

MIKROFLORA SVIJEŽEG KRAVLJEG SIRA TRADICIONALNO PROIZVEDENOG NA PODRUČJU TUZLANSKOG KANTONA

Darja Husejnagić¹, Snježana Hodžić¹, Aldijana Avdić¹, Suad Širanović¹,
Vildana Hadžić²

Izvod: Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi mikrobiološku ispravnost i karakterističnu mikrofloru sviježeg kravljeg sira proizvedenog u domaćinstvima na području Tuzlanskog kantona, te identificirati bakterije mliječne kiseline (BMK) koje imaju esencijalnu ulogu tokom proizvodnje ovih fermentisanih namirnica. Svježi kravljji sir predstavlja jednu od najznačajnijih, a ujedino i najbrojniju porodicu fermentiranih mliječnih proizvoda. Veliki dio ovih namirnica se još uvijek proizvodi na tradicionalan način, u malim količinama u domaćinstvima, a proizvodi su najčešće namijenjeni lokalnim potrošačima. Međutim ovakav način proizvodnje često za posljedicu ima lošu higijensku ispravnost ovih namirnica. Istraživanje je pokazalo da od ukupno 50 uzoraka ispitanih na higijensku ispravnost, čak 39 je bilo mikrobiološki neispravno, i to uglavnom zbog prisustva *Escherichia coli* fekalnog porijekla. Metode identifikacije BMK, pokazale su da mikrofloru sviježeg kravljeg sira čine vrste *Lactobacillus plantarum 1*, *Lactobacillus plantarum 2*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei 3*, *Lactobacillus fermentum 1*, *Lactobacillus brevis 1* i *Lactococcus lactis ssp lactis 1*, koje svojom metaboličkom aktivnošću utiču na proces zrenja sireva, dovodeći do stvaranja željenih senzornih osobina proizvoda.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline (BMK), svježi kravljji sir, mikroflora

Uvod

Pored razvijene industrijske proizvodnje u Tuzlanskom kantonu još uvijek je značajno zastupljena autohtona proizvodnja mladih sireva. Svježi sir je po svom biohemijском sastavu visokovrijedna namirnica. Vrlo je bogat visokokvalitetnim proteinima i sadrži sve esencijalne aminokiseline u količinama proporcionalnim tjelesnim potrebama (Steinkraus,1998.). Svježi kravljji sir se može proizvoditi zgrušavanjem pasteriziranog mlijeka sa određenim udjelom mliječne masti ili zgrušavanjem obranog mlijeka. Ne podvrgava se zrenju, već se stavlja u promet u svježem stanju (Taborščak,1978.).

Budući da ovakvi proizvodi ne prolaze procese pasterizacije, koji se primjenjuju u industrijskoj proizvodnji, higijenska ispravnost ovh namirnica je često upitna. Mladi kravljji sir ima karakterističnu mikrofloru koju uglavnom čine bakterije mliječne kiseline koje imaju esencijalnu ulogu tokom proizvodnje fermentisanih namirnica. Svojom metaboličkom aktivnošću utiču na proces zrenja sireva, dovodeći do stvaranja željenih senzornih osobina proizvoda, ali istovremeno produkcijom kiselina i drugih produkata metabolizma, ove bakterije inhibiraju i rast različitih sojeva neželjenih mikroorganizama (Tratnik,1998.).

Bakterije mliječne kiseline posjeduju svojstvo da izlučuju u okolnu sredinu razne produkte metabolizma kao što su organske kiseline, vodik-peroksid, ugljik-dioksid,

diacetil, ruterin i bakteriocine. Antimikrobno djelovanje organskih kiselina kao što je mliječna, octena i propionska dobro je poznato. Kiseline djeluju na staničnu membranu bakterija, mijenjaju potencijal membrane i inhibiraju aktivni transport (Stiles i Holzapfel, 1997.). Bakterije mliječne kiseline imaju sposobnost da sintetiziraju i karakteristične proteine-bakteriocine, koji djeluju inhibitorno na neke mikroorganizme koji izazivaju kvar namirnica, ali i na neke druge patogene mikroorganizme (De Vuyst i sar., 1994.).

Ciljevi ovog istraživanja bili su ispitati mikrobiološku ispravnosti i karakterističnu mikrofloru svježeg kravljeg sira proizvedenog u domaćinstvima na području Tuzlanskog kantona, a zatim izvršiti izolaciju i mliječno kiselinskih bakterija iz svježeg kravljeg sira i identificirati ih do nivoa vrste.

Materijal i metode

Mikrobiološka analiza sprovedena je na 50 uzoraka svježeg kravljeg sira. Uzorci svježeg kravljeg sira proizvedeni su u domaćinstvima na području Tuzlanskog kantona uključujući općine Tuzla, Živinice, i Kalesija, sa okolnim naseljima. Uzorci su transportovani u laboratoriju u priručnim hladnjacima sa ledom, a u laboratoriju su čuvani u frižideru na temperaturi od 4 °C, a potom su analizirani (u roku od 6 sati od momenta uzorkovanja).

Mikrobiološka ispravnost namirnica ispitivana je u skladu sa propisima Pravilnika o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (Službeni glasnik BiH 11/13), a za ispitivanje preporučenih parametara korištene su slijedeće metode:

1. Za utvrđivanje prisustva *Salmonella* vrsta: BAS EN ISO 6579:2005
2. Za utvrđivanje prisustva *Escherichia coli* vrste fekalnog porijekla: BAS EN ISO 16649-2:2008
3. Za utvrđivanje prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka: BAS EN ISO 6888-1:2005
4. Za utvrđivanje prisustva ukupnog broja mikroorganizama: BAS EN ISO 4833-1:2014

Za izolaciju i identifikaciju bakterija mliječne kiseline do nivoa vrste iz namirnica (svježeg kravljeg sira) vršena je prema opisanoj metodi (Lengkey, HAW, 2009). Iz osnovnog razrjeđenja (20g namirnice/180 mL fizioliške otopine) su napravljena decimalna razrjeđenja koja su zasijavana na De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar. Zasijane podloge su inkubirane na 37 °C 48-72h u u anaerobnim uslovima. Porasle okrugle mliječno bijele kolonije su testirane na produkciju enzima katalaze. Sa kolonija poraslih na MRS agaru napravljeni su mikrokopski preparati i obojeni metodom po Gramu, a identifikacija mliječno kiselinskih bakterija do nivoa vrste izvedena je pomoću API CHL 50 testova (bioMerieux, API).

Rezultati i diskusija

Rezultati mikrobiološke analize svježeg kravljeg sira proizvedenog i uzorkovanog na području Tuzlanskog kantona, prikazani su Tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati mikrobiološke analize svježeg kravljeg sira uzorkovanog sa područja Tuzlanskog kantona
 Table 1: Results of microbiological analysis of fresh cow's cheese collected from the Tuzla Canton area

Lokalitet uzorkovanja <i>Sampling area</i>	Broj uzoraka <i>Number of samples</i>	Mikrobiološki parametri <i>Microbiological parameters</i>			
		E.coli <i>E.coli</i>	Salmonella sp. <i>Salmonella sp.</i>	S. aureus <i>S.aureus</i>	Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija <i>Total number of aerobic mesophylic bacteria</i>
		m=10 M=10 ²	n.n 25g	m=10 M=10 ²	m=10 ⁴ M=10 ⁵
Živinice	6	2x10 ³	0	0	3x10 ⁵
Šerići	2	3x10 ³	0	0	3x10 ⁵
Šerići	1	0	0	0	5x10 ³
Bašigovci	3	4x10 ²	0	0	2x10 ³
Tupkovići	3	3x10 ²	0	0	5x10 ³
Tupkovići	1	0	0	0	5x10 ²
Toplice	2	0	0	0	5x10 ³
Toplice	5	3x10 ²	0	0	3x10 ⁵
Kikači	4	4x10 ²	0	0	4x10 ³
Kikači	1	2x10 ²	izolovano	0	5x10 ⁴
Kikači	1	3x10 ²	0	2x10 ²	5x10 ⁴
Kikači	1	0	0	0	3x10 ³
Vukovije	2	3x10 ²	0	0	5x10 ⁴
Vukovije	2	0	0	0	1x10 ²
Gornja Tuzla	5	5x10 ²	0	0	2x10 ³
Gornja Tuzla	1	0	0	0	1x10 ²
Donje Dubrave	3	3x10 ²	0	0	1x10
Donje Dubrave	1	0	0	0	1x10 ²
Lukavac	1	1x10 ²	0	0	1x10 ⁴
Poljice	1	4x10 ³	0	0	3x10 ⁵
Gornji Rainci	1	5x10 ²	0	0	5x10 ³
Pasci	1	0	0	0	5x10 ³
Međaš	2	3x10 ²	0	0	5x10 ³

*m - granična vrijednost - rezultati se smatraju zadovoljavajućim ako su dobivene vrijednosti manje ili jednake vrijednosti m

M - gornja granična vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim

n.n. – odsutnost mikroorganizama u uzorku

Svježi kravljji sir proizveden u domaćinstvima na području Tuzlanskog kantona dobija se tradicionalnim postupkom, bez provođenja procesa pasterizacije i bez dodavanja starter kultura, tako da se proces fermentacije odigrava pod uticajem bakterija mliječne kiseline koje su prirodno prisutne u mlijeku. Upravo zbog takvog načina proizvodnje, mikrobiološka slika analiziranih uzoraka ukazuje na lošu higijensku ispravnost ovih namirnica. Od ukupno pedeset analiziranih uzoraka, čak 39 bilo je

mikrobiološki neispravno, i to uglavnom zbog prisustva *Escherichie coli* fekalnog porijekla. U uzorcima pronađene su takođe i koagulaza pozitivne *Staphylococcus* vrste, te *Salmonella* vrste.

Prisustvo *Escherichie coli* fekalnog porijekla u uzorcima svježeg kravljeg sira ukazuju na loše higijenske uvjete prilikom proizvodnje sira. Jedan od glavnih uzroka kontaminacije sira sa ovim bakterijama je nedovoljno čisto posuđe koje se koristi za proizvodnju, kao i loši higijenski uvjeti prilikom manipulacije i skladištenja sira. Fekalna kontaminacija takođe može poticati od nečistih životinja, te zbog ne primjenjivanja postupaka dezinfekcije vimena ili ruku osoba koje vrše mužu (Markov i sar., 2011.). Prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoknih vrsta najčešće je posljedica korištenja sirovog mlijeka za proizvodnju svježeg sira od muznih životinja kod kojih je došlo do infekcije vimena, budući da je *Staphylococcus aureus* u 90% slučajeva uzročnik pojave subkliničkog i kliničkog mastitisa. Izvor *Staphylococcus aureus* u namirnicama može biti i čovjek kliconoša, koji kapljičnim putem ili kontaminiranim rukama prenosi bakteriju dalje (Kožačinski i sar., 2003). Prirodno stanište *Salmonella* vrste je probavni trakt životinja, te se njihovo prisustvo u ovim namirnicama povezuje sa neadekvatnim i nehigijenskim načinom mužnje životinja čije se mlijeko koristi za dobijanje svježeg sira, kao i sa nehigijenskim uslovima u kojima se vrši proizvodnja i čuvanje sira (Markov i sar., 2009).

Iz uzoraka svježeg kravljeg sira izolovane su bakterije mliječne kiseline. Porasle kolonije na selektivnoj podlozi MRS agar pokazivale su karakterističan makroskopski aspekt - bijele, okrugle, sitne ili srednje krupne kolonije, katalaza negativne, a mikroskopski preparat pokazivao je Gram pozitivne koke ili štapičaste bakterije. Pomoću standardizovanih API testova, izolovane bakterije su identificirane do nivoa vrste. Dobijeni rezultati pokazuju da je rod *Lactobacillus* dominantan u ispitanim uzorcima (85%), a samo u manjem broju uzoraka pronađene su vrste iz roda *Lactococcus* (15%). Postupcima identifikacije utvrđeno je da mikrofloru svježeg sira sa područja Tuzlanskog kantona čine slijedeće vrste: *Lactobacillus plantarum 1*, *Lactobacillus plantarum 2*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei 3*, *Lactobacillus fermentum 1*, *Lactobacillus brevis 1*, *Lactococcus lactis ssp lactis 1*. Najveću zastupljenost među izolovanim vrstama imao je *Lactobacillus plantarum 1*, te *Lactobacillus plantarum 2*.

Sastav mikroflora je specifičan za svaku vrstu sira. Budući da mikroorganizmi u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu, željena svojstva u siru ovise o mikrobnjoj kulturi koja izaziva zrenje sira. Najvažniji zadatak mikrobne kulture je proizvodnja mliječne kiseline, koja utiče na ukus sirnog gruš, što je od naročitog značaja kod proizvodnje svježeg sira. Za proizvodnju mliječne kiseline najvećim djelom su odgovorne homofermentivne bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus*, koje proizvode više mliječne kiseline od bakterija iz roda *Lactococcus* (Gregurek i sar., 1997.). Pored mliječne kiseline ove bakterije u okolnu sredinu izlučuju i neke druge produkte svog metabolizma kao što su vodik-peroksid, ugljik-dioksid, diacetil i ruterin. Ove supstance pored toga što značajno utiču na stvaranje senzornih osobina svježeg kravljeg sira, takođe posjeduju i antimikrobni efekat. Najveću antimikrobnu aktivnost imaju organske kiseline (mliječna, sirćetna i druge) koje svojom niskom pH vrijednošću inhibitorno djeluju na rast patogenih organizama.

Za identifikovane bakterijske vrste je takođe je karakteristično da posjeduju sposobnost produkcije supstanci proteinske prirode kao što su bakteriocini. To su ribozomalno sintetisani proteini, koji imaju veoma značajno antimikrobno svojstvo. Produkcijom bakteriocina, bakterije mliječne kiseline na selektivan, kompetitivan način djeluju na okolnu mikrofloru koja može da sadrži bakterije koje izazivaju kvar namirnica ili patogene mikroorganizme (Rajaram i sar., 2010).

Zaključak

Mikrobiološka neispravnost velikog broja uzoraka svježeg kravljeg sira, proizvedenog i sakupljenog na području Tuzlanskog kantona, najvećim dijelom potiče od nezadovoljavajućih higijenskih uvjeta u kojima se vrši proizvodnja i skladištenje ovih namirnica, a na šta ukazuju prisutne bakterijske vrste (*Escherihia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*) identificirane analizom ovih namirnica. Od bakterija mliječne kiseline identificirane su vrste *Lactobacillus plantarum 1*, *Lactobacillus plantarum 2*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei 3*, *Lactobacillus fermentum 1*, *Lactobacillus brevis 1*, *Lactococcus lactis ssp lactis 1*. Determinisane vrste velikim djelom doprinose u stvaranju senzorskih osobina svježeg kravljeg sira, a pored toga poznato je da ove vrste imaju sposobnost i produkcije specifičnih proteina - bakteriocina koje imaju bakteriocidno ili bakteriostatsko dejstvo na veliki broj patogenih bakterija. Iz tog razloga predstavljaju veoma interesantan potencijal za aplikaciju u industriji hrane, kao prirodni bioprezervativi.

Literatura

- De Vuyst L., Vandame E.J. (1994). Antimicrobial potential of Lactic Acid Bacteria in Bacteriocines of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and Application, 91-142. London, Blackie Academic and Profesional.
- Gregurek Lj., Borović A. (1997). Mljekarske kulture mikroorganizama u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Mljekarstvo, 47(2), 103-113.
- Kozačinski L., Cvrtila Ž., Hadžiosmanović M., Majnarić D., Kukuruzović B. (2003). Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 53(1), 17-22.
- Lengkey H.A.W., Balia R.L., Togoe I., Tasbac B.A., Ludong M. (2009). Isolation and identificaton of Lactic acid bacteria isolated from raw poutery meat. Biotechnology in Animal Husbandry, 25, 1071-1077.
- Markov K., Frece J., Čvek D., Delaš F. (2009). *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje sa područja grada Zagreba. Mljekarstvo 59(3), 225-231.
- Markov K., Perši N., Pleadin J., Čvek D., Radošević V., Delaš F. i ostali (2011). Karakterizacija prirodne mikroflore i kemijski parametri u svježem domaćem siru. Veterinarska stanica 42(3), 211-218.
- Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B. (2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine enviroment. Advanced Journal of Food Science and Technology, 2(2),138-144.

- Steinkraus K.H. (1998). Microbiology of fermented foods, 603-619. London, Blackie Academic and Profesional.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36(1), 1-29.
- Taborščak N. (1978). Mogućnosti proizvodnje domaćeg svježeg sira na industrijski način. Mljekarstvo, 28, 212-218.
- Tratnik Lj. (1998). Mlijeko. Tehnologija, biohemija i mikrobiologija, 217-238. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

MICROFLORA OF FRESH COW'S CHEES TRADICIONALY MADE IN TUZLA CANTON AREA

Darja Husejnagić¹, Snježana Hodžić¹, Aldijana Avdić¹, Suad Širanović¹,
Vildana Hadžić²

Abstract

The aim of this study was to determine the microbiological quality and specific microflora of fresh cow's cheese produced in households in the Tuzla Canton area and to identify lactal acid bacteria (LAB) that play an essential role in the production of these fermented foods. Fresh cow's cheese is one of the most important fermented dairy product. A great number of these foods are still produced in a traditional way, in small quantities in households, and products are mostly intended for local consumers. However, this kind of production often results in poor hygiene quality of these foods. The study showed that out of a total of 50 samples tested, even 39 were microbiologically not acceptable, mainly due to the presence of *Escherichia coli* faecal origin. The methods of identification of LAB showed that the microflora of the fresh cow's cheese is consisted from of *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei* 3, *Lactobacillus fermentum* 1, *Lactobacillus brevis* 1 and *Lactococcus lactis ssp lactis* 1, which have a metabolic activity affecting the ripening process of cheese, leading to the creation of desired sensory properties of the product.

Key words: lactic acid bacteria (LAB), fresh cow's cheese, microflora