

BAKTERIJE MLEČNE KISELINE IZOLOVANE IZ SJENIČKOG SIRA¹

Zorica Radulović, Aleksandra Martinović, Dragoslava Radin, D. Obradović²

Sadržaj: U radu su izolovani i karakterisani sojevi bakterija mlečne kiseline izdvojeni iz sjeničkog sira, proizvedenog autohtonom tehnologijom, bez dodavanja starter kultura.

Iz 5 uzoraka sjeničkog sira izvršena je izolacija 40 termofilnih, mezofilnih i citrat⁺ sojeva BMK na odgovarajućim selektivnim podlogama (MRS agar, LM17 agar i LDC agar). Ovi sojevi su dalje podvrgnuti ispitivanju na Gram reakciju i katalaza test, posle čega je izabrano 13 sojeva za dalja ispitivanja. Na osnovu načina fermentacije laktoze i acidogene sposobnosti praćene u 1% rekonstituisanom obranom mleku, selekcionisano je samo 6 sojeva. Determinacijom ovih sojeva pomoću API CHL 50 i Rapid ID 32 Strep testa, pokazalo se da 2 soja pripadaju vrsti *Lactococcus lactis ssp. lactis*, 2 soja *Lactococcus lactis ssp. cremoris* i 2 soja vrsti *Lactobacillus para.paracasei*.

Ključne reči: bakterije mlečne kiseline, acidogena sposobnost, sjenički sir.

Uvod

Pored razvijene industrijske proizvodnje, u našoj zemlji je još uvek značajno zastupljena autohtona proizvodnja sireva. Najveći deo brdsko-planinskog područja karakteriše se razvijenom stočarskom proizvodnjom na individualnim gazdinstvima. Pošto je u stočarskoj proizvodnji dominantan uzgoj goveda i ovaca, kao sirovina najviše se koriste kravlje i ovčije mleko.

Prerada i potrošnja mleka najvećim delom se odvija 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 proizvodnje najvažnijih domaćih mlečnih proizvoda.

¹ Izvorni naučni rad (Original scientific paper)

² mr Zorica Radulović, asistent-Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun; mr Aleksandra Martinović, Biotehnički institut, Podgorica; dr Dragoslava Radin, docent - Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun; dr Dragojlo Obradović, redovni profesor - Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.

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).

Proučavanjem tehnološkog postupka proizvodnje autohtonih proizvoda bavio se veći broj autora, a izučavanju mikrobiologije ovih proizvoda posvećeno je dosta pažnje u radovima *Vukašinovića i sar.* (1995) i *Dimitrijevića i sar.* (1998).

U ovom radu su istraživanja ograničena na Sjeničko-Peštersku visoravan, kao zelenu oazu specifičnih geografskih karakteristika, nadmorske visine, klimatskih i mikroklimatskih uslova. Specifičnost regiona, kao industrijski nerazvijene i nezagađene oblasti, mikroflora trave, mikroflora mleka, a kasnije i mikroflora sireva, utiču na kvalitet i specifičnost proizvoda. Pošto se sjenički sir odlikuje karakterističnom i prepoznatljivom punoćom, ukusom, mirisom, aromom, ovaj proizvod je tražen i cenjen i van regiona proizvodnje.

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 je upotrebljeno 5 uzoraka sjeničkog sira, koji su imali prijatan ukus i miris, dobru konzistenciju i aromu. Uzorci su homogenizovani u Stomacher 400 lab bleder aparatu (Seward, Engleska), a zatim je izvršena izolacija metodom razređenja zasejavanjem na selektivne podloge na određenim temperaturama. Iz svakog uzorka pikirano je maksimalno 20 kolonija, kako bi se smanjio rizik od izdvajanja istih sojeva. Potom je metodom iscrpljenja izvršeno trostruko prečišćavanje izolovanih sojeva. Tom prilikom ispitivalo se prisustvo termofilnih i mezofilnih štapićastih oblika BMK, pa je upotrebljen MRS agar i temperature inkubacije 43° i 37°C u anaerobnim uslovima u Gas-pak (BBL) sistemu u toku 3 dana. Prisustvo termofilnih i mezofilnih okruglastih oblika BMK je praćeno na LM 17 agaru i temperaturama inkubacije 43° i 25°C u aerobnim uslovima u toku 3 dana, a prisustvo citrat⁺ sojeva na LDC agaru na 25°C, u toku 3 dana inkubacije.

Izolovani sojevi kao čiste kulture su dalje 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.

Halotolerantnost izdvojenih sojeva je ispitana 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. Sojevi koji su ispunili zahteve prethodnih testova, su

selekcionisani i determinisani API sistemom i to štapićasti oblici na API CHL 50 testu (bio Merieux), a okruglasti oblici na RAPID ID 32 Strep sistemu (bio Merieux). Za očitavanje rezultata ovih testova korišćen je program API Lab plus softver.

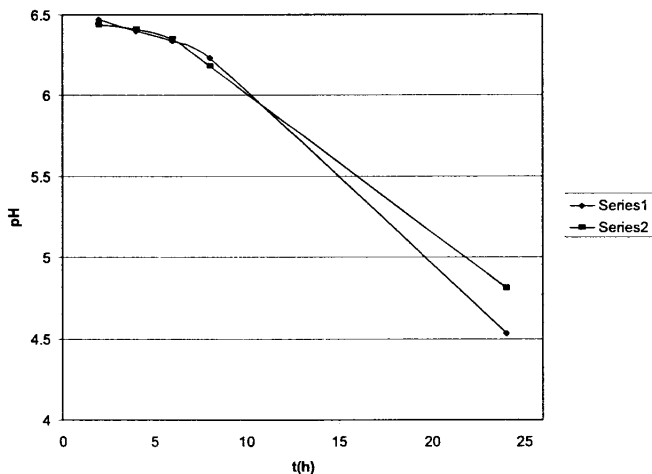
Rezultati i diskusija

Izolacija je izvršena iz pet uzoraka sjeničkog sira i korišćenjem pet kriterijuma, izdvojeno je 40 izolata. Posle sledećih koraka u determinaciji, a to su Gram reakcija, mikroskopski pregled i katalaza test, selekcionisano je 13 sojeva i to 5 okruglastih formi na LM 17 agaru, 5 štapićastih formi na MRS agaru i 3 okruglaste forme na LDC agaru. Od 5 okruglastih oblika, 4 su bili mezofilni sojevi i 1 termofilni soj, a od 5 štapićastih, 3 je pripadalo mezofilnim, a 2 termofilnim sojevima.

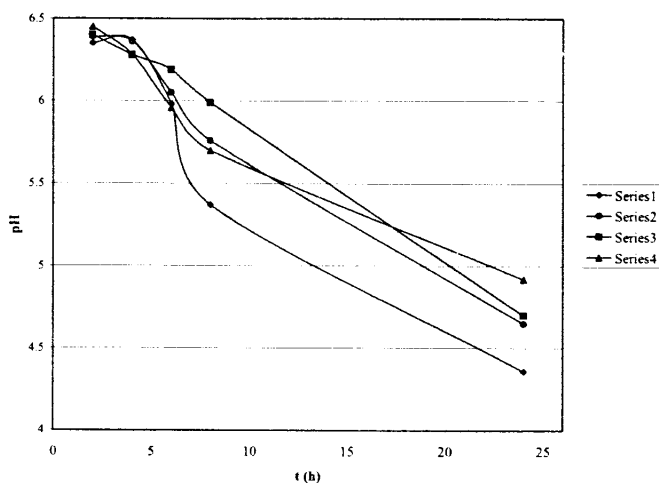
Rezultati su pokazali prilično ujednačen broj okruglastih i štapićastih oblika, pri čemu je mezofilna mikroflora znatno zastupljenija od termofilne, što je i razumljivo s obzirom da u tehnologiji proizvodnje sjeničkog sira nije zastupljena visoka temperatura dogrevanja sa jedne strane, a s druge, klima Sjeničko-Pešterske visoravni 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 sireva čine mezofilni sojevi laktobacila i laktokoka *Macedo i sar.*, (1995).

Posle testiranja da li sojevi pripadaju homo ili heterofermentativnim vrstama, utvrđeno je da jedan soj vrši fermentaciju šećera heterofermentativnim putem, 2 soja pokazuju vrlo malo prisustvo gasa, dok su ostali bili homofermentativni.

Ispitivanje acidogene sposobnosti je pokazalo različite rezultate. Pri tome su se izdvojila 2 soja okruglastog oblika, 2 soja štapićastog oblika i to obe forme mezofilne mikroflore, kao veoma aktivni u produkciji mlečne kiseline. Sličnu aktivnost su pokazala i 2 soja okruglastog oblika izdvojeni kao citrat+ sojevi. Navedenih 6 sojeva je nakon 24 sata inkubacije u 1% rekonstituisanom obranom mleku stvorilo gruš i pri tom postiglo pH vrednosti u rasponu 4,3 – 4,8.



Slika 1. Acidogena sposobnost ispitivanih laktobacila
Fig. 1. Acidogenic ability of examined lactobacilli



Slika 2. Acidogena sposobnost ispitivanih laktokoka
 Fig. 2. Acidogenic activity of examined lactococci

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 su sposobnost acidifikacije i brza produkcija mlečne kiseline poželjni parametri kod većine sojeva bakterija mlečne kiseline i mogu imati različitu namenu u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda, *Salminen S.*, (1998.), ova svojstva su uzeta 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 sjenički sir odlikuje prisustvom relativno velikog % soli, otpornost sojeva na veći % 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 bujanskoj kulturi 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 % soli njihova odlika, *Schillinger (1987.)*, ali je poznato, što je potvrđeno ovim ispitivanjima, da postoje sojevi koji nesmetano rastu i u prisustvu većeg % soli, *El-Gendy i sar.*, (1983).

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 ispitana 4 soja okruglastog oblika, a API 50 CHL testom 2 soja štapićastog oblika. Rezultati dobijeni Api Lab softverom su pokazali da izabrani sojevi pripadaju vrstama *Lactococcus lactis ssp. lactis* (2 soja), *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (2 soja), a od štapićastih oblika je utvrđeno da oba soja pripadaju vrsti *Lactobacillus para.paracasei*.

Zaključak

Izolacijom na selektivne podloge iz 5 uzoraka sjeničkog sira, izdvojeno je 40 izolata čistih kultura. Na osnovu bojenja po Gramu, mikroskopskog pregleda i katalaza testa, izabrano je 13 sojeva za dalju determinaciju.

Od tog broja 5 sojeva je bilo štapičastog oblika (1 termofilni i 4 mezofilna), 5 okruglastog oblika (2 termofilna i 3 mezofilna) i 3 soja koji su bili citrat pozitivni.

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

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

Determinacijom svih 6 sojeva primenom API CHL 50 i RAPID ID 32 Strep testa, utvrđeno je da 2 soja pripadaju vrsti *Lactococcus lactis ssp. lactis*, 2 soja *Lactococcus lactis ssp. cremoris* i 2 soja *Lactobacillus para.paracasei*.

Ovakva istraživanja pokazuju da među autohtonim sojevima BMK, izolovanim iz sjeničkog sira, postoje i oni koji bi mogli naći širu primenu u proizvodnji sireva.

LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM SJENICA CHEESE

Zorica Radulović, Aleksandra Martinović, Dragoslava Radin, D. Obradović

Summary

Lactic acid bacteria strains isolated from autochthonous cheeses of Sjenica were investigated. In those products, where starters were not added, fermentation occurred as a result of natural flora present in the surrounding environment.

Forty thermophilic, mesophilic and citrat+ LAB strains were isolated by selective mediums (MRS agar, LM17 agar and LDC agar) from 5 samples of Sjenica-cheeses. They were exposed to further analysis and identification. After examination by Gram test and catalase test, 13 strains of LAB, were selected for further analysis.

On the basis of lactose fermentation way and acid production in 1% reconstituted skimmed milk, 6 strains were selected. Determination of these strains by API 50 CHL and Rapid ID 32 Strep tests showed that 2 strains belonged to the *Lactococcus lactis ssp. lactis*, 2 strains to the *Lactococcus lactis ssp. cremoris* and 2 strains to the *Lactobacillus para.paracasei*.

Ključne reči: lactic acid bacteria, acidogenuos ability, Sjenica cheese.

Literatura

1. DOZET N., BAJČETIĆ B, STANIŠIĆ M.(1971): Tendencijes in production and manufacture of ewe's milk in Yugoslavia, IDF Seminar-Madrid.
2. DOZET N., STANIŠIĆ M., BIJELJAC S., PETROVIĆ M. (1985): Ispitivanje tehnologije bijelog sira – tipa travničkog. *Mljekarstvo* 33, str.5.
3. DOZET N.(1991): Komparativni pregled autohtonih mliječnih proizvoda brdsko-planinskog područja Jugoslavije. *Ekonomika poljoprivrede*, Vol.38, No6,7,8.
4. DOZET N., ADŽIĆ N., STANIŠIĆ M., ŽIVIĆ N. (1996): Autohtoni mliječni proizvodi. Poljoprivredni institut Podgorica, Sirmir Beograd.
5. 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.
6. DIMITRIJEVIĆ, S., BANINA A., ĆORIĆ M., VUKAŠINOVIĆ M., TOPISIROVIĆ LJ., FIRA DJ. (1998): Selekcija i karakterizacija prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline iz mladog sjeničkog sira. *Dani mikrobiologa Jugoslavije*, Zbornik radova i sažetaka, 297.
7. 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.
8. SALMINEN S.,VON WRIGHT A. (1998): Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc.
9. SCHILLINGER M., LUCKE, K.F.(1987): Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiol.* 4. str.199-208
10. VUKAŠINOVIĆ M., ĐORĐEVIĆ I., BRANKOVIĆ S., KURIJUŠIĆ I., TOPISIROVIĆ LJ., 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
11. ZDANOVSKI N.(1947): Ovčije mljekarstvo. Zagreb,1947.
12. ZDANOVSKI N., DOZET N., STANIŠIĆ M.(1972): Izučavanje kvalitetnih vrijednosti autohtonih mliječnih proizvoda na području istočne Bosne. *Elaborat*, Sarajevo.
13. ZDANOVSKI N. (1967): Naši tvrdi ovčji sirevi. *Mljekarstvo* 19/9.