Potencijal primjene bakteriocina bakterija mliječne kiseline u proizvodnji mliječnih proizvoda

Petanjek, Zvjezdana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:302843

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

DIPLOMSKI RAD

Zvjezdana Petanjek

Zagreb, veljača, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

DIPLOMSKI RAD

Zvjezdana Petanjek

Mentor: Doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar

Zagreb, veljača, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Zvjezdana Petanjek**, JMBAG 2223072679, rođena dana 28.01.1989. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Zvjezdana Petanjek**, JMBAG 2223072679, naslova

POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. Doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar	mentor	_____
2. Prof. dr. sc. Dubravka Samaržija	član	_____
3. Doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit	član	_____

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Pregled dosadašnjih istraživanja 2

2.1. Bakteriocini 2
2.2. Karakteristike bakteriocina 3
2.2.1. Mehanizam djelovanja bakteriocina 4
2.2.2. Otpornost bakterija na bakteriocine 5
2.3. Primjena bakteriocina 6
2.4. Djelovanje bakteriocina na humani organizam 9

3. Bakteriocini bakterija mliječne kiseline 11

3.1. Razred I – lantibiotici 13
3.2. Razred II - peptidni bakteriocini 14
3.3. Razred III 14
3.4. Najznačajniji bakteriocini bakterija mliječne kiseline 16
3.4.1. Nizini 16
3.4.2. Pediocini 18
3.4.3. Lakticini 19
3.4.4. Enterocini 22
3.5. Čimbenici koji utječu na sintezu bakteriocina 23

4. Bakteriocini BMK u proizvodnji mliječnih proizvoda 26

4.1. Primjena bakteriocina u sprečavanju kvarenja mliječnih proizvoda 26
4.2. Primjena bakteriocina BMK u proizvodnji sireva 31

5. Zaključak 33

6. Popis literature 34

7. Prilog 41

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Zvjezdana Petanjek**, naslova

POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIOCINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

Bakteriocini su peptidi koji se sintetiziraju ribosomalno, a sintetizira ih većina bakterija. Djelovanje im može biti baktriostatsko ili baktericidno, te je najčešće usmjereno na srodne bakterijske vrste ili sojeve iste vrste. Većinu poznatih bakteriocina sintetiziraju bakterije mliječne kiseline, a neki od najbolje istraženih su nizin, pediocin, lakticin i enterocin. Mogu se koristiti kao biokonzervansi u proizvodnji mliječnih proizvoda u cilju sprječavanja rasta i razmnožavanja patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja, poboljšanja kvalitete i senzorskih svojstava sira te kao sredstvo za suzbijanje biofilmova u mljekarskim pogonima. Unatoč tome, danas se uz nizin komercijalno proizvodi još jedino pediocin PA-1/AcH, iako postoje i drugi, još nedovoljno istraženi bakteriocini, koji pokazuju potencijal primjene u proizvodnji mliječnih i drugih prehrambenih proizvoda.

Ključne riječi: bakteriocini, bakterije mliječne kiseline, mliječni proizvodi, patogene bakterije, bakterije uzročnici kvarenja

Summary

Of the master's thesis - student **Zvjezdana Petanjak,** entitled

POTENTIAL APPLICATIONS BACTERIOCINS OF LACTIC ACID BACTERIA IN PRODUCTION OF DAIRY PRODUCTS

Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides synthesized by most bacteria. Their action can be bacteriostatic or bactericidal, and is usually directed against closely related bacterial species or strains of the same species. Most of the known bacteriocins are synthesized by lactic acid bacteria, while some of the most studied ones are nisin, pediocin, lacticin and enterocin. They can be used as biopreservatives in the production of dairy products to prevent the growth of pathogenic and spoilage bacteria and to improve the quality and sensory properties of cheese. Bacteriocins can be used to control biofilms in dairy plants. Despite that, only pediocin PA-1/AcH is currently produced commercially alongside nisin, although there are other, still underinvestigated bacteriocins, that show potential for application in dairy and other food products.

Keywords: bacteriocins, lactic acid bacteria, dairy products, pathogenic bacteria, spoilage bacteria

1. Uvod

Bakteriocini predstavljaju različitu skupinu peptida koji se sintetiziraju ribosomalno, a tvori ih većina bakterija i neke arheje. Mogu imati bakteriostatsko ili baktericidno djelovanje koje može biti užeg ili šireg spektra, najčešće je usmjereno na srodne bakterijske vrste ili sojeve iste vrste, a bakterije koje ih sintetiziraju posjeduju specifične imunosne sustave koji ih štite od djelovanja vlastitih bakteriocina. Zbog svoje aktivnosti protiv niza patogenih bakterija i bakterija kvarenja, bakteriocini su sigurni biokonzervansi zbog čega su izuzetno važni za mljekarsku i prehrambenu industriju (Chen i Hoover, 2003; Nandane i sur., 2007). Također, bakteriocini se sve više primjenjuju i u humanoj medicini kao alternativa konvencionalnim antibioticima na koje su mnoge bakterije razvile otpornost. Bakteriocini su sigurni za upotrebu budući da ne djeluju toksično na humani organizam te se lako razgrađuju u probavnom sustavu (Perez i sur., 2014).

Najvažniji izvor bakteriocina predstavljaju bakterije mliječne kiseline (BMK), koje su prirodno prisutne u hrani i imaju dugu tradiciju upotrebe u proizvodnji mliječnih proizvoda. Mogu se koristiti izravno, u pročišćenom ili polu-pročišćenom obliku ili neizravno primjenom BMK koje ih tvore, mikrobnih mljekarskih kultura ili zaštitnih kultura. Također se mogu koristiti u proizvodnji mliječnih proizvoda u svrhu sprečavanja rasta i razmnožavanja patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja, poboljšanja kvalitete i senzornih svojstava sira (Beshkova i Frengova, 2012; Silva i sur., 2018).

Najistraženiji bakteriocin BMK je nizin, bakteriocin bakterije *Lactococcus lactis* koji je i uvršten na europsku listu dopuštenih prehrambenih aditiva. Osim nizina, komercijalno se proizvodi jedino pediocin PA-1/AcH, unatoč tome što su dosadašnja istraživanja potvrdila da su i drugi bakteriocini sigurni za korištenje i da se mogu koristiti kao biokonzervansi u proizvodnji mliječnih proizvoda (Silva i sur., 2018).

Cilj diplomskog rada je na temelju dosadašnjih rezultata istraživanja dati pregled mogućnosti primjene različitih vrsta bakteriocina BMK u proizvodnji mliječnih proizvoda.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

2.1. Bakteriocini

Pasteur i Joubert 1877. godine uočili su da bakterije mogu imati inhibitorno djelovanje na druge bakterije, a 1925. belgijski znanstvenik Gratia zaključio je da filtrati bakterije *Escherichia coli* imaju sposobnost inhibicije rasta drugih sojeva iste vrste. Te su tvari stoga prema bakteriji koja ih sintetizira nazvane kolicinima. 1948. godine Fredricq je došao do sličnih saznanja vezano uz različite sojeve bakterija *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella* i *Proteus*, te je kolicine opisao kao proteine koji imaju ograničeni raspon djelovanja koji ovisi o prisutnosti specifičnih receptora na površini osjetljivih stanica. Naziv „bakteriocin“ prvi puta je upotrijebljen 1953. godine, a danas je poznato da većina bakterija, točnije njih oko 99%, stvara barem jedan bakteriocin, a također ih sintetiziraju i neke arheje (Nandane i sur., 2007; Imran, 2016). Imran (2016) navodi da je u 30 – 50% sojeva bakterije *Escherichia coli* izoliranih u ljudi pronađen bakteriocin kolicin koji se smatra faktorom virulencije. Kolicin je najistraženiji bakteriocin među onima gram-negativnih bakterija. Bakterija *Escherichia coli* osim kolicina može sintetizirati i bakteriocin mikrocin, koji je po svojim karakteristikama (termostabilnost, otpornost na neke proteaze, otpornost na ekstremne pH vrijednosti, relativna hidrofobnost) sličniji bakteriocinima gram-pozitivnih bakterija nego kolicinu.

Bakteriocini su podijeljeni u četiri grupe na temelju: sojeva koji ih proizvode, mehanizmu djelovanja, molekulskoj masi i kemijskoj konfiguraciji (Lopez-Cuellar i sur., 2016). Bakteriocini gram-pozitivnih bakterija raznovrsniji su od onih gram-negativnih bakterija te oni čine i većinu danas poznatih bakteriocina. Tipičan primjer su bakterije mliječne kiseline (BMK) koje sintetiziraju bakteriocine koji se međusobno razlikuju prema veličini, strukturi, fizikalno-kemijskim svojstvima i inhibitornom djelovanju (Hammami i sur., 2013; Imran, 2016). Iako je antimikrobno djelovanje bakteriocina bilo poznato puno ranije, tek su se 1951. godine počeli koristiti u proizvodnji prehrambenih proizvoda, a BMK postale su značajne zbog inhibicijskog djelovanja na gram-pozitivne patogene bakterije koje mogu kontaminirati hranu. Nizin, kojeg sintetizira bakterija *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, otkriven je 1928. godine i najbolje je istraženi bakteriocin, a počeo se koristiti za konzerviranje hrane 50.-ih godina prošlog stoljeća. Prva primjena nizina u nekom mliječnom proizvodu bila je u siru s ciljem inhibicije rasta klostridija i sprečavanja kasnog nadimanja. Godine 1969., nizin je priznat kao konzervans od

strane Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), dok ga je američka Uprava za hranu i lijekove (FDA) 1988. godine odobrila kao prehrambeni aditiv za upotrebu u pasteriziranom sirnom namazu, te u konzerviranim proizvodima u svrhu inhibicije rasta bakterije *Clostridium botulinum*. Danas se uz nizin komercijalno proizvodi još jedino pediocin PA-1/AcH, iako postoje i drugi, još nedovoljno istraženi bakteriocini, koji pokazuju potencijal primjene u mliječnim i drugim prehrambenim proizvodima (Jones i sur., 2005; Nandane i sur., 2007; Silva i sur., 2018).

2.2. Karakteristike bakteriocina

Iako bakteriocini imaju antibiotska svojstva, oni se ne klasificiraju kao antibiotici, od kojih su različiti po brojnim karakteristikama. Bakteriocini su mali peptidi koji se sintetiziraju na ribosomima tijekom lag faze rasta, dok su antibiotici sekundarni metaboliti. Budući da je biosinteza bakteriocina relativno jednostavna, putem bioinženjeringa lako se može pojačati njihova aktivnost ili djelovanje na određenu bakterije. Aktivnost bakteriocina je užeg spektra, odnosno bakteriocini određene vrste bakterija aktivni su protiv sojeva iste vrste ili srodnih vrsta, dok antibiotici imaju široki spektar djelovanja. Bakteriocini djeluju na način da formiraju pore ili inhibiraju biosintezu stanične stijenke, dok antibiotici djeluju na staničnoj membrani ili unutarstaničnim ciljevima. Bakteriocini su termostabilni i aktivni u širokom rasponu pH vrijednosti nasuprot antibioticima koji su termolabilni i aktivni u uskom rasponu pH vrijednosti. Bakteriocini nemaju boju, okus i miris, a antibiotici imaju. Dok su bakteriocini sigurni za konzumaciju zahvaljujući tome što ih proteolitički enzimi lako razgrađuju, antibiotici imaju nisku razgradivost. Osim toga, bakteriocini uglavnom nisu toksični za eukariotske stanice, dok antibiotici jesu. Ciljne stanice mogu razviti rezistentnost na bakteriocine ili antibiotike. Rezistentnost na bakteriocine ostvaruje se prilagodbom putem promjena u sastavu stanične membrane, dok se rezistentnost na antibiotike ostvaruje genetskim promjenama kojima se inaktivira aktivna komponenta. Na kraju, bakteriocini se primjenjuju u prehrambenoj industriji te imaju i kliničku primjenu, dok se antibiotici mogu primjenjivati samo klinički (Chen i Hoover, 2003; Zacharof i Lovitt, 2012; Perez i sur., 2014).

2.2.1. Mehanizam djelovanja bakteriocina

Bakteriocini koje sintetiziraju gram-pozitivne bakterije djeluju prvenstveno na širi i/ili uži spektar drugih gram-pozitivnih bakterija, a djelovanje im može biti baktericidno sa ili bez lize stanice, ili bakteriostatsko (Silva i sur., 2018). Za mnoge bakteriocine (lantibiotici tipa A i bakteriocini razreda II) glavno mjesto djelovanja je citoplazmatska membrana bakterija, odnosno primarni receptori su anionski lipidi citoplazmatske membrane (McAuliffe i sur., 2001; Zacharof i Lovitt, 2012). Bakteriocini na njoj formiraju pore, čime izazivaju raspršivanje, to jest gubitak protonske motorne sile, koju čine pH gradijent i membranski potencijal, a koja služi za sintezu ATP-a i akumulaciju metabolita putem transportnih sustava u membrani. Na taj način stanica gubi osnovni izvor energije, što dovodi do njene smrti. Lantibioticima tipa A za djelovanje nije potreban proteinski receptor, no aktivnost nizina ovisi o koncentraciji lipida II, koji je prekursor u sintezi peptidoglikana, odnosno nužan je za sintezu stanične stijenke. Interakcijom s lipidom II povećava se sposobnost nizina da se veže za membranu, ošteti lipidni dvosloj i formira pore, što znači da osjetljivost pojedinih vrsta bakterija na nizin ovisi o sastavu njihove citoplazmatske membrane. Nizin formira stabilne pore koje imaju promjer od približno 1 nm. Za formiranje i otvaranje pora od strane nizina, važno je energetsko stanje bakterijske stanice, to jest električni transmembranski potencijal. Nizin, kao i neki drugi lantibiotici i bakteriocini razreda II, također može djelovati na način da cilja lipid II i inhibira sintezu stanične stijenke, ali u usporedbi sa formiranjem pora to je sporiji proces (McAuliffe i sur., 2001).

Lantibiotici tipa B mogu djelovati na način da remete osnovne enzimatske aktivnosti te mogu inhibirati sintezu peptidoglikana, povećati permeabilnost membrane, formirati komplekse sa lipidom II ili inhibirati bakterijsku fosfolipazu A2. Bakteriocini razreda IIa djeluju na način da uzrokuju gubitak protonske motorne sile ili formiraju sitne pore. Budući da se bakteriocini razreda IIb sastoje od dva peptida, oba su potrebna za formiranje hidrofilnih pora i povećanje permeabilnosti membrane. U razredu IIc nalaze se strukturno različiti bakteriocini sa različitim djelovanjem, poput permeabilizacije membrane, inhibicije stvaranja septuma i aktivnosti feromona. Lakticin Q ubraja se u razred IId i on se, primjerice, veže s vanjske strane lipidnog dvosloja te formira velike pore prosječnog promjera većeg od 4,6 nm, a za njegovo djelovanje nije potreban lipid II. Bakteriocini razreda III kataliziraju hidrolizu stanične stijenke, odnosno autolizu bakterijske stanice (Paiva i Breukink, 2013).

Kako bi se bakterijske stanice zaštitile od djelovanja vlastitih bakteriocina, sintetiziraju specifične imunosne proteine, a geni odgovorni za njihovu proizvodnju genetski su bliski genima za sintezu samih bakteriocina te se obično nalaze na istom operonu. U zaštiti lantibiotika zajednički sudjeluju dva imunosna sustava, odnosno imunosni proteini LanI i LanFEG. LanI se nalazi s vanjske strane citoplazmatske membrane te sprječava bakteriocin da formira pore, dok LanFEG kontrolira koncentraciju bakteriocina u membrani na način da molekule bakteriocina koje su se smjestile u membrani transportira izvan membrane.

Kod bakteriocina razreda II imunosni protein se uglavnom većim dijelom nalazi u citoplazmi, a samo mali dio je povezan sa membranom. Ta interakcija imunosnog proteina sa citoplazmatskom membranom štiti bakterijsku stanicu od djelovanja bakteriocina. Imunosni protein može varirati u veličini te se može sastojati od 51 do 254 aminokiseline (Chen i Hoover, 2003; Zacharof i Lovitt, 2012).

2.2.2. Otpornost bakterija na bakteriocine

Kao i u slučaju konvencionalnih antibiotika, dugotrajna primjena bakteriocina, to jest izloženost patogenih bakterija ili uzročnika kvarenja bakteriocinima, može dovesti do razvoja otpornosti na iste. Iako brzo djelovanje bakteriocina u velikoj mjeri smanjuje mogućnost razvoja otpornosti kod osjetljivih bakterija, i dalje je moguća pojava mutiranih bakterijskih stanica. Učestalost pojave otpornosti, kao i mehanizmi putem kojih se ona javlja, mogu se razlikovati i između sojeva istih vrsta bakterija. Otpornost na neki bakteriocin može biti stečena i pojaviti se kod bakterija koje su prethodno na njega bile osjetljive ili može biti urođena. Nekoliko genskih lokusa povezuje se sa otpornošću na bakteriocine. Ako mutacije na određenom genu uzrokuju osjetljivost na bakteriocin, tada je taj gen odgovoran za urođenu otpornost. S druge strane, ako mutacije na genu dovedu do razvoja otpornosti, tada ga se povezuje sa stečenom otpornošću. Mehanizmi putem kojih se ostvaruje otpornost obično su povezani sa promjenama u staničnom omotaču bakterija. Te promjene mogu uzrokovati smanjeno vezivanje ili umetanje bakteriocina, odstranjivanje bakteriocina, izbacivanje bakteriocina putem efluks pumpi i razgradnju bakteriocina (Bastos i sur., 2015).

Najviše istraživanja provedeno je u vezi sa otpornošću bakterija na nizin, pediocin i lakticin 3147 (Bastos i sur., 2015). Gravesen i sur. (2002) proveli su istraživanje o razvoju otpornosti kod bakterije *Listeria monocytogenes* na pediocin PA-1 i nizin A. Naglasak je bio na

razlikama između različitih sojeva i utjecaju okolišnih uvjeta (pH, NaCl, temperatura). Utvrđene su značajne razlike u frekvencijama razvoja otpornosti s obzirom na korišteni bakteriocin, sojeve bakterije i okolišne uvjete. Razvoj otpornosti na pediocin PA-1 testiran je na 20 sojeva *Listeria monocytogenes*, od kojih je pet bilo potpuno otporno, devet je imalo srednje pojačanu otpornost, a šest sojeva je bilo osjetljivo na pediocin. Razvoj otpornosti na nizin A utvrđen je za 14 sojeva. Četiri soja imala su srednje pojačanu otpornost na nizin, dok je ostalih deset sojeva bilo osjetljivo na nizin. Okolišni uvjeti, odnosno snižena temperatura (10°C u odnosu na 30°C), pH vrijednost (5,5 u odnosu na 6,5) i dodatak NaCl (6,5%), nisu imali utjecaj na frekvenciju otpornosti na pediocin PA-1, ali je otpornost na nizin A u takvim uvjetima značajno smanjena. Jydegaard i sur. (2000) istraživali su mehanizam inaktivacije bakterije *Listeria monocytogenes* 412 nizinom i pediocinom te su utvrdili kako ona ovisi o bakterijskoj fazi rasta. Stanice su u stacionarnoj fazi rasta bile otpornije na oba bakteriocina nego u eksponencijalnoj fazi rasta. Također je utvrđeno da dodatak natrijevog klorida (6,5%) ili snižena temperatura (5°C) pojačavaju toleranciju bakterije na pediocin. Bastos i sur. (2015) navode istraživanje koje su proveli autori Rasch i Knøchel, a u kojem je proučavana otpornost *Listeria monocytogenes* na nizin i pediocin. Korišten je 381 soj, od kojih niti jedan nije bio prirodno otporan na nizin, a samo dva soja imala su pojačanu toleranciju na nizin. Nadalje, 20 sojeva je bilo otporno na pediocin, dok su 34 soja imala pojačanu toleranciju na pediocin.

2.3. Primjena bakteriocina

Antibakterijska svojstva bakteriocina čine ih pogodnima za primjenu u različitim područjima, a posebno u prehrambenoj industriji. Mogu se koristiti kao sredstvo poboljšanja sigurnosti i kvalitete te poboljšanja senzornih svojstava različitih namirnica kao što su mliječni ili mesni proizvodi, jaja i povrće. Osim u samim namirnicama, bakteriocini se mogu koristiti kao sredstvo protiv stvaranja biofilmova koji se formiraju na opremi u pogonima. Također se koriste i u farmaceutskoj industriji i medicini, a svoju primjenu našli su i u proizvodima poput sapuna ili zubne paste (Zacharof i Lovitt, 2012; Perez i sur., 2014).

Bakteriocini mogu biti sastojak antimikrobnih filmova i premaza koji služe kao barijera između određene namirnice i okoliša, a koji su sastavljeni od tankih slojeva biopolimera u koje se bakteriocini mogu inkorporirati. Takvi filmovi i premazi koriste se za poboljšanje sigurnosti i kvalitete namirnica pri tom ne mijenjajući njihova senzorska i nutritivna svojstva. Tako se u

proizvodnji sireva najčešće koriste biopolimeri poput proteina i polisaharida, koji su pogodni za inkorporaciju bakteriocina ili bakterija koje ih sintetiziraju. Njihovom upotrebom može se inhibirati rast patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja, spriječiti naknadna kontaminacija, poboljšati stabilnost i sigurnost te produžiti rok trajnosti mliječnih proizvoda (Valdés i sur., 2017; Silva i sur., 2018). Antimikrobni filmovi mogu se koristiti i kao dio ambalaže sireva kako bi se spriječio rast patogenih bakterija na njihovoj površini. Film mora biti u direktnom doticaju sa površinom sira kako bi se bakteriocini po njoj mogli raširiti i učinkovito djelovati (Nandane i sur., 2007).

Bakteriocini se mogu koristiti u kombinaciji sa kemijskim aditivima, ili sa drugim postupcima koji mogu uključivati primjenu visokih temperatura, visokog tlaka ili pulsirajućeg električnog polja. Kemijski aditivi koji se obično koriste su EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), natrijev laktat i kalijev diacetat. Etilendiamintetraoctena kiselina se koristi kako bi se oštetila vanjska membrana gram-negativnih bakterija te kako bi one postale osjetljive na djelovanje bakteriocina. Primjena visokih temperatura učinkovito djeluje na bakterije koje su otporne na pojedine bakteriocine. Postupci primjene visokog tlaka i pulsirajućeg električnog polja, također uzrokuju osjetljivost gram-negativnih bakterija na bakteriocine. Učinkovitost djelovanja bakteriocina može se povećati i primjenom više različitih bakteriocina zajedno (Nandane i sur., 2007).

Osim u proizvodnji mliječnih proizvoda, bakteriocini, a posebno lantibiotici, imaju veliki potencijal za primjenu kao sredstvo u borbi protiv formiranja biofilmova. Biofilmovi su zajednice jedne ili više vrsta mikroorganizama koje mogu nastaniti različite biotičke i abiotičke površine te predstavljaju velik izazov u prehrambenoj industriji, kao i u bolničkom okruženju. Bakterije koje se nalaze u biofilmu često su otporne na antibiotike i fizikalni i kemijski stres te mogu preživjeti u iznimno nepovoljnim uvjetima. U mljekarskim pogonima rizik predstavljaju biofilmovi nastanjeni primjerice bakterijama *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, kao i pojedinim gram-negativnim bakterijama, koje uzrokuju bolesti koje se prenose hranom. Mogu se formirati na vlažnim površinama, podu, odvodima, zidovima, raznoj opremi, dijelovima pasterizatora, tankovima za mlijeko, drvenim površinama poput polica u zrionama i ostalom (Marino i sur., 2013; Mathur i sur., 2018). Teh i sur. (2015) navode kako bakteriocini mogu značajno smanjiti broj bakterija tijekom ranih faza prianjanja i formiranja biofilma. Provedena su brojna istraživanja kako bi se utvrdio učinak bakteriocina poput nizina, enterocina i sakacina 1 na biofilmove koje formira bakterija *Listeria*

monocytogenes na metalnim i plastičnim površinama. Rezultati istraživanja pokazali su da bakteriocini usporavaju, ali ne sprječavaju nastajanje biofilma. Utvrđeno je da jedino enterocin AS-48 može u potpunosti inhibirati formiranje biofilma tijekom 24 sata (Rodríguez-López i sur., 2018). Također, enterocin AS-48 učinkovit je kada se *Listeria monocytogenes* nalazi u planktonskom obliku, dok su stanice u sesilnom obliku otporne na dozu od 10 µg/ml bakteriocina. Nadalje, primjena niskih koncentracija bakteriocina može čak i potaknuti nastajanje biofilma. Enterocin AS-48 djelotvoran je u inhibiciji biofilma koje stvara bakterija *Listeria monocytogenes* u sesilnom obliku kada se primjenjuje u visokim koncentracijama (50 µg/ml) i kombinira sa pojedinim biocidima (Mathur i sur., 2018).

U borbi protiv *Listeria monocytogenes* može se koristiti i nizin. U jednom istraživanju utvrđena je učinkovitost djelovanja nizina u kombinaciji sa esencijalnim uljem cinamaldehidom i limunskom kiselinom na soj *Listeria monocytogenes* F2635. Derivat nizina, M21A, je u koncentraciji od 0,1 µg/ml također bio iznimno učinkovit u sprječavanju stvaranja biofilmova soja *Listeria monocytogenes* F2635, kako samostalno, tako i u kombinaciji sa cinamaldehidom i limunskom kiselinom. Iako biofilmovi u kasnijoj fazi pokazuju otpornost na nizin, on se pokazao korisnim u primjeni protiv planktonskih stanica i u ranoj fazi formiranja biofilma, odnosno može inhibirati nastajanje te smanjiti životnu aktivnost već formiranog biofilma. Protiv biofilmova koji su otporni na nizin učinkovita je kombinirana primjena nizina sa enterocinom, kao i sa niskom pH vrijednošću i visokim hidrostatskim pritiskom. Osim na bakteriju *Listeria monocytogenes*, nizin učinkovito djeluje i na druge bakterije, primjerice 4000 IJ/ml nizina smanjuje formiranje biofilma bakterija *Staphylococcus aureus* za 30% te gram-negativne *Salmonelle enteritidis* za 87%. Nizin u kombinaciji sa polimiksinom djeluje inhibicijski i na biofilm drugih gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli* ili *Pseudomonas aeruginosa*, koja je česti uzročnik bolničkih infekcija. Ovi podaci ukazuju i na potencijal kliničke primjene bakteriocina. Nizin je u kombinaciji sa pojedinim antibioticima, kao i sa bakteriocinima nukacinom ISK-1 ili lakticinom Q, djelotvoran protiv formiranja biofilmova MRSA-e (Mathur i sur., 2018). Također se pokazalo da se bakteriocini mogu koristiti protiv biofilmova koje formira bakterija *Streptococcus pneumoniae*, uzročnik infekcije dišnih puteva (Wang i Liu, 2016;).

2.4. Djelovanje bakteriocina na humani organizam

Upotreba konvencionalnih antibiotika može izazvati promjene u mikroflori probavnog sustava, što može rezultirati raznim probavnim poremećajima i bolestima te narušenim imunitetom. Pojedini bakteriocini mogu poslužiti kao alternativa antibioticima u kontroli infekcija izazvanih raznim patogenim bakterijama, bez štetnog učinka na organizam. Bakteriocini bi u probavnom sustavu mogli djelovati na više načina. Jedan je da djeluju kao kolonizirajući peptidi. U probavnom sustavu stanice su gusto naseljene, odnosno stanice istih ili različitih bakterijskih vrsta dolaze u bliski kontakt. Bakterije koje sintetiziraju bakteriocine stoga mogu biti u prednosti budući da oni mogu djelovati na susjedne osjetljive bakterije. Bakteriocini u većim koncentracijama imaju inhibitorno djelovanje, dok se u manjim koncentracijama mogu ponašati kao signalni peptidi te potaknuti aktivaciju imunosnog sustava. Pročišćeni bakteriocini imaju potencijal primjene protiv patogenih bakterija rezistentnih na antibiotike bez negativnih posljedica na organizam (Dobson i sur., 2012; Arques i sur., 2015; López-Cuellar i sur., 2016). Arques i sur. (2015) navode nekoliko istraživanja provedenih na temu učinka bakteriocina na probavni sustav. Potkožna aplikacija lakticina 3147 na miševima pokazala se učinkovitom protiv bakterije *Staphylococcus aureus*. Pregledom jetre, bubrega i slezene šest sati nakon primjene utvrđena je uspješna kontrola širenja bakterije. Lakticin 3147 također bi mogao biti djelotvoran u tretiranju dijareje izazvane bakterijom *Clostridium difficile*, iako podaci pokazuju da se pri oralnom uzimanju brzo razgrađuje u probavnom sustavu. Primjena bakterija koje sintetiziraju bakteriocine i mogu preživjeti u probavnom sustavu stoga može biti bolja opcija od izravne primjene bakteriocina, s obzirom da se na taj način izbjegava proteoliza tijekom prolaska kroz želudac. U jednom istraživanju provedenom na štakorima proučavan je učinak primjene pročišćenog nizina i soja *Lactococcus lactis* CHCC 5826 koji sintetizira nizin, na sastav crijevne mikroflore. Primjena bakterije povećala je razinu bifidobakterija, a smanjila razinu enterokoka i streptokoka u fecesu. Takav učinak nije uočen kod primjene pročišćenog nizina. Dobson i sur. (2012) s druge strane u istraživanju navode da iako prolazak bakterije *Lactococcus lactis* DPC6520 kroz gastrointestinalni sustav nije utjecao na njezinu sintezu lakticina 3147, u uzorcima fecesa nije utvrđena aktivnost te bakterija nije imala utjecaja na *Clostridium difficile*. Iako se bakteriocini mogu sintetizirati i zadržati aktivnost u probavnom sustavu, utvrđivanje prisutnosti i

djelovanja bakteriocina u tako kompleksnom okruženju i dalje može predstavljati izazov (Arques i sur., 2015).

Nizin i lakticin 3147 učinkoviti su protiv sojeva bakterije *Clostridium difficile*, no rezultati pojedinih istraživanja pokazuju da ti bakteriocini ipak nisu najbolji izbor u liječenju crijevnih infekcija. Bakteriocin koji bi se koristio u tu svrhu trebao bi imati uzak spektar aktivnosti, odnosno ciljno inhibitorno djelovanje na određeni patogen, a poznato je da nizin i lakticin 3147 imaju široki spektar djelovanja usmjeren u najvećoj mjeri prema gram-pozitivnim bakterijama. Stoga osim na patogenu bakteriju također imaju štetno djelovanje i na normalnu crijevnu mikrofloru (Rea i sur., 2013). Rea i sur. (2011) istražili su djelovanje antibiotika vankomicina i metronidazola te bakteriocina lakticina 3147 na bakteriju *Clostridium difficile*, kao i njihov utjecaj na mikrofloru debelog crijeva. Primjenom svake od triju antimikrobnih supstanci značajno se smanjio broj stanica *Clostridium difficile*, no također je došlo i do većih promjena u sastavu crijevne mikroflore, odnosno manje raznovrsnosti zbog velikog povećanja broja enterobakterija te smanjenja broja bakteroida. Ne zna se da li je lakticin 3147 imao izravan utjecaj na bakteroide ili su nastale promjene povezane sa njegovim djelovanjem na druge bakterije. Lakticin 3147 također negativno utječe na laktobacile i bifidobakterije. Autori navode bakteriocin turicin CD kao bolji izbor u liječenju infekcija izazvanih *Clostridium difficile*. To je bakteriocin kojeg sintetizira bakterija *Bacillus thuringiensis*, a ima uzak spektar aktivnosti i ciljno djelovanje protiv *Clostridium difficile*, koje je jednako učinkovito kao i ono lakticina 3147. Nadalje, turicin CD ne uzrokuje značajne promjene u sastavu crijevne mikroflore te nakon nekoliko sati nestaje iz crijeva čime se smanjuje mogućnost da patogen na njega razvije otpornost.

Osim u liječenju gastrointestinalnih infekcija, bakteriocini, a posebno lantibiotici, uspješno se primjenjuju u liječenju kožnih, dišnih i urogenitalnih infekcija, a nizin se također pokazao djelotvornim u liječenju mastitisa kod ljudi (Hammami, 2013). López-Cuellar i sur. (2016) navode i potencijal primjene nizina i bakteriocina koje sintetizirai *Enterococcus mundtii* u liječenju određenih vrsta raka kao što su rak dojke, debelog crijeva ili pluća.

3. Bakteriocini bakterija mliječne kiseline

Tijekom godina, podjela bakteriocina mijenjala se više puta, a prvotna se sastojala od četiri razreda koji su formirani s obzirom na strukturu i djelovanje bakteriocina. U razred I svrstani su lantibiotici, u razred II peptidni bakteriocini, u razred III proteinski bakteriocini i u razred IV kompleksni bakteriocini. Današnja podjela bakteriocina bakterija mliječne kiseline najčešće uključuje tri razreda. U razredu I nalaze se lantibiotici, u razredu II bakteriocini bez lantionina te u razredu III veliki termolabilni proteini (Leroy i De Vuyst, 2010; Imran, 2016).

Općenito, biosinteza bakteriocina odvija se na ribosomima, a geni odgovorni za njihovu sintezu mogu biti smješteni na kromosomima, plazmidima ili transpozonima (pokretni genetički elementi) te su organizirani kao operoni, odnosno nakupine gena. U većini slučajeva bakteriocini se sintetiziraju kao neaktivni prepeptidi koji na N-terminalnom kraju sadrže vodeći peptid povezan sa propeptidom na C-terminalnom kraju. Vodeći peptid ima više funkcija. Djeluje kao mjesto prepoznavanja te usmjerava prepeptide prema transportnim proteinima. Također komunicira sa propeptidom na C-terminalnom kraju, te održava bakteriocine unutar bakterije koja ih sintetizira u neaktivnom obliku kako bi zaštitili samu bakteriju (Chen i Hoover, 2003; Perez i sur., 2014).

U sintezi lantibiotika sudjeluju geni koji kodiraju za prepeptid (LanA), enzimi potrebni za reakcije modifikacije (LanB, LanC/LanM), proteaze koje uklanjaju vodeći peptid (LanP), ABC-transportni proteini koji sudjeluju u translokaciji peptida (LanT), regulacijski proteini (LanR, LanK) te proteini koji sudjeluju u stvaranju imuniteta stanice koja sintetizira bakteriocin (LanI, LanFEG). Translacijom prepeptida započinje biosinteza lantibiotika. Prepeptid sadrži vodeći peptid i propeptid, a propeptid je dio koji zatim prolazi kroz modifikaciju.

Bakteriocini razreda II također se sintetiziraju kao neaktivni prepeptidi, no oni ne prolaze posttranslacijske modifikacije poput lantibiotika. Nakon translacije prepeptida, specifični enzimi uklanjaju vodeći peptid, te ABC-transporter provodi translokaciju u vanstanični prostor, odnosno otpušta se zreli bakteriocin (Perez i sur., 2014).

Za regulaciju biosinteze bakteriocina odgovorni su regulacijski sustavi koji se sastoje od dva signalna proteina, histidin proteinske kinaze (HPK) i regulatora citoplazmatskog odgovora (RR – response regulator). HPK autofosforilira konzervirani histidinski ostatak kada detektira određenu količinu bakteriocina u okolini. Zatim se fosforilna skupina prebacuje na

asparaginsku kiselinu na RR mjestu, čime se događa intramolekularna promjena koja potiče RR da aktivira trakskripciju gena (McAuliffe i sur., 2001; Chen i Hoover, 2003).

Mlijeko i pojedini mliječni proizvodi savršena su sredina za rast bakterija uzročnika kvarenja i patogenih bakterija. Opasnost u mljekarskoj industriji predstavljaju patogene bakterije: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium tyrobutyricum* i druge. Iako se u većini slučajeva u proizvodnji provodi postupak pasterizacije, moguća je naknadna kontaminacija ovim bakterijama. Primjenom pojedinih bakteriocina poput nizina, pediocina ili lakticina moguće je kontrolirati rast nepoželjnih bakterija u mliječnim proizvodima (Medina i Nuñez, 2011). Bakteriocini u mliječnim proizvodima mogu se koristiti na nekoliko načina (Nandane i sur., 2007; Silva i sur., 2018):

- pročišćeni ili polu-pročišćeni bakteriocini (prehrambeni aditivi)
- inokulirati bakterijama mliječne kiseline koje sintetiziraju bakteriocine
- inkorporirati bakteriocine u jestivi antimikrobni film ili premaz
- kombinirati bakteriocine sa drugim takozvanim tehnikama konzerviranja preprekama kao što su dodavanje kemijskih aditiva, primjena visokih temperatura ili visokog tlaka, kako bi se pojačalo njihovo djelovanje.

Bakteriocini koji se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda moraju udovoljavati određenim kriterijima. Primjerice, bakterije koje ih sintetiziraju moraju (Silva i sur., 2018): biti sigurne za primjenu u prehrabenim namirnicama, imati širok spektar djelovanja, imati visoku razinu aktivnosti, biti stabilne u širem pH i temperaturnom rasponu, biti stabilne i optimalno topive u pojedinoj namirnici. Osim toga, poželjno je i da poboljšavaju kvalitetu i okus hrane. Iako neki bakteriocini, poput primjerice lakticina 3147 ili enterocina AS-48, pokazuju potencijal u primjeni u prehrambenoj industriji, samo nizin i pediocin PA-1/AcH se komercijalno proizvode (Silva i sur., 2018).

Budući da su bakteriocini lako razgradivi, što dovodi do gubitka antibakterijske aktivnosti, korištenje BMK koje sintetiziraju bakteriocine često ima prednosti nad direktnim korištenjem bakteriocina (tablica 3.1.). Aplikacijom bakterija omogućena je kontinuirana sinteza bakteriocina, a pojedini sojevi mogu sintetizirati i veći broj bakteriocina, odnosno djelovati na veći broj nepoželjnih bakterija. Upravo zbog toga, određene bakterije mogu se koristiti kao zaštitne mikrobne mljekarske kulture (Zendo, 2013). Njihovo korištenje također smanjuje troškove proizvodnje u odnosu na korištenje bakteriocina. Ukoliko se mikrobne

mljekarske kulture koje mogu sintetizirati bakteriocine koriste u kombinaciji sa mikrobnim mljekarskim kulturama koje u svom sastavu imaju BMK, potrebno je odabrati one koje su otporne ili tolerantne na nizin, budući da nizin djeluje inhibitorno i na BMK (Silva i sur., 2018).

3.1. Razred I – lantibiotici

Lantibiotici su termostabilni mali peptidi molekulske mase <5 kDa koji su svoj naziv dobili zbog činjenice da sadrže jednu od nestandardnih aminokiselina lantionin (Lan). U strukturi lantibiotika također se nalazi i metil-lantionin (MeLan). Upravo te policikličke tioeterske aminokiseline tvore kovalentne veze s ostalim aminokiselinama čime nastaje specifična struktura lantibiotika. Osim lantionina i metil-lantionina, lantibiotici sadrže i nezasićene aminokiseline dehidroalanin (Dha) i dehidrobutirin (Dhb), a sve navedene aminokiseline nastaju post-translacijskim modifikacijama (Zacharof i Lovitt, 2012; Zendo, 2013; Perez i sur., 2014).

Lantibiotici se na temelju genetske organizacije mogu podijeliti u dvije grupe. U grupu I ubrajaju se nizin, epidermin, subtilin i Pep5. Kod tih bakteriocina modifikaciju provode dva odvojena enzima, LanB i LanC. Grupu II čine lakticin 481, citolizin, mersacidin i laktocin S, a modifikaciju provodi enzim LanM. Modificirani prepeptid, odnosno zreli propeptid se pomoću ABC-transportera LanT translocira preko citoplazmatske membrane. Kako bi se antibakterijska svojstva lantibiotika aktivirala, vodeći peptid, koji održava prepeptid neaktivnim, mora se ukloniti sa prepeptida, što čini proteaza LanP, te se otpušta zreli bakteriocin. Uklanjanje vodećeg proteina može se dogoditi prije, za vrijeme ili nakon izvoza iz stanice (McAuliffe i sur., 2001; Chen i Hoover, 2003).

Lantibiotici se s obzirom na strukturu i djelovanje mogu podijeliti u dvije grupe, odnosno na tip A i tip B. Tip A obuhvaća lantibiotike spiralnog izduženog oblika koje karakterizira pozitivan naboj i fleksibilnost te molekularna masa od 2 do 4 kDa. Djeluju na način da formiraju pore na membranama bakterija. Kao primjeri ove grupe lantibiotika mogu se navesti nizin, lakticin 3147 i lakticin 481. Lantibiotici tipa B su globularnog oblika i manje molekularne mase, od 2 do 3 kDa. Naboj im je ili negativan ili nemaju naboja, a djeluju putem inhibicije specifičnih staničnih enzimatskih reakcija. Predstavnici lantibiotika tipa B su primjerice mersacidin i cinamicin (Chen i Hoover, 2003; Zacharof i Lovitt, 2012).

3.2. Razred II - peptidni bakteriocini

Peptidni bakteriocini su peptidi molekularne mase do 10 kDa koji ne sadrže lantionin. Kao i lantibiotici, peptidni bakteriocini su relativno termostabilni. U ovaj razred uvršten je najveći broj bakteriocina, koji su podijeljeni u četiri podrazreda. Bakteriocini nalik pediocinu čine razred IIa. Karakteristični su po N-terminalnoj sekvenci Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Iako nemaju široki spektar antimikrobnog djelovanja, za mljekarsku industriju je od posebne važnosti činjenica da imaju visoku specifičnu aktivnost protiv patogene bakterije *Listeria monocytogenes*. Za njihovu primjenu u proizvodnji mliječnih proizvoda također je pozitivno što iskazuju nisku aktivnost protiv laktokoka. Primjer IIa bakteriocina je pediocin PA-1 (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010; Perez i sur., 2014). U razred IIb uvršteni su bakteriocini koji se sastoje od dvije komponente, odnosno od dva peptida. Budući da ti peptidi djeluju u sinergiji, oba su nužna kako bi IIb bakteriocini bili aktivni. Razred IIc čine cirkularni bakteriocini čija iznimno stabilna struktura nastaje povezivanjem N-terminalnog i C-terminalnog dijela peptidnom vezom. Zahvaljujući cirkularnoj strukturi, otporniji su na toplinski stres i proteolitičko djelovanje. U razred IId ubrajaju se ostali linearni bakteriocini koji se sastoje od jednog peptida i nisu nalik pediocinu, kao i bakteriocini koji se sintetiziraju bez N-terminalnih vodećih ili signalnih peptida (Zendo, 2013; Perez i sur., 2014).

3.3. Razred III

Bakteriocini razreda III su veliki termolabilni proteini molekulske mase veće od 30 kDa koji su od malog značaja za prehrambenu industriju te nisu toliko dobro istraženi kao ostali bakteriocini (Chen i Hoover, 2003). Perez i sur. (2014) predložili su da se bakteriocini ovog razreda nazivaju bakteriolizini.

Tablica 3.1. Klasifikacija različitih vrsta bakteriocina bakterija mliječne kiseline

Razred	Bakteriocini	Bakterija	Referenca
I-tip A	Nizin Z	*Lactococcus lactis*	Zendo (2013.)
	Nizin Q	*Lactococcus lactis*	Zendo (2013.)
	Lakticin 481	*Lactococcus lactis*	Chen i Hoover (2003.)
	Lakticin 3147	*Lactococcus lactis*	Zacharof i Lovitt (2012.)
I-tip B	Mersacidin	*Bacillus subtilis*	Nandane i sur. (2007.)
	Cinamicin	*Streptomyces cinnamoneus*	Nandane i sur. (2007.)
	Duramicin	*Streptomyces cinnamoneus*	Nandane i sur. (2007.)
IIa	Pediocin PA-1/Ach	*Pediococcus acidilactici*	Nandane i sur. (2007.)
	Enterocin NKR-5-3C	*Enterococcus faecium*	Zendo (2013.)
	Enterocin A	*Enterococcus faecium*	Zendo (2013.)
	Munditicin	*Enterococcus mundtii*	Zendo (2013.)
	Leukocin A	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	Zendo (2013.)
IIb	Laktokokin Q	*Lactococcus lactis*	Zendo (2013.)
	Laktokokin G	*Lactococcus lactis*	Zacharof i Lovitt (2012.)
	Enterocin NKR-5-3AZ	*Enterococcus faecium*	Zendo (2013.)
	Enterocin X	*Enterococcus faecium*	Zendo (2013.)
	Plantaricin A	*Lactobacillus plantarum*	Chen i Hoover (2003.)
IIc	Laktociklicin Q	*Lactococcus* sp.	Zendo (2013.)
	Leukociklicin Q	*Leuconostoc mesenteroides*	Zendo (2013.)
	Enterocin AS-48	*Enterococcus faecalis*	Silva i sur. (2018.)
	Acidocin B	*Lactobacillus acidophilus*	Nandane i sur. (2007.)
IId	Lakticin Q	*Lactococcus lactis*	Zendo (2013.)
	Lakticin Z	*Lactococcus lactis*	Zendo (2013.)
	Leukocin Q	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	Zendo (2013.)
	Leukocin N	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	Zendo (2013.)
III	Helveticin J	*Lactobacillus helveticus*	Nandane i sur. (2007.)
	Helveticin V-1829	*Lactobacillus helveticus*	Nandane i sur. (2007.)

Izvor: prilagođeno prema Chen i Hoover (2003)

3.4. Najznačajniji bakteriocini bakterija mliječne kiseline

3.4.1. Nizini

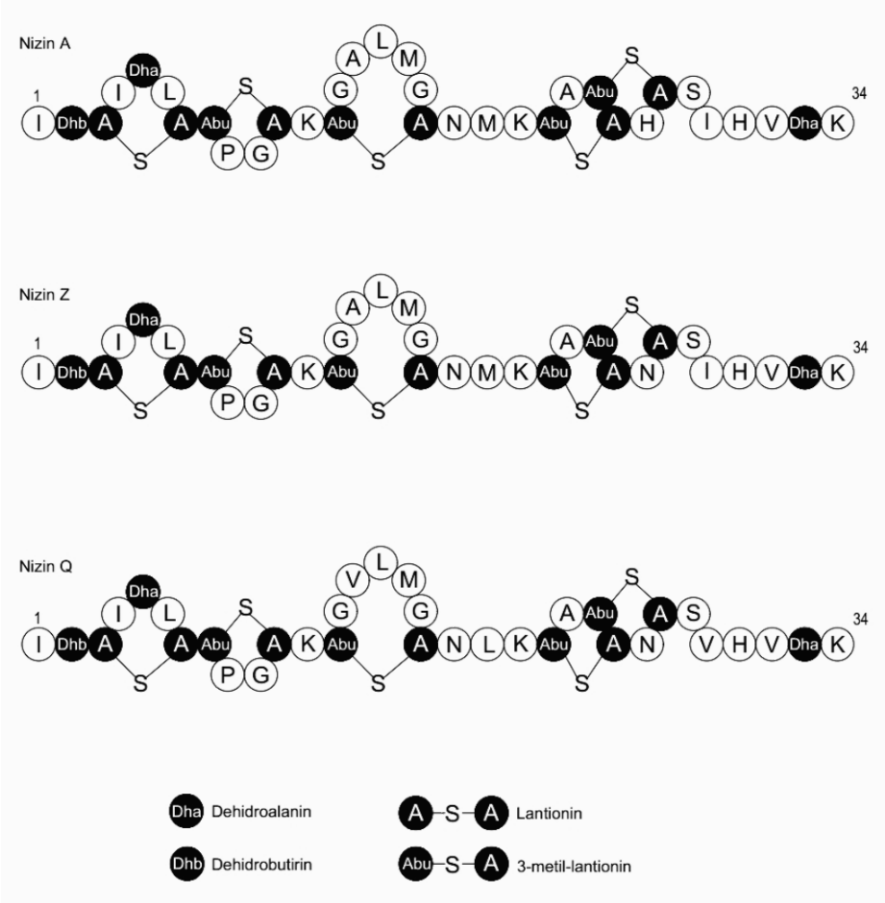
Nizin je jedan od dva komercijalno značajna bakteriocina te se nalazi na popisu prehrambenih aditiva pod nazivom E234, a sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Prvi puta je otkriven 1928., a 1969. godine odobren je od strane Svjetske zdravstvene organizacije. Komercijalni oblik nizina naziva se Nisaplin™, a proizvodi ga danska kompanija Danisco (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010).

Nizin je bakteriocin razreda I i tipa A čija molekulska masa iznosi 3,5 kDa. Struktura mu je pentaciklička, sastoji se od 34 aminokiseline te je termostabilan, a najbolje djeluje pri nižim pH vrijednostima. Kod dužeg zagrijavanja na 121°C pri pH vrijednosti 2 nizin ostaje stabilan, no ta se termostabilnost smanjuje pri višim pH vrijednostima od 5 do 7. Otporan je na probavne enzime tripsin, pepsin, erepsin, elastazu i karboksipeptidazu A, dok je osjetljiv na α-kimotripsin (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010; Zacharof i Lovitt, 2012). Silva i sur. (2018) navode kako je poznato osam varijanti nizina, od kojih četiri (A, Z, Q, F) sintetizira *Lactococcus lactis*, a ostalih četiri (U, U2, H, P) pojedini *Streptococcus* sojevi. Nizin A koristi se kao biokonzervans u prehrambenoj industriji zahvaljujući brzom antibakterijskom djelovanju i širokom spektru djelovanja. Struktura nizina A gotovo je jednaka onoj nizina Z, odnosno razlikuju se po tome što se kod nizina A na poziciji 27 nalazi histidin, dok se kod nizina Z nalazi asparagin. Nizin Q otkriven je u novije vrijeme, a po nekim se karakteristikama razlikuje od nizina A i nizina Z, iako je slične strukture (slika 3.1.). Sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* 61-14 koja je izolirana iz riječne vode. Od nizina Z razlikuje se u tri aminokiselinska ostatka te na poziciji 15 umjesto alanina sadrži valin, na poziciji 21 umjesto metionina sadrži leucin, i na poziciji 30 umjesto izoleucina sadrži valin, dok su razlike između nizina Q i nizina A iste, uz to da nizin Q još na poziciji 27 umjesto histidina sadrži asparagin. Također je otkriveno kako je nizin Q otporniji na oksidaciju od nizina A i Z, kojima oksidacija u većoj mjeri smanjuje aktivnost (Zendo, 2013; Perez i sur., 2014).

Nizin djeluje antibakterijski na brojne gram-pozitivne bakterije poput bakterija mliječne kiseline te bakterija kvarenja i patogenih bakterija kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ili *Mycobacterium tuberculosis*. Također djeluje na sporogene bakterije *Bacillus* spp. i *Clostridium* spp. te na vegetativni oblik stanica ima baktericidno djelovanje. Iako su spore tih bakterija osjetljivije na nizin od vegetativnih stanica, on ih ne uništava već ima

inhibitorno djelovanje na njihov rast. Zbog toga je za sprječavanje rasta spora nužna stalna prisutnost nizina u određenoj namirnici. Spore također postaju osjetljivije na nizin uslijed izloženosti visokim temperaturama (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010).

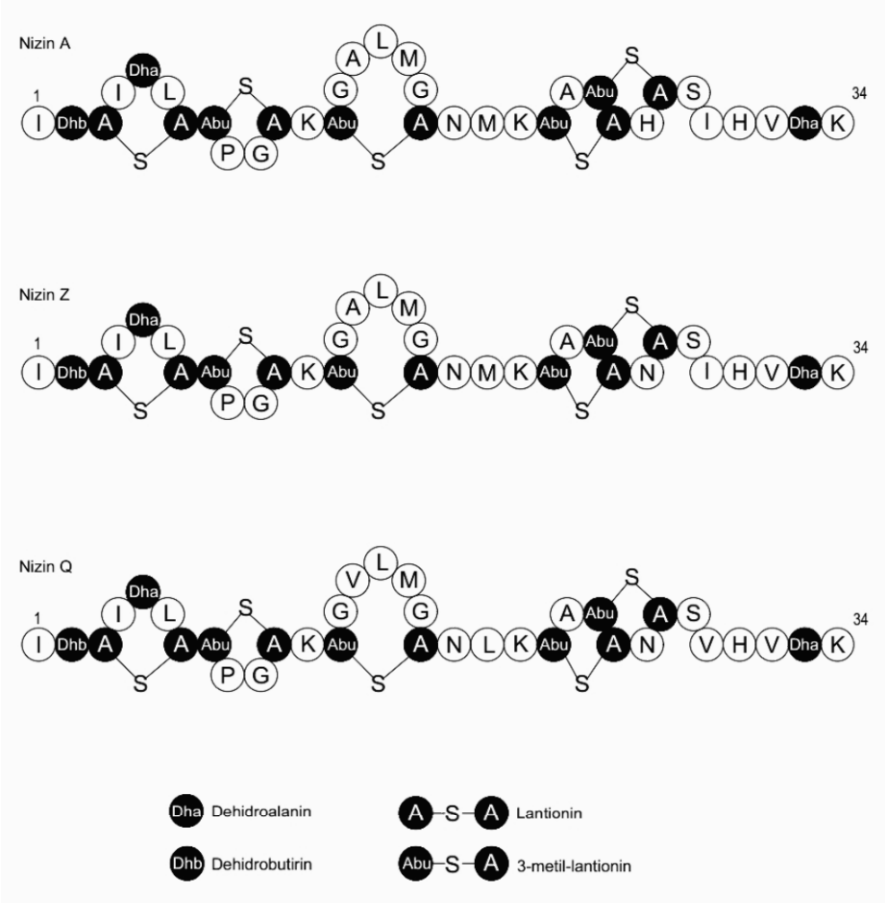
Djelotvornost nizina ovisi o više čimbenika. Primjerice, niska pH vrijednost i dodatak natrijevog klorida, temperatura, struktura, sastav i mikrobna populacija neke namirnice poboljšavaju aktivnost nizina. Nadalje, pojedini tehnološki postupci mogu utjecati na aktivnost nizina, poput na primjer homogenizacije mlijeka koja smanjuje njegovo djelovanje na bakteriju *Listeria monocytogenes*. Upotreba nizina u proizvodnji mliječnih proizvoda predstavlja izazov zbog svog inhibitornog djelovanja na mikrobne mljekarske kulture, slabe topivosti pri neutralnoj pH vrijednosti i mogućnosti pojave pogrešaka okusa. Iako gram-negativne bakterije nisu podložne utjecaju nizina, mogu postati osjetljive na njega zbog propusnosti vanjskog dijela membrane uslijed zagrijavanja ili zamrzavanja (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010; Silva i sur., 2018).



Slika 3.1. Prikaz strukture nizina A, Z i Q (prilagođeno prema Zendo, 2013.)

inhibitorno djelovanje na njihov rast. Zbog toga je za sprječavanje rasta spora nužna stalna prisutnost nizina u određenoj namirnici. Spore također postaju osjetljivije na nizin uslijed izloženosti visokim temperaturama (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010).

Djelotvornost nizina ovisi o više čimbenika. Primjerice, niska pH vrijednost i dodatak natrijevog klorida, temperatura, struktura, sastav i mikrobna populacija neke namirnice poboljšavaju aktivnost nizina. Nadalje, pojedini tehnološki postupci mogu utjecati na aktivnost nizina, poput na primjer homogenizacije mlijeka koja smanjuje njegovo djelovanje na bakteriju *Listeria monocytogenes*. Upotreba nizina u proizvodnji mliječnih proizvoda predstavlja izazov zbog svog inhibitornog djelovanja na mikrobne mljekarske kulture, slabe topivosti pri neutralnoj pH vrijednosti i mogućnosti pojave pogrešaka okusa. Iako gram-negativne bakterije nisu podložne utjecaju nizina, mogu postati osjetljive na njega zbog propusnosti vanjskog dijela membrane uslijed zagrijavanja ili zamrzavanja (Chen i Hoover, 2003; Leroy i De Vuyst, 2010; Silva i sur., 2018).

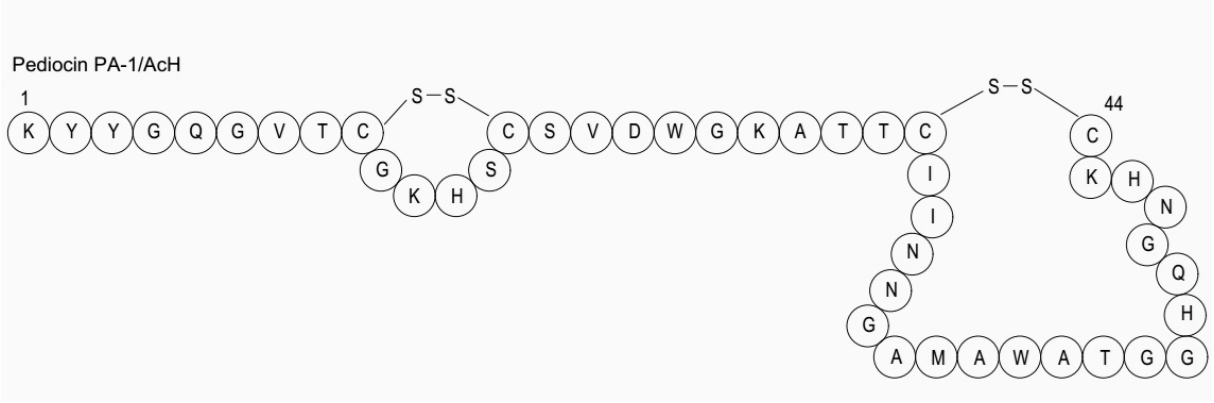


Slika 3.1. Prikaz strukture nizina A, Z i Q (prilagođeno prema Zendo, 2013.)

3.4.2. Pediocini

Pediocin je uz nizin jedini bakteriocin koji se komercijalno proizvodi. Mogu ga sintetizirati bakterije *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* te soj bakterije *Lactobacillus plantarum* WHE92. Komercijalnu važnost imaju dva bakteriocina koje sintetiziraju različiti sojevi *Pediococcus acidilactici*, odnosno pediocin PA-1 (*P. acidilactici* PAC1.0) i pediocin AcH (*P. acidilactici* H). Oba su otkrivena iste godine (1987.) i u početku smatrana za dva različita bakteriocina, no kasnija istraživanja utvrdila su da su potpuno jednaki. Budući da su ova dva pediocina identični peptidi, to jest imaju isti slijed nukleotida i aminokiselina, za njih se koristi zajednički naziv pediocin PA-1/AcH (slika 3.2.). Na ovom pediocinu temelji se proizvodnja komercijalnog oblika koji je dostupan pod imenom Alta 2341^{TM} (Ray i Miller, 2000; Delves-Broughton, 2012).

Pediocin, poput nizina, ima široki spektar djelovanja protiv gram-pozitivnih bakterija. Silva i sur. (2018) navode kako je pediocin djelotvorniji u odnosu na nizin u borbi protiv patogenih bakterija *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Osim toga, pediocin je aktivan u širokom rasponu pH vrijednosti i temperature, otporan je na zagrijavanje i zamrzavanje i stabilan je u vodenim otopinama. Učinkovito djeluje na bakterije *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Clostridium* spp. i *Bacillus cereus* (Chen i Hoover, 2003). Neke bakterijske vrste i sojevi otporne su na djelovanje pediocina, odnosno apsorpcija na površini stanice odvija se u manjoj mjeri nego što je to slučaj u bakterija osjetljivih na pediocin. Pediocin uglavnom ne djeluje na gram-negativne bakterije, no kao i u slučaju nizina, one mogu postati osjetljive na njega u slučaju propusnosti membrane zbog čega pediocin ima jače djelovanje protiv primjerice bakterija *Pseudomonas* i *Escherichia coli* u odnosu na nizin (Delves-Broughton, 2012; Silva i sur., 2018).



Slika 3.2. Prikaz strukture pediocina PA-1/AcH (prilagođeno prema Umu i sur., 2017)

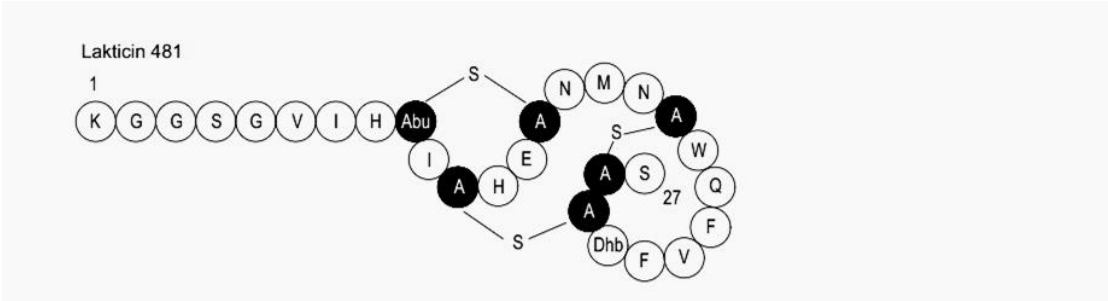
3.4.3. Lakticini

Lakticine sintetiziraju određeni sojevi bakterije *Lactococcus lactis*, a predstavnici su lakticin 3147 i lakticin 481 te u novije vrijeme otkriveni lakticini Q i Z. Lakticini 3147 i 481 ubrajaju se u lantibiotike tipa A, dok se lakticini Q i Z ubrajaju u razred IId.

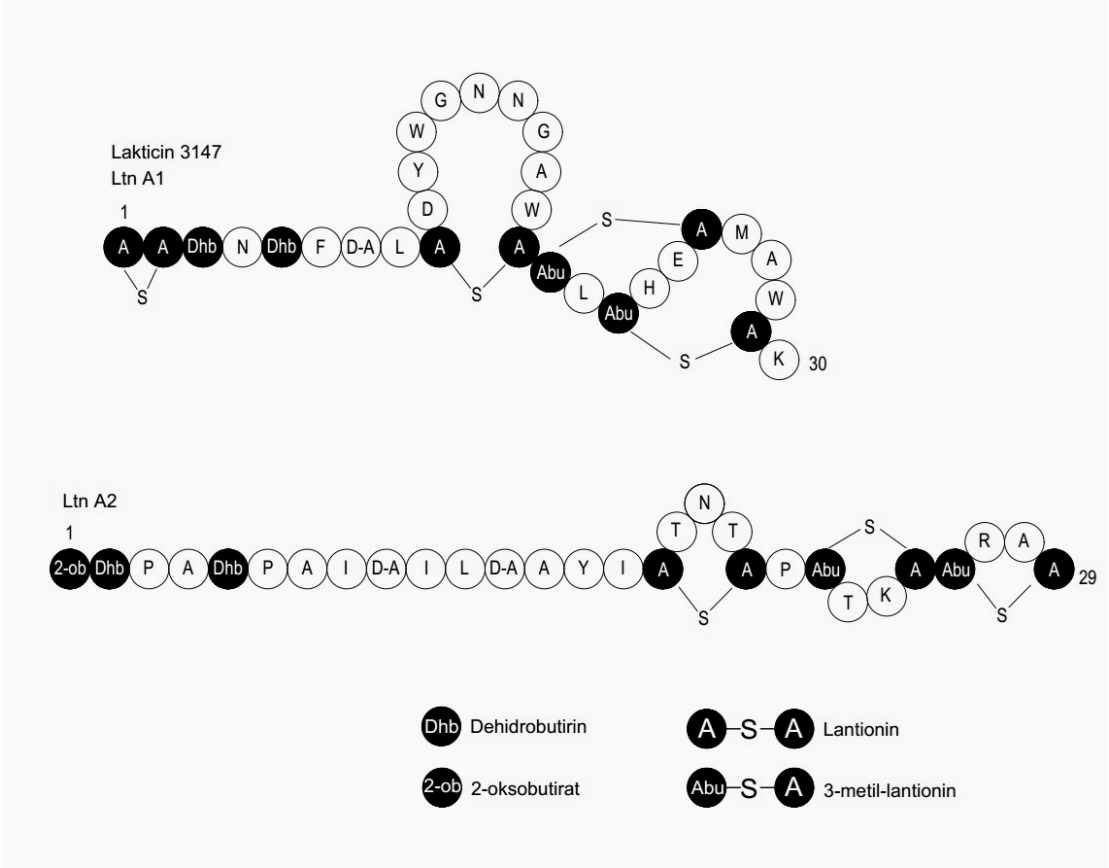
Lakticin 481 sastoji se od jednog peptida, građen je od 27 aminokiselina i molekulska masa mu iznosi 2,9 kDa (slika 3.3.). Ima srednje širok spektar djelovanja te je aktivan protiv bakterija *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes* te BMK. Djelovanje lakticina 481 protiv patogenih bakterija nije toliko učinkovito kao ono nekih drugih bakteriocina, no može se poboljšati primjenom postupaka kao što je visoki tlak tijekom proizvodnje sira (Leroy i De Vuyst, 2010; Silva i sur., 2018).

Lakticin 3147 je otkriven 1994. godine, a proizvodi ga soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147, izoliran iz kefirnih zrna. Sastoji se od dva peptida naziva LtnA1 i LtnA2. LtnA1 građen je od 30 aminokiselina i ima molekularnu masu 3,3 kDa, a zbog izdužene strukture sličan je lantibioticima tipa A (slika 3.4.). LtnA2 građen je od 29 aminokiselina, molekularna masa iznosi mu 2,8 kDa, a sličan je globularnim lantibioticima tipa B. Oba peptida potrebna su za inhibiciju sinteze stanične stijenke bakterija (Leroy i De Vuyst, 2010; Villa i sur., 2016). Lakticin 3147 ima široki spektar djelovanja na gram-pozitivne bakterije, aktivan je u malim koncentacijama i u širokom rasponu pH vrijednosti. Djeluje na bakterije uzročnike kvarenja i patogene bakterije kao što su *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*. Budući da je također vrlo termostabilan, pogodan je za korištenje u formi praha u kojoj je djelotvoran protiv patogena u raznim mliječnim proizvodima. Osim u prehrambenoj industriji,

lakticin 3147 se koristi i u medicini (Leroy i De Vuyst, 2010; Suda i sur., 2012). Istraživanjima je utvrđeno da lakticin 3147 može pridonijeti oralnom zdravlju zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibira oralne streptokoke. Nadalje, zbog topivosti i aktivnosti pri fiziološkoj pH vrijednosti, djelotvoran je u kontroli infekcija izazvanih bakterijom *Clostridium difficile* koja je uzročnik dijareje i zaraznog gastroenteritisa, a da pri tom nema veliki utjecaj na normalnu crijevnu mikrofloru. Kada se primjenjuje zajedno s nizinom, djeluje na infekcije izazvane mikobakterijama. Također, u kombinaciji sa antibioticima polimiksinom A ili polimiksinom E, djelotvoran je protiv gram-negativnih bakterija kao što su *Cronobacter* i *Escherichia coli* (Rea i sur., 2007; Villa i sur., 2016).



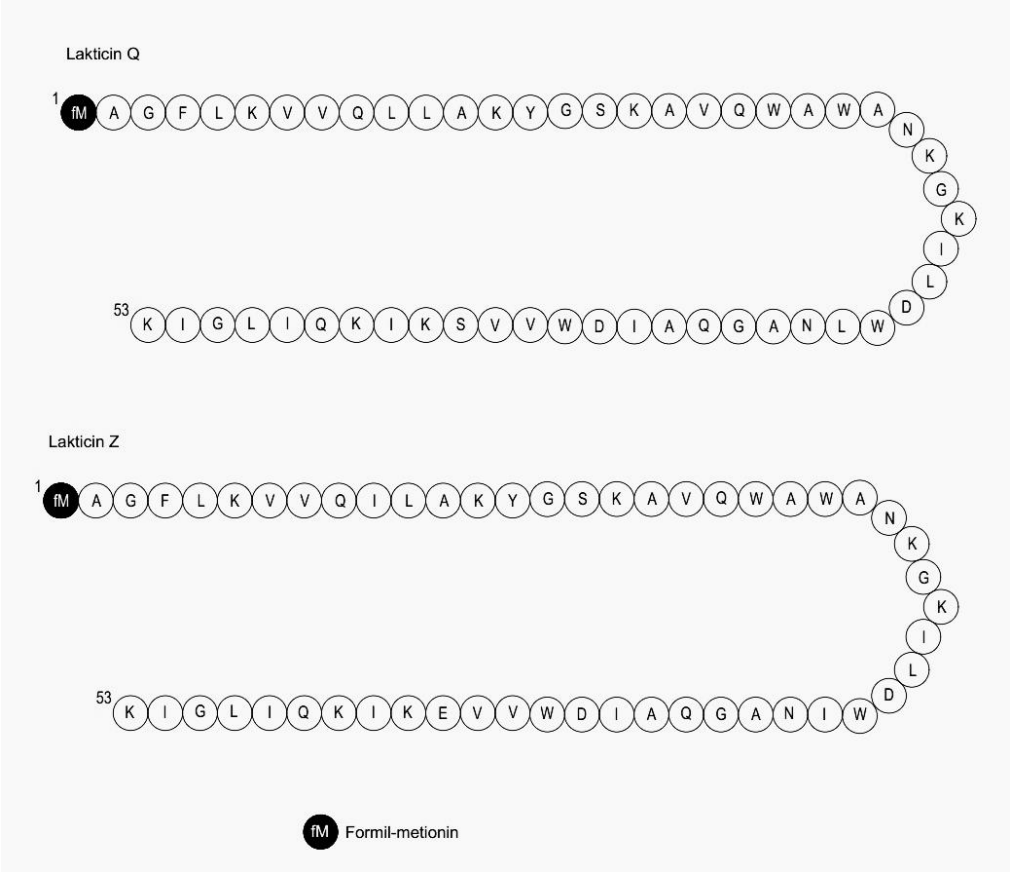
Slika 3.3. Prikaz strukture lakticina 481 (prilagođeno prema Böttiger i sur., 2009)



Slika 3.4. Prikaz strukture lakticina 3147 (prilagođeno prema Wiedemann i sur., 2006)

Lakticin Q sastoji se od 53 aminokiseline, a sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* QU 5 koja je izolirana iz kukuruza (slika 3.5.). Ima široki spektar djelovanja protiv gram-pozitivnih bakterija, aktivan je u širokom rasponu pH vrijednosti i alkalnim uvjetima, te je termostabilan. U usporedbi s drugim bakteriocinima BMK ima brže baktericidno djelovanje, a vrlo je aktivan protiv *Bacillus* vrsta (Fujita i sur., 2007; Zendo, 2013). Fujita i sur. (2007) navode kako lakticin Q ostaje stabilan na 100°C kroz 15 minuta i pH vrijednosti od 2 do 10. Također zadržava 25% svoje aktivnosti nakon tretmana u autoklavu pri 121°C kroz 15 minuta.

Lakticin Z je građen od 53 aminokiseline te je prema strukturi i aktivnosti sličan lakticinu Q od kojeg se razlikuje u tri aminokiseline (slika 3.6.). Sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* QU 14 izolirana iz probavnog sustava konja. Djeluje protiv raznih gram-pozitivnih bakterija. Također je termostabilan te zadržava potpunu stabilnost do 100°C, a kao i lakticin Q, ostaje stabilan pri alkalnim pH vrijednostima (Iwatani i sur., 2007; Zendo, 2013).

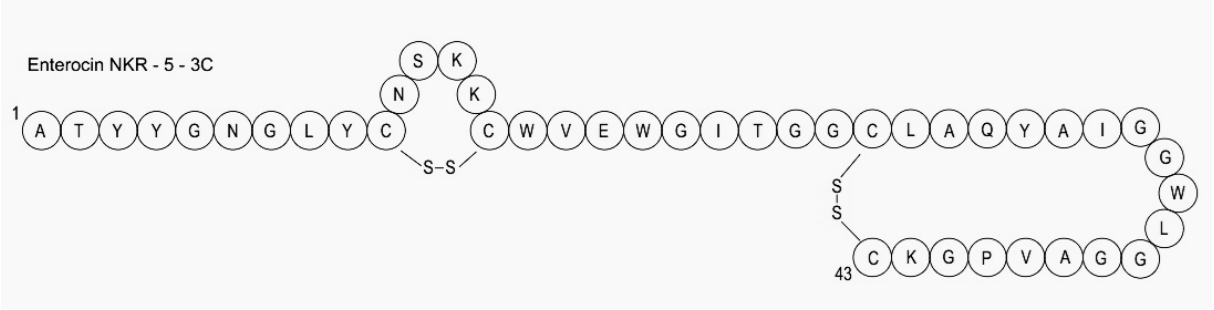


Slika 3.5. Prikaz struktura lakticina Q i Z (prilagođeno prema Zendo, 2013)

3.4.4. Enterocini

Enterocine sintetiziraju vrste roda *Enterococcus*, a djeluju protiv patogenih bakterija, prvenstveno vrsta rodova *Listeria* i *Clostridium*. Enterocin AS-48 sintetizira bakterija *Enterococcus faecalis*, a sastoji se od 70 aminokiselinskih ostataka. Ostaje stabilan na visokim temperaturama i u širokom rasponu pH vrijednosti. Djeluje protiv niza bakterija kao što su *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, a djelotvornost mu se može poboljšati primjenom primjerice toplinskog tretmana ili visokog tlaka (Grande Burgos i sur., 2014; Silva i sur., 2018). *Enterococcus faecium* NKR-5-3 je bakterija izolirana iz tajlandske fermentirane ribe, a proizvodi više bakteriocina poput enterocina NKR-5-3C ili enterocina NKR-5-3AZ (slika 3.6.). Enterocin NKR-5-3C pokazuje jaku aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija, posebice vrsta roda *Listeria*. Također u svojoj strukturi sadrži dva disulfidna mosta, zbog čega je ona izuzetno stabilna (Perez i sur., 2014).

Iako primjena enterocina u mliječnoj industriji ima velik potencijal, bakterije koje ih sintetiziraju predstavljaju rizik iz higijenskih razloga. Neke vrste roda *Enterococcus* mogu uzrokovati infekcije, odnosno nositelji su faktora virulencije i gena za otpornost na antibiotike, stoga je sigurnija primjena pročišćenih enterocina (Leroy i De Vuyst, 2010; Silva i sur., 2018).



Slika 3.6. Prikaz strukture enterocina NKR-5-3C (prilagođeno prema Perez i sur., 2014)

3.5. Čimbenici koji utječu na sintezu bakteriocina

Abbasiliasi i sur. (2017) navode da BMK najčešće sintetiziraju bakteriocine za vrijeme eksponencijalne faze rasta, no veći broj bakterijskih stanica ne znači nužno i visoku sintezu bakteriocina. U nekim slučajevima postoji korelacija između bakterijske biomase i sinteze bakteriocina, dok u drugim sinteza bakteriocina nastupa u stacionarnoj fazi. Više čimbenika može utjecati na sintezu bakteriocina, a najvažniji su bakterijski soj, sastav hranjive podloge i uvjeti fermentacije.

Postoji velik broj hranjivih podloga koje se mogu koristiti za kultivaciju BMK, a odabir ovisi o soju bakterije. Za sintezu bakteriocina BMK najčešće se koriste komercijalne hranjive podloge poput MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) i APT (All purpose Tween) podloge za laktobacile ili M17 podloge za laktokoke. S obzirom na varijacije između sojeva BMK, takve podloge nisu u potpunosti pogodne za sintezu točno određenog bakteriocina iz razloga što im sastav nije za tu svrhu optimalan, odnosno omjer ugljika i dušika te ostalih komponenti nije izbalansiran. Stoga je potrebno izvršiti formulaciju hranjive podloge, primjerice postići optimalan omjer ugljika i dušika ili dodati druge sastojke koji mogu potaknuti rast bakterija i povećati sintezu bakteriocina. Hranjivoj podlozi može se dodati određena količina vitamina, šećera i izvora dušika, što poboljšava rast stanica i sintezu bakteriocina, no prevelike količine mogu isto tako

djelovati inhibitorno. Neki od sastojaka poput natrijeva klorida, etanola ili izvor ugljika dodaju se zbog stabilizacije sinteze bakteriocina. Također, natrijev klorid i etanol mogu na sintezu nekih bakteriocina djelovati stimulativno, dok na sintezu drugih mogu djelovati inhibitorno. Za dobar rast i sintezu potrebno je i da hranjiva podloga sadrži dovoljno ekstrakta kvasca i hidrolizata proteina. Najbolji izvor ugljika za sintezu bakteriocina je glukoza. Kod pojedinih sojeva bakterija mliječne kiseline koji posjeduju kompleksne enzimatske sustave, uz glukozu se mogu dodati i drugi šećeri. Primjerice, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* može koristiti saharozu i laktozu u sintezi nizina. No utvrđeno je da pojedini sojevi trebaju upravo glukozu za sintezu određenih bakteriocina. Tako na primjer *Lactococcus lactis* u sintezi nizina Z koristi glukozu, koja potiče konzumaciju supstrata, rast stanica i sintezu. Povećanjem koncentracije glukoze poboljšava se sinteza bakteriocina, no samo do određene granice. Previsoka koncentracija glukoze dovodi do zasićenosti pri transportu same unutar stanica, pri čemu se smanjuje ili prestaje sinteza bakteriocina (Abbasiliasi i sur., 2017).

Izvori dušika koji se koriste za poticanje rasta BMK uključuju ekstrakt kvasca, goveđi ekstrakt i peptone. Ekstrakt kvasca, koji se prvenstveno sastoji od aminokiselina, peptida, ugljikohidrata i soli, povoljno djeluje na rast stanica, a njegove aminokiseline i peptidi mogu služiti kao prekursori u sintezi bakteriocina. Veliki utjecaj na proizvodnju bakteriocina također imaju temperatura, pH vrijednost i prisutnost kisika. Optimalna temperatura za rast bakterija ne mora ujedno biti optimalna i za proizvodnju bakteriocina. Primjerice, optimalna temperatura za rast soja *Pediococcus acidilactici* ITV/26 iznosi 40°C, dok optimalna temperatura za sintezu bakteriocina iznosi 35°C. S druge strane, kod soja *Pediococcus acidilactici* PA/003, optimalna temperatura za rast (35°C) jednaka je optimalnoj temperaturi za proizvodnju pediocina. Za većinu sojeva BMK optimalna temperatura za sintezu bakteriocina kreće se od 30 do 37°C. Iako je rast stanica određenih sojeva moguć i na višim temperaturama, sinteza bakteriocina vjerojatno će biti smanjena. Optimalne pH vrijednosti za rast stanica i sintezu bakteriocina također se mogu razlikovati i u velikoj mjeri ovise o soju. Kada je stopa rasta stanica niska, tada je iskorištenje energije bolje, pa je i sinteza bakteriocina bolja. Enzimatske reakcije koje sudjeluju u iskorištavanju energije ovise o pH vrijednosti, stoga snižavanje pH vrijednosti može pojačati enzimatske reakcije, odnosno sniziti stopu rasta, a pospješiti sintezu bakteriocina. Optimalna pH vrijednost za sintezu bakteriocina kod pojedinih *Lactococcus lactis* sojeva i *Pediococcus acidilactici* PA/003 kreće se u rasponu od 6 do 6,5, dok optimalna pH vrijednost kod soja *Pediococcus acidilactici* ITV/26 iznosi 5. Nadalje, BMK su

fakultativni anaerobi, a njihov rast na glukozi pospješuje prisutnost kisika. Postupak „prozračivanja“ ima utjecaj na sintezu bakteriocina i ovisi o bakterijskom soju. Primjerice, kod soja *Lactococcus lactis* UL719 utvrđena je veća sinteza nizina A uslijed prozračivanja, zahvaljujući povećanju stanične aktivnosti (Abbasiliasi i sur., 2017).

4. Bakteriocini BMK u proizvodnji mliječnih proizvoda

4.1. Primjena bakteriocina u sprečavanju kvarenja mliječnih proizvoda

Primjena nizina u siru kako bi se spriječilo kasno nadimanje izazvano klostridijama predstavljala je prvu upotrebu tog bakteriocina u nekom mliječnom proizvodu. Nizin se također pokazao djelotvornim i protiv drugih bakterija koje formiraju spore, poput *Bacillus* spp., od kojih mnoge mogu preživjeti toplinsku obradu i uglavnom su prisutne u mlijeku, vrhnju i drugim mliječnim proizvodima (Nissen i sur., 2001; Silva i sur., 2018). Niske koncentracije nizina u potpunosti inhibiraju rast bakterija *Bacillus* vrste u toplinski obrađenom vrhnju (90°C/15 min) pri temperaturama od 8° do 10°C i tijekom pohrane proizvoda. Bakterija *Bacillus cereus* je uzročnik kvarenja pri čemu dolazi do slatkog zgrušavanja pasteriziranog mlijeka i vrhnja, a može proizvoditi enterotoksine. Vrste poput *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus pumilus* također se pojavljuju u mliječnim proizvodima i odgovorne su za pojavu bolesti koje se prenose hranom (Nissen i sur., 2001).

Nizin učinkovito djeluje i na bakterije *Staphylococcus aureus*, što je potvrđeno istraživanjem na primjeru sira Minas Frescal te je utvrđeno smanjenje broja bakterija u grušu i sirutci (Felicio i sur., 2015). Unatoč tome što mu razina djelotvornosti ovisi o stupnju početne kontaminacije, primjena nizina pokazala se učinkovitom u smanjenju početnog broja *Staphylococcus aureus* u sirevima proizvedenima od mlijeka visoko kontaminiranog tom bakterijom. Pinto i sur. (2011) svoje su istraživanje proveli na tradicionalnom brazilskom siru (Minas Traditional Serro) proizvodenom od sirovog mlijeka u koje je dodan nizin u koncentracijama od 100 IJ/ml^{-1} i 500 IJ/ml^{-1}. Nakon sedmog dana zrenja utvrđeno je smanjenje broja *Staphylococcus aureus* za 1,2 log ciklusa (vrijeme i temperatura potrebna za smanjenje broja ciljanog mikroorganizma za 90% ili log 10) u siru s nižom koncentracijom nizina i za 2 log ciklusa u siru s višom koncentracijom nizina, u odnosu na sir koji nije sadržavao nizin. Istraživanjem je također utvrđeno da je dodatak nizina utjecao na indeks zrenja sira.

Brojna istraživanja provedena su kako bi se utvrdio učinak nizina na bakteriju *Listeria monocytogenes* prisutnu u različitim mliječnim proizvodima. Bakterija *Listeria monocytogenes* je psihrotrofna bakterija koja može rasti na temperaturama hladnjaka, stoga su mliječni proizvodi pogodni za razvoj ove bakterije. Nizin ima utjecaj na smanjenje broja bakterije

Listeria monocytogenes u mlijeku i mliječnim proizvodima u uvjetima hladnjaka. Tako, 2550 IJ nizina/g može u potpunosti inhibirati rast bakterije *Listeria monocytogenes* u svježem siru, a istraživanjima je također utvrđen njegov pozitivan utjecaj u proizvodnji sireva Cheddar i Ricotta (Medina i Nuñez, 2011; Silva i sur., 2018). Davies i sur. (1997) utvrdili su djelotvornost nizina protiv bakterije *Listeria monocytogenes* u sirevima u tipu Ricotta sira, tijekom 70 dana pohrane na 6-8°C. Primjenom nizina inhibiran je rast bakterije u vremenskom periodu od 8 tjedana ili duže, a također je pokazao visoku razinu održivosti tijekom 10 tjedana, odnosno gubitak nizina bio je niskih 10-32%. Silva i sur. (2018) također navode da se dodatkom nizina u premaz upotrijebljen na siru Ricotta sprječava rast te bakterije u vremenskom periodu od sedam dana pri temperaturi od 4°C. Nadalje, Benech i sur. (2002) usporedili su djelotvornost pročišćenog nizina Z i bakterijskog soja koji proizvodi nizin na primjeru nepatogene bakterije *Listeria innocua* u siru Cheddar tijekom šest mjeseci zrenja. Bakterija *Listeria innocua* se koristila kao zamjena za bakteriju *Listeria monocytogenes* iz sigurnosnih razloga, a dodana je u mlijeko u koncentraciji od 10^5 do 10^6 CFU/ml. Pročišćeni nizin Z dodan je u mlijeko prije zgrušavanja u inkapsuliranom obliku, dok je soj *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* biovar diacetylactis UL719 dodan kao sastavni dio mikrobne mljekarske kulture. Mikrobiološkom analizom uzoraka sireva uzetih nakon postupka prešanja utvrđeno je smanjenje broja bakterije *Listeria innocua*, i to za 3 log jedinice u sirevima sa dodatkom inkapsuliranog nizina te za 1,5 log jedinica u sirevima sa dodatkom soja *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* biovar diacetylactis UL719. Nakon šest mjeseci zrenja pročišćeni nizin također je pokazao bolje rezultate te je u sirevima utvrđeno manje od 10 CFU *Listeria innocue*/g, dok je nizin zadržao stabilnost i to 90% od svoje početne aktivnosti. Sirevi s dodatkom soja *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* biovar diacetylactis UL719 sadržavali su 10^4 CFU *Listeria innocue*/g, a aktivnost nizina se snizila na 12% od aktivnosti zabilježene odmah nakon prešanja sireva. Primjena inkapsuliranog nizina pokazala se boljom u odnosu na dodatak bakterija koje sintetiziraju nizin, te direktnu primjenu slobodnog nizina, budući da se inkapsulacijom poboljšava stabilnost i djelovanje nizina u siru. Također, utvrđeno je da dodatak inkapsuliranog nizina i soja koji sintetizira nizin, nisu imali utjecaj na proizvodnju i kemijski sastav sireva (Benech i sur., 2002).

Bhatti i sur. (2004) istražili su učinkovitost djelovanja nizina protiv bakterije *Listeria monocytogenes* (10^4 CFU/ml) u mlijeku (sirovo, pasterizirano, homogenizirano) koje sadrži 0,1%, 2% odnosno 3,5% mliječne masti. Najbolja učinkovitost nizina utvrđena je u mlijeku s udjelom mliječne masti od 0,1%, pri čemu je broj bakterija bio niži od 10 CFU/ml nakon 12

dana na temperaturi od 5°C. U mlijeku s udjelima 2 i 3,5% mliječne masti utvrđen je niži broj bakterija na početku, no u manjoj mjeri je naknadno došlo do ponovnog razmnožavanja bakterije.

U sirovom, pasteriziranom te homogeniziranom i pasteriziranom mlijeku sa 0,1% mliječne masti nizin je baktericidno djelovao na bakteriju *Listeria monocytogenes* čiji se broj snizio ispod 10 CFU/ml nakon dva do tri dana na 5°C. U punomasnom mlijeku (3,5%) nizin je imao takav učinak samo kod sirovog ili pasteriziranog mlijeka, dok je u homogeniziranom mlijeku bakterija *Listeria monocytogenes* bila otporna na nizin. Tako smanjena učinkovitost nizina posljedica je promjena udjela mliječne masti i proteina koje se događaju uslijed homogenizacije, pri čemu se zbog apsorpcije mijenja djelovanje nizina (Bhatti i sur., 2004).

Osim direktne primjene bakteriocina u proizvodnji mliječnih proizvoda, u svrhu kontrole patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja moguće je koristiti BMK koje sintetiziraju bakteriocine. Dodatkom *Lactococcus lactis* soja koji sintetizira nizin kao dodatne kulture u kombinaciji sa mikrobnom mljekarskom kulturom u mlijeko za proizvodnju sira Camembert nije utvrđen inhibitorni učinak na bakteriju *Listeria monocytogenes*, no on je ostvaren kada je taj soj upotrijebljen kao mikrobna mljekarska kultura (Medina i Nuñez, 2011). Arques i sur. (2015) navode kako dodatak mikrobnih mljekarskih kultura koje sintetiziraju nizin može inhibirati bakteriju *Listeria monocytogenes* u siru Camembert, no s povećanjem pH vrijednosti dolazi do ponovnog rasta bakterija.

Upotreba sojeva koji sintetiziraju nizin djelotvorna je i u proizvodnji drugih vrsta sireva. Kondrotiene i sur. (2018) dodali su tri soja *Lactococcus lactis* koji sintetiziraju nizin A u svježi sir te su utvrdili značajno smanjenje broja stanica bakterije *Listeria monocytogenes*. Dodatak mikrobne mljekarske kulture koja se sastoji od dva soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, koja sintetiziraju nizin, može smanjiti broj bakterija *Listeria monocytogenes* u siru proizvedenom od sirovog mlijeka (Silva i sur., 2018). *Lactococcus lactis* sojevi mogu se koristiti i u svrhu sprečavanja rasta i razmnožavanja bakterije *Clostridium tyrobutyricum*, uzročnika kasnog nadimanja, u polutvrdim i tvrdim sirevima (Leroy i De Vuyst, 2010). Dodatak sojeva koji sintetiziraju nizin također je učinkovito u smanjenju broja bakterija *Staphylococcus aureus* u sirevima i sirnim namazima (Medina i Nuñez, 2011).

Primjena drugih bakteriocina osim nizina, kao i bakterijskih sojeva koji ih sintetiziraju, također se pokazala djelotvornom protiv pojedinih nepoželjnih bakterija. Stabilnost, aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti i otpornost na visoke i niske temperature čine pediocin

prikladnim za primjenu u proizvodnji mliječnih proizvoda, a djelotvoran je protiv bakterija kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Primjerice, upotrebom pediocina smanjio se broj bakterije *Listeria monocytogenes* u mliječnim proizvodima (svježi sir, vrhnje), a izuzetno je djelotvoran ako je početni broj bakterija nizak (Arques i sur., 2015; Silva i sur., 2018). Pediocin učinkovito smanjuje broj bakterije *Staphylococcus aureus* u sirovom bivoljem mlijeku (Silva i sur., 2018). Soj *Lactococcus lactis* MM217 koji sintetizira pediocin utjecao je na smanjenje broja bakterije *Listeria monocytogenes* u proizvodnji sira Cheddar (Medina i Nuñez, 2011), a sojevi koji sintetiziraju pediocin također su se pokazali učinkovitim protiv bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Rodríguez, Calzada i sur. (2005) istražili su djelovanje dvaju sojeva *Lactococcus lactis* (CL1 i CL2) koji sintetiziraju pediocin, na bakterije *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* O157:H7, tijekom zrenja sira. Aktivnost pediocina tijekom zrenja utvrđena je samo kod sireva koji su sadržavali soj *Lactococcus lactis* CL1. Kod sireva u koje je dodan soj *Lactococcus lactis* CL1 nakon 30-og dana zrenja utvrđen je manji broj bakterija *Listeria monocytogenes* za 2,97 log jedinica, *Staphylococcus aureus* za 0,98 log jedinica i *Escherichia coli* O157:H7 za 1,69 log jedinica u usporedbi sa kontrolnim sirom.

Lakticin 3147 pokazao se učinkovitim u inaktivaciji bakterije *Listeria monocytogenes* u svježem siru i jogurtu (Morgan i sur., 2001). Dodatkom lakticina 3147 broj bakterija se je unutar dva sata smanjio za 85% u svježem siru i za 99,9% u prirodnom jogurtu. Također je djelotvoran i protiv bakterija *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Clostridium* spp. te je vidljiv potencijal primjene ovog bakteriocina u kontroli patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja. Chen i Hoover (2003) navode da je soj *Lactococcus lactis* DPC4275, koji sintetizira lakticin 3147, učinkovit u kontroli bakterije *Listeria monocytogenes* u svježem siru, a može se koristiti i kao zaštitna kultura na površini sireva sa plemenitom plijesni (McAuliffe i sur., 1999; Chen i Hoover, 2003). Soj *Lactococcus lactis* DPC4275 djelovao je na soj *Listeria monocytogenes* Scott A u sirevima pohranjenim na 4°C/7 dana. Nakon petog dana pohrane utvrđeno je smanjenje broja bakterija za 99,9%, pri čemu je lakticin 3147 ostao aktivan i tijekom pohrane. Istovremeno, nije utvrđeno smanjenje broja bakterije *Listeria monocytogenes* u kontrolnom siru što je potvrda o potencijalu primjene lakticina 3147 u sprečavanju naknadne kontaminacije sireva. Slično istraživanje proveli su O'Sullivan i sur. (2006) koji su koristili *Lactococcus lactis* DPC4275 u inhibiciji bakterije *Listeria monocytogenes* u sirevima koji zriju na površini. Zaštitna kultura, odnosno soj *Lactococcus lactis* DPC4275

dodan je na površinu sira prije te nakon dodavanja patogene bakterije. Utvrđeno je kako se primjenom zaštitne kulture nakon dodavanja patogene bakterije *Listeria monocytogenes* njen broj smanjio za tisuću puta, dok je ostao nepromijenjen kada je kultura dodana prije. U naknadnom istraživanju O'Sullivan i sur. (2006) ponovno su koristili sojeve *Lactococcus lactis* DPC4275 i za površinu sira koja je sadržavala patogenu bakteriju, dok je na površinu kontrolnog sira nanesen soj *Lactococcus lactis* DPC4268. Sir na čiju je površinu bio nanesen soj *Lactococcus lactis* DPC4275, a koja sintetizira lakticin 3147 imao je sto puta manji broj bakterije *Listeria monocytogenes* u odnosu na kontrolni sir.

Enterocini su bakteriocini koji najjače djeluju na bakteriju *Listeria monocytogenes*, a njihov je potencijal primjene u mliječnim proizvodima dobro poznat. Međutim, enterocine sintetiziraju sojevi bakterija poput *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*, čija je primjena kao kultura u proizvodnji mliječnih proizvoda ograničena budući da su enterokoki patogeni koji izazivaju infekcije kod ljudi. Stoga je prije njihovog korištenja potrebna procjena rizika i odabir sojeva koji ne sadrže faktore virulencije. Provedeno je istraživanje u kojem je proučena učinkovitost soja *Enterococcus faecium* F58 u kontroli rasta bakterije *Listeria monocytogenes* u kozjem mlijeku i marokanskom svježem siru. Rezultati istraživanja pokazali su da primjena *Enterococcus faecium* F58 kao dodatne kulture može biti korisna u kontroli rasta i razmnožavanja bakterije *Listeria monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima (Achemchem i sur., 2006). Liu i sur. (2007) su tijekom proizvodnje svježeg sira koristili *Lactococcus lactis* soj koji sadrži plazmid pEnt02 čiji su geni povezani sa proizvodnjom enterocina. Tijekom fermentacije utvrđeno je značajno smanjenje broja bakterije *Listeria monocytogenes*, što znači da bi ovakav način primjene mogao poslužiti kao alternativa korištenju enterokoka koji proizvode enterocine.

Djelotvornost bakteriocina može se poboljšati ukoliko se oni koriste u kombinaciji s drugim sastojcima i/ili postupcima proizvodnje. Također primjena više bakteriocina zajedno može poboljšati njihovu učinkovitost. Kao primjer Silva i sur. (2018) navode da inkorporacija nizina i lakticina u celulozni premaz može smanjiti broj bakterija *Listeria innocua* i *Staphylococcus aureus* u siru Cheddar.

Laktoperoksidazni sustav u kombinaciji sa nizinom djelotvoran je u kontroli bakterije *Listeria monocytogenes* u obranom mlijeku (Chen i Hoover, 2003; Silva i sur., 2018). Također se može kombinirati sa bakterijama koje proizvode nizin, što je učinkovito u kontroli bakterije *Listeria monocytogenes* u sirovom mlijeku pohranjenom na temperaturama hladnjaka

(Medina i Nuñez, 2011). Silva i sur. (2018) navode kako tretmani niskim ili visokim temperaturama primijenjeni na otporne bakterije rezultiraju učinkovitijem djelovanju nizina i pediocina, a takvi postupci su djelotvorni i na gram-negativnim bakterijama.

Morgan i sur. (2000) svojim su istraživanjem utvrdili pozitivan učinak primjene visokog tlaka uz dodatak lakticina 3147 na sojeve bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC6538 i *Listeria innocua* DPC1770 prisutnih u mlijeku i sirutci. Tlak viši od 400 MPa poboljšava aktivnost lakticina 3147 odnosno utvrđena je bolja učinkovitost istovremene primjene oba tretmana nego primjena svakog tretmana posebno. Rodríguez, Argués i sur. (2005) primjenili su kombinaciju visokog tlaka sa bakteriocinima BMK na bakteriju *Escherichia coli* O157:H7 u siru proizvedenom od sirovog mlijeka. Bakterija je dodana u mlijeko, približno 10^5 CFU/ml dok su različite BMK koje sintetiziraju bakteriocine dodane kao dodatne kulture. Sirevi su čuvani na temperaturi od 10°C i tretirani sa 300 MPa/10 minuta i 500 MPa/5 minuta drugog i pedesetog dana pohrane. Tretmanom visokim tlakom od 300 MPa s dodatkom bakterija koje sintetiziraju lakticin 481, nizin A, bakteriocin TAB 57 ili enterocin AS-48 drugog dana smanjio se broj patogene bakterije na manje od 2 log jedinice nakon 60 dana zrenja. Primjena istog tretmana provedenog pedesetog dana pokazala se učinkovitijom jer je postignuta potpuna inaktivacija patogena nakon 60 dana. Primjena tlaka od 500 MPa i bakterija koje sintetiziraju bakteriocine drugog i pedesetog dana također je izazvala potpunu inaktivaciju patogena u svih sireva osim onih sa dodatkom soja *Lactococcus lactis* TAB 50 koji sintetizira nizin A.

4.2. Primjena bakteriocina BMK u proizvodnji sireva

Bakterijske kulture koje proizvode bakteriocine se osim u svrhu poboljšanja sigurnosti mliječnih proizvoda mogu koristiti i za poboljšanje senzorskih svojstava i kvaliteta sireva. Primjenom bakteriocina BMK moguće je postići kontroliranu lizu stanica mikrobnih mljekarskih kultura, odnosno bržu proteolizu i zrenje sira. Mogu se koristiti u kontroli rasta nestarterskih BMK, koje mogu pozitivno doprinijeti razvoju senzorskih svojstava, no često imaju i negativan utjecaj u smislu pojave pogrešaka sira, primjerice pogreške okusa ili puknuća sirnog tijesta (Beshkova i Frengova, 2012). Korištenje laktokoka koji sintetiziraju nizin nije se pokazalo kao dobar izbor. Naime, zbog slabije otpornosti na visoke temperature, sporije proizvodnje mliječne kiseline i slabije proteolitičke aktivnosti te osjetljivosti na fag infekcije, laktokoki kao mljekarska kultura nisu pogodni za korištenje. Rješenje ovih problema može biti

njihova primjena zajedno sa mljekarskim kulturama koje su otporne na nizin. Učinkovitijima su se pokazale kulture koje sintetiziraju lakticin, što su u svome istraživanju potvrdili Ryan i sur. (1996) koji su koristili laktokoke koji sintetiziraju lakticin 3147 kao mljekarsku kulturu u proizvodnji sira Cheddar. O'Sullivan i sur. (2003) primijenili su soj *Lactococcus lactis* CNRZ481 koji sintetiziraju lakticin 481 kao dodatnu kulturu uz mljekarsku kulturu *Lactococcus lactis* HP, također u proizvodnji sira Cheddar. Utvrđeno je da je korištenjem soja koji sintetizira lakticin postignuta bolja liza i proizvodnja enzima te nije bilo negativnog utjecaja na proizvodnju mliječne kiseline. Rast nestarterskih bakterija mliječne kiseline bio je kontroliran, odnosno rast je bio smanjen za 5 log jedinica, čime je smanjena mogućnost razvoja pogrešaka sira. Sir u koji je dodan soj *Lactococcus lactis* CNRZ481 imao je i bolji okus u odnosu na kontrolni sir koji je sadržavao samo *Lactococcus lactis* HP. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da primjena laktokoka koji proizvode lakticin kao mljekarskih kultura ili dodatnih kultura može biti prikladna u proizvodnji sireva kada se želi postići ubrzano zrenje te bolja kvaliteta i senzorska svojstva sira.

5. Zaključak

Zahvaljujući antimikrobnim svojstvima koja posjeduju, mnogi bakteriocini bakterija mliječne kiseline imaju potencijal primjene u mljekarskoj industriji. Iako je do danas otkriven veliki broj bakteriocina od kojih neki pokazuju potencijal za primjenu u proizvodnji mliječnih proizvoda, jedini koji se komercijalno proizvode su nizin i pediocin PA-1/AcH. Stoga je potrebno dalje istražiti mogućnosti drugih poznatih bakteriocina, kao i posvetiti pozornost pronalaženju novih koji bi imali uži spektar djelovanja, odnosno ciljano djelovanje protiv određenih vrsta bakterija.

6. Popis literature

1. Abbasiliasi S., Tan J. S., Ibrahim T. A. T., Bashokouh F., Ramakrishnan N. R., Mustafaab S., Ariff A.B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. RSC Advances. 7: 29395-29420.
2. Achemchem F., Abrini J., Martínez-Bueno M., Valdivia E., Maqueda M. (2006). Control of Listeria monocytogenes in Goat's Milk and Goat's Jben by the Bacteriocinogenic Enterococcus faecium F58 Strain. Journal of Food Protection. 69(10): 2370-2376.
3. Arqués J. L., Rodríguez E., Langa S., Landete J. M., Margarita Medina M. (2015). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens. BioMed Research International. doi: 10.1155/2015/584183 [online] <https://www.researchgate.net/publication/273897198_Antimicrobial_Activity_of_Lactic_Acid_Bacteria_in_Dairy_Products_and_Gut_Effect_on_Pathogens>. Pristupljeno 06. lipnja 2018.
4. Bastos M. C. F., Coelho M. L. V., Santos O. C. S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Microbiology. 161: 683-700.
5. Benech R.O., Kheadr E. E., Laridi R., Lacroix C., Fliss I. (2002). Inhibition of Listeria innocua in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. Applied and Environmental Microbiology. 68(8): 3683-3690.
6. Beshkova D., Frengova G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. Engineering in Life Sciences. 12(4): 419-432.
7. Bhatti M., Veeramachaneni A., Shelef L. A. (2004). Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. International Journal of Food Microbiology. 97: 215-219.
8. Böttiger T., Schneider T., Martínez B., Sahl H.-G., Wiedemann I. (2009). Influence of Ca2+ Ions on the Activity of Lantibiotics Containing a Mersacidin-Like Lipid II Binding Motif. Applied and Environmental Microbiology. 75(13): 4427-4434.
9. Chen H., Hoover D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2(3): 82-100.

10. Davies E. A., Bevis H. E., Delves-Broughton J. (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiology. 24(5): 343-346.
11. Delves-Broughton J. (2012). Natural antimicrobials as additives and ingredients for the preservation of foods and beverages. U: Natural food additives, ingredients and flavourings (Baines D., Seal R., Ur.). Woodhead Publishing, UK 127-161.
12. Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2012). Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? Applied and Environmental Microbiology. 78(1):1-6.
13. Felicio B. A., Pinto M. S., Oliveira F. S., Lempk M. W., Pires A. C. S., Lelis C. A. (2015). Effects of nisin on Staphylococcus aureus count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. Journal of Dairy Science. 98(7): 4364-4369.
14. Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007). Structural Analysis and Characterization of Lacticin Q, a Novel Bacteriocin Belonging to a New Family of Unmodified Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 73(9): 2871-2877.
15. Grande Burgos M. J., Pulido R. P., Del Carmen López Aguayo M., Gálvez A., Lucas R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. International Journal of Molecular Sciences. 15(12): 22706-22727.
16. Gravesen A., Jydegaard Axelsen A.-M., Mendes da Silva J., Hansen T. B., Knøchel S. (2002). Frequency of Bacteriocin Resistance Development and Associated Fitness Costs in Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology. 68(2): 756-764.
17. Hammami R., Fernandez B., Lacroix C., Fliss I. (2013). Anti-infective properties of bacteriocins: an update. Cellular and Molecular Life Sciences. 70: 2947-2967
18. Imran S. (2016). Bacteriocin: An Alternative to Antibiotics. World Journal of Pharmaceutical Research. 5(11): 467-477.
19. Iwatani S., Zendo T., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by Lactococcus lactis QU 14. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 71(8): 1984-1992.

20. Jones E., Salin V., Williams G. W. (2005). Nisin and the market for commericial bacteriocins. Texas Agribusiness Market Research Center (TAMRC) Consumer and Product Research Report No. CP-01-05. <http://ageconsearch.umn.edu/record/90779?ln=en>. Pristupljeno 22. listopada 2018.
21. Jydegaard A.-M., Gravesen A., Knøchel S. (2000). Growth condition-related response of Listeria monocytogenes 412 to bacteriocin inactivation. Letters in Applied Microbiology. 31: 68-72.
22. Kondrotiene K., Kasnauskyte N., Serniene L., Gölz G., Alter T., Kaskoniene V., Maruska A. S., Malakauskas M. (2018). Characterization and Application of Newly Isolated Nisin Producing Lactococcus Lactis Strains for Control of Listeria Monocytogenes Growth in Fresh Cheese. LWT - Food Science and Technology. 87: 507-514.
23. Leroy F., De Vuyst L. (2010).Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. Australian Journal of Dairy Technology. 65(3): 143-149.
24. Liu L., O'Conner P., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2007). Controlling Listeria monocytogenes in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by Lactococcus lactis. Journal of Applied Microbiology. 104: 1059-1066.
25. López-Cuellar M. R., Rodríguez-Hernández A.-I., Chavarría-Hernández N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 30(6): 1039-1050.
26. Marino M., Frigo F., Bartolomeoli I., Maifreni M. (2013). Biofilm formation in the dairy industry: applications to cheese. U: Handbook of cheese in health: Production, nutrition and medical sciences (Preedy V. R., Watson R. R., Patel V. B., Ur.). Wageningen Academic Publishers, Netherlands. 137-150.
27. Mathur H., Field D., Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., Ross R. P. (2018). Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. NPJ Biofilms and Microbiomes. 4(9): 1-13. doi: 10.1038/s41522-018-0053-6 [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908865/>. Pristupljeno 06. lipnja 2018.

28. McAuliffe O., Hill C., Ross R. P. (1999). Inhibition of Listeria monocytogenes in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. Journal of Applied Microbiology. 86: 251-256.
29. McAuliffe O., Ross R. P., Hill C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiology Reviews. 25: 285-308.
30. Medina M., Nuñez M. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in milk and dairy products. U: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation (Lacroix C., Ur.). Woodhead Publishing, UK 267-296.
31. Morgan S. M., Ross R. P., Beresford T., Hill C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of Staphylococcus and Listeria. Journal of Applied Microbiology. 88: 414–420.
32. Morgan S. M., Galvin M., Ross R. P., Hill C. (2001). Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of Listeria monocytogenes and Bacillus cereus in a range of food systems. Letters in Applied Microbiology. 33: 387-391.
33. Nandane A. S., Tapre A.R., Ranveer R. C. (2007). Applications of bacteriocins as bio-preservative in foods: a review. ADIT J of Engg. 4(1): 50-55.
34. Nissen H., Holo H., Axelsson L., Blom H. (2001). Characterization and growth of Bacillus spp. in heat-treated cream with and without nisin. Journal of Applied Microbiology. 90: 530-534.
35. O'Sullivan L., O'Connor E. B., Ross R. P., Hill C. (2006). Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of Listeria monocytogenes on the surface of smear-ripened cheese. Journal of Applied Microbiology. 10: 135-143.
36. O'Sullivan L., Ross R. P., Hill C. (2003). A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. Journal of Applied Microbiology. 9: 1235-1241.
37. Paiva A. D., Breukink E. (2013). Antimicrobial Peptides Produced by Microorganisms. U: Antimicrobial Peptides and Innate Immunity (Hiemstra P. S., Zaat S. A. J., Ur.). Springer, Switzerland. 53-95.
38. Perez R. H., Zendo T., Sonomoto K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microbial Cell Factories. 13(1):

S3, 1-13. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3 [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155820/>. Pristupljeno 06. lipnja 2018.

39. Pinto M. S., Carvalho A. F., Pires A.C.S., Souza A. A. C., Silva P. H. F., Sobral D., Paula J. C. J., Santos A. L. (2011). The effects of nisin on Staphylococcus aureus count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. International Dairy Journal. 21: 90-96.

40. Ray B., Miller K. W. (2000). Pediocin. U: Natural Food Antimicrobial Systems (Naidu A. S., Ur.). CRC Press, Boca Raton, FL 525-566.

41. Rea M. C., Clayton E., O'Connor P. M., Shanahan F., Kiely B., Ross R. P., Hill C. (2007). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against clinical Clostridium difficile strains. Journal of Medical Microbiology. 56: 940-946.

42. Rea M. C., Dobson A., O'Sullivan O., Crispie F., Fouhy F., Cotter P. D., Shanahan F., Kiely B., Hill C., Ross R. P. (2011). Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on Clostridium difficile and microbial diversity in a model of the distal colon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108(1): 4639-4644.

43. Rea M. C., Alemayehu D., Ross R. P., Hill C. (2013). Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of Clostridium difficile infection. Journal of Medical Microbiology. 62: 1369-1378.

44. Rodríguez E., Argués J. L., Nuñez M., Gaya P., Medina M. (2005). Combined Effect of High-Pressure Treatments and Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria on Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Raw-Milk Cheese. Applied and Environmental Microbiology. 71(7): 3399-3404.

45. Rodríguez E., Calzada J., Argués J. L., Rodríguez J. M., Nunez M., Medina M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing Lactococcus lactis on Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157:H7 in cheese. International Dairy Journal. 15: 51-57.

46. Rodríguez-López P., Rodríguez-Herrera J. J., Vázquez-Sánchez D., López Cabo M. (2018). Current Knowledge on Listeria monocytogenes Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. Foods. 7(6): 85, 1-19.

47. Ryan M. P., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. (1996). An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of Lactococcus lactis Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology. 62(2): 612-619.

48. Silva C. C. G., Silva S. P. M., Ribeiro S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. Frontiers in Microbiology. 9(594): 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594 [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900009/>. Pristupljeno 06. lipnja 2018.

49. Suda S., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2012). Lacticin 3147-biosynthesis,molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. Current Protein & Peptide Science. 13(3): 193-204.

50. Teh K. H., Flint S., Bremer P. (2015). Raw Milk Quality Influenced by Biofilms and the Effect of Biofilm Growth on Dairy Product Quality. U: Biofilms in the Dairy Industry (Teh K. H., Flint S., Brooks J., Knight G., Ur.). John Wiley & Sons, UK. 65-98.

51. Umu Ö. C. O., Rudi K., Diep D. B. (2017). Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. Microbial Ecology in Health and Disease. 28 (1): 1-12. doi: 10.1080/16512235.2017.1348886 [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5614387/>. Pristupljeno 27. srpnja 2018.

52. Valdés A., Ramos M., Beltrán A., Jiménez A., Garrigós M. C. (2017). State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications. Coatings. 7(4): 56, 1-23.

53. Villa T. G., Feijoo-Siota L., Rama J. L. R., Sánchez-Pérez A., Miguel-Bouzas (2016). The Case of Lipid II: The Achilles' Heel of Bacteria. U: New Weapons to Control Bacterial Growth (Villa T. G., Vinas M., Ur.). Springer, Switzerland. 185-218.

54. Wang T., Liu M. (2016). The effect of bacteriocins derived from lactic acid bacteria on growth and biofilm formation of clinical pathogenic strains. International Journal of Clinical and Experimental Medicine. 9(4): 7343-7348.

55. Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R. R., Wiese A., Hagge S. O., Gutsmann T., Seydel U., Deegan L., Hill C., Ross P., Sahl H.-G. (2006). The mode of action of the lantibiotic

lacticin 3147 – a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. Molecular Microbiology. 61(2): 285-296.

56. Zacharof M. P., Lovitt R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. APCBEE Procedia. 2: 50-56.

57. Zendo T. (2013). Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 77(5): 893-899.

7. Prilog

Popis tablica

Tablica 3.1. Klasifikacija različitih vrsta bakteriocina bakterija mliječne kiseline..... 15

Popis slika

Slika 3.1. Prikaz strukture nizina A, Z i Q (prilagođeno prema Zendo, 2013.)..... 17
Slika 3.2. Prikaz strukture pediocina PA-1/AcH (prilagođeno prema Umu i sur., 2017) 19
Slika 3.3. Prikaz strukture lakticina 481 (prilagođeno prema Böttiger i sur., 2009) 20
Slika 3.4. Prikaz strukture lakticina 3147 (prilagođeno prema Wiedemann i sur., 2006) 21
Slika 3.5. Prikaz struktura lakticina Q i Z (prilagođeno prema Zendo, 2013)..... 22
Slika 3.6. Prikaz strukture enterocina NKR-5-3C (prilagođeno prema Perez i sur., 2014)..... 23