

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Fakultet veterinarske medicine,
Beograd

UDK: 637.356.2: 637.047: 547.472.3

PRIRODNA MIKROFLORA TRADICIONALNIH SIREVA

Iako zaštita biodiverziteta živog sveta danas predstavlja temu od posebnog interesa, veoma malo pažnje se poklanja očuvanju mikroorganizama, pre svega bakterija mlečne kiseline poreklom iz zanatski proizvedenih fermentisanih proizvoda od mleka. Primena autohtonih kultura bakterija mlečne kiseline u proizvodnji tradicionalnih sireva sačuvaće biodiverzitet bakterijskih vrsta povezanih sa ovim specifičnim proizvodima. Sa ovog aspekta, raznolikost i značajni kapacitet sojeva nestarterskih bakterija mlečne kiseline u transformaciji supstrata kroz specifične metaboličke puteve naglašava značaj ovih sojeva zbog toga što predstavljaju značajne biološke i genetske izvore sa značajnim učešćem u razvoju jedinstvenih senzornih karakteristika autohtonih sireva.

Ključne reči: biodiverzitet • autohtoni sirevi • atipični sojevi bakterija mlečne kiseline

UVOD

Bakterije mlečne kiseline podrazumevaju heterogenu grupu nesporogenih Gram pozitivnih organizama sa osnovnom biološkom karakteristikom fermentisanja šećera i posledičnom produkcijom mlečne kiseline. Njihova acidogena sposobnost koja se ogleda u snižavanju pH vrednosti sistema vodi ka ostvarivanju poželjnih organoleptičkih svojstava, a usled generisanja nepovoljnih uslova sredine sprečava se rast patogena i time osigurava postojani kvalitet i bezbednost konačnog proizvoda. Stvaranje mlečne kiseline na osnovu metaboličke aktivno-

sti bakterija ujedno deluje i kao selektivni faktor čime se i ostvaruje dominacija istih mikroorganizama. Industrijska proizvodnja zahteva primenu definisanih starter kultura sa poželjnim tehnološkim karakteristikama. Mnogi od komercijalno primenljivih starter sojeva su homofermentativni i većinom se selekcionišu i razvijaju iz *Lactococcus* vrsta (Beresford i sar., 2001). Starteri započinju proces fermentacije gde kao rezultat stvaranja mlečne kiseline dolazi do formiranja gruš. Usled proteolitičke aktivnosti, produkcijom aromogenih komponenti, učestvuju i u procesu zrenja. Suprotno ovome, tradicionalni sistemi fermentacije se, u svojoj osnovi, oslanjaju na aktivnost indogene flore bakterija mlečne kiseline. Nestarterske bakterije mlečne kiseline jeste termin koji se koristi kako bi se opisala slučajno prisutna mikroflora sposobna za rast pod selektivnim uslovima (tipično 32–39% vode, 4–6% soli u vodenoj fazi, pH 4,9–5,3 i 5–13°C), ostvarenim tokom zrenja sira (Franklin i Sharpe, 1963). Veoma je dobro dokumentovana činjenica da se nestarterske bakterije mlečne kiseline u velikom broju utvrđuju pre svega u sirevima sa dužim periodom zrenja (Peterson i Marshall, 1990; Litopoulou-Tzanetaki i Tzanetakis, 1992; Tzanetakis i Litopoulou-Tzanetaki, 1992), a gde na osnovu biohemijske aktivnosti značajno učestvuju u razvijanju specifične arome i teksture (Vafopoulou-Mastrojiannaki i Litopoulou-Tzanetaki, 1996; Vafopoulou-Mastrojiannaki i sar., 1996). Napredovanjem procesa zrenja Cheddar sira, dolazi do autolize starter organizama, oslobađanja supstrata rasta i enzima i, posledično ovome, zapaža se povećanje populacije nestarterskih bakterija mlečne kiseline do nivoa 10⁷

CFU/g u periodu 6 do 8 sedmica nakon proizvodnje (Johns i Cole, 1959; Naylor i Sharpe, 1958). Zajednicom nestarterskih bakterija mlečne kiseline dominiraju mezofilni laktobacili, mada se mogu utvrditi i enterokoke, pedikokoke i mikrokoke (Bhowmilk i Marth, 1990; Dacre, 1990; Fryer i Sharpe, 1966). Rezultati studije populacije nestarterskih bakterija mlečne kiseline 8 sedmica starog irskog Cheddar sira ukazuju na sledeći sastav: 55% *Lactobacillus paracasei*, 28% *Lactobacillus plantarum* i 14% *Lactobacillus curvatus* (Jordan i Cogan, 1993). Iako se nestarterske bakterije mlečne kiseline mogu izolovati i iz sirovog mleka pripremljenog za proizvodnju sira, većina se inaktivira procesom pasterizacije. Njihovo prisustvo u siru se objašnjava delom kao posledica kontaminacije po sprovedenoj pasterizaciji, pri čemu kontaminacija vodi poreklo iz vazduha ili sa opreme i pribora upotrebljenih u proizvodnji sira (Reiter i Sharpe, 1971), ili se pak radi o termorezistentnim sojevima koji preživljavaju pasterizaciju (Martley i Crow, 1993). Uloga nestarterskih bakterija mlečne kiseline u procesu zrenja sireva još uvek nije u potpunosti razjašnjena, mada primena pomoćnih kultura pojedinih sojeva nestarterskih bakterija povećava nivo slobodnih aminokiselina, peptida i slobodnih masnih kiselina što za posledicu ima pojačanje intenziteta ukusa i ubrzanje procesa zrenja sireva (Corsetti i sar., 1998; Franklin i Sharpe, 1963; Lane i Fox, 1996; Lynch i sar., 1996). Poređenjem proteolitičkih i lipolitičkih enzima starter mikroorganizama i nestarterskih bakterija mlečne kiseline zapaža se bolja adaptacija na uslove ostvarene tokom zrenja sira enzimskog sistema nestarterskih bakterija, pre sve-

Adresa autora:
Dr Snežana Bulajić, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, snezab@vet.bg.ac.yu

ga mezofilnih laktobacila (Gobbetti i sar., 1999). Zajednica indogene mikroflora koja se selekcioniše iz autohtone mikroflora sirovog mleka u uslovima mikro-sredine, okruženja proizvodne sredine, mikroklimatskim faktorima i specifičnom tehnologijom, može se smatrati jednim od glavnih faktora u određivanju specifičnosti sira. Studije o diverzitetu nestarterskih bakterija mlečne kiseline mogu biti od pomoći u razlikovanju različitih vrsta sireva, u utvrđivanju efekta selekcionisanih tehnoloških faktora na specifične razlike u sastavu mikrobne zajednice sireva, u razvoju monitoring sistema za proučavanje dinamike mikroflora u fermentacijama uspostavljenim od strane mešanih populacija, u proceni stvarnog doprinosa vrsta i sojeva mikroorganizama tokom procesa zrenja sireva i, generalno, u dobijanju informacija o diverzitetu autohtone populacije nestarterskih bakterija tradicionalnih sireva. Sve ovo bi omogućilo selekciju sojeva primenljivih kao pomoćne kulture u proizvodnji sireva od pasterizovanog mleka kako bi se što približnije reprodukovala senzorne karakteristike sireva proizvedenih od sirovog mleka ili pak ubrzao proces zrenja (De Angelis i sar., 2001). Drugim rečima, saznanje o sastavu prirodne, autohtone mikroflora tradicionalnih sireva doprinelo bi definisanju startera čijom primenom bi se omogućila standardizacija kvaliteta i bezbednost proizvoda a bez menjanja osnovnih karakteristika proizvoda koji osiguravaju specifičnost (Ruiz-Barba i sar., 1994). Ovim se naglašava potreba utvrđivanja diverziteta nestarterskih bakterija mlečne kiseline na nivou sojeva i zato je neophodna primena brzih i pouzdanih metoda pogodnih za manipulisanje velikim brojem izolata (Fitzsimons i sar., 1999). Mada fenotipske metode pružaju dokaz o metaboličkoj sposobnosti sojeva, kao nedostaci fenotipizacije ističu se nereproducibilnost i nedostatak diskriminatorne moći time što nije moguće odrediti pripadnost pojedinih izolata vrsti ili rodu a na osnovu selekcije fenotipskih markera čija ekspresija nije stabilna pod određenim uslovima sredine i kultivisanja. S druge strane, prednost genotipizacije uključuje stabilnost genomske DNK, čiji je sastav nezavisan od uslova kultivisanja i metode pripreme, te podložnost genetskih metoda automatizaciji i statističkoj analizi podataka.

Sirevi sa geografskom oznakom porekla

Specifičnost sireva sa oznakom porekla ili geografskom oznakom pore-

kla ogleda se u tome što isti sirevi gube svoje specifične karakteristike ukoliko se proizvode na drugim područjima. Posebnost ovih sireva se definiše u odnosu na rasu i ishranu mlečnih goveda, što ujedno određuje fizička i hemijska svojstva sirovog mleka, ali i na osnovu prakse tradicionalne proizvodnje sireva. Mikrobiološki aspekt je takođe veoma značajan budući da se sirevi sa oznakom porekla oslanjaju na tradicionalnu tehnologiju proizvodnje pri čemu se koristi sirovo mleko koje sadrži slučajno prisutnu, autohtonu mikrofloru. Upravo ova populacija nestarterskih bakterija mlečne kiseline je odgovorna za diverzitet senzornog profila sireva sa oznakom porekla i time predstavlja predmet istraživanja mnogih autora (Fox i sar., 1996; Lynch i sar., 1997; Steele i Unlu, 1992).

Sirevi sa geografskom oznakom porekla se, s obzirom na regionalno poreklo i veoma različite tradicionalne tehnologije, u svrhu karakterizacije, mogu smatrati zasebnim ekološkim entitetom (Lopes i sar., 1999). Pored toga, mobilizacija genetskog materijala, usled transfera plazmida ili hromosomalnih gena među srodnim vrstama (Matic i sar., 1996) ili između filogenetski udaljenih grupa (Amabile-Cuevas i Chicurel, 1992) čini bazu za stvaranje novih rekombinanata koji preživljavaju i opstaju u zajednici ukoliko su uslovi sredine takvi da favorizuju njihovu selekciju. U specifičnom slučaju mikroorganizama koji predstavljaju populaciju tradicionalnih fermentisanih proizvoda, a koji su vezani za specifično geografsko područje, postoji i geografski efekat usled toga što različite genetske predispozicije sojeva uslovljava da samo pojedini sojevi kolonizuju dati supstrat. Ove različitosti se dalje povećavaju time što tradicionalnu tehnologiju prate različiti neletalni stresovi usled odabira posebnih supstrata (sirovo mleko specifično po svom fizičko-hemijskom sastavu) i/ili predstavljanja karakterističnih proizvodnih tehnologija. Na ovaj način članovi autohtone mikroflora tradicionalnih proizvoda bivaju izloženi lokalnoj genetskoj i fenotipskoj diferencijaciji, kreirajući time lokalno specifičnu mikrobnu zajednicu. Time metabolički profili izolata objedinjuju ne samo faktore sredine već i karakteristike genoma, a članovi takve lokalne zajednice imaju fenotipski profil karakterističan za geografsko područje sa koga su izolovani. Vredna zapažanja jeste i činjenica da su mikrobne zajednice povezane sa datim ekološkim entitetom (specifičnim tradicionalnim proizvodom) sposobne za ispoljavanje komplementarnih aktivnosti.

Time određena metabolička aktivnost može biti implementirana od strane različitih vrsta, što omogućava da profili metaboličkih aktivnosti članova mikrobne zajednice daju bolji opis ekosistema nego profil distribucije vrsta. Lachance i Starmer (1982) fiziološke karakteristike izolata ne primenjuju isključivo u cilju taksonomije. Naime, autori su utvrdili da su fiziološki profili zajednica kvasaca povezanih sa pojedinim drvećem značajni deskriptori tih ekosistema. Ellis i sar. (1995) su proučavali metaboličke profile mikrobni zajednica povezanih sa biljkama i to u svrhu procene promena u datim zajednicama u slučaju da genetski modifikovani mikroorganizmi budu uvedeni u sistem.

Postoje i studije o mikrobnoj tipizaciji tradicionalnih proizvoda sa različitim geografskim poreklom (Corroler i sar., 1998; Desmaures i sar., 1998). U radu Corroler i sar. (1998) sprovedena su ispitivanja u cilju utvrđivanja diverziteta sojeva laktokoka izolovanih iz mleka namenjenog za proizvodnju Camembert sira sa oznakom porekla, i to na osnovu fenotipskih i genotipskih kriterijuma, a sa namerom da se potvrdi potencijalna korelacija *Lactococcus* sojeva sa njihovim geografskim poreklom. Mada se genetski profili referentnih sojeva laktokoka razlikuju od profila onih sojeva laktokoka koji su izolovani iz sirovog mleka poreklom sa specifičnog geografskog područja, a specifičnost i stalno prisustvo tipičnih, tzv. "wild-type" laktokoka u istim uzorcima potvrđuje značaj primene oznake, odnosno geografske oznake porekla proizvoda, Corroler i sar. (1998) smatraju da je tipičnost sojeva laktokoka pre povezana sa farmom nego sa specifičnošću geografskog područja. Kao opšti zaključak isti autori ističu da su potrebna daljna ispitivanja kako bi se procenilo da li se takvi tipični sojevi laktokoka mogu izolovati i sa drugih područja, ili su pak specifični za dato geografsko područje, čime bi se i potvrdila hipoteza da što su sojevi više geografski specifični, to je više tipičan proizvod proizveden na određenom geografskom području uz primenu tradicionalne tehnologije.

ZAKLJUČAK

Metabolički fenotipi za grupu izolata, pored svrhe opisivanja porekla i tipa fermentisane namirnice, mogu pružiti i dodatnu mogućnost određivanja sastojaka sa organoleptičkom vrednošću, čime se potvrđuje i nutritivna vrednost takvih proizvoda. Isto tako, mikrobna tipizacija tradicionalnih proizvoda na osnovu

predstavljanja specifičnih metaboličkih profila populacije mikroorganizama tipične za dati proizvod, daje i mogućnost kontrole kako bi se uverili da karakteristike proizvoda nisu izgubljene uvođenjem novih tehnologija, odnosno da se verifikuje, a ujedno i pruži garancija da proizvod stvarno potiče sa određenog geografskog područja.

Praktična primena ove metodologije bi, uz primenu komercijalnih sistema identifikacije, omogućila primenu fenotipskih karakteristika u svrhu izdavanja certifikata proizvodima sa oznakom porekla, bez potrebe za sofisticiranom opremom i neophodnim treningom tehničkog osoblja. Analiza metaboličkih profila bi se, uz periodičnu ocenu od strane osoba obučeni za senzorno ocenjivanje, mogla koristiti i kao dokaz da se organoleptičke karakteristike, svojstvene za tradicionalni proizvod sa određenog područja, održavaju kroz vreme.

LITERATURA

- Amabile-Cuevas, C.F., and M. E. Chicurel, 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189–199
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brenan, N.L., and Cogan, T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: 259–274
- Bhowmik, T., and E.H. Marth. 1990. role of *Micrococcus* and *Pedococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* 73: 859–866
- Corroler, D., I. Mangin, N. Desmaures, and M. Gueguen, 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4729–4735
- Corsetti, A., M. Gobbetti, E. Smacchi, M. De Angelis, and J. Rossi. 1998. Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. *J. Dairy Res.* 65: 631–642
- Dacre, J.C. 1958. A note of pediococci in New Zealand Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 25: 414–417
- De Angelis, M., A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M.R. Corbo and M. Gobbetti. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2011–2020
- Desmaures, N., I. Mangin, D. Corroler, and M. Gueguen. 1998. Characterization of lactococci isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* 85: 999–1005
- Ellis, R.J., I.P. Thompson, and M.J. Bailey. 1995. Metabolic profiling as a means of characterising plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 9–18
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. and Beresford, T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3418–3426
- Fox, P.F., J.M. Wallace, S. Morgan, C.M. Lynch, E. J. Niland, and J. Tobin. 1996. Acceleration of cheese ripening. *Antonie Leeuwenhoek* 70: 271–297
- Franklin, J.G., and M.E. Sharpe. 1963. The incidence of bacteria in cheesemilk and Cheddar cheese and their association with flavour. *J. Dairy Res.* 30: 87–99
- Fryer, T.F., and M.E. Sharpe. 1966. Pediococci in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 33: 325–331
- Gobbetti, M., R. Lanciotti, M. De Angelis, M.R. Corbo, R. Massini, and P.F. Fox, 1999. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, a_w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 795–809
- Johns, C.K., and Cole, S.E. 1959. Lactobacilli in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 26: 157–161
- Jordan, K.N., and T.M. Cogan. 1993. Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 32: 47–55
- Lachance, M. A., and W. T. Starmer. 1982. Evolutionary significance of physiological relationships among yeast communities associated with trees. *Can. J. Bot.* 60: 285–293
- Lane, C.N., and P.F. Fox. 1996. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 6: 715–728
- Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 1992. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology* 10, 31–41
- Lopes, M.F.S., C. I. Pereira, F.M.S. Rodrigues, M.P. Martins, M.C. Mimoso, T.C. Barros, J.J. Figueiredo Marques, R.P. Tenreiro, J.S. Almeida and M.T. Barreto Crespo. 1999. Registered Designation of Origin Areas of Fermented Food Products Defined by Microbial Phenotypes and Artificial Neural Networks. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4484–4489
- Lynch, C. M., P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan, and F.B. Drinan. 1996. Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6: 851–867
- Lynch, C.M., P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, T. M. Cogan, and F. D. Drinan. 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77: 441–459
- Martley, F.G., and V.L. Crow. 1993. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3: 461–483
- Matic, I., F. Taddei, and M. Radman. 1996. Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol.* 4: 69–73
- Naylor, J., and M.E. Sharpe. 1958. Lactobacilli in Cheddar cheese. I. The use of selective media for isolation and of serological typing for identification. *J. Dairy Res.* 25: 92–103
- Peterson, S.D. and Marshall, R.T. 1990. Non-starter lactobacilli in Cheddar cheese. A review. *Journal of Dairy Science* 73, 1395–1410
- Reiter, B., and Sharpe, M.E. 1971. Relationship of the microflora to the flavour of Cheddar cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 63–80
- Ruiz-Barba, J.L., Catchcart, D.P., Warner, P.J. and Dimenez-Diaz, R. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Applied Environmental Microbiology* 60, 2059–2064
- Steele, J.L., and G. Unlu. 1992. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavour development. *Food Technol.*, 1992: 128–135
- Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 1992. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *Journal of Dairy Science* 75, 1389–1393
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 1996. Protease and peptidase activity from whole cells and crude cell-free extracts of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc paramesenteroides* isolates from cheese. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 14, 167–174
- Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 1996. Esterase activities of cell free extracts from wild strains of leuconostoc and heterofermentative lactobacilli isolated from traditional Greek cheese. *Letters in Applied Microbiology* 23, 367–370

SUMMARY**NATURAL MICROFLORA OF TRADITIONAL CHEESES**

Snežana B. Bulajić, Zora M. Mijačević
Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

Although protection of the world's biodiversity is currently a topic of particular concern, little attention has been given to the preservation of microorganisms, particularly lactic acid bacteria from artisanal and how this is related to the survival of traditional, autochthonous products. The use of autochthonous cultures of lactic acid bacteria in the elaboration of artisanal cheeses would preserve the biodiversity of bacterial genera and species associated with specific products. From this point of view, the great versatility and significant capacity of typical, wild strains of lactic acid bacteria to transform substrates through particular metabolic pathways emphasize the importance of these strains as they are important biological and genetic resources which had the great contribution in development of unique sensory characteristics of these products.

Key words: biodiversity • autochthonous cheeses • atypical strains of lactic acid bacteria