

## Inhibicijsko djelovanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz svježeg kravljeg sira

Nevijo Zdolec, Sanja Lazić, Lidija Kozačinski,  
Mirza Hadžiosmanović, Ivana Filipović

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.352/579.678

### **Sažetak**

*Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio prirodne mikroflore mlijeka, a produktima svog metabolizma mogu utjecati i na sigurnost mliječnih proizvoda. Njihovo antimikrobno djelovanje odvija se preko organskih kiselina, vodikovog peroksida, ugljičnog dioksida ili bakteriocina. Svrha ovog rada bila je utvrditi sastav populacije bakterija mliječne kiseline u svježim sirevima prikupljenim na zagrebačkim tržnicama, te istražiti njihov antimikrobni potencijal. Broj bakterija mliječne kiseline određivan je metodom ISO 1524:1998, biokemijska determinacija pomoću API 50 CHL, a inhibicijsko djelovanje prema *Listeria monocytogenes* NCTC 10527 agar difuzijskim testom. Broj bakterija mliječne kiseline u svježim sirevima ( $n=10$ ) kretao se od 5,87 do 8,38  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ . Biokemijskom determinacijom izolata ( $n=52$ ) utvrđene su vrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (61,54 %), *Lactobacillus helveticus* (23,07 %), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (11,54 %) te *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (3,85 %). Inhibicijsko djelovanje prema *L. monocytogenes* NCTC 10527 zabilježeno je u 18 izolata.*

*Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, svježi kravljji sir, bakteriocini, sigurnost hrane*

### **Uvod**

U konceptu sigurnosti hrane stalna su nastojanja za što trajnijim rješenjima radi zaštite zdravlja potrošača od štetnih mikroorganizama. Istraživanja i razvoj zaštitnih tehnologija u prehrambenoj industriji sve su intenzivnija, a posebni interes pridaje se primjeni zaštitnih kultura mikroorganizama i njihovih antimikrobnih metabolita. U tom kontekstu prirodna mikroflora mliječnih proizvoda, kao i drugih namirnica, može nam

poslužiti kao polazna točka proučavanja mikrobnih interakcija čiji se principi mogu pretočiti i u praktične okvire i proizvodnju sigurnije hrane.

Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio prirodne mikroflore mlijeka, a svojom metaboličkom aktivnošću utječu i na ukupnu kakvoću svježeg sira. Djelovanjem mikrobnih enzima, te enzima iz mlijeka u procesu razgradnje mliječnog šećera, stvara se kiseli medij u kojem većina saprofitske i patogene mikroflore ne može opstati. Navedene promjene utječu i na organoleptička svojstva sira (primjerice na miris, okus i konzistenciju). Nadalje, poznato je da bakterije mliječne kiseline stvaraju i različite metabolite koji, između ostalog, mogu djelovati štetno na «osjetljivu» mikrobnu floru, bilo stvaranjem nepovoljnog medija za rast (acidifikacija) ili djelovanjem na strukture bakterijske stanice (antimikrobni peptidi).

Ovo posljednje svojstveno je bakteriocinima, antimikrobnim peptidima ili proteinima (Tagg i sur., 1976.) različitih spektara i načina djelovanja, molekularnih masa, genetskih i biokemijskih svojstava (Jack i sur., 1995.). U mljekarskoj industriji najznačajniji su kratki, termostabilni bakteriocini (engl. lantibiotics) (Klaenhammer, 1993.) s najpoznatijim predstavnikom nizinom, jedinim bakteriocinom u komercijalnoj upotrebi širom svijeta u proizvodnji mliječnih proizvoda (Federal Register, 1988.). Sintetizira ga *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i inhibira široki spektar gram-pozitivnih bakterija uključujući *L. monocytogenes* (Benkerroum i Sandine, 1988.), *Clostridium* spp. i *Bacillus* spp. (Daeschel, 1989.). Prema našem Pravilniku o prehrambenim aditivima (NN 173/2004) upotreba nizina (E234) kao konzervansa dopuštena je u proizvodnji sireva sa zrenjem (12,5 mg/kg), topljenim sirevima, vrhnju dobivenom kuhanjem i siru Mascarpone (10 mg/kg).

Dostupna literatura obiluje dokazima o inhibicijskom učinku bakteriocina na bakterije kvarenja (klostridije, heterofermentativni laktobacili) i patogene bakterije uključujući *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. *Clostridium* spp. *Enterococcus* spp. i *Bacillus* spp. Među bakteriocinogenim bakterijama mliječne kiseline značajno mjesto zauzimaju vrste roda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* i dr. (Zdolec i sur., 2005.). Istraživanja autohtone mikroflore fermentiranih i drugih namirnica usmjerena su pronalaženju sojeva koji sintetiziraju bakteriocine te njihovoj implementaciji u proizvodnji hrane kao dodatnih zaštitnih faktora prema nepoželjnim mikroorganizmima. Tako su i iz različitih vrsta tradicionalnih sireva izolirani sojevi s inhibicijskim djelovanjem prema *Clostridium* spp. (Christiansen i sur., 2005.), *Staphylococcus aureus*,

*Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes* (Herrerros i sur., 2005.; Gurira i Buys, 2005.; Gonzales i sur., 2006.; Topisirović i sur., 2006.).

U svezi s navedenim, svrha ovog rada bila je u svježim kravljim sirevima istražiti sastav populacije bakterija mliječne kiseline te testirati njihovu sposobnost inhibiranja rasta *L. monocytogenes* NCTC 10527.

### **Materijal i metode**

#### **Svježi kravljji sirevi**

Svježi kravljji sirevi (n=10) proizvedeni u domaćinstvima uzorkovani su na zagrebačkim tržnicama. U laboratorij Zavoda za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dostavljeni su u PVC vrećicama u prijenosnom hladnjaku. Do početka mikrobiološke pretrage bili su pohranjeni u hladnjaku na + 4 °C.

#### **Izolacija i determinacija bakterija mliječne kiseline**

Za određivanje broja bakterija mliječne kiseline aseptički je uzeto 10 grama uzorka, razrijeđeno u 90 mL fiziološke otopine te homogenizirano 2 minute (Stomacher 400 Circulator, Seward, UK). Od pripremljenih serijskih razrijeđenja uzeto je 0,1 mL te površinski nacijepljen na De Man, Ragosa, Sharpe (MRS) agar (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska) i inkubiran u anaerobnim uvjetima (Anaerocult C; Merck, Darmstadt, Njemačka) 48-72 sata na 30 °C.

Nakon izračuna broja bakterija mliječne kiseline na MRS agaru, morfološki različite kolonije (okrugle, sitne, krupne, glatke, zvjezdaste, žućkaste, bijele) prebačene su u MRS bujon radi pripreme čistih kultura. Ukupno je izdvojeno 70 kolonija i inkubirano 48 sati na 30 °C. Nakon inkubiranja nacijepljene su na MRS agar metodom iscrpljivanja uzorka radi postizanja odvojenosti kolonija, te potom ponovno inkubirane u istim uvjetima. Kolonije su obojene po Gramu, pregledane mikroskopski te podvrgnute katalaza testu. Gram-pozitivni i katalaza-negativni koki, kokobacili i bacili podvrgnuti su daljnjoj determinaciji pomoću API 50 CHL dijagnostičkog sustava prema uputama proizvođača (Biomérieux). Fermentacijski profil izolata očitao je kompjutorskim programom API Lab Plus. Nakon determinacije izolati su pohranjeni u MRS bujonu s 30 % glicerola na -20 °C.

### **Inhibicijsko djelovanje izolata prema *L. monocytogenes***

Inhibicijsko djelovanje izolata prema indikatorskom soju *L. monocytogenes* NCTC 10527 provjereno je agar spot (engl. agar spot test) i agar difuzijskim testom (engl. agar well diffusion assay). Kultura indikatorskog soja *L. monocytogenes* pripravljena je u BHI bujonu inkubiranjem 24 sata na 37 °C. Izolati bakterija mliječne kiseline (n=52) inkubirani su u MRS bujonu 48 sati na 30 °C i potom centrifugirani na 10 000 okretaja/min. 10 minuta na +4 °C. Nakon centrifugiranja uzeto je 50 µL supernatanta za agar spot test, tj. izravno nakapano na BHI agar s indikatorskim mikroorganizmom. Nakon inkubacije 24 sata na 30 °C uslijedila je provjera pojave zona inhibicije. U slučaju pozitivnog nalaza (inhibicija rasta *L. monocytogenes*) provjerena je sposobnost proizvodnje bakteriocina agar difuzijskim testom.

Za agar difuzijski test kultura je pripremljena prema gore opisanoj metodologiji. Iz supernatanta je uzeto 100 µL u duplikatu, prvi dio je neutraliziran s 1M KOH radi isključivanja inhibicije indikatorskog soja djelovanjem kiseline, a drugi tretiran proteazom (proteinaza K, Takara, Bio Inc, Japan) radi provjere proteinske strukture inhibitora. Proteazom tretirani supernatant prije izvedbe testa inkubiran je 1 sat na 37 °C. U agar difuzijskom testu korišten je BHI agar (s 1,5 % agara) prekriven s 7 mL mekog BHI agara (0,7 % agara) inokuliranog *L. monocytogenes* NCTC 10527. U tako pripremljenim hranjivim podlogama načinjene su udubine te ispunjene s 50 µL odgovarajućeg supernatanta (netretirani, neutralizirani i proteazom tretirani supernatant). Prije inkubiranja (24 sata na 30 °C) u anaerobnim uvjetima (radi isključivanja inhibicije vodikovim peroksidom) hranjive podloge držane su na + 4 °C radi difuzije inhibitora. Nakon inkubacije provjerena je pojava zone inhibicije rasta *L. monocytogenes*.

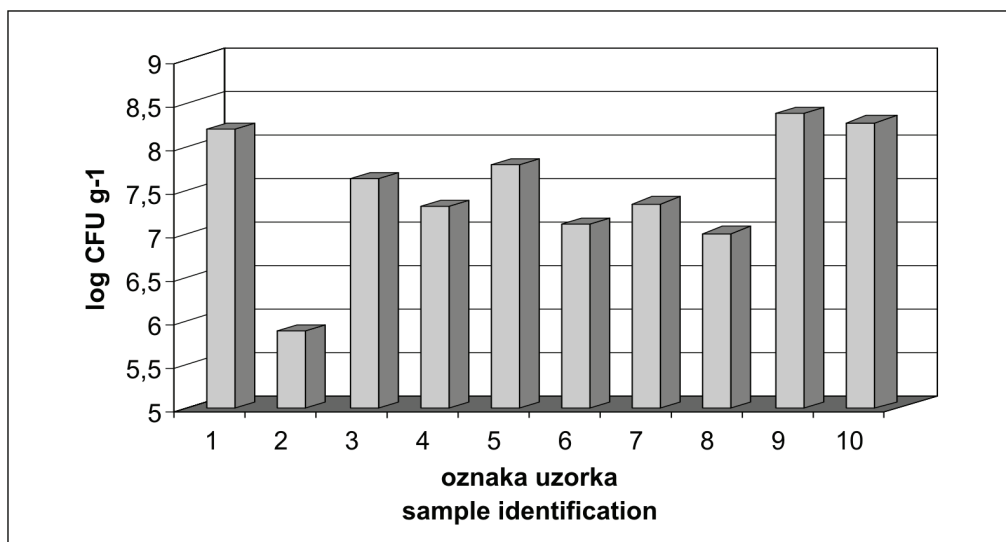
### **Rezultati i rasprava**

Rezultati su pokazali da se broj bakterija mliječne kiseline u pretraženim uzorcima sireva kretao se od 5,87 do 8,38 log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> (grafikon 1). Od ukupno 70 izdvojenih, 52 izolata bili su gram-pozitivni, katalaza negativni bacili (n=12), koki i kokobacili (n = 40) što su bili kriteriji za daljnju determinaciju.

API identifikacijskim testom bakterije mliječne kiseline determinirane su kao *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc (Ln.) mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i

*Lactobacillus (Lb.) helveticus*. Ukupno gledajući, dominantna vrsta u pretraženim uzorcima svježih kravljih sireva bila je *Lc. lactis* subsp. *lactis* (n = 32; 61,54 %), potom *Lb. helveticus* (n=12; 23,08 %), *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (n = 6; 11,54 %) i konačno *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (n = 2; 3,84 %).

Podatci o sastavu populacije bakterija mliječne kiseline u svježim kravljim sirevima u našoj su literaturi - oskudni. S druge strane, u svijetu su provedena mnoga istraživanja tog tipa u različitim vrstama sireva i drugim mliječnim proizvodima, ponajprije radi utvrđivanja sastava mikroflore te pronalaženja i primjene različitih sojeva koji sintetiziraju bakteriocine.



Grafikon 1: Broj bakterija mliječne kiseline ( $\log_{10}$  CFU g<sup>-1</sup>) u svježim kravljim sirevima

Figure 1: Lactic acid bacteria count ( $\log_{10}$  CFU g<sup>-1</sup>) in fresh cow cheese samples

Tako su Zamfir i sur. (2006.) istraživali sastav populacije bakterija mliječne kiseline u sirovom i fermentiranom mlijeku, kiselom vrhnju i sirevima proizvedenim na tradicionalan način u domaćinstvima diljem Rumunjske. Najučestalije izolirana vrsta bila je *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; u više od 72 % uzoraka (n = 98) - u 90 % uzoraka sirovog mlijeka, 80 % uzoraka kiselog vrhnja, 68 % uzoraka fermentiranih mlijeka i 52 % uzoraka sireva. Također je značajan nalaz *Leuconostoc mesenteroides* koji je utvrđen u

Tablica 1: Inhibicijsko djelovanje izolata bakterija mliječne kiseline prema *L. monocytogenes* (agar spot test)

Table 1: The inhibitory activity of lactic acid bacteria against *L. monocytogenes* (agar spot test)

Oznaka izolata Isolate identification	Vrsta (API 50 CHL) Species (API 50 CHL)	Zona inhibicije (mm) Zone of inhibition (mm)
S1	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3
S6	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3
S19	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	3
S21	<i>Lb. helveticus</i>	3
S24	<i>Lb. helveticus</i>	3
S27	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5
S33	<i>Lb. helveticus</i>	3
S34	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S38	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S40	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S43	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S45	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S46	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S48	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S49	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4
S50	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3
S51	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3
S52	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3

više od 35 % pretraženih uzoraka. Osim spomenutih, izolirane su druge *Leuconostoc* vrste, enterokoki te vrlo rijetko laktobacili (pr. *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*). U istraživanju mikrobioloških i kemijskih svojstava svježeg kravljeg sira «Tetilla» Menendez i sur. (2001.) utvrdili su također dominaciju laktokoka (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) nad pripadnicima rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (19 : 12,3 : 7,6 %). Naši rezultati sukladni su prikazanim u smislu nalaza *Lc. lactis* subsp. *lactis* prevladavajućom vrstom u populaciji bakterija mliječne kiseline u mliječnim proizvodima od sirovog mlijeka.

Agar spot testom utvrđena je inhibicija rasta *L. monocytogenes* kod ukupno 18 izolata: četrnaest izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis*, tri izolata *Lb. helveticus* i jednog izolata *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (tablica 1). Ovi su rezultati kompatibilni podacima iz literature koji potvrđuju inhibicijsko djelovanje navedenih vrsta prema *L. monocytogenes* djelovanjem

bakteriocina ili drugih antimikrobnih tvari (Herrerros i sur., 2005.; Gonzales i sur., 2006.; Topisirović i sur., 2006.).

U našem istraživanju agar difuzijskim testom, nakon tretiranja supernatanata lužinom, (1M KOH) zona inhibicije je izostala kod svih pretraženih izolata, a postojeći inhibitor nije posjedovao proteinsku strukturu budući da su se zone inhibicije pojavile i nakon tretiranja supernatanata proteinazom. Dobiveni rezultat pokazuje da je inhibicija rasta *L. monocytogenes* NCTC 10527 bila rezultat djelovanja organskih kiselina, a ne bakteriocina ili bakteriocinima sličnih metabolita.

### **Zaključci**

- Broj bakterija mliječne kiseline u svježim kravljim sirevima kretao se od 5,87 do 8,38  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ , a relativno velik raspon vrijednosti treba pripisati specifičnostima svakog pojedinog sira (porijeklo, način proizvodnje i dr.)
- Prevladavajuća vrsta bakterija mliječne kiseline u pretraženim uzorcima svježih kravljih sireva je *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a izolirane su i *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.
- Antilisterijsko djelovanje posjeduje značajan dio populacije bakterija mliječne kiseline izoliranih iz svježih kravljih sireva (18 od 52 izolata ili 34,61 %). Inhibicija rasta *L. monocytogenes* NCTC 10527 nije bila rezultat djelovanja bakteriocina, već proizvedenih organskih kiselina.

## **THE INHIBITORY ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FRESH COW CHEESE**

### **Summary**

*Lactic acid bacteria are the constituent part of milk microbial flora that could influence the safety of dairy products due production of organic acids, hydrogen peroxide, carbon dioxide and bacteriocins. Taking this in consideration, the objective of this study was to investigate the composition of lactic acid bacteria population in fresh cow cheeses taken from local markets, as well as their antimicrobial capacity. Lactic acid bacteria counts were determined according to ISO 1524:1998 method, biochemical determination using API 50 CHL system, and inhibitory activity against L. monocytogenes*

NCTC 10527 by agar well diffusion assay. Lactic acid bacteria count in fresh cow cheeses ( $n=10$ ) ranged from 5.87 to 8.38  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$ . Among 52 MRS isolates collected, 61.54 % were assigned to the *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* species, 23.07 % *Lactobacillus helveticus*, 11.54 % *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and 3.85 % *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Antilisterial activity was found in 18 isolates.

*Key words:* lactic acid bacteria, fresh cow cheese, bacteriocins, food safety

### Literatura

- BENKERROUM, R., SANDINE, W. E. (1988): Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal Dairy Science*, 71, 3237-3245.
- CHRISTIANSEN, P., PETERSEN, M. H., KASK, S., MOLLER, P. L., PETERSEN, M., NIELSEN, E. W., VOGENSEN, F. K., ARDÖ, Y. (2005): Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15, 901-909.
- DAESCHEL, M. A. (1989): Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43, 164-166.
- GONZALES, L., SANDOVAL, H., SACRISTAN, N., CASTRO, J. M., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. (2006): Identification of lactic acid bacteria and study of their antimicrobial activity. *Food Control*. Article in Press.
- GURIRA, O. Z., BUJS, E. M. (2005): Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology*, 22, 159-168.
- HERREROS, M. A., SANDOVAL, H., GONZALES, L., CASTRO, J. M., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. (2005): Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats milk cheese). *Food Microbiology*, 22, 455-459.
- JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59 (2), 171-200.
- KLAENHAMMER, T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12, 39-86.
- MENENDEZ, S., GODINEZ, R., CENTENO, J. A., RODRIGUEZ-OTERO, J. L. (2001): Microbiological, chemical and biochemical characteristics of «Tetilla» raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, 18, 151-158.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W. (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews*, 40 (3), 722-756.



TOPISIROVIC, LJ., KOJIC, M., FIRA, DJ., GOLIC, N., STRAHINIC, I., LOZO, J. (2006): Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Article in Press.

ZAMFIR, M., VANCANNEYT, M., MAKRAS, L., VANINGELGEM, F., LEFEBVRE, K., POT, B., SWINGS, J., DE VUYST, L. (2006): Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487-495.

ZDOLEC, N., HADŽIOSMANOVIĆ, M., KOZAČINSKI, L., FILIPOVIĆ, I. (2005.): Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso*, VII, 3; 43-47.

\*\*\*FEDERAL REGISTER (1988): Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Federal Register 54, 11247-11251.

\*\*\*PRAVILNIK o prehrambenim aditivima (NN 173/2004)

Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenih projekata (Veterinarsko javno zdravstvo u proizvodnji zdrave hrane 053-0531854-1851 i Mikrobiološka ispravnost i održivost namirnica animalnog podrijetla 053-0531854-1853), provedenih uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

**Adrese autora- Author's addresses:**

Nevijo Zdolec, dr. vet. med.<sup>1</sup>

Sanja Lazić, dr. vet. med.<sup>2</sup>

Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski<sup>1</sup>

Prof. dr. sc. Mirza Hadžiosmanović<sup>1</sup>

Ivana Filipović, dr. vet. med.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica  
Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane  
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Heinzelova 55, Zagreb

<sup>2</sup>Veterinarska stanica Slatina d.o.o.  
Kralja Zvonimira 16, Slatina

**Prispjelo - Received:** 08.01.2007.

**Prihvaćeno - Accepted:** 26.03.2007.