

ISTRAŽIVANJE PROTEOLITIČKE I LIPOLITIČKE AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ AUTOHTONOG TRAVNIČKOG/VLAŠIČKOG SIRA

Mersiha Alkić-Subašić¹, Svijetlana Sakić-Dizdarević¹, Tarik Dizdarević¹, Sabina Operta¹, Jasmina Tahmaz¹, Nermina Đulančić¹

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

Rezime

Bakterije mliječne kiseline (BMK) koje se prirodno nalaze u nekim vrstama hrane, sudjeluju u procesima fermentacije hrane i ciljano se dodaju kao starter kulture u prehrambenoj industriji. U tradicionalnim proizvodima, BMK doprinose zrenju i razvoju finalnih senzornih svojstava proizvoda. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati proteolitičku i lipolitičku aktivnost BMK, primarno izoliranih iz tradicionalnog *Travničkog/Vlašićkog* sira. Četrdeset i jedan izolat (41) BMK preliminarno je karakteriziran morfološkim, fiziološkim i biohemijskim testovima. Četiri roda bakterija mliječne kiseline obuhvaćena su istraživanjem: 1. *Lactobacillus* (*Lb. paracasei/casei* i *Lb. brevis*), 2. *Pediococcus* (*P. pentosaceus* i *P. acidilacti*), 3. *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides*) i 4. *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium* i *E. durans*). Kod sedam analiziranih sojeva BMK dokazana je izuzetno dobra proteolitička aktivnost, sa dijametrima zone proteolize između 14 i 18 mm. Pored navedenog, potvrđena je niska lipolitička aktivnost BMK porijekolom iz *Travničkog/Vlašićkog* sira. Proteolitički sojevi BMK bi mogli naći primjenu u polu-industrijskoj proizvodnji bijelog salamurnog sira, što bi pozitivno uticalo na intenzivniju proteolizu i ubrzalo proces zrenja sira.

Ključne riječi: *bakterije mliječne kiseline (BMK), proteolitička aktivnost, lipolitička aktivnost.*

UVOD

Proteolitički sistem bakterija mliječne kiseline (BMK) ima jednu od najvažnijih uloga u metabolizmu azotnih supstanci mlijeka, a sastoji se od proteinaza ćelijskog zida uz nekoliko peptidaza smještenih u citoplazmi. Ekstracelularne proteinaze ćelijskog zida iniciraju razgradnju kazeina do manjih peptida što je neophodno za rast BMK u mlijeku. Stoga se ekstracelularne proteinaze smatraju ključnim enzimima proteolitičkog sistema BMK (Moulay i sar., 2006). Soj specifični transportni sistem bakterija reguliše transport peptida i aminokiselina u bakterijsku ćeliju. Ovaj sistem sojevi laktokoka koriste u snabdijevanju ćelija neophodnim aminokiselinama te za povećanje biomase

¹Poljoprivredno-prehrambeni fakultet - Univerzitet u Sarajevu / Faculty of Agriculture and Food Sciences - University of Sarajevo
Correspondence: m.alkic-subasic@ppf.unsa.ba

ćelija (Pelaez i Requena, 2005). Brzina rasta i razmnožavanja laktokoka u mlijeku zavisi od proteolitičkog sistema. Koncentracija aminokiselina u mlijeku je veoma niska, posebno izoleucina i leucina (Mills i Thomas, 1980). Selekcija novih sojeva BMK se vrši na osnovu sposobnosti rasta u mlijeku, a proteolitičke i lipolitičke aktivnosti su faktori na osnovu kojih se procjenjuje tehnološki potencijal BMK. Selekcioniraju se sojevi koje odlikuje visoka proteolitička aktivnost, a isti ulaze u sastav ko-kultura i/ili starter kultura namijenjenih proizvodnji sira (Moulay i sar., 2006).

BMK se odlikuju slabije izraženom lipolitičkom aktivnošću u poređenju sa drugim bakterijskim vrstama i plijesnima. Enzimi starter bakterija vrlo slabo hidroliziraju trigliceride, iako su sposobni da proizvode slobodne masne kiseline, koje nastaju djelovanjem lipaza mlijeka i/ili drugih mikrobnih lipaza iz mono i di-glicerida (Stadhouders i Veringa, 1973). Potvrđeno je da bakterije proizvode lipazu tokom ekspanzionalne faze rasta, te da je proizvodnja iste u velikoj mjeri ovisna o uslovima rasta (Papon i Talon, 1988; Makhzoum i sar., 1995) sa maksimalnim proizvedenim količinama pri optimalnoj temperaturi i pH vrijednosti supstrata. Slobodne masne kiseline nastale u siru razlaganjem masnih frakcija, smatraju se prekursorima molekula koje su zaslužne za proizvodnju komponenti arome kao što su metilketoni, esteri, laktoni masnih kiselina i alkoholi (McSweeney i Sousa, 2000).

MATERIJAL I METODE

Četrdeset i jedan izolat BMK (41) obuhvaćen istraživanjem prvobitno je izolovan iz autohtonog ovčijeg *Travničkog/Vlaškog* sira, nakon čega su izolati determinisani primjenom morfoloških, fizioloških testova te biohemijskim nizom reakcija API Rapid ID 32 Strep stripova i API 50 CH (BioMeriux, Francuska). Izolati rodova BMK (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*) su do upotrebe čuvani u MRS bujonu (De Man i sar., 1960) i/ili M17 bujonu (*Enterococcus*) (Himedia, Indija) (Terzaghi i Sandine, 1975) uz dodatak 20% glicerola. Čistoća izolata je provjeravana svakih šest mjeseci. Rodovi *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* su periodično rekultivisani na MRS agarnoj podlozi (Himedia, India), dok je za izolate roda *Enterococcus* korištena M17 agarna podloga (Himedia, India). Čiste kulture su čuvane u krio epruvetama na temperaturi -60°C , na Poljoprivredno-prehrambenom fakultetu, Univerziteta u Sarajevu.

Priprema inokuluma bakterijakih kultura. Nakon potvrđivanja čistoće autohtonih izolata BMK, uzeta je po jedna kolonija svake kulture sa površine agarnih ploča i inokulirana u 9 ml MRS ili M17 bujona (Merck Darmstadt, Njemačka). Kulture su inkubirane 18h pri 30°C , a pripremljena bujonska kultura je korištena za dokazivanje proteolitičke i lipolitičke aktivnosti izolata BMK.

Proteolitička aktivnost izolata BMK je određivana primjenom sterilne mliječne agarne podloge (MA; pH 6,5) (Oxoid). Napravljena su udubljenja diametra 5mm u MA podlozi (agar spot metod), a u udubljenja je inokulirano $5\mu\text{L}$ i $10\mu\text{L}$ testiranih bujonskih kultura

BMK (zamućenja 4 po McFarland-u). Paralelne Petri kutije su inkubirane 24h pri 37°C za laktobacile i enterokoke i pri 30°C za pediokoke i leukonostok. Proteolitička aktivnost je dokazivana mjerenjem prozirnih zona koje su se pojavile oko udubljenja u koje je inokulirana kultura, prema proizvođačkoj specifikaciji.

Lipolitička aktivnost izolata BMK je dokazivana brzom kvalitativnom metodom određivanja lipolitičke aktivnosti fermentativnih mikroorganizama (Leuschner i sar., 1997). Za ispitivanje lipolitičke aktivnosti BMK korištena je bujonska kultura u logaritamskoj fazi rasta (zamućenja 4 po McFarland-u). Lipolitička aktivnost je analizirana na 2% Tributirin agaru (TBA) (Merck, Darmstadt, Njemačka), u koji je nakon sterilizacije i hlađenja na 60°C dodato 1,0% neutralnog glicerol tributirata (Aldrich Chemicals, Gillingham, UK). Napravljena su udubljenja diametra 5 mm u TBA agaru (agar spot metod), a u udubljenja je inokulirano 5µL i 10 µL testiranih bujonskih kultura BMK. Paralelne Petri kutije su inkubirane 6 dana pri temperaturi 30°C. Lipolitička aktivnost je dokazivana mjerenjem prozirnih zona koje su se pojavile oko udubljenja u koje je inokulirana kultura.

REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ispitivanja proteolitičke aktivnosti BMK je selekcija sojeva koji se odlikuju visokom proteolitičkom aktivnošću, a odabrani sojevi bi mogli biti upotrebljeni kao kulture u proizvodnji sira (Mills i Thomas, 1980; Ayad i sar., 2000). Kod BMK, razlike u sposobnosti metaboliziranja aminokiselina se povezuju sa sposobnostima sinteze aminokiselina. Proteolitička aktivnost sojeva izolovanih iz prirodnih staništa je unikatna i obično veća od aktivnosti komercijalno dostupnih starter sojeva. Prirodni sojevi posjeduju mnogo veći potencijal sintetiziranja vlastitih aminokiselina u mediju u poređenju sa selekcionisanim sojevima, koji se nalaze u sastavu komercijalnih starter kultura (Ayad i sar., 2000; Smit i sar., 2005).

Tabela 1. Rezultati kvalitativne determinacije izvanćelijske proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline sa dijametrom prozirnih zona (mm)

Table 1. Results of qualitative determination of extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria with diameter of clear zones (mm)

Bakterijska vrsta	Dijametar prozirne zone u milimetrima (mm)				
	<10	10-12	12-14	14-16	16-18
<i>Lb. paracasei/ Lb. casei</i> (4)	1		3		
<i>Lb. brevis</i> (5)		3	2		
<i>Leu. mesenteroides</i> (5)		4	1		
<i>E. durans</i> (1)					1
<i>E. faecalis</i> (14)		5	6	3	
<i>E. faecium</i> (6)	1	3	2		

<i>P. pentosaceus</i> (5)		2		3	
<i>P. acidilacti</i> (1)		1			
Broj izolata (41)	2	18	14	6	1

Proteolitička aktivnost BMK izolovanih iz *Travničkog/Vlašićkog* sira ispitivana je na standardiziranoj mliječnoj agarnoj podlozi sa kazeinom, a interpretacija rezultata je rađena prema proizvođačkim specifikacijama. Izolati BMK uglavnom su hidrolizirali kazein formirajući svijetlu tj. prozirnu zonu dijametra >10 mm. Osamnaest analiziranih sojeva BMK odlikovalo se srednje dobrom (10-12 mm), a četrnaest sojeva se odlikovalo izrazito dobrom (12-14 mm) proteolitičkom aktivnošću (Tabela 1.). Izuzetno dobra proteolitička svojstva su utvrđena kod tri izolata vrste *E. faecalis* i tri izolata vrste *P. pentosaceus*, a isti su hidrolizirali kazein formirajući zonu dijametra (14-16 mm). Najveća proteolitička aktivnost je dokazana kod jedinog izolata vrste *E. durans* Ed17, porijeklom iz *Travničkog/Vlašićkog* sira, sa dijametrom prozirne zone (16-18 mm) (Tabela 1.). Prema Vuilleumard i sar. (1986), sojevi BMK se smatraju proteolitičkim ukoliko je izmjerena zona lize dijametra između 15 i 21 mm. Pojedini sojevi enterokoka najbolje hidroliziraju kazein pri temperaturama zrenja 10°C, a radi se prvenstveno o α -kazeinu, iako postoje sojevi koji posjeduju veći potencijal hidrolize β -caseina (Psoni i sar., 2007). Veliki broj autora smatra da se sojevi vrste *E. faecalis* razlikuju po količini oslobođenih aminokiselina, što je potvrđeno u ovom istraživanju, kao i činjenica da su sojevi vrste *E. faecalis* aktivniji proteolitički agensi u poređenju sa sojevima vrste *E. faecium* (Morandi i sar., 2006; Sarantinopoulous i sar., 2001).

Poznato je da BMK posjeduju slabu lipolitičku aktivnost. Na lipolitičku aktivnost sojeva iz roda *Enterococcus* utiču mnogobrojni faktori, a najviše porijeklo soja/vrste. Enterokoke porijeklom iz hrane imaju najviše izražena lipolitička svojstva, posebno sojevi vrste *E. faecalis*, potom *E. durans* i na kraju *E. faecium* (Sarantinopoulous i sar., 2001). Navedeno zavisi od uzgojnog medija, a veoma niska lipolitička aktivnost enterokoka ustanovljena je uzgojem u punomasnom mlijeku (Villani i sar., 1993).

Smatra se da je lipolitička aktivnost BMK soj-specifično svojstvo, obzirom da su se samo pojedini izolati BMK porijeklom iz *Travničkog/Vlašićkog* sira odlikovali izraženijom lipolitičkom aktivnošću. Kod izolata vrste *E. faecium* Efm19, dokazana je najveća lipolitička aktivnost, sa prozirnom zonom promjera 14 mm. Najveći broj BMK analiziranih u ovom radu je nakon rasta na površini tributirin agarne podloge hidrolizirao tributirin stvarajući prozirnu zonu hidrolize dijametra 6-8 mm (Tabela 2).

Tabela 2. Rezultati kvalitativne determinacije izvanćelijske lipolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline sa dijametrom prozirnih zona (mm)

Table 2. Results of qualitative determination of extracellular lipolytic activities of lactic acid bacteria with diameter of clear zones (mm)

Bakterijska vrsta	Dijametar lipolize u milimetrima (mm)				
	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14
<i>Lb. paracasei/ Lb. casei</i> (4)	3	1			
<i>Lb. brevis</i> (5)	1	3	1		
<i>Leu. mesenteroides</i> (5)		5			
<i>E. durans</i> (1)		1			
<i>E. faecalis</i> (14)		9	3	2	
<i>E. faecium</i> (6)	1	4			1
<i>P. pentosaceus</i> (5)	3	1	1		
<i>P. acidilacti</i> (1)		1			
Ukupan broj izolata (41)	8	25	5	2	1

Prema Leuschner i sar. (1997), lipolitička aktivnost mikroorganizama koji učestvuju u fermentacijama hrane je podijeljena na nisku, ukoliko je zona hidrolize <1,5 cm, srednju aktivnost ukoliko je zona hidrolize 1,5-2,0 cm, te jaku kod zone hidrolize >2,0 cm. Prema ovoj podjeli svi izolati BMK izolirani iz tradicionalnog *Travničkog* sira mogu se svrstati u grupu izolata niske lipolitičke aktivnosti, obzirom da je kod svih zona hidrolize bila <1,5 cm. U istraživanjima Sarantinopoulos i sar.(2001), dokazano je da su izolati vrsta *E. faecalis*, *E. faecium* i *E. durans* imali sličnu lipolitičku aktivnost, nezavisno od porijekla, ali se vrsta *E. faecium* odlikovala najvišom esterolitičkom aktivnošću. Navedeno je potvrđeno i kod izolata BMK analiziranih u ovom radu (Tabela 2.).

ZAKLJUČAK

Četrdeset i jedan izolat BMK (41) obuhvaćen ovim istraživanjem pripadali su rodovima *Lactobacillus* (9), *Leuconostoc* (5), *Pediococcus* (6) i *Enterococcus* (21). Kvalitativnom analizom proteolitičkih i lipolitičkih aktivnosti BMK dokazana je dominacija sojeva koji se odlikuju srednje do izrazito dobrom proteolitičkom aktivnošću. Izuzetno dobra proteolitička svojstva su utvrđena kod tri izolata vrste *E. faecalis* i tri izolata vrste *P. pentosaceus*, a isti su hidrolizirali kazein formirajući zonu dijametra (14-16mm). Najveća proteolitička aktivnost je dokazana kod jedinog izolata vrste *E. durans* (Ed17) koji se odlikovao dijametrom prozirne zone 16-18 mm. Svi izolati BMK porijeklom iz *Travničkog/Vlašićkog* sira odlikovali su se niskom lipolitičkom aktivnošću, obzirom da je kod istih zona hidrolize bila <1,5 cm. Proteolitički sojevi bi se mogli upotrijebiti u svojstvu ko-kultura BMK u polu-industrijskoj proizvodnji bijelih salamurnih sireva.

LITERATURA

- Ayad, C., Verheul, A., Wouters, J. T. M., Smit, G. (2000). Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*, 10, 169–179.
- de Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. Elisabeth (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 130-135.
- Leuschner, R.G., Kenneally, P.M., Arendt, E.K. (1997). Method for the rapid quantitative detection of lipolytic activity among food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 2-3, 237–240.
- Makhzoum, A., Knapp, J.S., Owusu, R.K. (1995). Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food Microbiology*, 12, 277–290.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. A review. *Lait*, 80, 293-324.
- Mills, O. E., Thomas, T. D. (1980). Bitterness development in Cheddar cheese: effect of the level of starter proteinase. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 15: 131–141.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int Dairy J*, 16, 867–875.
- Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D.E., Kihal, M. (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity; *World Journal of Dairy & Food Sciences* 1 (1), 12-18.
- Papon, M., Talon, R. (1988). Lipolytic activity of *Brochothrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus*. *Proceedings of the Thirty fourth International Congress of Meat Science and Technology*, 2, 558–561.
- Pelaez, C., Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15, 831-844.
- Psoni, L., Kotzamanidis, C., Yiangou, M., Tzanetaki, N., Litopolou-Tzanetaki, E. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 114, 211-220.
- Sarantinopoulous, P., Kalantzopoulous, G., Tsakalidou, E. (2001). Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIRE229. *Appl Environ Microbiology*, 67, 5482–5487.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavours profiling of cheese products. *FEMS Microbiological Review*, 29, 591–610.
- Stadhouders, J., Veringa, H.A. (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27, 77-91.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol*, 6:807-813.

- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., Coppola, S. (1993). Enterocin 226 NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 380-386.
- Vuillemard, J.C. (1986). Food microbiology. Evolution of proteolytic activity of the lactic bacteria (In French). Tec & Doc, Lavoisier, 3,1-65.

INVESTIGATION OF PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM AUTOCHTHONOUS TRAVNIČKI/VLAŠIČKI CHEESE

Summary

Lactic acid bacteria (LAB) found naturally in some foods, participate in food fermentation processes and are intentionally added as starter cultures in food industry. In traditional products, LAB appears to play a role in ripening and the development of the final organoleptic qualities. The objective of this study was to investigate proteolytic and lipolytic activities of LAB, primary isolated from traditional *Travnički/Vlašički* cheese. Forty-one strain of LAB were preliminary characterized using morphological, physiological and biochemical tests. Four genera of the bacteria were included in the study: 1. *Lactobacillus* (*Lb. paracasei/casei* and *Lb.brevis*), 2. *Pediococcus* (*P. pentosaceus* and *P. acidilacti*), 3. *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides*) and 4. *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium* and *E. durans*). Seven LAB strains demonstrated extremely good proteolytic activity, with proteolysis zone diameters between 14 and 18 mm. In addition to the above, low lipolytic activity of LAB originating from *Travnički/Vlašički* cheese was confirmed. Proteolytic strains of BMK could find application in semi-industrial production of white brine cheese, those would positively affect more intensive proteolysis and accelerate the process of cheese ripening.

Key words: *lactic acid bacteria (LAB), proteolytic activity, lipolytic activity*