

ZORICA T. RADULOVIĆ  
DRAGOSLAVA D. RADIN  
DRAGOJLO B. OBRADOVIĆ

Poljoprivredni fakultet, Zemun

UDK 637.35:637.047:637.146.1

## AUTOHTONA MIKROFLORA SJENIČKOG SIRA

U radu su izdvojeni i identifikovani izolati bakterija mlečne kiseline i enterokoka iz sjeničkog sira, proizvedenog na tradicionalan način, bez dodavanja starter kulture. Iz 10 uzoraka sjeničkog sira izdvojeno je 53 termofilna, mezofilna i citrat+ izolata na odgovarajućim selektivnim podlogama (MRS agar, M17 agar, LDCagar i LDV agar). Postupkom bojenja po Gramu, mikroskopskim pregledom i katalaza testom je utvrđeno da svi izolati predstavljaju čiste kulture Gram-pozitivnih i katalaza-negativnih bakterija, pri čemu je utvrđeno da je 21 izolat štapičastog, a 35 okruglastog oblika. Radi razdvajanja enterokoka od laktokoka, za sve okruglaste forme je ispitana sposobnost rasta pri 6,5% NaCl, pH 9,6 i nakon termičkog tretmana na 60°C 20 minuta je utvrđeno da od 35 izolata okruglastog oblika, 7 izolata podnosi navedene uslove.

Determinacijom dobijenih izolata primenom API sistema i to za štapičaste oblike API CHL 50 testa, a za okruglaste oblike RAPID ID 32 Strep sistema, utvrđeno je da izolati pripadaju vrstama *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* boiv. *dicetylactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* sp. i *Enterococcus* sp. Ubedljivo najveću zastupljenost je imala okruglasta vrsta *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (35,85%), a od štapičastih, vrsta *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

Adresa autora:

Mr Zorica Radulović, Poljoprivredni fakultet,  
Nemanjina 6, Zemun tel: 011/ 2615-315 / lok 161  
zorica@agrifaculty.bg.ac.yu

(18,86%). Vrste roda *Enterococcus* sp. bile su zastupljene sa 13,20 %.

**Ključne reči:** sjenički sir • autohtona mikroflora • bakterije mlečne kiseline

### UVOD

Proizvodnja sireva na tradicionalan način zastupljena je svuda u svetu, pa i kod nas. Ovakva proizvodnja predstavlja obeležje određene oblasti i daje epitet „autohtoni“ za proizvodnju velikog broja različitih vrsta i tipova sireva. Ta različitost je posledica razvoja sirarske tehnologije, gde mnogobrojni načini koagulacije, obrade grušta, odvajanje surutke, uslovi zrenja i dr., povećavaju varijabilnost u proizvodnji sireva.

U našoj zemlji postoji nekoliko oblasti koje se karakterišu autohtonom proizvodnjom različitih vrsta sireva, ali najviše je zastupljena proizvodnja belih sireva u salamuri. Za ova sireve je karakteristično da ime dobijaju po oblasti u kojoj se proizvode, pa su samim tim podeljeni na: sjenički, zlatarski, krivovirski, svrljiški, homoljski i dr.

Sistematski prikaz i ocenu autohtonih mlečnih proizvoda dao je Zdanovski (1947). Ovaj autor i saradnici su u brojnim radovima (Zdanovski 1967; Zdanovski, Dozet, Stanišić 1972) izučavali tehnologije najvažnijih domaćih mlečnih proizvoda. Obimam pregled proizvodnje autohtonih mlečnih proizvoda na području nekadašnje SFRJ dat je u radovima Dozet, Stanišić, Bijeljac, Petrović(1985); Dozet (1991) i Dozet, Adžić, Stanišić, Živić (1996). I danas je autohtona proizvodnja mlečnih proizvoda veoma zanimljiva oblast za mnoge istraživače, sa tendencijom da se izvrši zaštita

geografskog porekla, što je u razvijenim zemljama već ustaljena praksa.

Autohtona proizvodnja se odlikuje preradom i portošnjom mleka, najvećim delom u samim domaćinstvima gde se zadržala skoro na istom nivou duži niz godina. Sirevi, proizvedeni na tradicionalan način, prave se od svežeg mleka bez dodavanja starter kultura, što znači da se proces proizvodnje i zrenja sira odvija pod uticajem samo prirodne autohtone mikroflora. Odsustvo bilo kakve kontrole, kako u pogledu higijene, tako i u pogledu tehnoloških parametara, pre svega temperature, pH vrednosti, vremena koagulacije, uslova zrenja i dr., uslovljavaju veliku varijabilnost krajnjeg proizvoda. Neustaljeni kvalitet proizvoda predstavlja ograničavajući faktor u njegovom plasmanu, koji se odvija ili u samom domaćinstvu ili na lokalnim pijacama. Primenom pasterizacije mleka, specifične starter kulture i kontrolisanim uslovima proizvodnje i zrenja, omogućila bi se proizvodnja sira prepoznatljivih karakteristika i konstantnog kvaliteta (Radulović, Miočinović, Radin, Puđa, Obradović 2005).

Cilj ovog rada je da ispita koja je to dominantna mikroflora koja usmerava proces fermentacije i zrenja sjeničkog sira. Ovakva identifikacija autohtone mikroflora bi dala doprinos u rešavanju problema starter kultura u procesu standardizacije proizvodnje ovog poznatog mlečnog proizvoda.

### MATERIJAL I METOD RADA

Za izolaciju je upotrebljeno 10 uzoraka sireva proizvedenih na tradicionalan način u domaćinstvima Sjeničko-pešter-ske visoravni. Svi uzorci sireva su imali prijatan ukus i miris, dobru konzistenciju

i aromu. Uzorci sireva od po 20 g su homogenizovani sa 180 ml 2% Na-citrata u Stomacher 400 lab blender aparatu (Seward, Engleska), a zatim je izvršena izolacija metodom razređenja zasejavanjem na selektivne podloge i inkubacijom na optimalnim temperaturama rasta.

Za ispitivanje prisustva termofilnih i mezofilnih *Lactobacillus* vrsta upotrebljen je MRS agar (Oxoid CM 361) i temperature inkubacije 43° i 37°C u anaerobnim uslovima u Gas-pak (BBL) sistemu u toku dva dana.

Prisustvo termofilnih i mezofilnih *Lactococcus* vrsta praćeno je na M 17 agaru (Oxoid CM 785) i temperaturama inkubacije 43° i 25°C u aerobnim uslovima u toku dva dana.

Citrat-pozitivne (Cit<sup>+</sup>) *Lactococcus* vrste su determinisane na LD agaru sa dodatkom Ca-citratne suspenzije, inkubacijom na 25°C u toku tri dana. Na ovoj podlozi Cit<sup>+</sup> vrste daju kolonije sa jasno prosvetljenom zonom.

*Leuconostoc* vrste su izdvajane na LD agaru sa dodatkom vankomicina i inkubacijom u aerobnim uslovima tokom tri dana na 25°C. Neposredno pre zasejavanja na 200 ml LD agara dodavano je po 2ml 2%-tnog rastvora vankomicin-hidroklorid monohidrata.

Sa svake selektivne podloge pikirano je maksimalno 20 kolonija, kako bi se smanjio rizik od izdvajanja istih sojeva, a potom je standardnom metodom iscrpljenja izvršeno trostruko prečišćavanje izolovanih bakterija do dobijanja čistih kultura.

Karakterizacija izolata je izvršena na osnovu nekih morfoloških, fizioloških i biohemijskih osobina. Bojenjem po Gramu i mikroskopskim pregledom je provereno da li su dobijeni izolati Gram-pozitivni i utvrđena je oblik bakterija, a takođe je proverena čistoća kultura.

Katalaza testom je ispitano prisustvo enzima katalaze, unošenjem male količine biomase ispitivanih bakterija u kap 30% rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Witthenbury, 1964.). Pojavom ili odsustvom sitnih mehurića u kapi vodonik-peroksida je determinisano da li ispitivana kultura poseduje enzim katalazu.

U cilju razdvajanja enterokoka od laktokoka, za sve okruglaste forme bakterija proverena je sposobnost rasta pri koncentraciji soli od 6,5%, pH vrednosti od 9,6 i termorezistentnost. Sposobnost rasta okruglastih bakterija u prisustvu 6,5% NaCl je ispitana zasejavanjem u odgovarajućim bujonima sa 6,5% NaCl. Inkubacija je izvršena na odgovarajućim optimalnim temperaturama u toku 48 sati. Za one izolate koji su pokazali porast pri 6,5% soli, ispitana je mogućnost rasta u bujonima čija je pH vrednost iznosila 9,6, inkubacijom pri optimalnim temperaturama. Za izolate koji su zadovoljili prethodna dva kriterijuma ispitana je sposobnost preživljavanja na 60°C u toku 20 minuta. Bujonske kulture ispitivanih bakterija su podvrgnute ovom režimu, a zatim su zasejane na odgovarajuće agare u Petri kutijama i inkubirane u optimalnim uslovima i odgovarajućem vremenu.

Dobijeni izolati su determinisani API sistemom i to štapičasti oblici na API CHL 50 testu (bio Merieux), a okruglasti oblici na RAPID ID 32 Strep sistemu (bio Merieux).

Svaki ispitivani izolat je zasejavan po predviđenom protokolu i to štapičasti oblici po površini MRS agara, a okruglasti po površini krvnog agara. Posle inkubacije na optimalnim temperaturama, izrasle kulture su se skupljale sa površine agarnih ploča i prenosile u po 10 ml odgovarajućih medijuma za laktobacile, odnosno za laktokoke, leukonostok i en-

terokoke, a zatim zasejavane u kupule API 50 CHL, odnosno Rapid ID 32 Strep stripova. Nakon inkubacije od 24 sata za laktobacile i 2 sata za laktokoke, enterokoke i leukonostok, izvršeno je očitavanje testova i identifikacija primenom programa API Lab plus softver.

## REZULTATI

Na sledećoj tabeli dat je prikaz broja okruglastih i štapičastih oblika bakterija, koji su izolovani na navedenim selektivnim podlogama pri optimalnim temperaturama inkubacije. Iz 10 uzoraka sjeničkog sira izdvojeno je ukupno 53 izolata.

Mikroskopskim pregledom i bojenjem po Gramu utvrđeno je da je izdvojen 21 izolat štapičastog oblika i 32 izolata okruglastog oblika. Svi su bili G-pozitivni i katalaza negativni. Evidentno je da je mikroflora okruglastih bakterija dominantna i da ona najvećim delom usmerava procese zrenja sjeničkog sira.

Pošto u mikroflori okruglastih bakterija, pored laktokoka, značajnu ulogu imaju i enterokoke, sve okruglaste forme su istestirane na sposobnost preživljavanja pri 6,5% NaCl, pH 6,9 i na temperaturnom režimu od 60°C u toku 20 minuta. Ova testiranja su izvedena u cilju odvajanje enterokoka koje podnose ove uslove. Utvrđeno je da od ukupno 32 izolata okruglastog oblika, 7 izolata podnosi navedene uslove rasta, što ukazuje na mogućnost da od ukupne mikroflore okruglastih bakterija, skoro 25% čine enterokoke.

Posle determinacije dobijenih izolata primenom API sistema, dobijeni su sledeći rezultati.

Istraživanjima je utvrđeno da se dominantna mikroflora bakterija mlečne kiseline autohtonog sjeničkog sira može

Tabela 1: REZULTATI IZOLACIJE BAKTERIJA NA SELEKTIVNIM PODLOGAMA  
Table 1: RESULTS OF BACTERIA ISOLATION ON SELECTIVE MEDIA

Uzorak Sample	MRS 43° C		MRS 37° C		M17 43° C	M17 25° C		LDC 25° C	LDV 25° C
	Koke cocci	Bacili bacilli	Koke cocci	Bacili bacilli	Koke cocci	Koke cocci	Bacili bacilli	Koke cocci	Koke cocci
71		1		1		1			
72	1			2		1		1	
73		1	2			1		1	
74		1	2	1					
75		1		1	1	2			1
76		1		2	1	2		1	
77	1			1	1		1	3	
78	1			2	2				
79				2	1	2			
80		1	1	1	1		1	1	
UKUPNO Total	3	6	5	13	7	9	2	7	1

Tabela 2: REZULTATI IDENTIFIKACIJE BAKTERIJA I NJIHOVA PROCENTUALNA ZASTUPLJENOST

Table 2: RESULTS OF BACTERIA IDENTIFICATION AND THEIR PERCENTAGE

Izolati / Isolates	Broj izolata / Number of isolates	(%)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	19	35,85
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>dicetylactis</i>	4	7,55
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	16,99
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	10	18,86
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	1,89
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	1,89
<i>Leuconostoc</i> sp.	2	3,77
<i>Enterococcus</i> sp.	7	13,20
Ukupno / Total	53	100

svrstati u šest identifikovanih vrsta, jedan rod *leuconostoka* i rod *enterokoka*.

Najveću zastupljenost ima vrsta *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (35,85%). Ovako visok broj prisutnih laktokoka ukazuje na njihovu vodeću ulogu u procesu zrenja sjeničkog sira (Radulović, Martinović, Radin, Obradović 2004). Kako je ova vrsta obavezna komponenta u starter kulturama za proizvodnju sireva u industrijski kontrolisanim uslovima, nije ni čudo što se javlja i kao nosilac proizvodnje sireva na tradicionalan način. S obzirom da je jedna od primarnih uloga bakterija mlečne kiseline u proizvodnji sireva da izvrši dobru acidifikaciju, poboljša sinerezis grušta i spreči rast nepoželjne mikroflore, vrsta *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se javlja kao faktor ključnog značaja. Sigurno da ova vrsta ima važnu ulogu i u proteolitičkim promenama tokom zrenja sira, s obzirom da se sojevi ove vrste mogu javiti kao izrazito jaki proteoliti. (Fox, Law, McSweeney, Wallace 1993; Radulović, Radin, Obradović, Barać, Martinović 2004). Naravno da u proteolitičkim promenama značajnu ulogu ima i vrsta *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* čija zastupljenost nije zanemarljiva i iznosi 18,86% (Hansen, Houlberg, Ardo 2001; Williams, Noble, Banks 2001). Visok udeo zastupljenosti ove vrste je evidentiran i u drugim vrstama autohtonih sireva, (Beresford, Pelaez, Jimeno, 1998; Pešić-Mikulec, Jovanović 2005.). S obzirom da se sojevi ove vrste odlikuju jakim proteolitičkim fermentnim sistemima, može se ostvariti ubrzano zrenje sireva, bez pojave gorčine (Beresford, Cogan, 1997; Beresford, Fitzsimons, Cogan 1999). Prisustvo vrste *Lactobacillus plantarum* od 16,90% svakako daje specifičnost kvalitetu proizvoda kao autohtona vrsta koja se javlja kao takva, ne samo u mlečnim proizvodima, već i u proizvodima biljnog porekla. Nosioci arome sireva *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* boiv. *dicetylactis* i *Leuconostoc* sp.

zastupljeni su ukupno sa 11,32%. Poznato je da broj *leuconostok* vrsta pada posle prvog meseca zrenja, tako da u sirevima veće zrelosti, njegova prisutnost je nikakva ili minimalna. Prisustvo heterofermentativnih vrsta *Lactobacillus curvatus* i *Lactobacillus brevis* veoma je nisko i iznosi ukupno 3,78%. Pojava ovih vrsta nije tipična za poslednje faze zrenja (Aran, 1998.; Mass, Gonzales Crespo 1992), ali su zato identifikovane kao nestarterska mikroflora u prethodnim fazama zrenja različitih sireva (Corroler, Mangin, Desmasures, Gueguen 1995.). Vrste iz roda *Enterococcus* su prisutne sa 13,20%, što se svakako odražava na procese zrenja i organoleptičke karakteristike sjeničkog sira.

Svaka od identifikovanih vrsta ima svoju ulogu i mesto tokom proizvodnje i zrenja sjeničkog sira, pri čemu su neke vrste značajne u prvim fazama, a neke u kasnijim fazama zrenja. Smenjivanjem dominantnosti pojedinih vrsta, kao i njihovim združenim delovanjem, ostvaruju se acido-efekti, proteolitičke i lipolitičke promene, produkcija komponenata arome tokom zrenja, što sveobuhvatno rezultira sirom specifičnog i prepoznatljivog kvaliteta.

## ZAKLJUČAK

Izolacijom na selektivne podloge iz deset uzoraka sjeničkog sira, izdvojeno je 53 izolata čistih kultura. Postupkom bojenja po Gramu i mikroskopskom pregledom je utvrđeno da su svi izolati Gram pozitivni i da je 21 izolat štapičastog oblika, a 32 izolata okruglastog oblika. Svi izolati su pokazali negativnu katalaza reakciju. Ispitivanjem sposobnosti rasta okruglastih bakterija pri pH vrednosti od 9,6, 6,5% NaCl i preživljavanje tretmana od 60° C u toku 20 minuta, izdvojeno je sedam izolata, koji podnose uslove rasta *enterokoka*.

Identifikacijom izdvojenih izolata primenom API CHL 50 I RAPID ID 32 Strep testa, utvrđeno je da dominantnu

mikrofloru čini vrsta *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (35,85%), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (18,86%), *Lactobacillus plantarum* (16,99%), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* boiv. *dicetylactis* (7,55%), *Leuconostoc* sp. (3,77%), *Lactobacillus curvatus* (1,89%), *Lactobacillus brevis* (1,89%) i *Enterococcus* sp. (13,20%).

## LITERATURA

- Aran, N.: A microbial study of Kashar Cheese. *Milchwissenschaft* 53(10), (1998) 565-567.
- Beresford, T., Cogan, T.M: Improving cheddar cheese flavour. 5 th cheese Symposium, Cork, Ireland, Ed: Cogan, T.M., Fox P.F. and Ross, R.P.(1997): 53-61.
- Beresford, T., Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M.: Acquired taste. *Dairy Industries International*, February, (1999)19-21.
- Beresford, T., Pelaez, C., Jimeno, J.: Nature and growth of non starter flora. COST Action 95: Improvement of the quality and microbiology of traditional and raw milk cheeses, November/ December, (1998) Dijon, France: 225-238.
- Corroler D., Mangin I., Desmasures N., Gueguen M.: An ecology study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environmental Microbiology* 64,(1998) 4729-4735.
- Dozet N., Stanišić M., Bijeljac S., Petrović M.: Ispitivanje tehnologije bijelog sira – tipa travničkog. *Mljekarstvo* 33(1985), str.5.
- Dozet N.: Komparativni pregled autohtonih mliječnih proizvoda brdsko-planinskog područja Jugoslavije. *Ekonomika poljoprivrede*, Vol.38, No6,7,8, (1991).
- Dozet N., Adžić N., Stanišić M., Živić N.: Autohtoni mliječni proizvodi. *Poljoprivredni institut Podgorica, Sirmir Beograd* (1996).
- Hansen, B.V., Houlberg U., Ardo Y.: Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal* 11.(2001): 225-233.
- Mass M., Gonzales Crespo J.: Lactic acid bacteria in Los Ibores cheeses: *Alimentaria* 92(1992): 41-43.
- Pešić-Mikulec, D., Jovanović L.: Microbiological study of fresh white cheese (A Serbian craft variety). *Appl. Ecology and Environmental Research* 4 (1) (2005) 129-134.
- Radulović Z., Radin D., Obradović D., Barać M., Martinović A.: Selekcija autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline roda *Lactococcus*. Simpozijum "Mleko i proizvodi od mleka stanje i perspektive", Zlatibor, 25-29 april, (2004), Zbornik radova 249-250.
- Radulović Z., Miočinović J., Radin D., Puđa P., Obradović D.: Primena autohtonih bakterija mlečne kiseline roda *Lactococcus* u proizvodnji belog sira u salamuri. Simpozijum "Mleko i proizvodi od mleka", Tara, 6-10 april (2005), Zbornik radova 75-77.
- Radulović Z., Martinović A., Radin D., Obradović D.: Bakterije mlečne kiseline izolovane iz sjeničkog sira. *Biotechnology in animal husbandry* 20 (3-4), (2004) 49-54.
- Zdanovski N., Dozet N., Stanišić M.: Izučavanje kvalitetnih vrijednosti autohtonih mliječnih proizvoda na području istočne Bosne. *Elaborat, Sarajevo*. (1972).

16. Zdanovski N.: Naši tvrdi ovčiji sirevi. Mljekarstvo, (1967) 19/9.
17. Zdanovski N. : Ovčije mljekarstvo. Zagreb, (1947).
18. Fox, P.F., Law, J., McSweeney P.L.H., Wallace, J: Biochemistry of cheeses ripening. In Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol I General aspects. Ed: Fox, P.F., Chapman & Hall, London. (1993).
19. Withenbury, R.: Hydrogen-peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol. 35(1964) 13-26.
20. Williams, A.G., Noble, J., Banks J., M.: Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. Int. Dairy Journal 11, (2001) 203-215.

### AUTOCHTHONOUS MICROFLORA OF SJENICA CHEESE

Zorica T., Radulović, Dragoslava D. Radin, Dragojlo B. Obradović  
Faculty of Agriculture, Zemun

#### Summary

Autochthonous isolates of lactic acid bacteria and enterococci, from Sjenica cheese had been isolated and identified. From 10 samples of Sjenica cheese that were traditionally produced without starter cultures, 53 thermophile, mesophile and citrate (+) isolates were isolated using selective media (MRS agar, M17 agar, LDCagar i LDV agar). According to Gram staining, cell morphology and catalase test, it was determined that all isolates were pure culture of G (+) and catalase (–) bacteria, 21 bacilli and 35 cocci. For the purpose of differentiation enterococci and lactococci, growth of all cocci bacteria was examined on 6,5% NaCl, pH 9,6 and heat treatment 60°C 20 min. Out of 35 cocci isolates, 7 isolates were able to grow at these conditions.

Identification by API CHL 50 test for lactobacilli and RAPID ID 32 Strep for cocci, showed that isolates were *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* boiv. *dicetylactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* sp. i *Enterococcus* sp. Dominant lactococci strain was *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (35,85%) and for lactobacilli *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (18,86%). Strains from genus *Enterococcus* sp. had the rate of 13,20%.

**Key words:** Sjenica cheese • autochthonous microflora • lactic acid bacteria