

## ANTILISTERIJSKI EFEKAT DODATOG *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* TOKOM PROIZVODNJE MEKOG BELOG SIRA

Slavica Vesković Moračanin<sup>1</sup>, Dragutin Đukić<sup>2</sup>, Pavle Mašković<sup>2</sup>,  
Vladimir Kurćubić<sup>2</sup>, Leka Mandić<sup>2</sup>, Miloš Veličić<sup>2</sup>

**Izvod:** U radu su ispitivani sojevi bakterija mlečne kiseline izdvojeni iz zlatarskog sira, koji je proizveden u skladu sa načelima tradicionalne proizvodnje. Primenom klasičnih mikrobioloških testova izolovano je 96 sojeva bakterija mlečne kiseline, koje su zatim podvrgnute molekularno genetskim ispitivanjima. Jedan od izolata, koji je označen kao *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ispoljio je u laboratorijskim uslovima izražen antilisterijski efekat. Na bazi tih rezultata vršena su dalja istraživanja radi utvrđivanja njegovog potencijalnog antilisterijskog efekta tokom proizvodnje mekog belog sira. Tokom procesa fermentacije sira, koji je trajao 21 dan, u oglednoj grupi sira u koju je inokulisana *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 zajedno sa kulturom *Lc. lactis* ssp. *lactis* došlo je do redukcija broja ćelija listerije u siru (za 3-4 log), što se može smatrati značajnim potencijalom biološke zaštite u njegovoj proizvodnji.

**Ključne reči:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, antilisterijski efekat, meki beli sir.

### Uvod

Zbog veoma složenog hemijskog i nutritivnog sastava, sir spada u grupu lako kvarljivih namirnica, pogodnih za razvoj kako mikroorganizama kvara, tako i patogenih mikroorganizama koji se prenose hranom. Generalno, proizvodi od mleka, prvenstveno meki beli sirevi, naročito su pogodni za rast i razmnožavanje *Listeria monocytogenes* (Bille i sar., 2006), koja se smatra jednom od najznačajnijih uzročnika bolesti koje se prenose hranom (*foodborne diseases*).

*L. monocytogenes* je ubikvitarni mikroorganizam, koji je široko rasprostranjen i relativno otporan. Izolovana je iz različitih sredina (zemljište, voda, razne vrste namirnica biljnog i animalnog porekla, životinje, ljudi) (Chao i sar., 2006; EFSA, 2013; Chen i sar., 2014). Njeno prisustvo u hrani posledica je, najčešće, postprocesne kontaminacije usled manipulacije hranom i kontakta sa kontaminiranim površinama ili drugom hranom iz skladišnog prostora (Lunden i sar., 2003).

Zlatarski sir je jedan od tipičnih predstavnika tradicionalnih mekih belih sireva u salamuri (Vesković Moračanin i sar., 2012). Njegova autentičnost je bazirana na prisustvu i raznolikosti velikog broja različitih vrsta autohtonih mikroorganizama, prvenstveno bakterija mlečne kiseline (BMK), koje su odgovorne za nastanak proizvoda sa karakterističnim senzorskim svojstvima (Vesković Moračanin i sar., 2013).

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su nosioci mlečnokiselinske fermentacije, procesa zrenja, formiranja konačnog ukusa i nutritivnih karakteristika fermentisanog proizvoda, sa direktnim uticajem na održivost gotovog proizvoda (Holzapfel i sar., 1995; Leroy i De

<sup>1</sup> Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Srbija;

<sup>2</sup> Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija (lekamg@kg.ac.rs).

Vuyst, 2014). Zbog pozitivnog metaboličkog i antimikrobnog efekta (naročito značajnim se smatra produkcija specifičnih antibakterijskih jedinjenja - bakteriocina), BMK su označene kao „zdravstveno bezbedna mikroflora“ (Tagg i sar., 1976; Stiles, 1994; Caplice i Fitzgerald, 1999). Antibakterijski spektar BMK i njihovih metabolita, bakteriocina, najčešće se vezuje za Gram-pozitivne mikroorganizme kvara i patogene bakterije poreklom iz hrane, među kojima je najznačajnije antilisterijsko dejstvo (Drosinos i sar., 2006).

Jedan od izolata BMK, poreklom iz zlatarskog sira, koji je označen kao *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ispoljio je u laboratorijskim uslovima izražen antilisterijski efekat. Na bazi tih rezultata vršena su dalja istraživanja radi utvrđivanja njegovog potencijalnog antilisterijskog efekta tokom proizvodnje mekog belog sira.

### Materijal i metod rada

**Mikroorganizmi i uslovi rasta.** Izolacija i determinacija vrsta BMK izvršena je iz uzoraka zlatarskog sira koji su imali pozitivno ocenjena senzorska svojstva. Primenom klasičnih mikrobioloških metoda (Sharpe, 1979; Schillinger i Lucke, 1989; Vesković Moračanin i sar., 2013) dobijeni su izolati BMK, koji su tokom daljih istraživanja podvrgnuti postupcima sekvenciranja radi pouzdanog određivanja pripadnosti vrste.

U radu je korišćen izolat BMK označen, nakon sekvenciranja, kao *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, radi određivanja potencijalnog antilisterijskog dejstva tokom procesa proizvodnje mekog belog sira u salamuri. Izolat je do početka oglada čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$  u GM17 bujonu (M17 bujon, Merck, Nemačka sa 0.5% (w/v) glukoze) sa 20% glicerola.

*Listeria monocytogenes* ATCC 19111 aktivirana je sa BHI agara (HiMedia, Indija) u BHI bujon (HiMedia, Indija) i preko noći inkubirana (18 časova) na  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga, revitalizovane ćelije *L. monocytogenes* su centrifugovane, a potom su suspendovane u puferizovanu peptonsku vodu (Merck, Nemačka). Finalna koncentracija *L. monocytogenes* koja je dodata u sir bila je oko  $10^4$  cfu/g.

**Određivanje spektra antimikrobne aktivnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.** Utvrđivanje potencijalne antimikrobne aktivnosti *Lc. lactis* ssp. *lactis* vršeno je metodom agar-difuzije ("agar well-diffusion" metod) (Schillinger i Lücke, 1989).

Pored antilisterijske, ispitivana je i potencijalna antimikrobna aktivnost *Lc. lactis* ssp. *lactis* u odnosu na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Escherichia coli* ATCC 11303.

**Proizvodnja sira i procedura uzorkovanja.** Kravlje sirovo mleko je termički obrađeno (5 minuta na temperaturi iznad  $90^{\circ}\text{C}$ ), a potom ohlađeno do  $30^{\circ}\text{C}$ , što predstavlja optimalnu temperaturu za postupak podsiravanja. Podsiravanje je vršeno na tradicionalni način upotrebom komercijalnog sirila - "Maja" (Čačak, Srbija) jačine 1:5000, u količini cca 1.5-2 mL/L. Odmah nakon potsiravanja, pre nego što se stvari grušu, izvršena je podela na tri jednaka zapreminska dela:

- i) prvi deo predstavljao je kontrolnu grupu oglada (K - grupa),
- ii) drugi deo je inokulisan sa *L. monocytogenes* (cca.  $10^4$  ćelija/mL) i označen je kao O-1 grupa i
- iii) treći deo predstavlja drugu oglednu grupu u koju je inokulisana *L. monocytogenes* (cca  $10^4$  ćelija/mL) i *Lc. lactis* ssp. *lactis* (cca  $10^6$  ćelija/mL) i označen je kao O-2 grupa.

Zbog specifičnosti dodatog patogena ceo ogled je izveden uz posebne mere opreza. Uzorci za laboratorijska ispitivanja su uzimani 0., 2., 4., 7., 14. i 21. dana. Ogled je ponovljen tri puta.

**Mikrobiološke analize.** Utvrđivanje prisustva *L. monocytogenes* vršeno je u skladu sa procedurama ISO 11290-1,2 (11290-1,2, 2004).

**Statistička analiza.** Dobijeni rezultati obrađeni su primenom statističkih metoda sa ciljem da se utvrde mere centralne tendencije (aritmetička srednja vrednost), mere varijacije ili disperzije (standardna devijacija, SD). U radu je korišćen statistički paket program „Statistica for Windows“ (StatSoft. Inc., USA).

## Rezultati istraživanja i diskusija

### **Osnovna i molekularno genetska identifikacija BMK izolata.**

Kao rezultat osnovnih mikrobioloških testova opisano je 96 izolata BMK. Utvrđeno je dominantno prisustvo loptastih oblika (83) BMK i 13 štapičastih predstavnika: 46 pripadnika roda *Lactococcus*, 34 pripadnika roda *Enterococcus*, 13 izolata označeni pripadnici roda *Lactobacillus*. Samo 3 izolata je identifikovano kao *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

Klasični mikrobiološki testovi poslužili su za dobru identifikaciju bakterija do nivoa roda; međutim, pouzdana identifikacija BMK vrsta moguća je jedino primenom molekularno genetskih ispitivanja (Vesković Moračanin i sar., 2013a), i to onih koji podrazumevaju sekvenciranje gena odgovornog za sintezu 16S ribozomalne rRNA (Coppola i sar., 2001).

Primenom navedene molekularne metode određena je tačna pripadnost ispitivanih izolata BMK rodu i vrsti, i to: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* - 38 sojeva, *Enterococcus faecalis* - 32 soja, *Lactobacillus plantarum* - 11 sojeva, *Leuconostoc mesenteroides* - 3 soja, *Lactobacillus sakei* - 3 soja, *Lactobacillus garvieae* – 3 soja, *Enterococcus faecium* - 3 soja, *Staphylococcus hominis* – jedan soj i jedan soj je označen kao „nekultivisan“.

Dobijeni rezultati identifikacije sojeva BMK ukazuju na to da se i ova mikrobna zajednica zlatarskog sira može podeliti u dve aktivne metaboličke grupe BMK: neke vrste učestvuju u procesu fermentacije (starterne BMK), dok su neke druge vrste odgovorne za proces zrenja sira (nesterarne BMK, NSBMK) (Beresford i sar., 2001; Settanni i Moschetti, 2010). U prvom slučaju, starterne BMK brzo fermentišu laktozu proizvodeći visoke koncentracije mlečne kiseline (ova grupa uglavnom uključuje mezofilne vrste BMK - *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc* spp., kao i termofilne vrste - *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus helveticus* (Fox i sar., 2004). NSBMK je termin koji se koristi da bi se opisala sporedna bakterijska zajednica sposobna da raste pod selektivnim uslovima zrenja sira. Ove bakterije se mogu naći kao rezultat sastava mleka, ili kao posledica post-pasterizacijske kontaminacija iz sirarske opreme ili okolne sredine (McSweeney i sar., 1993). Nalaze se, uglavnom, u tradicionalnim sirevima koji su proizvedeni u specifičnim ekološkim nišama (Gobbetti i sar., 2002; Coeuret i sar., 2004; Settanni i Moschetti, 2010).

Ispitivanja su pokazala da su NSLAB od suštinskog značaja za razvoj ukusa, mirisa i ostalih organoleptičkih svojstava tradicionalnih sireva. Veruje se da su razlike u senzorskim svojstvima sireva uslovljene prisustvom različitih vrsta NSLAB koje su karakteristične za svaki region gde se sir proizvodi (McSweeney i sar., 1993). Zbog svega toga, danas je povećan interes za razvoj specifičnih starternih mikroorganizama sačinjenih od prirodnih izolata BMK čijom primenom bi se omogućila bolja kontrola procesa proizvodnje i nastanak proizvoda ujednačenog kvaliteta (Beresford i Williams,

2004). Primena NSBMK našla bi svoj značaj u polu-industrijskim i industrijskim uslovima proizvodnje tradicionalnih sireva. Zbog svega toga izolacija i optimizacija divljih sojeva BMK, radi njihove primene kao deo starter kultura u proizvodnji sira, danas je veoma značajna oblast istraživanja u biotehnologiji hrane.

**Antilisterijski efekat dodatog *Lc. lactis* spp. *lactis*.**

U odnosu na izabrane test mikroorganizme izolat *Lc. lactis* spp. *lactis* pokazuje izraženu antibakterijsku aktivnost u odnosu na *L. monocytogenes*, dok je dejstvo na *S. aureus* i *E. coli* izostalo. U prilog ovim rezultatima govore i nalazi drugih autora (Schilinger, 1990; Abbe, 1995; Vesković Moračanin i sar., 2013) koji ukazuju na činjenicu da je inhibitorna aktivnost bakteriocina BMK dominantna, uglavnom, na Gram pozitivne bakterije.

*L. monocytogenes* nije utvrđena ni u jednom uzorku sira koji je pripadao kontrolnoj grupi (K) u svim fazama ispitivanja (0., 2., 4., 7., 14. i 21. dan) tokom tri puna ponovljena ogleđna ciklusa. Stoga, rezultati ove grupe nisu prikazani.

Promene broja *L. monocytogenes* u ispitivanim ogleđnim grupama (O-1 i O-2) prikazani su u tabeli 1 i dijagramu 1.

Табела 1. Ukupan broj bakterija (log CFU/g ± SD)\* *Listeria monocytogenes* u uzorcima ogleđnih grupa O-1 i O-2 mekog belog sira tokom fermentacije  
 Table 2. The total viable count (log CFU/g ± SD)\* of *Listeria monocytogenes* in samples of experimental groups O-1 and O-2 soft white cheese during fermentation

Dani Days	Ogleđ O-1 Experimental group O-1	Ogleđ O-2 Experimental group O-2
0.	4.19 <sup>bc</sup> ± 0.19	4.58 <sup>a</sup> ± 0.11
2.	4.38 <sup>b</sup> ± 0.08	3.81 <sup>bc</sup> ± 0.03
4.	5.35 <sup>a</sup> ± 0.35	2.54 <sup>de</sup> ± 0.24
7.	4.24 <sup>bc</sup> ± 0.23	1.75 <sup>ef</sup> ± 0.28
14.	4.14 <sup>bc</sup> ± 0.24	1.10 <sup>f</sup> ± 0.10
21.	4.29 <sup>bc</sup> ± 0.33	0.75 <sup>f</sup> ± 0.05

\*svaki rezultat je izražen kao srednja vrednost merenja iz tri uzorka ± standardna devijacija (S.D.);

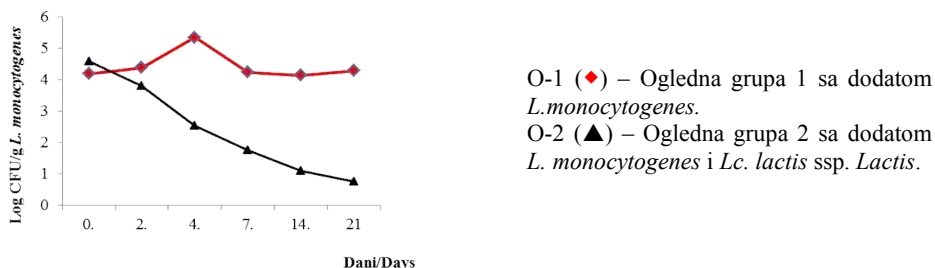
CFU – broj jedinica (živih mikroorganizama) koje formiraju kolonije;

Vrednosti obeležene različitim slovima u koloni pokazuju signifikantnu razliku (P≥0.05) prema LSD testu.

Rezultati promene broja *L. monocytogenes*, tokom perioda zrenja sira, ukazuju da se u ogleđnoj grupi O-1 ovaj patogen održava u visokoj koncentraciji, koja je 21. dana zrenja bila približna inicijalnoj kontaminaciji (cca 10<sup>4</sup> CFU/g). Maksimalni broj ćelija listerije je utvrđen 4. dana ispitivanja.

U ogleđnoj grupi sira sa dodatom laktokokom (O-2), na kraju perioda zrenja sira, utvrđen je statistički značajan stepen redukcije broja *L. monocytogenes* (P≥0.05). Od početne koncentracije (cca 10<sup>4</sup> CFU/g), na kraju procesa zrenja sira, broj ovog patogena je redukovan ispod 100 CFU/g (group O-2). Utvrđeni antilisterijski efekat dodatih ćelija *Lc. lactis* ssp. *lactis*, uprkos mogućim inaktivacijama od strane komponenata hrane,

predstavlja veoma značajan bioprotektivni rezultat (Ennahar i sar.,1998; Izquierdo i sar., 2009).



Dijagram 1. Rast *L. monocytogenes* ATCC 19111 u uzorcima mekog belog siratokom fermentacije

Fig 1. Growth of *L. monocytogenes* ATCC 19111 in the samples of soft white cheese during fermentation

Antilisterijski efekat (redukcija broja ćelija listerije u siru je bila za 3-4 log) dodate bakteriocin-produkujuće *Lc. lactis* spp. *lactis* predstavlja značajan potencijal biološke zaštite u proizvodnji sira, o čemu svedoče rezultati istraživanja brojnih autora (Ross i sar., 2000; Rodríguez i sar., 2005; Šviráková, 2009). Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju na mogućnost upotrebe laktokoka u proizvodnji sira, i to kao deo mezofilnih starter kultura kao deo biološkog sistema efikasne kontrole pojave i rasta listerija. Ispoljeno antilisterijsko dejstvo laktokoka rezultat je njihove biohemijske aktivnosti, prvenstveno stvorene mlečne kiseline i antimikrobnih metabolita - bakteriocina, od kojih je najznačajniji nizin, ali i zbirnog dejstva ostalih internih i eksternih tehnoloških faktora u proizvodnji sira (pH, temperatura, NaCl) (Thomas i Wimpenny, 1996; Leistner, 2000; Cleveland i sar., 2001; Boziaris i sar., 2007).

### Zaključak

Sve veća potreba za prirodno bezbednom hranom u koju, tokom procesa prerade, nisu dodati hemijski konzervansi, dovela je do povećanog interesa za upotrebu bakteriocin-produkujućih sojeva BMK, koji se koriste kao starter kulture dodaju u proizvodnji fermentisanih proizvoda u prehrambenoj industriji. Njihova primena može biti interesantna i veoma poželjna s obzirom da je poverenje potrošača u hemijske konzervanse uveliko poljuljano, pa čak i dovedeno u pitanje.

Buduća istraživanja u ovoj oblasti biće usmerena na bolje razumevanje prirode antimikrobnih metabolita, njihovu antimikrobnu aktivnost, mogućnosti njihove primene, kao i otkrivanja novih bakteriocin-produkujućih sojeva BMK koji vode poreklo iz autohtonih fermentisanih proizvoda, čija bi kontrolisana i planska primena imala efekat prirodnih konzervanasa ili bioprotektora hrane.

## Napomena

Istraživanja u ovom radu su rezultat Projekta III 46009, koji je tokom 2011.-2016. godine finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke R. Srbije.

## Literatura

- Abbe, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of gram-positive and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol Lett*, 129, 1-10.
- Beresford, T., Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, London, UK, pp. 287-318.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bille, J., Blanc, D.S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H.H., Tritten, M.L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J.M., Malinverni, R., Genné, D., Erard, P.H., Waespi, U. (2006). Outbreak of human listeriosis associated with Tomme cheese in northwest Switzerland. *Euro Surveillance*, 11, 91-93.
- Bozialis, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M. and G.-J.E. (2007). Nychas Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 796-805.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131-149.
- Chen, M., Wu, Q., Zhang, J., Yan, Z., & Wang, J. (2014). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food Control*, 38, 1-7.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20.
- Couret, V., Gueguen, M., Vernoux, J.P. (2004). In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res*, 71, 451-460.
- Drosinos, E., Mataragas, M., Vesković Moračanin, S., Gasparik-Reichardt J., Hadžiosmanović, M., Alagić, D. (2006). Quantifying Nonthermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in European Fermented Sausages Using Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria or Their Bacteriocins: A Case Study for Risk Assessment. *Journal of Food Protection*, 69 (11), 2648-2663.
- EFSA European Food Safety Authority. (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat (RTE) foods in the EU, 2010e2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 11, 75 pp.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C. (1998a). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 521-526.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.) (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, London, UK.

- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M.R., Matarante, A., Considine, T., Di Cagno, R., Guinee, T., Fox, P.F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 12, 511-523.
- Holzappel, W., Geisen, R., Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 343-362.
- ISO 11290-1. Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection Method, International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland (2004).
- ISO 11290-2. Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland (2004).
- Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselman, C., Ennahar, S. (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26, 16-20.
- Leistner, L., (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology, *Int. J. Food Microbiol.*, 55, 181-186.
- Leroy, F.; de Vuyst, L. (2014). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78.
- Lunden JM, Autio TJ, Sjöberg AM, Korkeala HJ. (2003). Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *J Food Prot*, 66, 2062-9.
- McSweeney P.L.H., Fox P.F., Lucey J.A., Jordan K.N., Cogan T.M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613-634.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.*, 15, 51-57.
- Ross, R.P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Coffey, A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 96-104.
- Schillinger U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biotechnology, Food Quality*, 55-74.
- Schillinger, U., and Lucke, F. K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- Settanni, L. and Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.
- Sharpe, M.E. (1979). Identification of Lactic Acid Bacteria. In: *Identification Methods for Microbiologists*.
- StatSoft.Inc.: STATISTICA for Windows (computer program manual). Tulsa. OK: StatSoft.Inc.
- Stiles, M.E. (1994). Bacteriocins Produced by *Leuconostoc* species. *J. Dairy Sci.*, 77, 2718-2724.
- Šviráková, E., Složilová, I., Tichovský, P., Plocková, M. (2009). Effect of *Lactococcus* sp. on the Growth of *Listeria* sp. in the Model UHT Milk System. *Czech J. Food Sci.* Vol. 27, 2009, Special Issue 2, 8-11.

- Tagg, J., Dajani, A., Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacterial. Rev.*, 40, 722-756.
- Thomas L.V. and Wimpenny J. W. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 62(6), 2006-2012.
- Vesković Moračanin, S., Borovic, B., Velebit, B. (2013). Basic Characteristics of Natural Isolates of Lactic Acid Bacteria. International 57th Meat Industry Conference, Belgrade, 10th-12th June, 2013, Proceedings, pp.305-308.
- Vesković Moračanin, S., Mirecki, S., Trbović, D., Turubatović, L., Kurćubić, V., Mašković, P., (2012). Traditional manufacturing of white cheeses in brine in Serbia and Montenegro: Similarities and differences. *Acta periodica technologica*, 43, 107-113.
- Vesković Moračanin, S., Turubatović, L., Škrinjar M., Obradović, D. (2013a). Antilisterial activity of bacteriocin isolated from *Leuconostoc mesenteroides* subspecies *mesenteroides* IMAU: 10231 in production of Sremska sausages (traditional Serbian sausage): Lactic acid bacteria isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments", *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), 247-256.
- Chao, G., Deng, Y., Zhou, X., Xu, Q., Qian, X., Zhou, L., Zhu, B. (2006). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in delicatessen food products in China. *Food Control*, 17, 971-974.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 414-420.
- Schillinger, U. (1990). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biotech. Food Quality*, 55-74.

## ANTILISTERIAL EFFECT OF *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DURING SOFT WHITE CHEESE PRODUCTION

Slavica Vesković Moračanin<sup>1</sup>, Dragutin Đukić<sup>2</sup>, Pavle Mašković<sup>2</sup>, Vladimir Kurćubić<sup>2</sup>, Leka Mandić<sup>2</sup>, Miloš Veličić<sup>2</sup>

**Abstract:** This study examined strains of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese produced by the traditional method. Conventional microbiological testing resulted in the isolation of 96 strains of lactic acid bacteria which were then subjected to molecular genetic tests. One of the isolates, designated as *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, showed a markedly antilisterial effect under laboratory conditions. Based on the results, further research involved determination of its potential antilisterial effect during soft white cheese production. During fermentation that lasted 21 days, in experimental cheeses inoculated with *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 combined with *Lc. lactis* spp. *lactis* culture, there was a reduction in *Listeria* cell count (by 3-4 log units), which can be considered important potential for biological control in soft white cheese production.

**Key words:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, antilisterial effect, soft white cheese.

<sup>1</sup> Institute of Meat Hygiene and Technology, Kačanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia;

<sup>2</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Cacak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (lekamg@kg.ac.rs).