

FUNKCIONALNE OSOBINE SOJEVA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE I MIKROKOKA U SREDINI SLIČNOJ MESNOJ MASI SIROVIH KOBASICA KAO MODELU

K. Valkova-Jorgova¹, K. Danov¹, D. Gradinarska¹, A. Kuzelov², N.
Taskov², D. Saneva²

Izvod: U ovom radu su ispitivana potencijalna probiotska svojstva bakterija *Lactobacillus Plantarum* soj L 24 - 2, *Lactococcus lactis* biovar *diacetilactis* soj N 237 i *Micrococcus* sp. Utvrđeno je da mikrobnе vrste pokazuju sposobnost za preživljavanje pod uslovima visoke koncentracije žučnih soli (2,0%) i niskog pH (2.0). Ova sposobnost varira kod različitih ispitivanih bakterija, ali sve one ostaju životno sposobne do kraja eksperimenata. Ovo, zajedno sa dokazanom antimikrobnom aktivnošću čini ih pogodnim za uključivane u sastav novih starter kultura, koje mogu efikasno poslužiti kao antimikrobna barijera za razvoj patogenih bakterija u proizvodnji sirovih - sušenih proizvoda od mesa.

Ključne reči: bakterije mlečne kiseline, mikrokoke, starter kultura, antimikrobno dejstvo, sirovine, sušeni proizvodi

Uvod

Stručnjaci iz oblasti prehrambene industrije u mnogim zemljama čine napore u cilju stvaranja novih starter kultura mikroorganizama sa funkcionalnim svojstvima. Upotreba starter kultura u proizvodnji sirovih kobasica može da doprinese dostizanju *in situ* poželjnih osobina, zadržavajući prirodnu i visoku hranljivu vrednost gotovih proizvoda (Campanini i sar., 1993; Hugas & Monfort, 1997; Toldra, 2006). Probiotski mikroorganizmi su definisani kao nepatogeni mikroorganizmi koji kada se unesu u dovoljnoj količini u organizam pozitivno utiču na fiziologiju domaćina i pokazuju određene zdravstvene dobrobiti izvan osnovnog urođenog i dejstva ishrane (Ouvehand, 2002, Salminen and Isolauri, 2002). Erkkila i sar. (2001) navode neke probiotske starter kulture koje ne menjaju tehnološke i senzorne osobine proizvoda kada se upotrebljavaju za proizvodnju nekih severno-evropskih sirovih kobasica.

Pravilno odabrana starter kultura sa funkcionalnim svojstvima u proizvodnji sirovih kobasica može doprineti bezbednosti proizvoda i obezbediti jednu ili više prednosti (senzornu, tehnološku, prehrambenu i/ili zdravstvenu) gotovog proizvoda (Liroj i sar., 2006).

U literaturi postoje podaci da mlečno kiselinske bakterije izolovane iz proizvoda od mesa pokazuju toleranciju prema niskim pH vrednostima i preživljavaju dejstvo žučnih soli u koncentraciji od 0,3 % (v/v) (Erkkila & Petaja, 2000; Pennacchia i sar., 2004;

¹ University of Food Technologies in Plovdiv, Bulevar Marica 13, Plovdiv, Bulgaria (katia_jorgova@yahoo.com)

² University Goce Delchev, Ul. Krste Misirkov Bb Stip R. Macedonia (aco.kuzelov@ugd.edu.mk)

Klingberg i sar., 2006). Mlečno kiselinske bakterije se ponašaju kao probiotici ako uspešno konkurišu patogenim mikroorganizmima u organizmu i podstiču obnovu normalne crevne mikroflore (Salminen i sar., 1998). Kao alternativa hemijskim konzervansima može se koristiti antimikrobno dejstvo određenih sojeva mlečno kiselinskih bakterija kao sredstvo za sprečavanje mikrobne kontaminacije, jer postoji zainteresovanost potrošača za atraktivne, zdravije proizvode. Cilj ovog rada je da istraži potencijalne probiotske karakteristike odabranih sojeva *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis biovar diacetylactis* i *Micrococcus sp.* u sredini sličnoj mesnoj masi sirovih kobasica kao modelu.

Materijal i metode rada

Ispitivani sojevi mlečno kiselinskih bakterija *Lactobacillus Plantarum L24 - 2*, *Lactococcus lactis biovar diacetylactis N 237* i *Micrococcus sp.* obezbeđeni su iz zbirke mikroorganizama "Lactina" OOD, Bankya, Bugarska. Pre početka eksperimenta, liofilizovani sojevi su aktivirani u MRS bujonu (HiMedia) tokom 24 časa na 37 °C za mlečno kiselinske bakterije i Mannitol Salt Broth za mikrokoke (HiMedia) za 24 časa na 37 °C. Dinamika odabranih sojeva pod različitim temperaturnim uslovima je procenjena u modelnoj sredini sličnoj smesi mase sirovih kobasica, sledećeg sastava: 29 g peptona; 23 g mesnog ekstrakta; 0,2 g MgSO₄ x 7H₂O ; 0,0038 g MgSO₄ x H₂O; 1mL Tween 80; 55 g NaCl; 0,01 g NaNO₂, 1,5 % saharoze (HiMedia), 1.00 L destilovane vode. Medijumu je podešena pH vrednost na 6.2. Mikrobne kulture su sa titrom od 10¹⁰ cfu/mL. Od njih se zasejava 0,1 mL u 100 mL pripremljene modelne sredine i kultivišu na 15 °C i 25 °C tokom 48 časova. Apsorpcija uzoraka je merena svakih 8 sati na talasnoj dužini od 660 nm (M550 spektrofotometar, Camspec, UK) prema neinokuliranom uzorku, u skladu sa postupkom koji su opisali Novroozi i sar., (2004). Istovremeno su izvršena zasejavanja svih sojeva za određivanje ukupnog broja bakterija (cfu/mL). Ovo se radi kako bi se utvrdio stepen razvoja mikroorganizama, ukoliko promena apsorpcije nije dovoljna za procenu. Tokom istih intervala meri se i promena pH sredine.

Potencijalna probiotska svojstva ispitivanih sojeva su određena procenom otpornosti na niske pH vrednosti, i u prisustvu žučnih soli. Za ocenu rezistentnosti ispitivanih sojeva bakterija na kisele uslove želudca, pH vrednost modelne sredine je bila korigovana pomoću rastvora sone kiseline do vrednosti 2.0, 2.5 i 3.0. Nakon toga 100 mL medijuma je inokulisano sa 1 mL izlazne suspenzije na 24 – časovnoj mikrobnom kulturom ispitivanih mikroorganizmima, sa titrom 10⁸ cfu/mL. Kontrolne probe bez zakiseljavanja modelne sredine su takođe bile sprovedene. Kultivisanje je bilo sprovedeno na 37 °C. Apsorpcija tih uzoraka je bila merena (M550 spektrofotometar, Camspec, UK) svakih 30 minuta, a u produžetku 270 minuta, na talasnoj dužini od 560 nm u odnosu na neinokulirane uzorke, prema metodi koju su opisali Gotcheva i sar. (2002). Za obe vrste uzoraka (sa i bez acidifikacije - podkiseljavanja) i naknadne inokulacije sa odgovarajućim sojevima, utvrđen je ukupan broj bakterija na početku i na kraju eksperimenta, kako bi se utvrdila stopa preživljavanja, ako promena apsorpcije nije dovoljna da se izvrši procena bakterijskog razvoja.

Odredjivanje otpornosti ispitivanih mikroorganizama na prisustvo žučnih soli

Modelnoj sredini je dodato žučnih soli (Okoid) u količini od 0.2 %, 0.3 %, 0.4 % i 2.0 % (v/v), i ista se zaseje sa 1 % (v/v) 0,5 McFarland suspenzije 24-časovne kulture ispitivanih mikroorganizama. Takođe su bili pripremljeni kontrolni uzorci, bez dodatka žučnih soli u modelnoj sredini. Kultivacija je izvedena na temperaturi od 37 °C, a apsorbancija uzoraka je merens svakih 30 minuta tokom 270 min., na talasnoj dužini od 560 nm, u odnosu na neinkulisane uzorke (Gotcheva i sar., 2002). Statistička obrada dobijenih podataka izvršena je pomoću softvera "STATPLUS" 2009.

Rezultati istraživanja i diskusija

Podaci o stepenu razvoja ispitivanih sojeva izraženih promenama u apsorpciji i u ukupnom broju mikroorganizama (cfu/mL) pokazuju da izabrani sojevi imaju sposobnost da rastu u modelnoj sredini u oba primenjena temperaturna uslova (tabela 1). Tokom prvih 8 sati inkubacije na 15 °C, sojevi bakterija mlečne kiseline *L. plantarum* L24 - 2 i *L. lactis biovar diacetilactis* N 237 se razvijaju polako. Ovo potvrđuju vrednosti optičke gustine izražene apsorpcijom na inkulisane sredine i dobijeni rezultati za ukupan broj bakterija. Sposobnost da se razviju bolje na 15 °C je primećen u slučaju *L. plantarum* L24 - 2, kada je apsorpcija sredine povećana na 0,162 jedinica, a ukupan broj bakterija je povećan za dva reda veličine, u poređenju sa *L. lactis biovar diacetilactis* N 237. Kultivacija sojeva *L. plantarum* L24 - 2 i *L. lactis biovar diacetilactis* N 237 na 25 °C značajno ubrzava njihov razvoj. Sporiji tempo razvoja na 15 °C je povezan sa produženjem LAG - faze, a intenzivan razvoj sojeva *Lactobacillus plantarum* L24 - 2 i *Lactococcus lactis biovar diacetilactis* N 237 može se objasniti njihovim brzim prilagođavanjem hranljivoj modelnoj sredini.

Što se tiče razvoja soja *Micrococcus sp.* nakon kultivisanja na 15 °C i na 25 °C, primećen je usporen tempo razvoja, a statistički različite vrednosti su zapažene nakon 16 časova kultivisanja. Nakon prvih 8 časa kultivisanja ispitivani sojevi mlečno kiselinskih bakterija imaju tendenciju brzog rasta i razvoja. Kod oba ispitivana soja je primećena dobra sposobnost stvaranja kiseline u modelnoj sredini, na 25 °C i na 15 °C. Nakon početnog perioda prilagođavanja *Micrococcus sp.* tokom 24 sata primećuje se značajan razvoj, po oceni viših vrednosti optičke gustine u proseku 0.721 i 0.803, na 15 °C i 25 °C.

Rezultati promena pH vrednosti bujonske kulture *Micrococcus sp.* predstavljeni su u tabeli 1, i pokazuju da iako ispitivani soj demonstrira dobru sposobnost za razvoj u sredini sličnoj uslovima u mesnoj masi, ne pokazuje dobro izražena acidiona svojstva.

Tabela 1. Promene u razvoju ispitivanih sojeva u test medijumu na 15 ° C i 25 ° C.
 Table 1. Changes in the development of the test strains in the test media at 15 ° C and 25 ° C.

vreme, h	indikator	<i>Lactobacillus plantarum</i> L24-2		<i>Lactococcus lactis</i> biovar diacetylactis N 237		<i>Micrococcus</i> sp.	
		Temperatura, °C					
		15	25	15	25	15	25
0	pH	6.21	6.22	6.21	6.21	6.22	6.23
	Abs	0.108	0.105	0.135	0.139	0.258	0.266
	OB, logcfu/mL	5.32	5.34	5.49	5.41	6.15	6.26
8	pH	6.18	6.14	6.19	6.16	6.26	6.20
	Abs	0.270	0.378	0.212	0.295	0.296	0.376
	OB, cfu/mL	7.52	8.56	6.57	6.30	6.28	6.32
16	pH	5.92	5.61	6.08	5.84	6.31	6.22
	Abs	0.678	1.305	0.586	0.978	0.458	0.772
	OB, cfu/mL	7.58	9.54	6.87	7.49	6.75	7.45
24	pH	5.85	5.53	5.89	5.75	6.24	6.19
	Abs	0.808	1.370	0.766	1.113	0.721	0.803
	OB, cfu/mL	8.43	9.46	7.65	8.64	7.30	7.72
32	pH	5.73	5.54	5.78	5.67	6.15	6.02
	Abs, %	0.801	1.184	0.779	1.027	0.732	0.693
	OB, cfu/mL	8.59	9.04	7.88	8.76	7.46	8.54
40	pH	5.58	5.33	5.79	5.52	6.25	5.94
	Abs	0.937	1.209	0.884	1.141	0.739	0.722
	OB, cfu/mL	9.00	9.08	8.04	8.76	6.39	7.58
48	pH	5.66	5.45	5.61	5.55	6.26	6.08
	Abs	1.102	1.104	0.969	1.095	0.728	0.733
	OB, cfu/mL	9.28	8.60	7.99	8.59	6.34	7.54

Tolerancija ispitivanih mikroorganizama na niske pH vrednosti

Stabilnost na pH 3.0 u produžetku od 2 časa se koristi kao standard u smislu održivosti probiotskih bakterija na niske pH vrednosti (Arihara i sar., 1998; Aimerich i sar., 2000). Tokom eksperimenata je utvrđeno da se ispitivani mikroorganizmi razlikuju u njihovom ponašanju prema niskim pH vrednostima (2.0 do 3.0) (Tabela 2).

Tabela 2. Procena Održivost *L. plantarum* L24 -2, *L. lactis* biovar diacetylactis N 237 i *Micrococcus* sp. Nizak pH

Table 2. Assessing Sustainability *L. plantarum* L24-2, *L. lactis* biovar diacetylactis N 237 and *Micrococcus* sp. The low pH

uzorak		<i>L. plantarum</i> L24-2		<i>L. lactis</i> N 237		<i>Micrococcus</i> sp.	
		ΔA_{560}	S	ΔA_{560}	S	ΔA_{560}	S
inspekcija, 6.5	pH	0.144	+	0.6	+	0.101	+
	pH 2.0	0.023	+	0.005	+	- 0.078	+
	pH 2.5	0.026	+	0.009	+	- 0.045	+
	pH 3.0	0.029	+	0.019	+	-0.023	+

Rezultati su izraženi kao razlika apsorpcije na 560 nm u roku od 4.5 sata, na osnovu tri nezavisna merenja i evaluaciji stope preživljavanja (S) mikrobnih vrsta određivanjem ukupnog broja bakterija, kada su zasejavanja izvršena nakon određenog vremena ispitivanja (posle 4.5 sata). Rast svih sojeva posle 4.5 sata na pH 2.0, 2.5 i 3.0 je veoma spor (Tabela 2). Rast svih sojeva nakon 4.5 časa na pH 2.0, 2.5 i 3.0 je veoma usporen (Tab. 2.). Dobijeni rezultati za ukupan broj bakterija su pokazali da ispitivani sojevi mikroorganizama ostaju životno sposobni tokom čitavog perioda istraživanja. Značajne promene u apsorpciji ($P < 0.05$) su zapažene kod sva tri ispitivana soja. Najveću otpornost je pokazao *L. plantarum* L24-2, a najslabu *Micrococcus* sp. Pri oceni ukupnog broja bakterija pri kraju eksperimenta se utvrdilo preživljavanje i kod *Micrococcus* sp. Rezultati ispitivanja pokazuju da izabrani sojevi bakterija mlečne kiseline mogu preživeti u kiseloj sredini želuca, simulirajući uslove *in vitro*. Iako vrednost pH želuca ne može biti niža od 2.0, očuvanje održivosti *L. plantarum* L24 - 2 i *L. lactis* N 237 može se smatrati zadovoljavajućim kriterijumom za pred-izbor potencijalnih probiotskih sojeva.

Tolerancija ispitivanih mikroorganizama na delovanje žučnih soli

Promene u opstanku kultura *L. plantarum* L24 - 2 i *L. lactis* N 237 nisu bile značajne ($P < 0.05$) kada su se koncentracije žučnih soli kretale u rasponu od 0.2 % - 0.4 %. Pri neutralnoj pH vrednosti, za vreme od 4.5 časa u prisustvu 2.0 % žučnih soli ispitivani sojevi zadržavaju visoku koncentraciju životno sposobnih ćelija.

Tabela 3 Procena Održivost *L. plantarum* L24 -2, *L. lactis* biovar *diacetylactis* N 237 i *Micrococcus* sp. u odnosu na različite koncentracije žučnih soli: 0.2 %, 0.3 %, 0.4 %, 2.0%.

Table 3 Assessing Sustainability *L. plantarum* L24-2, *L. lactis* biovar *diacetylactis* N 237 and *Micrococcus* sp. in relation to different concentrations of bile salts: 0.2% 0.3% 0.4% 2.0%.

Uzorak	<i>L. plantarum</i> L24-2		<i>L. lactis</i> N 237		<i>Micrococcus</i> sp.	
	ΔA_{560}	S, log cfu/mL -1	ΔA_{560}	S, log cfu/mL -1	ΔA_{560}	S, log cfu/mL -1
Kontrola, pH 6.5	0.144	8.85	0.600	8.81	0.101	8.24
0.2 %	0.137	8.52	0.350	8.45	0.055	7.41
0.3 %	0.125	8.84	0.275	8.70	0.036	6.95
0.4 %	0.106	8.74	0.262	8.80	0.015	6.87
2.0 %	0.059	7.30	0.078	8.00	0.002	4.65

Rezultati su izraženi kao razlika apsorpcije na 560 nm u roku od 4.5 sata, na osnovu tri nezavisna merenja i evaluaciji stope preživljavanja (S) mikrobnih vrsta određivanjem ukupnog broja bakterija prilikom zasejavanja izvršenih posle 4.5 časa nakon vremena

ispitivanja. Bakterije mlečne kiseline su se pokazale kao otporne, verovatno kao rezultat njihove hidrolazne aktivnosti prema žučnim solima. Iz dobijenih rezultata za ispitivani soj *Micrococcus sp.* primećuje se visok stepen osetljivosti nakon 4.5 časa kultivacije u sredini sa žučnim solima, a na višim koncentracijama (2 %), primećena je značajna redukcija prezivljavanja mikrobnih ćelija. Iako je primetno smanjenje mikrokoka u oglednim uzorcima u odnosu na kontrolne uzorke gde su primenjene koncentracije žučnih soli slične ili neznatno veće od fizioloških, primećuje se očuvanje životno sposobnih ćelija. Kada se uporede rezultati ovih ispitivanja tolerancije koji simuliraju uslove u različitim delovima gastrointestinalnog trakta, utvrđeno je da je izlaganje ispitivanih sojeva bakterija dejstvu žučnih soli imalo značajno slabije destruktivno delovanje u poređenju sa dejstvom niskih pH vrednosti.

Zaključak

Analiza rezultata dobijenih u modelnoj sredini sličnoj mesnoj masi sirovih kobasica na sposobnost rasta sojeva *L. plantarum L24 - 2*, *L. lactis biovar diacetilactis N 237* i *Micrococcus sp.* pokazuju da oni mogu da rastu i umnožavaju se dobro, pod različitim temperaturnim uslovima korišćenim u procesu proizvodnje. Ispitivani sojevi pokazuju sposobnost preživljavanja u uslovima visoke koncentracije žučnih soli (2.0%) i niskih pH vrednosti (2.0).

Literatura

- Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamanaka H., Akomoto M., Kanai S., Miki T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* Group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science* 63 (3), 544-547.
- Aymerich M.T., Garriga M., Monfort J.M., Nes I., Hugas, M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocin. *Food Microbiology* 17, 33-45.
- Campanini M., Pedrazzoni I., Barbuti S., Baldini P. (1993). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic acid bacteria starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 20, 169-175.
- Erkkila S., Suihko M.L., Eerola S., Petäjä E., Mattila-Sandhoim T. (2001). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology* 64, 205-210.
- Gotcheva V., Hristizova E., Hristozova T., Guo M., Roshkova Z., Angelov A. (2002). Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnology* 16(3), 211-225.
- Hugas M., Monfort J.M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59(5), 47-554.
- Klingberg T.D., Axelsson L., Naterstad K., Elsser D., Budde B.B. (2006). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 105, 419-431.
- Leroy F., Verluyten J, De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for

- improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106(3), 270-28.
- Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80, Suppl. 1: S147-171.
- Toldra F. (2006). Biochemistry of fermented meat. In *Food biochemistry and food processing*. Eds. Y.H. Hui, W.K.K. Nip, M.L. Nollet, G. Paliyath and B.K. Simpson. 641-658. Ames, IA: Blackwell Publishing.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOME *LAB* AND *MICROCOCCUS* STRAIN IN MEAT MODEL SYSTEM

*K. Valkova-Jorgova*¹, *K. Danov*¹, *D. Gradinarska*¹, *A. Kuzelov*², *N. Taskov*², *D. Saneva*²

Abstract

In this study we investigated the potential probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* L 24 - 2, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* N 237 and strain *Micrococcus* sp. It has been found that microbial species exhibited the ability to survive under conditions of high concentrations of bile salts (2.0%) and low pH (2.0). This ability varies for different types, but they will remain until the end of experiments *zivotosposobne*. This, together with the antimicrobial activity *projavljenoj* them makes them suitable for the new composition *uklucivane* the starter culture, which can be effectively used as an antimicrobial barrier to the development of pathogenic bacteria in the manufacture of a crude - product of dried meat.

Keywords: lactic acid bacteria micrococci, starter cultures, antimicrobial activity, raw material - dried meat products

¹University of Food Technologies in Plovdiv, Bulevar Marica 13, Plovdiv, Bulgaria (katia_jorgova@yahoo.com)

²University Goce Delchev, Ul. Krste Misirkov Bb Stip R. Macedonia (aco.kuzelov@ugd.edu.mk)