

AUTOHTONA MIKROBIOTA SJENIČKE OVČIJE STELJE

Tanja Žugić Petrović¹, Predrag Ilić¹, Mirjana Muruzović²,
Katarina Mladenović², Ljiljana Čomić²

Suva ovčija stelja je tradicionalni proizvod Zapadnog Balkana. Proizvodi se sušenjem specijalno obrađenih trupova celih ovaca koji se kratko dime na hladnom dima i spontano fermentišu. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispitataju fizičko-hemijske karakteristike i izoluju Bakterije mlečne kiseline (BMK) i koagulaza negativne stafilokoke (KNS) iz proizvoda. U tom cilju uzeto je 9 uzoraka iz tri domaćinstva. Izolovane BMK su identifikovane kao *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* i *Enterococcus faecium*. KNS su identifikovane kao *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus carnosus*. BMK i KNS igraju ključnu ulogu u definisanju kvaliteta proizvoda.

Ključne reči: Bakterije mlečne kiseline, koagulaza negativne stafilokoke, ovčija stelja

Uvod

Na zapadnom Balkanu se proizvodi suvo ovčije meso, nazvano Pastrma ili Stelja (u turskom pastyrma ili bastyrma) (Stamenković i Dević, 2006). Pri izradi stelje koriste se celi trupovi autohtone rase ovaca Sjenička pramenka starosti od 1 do 5 godina (Stojković i sar., 2015). Tokom proizvodnog procesa sve kosti sa trupa se uklanjaju, jedino se na butovima ostavljaju distalni delovi kosti kolenice u dužini od 5 cm zajedno sa ahilovom tetivom, a na plečkama se ostavljaju distalni delovi kosti podlaktice, takođe u dužini 5 cm. Tetive i delovi pomenutih kostiju služe za vešanje trupova za vreme dimljenja, sušenja i skladištenja. Sa butova se odvaja unutrašnji deo (šol) koji se koristi za proizvodnju ovčije pršute. (Stamenković i Dević, 2006). Zrenje i fermentacija proizvoda nije dirigovana i dešava se pod uticajem autohtone mikrobiote koja se razvija u proizvodu tokom tehnološkog procesa proizvodnje. Bakterije mlečne kiseline (BMK) i Gram-pozitivne katalaza-pozitivne koke (KNS) su dve grupe bakterija koje su poznate kao tehnološki važne u fermentaciji i sušenju proizvoda od mesa (Aymerich i sar., 2003). BMK utiču na acidifikaciju proizvoda, akumulacijom mlečne kiseline do nivoa koji inhibira patogene bakterije (Lücke, 2000). BMK takođe omogućavaju degradaciju proteina i lipida čime se smanjuje vezivanje vode, dehidracija i olakšava sušenja proizvoda (Hammes i sar., 2008). *Staphylococcus* vrste su veoma važne u izgradnji organoleptičkih karakteristika proizvoda, utiču na razgradnju peroksida, i

¹Visoka poljoprivredno-prehrambena škola strukovnih studija, Ćirila i Metodija 1, 18400 Prokuplje, Srbija (tanja.zugicpetrovic@yahoo.com);

²Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, 3400 Kragujevac, Srbija;

formiranju arome proizvoda usled proteolitičke i lipolitičke aktivnosti (Comi i sar., 2005; Talon i sar., 2007).

U literaturi nema publikovanih radova o izolaciji i identifikaciji autohtone mikrobiote sjeničke ovčije stelje. Stoga je cilj ove studije bio izolacija i identifikacija mikrobiote i fizičko-hemijska analiza uzoraka sjeničke ovčije stelje.

Materijal i metod rada

Ukupno 9 uzoraka sjeničke ovčije stelje su uzeta od 3 proizvođača (A,B,C) sa teritorije Sjenice u 2017-toj godini (po 3 uzorka od svakog proizvođača). Uzorkovani materijal je proizveden tradicionalnim načinom u identičnim mikroklimatskim uslovima i od autohtone vrsta životinja Sjeničko-peštarska Pramenka.

Fizičko-hemijska analiza

Određivanje pH vrednosti ovčije stelje vršeno je pomoću pH metra (Testo 205; Lenzkirh, Germany). Određivanje a_w vrednosti proizvoda sprovedeno je pomoću mobilnog uređaja LabSwift – aw (Novasina, Lachen, Switzerland).

Brojnost mikroorganizama

Za mikrobiološku analizu, uzorci ovčije stelje (10 g) su aseptično preneti u 90 ml sterilnog (sterilizacija tokom 20 minuta na 121°C) fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona (NaCl 0.8 g / l i 1 g peptona / l) i mešani su 15 minuta. Broj mikroorganizama određen je indirektnom metodom sukcesivnog razblaženja koja se sastoji u pravljenu razblaženja i prenošenju odgovarajućih razblaženja na čvrste podloge. Broj BMK određen je na pločama sa De Man, Rogosa, Sharpe, Agar (MRS, Torlak, Beograd, Srbija) koje su, nakon nanošenja 1 ml razblaženja i očvršćavanja, nalivene dodatnim slojem podloge kako bi se postigli mikroaerofilni uslovi. Broj KNS određen je brojanjem izraslih kolonija nakon inkubacije na pločama sa Mannitol Salt Phenol-Red Agar (MSA, Torlak, Beograd, Srbija) nakon 48 sati na 30°C.

Identifikacija izolata

Dvadeset pet kolonija iz svakog uzorka sjeničke ovčije stelje je slučajno izabrano iz MRS agarnih ploča. Kolonije su zatim prenete u MRS bujon. Nakon inkubacije kulture iz bujona prenete su na Petri ploče i izvršeno je trostruko prečišćavanje izolata sukcesivnim prenošenjem pojedinačnih kolonija na nove Petri ploče sa MRS agarom. Preliminarna karakterizacija izolata rađena je bojenjem ćelija po Gramu, kao i ispitivanjem sposobnosti sinteze katalaze nakapavanjem 30% H₂O₂ na razmaz čiste kulture na staklenoj predmetnici. Svi izolati koji su bili Gram pozitivni i katalaza-negativni su podvrgnuti daljem ispitivanju. Proizvodnja gasa iz glukoze, hidroliza arginina, rast na eskulin žučnom agaru, rast na 15 i 45°C i rast u prisustvu 4%, 6,5% i 8% NaCl. Identifikacija fermentacijom šećera određen je pomoću API 50 CHL (BioMerieux, SA, Francuska). Za identifikaciju KNS

odabrano je slučajno dvadeset kolonija iz svakog uzorka iz brojnih MSA ploča, a zatim su izolati prečišćeni u Tryptone Soya agaru (TSA, Torlak, Beograd, Srbija) i Tryptone Soya bujonu (TSB, Torlak, Beograd, Srbija). Čiste kulture su okarakterisane pomoću Gram reakcije, proizvodnje katalaze i morfologije ćelija. Izolati su testirani na aktivnost anaerobne koagulaze rasta (BD BBLTM koagulaza plazma, Rabbit sa EDTA, Rockville, MD, USA), aktivnost nitrata reduktaze, proteolitička aktivnost, lipolitička aktivnost, aktivnost ureaze i arginin hidroliza, osetljivost na novobiocin.

Statistička analiza

Statistička analiza je sprovedena u programu SPSS 11.0 Bivariate Correlation Analysis (Chicago, Illinois, USA). Primenjena je analiza varijanse (Duncan test).

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati mikrobioloških i fizičko-hemijskih analiza su predstavljani u Tabela 1. Iz tabele možemo zaključiti da ne postoje statistički značajne razlike u pogledu broja mlečno kiselih bakterija stafilokoka, pH i aw vrednosti između uzoraka ovčije stelje uzetih od različitih proizvođača. Rezultati takođe ukazuju na ujednačenost tehnološkog procesa proizvodnje sjeničke ovčije stelje, pri čemu imamo dominaciju BMK u spontanoj fermentaciji proizvoda.

Tabela 1. Rezultati mikrobiološke i fizičko-hemijske analize uzoraka sjeničke ovčije stelje

Table 1. Results of microbiological and physicochemical analysis of dry-cured sheep ham samples.

Proizvođači <i>Manufacturers</i>	n	Bakterije mlečne kiseline <i>Lactic acid bacteria</i> (cfu/g)	Staphylococcus (cfu/g)	pH	aw
A	3	8.44±0.13*	4.43±0.11*	5.43±0.19*	0.80±0.04*
B	3	8.53±0.27*	4.49±0.27*	5.47±0.04*	0.81±0.01*
C	3	8.39±0.07*	4.50±0.95*	5.41±0.09*	0.80±0.05*

Nema statistički značajne razlike u kontrolisanim parametrima ($P > 0,05$), srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Papamanoli i sar. (2002) u svom radu ističu da *Lactobacillus curvatus* često predstavlja polovinu ili dve trećine BMK mikrobiote fermentisanog mesa, dok *Lactobacillus sakei* predstavlja do četvrtinu izolovanih BMK. *Lactobacillus* vrste su takođe dominantne u fermentisanim kobasicama, kod nekih blago zakiseljenih kobasica iz južne Evrope. Pored *Lactobacillus* vrste mogu biti izolovane i *Enterococcus* vrste, koje su odgovorni za fermentaciju proizvoda (Lebert i sar., 2007; Martin i sar., 2005). Od ukupno 192 izolata BMK u ovčijoj stelji su identifikovane tri vrste (Tabela 2.). Identifikovano je 66.14% izolata kao *L. curvatus*, 22.91% je identifikovano kao *L. sakei* i 10.9% *En. faecim*. Izolati koji su bili homofermentativni laktobacili, bez hidrolitičke reakcije na arginin i eskulin. Lipolitički, proteolitički i test sinteze EPS su bili negativni,

a morfologija i oblici kolonija su dali identifikaciju koja je bila najbližnja *L. curvatus* i *L. sakei* vrsti. Dalja identifikacija je potvrđena API sistemom kao *L. curvatus* i *L. sakei*. Izolati koji su uspešno rasli u temperaturnom opsegu od 15 i 45°C i u uslovima sa 4, 6.5 i 8% NaCl, koji su pokazali hidrolizu arginina kao i sintezu egzopolisaharida, karakterisala je pojava crnih kolonija na žučnom eskulinskom agaru je identifikovano kao *Enterococcus* sp. Identifikacija je potvrđena API sistemom kao *En. faecim*.

BMK u ispitivanim uzorcima sjeničke ovčije stelje su odgovorne za formiranje mlečne kiseline i igraju ključnu ulogu u sazrevanju ovog mesnog proizvoda. Dincer i Kivanc (2012) istražujući Tursku pastrmu su izolovali i identifikovali mikrobiotu koju su činili *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei*, *En. faecium* i *Pediococcus acidilactici*. Lücke (2000) je ukazao da je u tradicionalnim kobasicama koje su fermentisale na temperaturama od 20 do 22°C, *L. sakei* i *L. curvatus* su najčešće izolovani mikroorganizmi, dok je veći broj *L. plantarum* zabeležen na temperaturama sazrevanja većim od 25°C.

Tabela 2. Procenat pojedinačnih tipova BMK izolovanih iz stelje
Table 2. Percentage of individual types of LAB isolated from stelja

Proizvođači Manufacturers				
	A	B	C	Ukupno (%) Total
<i>L. curvatus</i>	33	41	53	66.14%
<i>L. sakei</i>	22	15	7	22.91%
<i>En. faecim</i>	5	7	9	10.9%
Ukupno Total	60	63	69	100%

KNS u fermentisanim proizvodima od mesa proizvode širok spektar isparljivih komponenti arome, koje nastaju degradacijom aminokiselina, i odgovorne su za formiranje senzornih svojstva. Od ukupnog broja izolovanih KNS (95) sjeničke ovčije stelje, 42.75% je identifikovano kao *S. xylosum*, 25.2% *S. saprophyticum*, 5.6% *S. equorum* i 2.4% kao *S. Carnosus* (Tabela 3).

Tabela 3. Procenat pojedinačnih tipova KNS izolovanih iz stelje
Table 3. Percentage of individual types of CNS isolated from stelja

Manufacturers				
	A	B	C	Ukupno (%) Total
<i>S. xylosum</i>	21	11	13	42.75%
<i>S. saprophyticum</i>	9	10	5	25.2%
<i>S. equorum</i>	4	6	7	5.6%
<i>S. carnosus</i>	2	2	5	2.4
Ukupno Total	36	29	30	100%

Odabrani sojevi su bili Gram pozitivni i koagulaza negativni. *S. xylosum*, *S. saprophyticum* i *S. equorum* su pokazali rezistenciju na novobiocin, dok je *S. carnosus* bio osjetljiv na pomenuti antibiotik. Lipolitičku i proteolitičku aktivnost su pokazali *S. carnosus* i *S. equorum*. Dok je *S. carnosus* je pokazao pozitivne rezultate na ureazu. Amonijak iz arginina proizveli su izolati identifikovani kao *S. xylosum*. Rezultate koje smo dobili istražujući sjeničku ovčiju stelju su u skladu sa rezultatima drugih autora za slične proizvode. Papamanoli i sar. (2002) u tradicionalnim grčkim kobasicama su izolovali i identifikovali mikrobiotu koju su činile *S. saprophyticum* i *S. carnosus*. *S. xylosum* je dominantna vrsta i u mnogim italijanskim i španskim kobasicama (Cocolin i sar., 2001; Rossi i sar., 2001).

Zaključak

Ovčija stelja je fermentisani mesni proizvod za čiji kvalitet i organoleptička svojstva su odgovorni mikroorganizmi. U tradicionalnoj proizvodnji sjeničke ovčije stelje, mikroorganizmi potiču od sirovina i okruženja u kojem se proizvodi izrađuju. Od ukupno 192 izolata BMK u ovčijoj stelji je identifikovano 66.14% kao *L. curvatus*, 22.91% je identifikovano kao *L. sakei* i 10.9% je identifikovano kao *En. faecium*. Od izolovanih i identifikovanih KNS, 42.75% je identifikovano kao *S. xylosum*, 25.2% *S. saprophyticum*, 5.6% *S. equorum* i 2.4% kao *S. carnosus*. Dakle, proces fermentacije ovčije stelje nije kontrolisan, pa se u ovom slučaju radi isključivo o divljim sojevima mikroorganizama koji čine mikrobiotu proizvoda.

Literatura

- Aymerich T., Martin B., Garriga M., Hugas M. (2003). Microbial quality and Direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl Environ Microbiology*. 69(8):4583–94.
- Cocolin L., Manzano M., Aggio D., Cantoni C., Comi G. (2001). A novel polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science*. 57:59–64.
- Comi G., Urso R., Iacumin L., Rantsiou K., Cattaneo P., Cantoni C., Cocolin L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*. 69:381–92.
- Dincer E., Kivanc M. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from Turkish Pastirma. *Annals of Microbiology*. 62:1155–1163.
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M, Köster O, Egli T. (2008). Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*. 42: 269-277.
- Lebert I., Leroy S., Talon R. (2007). Microorganisms in traditional fermented meats – Chapter 11. In F. Toldra Y. H. Hui I. Astiasaran W. K. Nip J. G. Sebranek E.

- T. F. Silveira L. H. Stahnke R. Talon (Eds.). Handbook of fermented meat and poultry (pp. 113–1124). Blackwell publishing.
- Lücke KF. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 56:105–15.
- Martin B., Garriga M., Hugas M., Bover-Cid S., Veciana-Nogues MT., Aymerich T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of gram-positive catalasepositive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 107:148–58.
- Papamanoli E., Kotzekidou P., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2002). Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology*. 19:441–9.
- Rossi F., Tofalo R., Torriani S., Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosum* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 365–371.
- Stamenković T., Dević B. (2006): Senzorska svojstva ovčije stelje. *Tehnologija mesa*. 47: 115–122.
- Stojković S., Grabež V., Bjelanović M., Mandić S., Vučić G., Martinović A., Thauland Håseth T., Velemir A., Egelanddal B. (2015): Production process and quality of two different dry-cured sheep hams from Western Balkan countries. *Food Science and Technology*. 64: 1217–1224
- Talon R., Leroy S., Lebert I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*. 77:55–62.

AUTOCHTHONE MICROBIOTA FROM DRY-CURED SHEEP HAM

Tanja Žugić Petrović¹, Predrag Ilić¹, Mirjana Muruzović²,
Katarina Mladenović², Ljiljana Čomić²

Abstract

Dry-cured sheep ham is traditional products of the Western Balkans. It is produced by drying specially processed carcasses of whole sheep that are smoked in cold smoke and spontaneously fermented. The aim of this research was to investigate physicochemical properties and isolate lactic acid bacteria (LAB) and coagulase negative staphylococci (CNS) from the product. To this end, 9 samples of dry-cured sheep ham from three households were taken. Isolated LABs were identified as *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus faecium*. CNS were identified as *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus carnosus*. LAB and CNS play a key role in defining the quality of the product.

Key words: Lactic acid bacteria, coagulase negative staphylococci, dry-cured sheep ham,

¹College of Agriculture and Food Technology, Ćirila i Metodija 1, 18400 Prokuplje, Serbia (tanja.zugicpetrovic@yahoo.com);

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 3400 Kragujevac, Serbia;