

KARAKTERISTIKE RASTA I AKTIVNOSTI LAKTOBACILA U UF MLEKU

Zorica T. Radulović, Dragojlo B. Obradović, Đorđe Fira

*Primena ultrafiltracije ima sve veći značaj u proizvodnji mlečnih proizvoda, u prvom redu mekih sireva, dok je u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva zastupljena u manjem obimu. S obzirom da se UF mleko karakteriše povećanim puferskim kapacitetom, bakterije mlečne kiseline koje bi se mogle koristiti kao starter kulture, moraju se odlikovati izraženom acidogenom sposobnošću. Takođe, praksa je pokazala da sirevi dobijeni iz UF mleka sporije sazrevaju, zbog čega je neophodno da starter kulture poseduju izražena i proteolitička svojstva. U radu je prikazan puferski kapacitet UF mleka različitog stepena koncentrovanja i to mlečnog ekvivalenta (CF=1) i retentata CF=3 i CF=4. Zatim je ispitivan uticaj UF mleka navedenih koncentracija na aktivnost i rast dva soja bakterija mlečne kiseline i to : **Lactobacillus helveticus HD-50** i **Lactobacillus acidophilus MC**. Rast i acidogena sposobnost ispitivanih sojeva je praćena tokom osam sati fermentacije u mlečnom ekvivalentu i retentatima. Proteolitička aktivnost ispitivanih sojeva je determinisana određivanjem tirozinske vrednosti i elektroforetskom detekcijom prt⁺ sojeva koji hidrolizuju β kazein. Ispitivanja su pokazala da soj **Lactobacillus helveticus HD-50** ima bolju acidogenu sposobnost, a soj **Lactobacillus acidophilus MC** je pokazao bolju proteolitičku aktivnost.*

KLJUČNE REČI: bakterije mlečne kiseline, UF mleko, acidogena sposobnost, proteolitička aktivnost

UVOD

Uvodjenjem ultrafiltracije mleka u mlekarsku industriju ostvaren je značajan napredak u proizvodnji mlečnih proizvoda, čime je postignuto bolje iskorišćenje mleka kao sirovine. Ovaj tehnološki postupak se primenjuje u proizvodnji mekih sireva, visokog sadržaja vlage i niže pH vrednosti, čije osobine ne zavise od proteolitičkih promena kazeina. Sa obzirom da ultrafiltracija nije značajno zastupljena u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva, istraživanja na ovom polju su veoma aktuelna (1,2).

Sirevi koji bi se dobili primenom ovog postupka bi imali specifičnu konzistenciju, strukturu, ukus i miris, što bi uslovlilo nastajanje novih tipova sireva. Ultrafiltrirano mleko se karakteriše

Mr Zorica T. Radulović, asistent, Dr Dragojlo Obradović, prof., Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Katedra za Tehnološku mikrobiologiju, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Jugoslavija. Dr Đorđe Fira, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, 11000 Beograd, Studentski Trg 16, Jugoslavija.

izmenjenim sastavom, što predstavlja jednu novu sredinu za rast bakterija mlečne kiseline. Ta specifičnost se ogleda pre svega u povećanom puferском kapacitetu UF mleka, koji nastaje usled povećanog sadržaja proteina i nerastvorljivih soli kalcijuma i fosfora. Ova pojava dovodi do usporenog opadanja pH vrednosti i predstavlja dodatni zahtev za kulturu u pogledu acidogene sposobnosti (3,4).

Bez obzira na prisustvo velikog broja aktivnih ćelija startera čiji broj nakon nekoliko časova inkubacije može da se poveća, opadanje pH vrednosti u UF mleku je usporeno (5,6). Puferска svojstva UF mleka omogućavaju da ćelije startera imaju produženu logaritamsku fazu rasta, odnosno njihova aktivnost je znatno produžena (7).

Pored povećanog puferского kapaciteta UF mleka, povećan je i sadržaj proteina surutke što predstavlja još jednu specifičnost ove mlečne sredine u odnosu na starter kulture. Takođe je značajna i smanjena koncentracija para-kapa-kazeina, koja nastaje kao posledica sporije aktivnosti himozina i bržeg stvaranja grušа (8). Poznato je da se osnovni protein surutke, β -laktoglobulin, slabo hidrolizuje enzimima prisutnim u siru, kako enzimima startera, tako i himozinom, plazminom i ostalim proteinazama prisutnim u siru (9,10). Ovako izmenjen proteinski sastav mleka prouzrokuje znatno sporije sazrevanje sireva dobijenih iz UF mleka. Ćelijama startera je dostupna manja količina rastvorljivih azotnih materija, što prouzrokuje usporeno odvijanje proteolitičkih promena tokom zrenja sira.

Dakle, kada se radi o selekciji starter kultura za proizvodnju sireva iz UF mleka, akcenat se stavlja u prvom redu na izraženu acidogenu sposobnost, a zatim i na njihovu proteolitičku aktivnost, što doprinosi pravilnoj fermentaciji svežeg sira i ubrzanju proteolitičkih procesa tokom zrenja sireva.

U tom smislu, cilj ovog rada je da pokaže kakve su karakteristike rasta i aktivnosti nekih laktobacila, koji bi se mogli primenjivati u proizvodnji pomenutih sireva.

EKSPERIMENTALNI DEO

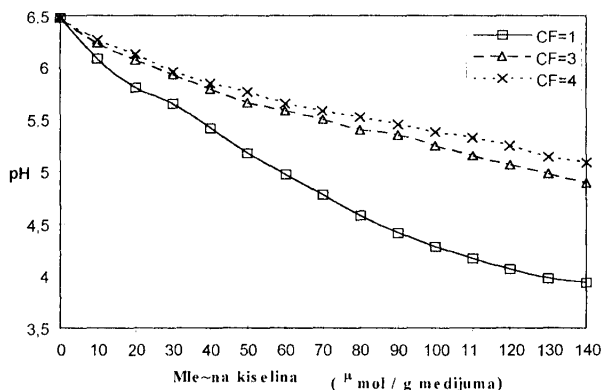
Za ispitivanje su korišćena dva soja laktobacila i to: *Lactobacillus helveticus HD-50* i *Lactobacillus acidophilus MC*. Ispitivani sojevi su održavani u 10% rekonstituisanom obranom lakmus mleku sa dodatkom CaCO_3 i pripadaju kolekciji čistih kultura Katedre za Tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

Ultrafiltrirano mleko koncentracije CF=5 je dobijeno na industrijskom postrojenju za ultrafiltraciju mlekare Džersi u Knjaževcu, a potom je standardizovano permeatom na stepene koncentrovanja CF=4, CF=3 i CF=1 (mlečni ekvivalent). Ove tri koncentracije UF mleka su korišćene za rast ispitivanih sojeva. Pre inokulacije u ispitivanim koncentracijama UF mleka (CF=4, CF=3 i CF=1) je odredjen puferски kapacitet modifikovanom metodom po Sutherland and Jameson-u (11). Nakon toga je izvedena repasterizacija mlečnog ekvivalenta i pomenutih retentata na 75°C u toku 10 minuta, a potom i inokulacija sa 1% kulture ispitivanih sojeva.

Rast ispitivanih sojeva je praćen inkubacijom uzoraka na 37°C u toku 8 časova. Za utrdjivanje promene broja ćelija primenjena je metoda razredjenja na MRS podlozi i to na svaka dva sata u toku osmočasovne fermentacije. Promene pH vrednosti u mlečnom ekvivalentu i retentatima su praćene na pH-metru "Iskra", takođe na svaka dva sata fermentacije. Proteolitička aktivnost ispitivanih sojeva je utrdjena spektrofotometrijski metodom po Juffs-u (12) i elektroforskom detekcijom prt^+ sojeva koji hidrolizuju β -kazein, metodom po Hill i Gasson-u (13). Ovo je modifikovana metoda za ekstracelularne proteinaze u kojoj je korišćena SDS poliakrilamidna gel-elektroforeza, a za standard je upotrebljen čist β -kazein.

REZULTATI I DISKUSIJA

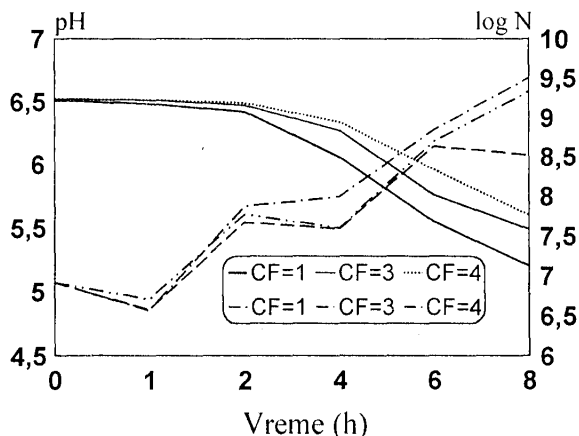
Na osnovu promene pH vrednosti u mlečnom ekvivalentu i retentatima prilikom dodavanja poznate količine mlečne kiseline, utvrđen je puferski kapacitet sva tri mlečna medijuma, što je prikazano na slici 1.



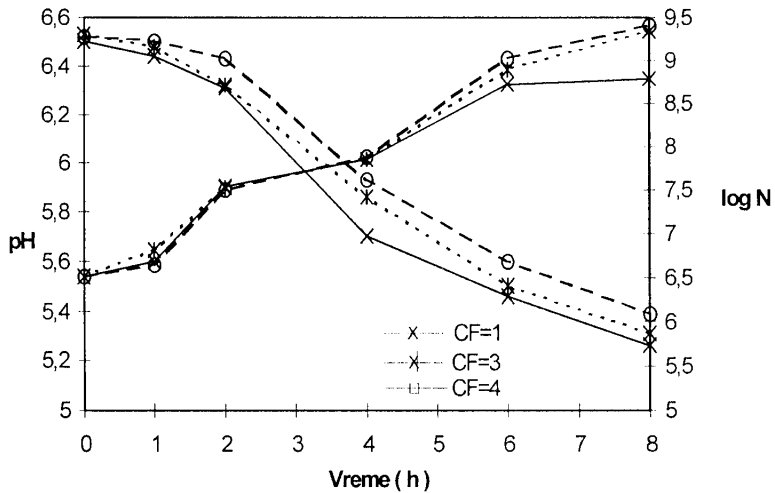
Slika 1. Puferski kapacitet retentata CF=4, CF=3 i mlečnog ekvivalenta

Sa grafikona se vidi da pri pH vrednosti 5,5 puferski kapacitet u retentatima CF=4 i CF=3 iznosi 88 i 74, a u mlečnom ekvivalentu 38 mmol mlečne kiseline /pH jedinici. Zapaža se da puferski kapacitet raste sa povećanjem stepena koncentrovanja retentata, pa je u retentatu CF=3 dva puta veći, a u CF=4 dva i po puta veći u odnosu na mlečni ekvivalent, pri pomenutoj pH vrednosti. Ova pojava omogućava ćelijama startera duže održavanje pH vrednosti između 5,5 i 6,0 u retentatima većeg stepena koncentrovanja, što je značajno za dužu aktivnost starter kultura.

Na slikama 2 i 3 su dati rezultati o promeni broja ćelija i pH vrednosti u retentatima i mlečnom ekvivalentu za ispitivane sojeve.



Slika 2. Promene pH vrednosti i ukupnog broja ćelija soja *Lactobacillus helveticus* HD-50 u UF mleku



Slika 3. Promene pH vrednosti i ukupnog broja ćelija soja *Lactobacillus acidophilus MC* u UF mleku

Evidentno je da je snižavanje pH vrednosti u mlečnom ekvivalentu najbrže, potom u retentatu CF=3, a najsporije u retentatu CF=4. Ova pojava je i očekivana, obzirom da sa porastom stepena koncentrovanja UF mleka, kulture pokazuju usporen porast aktivne kiselosti. Ova pojava je posledica povećanog puferskog kapaciteta u retentatima veće koncentracije, što znači da kultura mora ostvariti veću produkciju mlečne kiseline da bi savladala ponudjeni puferski kapacitet.

Naravno, da je za savladjivanje puferskog kapaciteta u mlečnom ekvivalentu potrebna manja količina mlečne kiseline, a srazmerno stepenu koncentrovanja UF mleka i neophodna količina mlečne kiseline se povećava (14, 15, 16).

Uoprednom analizom grafikona promene broja ćelija, zapaža se da je ukupan broj ćelija ispitivanih sojeva veći u retentatu CF=4, nego u retentatu CF=3, a ovaj opet veći nego u mlečnom ekvivalentu. S obzirom da je UF mleko veće koncentracije pogodnija i bogatije sredina za rast starter kultura, da je u ovoj sredini usporen porast aktivne kiselosti, ćelijama je omogućena bolja aktivnost i rast (17,18). Na kraju osmog sata fermentacije, soj *Lactobacillus helveticus HD-50* je postigao pH vrednost u mlečnom ekvivalentu 5,26, u retentatima CF=3 5,31 i u CF=4 5,39. Ispitivani soj *Lactobacillus acidophilus MC* je za isti vremenski period postigao u mlečnom ekvivalentu pH vrednost 5,25, a u retentatima CF=3 i CF=4 : 5,49, 5,60. Evidentno je da su oboja soja u mlečnom ekvivalentu postigla približne pH vrednosti, dok je u retentatima soj *Lactobacillus helveticus HD-50* postigao znatno niže pH vrednosti. Istovremenom analizom promene broja ćelija, utvrđuje se da su pomenute pH vrednosti ispitivani sojevi postigli sa prilično ujednačenim ukupnim brojem ćelija. Broj aktivnih ćelija oboja ispitivana soja u mlečnom ekvivalentu se kretao oko 10^8 , a u retentatima $10^9 - 10^{10}$ ć/ml. Takođe su oboja soja pokazala da se posle osam sati fermentacije njihova aktivnost u mlečnom ekvivalentu smanjuje i ćelije ulaze u stacionarnu fazu rasta, dok je u retentatima njihova aktivnost veoma izražena i ćelije se nalaze još uvek u ekspanzionalnoj fazi rasta, gde se i dalje može očekivati snižavanje pH vrednosti.

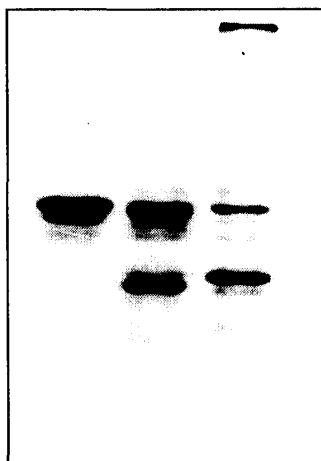
Da bi se stekla jasnija slika o aktivnosti i acidogenoj sposobnosti ispitivanih sojeva, utvrđeno je povećanje broja ćelija tokom fermentacije i prikazano kao odnos broja ćelija na početku i na kraju fermentacije, što je dato na tabeli 1.

Tabela 1. Odnos ukupnog broja ćelija na početku i na kraju fermentacije

SOJ	MLEČNI EKVIVAL.	RETENTAT CF=3	RETENTAT CF=4
<i>Lactobacillus helveticus HD-50</i>	$1,9 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$7,9 \times 10^2$
<i>Lactobacillus acidophilus MC</i>	$4,1 \times 10$	$2,6 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$

Jasno je da je soj *Lactobacillus helveticus HD-50* pokazao bolju aktivnost i veće uvećanje broja ćelija i to u sva tri mlečna medijuma, pa je razumljivo što su i pH vrednosti koje je postigao ovaj soj znatno niže.

U cilju utvrđivanja proteolitičke aktivnosti ispitivanih sojeva, uradjena je detekcija prt⁺ sojeva za ekstracelularne proteinaze. S obzirom da su ovo prvi enzimi koji započinju razgradnju proteina, kao kontrola je uzet čist β-kazein, kao najzastupljeniji protein mleka (19). Sposobnost ispitivanih sojeva da svojim ekstracelularnim proteinazama započinju hidrolizu β-kazeina je prikazana elektroforetski na slici 4.



Slika 4. Razgradnja β-kazeina pod uticajem ekstracelularnih proteinaza ispitivanih sojeva

Na gel je sa leve strane nanešen najpre čist β-kazein kao kontrola, a zatim sojevi *Lactobacillus helveticus HD-50* pa *Lactobacillus acidophilus MC*. Sa slike je evidentno da je soj *Lactobacillus acidophilus MC* jače hidrolizovao β-kazein u odnosu na soj *Lactobacillus helveticus HD-50*. Do sličnih rezultata se došlo i utvrđivanjem tirozinske vrednosti, što je dato u tabeli 2.

Tabela 2. Proteolitička aktivnost ispitivanih sojeva

SOJ	TIROZINSKA VREDNOST
<i>Lactobacillus helveticus HD-50</i>	123
<i>Lactobacillus acidophilus MC</i>	136

Soj *Lactobacillus acidophilus MC* je postigao veću tirozivsku vrednost. Naime, i elektroforetskom detekcijom prt⁺ sojeva i utvrđivanjem tirozinske vrednosti je utvrđeno da oba ispitivana soja pokazuju dobru proteolitičku aktivnost, ali je kod soja *Lactobacillus acidophilus MC* ona znatno izraženija.

ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih ispitivanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

Najniži pufeski kapacitet je utvrđen u mlečnom ekvivalentu, a sa povećanjem stepena koncentrovanja retentata i puferski kapacitet se povećava.

Shodno ovoj činjenici, snižavanje pH vrednosti u mlečnom ekvivalentu je brže u odnosu na retentate većih koncentracija, gde se sa povećanjem stepena koncentrovanja retentata snižavanje pH vrednosti usporava.

Tokom osmočasovne inkubacije, broj ćelija za oba ispitivana soja se povećavao sa povećanjem stepena koncentrovanja UF mleka, pa je ovaj broj najveći u retentatu CF=4, zatim u retentatu CF=3, a najmanji u mlečnom ekvivalentu.

Utvrđeno je da sa približno istim brojem ćelija na kraju osmog sata rasta, ispitivani sojevi postižu različite pH vrednosti, pri čemu je soj *Lactobacillus helveticus HD-50* pokazao jaču acidogenu sposobnost.

Određivanjem tirozinske vrednosti i elektroforetskom detekcijom prt⁺ sojeva koji hidrolizuju β-kazein, pokazala su slaganja u pogledu inteziteta proteolize za oba ispitivana soja. Nešto izraženiju proteolitičku aktivnost je pokazao soj *Lactobacillus acidophilus MC*.

LITERATURA

1. Milanović S. : Primena ultrafiltracije, genetski modifikovanog himozina i proteolitičkih enzima u tehnološkom procesu proizvodnje kačkavalja. Doktorska disertacija, (1993) Tehnološki fakultet, Novi Sad, 177.
2. Milanović S.: Nove mogućnosti u tehnologiji tvrdih sireva. Zbornik radova IV Međunarodnog Simpozijuma "Savremeni trendovi u proizvodnji mleka" 49-52 (1995), Kopaonik.
3. Covacevich, H. R., F. V. Kosikowski: Buffer, lactic fermentation and rennet coagulation properties of skim milk retentates produced by ultrafiltration. J. Dairy Sci. **62** (1979), 204-207.
4. Mistry, V. V., F. V. Kosikowski: Growth of lactic acid bacteria in highly concentrated ultrafiltered skim milk retentates. J. Dairy Sci. **68** (1985), 2536-2543.
5. Obradović, D., Kerečki, Z., Fira, Đ., Puđa, P., Banina, A., Lj.Topisirović: Metabolic activities of *Lactobacillus* strains in ultrafiltered milk. FEMS Microbiol. Rew. **87** (1990), 1-2, 72.
6. Hickey, M. W. Roginski, H., M. C. Broome: growth and acid production of group N streptococci in ultrafiltered milk. Aust. J. Dairy Technol. **38** (1983), 138.
7. Mistry, V.V., F.V. Kosikowski: Fermentation of ultrafiltered skim milk retentates with mesophilic lactic cheese starters. J. Dairy Sci. **68** (1985b), 1613-1617.
8. Dalgleish, D. G.: Effect of milk concentration on the nature of curd formed during renneting - a theoretical discussion. J. Dairy Res. **48** (1981), 65-69.

9. Furtado, M. M. J. A. Portridge: Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates. *J. Dairy Sci.* **71** (1988), 2877-2884.
10. Lawrence, R. C. and J. Gilles: Cheese composition and quality. *Proceed. of the XXII Internat. Dairy Congress*, 111-121. *Technol.* **38** (1987), 138.
11. Sutherland, B. J., G. W. Jameson: Composition of hard cheese manufactured by ultrafiltration. *Aust. J. Dairy Technol.* **36** (1981), 136.
12. Juffs, H. S.: Proteolyses detection in milk. *J. Dairy Res.* **42** (1975), 31.
13. Hill, H.A.S., J. M. Gosson: A qualitative screening procedure for detection of casein hydrolysis bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* **53** (1986), 625-629.
14. Obradović, D., Puda, P., Banina, A., Lj. Topisirović: Growth of lactic acid bacteria in ultrafiltered milk and the influence on feta cheese production. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 3 (1987), 82..
15. Obradović, D., Stefanović, R., Pudja, P., Miletić, M., Z. Kerečki: Rast i promena pH UF mleka pod uticajem streptokoka N. XXV Simpozijum za mlekarstvu industriju, (1987), Lovran.
16. Exterkate, F. A.: An industry study of proteolytic system of *Streptococcus cremoris* HP. *Neth. Milk Dairy J.* **29** (1975), 303.
17. Mistry, V. V., F. V. Kosikowski: A natural buffered bulk retentate starter from ultrafiltered milk. *J. Dairy Sci.*, **69** (1986), 1484-1490.
18. Guinee, T. P., Puda, P. D., Mulholland, E. O., W. J. Reville: Ultrafiltration in cheesemaking. 3rd Cheese Symposium, National Dairy Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, (1992), Ireland.
19. Exterkate, F. A.: On the possibility of accelerating the ripening of Gauda cheese; a comment. *Neth. Milk Dairy J.* **41** (1987), 189-194.

CHARACTERISTICS OF LACTOBACILLI GROWTH AND ACTIVITY IN UF MILK

Zorica T. Radulović, Dragojlo B. Obradović, Djordje Fira

The application of ultrafiltration has an increasing importance in the manufacture of dairy products, primarily of soft cheeses. However, in semi-hard and hard cheeses, manufacture ultrafiltration has not been applied at industrial level yet. Considering that UF milk is characterised by increased buffer capacity, lactic acid bacteria, that could be used as starter cultures, must have an expressed acidogenic ability.

Also, practice has shown that cheeses manufactured of UF milk ripen slowly, because it is necessary that starter cultures have an expressed and proteolytic activity. The buffer capacity of milk equivalent (CF=1) and retentates (CF=3 and CF=4) were studied. Furthermore, the influence of milk equivalent and these retentates on the growth and activity of two strains of lactic acid bacteria: *Lactobacillus helveticus* HD-50 and *Lactobacillus acidophilus* MC. The growth and production of lactic acid of the tested strains in UF milk were being observed during eight hours of fermentation.

Proteolytic activity of these strains was examined by determination of tyrosine value and electrophoretic detection prt⁺ strains which were capable to hydrolyse β casein. In strain *Lactobacillus helveticus HD-50* was detected better acidogenic ability, but in strain *Lactobacillus acidophilus MC* was detected better proteolytic activity.

Prispeo 31. januara 2000.
Prihvaćen 3. jula 2000.