

**RĂSPUNSUL LA DIFERITE CONDIȚII DE STRES AL
UNOR BACTERII LACTICE CU APLICAȚII
BIONANOTEHNOLOGICE**

Etapă unică 2016

Director de proiect

Dr. Silvia Simona Grosu-Tudor

INTRODUCERE

Bacteriile lactice (BL) reprezintă un grup heterogen de microorganisme cu importanță industrială (în special în industria alimentară), care se regăsesc în diferite alimente fermentate (produse lactate, anumite tipuri de mezeluri, cereale fermentate, murături etc.) (Doyle și Beuchat, 2007; Stitles, 1996). De asemenea, BL sunt cunoscute pentru efectele benefice, motiv pentru care au atras atenția asupra cercetătorilor. În ultimele decenii, BL au fost intens studiate din punct de vedere genetic, fiziologic și al metabolismului acestora.

Tulpnile de BL folosite ca starter în industria alimentară sunt expuse unor condiții de stres de tipul: pH scăzut, temperaturi prea ridicate sau prea scăzute, stres oxidativ și osmotic etc. Mai mult, metodele de conservare a culturilor starter pot impune și ele un anumit stres de tipul: pH scăzut, uscare, îngheț/dezgheț, stres care afectează viabilitatea și capacitatea fermentativă a microorganismelor respective, afectându-le performanțele. În acest sens, în ceea ce privește culturile starter, în ultimul timp se pune un accent deosebit pe performanța și robustețea acestora, calități care, împreună cu funcționalitatea, sunt esențiale pentru succesul unei fermentații (Van de Guchte și colab., 2002).

BL au dezvoltat în cursul evoluției lor sisteme de apărare și de adaptare la stres, care le permit supraviețuirea în condiții mai puțin prielnice sau în cazul unor modificări bruște ale condițiilor de mediu. Aceste bacterii răspund la stres în moduri foarte specifice, în funcție de specie, tulpină și de tipul de stres (Van de Guchte și colab., 2002; Serrazanetti și colab., 2009; Mills și colab., 2011). O serie de compuși produși de BL, sau compuși a căror sinteză a fost stimulată în condiții de stres au fost caracterizați până în prezent (Van de Guchte și colab., 2002; Champomier-Verges și colab., 2010). Între aceștia, un loc însemnat îl ocupă proteinele și anumite enzime. Cele mai studiate dintre acestea sunt, de departe, proteinele de șoc termic („heat shock proteins”) a căror sinteză este indusă nu numai de tratamentul termic, ci pot fi considerate ca un răspuns general la stres.

Pentru îmbunătățirea performanțelor și funcționalității BL cu aplicații industriale au fost aplicate diferite strategii, cum ar fi modificarea mediilor de creștere, pre-adaptarea la condițiile de stres sau așa numita „protecție încrucișată” (cross-protection) (Bron și Kleerebezem, 2011). De exemplu, s-a arătat că un tratament preliminar în condiții de stres termic sau osmotic are un efect protector asupra viabilității preparatelor uscate de probiotice în timpul perioadei de păstrare.

Se pare că stresul nu numai că induce modificări în sensul supraviețuirii, dar influențează și performanțele unui sistem, fapt care poate fi exploatat în alimentele fermentate, pentru obținerea de produse de calitate superioară, cu proprietăți senzoriale sau structurale îmbunătățite (Serrazanetti și colab., 2009). Mai multe studii s-au concentrat pe impactul condițiilor de stres asupra producerii de bacteriocine de către BL (Leroy și De Vuyst, 1999; Neysens și colab., 2003; Zamfir și Grosu-Tudor, 2009). Recent, a fost observată o corelație pozitivă între producerea de exopolizaharide și rezistența la săruri biliare și pH scăzut în cazul unor specii de *Bifidobacterium* izolate din lapte matern și din fecale de bebeluș (Alp și Aslim, 2010). Efectul protector al stratului S în condițiile unui mediu ostil (Mobili și colab., 2010; Mills și colab., 2011) au fost studiate folosind tulpini de BL. Mai mult, stratul S s-a dovedit a avea un rol deosebit de important în agregarea și aderarea la celulele epiteliale sau la matricea proteinelor extracelulare, contribuind astfel la activitatea probiotică a bacteriilor producătoare de strat S (Mobili și colab., 2010; Golowczyk și colab., 2007; Frece și colab., 2005).

În acest context, informațiile privind mecanismele implicate în adaptarea BL la stres, supraviețuirea și stimularea în condiții de stres a biosintezei de metaboliți cu aplicații industriale sunt deosebit de importante din punct de vedere științific și tehnologic.

MATERIALE ȘI METODE

În această etapă a proiectului a fost studiat efectul condițiilor de stres care pot să apară în timpul proceselor biotehnologice (temperatură scăzută sau ridicată și prezența sării), asupra bacteriilor lactice selectate. În acest scop, au fost selectate 6 tulpini de bacterii lactice: *Lactococcus lactis* 19.3 și *Enterococcus durans* 41.2 (tulpini producătoare de bacteriocine), *Leuconostoc mesenteroides* P109 și *Leuconostoc mesenteroides* P124 (tulpini producătoare de exopolizaharide) și *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9 și *Lactobacillus brevis* FV 403 (tulpini producătoare de strat S). Culturile bacteriene au fost păstrate la -80°C în mediu MRS (de Man și colab., 1960) în prezența a 25% glicerol.

Modificările metabolice și structurale apărute în condițiile de stres studiate au fost evaluate prin metode biochimice și moleculare. Pentru determinări biochimice, proteinele totale au fost extrase din culturi prin sonicare și apoi au fost analizate prin Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Concentrația proteică a fost determinată folosind metoda Bradford (1976). Activitatea unor enzime intracelulare implicate în diferite căi metabolice (lactat dehidrogenază, alcool dehidrogenază, malat dehidrogenază și superoxid dismutază) din extractul proteic a fost determinată folosind metode spectrofotometrice descrise de Vallee și Hoch, 1993 sau Winterbourn și colab., 1975. De asemenea, posibile modificări ale izoenzimelor respective au fost studiate prin electroforeza nativă în gel de poliacrilamidă.

În continuare, a fost studiată biosinteza unor compuși cu importanță bionanotehnologică (bacteriocine, exopolizaharide, strat S) în condiții de stres, din punctul de vedere al cantității și proprietăților acestora. Bacteriocinele au fost cuantificate prin metoda difuziei în agar (Mayr-Harting și colab., 1972), folosind diluții seriale. În cazul tulpinilor producătoare de exopolizaharide, acestea au fost izolate și cuantificate prin precipitare cu acetonă (Degeest și De Vuyst, 1999). Proteinele stratului S au fost detectate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE) (Dohm, 2011). Modificările structurale apărute în condițiile de stres studiate au fost determinate cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (Scanning Electron Microscopy).

În final, s-a încercat îmbunătățirea performanțelor și funcționalității bacteriilor lactice cu aplicații industriale, prin aplicarea unor strategii, cum ar fi pre-adaptarea la condițiile de stres sau așa numita „protecție încrucișată” (cross-protection).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. Studiul modificărilor morfologice, metabolice și structurale induse în condiții de stres termic și salin

Electroforeza proteinelor totale celulare extrase de la culturile de bacterii lactice incubate la diferite temperaturi a arătat câteva modificări ale benzilor proteice. Cea mai evidentă este intensificarea unor benzi de aproximativ 60-70 kDa la extractele obținute de la culturile crescute la temperaturi mai mari decât temperatura optimă de creștere. Cel mai probabil, acestea corespund

proteinelor de șoc termic. De asemenea, se observă intensificarea/dispariția unor benzi corespunzătoare unei mase moleculare mici, la temperaturi scăzute/ridicate.

În cazul spectrelor proteice obținute pentru tulpinile bacteriene crescute la diferite concentrații de NaCl, se observă intensificarea unor benzi proteice comparativ cu proba martor, în special la tulpinile producătoare de EPS și la tulpina *Ent. durans* 41.2.

În literatură au fost descrise numeroase enzime și proteine implicate în protecția celulară (van de Guchte și colab. 2002; Champomier Verges și colab. 2010) în condiții de stres. Proteinele chaperon de aproximativ 60 kDa dnaJ, dnaK, chaperonina HsIO de 33 kDa și chaperonina GroS de 10 kDa au fost recunoscute ca “proteine de stres” acestea fiind detectate ca răspuns la diferiți factori de stres precum stresul termic, pH scăzut, presiune mare, stresul osmotik (Van de Guchte și colab. 2002; Champomier-Verges și colab. 2010; Mills și colab. 2011; Wu și colab. 2012). Este posibil ca o parte dintre benzile care au fost mai intense la temperaturi ridicate sau în prezența NaCl să corespundă unor astfel de enzime și proteine specifice, implicate în adaptarea celulelor bacteriene la stres.

Detectia și profilele electroforetice ale unor izoenzime intracelulare în condiții de stres termic.

Pentru detectia lactat dehidrogenazelor (LDH) în gel de poliacrilamidă, vizualizarea benzilor s-a făcut atât cu acid L-lactic, cât și cu acid D, L-lactic. În cazul utilizării acidului L-lactic, doar pentru două dintre tulpinile testate, *Enterococcus durans* 41.2 și *Lactobacillus brevis* FV 403, s-a observat apariția unor benzi de intensitate diferită. Când a fost folosit acidul D, L –lactic, în plus față de cele două tulpini la care a fost detectată prezența L-lactat dehidrogenazei, alte două tulpini, *Leuconostoc mesenteroides* P109 și *Leuconostoc mesenteroides* P124, au prezentat benzi de intensitate diferită, cel mai probabil corespunzând D-lactat dehidrogenazei.

Pentru tulpina *Lactobacillus brevis* FV 403 se observă apariția unor benzi suplimentare, de intensitate mai slabă, probabil cu specificitate redusă pentru substrat. Rezultate similare au fost obținute pentru tulpina *Lactobacillus acidophilus* IBB801 (Zamfir și Grosu-Tudor, 2014).

Prin dozarea spectrofotometrică s-a observat că activitatea cea mai mare a LDH a fost înregistrată, în general, la temperatura cea mai scăzută, dar de multe ori similară ca valoare cu cea înregistrată la temperatura optimă. La temperatura de incubare cea mai mare, activitatea LDH a fost, însă, cea mai mică, cu excepția tulpinii 41.2, unde a fost maximă.

În ceea ce privește spectrele izoenzimaticice ale alcool dehidrogenazei (ADH) obținute în cazul tulpinilor crescute la diferite temperaturi, nu au fost detectate diferențe semnificative. Activitatea ADH a fost detectată spectrofotometric doar la cele două tulpini de *Leuconostoc* și la *Lb. brevis* FV403, având valori maxime la celulele crescute la 15°C.

În cazul malat dehidrogenazei (MDH), activitatea a fost detectată doar la cele două tulpini de *Leuconostoc* și la cele două tulpini de *Lactobacillus*, fără diferențe importante între valorile la diferitele temperaturi de incubare. În gelul de poliacrilamidă, doar pentru 3 dintre tulpinile testate, *Leuconostoc mesenteroides* P109, *Leuconostoc mesenteroides* P124 și *Lactobacillus brevis* FV 403, se observă apariția unor benzi, de intensitate diferită. Pentru tulpinile *Leuconostoc mesenteroides* P124 și *Lactobacillus brevis* FV 403 se observă și apariția unor benzi suplimentare, de intensitate diferită (în general mai intense la temperatura minimă de incubare).

În cazul superoxid dismutazelor (SOD), în gelul de poliacrilamidă se observă apariția unei varietăți foarte mari de benzi, dovedind o specificitate redusă a metodei de colorare. Prin metoda spectrofotometrică, SOD au fost evidențiate doar la tulpina *L. lactis* 19.3. Activitatea maximă a SOD a fost înregistrată în extractele proteice obținute de la celulele crescute la temperatura cea mai mică, 20°C, iar cea mai mică la temperatura optimă de creștere. Deși SOD sunt cunoscute ca fiind implicate în protecția față de stresul oxidativ la diferite tipuri de microorganisme, inclusiv bacterii lactice (Bruno-Barcena și colab. 2004), studiile noastre au arătat implicarea acestei enzime și în alte tipuri de stres, cum ar fi stresul termic.

Detecția și profilele electroforetice ale unor izoenzime intracelulare în condiții de stres osmotic

În cazul tulpinilor supuse stresului osmotic, se observă apariția unor benzi de intensitate diferită în profilele izoenzimaticale ale LDH la 4 dintre tulpinile testate, *Enterococcus durans* 41.2, *Leuconostoc mesenteroides* P 109, *Leuconostoc mesenteroides* P 124 și *Lactobacillus brevis* FV 403. Pentru *Lactobacillus brevis* FV 403 se observă și apariția unor benzi suplimentare de intensitate mai mică. Dozarea spectrofotometrică a LDH a arătat că nu există diferențe semnificative între activitatea enzimatică a extractelor proteice obținute de la culturile cu NaCl, față de martor.

La profilul electroforetic al ADH, nu se observă diferențe semnificative la benzile obținute în condiții de stres osmotic. Totuși în cazul tulpinilor de *Leuconostoc*, activitatea ADH în extractele de la celulele crescute în prezența NaCl, a fost mai mică decât la martor.

În cazul malat dehidrogenazei (MDH), pentru 3 dintre tulpinile testate, *Leuconostoc mesenteroides* P109, *Leuconostoc mesenteroides* P124 și *Lactobacillus brevis* FV 403, se observă apariția unor benzi de intensitate diferită. De asemenea, se observă apariția unor benzi suplimentare, în general mai intense pentru proba martor comparativ cu proba cu sare.

Din nou, profilul electroforetic al SOD arată o varietate mare de benzi atât pentru martor cât și pentru probele supuse stresului osmotic. Activitatea SOD înregistrată spectrofotometric la varianta martor a fost similară cu cea a variantei în prezența de NaCl.

Modificările structurale apărute în condițiile de stres studiate au fost determinate cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (Scanning Electron Microscopy - SEM).

De exemplu, pentru tulpina *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9, în condiții optime de creștere, celulele au formă tipică de bacili, rotunjiți la capete. Când cultura a fost supusă unor factori de stres, am putut observa o serie de modificări structurale evidente. Astfel, în culturile obținute la temperatură scăzută față de cea optimă, celulele sunt scurte și aplatizate. La temperatura maximă de creștere, celulele capătă o formă alungită și sunt mai subțiri față de cele de la temperatura optimă de creștere. Când în mediul de cultură a fost adăugată NaCl, se observă că celulele bacteriene sunt curbate, unele având aspect de inel.

2. Evaluarea producerii de compuși cu aplicații bionanotehnologice în condiții de stres termic și salin

În ceea ce privește evaluarea producerii de exopolizaharide (EPS) în condiții de stres termic, cantitatea acestora variază semnificativ cu temperatura de incubare. Tulpina *Leuconostoc mesenteroides* P 109 produce cantități maxime de EPS la temperatura optimă de creștere (17,38 g/L), dar valori asemănătoare au fost obținute și la temperatura minimă de incubare (15,33 g/L).

A doua tulpină producătoare de EPS, *Leuconostoc mesenteroides* P124, a sintetizat cantități maxime de EPS la temperatura minimă de incubare (16,52 g/L). Producerea unor cantități mari de EPS la temperaturi mici de creștere poate fi explicată printr-un mecanism de apărare al celulelor față de condițiile nefavorabile din mediul de cultură. Cantitățile de EPS produse la temperatura maximă de creștere au fost mult mai mici pentru ambele tulpini de bacterii lactice producătoare de EPS. Adăosul de 7% NaCl în mediul de cultură a avut ca rezultat scăderea producerii de EPS. Însă, chiar și în aceste condiții, cantitatea de EPS produsă de *Leuconostoc mesenteroides* P 109 (11,68 g/L) este suficient de mare, ceea ce o face potrivită pentru folosirea în obținerea unor alimente cu proprietăți reologice îmbunătățite. Cantitatea de EPS sintetizată de *Leuconostoc mesenteroides* P 124 a scăzut dramatic (1,02 g/L), și poate fi explicată prin creșterea slabă în prezența a 7% NaCl, densitatea optică atingând valori de numai 0,52.

Activitatea inhibitoare a bacteriocinelor față de tulpina indicator *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 6901^T variază în funcție de condițiile de stres testate.

Cea mai mare activitate, 51 200 AU/mL, a fost obținută pentru *Lactococcus lactis* 19.3 după 24 de ore de incubare la 20°C, urmată de activitatea obținută la temperatura optimă de creștere și în prezența a 3% NaCl (25 600 AU/mL). La 37°C, activitatea bacteriocinei produsă de *Lactococcus lactis* 19.3 s-a înjumătățit ajungând la 12 800 AU/mL.

În cazul tulpinii *Enterococcus durans* 41.2, activitatea maximă a bacteriocinei a fost obținută la temperatura optimă de creștere (800 AU/mL). La temperatura minimă, respectiv maximă, sau în prezența de NaCl, activitatea a fost mai mică, sub 100 AU/mL, respectiv 200 AU/mL.

Tulpina *Lactobacillus helveticus* 34.9 este, de asemenea, producătoare de bacteriocine în condiții optime de temperatură (200 AU/mL), însă s-a observat o creștere a activității antibacteriene la temperatura maximă de creștere, precum și la cultivarea în mediu cu NaCl (400 AU/mL, respectiv 1600 AU/mL).

În ceea ce privește producerea de strat S, aceasta a fost evidențiată prin electroforeză SDS-PAGE, atât în condiții optime de creștere, cât și în cazul celulelor supuse stresului termic și salin.

În cazul tulpinii *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9, se observă o creștere a intensității benzii corespunzătoare temperaturii maxime de creștere față de temperatura optimă. Rezultate similare au fost obținute de Frece și colab. 2005, autorii sugerând că proteinele stratului S se exprimă preferențial în condiții de stres termic.

Pentru tulpina *Lactobacillus brevis* FV 403, nu se observă modificări semnificative ale benzilor obținute la diferite temperaturi de creștere.

În condiții de stres osmotic, benzile corespunzătoare proteinelor stratului S sunt mai puțin intense față de proba martor pentru ambele tulpini testate.

În final a fost testată rezistența tulpinilor selectate (*Lactococcus lactis* 19.3, *Leuconostoc mesenteroides* P109 și *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9) la temperaturi ridicate (60-80°C) pentru perioade scurte de timp (1-6 min). La 60°C, procentul de supraviețuire după 6 minute de tratament este foarte ridicat pentru tulpina *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9 (~90%), în timp ce pentru celelalte două tulpini este de 55%, respectiv 22%. De asemenea, la 70°C, după 3 minute de tratament termic, *Lactobacillus helveticus* RFF 34.9 are o rată de supraviețuire foarte bună (peste

50%) în comparație cu celelalte tulpini. În schimb, după 3 minute de expunere la temperatura de 80°C, s-a observat moartea tuturor tulpinilor.

Mai mult, am încercat să creștem rezistența tulpinilor testate la condițiile de stres salin printr-o pre-adaptare într-un mediu cu concentrații moderate de NaCl. Pre-adaptarea s-a realizat conform tabelului de mai jos:

Tulpina:	41.2	19.3	P109	P124	403	34.9
Concentrația de sare	1%	5%	5%	5%	7%	2%

Bacteriile lactice enumerate mai sus au fost crescute de patru ori în mediu MRS suplimentat cu concentrația de sare specificată. După adaptare, creșterea tulpinilor a fost testată în mediu MRS cu următoarele concentrații de NaCl:

- 41.2: 2%, 3%, 4%, 5%;
- 19.3: 6%, 7%, 8%, 9%;
- P109: 6%, 7%, 8%, 9%;
- P124: 6%, 7%, 8%, 9%;
- 403: 8%, 9%, 10%, 11%;
- 34.9: 3%, 4%, 5%, 6%.

Experimentul nu a furnizat rezultate satisfăcătoare, creșterea bacteriilor adaptate la concentrația de sare următoare celei de adaptare nefiind diferită față de cea a bacteriilor neadaptate. Considerăm că se impune un studiu mai elaborat, prin care să se testeze posibilitatea de adaptare la stres printr-o incubare prealabilă în diferite condiții, nu neapărat în același tip de stres. Acest lucru se va putea face după ce vom avea și datele din următoarea etapă, privind răspunsul la diferite valori de pH și concentrații de săruri biliare.

CONCLUZII

Rezultatele experimentale obținute în etapa finală 2016 a acestui proiect ne-au condus la următoarele concluzii:

- Studiile noastre aduc informații noi cu privire la răspunsul la anumiți factori de stres a unor bacterii lactice cu proprietăți funcționale
- Tulpinile testate sunt tolerante la stresul termic și salin, supraviețuind inclusiv la temperaturi foarte ridicate pentru perioade scurte de timp
- Rezultatele noastre confirmă implicarea anumitor proteine și enzime în răspunsul la factorii de stres testați
- Bacteriile testate suferă o serie de modificări structurale în condiții de stres, așa cum au fost evidențiate prin SEM
- Funcționalitatea bacteriilor testate (producere de bacteriocine, exopolizaharide, proteinele stratului S) este influențată de condițiile de creștere

Bibliografie

1. Alp, G. and Aslim, B. (2010) Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. Isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* 16, 101-105.
2. Åvall-Jääskeläinen, S. and Palva, A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 511-529.
3. Bron, P.A. and Kleerebezem, M. (2011). Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. *Bioengineered Bugs* 2:2, 80-87.
4. Bruno-Ba'rcena JM, Andrus JM, Libby SL, Klaenhammer TR, Hassan HM (2004) Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity. *Appl Environ Microbiol* 70:4702–4710.
5. Champomier-Verges M.C., Zagorec M., Fadd S., (2010) Proteomics: A tool for understanding lactic acid bacteria adaptation to stressful environments. In: Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (eds.) *Biotechnology of lactic acid bacteria - Novel applications*. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA.
6. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130–135.
7. Degeest, B. and De Vuyst, L. (1999) Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2863-2870.
8. Dohm, N., Petri, A., Schlender, M., Schlott, B., König, H., and Claus, H. (2011) Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B706. *Arch. Microbiol.* 193(4), 251-261.
9. Doyle, M.P. & Beuchat, L.R. (eds.) (2007) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press.
10. Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V. and Šuškovc, J. (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.
11. Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G.L. (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 264-273.
12. Hardy G., Hardy I., McElroy B. (2002) Nutraceuticals: a pharmaceutical viewpoint: I. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 5, 671-677.
13. Hollmann, A., Delfederico, L., Miyoshi, A., Disalvo, E.A., De Antoni, G., Semorile, Azevedo V. (2010) S-layer proteins from lactobacilli as vaccine delivery systems. *Int. J. Microbiol. Res.* 2(2), 30-43.
14. Klaenhammer, T. (2007) Probiotics and prebiotics. In M. P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 891-907). Washington, DC: ASM Press.
15. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
16. Leroy, F. and DeVuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation Industry. *Trends Food Sci.Technol.* 15, 67–78.
17. Leroy, F. and L. De Vuyst. (1999) The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5350–5356.
18. Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C. (1972) Methods for studying bacteriocins. In: *Methods in Microbiology* (Norris, D.W., Ribbons, D.W., eds.), Vol. 7A, New York, Academic Press, p. 246-260.
19. Mills S., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross P., (2011) Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microb. Cell Fact.* 10(suppl):S19

20. Mobili, P., Gerbino, E., Tymczyszyn E.E., and Gómez-Zavaglia, A. (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, A. Mendez-Vilas (ed.), FORMATEX Research Center, Spain, vol. 2, 1224-1234.
21. Mozzi, F., Raya, R.R. and Vignolo, G.M. (eds.) (2010) Biotechnology of lactic acid bacteria - Novel applications. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA.
22. Neysens, P., Messens, W., Gevers, D., Swings, J. and De Vuyst, L. (2003) Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE471 occur under stress conditions. Microbiol., 149, 1073-1082.
23. Reina L.D., Breidt F. Jr., Fleming H.P. and Kathariou S. (2005) Isolation and selection of lactic acid bacteria as biocontrol agents for nonacidified, refrigerated pickles. J. Food Sci. 70, M7-M11.
24. Serrazanetti, D.I., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R., (2009) Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. Food Microbiol. 26, 700-711.
25. Stiles M.E., (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. Antoine Van Leeuwenhoek 70: 331 – 345.
26. Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002) Stress response in lactic acid bacteria. Antonie Leeuwenhoek 82:187–216.
27. Wu C, Zhang J, Chen W, Wang M, Du G, Chen J (2012) A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acidinduced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. Appl Microbiol Biotechnol 93:707–722.
28. Zamfir M., Grosu-Tudor S., (2009) Impact of stress conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 and production of acidophilin 801, Journal of General and Applied Microbiology, 55 (4) 277 - 282.
29. Zamfir M., Grosu-Tudor S.S., (2014) Stress response of some lactic acid bacteria isolated from Romanian artisan dairy products, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30 (2), 375-384.