

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Fakultet veterinarske medicine,
Beograd

UDK 637.352:637.047

KARAKTERISTIKE TRADICIONALNOG SOMBORSKOG SIRA – BAKTERIJE MLEČNE KISELINE

Somborski sir je meki sir koji se tradicionalno proizvodi iz ovčijeg mleka u severnom delu Srbije. Poznavanje diverziteta mikrobne populacije ovog tradicionalnog proizvoda jeste od posebnog značaja za održavanje jedinstvenih senzornih karakteristika sira. Ispitivana je autohtona mikroflora bakterija mlečne kiseline somborskog sira. Glavne grupe autohtone mikroflora bakterija mlečne kiseline (laktokoke, laktobacili, enterokoke) određene su primenom uobičajenih metoda mikrobiološke analize. Broj *Lactococcus spp.* u somborskom siru je 10^6 - 10^8 cfu/g, *Lactobacillus spp.* 10^4 - 10^7 cfu/g sira a *Enterococcus spp.* 10^3 - 10^7 cfu/g. Izolovani sojevi laktokoka, laktobacila i enterokoka su dalje okarakterisani u odnosu na tehnološke karakteristike kao što su acidifikacija, proteolitička aktivnost i sposobnost stvaranja diacetila a u cilju njihove moguće primene kao pomoćnih kultura u procesu proizvodnje sira.

Ključne reči: Somborski sir • tradicionalna proizvodnja • bakterije mlečne kiseline • tehnološka svojstva

UVOD

U tradicionalnoj proizvodnji sireva ne koriste se komercijalne starter kulture, već se proces zasniva na biohemijskoj aktivnosti autohtono prisutne mikroflora bakterija mlečne kiseline. Bakterije mlečne kiseline, pre svega laktokoke,

Leuconostoc spp., mezofilni laktobacili i enterokoke su u značajnom broju prisutne u mnogim tradicionalno proizvedenim sirevima južnog dela Evrope, kao što Manchego, Cabrales, Mahon i Majorero (Nunez i Martinez-Moreno, 1976; Nunez, 1978; Suarez i sar., 1983; Fontecha i sar., 1990). Autohtona mikroflora sireva predstavlja nasleđe koje se mora zaštititi i takvi sirevi predstavljaju izvor interesantnih sojeva bakterija mlečne kiseline koje, s obzirom na tehnološki potencijal, pre svega sposobnost acidifikacije, proteolitičku aktivnost i sposobnost produkcije aromatičnih komponenti, predstavljaju potencijalno primenjive starter kulture. Somborski sir se tradicionalno proizvodi iz ovčijeg mleka u severnom delu Srbije. Poznavanje diverziteta mikrobne populacije ovog tradicionalnog proizvoda jeste od posebnog značaja za održavanje jedinstvenih senzornih karakteristika sira.

Produkcija mlečne kiseline i proteolitička aktivnost predstavljaju značajne karakteristike starter bakterija koje se primenjuju u komercijalnom postupku proizvodnje sireva. Mleko kao medijum je siromašno u sadržaju mnogih aminokiselina potrebnih za rast starter bakterija. Posledično tome, bakterije mlečne kiseline moraju imati proteolitički sistem kako bi hidrolizovale proteine mleka na aminokiseline i peptide potrebne za rast. Proteoliza je značajna i sa aspekta razvoja specifičnog i jedinstvenog ukusa sireva. Sposobnost brzog proizvodnje kiseline verovatno jeste najvažnije svojstvo starter bakterija. Stvaranjem mlečne kiseline dolazi do snižavanja pH vrednosti i povećanja istiskivanja surutke iz grušta te redukcije sadržaja vode, a time i smanjenja mogućnosti mikrobnog kvara.

Cilj ovog rada jeste preliminarna karakterizacija izolata glavnih mikrobnih grupa bakterija mlečne kiseline prisutnih u tradicionalno proizvedenom somborskom siru, pre svega u odnosu na njihovu zastupljenost, brzinu kišeljavanja, proteolitičku aktivnost i sposobnost produkcije diacetila.

MATERIJAL I METODI

Sa pijace u Somboru je tokom proleća i leta od dva proizvođača koja tradicionalno proizvode sir uzorkovano 12 sireva. Glavne grupe autohtone mikroflora bakterija mlečne kiseline (laktokoke, laktobacili, enterokoke) izolovane su na M17 agaru, MRS agaru i kanamicin eskulin azid (KAA) agaru. Broj izraslih kolonija bakterija mlečne kiseline posle inkubacije na odgovarajućoj podlozi iskazan je kao log cfu/g. Za određivanje tehnoloških karakteristika izolata, pojedinačne kolonije sa različitim podloga su dvaput prečišćavane i potom je ispitana brzina kišeljavanja, proteolitička aktivnost i sposobnost stvaranja diacetila.

Brzina kišeljavanja je određivana merenjem pH posle 6h, 16h i 24h inkubacije ispitivanih sojeva u sterilisanom 10% rekonstituisanom obranom mleku u prahu. Proteolitička aktivnost je određena zasejavanjem ispitivanih sojeva na mlečni agar, a posle 24 h inkubacije na 30°C za laktokoke, odnosno 37°C za laktobacile i enterokoke, kod proteolitičnih sojeva zapaza se zona prosvetljenja. Sposobnost stvaranja diacetila kod ispitivanih sojeva određena je na osnovu kvalitativne metode gde se odmeri 1 ml 30% NaOH na 1 ml mleka, prethodno zgrušanog aktivnošću ispitivanog soja. Pojava crvenog prstena na površini sadržaja epruvete po dodavanju male količine kreatina, znak

Adresa autora:

Mr Snežana Bulajić, asistent, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar Oslobođenja 18, 11 000 Beograd, snezab@vet.bg.ac.yu

Rad je finansiran u okviru projekta
BTN – 351002B

je da ispitivani izolati obrazuju diacetil. U radu su ispitana 28 izolata *Lactococcus* spp., 8 izolata *Lactobacillus* spp. i 25 izolata *Enterococcus* spp.

REZULTATI I DISKUSIJA

Bakterije mlečne kiseline izolovane su iz somborskog sira u različitom broju, kako je prikazano u tabeli 1.

Kako se vidi iz tabele broj *Lactococcus* spp. kod 12 ispitivanih sireva u proseku je iznosio $7,99 \pm 0,62$ log cfu/g, a razlika između maksimalne i minimalne vrednosti je 2 log. Razlika u broju laktokoka u tradicionalnom somborskom siru rezultat je različite starosti sira koja se kretala od 5-15 dana. Poznato je da su procesi zrenja u somborskom siru najintenzivniji prvih 10 dana, a potom se aktivnost bakterija mlečne kiseline smanjuje, pa prema tome i njihov broj opada.

Broj *Lactobacillus* spp u somborskom siru je u proseku za dva logaritma niži od broja laktokoka. Zapaža se takođe i značajnije odstupanje broja laktobacila od srednje vrednosti, a razlika između minimalne i maksimalne vrednosti je 3,5 log.

U tradicionalnim sirevima enterokoke su zastupljene u značajnom broju (Jensen i sar., 1975; Suarez i sar., 1983; Fontecha i sar., 1990; Cogan i sar., 1997). Tradicionalna proizvodnja sireva je najčešće iz sirovog mleka, a enterokoke su mikroorganizmi koji se nalaze u ambijentu i tako dospevaju u mleko u kome se razmnožavaju i zahvaljujući svojoj biohemijskoj aktivnosti značajno utiču na ukus proizvoda. U ispitivanim uzorcima somborskog sira utvrđeno je da se log broja enterokoka kreće u proseku 5,37 sa odstupanjem od srednje vrednosti 1,73 log cfu/g. Iz raspona između maksimalne i minimalne vrednosti može se zaključiti da je broj enterokoka u somborskom siru veoma varijabilan, a uzrok tome jeste činjenica da svaki od sireva predstavlja jedinstveni ekosistem u odnosu na uslove proizvodnje.

Sojevi bakterija mlečne kiseline izolovanih iz somborskog sira ispitani su na sposobnost kišljenja mleka, proteolitičku aktivnost i sposobnost stvaranja diacetila. Kišljenje mleka je jedna od

Tabela 2. PROMENA pH MLEKA AKTIVNOŠĆU *Lactococcus* spp. U ZAVISNOSTI OD DUŽINE INKUBACIJE

Table 2. CHANGE OF pH IN MILK BY *Lactococcus* spp. ACTIVITY DURING INCUBATION

Statistički parametri	Dužina inkubacije u časovima		
	6	16	24
n	28	28	28
X±s	5,90±0,32	5,30±0,55	5,05±0,55
max	6,30	6,34	6,05
min	4,98	4,38	4,24

Tabela 3. PROMENA pH MLEKA AKTIVNOŠĆU *Lactobacillus* spp. U ZAVISNOSTI OD DUŽINE INKUBACIJE

Table 3. CHANGE OF pH IN MILK BY *Lactobacillus* spp. ACTIVITY DURING INCUBATION

Statistički parametri	Dužina inkubacije u časovima		
	6	16	24
n	8	8	8
X±s	6,18±0,14	5,70±0,46	5,68±0,35
max	6,28	6,21	6,02
min	5,91	4,98	5,07

Tabela 4. PROMENA pH MLEKA AKTIVNOŠĆU *Enterococcus* spp. U ZAVISNOSTI OD DUŽINE INKUBACIJE

Table 4. CHANGE OF pH IN MILK BY *Enterococcus* spp. ACTIVITY DURING INCUBATION

Statistički parametri	Dužina inkubacije u časovima		
	6	16	24
n	25	25	25
X±s	5,92±0,15	5,56±0,28	5,32±0,25
max	6,25	6,01	5,74
min	5,57	5,06	4,91

osnovnih karakteristika bakterija mlečne kiseline i u proceni njihove tehnološke podobnosti uvek se ispituje brzina kišljenja.

Brzina kišljenja je određivana merenjem pH posle 6h, 16h i 24h inkubacije ispitivanih sojeva u sterilisanom 10% rekonstituisanom obranom mleku u prahu, a rezultati dobijeni za izolate *Lactococcus* spp. prikazani su u tabeli 2.

Izolati bakterija mlečne kiseline koji pokazuju sposobnost brzog kišljenja mleka redukovati će pH vrednost sa početne vrednosti 6,6 na 5,3 u periodu inkubacije od 6 časova pri 30°C (mezofili), odnosno pri 42°C (termofili) (Morea i sar., 1999). Iz tabele se zapaža da određeni izolati laktokoka slabo kisele mleko u ispitivanom intervalu, dok pojedini izolati dobro kisele mleko već posle 6h

inkubacije na 30°C. Da bi se dobio uvid u sposobnost acidifikacije mleka pojedinačnih izolata laktokoka izolovanih iz somborskog sira, na grafikonu 1 je prikazana promena pH mleka aktivnošću pojedinačnih izolata u ispitivanom intervalu.

Iz grafikona se jasno zapaža da 7 izolata laktokoka posle 16 h inkubacije snižavaju pH mleka na vrednost $\leq 4,5$.

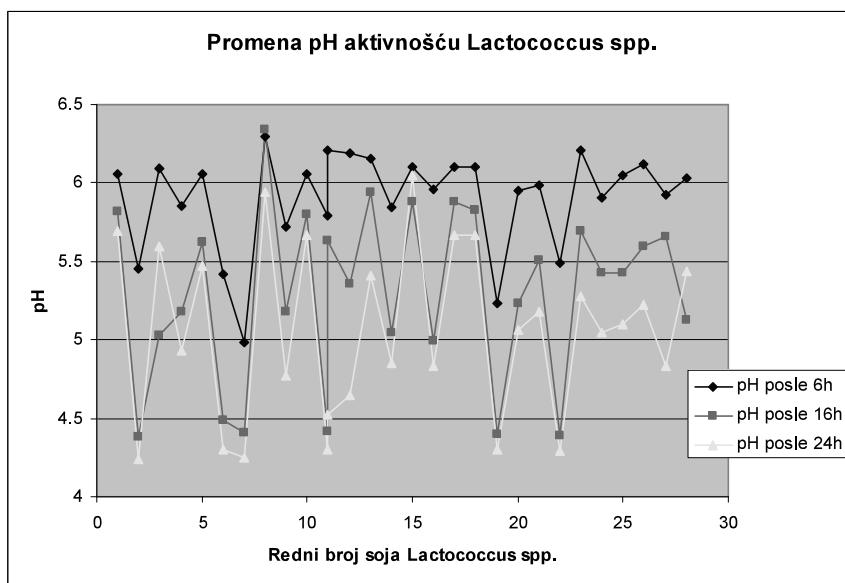
Sposobnost kišljenja mleka kod izolata *Lactobacillus* spp. izolovanih iz tradicionalnog somborskog sira prikazana je u tabeli 3.

Izolati laktobacila iz somborskog sira pokazuju manju sposobnost acidifikacije mleka od laktokoka; u proseku pH vrednost mleka opadne na $5,68 \pm 0,35$ tokom inkubacije od 24h.

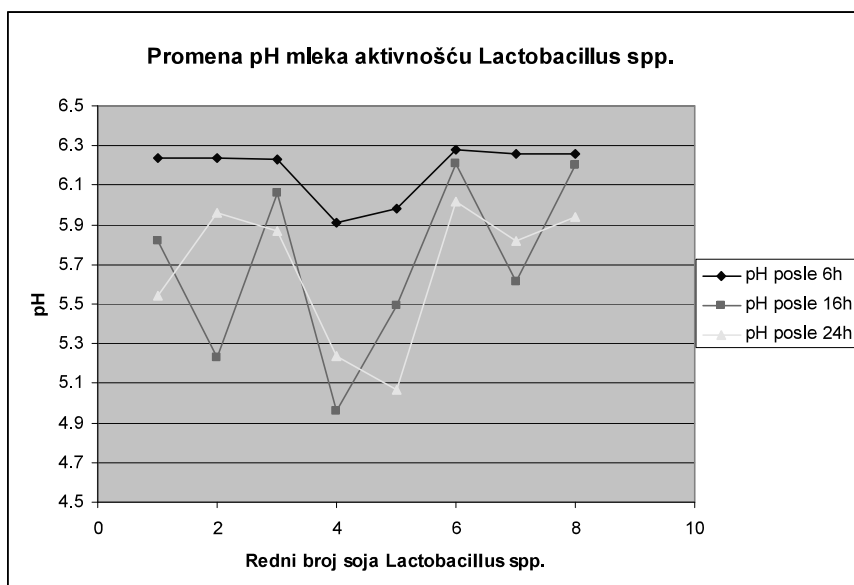
Tabela 1. LOGARITAM BROJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U TRADICIONALNOM SOMBORSKOM SIRU

Table 1. LOG OF LACTIC ACID BACTERIA NUMBER IN TRADITIONAL SOMBOR CHEESE

Bakterije mlečne kiseline	Bakterije mlečne kiseline u somborskom siru (log cfu/g)			
	n	X±s	max	min
<i>Lactococcus</i> spp.	12	7,99±0,62	8,40	6,18
<i>Lactobacillus</i> spp.	12	5,80±1,08	7,64	4,20
<i>Enterococcus</i> spp.	12	5,37±1,73	7,33	3,00



Grafikon 1. SPOSOBNOST ACIDIFIKACIJE MLEKA POJEDINAČNIH IZOLATA LAKTOKOKA IZOLOVANIH IZ SOMBORSKOG SIRA
Graph. 1. ACIDIFICATION ABILITY IN MILK BY LACTOCOCCI ISOLATED FROM SOMBOR CHEESE



Grafikon 2. SPOSOBNOST ACIDIFIKACIJE MLEKA POJEDINAČNIH IZOLATA LAKTOBACILA IZOLOVANIH IZ SOMBORSKOG SIRA
Graph. 2. ACIDIFICATION ABILITY IN MILK BY LACTOBACILLI ISOLATED FROM SOMBOR CHEESE

Sposobnost acidifikacije mleka pojedinih izolata laktobacila prikazana je u grafikonu 2.

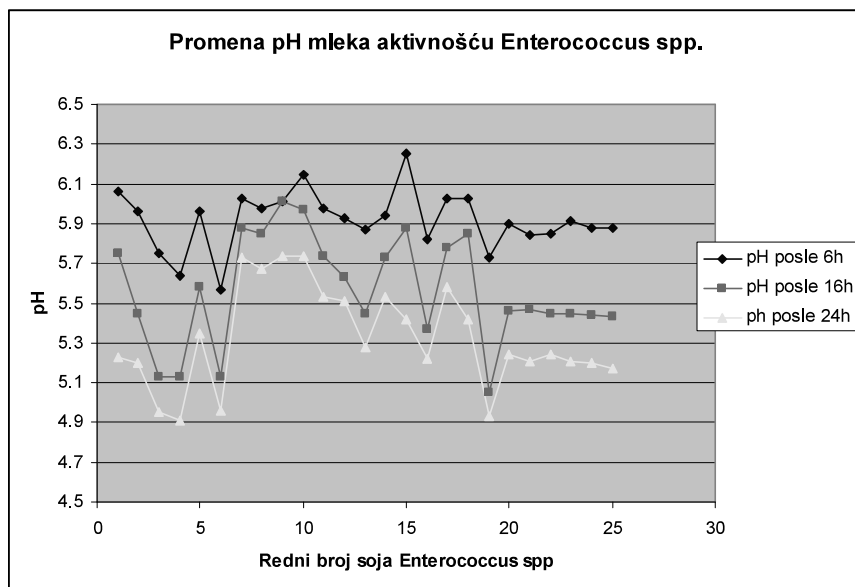
Sposobnost kišeljavanja izolata *Enterococcus* spp. izolovanih iz tradicionalnog somborskog sira prikazana je u tabeli 4.

Izolati enterokoka u periodu od 24 časa inkubacije snize pH mleka, u proseku, na $5,32 \pm 0,25$. Zapaža se takođe da pojedini izolati enterokoka u periodu od 24h inkubacije u mleku mogu da snize pH i do 4,91. Sposobnost acidifikacije 25 izolata enterokoka prikazana je i grafički na grafikonu 3.

Iz grafikona se jasno vidi da 14 od 25 izolata enterokoka iz somborskog sira snižavaju pH mleka tokom 24h inkubacije na vrednosti ispod 5,3.

Smatra se da bakterije mlečne kiseline imaju veoma ograničenu sposobnost sintetisanja aminokiselina iz anorganskih izvora azota, i time su zavisne od prethodno formiranih aminokiselina prisutnih u medijumu za rast. Činjenica jeste da je dobro razvijen proteolitički sistem bakterija mlečne kiseline neophodan za značajan i brzi rast bakterija mlečne kiseline u mleku (Salminen i sar., 2004). Izolati bakterija mlečne kiseline iz tradicionalnog somborskog sira nisu pokazivali proteolitičku sposobnost.

Metabolizam citrata kod bakterija mlečne kiseline odgovoran je za produkciju aromatičnih komponenti kao što su diacetil, acetoin, butandiol i acetaldehid (Hugenholtz, 1993), a prisustvo diacetila se očituje u razvijanju jedinstvenog, prepoznatljivog ukusa fermentisanog proizvoda od mleka. Stvaranje diacetila dokazano je kod 18 od 28 izolata laktokoka, kod svih ispitivanih laktobacila te kod 4 od 25 ispitivanih izolata enterokoka.



Grafikon 3. SPOSOBNOST ACIDIFIKACIJE MLEKA POJEDINAČNIH IZOLATA ENTEROKOKA IZOLOVANIH IZ SOMBORSKOG SIRA

Graph. 3. ACIDIFICATION ABILITY IN MILK BY LACTOBACILLI ISOLATED FROM SOMBOR CHEESE

ZAKLJUČAK

1. Iz tradicionalnog somborskog sira izolovane su mezofilne laktokoke, termofilni laktobacili i enterokoke u broju 10^3 - 10^9 cfu/g.
2. Ispitivani izolati laktokoka su pokazali sposobnost dobre acidifikacije, dok su laktobacili i enterokoke slabije kisellili mleko.
3. Nijedan od ispitivanih izolata bakterija mlečne kiseline iz tradicionalnog somborskog sira nije pokazao proteolizu na mlečnom agaru.

4. Stvaranje diacetila dokazano je kod 18 od 28 izolata laktokoka, kod svih ispitivanih laktobacila te kod 4 od 25 ispitivanih izolata enterokoka.

LITERATURA

1. Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuier, E et al.: Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421, 1997.
2. Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C., Ramos, M.: Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 1150-1157, 1990.

SUMMARY

CHARACTERISTICS OF TRADITIONAL SOMBORSKI CHEESE – LACTIC ACID BACTERIA

Snežana B. Bulajić, Zora M. Mijačević

Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

Sombor cheese is a soft cheese traditionally produced from raw sheep milk in the southern part of Serbia. The knowledge of the microbial diversity of this traditional product is in turn fundamental for the attainment of its unique sensory properties. A study of the resident microbial population of Somborcheese has been undertaken. The main groups of native lactic acid bacteria (lactococci, lactobacilli, enterococci) were determined following conventional microbiological procedures. The *Lactococcus* spp. reached level of 10^6 - 10^9 cfu/g, and the microbial counts for presumptive lactobacilli and enterococci attained 10^4 - 10^7 cfu/g and 10^3 - 10^7 cfu/g, respectively. Isolated strains of lactococci, lactobacilli and enterococci were further characterized regarding their technological properties such as acidification, proteolytic ability and production of diacetyl in order to evaluate their possible application as a co-culture in cheese-making practice.

3. Hugenholtz, J.: Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 165-178, 1993.
4. Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J., Vedamuthu, E.R.: Role of enterococci in Cheddar cheese: organoleptic considerations. *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 142-145, 1975.
5. Morea, M., Baruzzi, F. and P.S. Coconcelli.: Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* 87, 574-582, 1999.
6. Nunez, M. and Martinez-Moreno, J.L.: Microbial flora of Manchego.1. Behaviour of of the microbial flora in artisanal Manchego cheese. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie General* 4, 11-31, 1976.
7. Nunez, M.: Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *Journal of Dairy Research* 45, 501-508, 1978.
8. Salminen, S., Ouwehard, A. and von Wright A.: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspect.* Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 2004.
9. Suárez, J.A., Barneto, R., Iñigo, B.: Contribution to study of Mahón cheese. III. Lactic acid bacteria and enterococci. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*, 8,52-56,1983.

Key words: Sombor cheese • traditional cheese-making • lactic acid bacteria • technological properties