

ZORA M. MIJAČEVIĆ
SNEŽANA B. BULAJIĆ

Univerzitet u Beogradu, Fakultet
veterinarske medicine, Beograd

NAUČNI RAD

UDK: 637.354.62:547.472.3 (497.11)

NALAZ I AKTIVNOST BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U AUTOHTONOM SJENIČKOM SIRU

U radu je prikazana prevalenca bakterija mlečne kiseline tokom procesa proizvodnje i zrenja autohtonog sjeničkog sira. Aktivnost bakterija mlečne kiseline je procenjena na osnovu promene pH vrednosti i koeficijenta zrelosti tokom perioda zrenja od 90 dana.

Ključne reči: autohtoni sjenički sir • bakterije mlečne kiseline • pH i koeficijent zrelosti

UVOD

Jedan od najznačajnijih predstavnika autohtonih belih sireva u salamuri je sjenički sir koji se po tradicionalnoj tehnologiji proizvodi isključivo na planinskim visoravnima koji okružuju Sjenicu (Sjeničko-Pešterska visoravan), kao i na područjima opština Novi Pazar, Tutin i Prijepolje. Autohtono se proizvodi od sirovog ovčijeg mleka, a u tipu sjeničkog sira od mešanog (ovčijeg i kravljeg) i kravljeg mleka.

Sjenički sir ima dugogodišnju tradiciju. Po autohtonoj tehnologiji proizvodi se od ovčijeg mleka u katunima ili stanovima daleko od naseljenih područja za vreme ispaše ovaca, od sredine maja do kraja septembra. Mleko se posle muže cedi i podsirava. Podsiranje traje 2-3 časa, a potom se prebacuje u cedila i cedi bez opterećenja. Ceđenje traje 3-4 časa, sir se postavi na sirarsku dasku, opetereti drvenim krugom i ceđenje traje dodatna 3-4 časa. Sirna pogača (gruda) se reže u četvrtaste komade, soli i slaže u kace. Sir zri u slanoj surutki, a tokom zrenja je neophodno dopunjavanje kace 2-3 puta. Tokom zrenja sir se sleže i formira kompaktno testo u kome nema jasno odvojenih kriški. Zrenje sira je minimum 90 dana.

Kao i kod ostalih sireva proizvedenih od sirovog mleka, kvalitet i senzorni profil sjeničkog sira je prvenstveno uslovljen specifičnošću geografskog područja sa koga potiče, odnosno pedoklimatskim karakteristikama okruženja, ali i tradicionalnom tehnikom proizvodnje, koja isključuje primenu termičkog tretmana. Kako je supstrat isključivo sirovo mleko, to su proces fermentacije i zrenja kod sjeničkog sira uslovljeni isključivo dinamikom razvoja i aktivnošću autohtone populacije bakterija mlečne kiseline (BMK). Time se zajednica indogene mikroflo-

re BMK, koja se selekcioniše iz prirodne mikroflore sirovog mleka u datim uslovima mikrosredine, proizvodnog okruženja, i specifičnom tehnologijom, može smatrati jednim od glavnih faktora u određivanju autohtonog karaktera sjeničkog sira (Bulajić i Mijačević, 2007).

Sjenički autohtoni sir se, s obzirom na regionalno poreklo i specifičnost tradicionalne tehnologije može smatrati zasebnim ekološkim entitetom (Garabal, 2007) i veoma dinamičnim biohemijskim supstratom, koji tokom proizvodnje, a posebno perioda zrenja prolazi kroz značajne promene, pre svega kroz sukcesiju glavnih mikrobnih grupa bakterija mlečne kiseline, a na osnovu njihove metaboličke aktivnosti i evoluciju fizičko-hemijskih parametara kao što su pH, količina ukupnog azota i rastvorljivih azotnih materija, čiji odnos karakteriše obim proteolize.

Cilj ovog rada jeste da se ispita zastupljenost i dinamika razvoja autohtone populacije bakterija mlečne kiseline, a u odnosu na njihovu metaboličku aktivnost, kao rezultat interakcije supstrata, mikroklimatskih faktora, specifičnosti tehnologije izrade i fiziološkog potencijala prisutne populacije BMK i dinamika promene pH i koeficijenta zrelosti tokom perioda zrenja autohtonog sjeničkog sira. Preliminarna karakterizacija autohtonog sjeničkog sira u odnosu na navedene zadate parametre daje rezultate neophodne u sprovođenju standardizacije tehnološkog postupka u cilju dobijanja tradicionalnog proizvoda ujednačenog kvaliteta uz očuvanje biodiverziteta bakterijskih vrsta povezanih sa ovim specifičnim proizvodom.

Adresa autora:
Doc. Dr Snežana Bulajić, Fakultet veterinarske
medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd,
Tel: 011/2685-653,
e-mail: snezab@vet.bg.ac.rs

MATERIJAL I METODI

Materijal ispitivanja su predstavljali uzorci sirovog mleka i sjeničkog sira tokom procesa proizvodnje i perioda zrenja (7., 15., 30., 60. i 90.-ti dan zrenja).

Za mikrobiološka ispitivanja 20 ml (g) mleka, odnosno sira u različitim fazama proizvodnje i perioda zrenja homogenizovano je u 180 ml 2% rastvora Na-citrata primenom Stomahera (Bag Mixer, Interscience), a potom su pripremljena serijska decimalna razblaženja sa puferisanom peptonskom vodom. Odgovarajuće razblaženje je preneseno na specifične podloge za dokazivanje broja: termofilni laktobacili na MRS agar (Merck) pri 37°C tokom 48h inkubacije u anaerobnim uslovima; mezofilne laktoke na M17 Agar (Merck) pri 30°C tokom 48h i enterokoke na Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA agar) pri 37°C tokom 24h inkubacije.

Za praćenje promene azotnih materija tokom zrenja sira primenjene su sledeće metode:

- Ukupne azotne materije po metodi Kjeldahl-u pomoću Kjeltex sistema (IDF standard 20B:1993)
- Rastvorljive azotne materije metodom po van Slyke-u i Hart-u (Pejić i Đorđević, 1963).

Koeficijent zrelosti, kao pravi pokazatelj zrenja, odnosno stepena zrelosti sira i intenzifikacije proteolitičkih promena u matriksu sira, određen je računskim putem kao odnos rastvorljivog i ukupnog azota.

REZULTATI I DISKUSIJA

Distribucija identifikovanih bakterija mlečne kiseline tokom procesa proizvodnje autohtonog sjeničkog sira i perioda zrenja od 90 dana prikazana je u tabelama 1 i 2.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 1 laktokoke predstavljaju najzastupljeniju grupu bakterija mlečne kiseline, potom slede laktobacili i enterokoke. Povećanje njihova broja tokom procesa proizvodnje, pre svega u fazi formiranja grude nije neočekivano. Rezultat je prirodnog fenomena prisutnog kao posledica intenzifikacije njihova umnožavanja usled toga što temperatura podsiravanja pogoduje njihovom rastu, ali i kao rezultat fizičke retencije mikroorganizama u grudi prilikom odstranjivanja surutke. Sličnu prevalencu laktokoka laktoba-

Tabela 1. BROJ (LOG₁₀ CFU/ML/G) GLAVNIH MIKROBNIH GRUPA (*LACTOCOCCUS* SPP., *LACTOBACILLUS* SPP. I *ENTEROCOCCUS* SPP.) BAKTERIJA MLEČNE KISELINE TOKOM PROIZVODNJE AUTOHTONOG SJENIČKOG SIRA

Table 1. MICROBIAL SUCCESSION - CHANGES IN THE COUNTS (LOG CFU/ML/G) OF THE MAIN MICROBIAL GROUPS OF LAB DURING MANUFACTURING OF AUTOCHTHONOUS SJENICA CHEESE

Supstrat Substrate	Bakterije mlečne kiseline Lactic Acid Bacteria		
	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
Mleko Milk	7,54±1,16	4,93±0,47	3,65±0,77
Gruš Crude	6,83±0,91	4,93±0,76	3,79±1,10
Gruda	8,37±0,18	6,86±0,68	4,51±0,27

cila i enterokoka utvrđuju Mijačević i Bulajić (2008) prilikom mikrobiološke karakterizacije autohtonog Somborskog sira (tabela 2).

Tokom perioda zrenja laktokoke se u najvećem broju održavaju tokom prvih 7 dana, kada je u matriksu sira i najintenzivniji proces acidifikacije. Do kraja perioda zrenja laktokoke se održavaju u prilično visokom broju, mada je prisutan trend smanjenja njihova broja kao posledica permanentnog snižavanja pH vrednosti sira i primenjene procedure soljenja, što se negativno odražava na stopu rasta laktokoka. U prvih 30 dana zrenja, populacija laktobacila je prisutna u prilično konstantnom broju, a objašnjenje ovoga leži u činjenici da je ova grupa mikroorganizama, u odnosu na laktokoke, daleko otpornija na nepovoljne uslove sredine kao što su nizak pH, visoka koncentracija soli, anaerobni uslovi, i nedostatak hranjivih materija. Enterokoke svoj maksimum postižu 30.-og dana zrenja, a populacija se neznatno smanjuje do kraja perioda zrenja. Karakteristično za mnoge sire-

ve proizvedene od sirovog mleka jeste da su enterokoke u praktično konstantnom broju prisutne tokom celog perioda zrenja (Mas i sar., 2002; Bulajić, 2007; Litopoulou-Tzanetaki i Tzanetakis, 1992), što reflektuje njihovu rezistenciju na nepovoljne uslove (nizak pH, niska aw, visoka koncentracija soli) ostvarene napredovanjem procesa zrenja.

Aktivnost bakterija mlečne kiseline predstavljena je kroz promenu pH i koeficijenta zrelosti u matriksu sira tokom perioda zrenja od 90 dana. (tabela 3). U sjeničkom siru, kao predstavniku belih sireva u salamura koji po teksturi pripadaju mekim sirevima, odvijaju se intenzivni procesi fermentacije kao posledica metaboličke aktivnosti bakterija mlečne kiseline što dovodi do acidifikacije supstrata i promene pH vrednosti. Tokom zrenja proteini u siru se transformišu do produkata nižih molekularnih masa koje u velikoj meri definišu senzorni profil i reološke karakteristike sira, a proteoliza jeste jedan od najznačajnijih biohemijskih procesa u supstratu sira. Kao pokazaza-

Tabela 2. BROJ (LOG₁₀ CFU/G) GLAVNIH MIKROBNIH GRUPA (*LACTOCOCCUS* SPP., *LACTOBACILLUS* SPP. I *ENTEROCOCCUS* SPP.) BAKTERIJA MLEČNE KISELINE TOKOM PERIODA ZRENJA AUTOHTONOG SJENIČKOG SIRA

Table 2. MICROBIAL SUCCESSION - CHANGES IN THE COUNTS (LOG CFU/ML/G) OF THE MAIN MICROBIAL GROUPS OF LAB DURING RIPENING OF AUTOCHTHONOUS SJENICA CHEESE

Period zrenja Ripening period (in days)	Bakterije mlečne kiseline Lactic Acid Bacteria		
	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
7	8,76±0,66	7,86±0,68	5,15±0,63
15	7,91±0,39	7,86±0,75	4,64±0,65
30	7,47±0,80	7,53±0,28	5,47±0,36
60	7,96±0,33	6,02±0,57	4,55±0,54
90	7,21±0,03	6,30±0,30	4,93±0,48

telj stepena zrelosti, najčešće se koristi odnos sadržaja rastvorljivog azota i ukupnog azota, parametar poznat u literaturi kao koeficijent zrelosti.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 3. zapaža se intenzivna aktivnost bakterija mlečne kiseline u prvih 30 dana zrenja, što je praćeno značajnom promenom pH vrednosti u matriksu sira. Do kraja perioda zrenja, pH vrednost se ne menja značajno, dok se promene na proteinima intenziviraju, čime se udeo rastvorljivih proteina povećava i kao posledica toga imamo i povećanje koeficijenta zrelosti sira. Prema literaturnim podacima, grupa mekih sireva na kraju perioda zrenja pokazuje koeficijent zrelosti od 13 do 20 (Jovanović, 1994; Petrović, 1986; Maćej 1989; Mijačević i Bulajić, 2008), što je u dobroj korelaciji sa rezultatima prikazanim u radu.

ZAKLJUČAK

Tokom proizvodnje autohtonog sjeničkog sira zaključno sa formiranjem grude, utvrđeno je povećanje populacije laktobacila za $2 \log_{10}$, a laktokoka i enterokoka za $1 \log_{10}$.

Tokom perioda zrenja, laktokoke su najbrojnije u prvih 7 dana, populacija laktobacila se održava na visokom broju od $7 \log_{10}$ prvih 30, a potom njihov broj neznatno opada, dok su enterokoke, kao rezistentni mikroorganizmi u praktično konstantnom broju prisutne kroz čitav proces zrenja.

Aktivnost bakterija mlečne kiseline u odnosu na acidifikaciju supstrata najviše je izražena u prvih 30 dana zrenja, dok se proteolitičke promene

Tabela 3. POKAZATELJ AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KROZ KOEFICIJENT ZRELOSTI I PH TOKOM PERIODA ZRENJA AUTOHTONOG SJENIČKOG SIRA

Table 3. THE ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA REPRESENTED AS RIPENING COEFFICIENT AND PH VALUES DYNAMICS DURING RIPENING OF AUTOCHTHONOUS SJENICA CHEESE

Period zrenja Ripening period (in days)	Koeficijent zrelosti Ripening coefficient	pH pH value
7	11,05±0,01	5,55±0,09
15	13,10±0,13	5,38±0,03
30	14,20±0,38	4,71±0,08
60	16,20±0,63	4,56±0,06
90	17,68±0,08	4,54±0,03

intenziviraju posle 30.-og dana zrenja, što je iskazano kroz povećanje koeficijenta zrelosti.

ZAHVALNICA

Rad je deo istraživanja na projektu III 46009 finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Bulajić, S., Mijačević, Z. (2007). Prirodna mikroflora tradicionalnih sireva. *Prehrambena industrija* Vol. 18, 1-2 (2007)
- Garabal, J.I. (2007). Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, 10, 1-3
- International Dairy Federation (IDF): Milk, Determination of nitrogen content (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content. IDF Standard 20B (1993).
- Pejić, O., Đorđević, J. (1963). *Mlekarski praktikum*, Drugo, izmenjeno izdanje. Naučna knjiga, Beograd (1963).

- Mijačević, Z., Bulajić, S. (2008). Sensory evaluation and microbiological characterization of autochthonous sombor cheese. *Acta Veterinaria*, Vol. 58, No. 5-6, pp. 531-541
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzales, J., Rebollo, J.E., Caceres, P. (2002.) Ibores goats milk cheese: Microbiological and physicochemical changes through out ripening. *Lait*, Vol. 82, Issue 5, pp. 579-587
- Bulajić, S. (2007). Mogućnost primene enterokoka u proizvodnji sireva i njihov potencijal u prenošenju gena rezistencije na antibiotike. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (1992). Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology*, 9, pp. 13-19
- Jovanović, S. 1994. Uticaj pojedinih faktora i tehnoloških operacija u proizvodnji kiselinskih sireva. Magistarski rad, Univerzitet Banja Luka
- Maćej, O. 1989. Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi agregata belančevina mleka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu
- Petrović, D. 1986. Uticaj tehnološkog procesa proizvodnje na zrenje somborskog sira. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

SUMMARY

PREVALENCE AND ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA IN AUTOCHTHONOUS SJENICA CHEESE

Zora M. Mijačević, Snežana B. Bulajić

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine

In this article the prevalence of lactic acid bacteria through the production and ripening period of autochthonous Sjenica cheese was reviewed. The activity of main LAB group was evaluated by pH changes and evolution of ripening coefficient.

Key words: autochthonous Sjenica cheese • lactic acid bacteria • pH and ripening coefficient