

UTJECAJ *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS* NA POVEĆANJE BIOLOŠKE VREDNOSTI SIREVA ZA BRZU POTROŠNJU

Dr Stojanka MITIĆ, Institut za mlekarstvo, Novi Beograd, Maja ĐORĐEVIĆ,
dipl. inž., PKB mlekara — Beograd

Sažetak

U cilju utvrđivanja i usporedbe biološke vrednosti mleka i sireva za brzu potrošnju praćena je promenu aminokiselinskog sustava proteinskog kompleksa u ovim uzorcima.

*Kvantitativni pokazatelji koncentracija aminokiselina u sirevima omogućili su konstataciju, da je pod utjecajem proteolitičke aktivnosti *Str. diacetilactis* povećana koncentracija slobodnih esencijalnih aminokiselina u poređenju sa sirevima bez kulture.*

Uvod

Izvestan broj autora ukazuje da bakterije mlečne kiseline u zavisnosti od vrste, odnosno soja, imaju proteolitičko dejstvo, razgrađujući mlečne belančevine do nisko-molekularnih peptida i aminokiselina. Streptokoke grupe N, gde spada i *Str. diacetilactis*, poseduju ekstracelularne proteinaze, vezane za zidove ćelija, koje degradiraju kazeine do peptida (Thomas, et al. 1974). Peptidi se hidrolizuju u aminokiseline različitim aminopeptidazama, dipeptidazama i tripeptidazama kod *Str. diacetilactis* (Desmazead, et al. 1979). Do povećanja izvesnih aminokiselina dolazi i razvojem proteinskog kompleksa ćelija *Str. diacetilactis*.

Na osnovu ovih saznanja bilo je od interesa da se proveri proteolitička aktivnost *Str. diacetilactis* u proizvodnji sira za brzu potrošnju. Radi toga, istraživanja su tako metodološki postavljena da daju odgovor o tehnološkoj vrednosti kulture *Str. diacetilactis* i kvalitetu gotovog proizvoda obzirom na sastav slobodnih esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina.

Materijal i metode rada

Ogledi proizvodnje sira za brzu potrošnju izvođeni su u mlekari PKB-a. Za fermentaciju mleka korišćen je soj *Str. diacetilactis*, koji je potjecao iz autohtone kolekcije mikrobiološke laboratorije Instituta, čija je identifikacija sprovedena savremenim API sistemom (50 biohemijskih testova).

U prethodnim istraživanjima dokazana je njegova biohemijska aktivnost u stvaranju aciditeta, diacetila i acetilmetilkarbinola te antimikrobnog dejstva prema enteropatogenim sojevima *Esch. coli* serotipiziranim 055 k59, 026 k60, 086 k61, 0111 k58, 0125 k70 i 027 k63, *Salmonella spec.*, *Proteus spec.*, *Klebsiella spec.* i *Shigella spec.* (Mitić, et al. 1981).

U proizvodnim uslovima ogledi su izvođeni sa po 200 lit. mleka tipiziranog na 2,8% masti i 8,6% suve materije bez masti, uz kiselinški stepen 6,8 °SH.

Pasterizacija mleka je izvođena na 63 °C u vremenu od 30 minuta. Inokulisanje temperiranog mleka je vršeno na oko 30 °C sa *Str. diacetilactis* u koncentraciji od 2%, što je zadovoljavalo dalje tehnološke operacije izrade sira.

Za istraživanje slobodnih aminokiselina u mleku i u sirevima korišćen je Beckmanov automatski aminokiselinski analizator. Kompletne automat-ske analize uzoraka iz hidrolizata proteina vršene su po metodi Moorea i Steina (1958).

Amiokiselinski sastav je utvrđivan kod mleka pre zasejavanja, kod gotovih sireva s kulturom *Str. diacetilactis* i bez kultura. U cilju praćenja promena aminokiselinskog sastava analiziran je kvalitativni i kvantitativni sastav aminokiselina u ukupnom proteinu ćelija *Str. diacetilactis*. Oglledi su bili tako metodološki postavljeni da daju ođgovor o utjecaju dejstva kulture *Str. diacetilactis* na stvaranje slobodnih aminokiselina kako esencijalnih tako i neesencijalnih.

U cilju utvrđivanja trajnosti sireva zasejavanje je vršeno na raznim selektivnim podlogama radi detekcije bakterija sledećih rodova: *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Sacharomyces*, koliformnih bakterija i sulfitoredukujućih klostridija.

Rezultati i diskusija

Biološke vrednosti mleka i sireva za brzu potrošnju praćene su po promenama aminokiselinskog sastava proteinskog kompleksa u ovim uzorcima. Opisanom metodom utvrđen je kvalitativni sastav aminokiselina u ukupnom proteinu ćelija *Str. diacetilactis*. Prosečne vrednosti sadržaja slobodnih aminokiselina iz ponovljenih oglleda prikazane su u tablici 1. Ako bi pokušali da uporedimo kvalitativni i kvantitativni aminokiselinski sastav proteinskog kompleksa u ispitivanim uzorcima mogli bi da konstatujemo:

Kvalitativna identifikacija pokazala je prisustvo istih baznih, neutralnih i kiselih aminokiselina, izuzev cistein, koji je dokazan samo u uzorcima mleka.

Kvantitativni pokazatelji razlićitih koncentracija aminokiselina omogućili su konstataciju da je bio povećan sadržaj 14 slobodnih aminokiselina kod sireva dohijenih s kulturom *Str. diacetilactis* u odnosu na sireve bez kultura. Povećane koncentracije su bile izražene i kod esencijalnih aminokiselina: lizina, histidina, treonina, valina, izoleucina, metionina i fenilalanina, što mladim sirevima daje izrazitu biološku vrednost.

Ako se posmatra ukupni aminokiselinski sastav kod svih ispitivanih uzoraka, možemo da izdvojimo pojedine aminokiseline u posebne grupe. U grupu najzastupljenijih aminokiselina ubrajaju se: glutaminska i asparaginska kiselina, alanin i glicin u uzorcima mleka i *Str. diacetilactis*, među kojima glutaminska kiselina predstavlja dominantnu aminokiselinu. Najzastupljenije aminokiseline kod sireva sa kulturom bili su lizin, glutaminska kiselina i leucin, čije su se koncentracije kretale od 2,48 do 5,36 mg. dok su se njihove koncentracije u sirevima bez kulture kretale od 0,69 do 4,72. Iz ovih podataka jasno se uočavaju smanjene vrednosti u koncentracijama kod oglleda III. Kvantitativan nalaz serina, histidina, prolina, tirozina i fenilalanina pokazao je da pripadaju grupi srednje zastupljenih aminokiselina, čije su se vrednosti koncentracije kretale od 1,08 do 1,88 u ogledima sireva sa kulturom, a od 0,24 do 1,20

Tablica 1. Slobodne aminokiseline u proteinskom kompleksu mleka, sireva i ćelija *Str. diacetilactis* (u miligramima u 100 grama uzoraka)

Tableau 1. Acides aminés libres du lait, des fromages, et des cellules *Str. diacetilactis* (mg/100 g)

Aminokiseline Acides aminés	Mleko Lait	<i>Str.</i> <i>diacetilactis</i>	Sir sa kulturom Fromage avec. <i>Str.</i> <i>diacet.</i>	Sir bez kulture Fromage sans <i>Str.</i> <i>diacet.</i>
	I		II	III
Lizin — Lysine	0,33	0,63	5,36	0,69
Histidin -- Histidine	0,28	0,14	1,73	0,66
Arginin — Arginine	0,24	0,26	0,22	0,15
Asparag. kiselina — Ac. aspartique	0,40	0,79	0,81	0,26
Treonin — Thréonine	0,23	0,36	0,80	0,18
Serin -- Sérine	0,25	0,28	1,74	0,29
Glutam. kiselina — Ac glutamique	2,80	0,92	4,98	4,72
Prolin — Proline	0,42	0,25	1,41	1,64
Glicin — Glycine	1,25	0,79	0,11	0,26
Alanin — Alanine	0,65	0,84	0,66	0,62
Cistein -- Cysteine	0,17	—	—	—
Valin — Valine	0,27	0,5	0,51	0,21
Metionin -- Méthionine	0,68	0,14	0,10	—
Izoleucin — Isoleucine	0,07	0,39	0,13	0,03
Leucin — Leucine	0,13	0,53	2,48	2,04
Tirozin — Tyrosine	0,09	0,23	1,08	0,24
Fenilalanin — Phenylalanine	0,08	0,24	1,88	1,20
Ukupno:				
Total:	7,82	7,29	24,00	13,19

kod kontrolnih sireva. Treću grupu predstavljaju aminokiseline od 0,1 do 0,8 mg za prvi slučaj, odnosno 0,03 do 0,69 za drugi slučaj.

U cilju povezivanja i objašnjenja bioloških pojava koje se manifestuju u transformaciji proteinskog kompleksa mleka i sireva praćena je promena esencijelnih i neesencijelnih aminokiselina. Na osnovu izračunatih koncentracija najuočljivija promena u povećanju esencijelnih aminokiselina je zapažena kod uzoraka sireva dobijenih sa kulturom *Str. diacetilactis* (tablica 2).

Pod utjecajem proteolitičke aktivnosti *Str. diacetilactis* došlo je do povećanja koncentracije slobodnih esencijelnih aminokiselina. Da bi se bolje zapažile razlike koncentracija esencijelnih aminokiselina između oglada II i III rezultati ispitivanja su ilustrovani i u procentualnim vrednostima.

Ako se izvrši upoređenje podataka iz tablice 2, može se konstatovati da se procentualno povećanje esencijelnih aminokiselina kretalo od 121,5% do 778,2% u uzorcima sireva s kulturom u usporedbi s onima bez kulture (100%). Na osnovu ovih utvrđenih razlika vidi se da je došlo do najvećeg povećanja lizina (778,2%), koji predstavlja istovremeno dominantnu aminokiselinu u odnosu na druge ispitivane slobodne aminokiseline. Procentualno povećanje koncentracija esencijelnih aminokiselina nije bilo podjednako izraženo po pojedinim aminokiselinama što je normalno i očekivati obzirom na njihove strukture, fizičko-hemijske osobine, zastupljenost, sekvencu i frekvencu u proteinima

Tablica 2. Koncentracija esencijelnih aminokiselina u mleku i sirevima
(u miligramima u 100 grama uzorka)

Tableau 2. Les concentrations des acides aminés essentiels du lait et du fromage
avec et sans *Str. diacetylactis* (mg/100 g)

Esencijelne aminokiseline Acides aminés essentiels	Mleko	Sir sa <i>Str. diacetylactis</i>		Sir bez kulture	
	Lait	Fromage avec <i>Str. diacetyl.</i>		Fromage sans <i>Str. diacetylactis</i>	
	I	II	%	III	%
	mg/100 g	mg/100 g		mg/100 g	
Lizin — Lysine	0,33	5,37	778,2	0,69	100,0
Treonin — Threonine	0,23	0,80	444,5	0,18	100,0
Valin — Valine	0,27	0,51	242,8	0,21	100,0
Metionin — Methionine	0,08	0,10	—	—	—
Izoleucin — Isoleucine	0,07	0,13	433,3	0,03	100,0
Leucin — Leucine	0,13	2,48	121,5	2,04	100,0
Fenilalanin — Phénylalanine	0,08	1,88	156,6	1,20	100,0
Ukupno					
Total	1,19	11,27		4,35	

mleka i proizvodima od mleka. Obzirom na veliki sadržaj lizina u ukupnom proteinu sireva s kulturom *Str. diacetylactis* može se zaključiti, da je biološka vrednost ovih sireva mnogo veća, nego sireva bez primene kulture.

Veći broj autora Carpenter, et al. (1955), De Vuyst, et al. (1972), Rexen, et al. (1967) su primenjivali razne eksperimentalne uslove da bi dokazali biološki indeks nekog proizvoda od mleka, a kao najsigurniji pokazatelj u objašnjenju ovih karakteristika poslužili su im kvantitativni parametri sadržaja lizina.

Rezultate naših ispitivanja mogli bi uporediti sa radom Ordóñez-a et al. (1977), koji su dobili veće vrednosti ukupnih slobodnih aminokiselina (126,67 mg/100 gr. suve materije) u sirevima tipa »Ulloa« sa starterom *Str. faecalis var. liquefaciens*, nego bez ove kulture (86,84 mg/100 gr. suve materije). Jači stepen izražene proteolize kazeina tumači se enzimskom aktivnošću proteaza, karboksipeptidaza, aminopeptidaza, fosfataza i tripeptidaza, startera *Str. faecalis var. liquefaciens*, koje u finalnom proizvodu određuju progresivno oslobađanje aminokiselina. Sadržaj i evolucija ovih supstanci za vreme procesa zrenja daju specijalan okus različitim tipovima sireva.

Mikrobiološka istraživanja kod izoliranih sojeva *Str. diacetylactis* iz sireva vršena su radi donošenja zaključaka o održivosti antimikrobnih svojstava posle određenih tehnoloških postupaka. Retestirana je osetljivost 20 sojeva *Pseudomonas spec.* (*Pseud. fluorescens* i *Pseud. aeruginosa*) i dokazano je inhibitorno dejstvo izolata *Str. diacetylactis* na ove sojeve.

Ovi rezultati su u skladu sa ispitivanjima, Babela (1977) kad su za pravljenje sira korišćene kulture *Str. lactis* i *Str. cremoris*, koje su inhibirale porast *Pseud. fragi*, *Pseud. putrefaciens* i koliformne bakterije. Braneni i Geneske (1979) su utvrdili inhibitorno dejstvo *Str. cremoris* i *Str. diacetylactis* prema raznim bakteriološkim populacijama gramnegativnih bakterija. Elikier, et al. (1979) su proučavali poboljšanje okusa sitnog sira dodavanjem

Str. diacetilactis, ova kultura je davala diacetilni okus. Vreme skladištenja sira je bilo oko 21 dan što je pripisivano inhibiranju rasta štetnih bakterija.

Zaključak

Kvantitativni pokazatelji procentualnog povećanja esencijelnih amino-kiselina od 121,5 do 778,2% u uzorcima sireva koji su bili izloženi dejstvu *Str. diacetilactis* ukazuju na potrebu, da se proizvodnja svežih sireva izvodi uz korišćenje startera. Selekciju aromogenih streptokoka treba izvršiti prema stepenu proteolitičkog dejstva na kazeinske komponente mleka i stepenu antimikrobnog dejstva prema patogenim gram-negativnim bakterijama.

Na osnovu povećanih koncentracija lizina može se zaključiti, da je biološka vrednost sireva sa kulturom *Str. diacetilactis* mnogo vrednija, nego sireva bez primene ovih streptokoka.

Résumé

Les résultats de nos analyses au point de vue d'acides aminés essentiels ont montré qu'il y a des différences entre des fromages analysés. On constate l'augmentation des acides aminés essentiels de 121,5 p 100 à 778,2 p 100 dans les fromages avec la culture STR. DIACETILACTIS, par rapport à la protéine des fromages sans STR. DIACETILACTIS.

Sur la base de la composition en lysine on note une augmentation de la teneur en lysine dans les fromages blancs avec STR. DIACETILACTIS. On arrive à la conclusion que la valeur biologique de la protéine du fromage avec STR. DIACETILACTIS sera plus grande à celle du fromage sans STR. DIACETILACTIS.

Literatura

- BABEL, F. Y. (1977): Antibiosis by lactic culture, **J. Dairy Sci.**, **60**, 815—821.
- BRANEN, A. L. and GENESKE, R. P. (1979): **Science**, **40**, 446—450.
- CARPENTER, K. Y. and ELLINGER (1955): The determination of available lysine in feeding stuffs. **Biochemical Journal**, **61**, XI.
- DESMAZEAUD, M. Y. and ZEVACO, C. (1979): Isolation and general proprieties of two intracellular aminopeptidases of *Str. diacetilactis*. **Milchwissenschaft**, **34**, 606—610.
- DE VUYST, A., VERNACK, W. et CHARLIER, H. (1972): La teneur en lysine totale et disponible du lait, des fromages ayant subi un traitement industriel. **Le lait**, **517**, 444—453.
- MOORE, S., SPECKMAN, D. et STEIN, W. (1958): **Analytical Chemistry** **7**, 30, 1190—1206.
- MITIĆ, S., ĐORĐEVIĆ, M. i RAKIĆ, M. (1982): Ispitivanje antimikrobnih komponenti *Streptococcus diacetilactis* u tehnološkim uslovima. Zbornik radova.
- ORDONEZ, Y. A. et BURGOS, Y. (1977): Acides aminés libres pendant la maturation. **Le lait**, **567**, 416—420.
- REXEN, B. and CHRISTENSEN, B. (1967): The determination of available lysine in feeding stuffs. *Analytical Chemistry*, Technicon International Ardsley Chauncey, New-York.
- THOMAS, T. D., YARVIS, B. D. et SKIPPER, N. A. (1974): Localisation of protease near the cell surface of *Str. lactis*, **J. Bacteriology**, **118**, 329—333.