

UDK: 637.3:579.67

## POTENCIJALI PRIMENE DOPUNSKIH KULTURA U PROIZVODNJI SIREVA

DRAGOJLO OBRADOVIĆ, DRAGOSLAVA RADIN, ZORICA RADULOVIĆ<sup>1</sup>

**IZVOD:** Mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u toku proizvodnje i zrenja sireva. U tim procesima velika pažnja se poklanja izboru starter kultura, ali se često zaboravlja aktivnost takozvane sekundarne mikroflore koja je specifično vezana za određena svojstva pojedinih vrsta sireva. Ta mikroflora može da posluži kao potencijalni izvor sojeva koji bi ulazili u sastav takozvanih «dopunskih» kultura čija je funkcija poboljšanje senzornih osobina i skraćenje zrenja sireva. U dopunske kulture mogle bi da spadaju i one koje sadrže sojeve koji sintetišu bakteriocine u cilju sprečavanja razvića neželjene mikroflore ili koji ubrzavaju proces liziranja ćelija čime se oslobađa veliki broj intracelularnih enzima bitnih za procese zrenja. Isto tako i primena probiotika u proizvodnji sireva privlači sve veću pažnju, jer su se sirevi pokazali kao dobri vektori za prenos probiotika.

**Ključne reči:** dopunske kulture, sekundarna mikroflora, autoliza, probiotik, zrenje sira

### UVOD

Savremena proizvodnja sireva je strogo kontrolisan proces u kome se koristi pasterizovano mleko pri čemu se posebna pažnja poklanja higijensko sanitarnim uslovima. Pa ipak, i pored svih preduzetih mera, u siru je uvek prisutna nestarterska mikroflora koja pripada bakterijama mlečne kiseline, mikrokokama i u manjoj meri enterokokama (Fitzsimons i sar., 2001). Ovde se najčešće radi o heterofermentativnim mezofilnim laktobacilima i najčešće izolovane vrste su *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, a od pediokoka najčešće su prisutne vrste *Pediococcus acidilactici* i *Pediococcus pentosaceus*. Poznato je da se maksimalne vrednosti broja ćelija starter kultura postižu prvo dana proizvodnje, a da te vrednosti vremenom opadaju, tako da na primer kod čedar sira posle mesec dana, nakon uginuća i autolize ćelija startera, dolazi do intenzivnog povećanja nestarterske mikroflore koja postaje dominantna (Beresford i sar., 2001). Ispitivanja su pokazala da ovi mikroorganizmi mogu da dovedu do intenzivnijeg razvoja karakterističnih senzornih svojstava kao što su ukus i miris, ali takođe i do pogoršanja

Pregledni rad / Review paper

<sup>1</sup> Dr Dragojlo Obradović, redovni profesor; dr Dragoslava Radin, vanredni profesor; mr Zorica Radulović, asistent; Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

navedenih osobina (Broadbent i sar., 2003). Imajući u vidu da proizvođači sireva ulažu velike napore kako bi unapredili kvalitet, standardizovali proizvodnju i po mogućnosti skratili period zrenja, u tom smislu kao jedno od rešenja namentnula se primena dopunskih kultura, odnosno selekcionisanih sojeva, koji imaju za cilj prevenstveno poboljšanje senzornih osobina (El Soda i sar., 2000). Međutim, u sastav dopunskih kultura mogu doći i sojevi koji produkuju bakteriocine koji imaju zadatak da spreče razviće neželjene mikroflore ili koji ubrzavaju lizu ćelija starter kultura i time oslobođaju intracelularne enzime vitalne za zrenje sireva (Pelarez i Requena, 2005). Kada je u pitanju primena probiotika u sirarstvu tu stvari, za razliku od fermentisanih napitaka, nisu dovoljno ispitane. Imajući u vidu pH sireva, oksidoreduktioni potencijal, hemijski sastav, strukturu i puferska svojstva, neosporno je da sirevi mogu biti dobri vektori za prenos probiotika. Međutim, trenutno je suviše mali broj sireva sa probioticima na tržištu, ali zato podaci dobijeni na osnovu eksperimenata deluju ohrabrujuće, pa iz tih razloga primena probiotika kao dopunskih kultura u sirarstvu predstavlja oblast koja sigurno ima perspektivu (Obradović i sar., 2004). Imajući u vidu sve što je navedeno ovaj rad ima za cilj da ukaže na buduće pravce primene dopunskih kultura u sirarstvu i da istakne višestruku korist od njihove primene.

### **Poreklo i značaj nestarterske mikroflore**

Poreklo nestarterske mikroflore može biti višestruko. Prisustvo ovih mikroorganizama može da bude posledica kontaminacije pasterizovanog mleka sa florom iz vazduha, prisustva termorezistentnih vrsta, ali najčešće se smatra da se nalaze u biofilmovima na površinama koje dolaze u kontakt sa mlekom, a koji su rezistentni na pranje i dezinfekciju, čime se omogućava preživljavanje mikroflore (Somers i sar., 2001). Pored sireva proizvedenih na industrijski način, potencijalni izvori navedene flore predstavljaju i autohtoni fermentisani mlečni proizvodi (Martinović i sar., 2005, Radulović i sar., 2006, Obradović i Radin, 2006). Nestarterski mikroorganizmi zahtevaju energiju za svoj rast, ali kako je laktosa u siru posle određenog vremena transformisana, očigledno da im laktosa nije glavni izvor energije, pogotovo ako se zna da se njihovo prisustvo u toj fazi zrenja povećava. Pretpostavlja se da ovi mezofilni laktobacili poseduju enzime koji omogućavaju korišćenje šećera iz kazeina i glikoproteina masnih kapljica, a drugi izvori energije u zrelim srevima predstavljaju i metaboliti bakterija kao što su peptidi i aminokiseline (Williams i sar., 2000). Ispitivanja su pokazala da su sirevi proizvedeni sa mezofilnim laktobacilima imali superioran ukus i miris u poređenju sa kontrolnim srevima (Lynch i sar., 1996). Prisustvo laktobacila dovelo je do povećane koncentracije malih peptida i amino kiselina. Do istih rezultata došlo se i u proizvodnji čedra sa manjim centrom masti (Drake i sar., 1997). Iz ovih ispitivanja, a i brojnih drugih proizilazi da su dopunske kulture bolje rešenje za poboljšanje arome i ubrzanje zrenja sireva u poređenju sa primenom enzima, povišenim temperaturama zrenja ili izmenom tehnološkog procesa, tim pre što se radi o bakterijama mlečne kiseline, odnosno o selekcionisanim sojevima čija je aktivnost prethodno ispitana, tako da mogu da se primenjuju kao definisane kulture. U tom smislu danas se poklanja velika pažnja sojevima koji bi mogli da se koriste kao dopunske kulture i to prevenstveno njihovoj peptidaznoj i esteraznoj aktivnosti, odnosno njihovim enzimskim profilima (El Soda i sar., 1999). Praksa je pokazala da samo sojevi sa izraženom peptidaznom, dobrom razgradnjom hidrofobnih aminokiselina, a

slabom acidogenom aktivnošću, dovode do redukcije gorkog ukusa, a samim tim povoljno utiču na senzorna svojstva. Kao drugi kriterijum selekcije mogla bi da posluži i autolitička sposobnost koja omogućava oslobađanje intracelularnih peptidaza, a samim tim i veći sadržaj slobodnih amino kiselina, odnosno smanjen sadržaj tzv. gorkih peptida (Hannon i sar., 2003).

### **Producija bakteriocina od strane nestarterske mikroflore**

Producija bakteriocina je jedna od najispitivanijih osobina bakterija mlečne kiseline (Obradović, 1998; Twomey i sar. 2002). Međutim, primena sojeva koji produkuju bakteriocine kao dopunskih kultura tek od skora privlači pažnju (Salam i sar., 2004). Poznato je da bakteriocini mogu biti iskorišćeni u prevenciji trovanja hranom ili kvarenja hrane i najbolji primer za ovo je antibiotik nizin. Ta aktivnost se ne ograničava samo na bakterije, već i na kvasce i pokazano je da bakteriocin soja *L.paracasei subsp. paracasei*, korišćenog kao starter, sprečava razviće *Candida albicans*, *Candida pseudointermedia*, *Candida blankii* i *S. cerevisiae* (Atanasova i sar., 2003). Isto tako, soj *L. paracasei subsp. paracasei* izolovan iz čedra, koji je posedovao odličan ukus i miris, korišćen je za proizvodnju čedra u kombinaciji sa sojem koji je proizvodio bakteriocin lakticin 3147. Kako je navedeni izolovani soj bio rezistentan na pomenuti bakteriocin, došlo je do njegove dominacije u toku celog toka zrenja (Ryan i sar., 2001). Eksperiment je izveden sa liofilizovanim koncentrovanim kulturama, čime je podvučen značaj navedenih kultura (Obradović i sar., 1992, Obradović i Ilić, 1996).

Sposobnost ćelija startera da autoliziraju je od posebnog značaja, jer se na ovaj način oslobođaju intracelularni enzimi vitalni za zrenje. Međutim, upotreba bakteriocina u cilju indukovana lize bakterija mlečne kiseline je sasvim novi pristup u ubrzavanju zrenja sira i kontrolisanom formiranju arome. Većina bakteriocina bakterija mlečne kiseline iskazuje svoju aktivnost utičući na propustljivost citoplazmatične membrane, što dovodi do gubitka vijabilnosti ćelija. Pored toga, neki bakteriocini dovode do lize ćelija bakterija (Martinez-Costa i sar., 2000). Sigurno je da ova oblast zahteva dodatna istraživanja koja bi obuhvatila aktivnost enzima koji transformišu aminokiseline u liziranim ćelijama kao, i uticaja različitih faza liziranja ćelije na delovanje intracelularnih enzima.

### **Probioitici kao dopunske kulture u sirarskoj proizvodnji**

Primena probiotika u proizvodnji sira privlači sve veću pažnju (Gardiner i sar. 1999, Obradović i sar., 2003). Neosporna je činjenica da pH, sadržaj masti, oksidoreduktacioni potencijal i uslovi skladištenja predstavljaju solidan preduslov za produženu vijabilnost ćelija probiotika u određenim srevima. Kod sira se pH kreće u rasponu 4,8–5,6 što je bitna razlika u odnosu na fermentisana mleka gde je pH 3,7–4,3 što opet, s druge strane, pogoduje preživljavanju probiotika, a naročito bifidobakterija koje su veoma senzitivne na povećanje kiselosti. Isto tako, zrenje polutvrdih i tvrdih sira, koje traje nekoliko nedelja ili meseci, odvija se pod skoro anaerobnim uslovima, što pogoduje mikroaerofilnim i anaerobnim ćelijama probiotika. Pored toga, struktura sirnog testa, kao i relativno visok sadržaj masti, doprinose boljoj zaštiti probiotika prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Ispitivanja u proizvodnji edamskog sira sa kulturama FD-DVS DCC-240 (CHR. Hansen) i probiotske kulture FD DVS BB-12 *Bifidobacterium lactis* (CHR. Hansen) i FD

DVS La 5 *Lactobacillus acidophilus*, (CHR. Hansen) su pokazala da je stepen preživljavanja čelija probiotika u prvih 120 dana bio veći od  $10^6$  cfu/g, čime su apsolutno ispunjeni kriterijumi o minimalnoj koncentraciji probiotika koja dovodi do željene probiotičke aktivnosti, a da pri tome nije došlo do odstupanja od standardnog ukusa i mirisa. Ne sme se izgubiti iz vida međusobni uticaj probiotika i starter kultura, a stepen interakcija prvenstveno zavisi od momenta dodavanja probiotika, odnosno da li se oni dodaju pre ili posle fermentacije. Ako se ima u vidu tehnološki proces proizvodnje svežih sreva, može se reći da ovi srevi predstavljaju više nego pogodne vektore za prenos probiotika. Navedeni srevi nemaju zrenje, čuvaju se na temperaturama hlađenja, rok trajanja je relativno kratak. Prema tome, jasno je da primena probiotika u sirarstvu ima određene potencijale, ali su sigurno neophodna dopunska istraživanja (Obradović i sar., 2005).

## LITERATURA

- ATANASSOVA, M., CHOISSET, Y., DALGALARRONDO, M., CHOBERT, J.-M., DOUSSET, X., IVANOVA, I., HAERTLE, T.: Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp.*paracasei* strain M3. International Journal of Food Microbiology, 87, 63–73(2003).
- BERESFORD, T., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, L. N.: Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11, 259–274(2001).
- BROADBENT, J. R., HOUCK, K., JOHNSON, M. E., OBERG, C. J.: Influence of adjunct use and cheese microenvironment non-starter lactic acid bacteria in reduced fat Cheddar-type cheese. Journal of Dairy Science, 86, 2773–2782(2003).
- DRAKE, M. A., BOYLDSTON, T. D., SPENCE, K. D., SWANSON, B. G.: Improvement of sensory quality of reduced fat Cheddar cheese by a *Lactobacillus* adjunct. Food Research International, 30 (1), 35–40(1997).
- EL SODA, M., MADKOR, S. A., TONG, P. S.: Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. Journal of Dairy Science, 83, 609–619(2000).
- EL SODA, M., MADKOR, S. A., TONG, P. S.: Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 1. Enzymatic activities and autolytic properties of freeze-shocked adjuncts in buffer system. Milchwissenschaft 54:85–89 (1999).
- FITZSIMONS, N. A., COGAN, T. M., CONDON, S., BERESFORD, T.: Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. Journal of Applied Microbiology, 90, 600–608(2001).
- GARDINER, G., STANTON, C., LYNCH, P. B., COLLINS, J. K., FITZGERALD, G., ROSS P. R.: Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. J.Dairy Sci.Vol 82, No7, 1379-1387(1999).
- HANNON, J. A., WILKINSON, M. G., DELAHUNTY, C. M., WALLAC, J. M., MORRISSEY, P. A., BERESFORD, T. P.: Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. Int. Dairy J. 13:313–323(2003).
- LYNCH, C. M., MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F., COGAN, T. M., DRINAN, F. B.: Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. Int. Dairy J. 6: 851–867(1996).

- MARTINEZ-CUESTA, M. C., KOK, J., HERRANZ, E., PELAREZ, C., REQUENA, T., BUIST, G.: Requirement of autolytic activity for bacteriocin induced lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3174–3179(2000).
- MARTINOVIC, A., RADULOVIC, Z., WIND, A., JANZEN, A., OBRADOVIC, D.: Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. *Acta Veterinaria*, Vol. 55, No. 4, 307-318(2005).
- OBRADOVIC, D., MAČEJ, O., NIKŠIĆ, M.: Koncentrovane kulture, značaj i primena.. *Prehrambena industrija-mleko i mlečni proizvodi*, vol.3(1-2), 6-11(1992).
- OBRADOVIC, D., ILIĆ, S.: Koncentrovane kulture u proizvodnji fermentisanih proizvoda, prednosti i primena. *Monografija Sirarstvo*, ed. P. Puđa, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 64-73(1996).
- OBRADOVIC, D.: Antimikrobnna aktivnost bakterija mlečne kiseline. Treći jugoslovenski simpozijum prehrambene tehnologije, zbornik radova, sveska 4, 40-44(1998).
- OBRADOVIC, D., RADIN, D., PUĐA, P., KARIĆ, A.: Primena probiotika u proizvodnji sireva-stanje i perspektive. *Prehrambena industrija*, Vol. 14, No. 1-2, p. 7-10(2003).
- OBRADOVIC, D., RADIN, D.: Mikroflora autohtonih belih sreva. *Monografija: Autohtoni beli srevi u salamuri*, Ur.: Dozet N., Maće O., Beograd-Zemun, 87-98(2006).
- OBRADOVIC, D., RISTIĆ, G., KARIĆ, A.: Industrijska primena probiotika. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi* 1-2, 4-8(2002).
- OBRADOVIC, D., RISTIĆ, G., KARIĆ, A.: Zdravstveni efekat mleka i fermentisanih mleka. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi* 1-2, 4-8(2005).
- PELAREZ, C., REQUENA, T.: Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15: 831–844(2005).
- RADULOVIC, Z., RADIN, D., OBRADOVIC, D.: Autohtona mikroflora sjeničkog sira. *Prehrambena Industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, Vol.17, 1-2, 48-51(2006).
- RYAN, M. P., ROSS, R. P., HILL, C.: Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lacticin 3147 producing and resistant cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2699–2704(2001).
- SALLAMI, L., KHEADR, E. E., FLISS, I., VUILLEMARD, J. C.: Impact of Autolytic, Proteolytic, and Nisin-Producing Adjunct Cultures on Biochemical and Textural Properties of Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* 87:1585-1594(2004).
- SOMERS, E. B., JOHNSON, M. E., WONG, A. C. L.: Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, 84: 1926–1936(2001).
- TUCOVIĆ, N., RADULOVIC, Z., KARIĆ, A., ČUK, M., IPAČ, N., OBRADOVIC, D.: Primena probiotika u proizvodnji edamskog sira. *Prehrambena industrija*, Vol. 15, No. 1-2, 12-15(2004).
- TWOMEY, D., ROSS, R. P., RYAN, M., MEANEY, B., HILL, C.: Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165–1(2002).
- WILLIAMS, A. G., WITHERS, S. E., BANKS, J. M.: Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 10: 17–23(2000).

## **POTENTIALS OF APPLICATION ADJUNCT CULTURES IN CHEESE PRODUCTION**

DRAGOJLO OBRADOVIĆ, DRAGOSLAVA RADIN, ZORICA RADULOVIĆ

### **Summary**

Attempts to select lactic acid bacteria for use as adjuncts have been made, with the purpose of both controlling off-flavours in cheese and enhancing the development of good cheese flavour. A promising application of bacteriocin-producing LAB is a control of adventitious spoilage microorganisms and their use as cell-lysis inducing agents to increase proteolysis and flavour formation in cheese. It is also proposed that cheese could be an effective vehicle for delivery of probiotics to the consumer.

**Key words:** adjunct culture, cheese ripening, autolysis, bacteriocin, probiotic