

ZORICA RADULOVIĆ
 DRAGOSLAVA RADIN
 MIROLJUB BARAĆ
 JELENA ĐEROVSKI
 DRAGOJLO OBRADOVIĆ

Poljoprivredni fakultet,
 Beograd

UDK 547.472.3:637.146.1:543.64

KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE RODA *Lactococcus*

Rad je obuhvatio karakterizaciju bakterija mlečne kiseline izolovanih iz autohtonih sireva prozvedenih na tradicionalan način, bez dodavanja starter kultura. Iz 5 uzoraka sira izvršena je izolacija 30 termofilnih, mezofilnih i citrat⁺ sojeva BMK na odgovarajućim selektivnim podlogama (LM17 agar i LDC agar). Od izdvojenih čistih kultura, nakon određivanja Gram reakcije i katalaza testa, izabrano je 12 sojeva za dalja ispitivanja. Na osnovu načina fermentacije laktoze (homo-heterofermentacija) i acidogene sposobnosti praćene u 1% rekonstituisanom obranom mleku u toku 24 sata, selekcionisano je 6 sojeva, koji su pokazali homofermentativnu aktivnost i dobru acidogenu sposobnost. Za ove sojeve je ispitana proteolitička aktivnost u odnosu na β -kazein, pomoću SDS poliakrilamidne elektroforeze, koja je pokazala međusobne razlike u sposobnosti razgradnje β -kazeina. Na kraju je izvršena njihova identifikacija pomoću API Rapid ID 32 Strep testa za laktokoke, i utvrđeno je da 4 soja pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, a dva soja vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Ključne reči: Bakterije mlečne kiseline • autohtoni sir • acidogena sposobnost • proteolitička aktivnost

UVOD

Autohtona prerada mleka datira iz daleke prošlosti, ali se i do današnjih dana zadržala u različitim oblastima, kako kod nas, tako i u drugim zemljama. Ovakav način proizvodnje mlečnih proizvoda karakterističan je za brdsko-planinska područja, koja se odlikuju razvijenom stočarskom proizvodnjom na individualnim gazdinstvima. Pošto je u stočarskoj proizvodnji dominantan uzgoj goveda i ovaca, kao sirovina javlja se kravlje i ovčje mleko, a najviše zastupljen proizvod ovakve prerade mleka je sir.

Prerada i potrošnja mleka najvećim delom je u domaćinstvima, a samo manji deo se iznosi na seosku pijacu. Visoka potrošnja mleka i mlečnih proizvoda u samim domaćinstvima i neorganizovanost otkupa putem trgovačke i kooperativne mreže, kao i uslovi prerade mleka, koja se vrši na planinama često nedovoljno pristupačnim, uzrokuju zatvorenost proizvodnje.

Sistematski prikaz i ocenu znatnog broja autohtonih mlečnih proizvoda „stare Jugoslavije”, dao je Zdanovski (1947) Ovaj autor i saradnici su u brojnim radovima (1967, 1972) izučavali tehnologije najvažnijih domaćih mlečnih proizvoda.

Značajan doprinos u izučavanju proizvodnje autohtonih mlečnih proizvoda dali su Dozet i sar. (1971, 1985, 1991), kao i paralelu sa sličnim tehnologijama u Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori (1996).

U Srbiji postoji nekoliko oblasti koje se karakterišu autohtonom proizvodnjom belih sireva u salamuri, za koje je karakteristično da ime dobijaju po

oblasti u kojoj se proizvode, pa su samim tim poznati: sjenički, zlatarski, krovirski, velija (svrljiški), homoljski i dr.

Proučavanjem tehnološkog postupka proizvodnje autohtonih proizvoda bavio se veći broj autora, a takođe i izučavanju mikrobiologije ovih proizvoda posvećeno je dosta pažnje, Vukašinić i sar. (1995), Dimitrijević i sar. (1998).

S obzirom da su autohtoni sirevi veoma različitog kvaliteta, neophodno je izdvojiti najbolje i uticati na organizovanu preradu i plasman. Poznato je da specifična mikroflora mleka, a kasnije i mikroflora sireva, znatno utiču na kvalitet i specifičnost proizvoda, koji je karakterističan i prepoznatljiv za određeni region. U tom smislu, cilj ovog rada je da ispita koja je to dominantna mikroflora bakterija mlečne kiseline, koja usmerava proces fermentacije i zrenje sireva, da se izoluju čiste kulture, ispituju neke njihove karakteristike, kao preliminarni parametri u nalaženju mogućnosti njihove šire primene u proizvodnji sireva.

MATERIJAL I METOD RADA

Za izolaciju sojeva upotrebljeno je pet uzoraka sira, koji su imali prijatan ukus i miris, dobru konzistenciju i aromu. Uzorci su homogenizovani u Stomacher 400 lab blender aparatu (Seward, Engleska), a zatim je izvršena izolacija metodom razređenja zasejavanjem na selektivne podloge na određenim temperaturama. Tom prilikom ispitivalo se prisustvo termofilnih i mezofilnih okruglastih oblika BMK, pa je upotrebljen LM 17 agar i temperature

Adresa autora: mr Zorica Radulović, Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun-Beograd

inkubacije 43° i 30°C u aerobnim uslovima u toku 3 dana, a prisustvo citrat+ sojeva na LDC agaru na 30°C, u toku 3 dana inkubacije. Potom je metodom iscrpljenja izvršeno trostruko prečišćavanje izolovanih sojeva.

Izolovani sojevi kao čiste kulture dalje su podvrgnuti determinaciji pomoću klasičnih mikrobioloških metoda, Gram reakcijom, mikroskopskim pregledom i katalaza testom.

Za selekcionisane sojeve je potom utvrđeno da li fermentaciju šećera obavljaju homo ili heterofermentativnim putem. Za ovu determinaciju je izvršeno zasejavanje u odgovarajući bujon sa Durham cevčicom i posle inkubacije na optimalnoj temperaturi, utvrđeno prisustvo ili odsustvo gasa u cevčici.

Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama NaCl, ispitana je zasejavanjem i inkubacijom u odgovarajućim bujonima sa 2%, 4% i 6,5% soli.

Acidogena sposobnost ispitivanih sojeva je praćena u 1% rekonstituisanom obranom mleku, promenom pH vrednosti u toku 8 sati i to merenjem na svaka dva sata, a zatim nakon 24 sata.

Proteolitička aktivnost selekcionisanih sojeva je utvrđena detekcijom prt+ sojeva u odnosu na β -kazein, primenom SDS poliakrilamidne gel-elektroforeze.

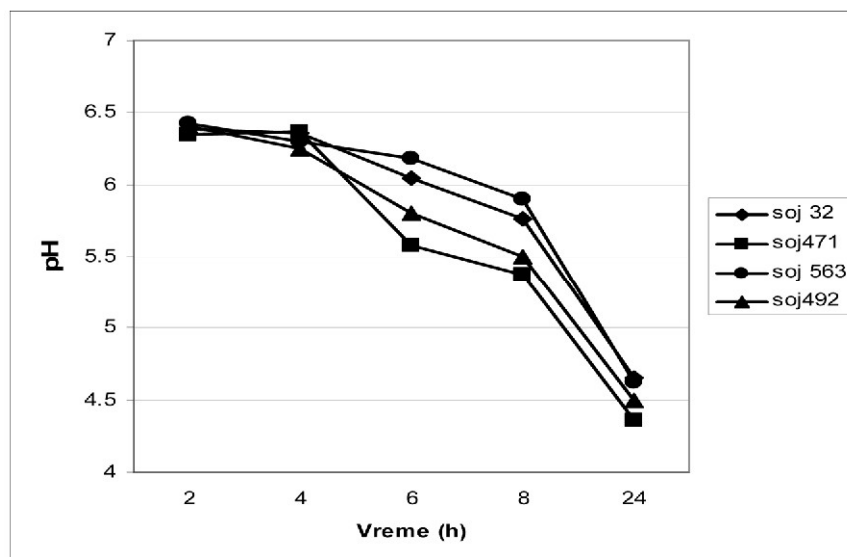
Sojevi koji su ispunili zahteve prethodnih ispitivanja, determinisani su na API RAPID ID 32 Strep sistemu (bio Merieux). Za očitavanje rezultata ovih testova korišćen je program API Lab plus softver.

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacijom na selektivnim podlogama i prečišćavanjem do čistih kultura, izdvojeno je 30 sojeva. Posle sledećih koraka u determinaciji, a to su Gram reakcija, mikroskopski pregled i katalaza test, selekcionisano je 12 sojeva i to 7 okruglastih formi na LM 17 agaru i 5 okruglastih formi na LDC agaru.

Od 7 sojeva izdvojenih na LM17 agaru, 6 su bili mezofilni i samo 1 termofilni, a svih 5 citrat-pozitivnih sojeva su bili mezofilni.

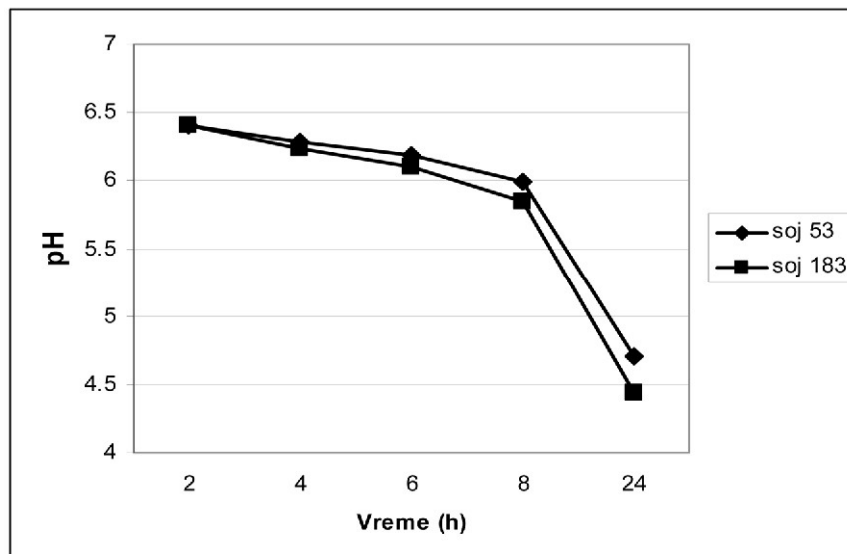
Rezultati su pokazali da je mezofilna mikroflora znatno zastupljenija od termofilne. Što je i razumljivo s obzirom da u tehnologiji proizvodnje belog sira u salamuri nije zastupljena visoka temperatura dogrevanja sa jedne stra-



Slika 1. ACIDOGENA SPOSOBNOST ISPITIVANIH SOJEVA IZDVOJENIH NA LM 17 AGARU

Figure 1. ACIDOGENIC ABILITY OF EXAMINED STRAINS ISOLATED BY LM 17 AGAR

ne, a sa druge klima brdsko-planinskih nim putem, dva soja pokazuju vrlo ma-



Slika 2. ACIDOGENA SPOSOBNOST ISPITIVANIH SOJEVA IZDVOJENI NA LDC AGARU

Figure 2. ACIDOGENIC ACTIVITY OF EXAMINED STRAINS ISOLATED BY LDC AGAR

krajeva je umerena i ne odlikuje se visokim temperaturama. Samim tim i dominantna mezofilna mikroflora je bila i očekivana. Takođe, poznato je da dominantnu mikrofloru u toku zrenja sira čine mezofilni sojevi laktobacila i laktokoka Macedo i sar. (1995).

Posle testiranja da li sojevi pripadaju homo ili heterofermentativnim vrstama je utvrđeno je da jedan soj vrši fermentaciju šećera heterofermentativ-

no prisustvo gasa, dok su ostali bili homofermentativni.

Ispitivanje acidogene sposobnosti je pokazalo različite rezultate. Kao veoma aktivni u produkciji mlečne kiseline, izdvojila su se četiri soja okruglastog oblika izolovani na LM17 agaru i dva citrat-pozitivna soja izolovani na LDC agaru, a svih 6 su predstavljali mezofilnu mikrofloru. Navedeni sojevi su nakon 24 sata inkubacije u 1% rekonsti-

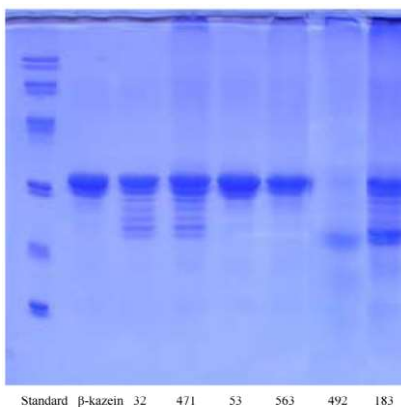
tuisanom obranom mleku stvorili gruš i pri tom postizali pH vrednosti u rasponu 4,4–4,8.

Ostali sojevi su pokazali slabu acidogenu moć i sporo snižavanje pH vrednosti, tako da se ona nakon 24 sata kretala najniže do 5,2. Pošto je sposobnost acidifikacije i brza produkcija mlečne kiseline poželjan parametar kod većine sojeva bakterija mlečne kiseline i može imati različitu namenu u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda Salminen, S. (1998), ovo svojstvo je uzeto kao veoma važan kriterijum u daljoj selekciji sojeva.

Dalja ispitivanja su vršena sa odabranih 6 sojeva i u tom smislu je ispitana njihova sposobnost da obavljaju svoje životne funkcije u prisustvu 2, 4 i 6,5% soli. S obzirom da se autohtoni sirevi često odlikuju prisustvom relativno velikog procenta soli, otpornost sojeva na veće procenete soli bi trebalo da bude jedna od njihovih karakteristika.

Rezultati ispitivanja su to i potvrdili i pokazalo se da ispitivani sojevi imaju pun rast u bujonskoj kulturi i sa 2, 4 i 6,5% soli nakon 24 sata inkubacije na optimalnim temperaturama. Generalno, za bakterije mlečne kiseline se ne može reći da je rast u prisustvu velikog procenta soli njihova odlika Schillinger (1987), ali je poznato, a i ova ispitivanja su pokazala da postoje sojevi koji nesmetano rastu i u prisustvu većeg procenta soli El-Gendy i sar. (1983).

Elektroforetskom detekcijom sojeva koji poseduju ekstracelularne proteinaze sposobne da razgrađuju β -kazein, utvrđeno je da među ispitanim soje-



Slika 3. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST ISPITIVANIH SOJEVA
Figure 3. PROTEOLYTIC ACTIVITY OF EXAMINATED STRAINS

vima postoje značajne razlike. Posebno se istakao soj 492 koji je pokazao najveću proteolitičku aktivnost, zatim sledi soj 183, dok su sojevi 32 i 47 pokazali nešto manju sposobnost razgradnje β -kazeina, a najmanju ispitivanu sposobnost su pokazali sojevi 53 i 563.

Ispitivanja su nastavljena determinacijom na API sistemu, gde je na osnovu biohemijskih reakcija i fizioloških osobina sojeva utvrđena vrsta kojoj soj pripada. Rapid ID 32 Strep testom su ispitani svih 6 sojeva okruglastog oblika, a rezultati dobijeni Api Lab softverom pokazali su da 4 izabrana soja: 32, 471, 563 i 492 pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, a dva soja 53 i 183 pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

ZAKLJUČAK

Izolacijom na selektivne podloge iz 5 uzoraka sira i daljim prečišćavanjem izdvojeno je 30 čistih kultura. Na osnovu bojenja po Gramu, mikroskopskog pregleda i katalaza testa, izabrano je 12 sojeva za dalju determinaciju i to: 7 sojeva koji su izdvojeni na LM 17 agaru i 5 sojeva izdvojenih na LDC agaru kao citrat-pozitivni.

Od 7 sojeva koji su izdvojeni na LM 17 agaru, jedan je bio termofilan i 6 mezofilnih, a svih 5 citrat pozitivnih sojeva su bili mezofilni.

Po načinu fermentacije laktoze, pokazalo se da je jedan soj bio heterofermentativan, dva su pri fermentaciji izdvajala vrlo malo gasa, a ostalih 9 sojeva je bilo homofermentativno.

Svi ispitivani sojevi su pokazali dobru aktivnost u prisustvu 2, 4 i 6,5% NaCl.

Ispitivanjem acidogene sposobnosti utvrđeno je da 6 sojeva postiže zadovoljavajuće pH vrednosti u toku 24 sata i kretale su se od 4,3 do 4,8.

U pogledu proteolitičke aktivnosti u odnosu na β -kazein, pokazalo se da jedan soj poseduje ubedljivo najjaču sposobnost razgradnje β -kazeina, jedan vrši ovu razgradnju nešto manjim intenzitetom, zatim slede dva soja sa umerenom aktivnošću i na kraju, sa najmanjom aktivnošću se nalaze dva ispitivana soja.

Determinacijom svih 6 sojeva primenom API RAPID ID 32 Strep testa, utvrđeno je da 4 soja pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* i 2 soja

Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Ovakva istraživanja pokazuju da među različitim sojevima BMK, izolovanim iz autohtonih sireva postoje i oni, čijom bi selekcijom u pravcu kriterijuma koje moraju da zadovolje starter kulture u proizvodnji sireva, koji bi mogli naći širu primenu u mlekerskoj industriji.

LITERATURA

- DOZET N., BAJČETIĆ B, STANIŠIĆ M. (1971): Tendences in production and manufacture of ewe's milk in Yugoslavia, IDF Seminar-Madrid.
- DOZET N., STANIŠIĆ M., BIJE LJAC S., PETROVIĆ M. (1985): Ispitivanje tehnologije bijelog sira – tipa travničkog. Mljekarstvo 33, str. 5.
- DOZET N. (1991): Komparativni pregled autohtonih mliječnih proizvoda brdsko-planinskog područja Jugoslavije. Ekonomika poljoprivrede, Vol. 38, No 6, 7, 8.
- DOZET N., ADŽIĆ N., STANIŠIĆ M., ŽIVIĆ N. (1996): Autohtoni mliječni proizvodi. Poljoprivredni institut Podgorica, Sirmir Beograd.
- EL-GENDY M.S., ABDEL-GALIL Y., HEGAZI Z.F. (1983): Characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria, in particular lactobacilli, leuconostoc and pediococci isolated from salted raw milk. J. Food Prot. 46., 429–433.
- DIMITRIJEVIĆ S., BANINA A., ČORIĆ M., VUKAŠINOVIĆ M., TOPISIROVIĆ L.J., FIRA Đ. (1998): Selekcija i karakterizacija prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline iz mladog sjeničkog sira. Dani mikrobiologa Jugoslavije, Zbornik radova i sažetaka, 297.
- MACEDO C.A., MAICATA X.F., HOOG A.T. (1995): Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. J. Appl. Bac., 79., 1–11.
- SALMINEN S., VON WRIGHT A. (1998): Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc.
- SCHILLINGER M., LUCKE, K.F. (1987): Identifikation of lactobacilli from meat and meat products. Food microbiol. 4, str. 199–208
- VUKAŠINOVIĆ M., ĐORDEVIĆ I., BRANKOVIĆ S., KURIJUŠIĆ I., TOPISIROVIĆ L.J., BANINA A. (1995): Biohemijska i genetička karakterizacija prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline u cilju proizvodnje starter kultura. VII kongres mikrobiologa Jugoslavije, Zbornik radova 175–176
- ZDANOVSKI N. (1947): Ovcije mljekarstvo. Zagreb, 1947.
- ZDANOVSKI N., DOZET N., STANIŠIĆ M. (1972): Izučavanje kvalitetnih vrijednosti autohtonih mliječnih proizvoda na području istočne Bosne. Elaborat, Sarajevo.
- ZDANOVSKI N. (1967): Naši tvrdi ovčji sirevi. Mljekarstvo 19/9.

SUMMARY

CHARACTERISATION OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA
GENUS *Lactococcus*

Zorica Radulović, Dragoslava Radin, Miroljub Barać, Jelena Miočinović,
Dragojlo Obradović

Faculty of Agriculture, Belgrade

Lactic acid bacteria strains isolated from autochthonous cheeses were researched. In products such as these, where starters were not added, fermentation occurs as a result of natural flora present in the surrounding environment.

Thirty thermophilic, mesophilic and citrate+ LAB strains were isolated by selective medium (LM17 agar and LDC agar) from 5 samples of autochthonous cheeses. They were exposed to further analysis and identification. After examination by Gram test and catalase test, 12 strains of LAB, were selected for further analysis.

On the basis of lactose fermentation and acid production in 1% reconstituted skim milk, 6 homofermentative strains were selected, that also had good acidogenic activity. Their proteolytic ability to hydrolyze B-casein was examined by SDS polyacrilamid electrophoresis, where these strains showed different proteolytic activity. Determination of these strains by API Rapid ID 32 Strep tests showed that 4 strains belong to the *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and 2 strains to the *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Key words: Lactic acid bacteria • autochthonous cheese • acidogenic ability • proteolytic activity