

KARAKTERIZACIJA TEHNOLOŠKIH OSOBINA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE IZOLOVANIH IZ SIRA SA PLANINE RADAN

Nataša Joković¹, D. Savić¹, Maja Vukašinić², Lj. Topisirović³

¹Tehnološki fakultet, Leskovac

²Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

³Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

IZVOD

U ovom radu urađena je karakterizacija 69 izolata bakterija mlečne kiseline izolovanih iz domaćeg sira sa planine Radan. Karakterizacija izolata je obuhvatala ispitivanje aktivnosti izolata u mleku kao i sintezu diacetila, egzopolisaharida i bakteriocina. Izolati iz roda *Lactococcus* najviše snižavaju pH vrednost inokulisanog mleka, dok laktobacili najslabije rastu u mleku. Sinteza diacetila je detektovana kod dva izolata koja pripadaju biovarijetetu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, kod svih izolata iz roda *Enterococcus* sa tipičnim fenotipskim karakteristikama i kod tri izolata iz roda *Lactobacillus*. Svi izolati koji pripadaju vrsti *Ln. mesenteroides* (osim jednog koji pripada podvrsti *cremoris*) poseduju sposobnost sinteze dekstrana prilikom rasta na podlozi sa saharozom, dok nekoliko izolata iz roda *Lactobacillus* pokazuju sposobnost sinteze egzopolisaharida. Bakteriocine sintetišu samo dva izolata koja pripadaju vrsti *En. faecium*.

UVOD

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su heterogena grupa Gram pozitivnih bakterija koje kao krajnji produkt metabolizma laktoze daju mlečnu kiselinu. Dugogodišnje korišćenje ovih bakterija kao i mnogobrojne interesantne metaboličke karakteristike doveli su do značajnih i različitih primena ovih mikroorganizama u industriji. U cilju poboljšanja trajnosti i kvaliteta fermentisane hrane u različitim prehrambenim procesima koriste se različite vrste BMK iz nekoliko rodova: *Lactobacillus* (mleko, meso, povrće, žitarice), *Lactococcus* (mleko), *Leuconostoc* (mleko, povrće), *Pediococcus* (povrće, meso), *Oenococcus* (vino), *Enterococcus* (mleko) i *Streptococcus* (mleko) (Stiles and Holzapfel, 1997). Zbog njihovog pozitivnog uticaja na zdravlje ljudi neki sojevi ovih bakterija koriste se kao probiotici.

U savremenoj industrijskoj proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda koriste se starter kulture koje predstavljaju kombinaciju različitih

sojeva BMK sa posebnim karakteristikama. Najznačajnija karakteristika ovih bakterija je produkcija mlečne kiseline koja snižava pH supstrata i tako sprečava razvoj patogenih mikroorganizama. Sa druge strane, prisustvo proteinaza omogućava razlaganje proteina iz mleka što utiče na krajnji kvalitet proizvoda. Ostale karakteristike koje su bitne za upotrebu BMK u mlekarskoj industriji, a koje zavise od primenjenog soja su sposobnost sinteze aromatičnih jedinjenja, egzopolisaharida i bakteriocina, kao i njihova probiotička svojstva (Gilliand, 1985).

Cilj ovog rada bio je ispitivanje tehnoloških svojstava različitih sojeva bakterija mlečne kiseline koji su izolovani iz autohtonog sira tokom perioda zrenja radi moguće upotrebe sojeva u komercijalnoj proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda.

MATERIJAL I METODE

Sojevi

Sojevi bakterija mlečne kiseline izolovani su tokom zrenja autohtonog sira sa planine Radan. Svi sojevi su identifikovani fenotipskim i rep-PCR metodama (Joković, 2004)

Ispitivanje aktivnosti izolata u mleku

Aktivnost izolata u mleku je određivana promenom pH vrednosti inokulisanog mleka, kao i mleka sa dodatkom 2% glukoze i 1% kvašćevog ekstrakta nakon 6 i 24 sata inkubacije na 30°C (za mezofilne sojeve), odnosno na 37°C (za termofilne sojeve). Za inokulaciju je korišćen 2% inokulum bakterija koje su već tri puta sukcesivno presejavane u mleko.

Ispitivanje produkcije diacetila

Produkcija diacetila od strane izabranih izolata je ispitivana nakon 24 sata gajenja u mleku. Kvalitativno određivanje diacetila je vršeno dodavanjem 1ml 30% NaOH i 1-2 mg kreatina u cm³ zgrušanog mleka. Nakon 1-2 sata očitani su rezultati pri čemu je pojava crvenog prstena označavala pozitivnu reakciju.

Ispitivanje produkcije EPS-a

Produkcija egzopolisaharida detektovana je vizuelno (formiranje sluzavih kolonija) nakon rasta izolata na rekonstruisanoj MRS podlozi sa dodatkom glukoze, saharoze, laktoze i fruktoze na temperaturi od 30°C za mezofilne i 37°C za termofilne izolate.

Antimikrobijalni eseji

Za detekciju sinteze antimikrobijalnih supstanci korišćen je difuzioni metod u bunarčićima. Eksperiment je radjen tako što su petri šolje sa čvrstim MRS ili GM17 (Merck, Germany) podlogama prelivane sa 5 cm³ soft (0,7%) GM17 ili MRS agara, u kome je inokulisano oko 10⁵ ćelija indikatorskog

soja/cm³ medijuma. Za izolate iz rodova *Lactococcus* i *Enterococcus* korišćeni su indikator sojevi *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NS1 i *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596 dok su za laktobacile i leukonostoke korišćeni sojevi *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC393 i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16/K4. U soft agaru su pravljene bunarčice prečnika 5 mm u koje je sipano 100 µl 16 sati stare kulture potencijalnog producenta bakteriocina. Prisustvo antimikrobijalnih supstanci je detektovano na osnovu pojave svetle zone oko bunarčice, kao posledice inhibicije rasta indikatorskog bakterijskog soja. Za ispitivanje proteinske prirode antimikrobijalne supstance na samu ivicu bunarčice dodavan je kristal pronaze E. Ako je zona inhibicije izostajala na mestu gde je dodavana pronaza E potvrđeno je da je produkovana antimikrobna supstanca proteinske prirode.

REZULTATI

Aktivnost izolata u mleku

Lactococcus sp.

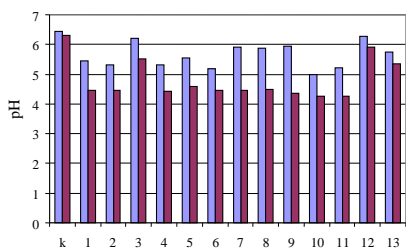
Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem aktivnosti izolata koji pripadaju podvrsti *Lc.lactis* ssp. *lactis* u mleku i u mleku obogaćenom glukozom i kvašćevim ekstraktom, u trajanju od 6 sati i 24 sata (Slika 1), svi izolati se mogu svrstati u tri grupe.

Izolati prve grupe (BGGJ1-11, BGGJ1-12, BGGJ2-9, BGGJ2-13, BGGJ2-17, BGGJ3-20 i BGGJ3-28) nakon 6 sati inkubacije na 30°C snižavaju pH vrednost mleka na 5-5,5, a nakon 24 sata do pH 4.1. Najbolju aktivnost u mleku u ovoj grupi pokazuje izolat BGGJ3-20 koji u prvih 6 sati inkubacije snižava pH vrednost mleka do 5.

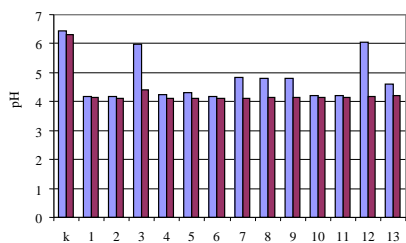
Druga grupa izolata (BGGJ3-15, BGGJ3-16 i BGGJ3-17 i BGGJ4-4) pokazuje slabiju aktivnost u mleku u odnosu na prethodnu grupu. Nakon 24 sata inkubacije na 30°C prva tri izolata snižavaju pH inokulisanog mleka na 4,8, dok izolat BGGJ4-4 snižava pH vrednost mleka ispod tačke zgrušavanja (4,6).

Treću grupu izolata čine BGGJ2-8 i BGGJ4-1 (*Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) koji pokazuju izrazito slabu aktivnost u mleku. Nakon 24 sata inkubacije obaraju pH vrednost mleka na 5,9 odnosno 6.

Svi laktokokalni izolati bolje rastu u mleku sa dodatkom glukoze i kvašćevog ekstrakta.



a)



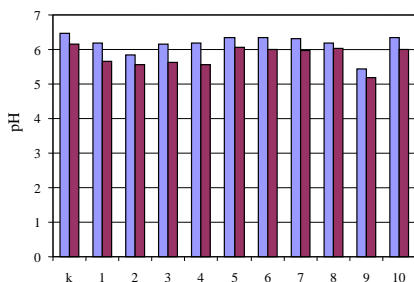
b)

Slika 1. Vrednosti pH mleka i mleka obogaćenog glukozom i kvašćevim ekstraktom nakon inkubacije laktokokalnih izolata u trajanju od 6 sati (a) i 24 sata (b). k-kontrola, 1-BGGJ1-11, 2-BGGJ1-12, 3-BGGJ2-8, 4-BGGJ2-9, 5-BGGJ2-13, 6-BGGJ2-17, 7-BGGJ3-15, 8-BGGJ3-16, 9-BGGJ3-17, 10-BGGJ3-20, 11-BGGJ3-28, 12-BGGJ4-1, 13-BGGJ4-4.

■ - Mleko; ■ - Obogaćeno mleko.

Leuconostoc sp.

Aktivnost izolata iz roda *Leuconostoc* u mleku i mleku obogaćenom glukozom i kvašćevim ekstraktom praćena je takođe preko promene pH vrednosti mleka (Slika 2).



a)



b)

Slika 2. Vrednosti pH mleka i mleka obogaćenog glukozom i kvašćevim ekstraktom nakon inkubacije izolata iz roda *Leuconostoc* u trajanju od 6 sati (a) i 24 sata (b). k-kontrola, 1-BGGJ1-9, 2-BGGJ1-14, 3-BGGJ1-23, 4-BGGJ2-16, 5-BGGJ3-13, 6-BGGJ4-8, 7-BGGJ4-23, 8-BGGJ4-26, 9-BGGJ4-27, 10- BGGJ4-31

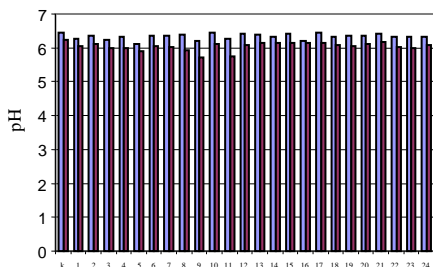
■ - Mleko; ■ - Obogaćeno mleko.

Najbolju aktivnost u mleku pokazuje izolat BGGJ4-27 (*Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*) koji nakon 24 sata inkubacije snižava pH vrednost inokulisanog mleka do 4.8. Svi ostali izolati pokazuju slabu aktivnost u mleku koja je daleko iznad granice zgrušavanja mleka.

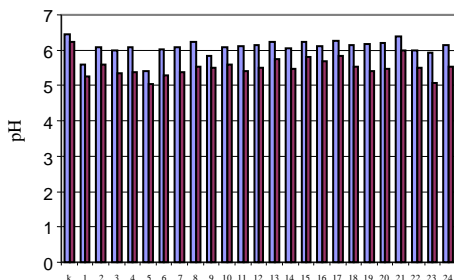
Dodatak glukoze i kvašćevog ekstrakta u mleko doprinosi povećanju brzine koagulacije mleka u prvih 6 sati inkubacije, dok obogaćeno mleko nakon 24 sata inkubacije zgrušava veći broj izolata.

Lactobacillus sp.

Svi izolati iz roda *Lactobacillus* pokazuju izrazito slabu aktivnost u mleku i mleku sa dodatkom glukoze i kvašćevog ekstrakta nakon 6 i 24 sata inkubacije (Slika 3). Većina izolata ne snižava pH vrednost mleka ispod 6 čak ni nakon 24 sata inkubacije. Izuzetak su izolati BGGJ2-21, BGGJ5-25 (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*), BGGJ6-1 (*Lb. plantarum*) koji za 24 sata obaraju pH vrednost mleka na 5,6 odnosno 5,4.



a)



b)

Slika 3. Vrednosti pH mleka i mleka obogaćenog glukozom i kvaščevim ekstraktom nakon inkubacije laktobacilusnih izolata u trajanju od 6 sati (a) i 24 sata (b). k-kontrola, 1-BGGJ2-21, 2-BGGJ4-3, 3-BGGJ5-6, 4-BGGJ5-22, 5-BGGJ5-25, 6-BGGJ5-28, 7-BGGJ5-30, 8-BGGJ5-31, 9-BGGJ6-1, 10-BGGJ6-8, 11-BGGJ6-10, 12-BGGJ6-11, 13- BGGJ6-16, 14-BGGJ6-31, 15-BGGJ6-35, 16-BGGJ6-38, 17-BGGJ6-40, 18-BGGJ7-4, 19-BGGJ7-9, 20-BGGJ7-16, 21-BGGJ7-18, 22-BGGJ7-20, 23-BGGJ7-21, 24-BGGJ7-29.

■ - Mleko; ■ - Obogaćeno mleko.

Dodatak glukoze i kvaščevog ekstrakta i u slučaju laktobacila ima stimulatívni efekat na njihov rast. I pored toga nakon 24 sata inkubacije, samo izolati BGGJ5-25 i BGGJ7-21 obaraju pH vrednost na oko 5 što je nedovoljno za formiranje grušá.

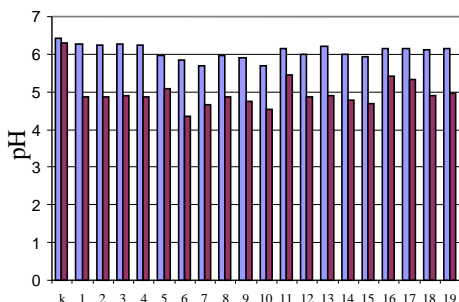
Enterococcus sp.

Aktivnost izolata iz roda *Enterococcus* praćena je u mleku i mleku sa dodatkom glukoze i kvaščevog ekstrakta nakon inkubacije ćelija u trajanju od 6 i 24 sata inkubacije na temperaturi od 37°C (Slika 4).

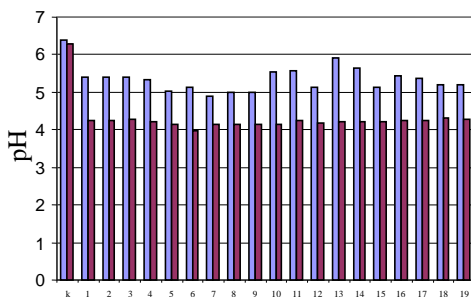
Enterokoke pokazuju slabu aktivnost u mleku nakon 6 sati inkubacije. Sa dodatkom glukoze i kvaščevog ekstrakta znatno se poboljšava brzina koagulacije mleka, tako da većina izolata obara pH na vrednost koja je bliska taćki zgrušavanja mleka.

Izolat BGGJ3-18 nakon inkubacije od 24 sata obara pH vrednost mleka na 4.8, dok ostali izolati za isto vreme obaraju pH vrednost mleka na 5 do 5,2. Dodatak glukoze i kvaščevog ekstrakta pospešuje rast svih enterokokalnih

izolata tako da se pH vrednost mleka nakon 24 sata inkubacije kreće u intervalu od 3,9 do 4,3.



a)



b)

Slika 4. Vrednosti pH mleka i mleka obogaćenog glukozom i kvašćevim ekstraktom nakon inkubacije enterokokalnih izolata u trajanju od 6 sati (a) i 24 sata (b). k-kontrola, 1-BGGJ1-3, 2-BGGJ1-5, 3-BGGJ2-7, 4-BGGJ2-14, 5-BGGJ3-6, 6-BGGJ3-12, 7-BGGJ3-18, 8-BGGJ3-19, 9-BGGJ3-30, 10-BGGJ3-37, 11-BGGJ4-2, 12-BGGJ4-15, 13-BGGJ5-2, 14-BGGJ5-3, 15-BGGJ5-26, 16-BGGJ6-3, 17-BGGJ6-23, 18-BGGJ7-3, 19-BGGJ7-6.

■ - Mleko; ■ - Obogaćeno mleko.

Sinteza diacetila

Sinteza diacetila je uočena kod izolata iz rodova *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Enterococcus* (Tabela1). Dva izolata iz roda *Lactococcus* koja pripadaju varijetetu *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (BGGJ2-8 i BGGJ4-1) proizvode diacetil. Svi izolati iz roda *Enterococcus* koji imaju tipične fenotipske karakteristike ovog roda proizvode diacetil za razliku od atipičnih predstavnika za koje je test na diacetil bio negativan. Izolati *Lb. plantarum* BGGJ6-7 i BGGJ6-40, kao i *Lb. paraplantarum* BGGJ6-16 također sintetiziraju diacetil, mada u manjoj količini u odnosu na ostale izolate. U okviru roda *Leuconostoc* nije detektovan ni jedan izolat koji poseduje sposobnost sinteze diacetila.

Tabela 1. Broj sojeva iz različitih rodova BMK koji produkuju diacetil i egzopolisaharide

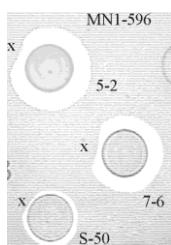
	ukupan broj sojeva	sojevi koji produkuju diacetil	sojevi koji produkuju egzopolisaharide
<i>Lactococcus</i>	13	15%	-
<i>Leuconostoc</i>	13	-	91%
<i>Enterococcus</i>	19	79%	-
<i>Lactobacillus</i>	24	13%	12.5%

Produkcija egzopolisaharida

Produkcija egzopolisaharida je detektovana kod izolata iz rodova *Leuconostoc* i *Lactobacillus*, dok kod izolata koji pripadaju rodovima *Lactococcus* i *Enterococcus* ovo svojstvo nije uočeno (Tabela 1). Svi izolati identifikovani kao *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* obrazuju sluzave kolonije na čvrstoj podlozi sa saharozom pod aerobnim uslovima. Izolati iz roda *Lactobacillus* obrazuju slabo mukoidne kolonije. Izolati BGGJ6-31, BGGJ6-32 produkuju EPS na galaktozi i saharozi, a izolat BGGJ7-16 na saharozi i laktozi. Za ostale izolate detektovana je produkcija EPS-a prilikom rasta samo na jednom šećeru: izolat BGGJ6-40 produkuje EPS na glukozi, a izolat BGGJ6-1 na galaktozi.

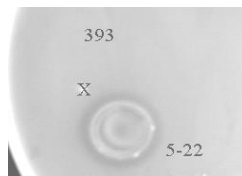
Produkcija antimikrobijalnih supstanci

Od svih ispitivanih izolata dva *En. faecium* izolata, BGGJ5-2 i BGGJ7-6, obrazuju zonu inhibicije oko bunara veličine 5mm, na indikator soju *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596 (Slika 5). Dodavanjem pronaze E na ivicu bunara zona inhibicije je izostala na tom mestu čime je potvrđeno da je produkovana antimikrobna supstanca proteinske prirode. Isti izolati ne inhibiraju rast indikator soja *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NS1.



Slika 5. Inhibitorno delovanje izolata *En. faecium* BGGJ5-2 i BGGJ7-6 na indikator soju *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596, X-kristal pronaze E.

Izolat *Lb. plantarum* BGGJ5-22 pokazuje inhibitorno delovanje na rast indikator soja *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC393 (Slika 6). Zona inhibicije nije izostala na mestu dodavanja pronaze E tako da inhibitorna aktivnost najverovatnije ne potiče od bakteriocina. Priroda antimikrobne supstance nije dalje ispitivana.



Slika 6. Inhibitorno delovanje izolata *Lb. plantarum* BGGJ5-22 na indikator soj *Lb. casei* subsp. *casei* 393, x-kristal pronaze E.

DISKUSIJA

Izolacija BMK iz autohtonih mlečnih proizvoda je baza za selekciju novih sojeva sa svojstvima koja su pogodna za njihovu upotrebu u starter kulturama. Kriterijumi na osnovu kojih se vrši selekcija sojeva za starter kulture su aktivnost izolata u mleku, sinteza ekstracelularnih proteinaza, diacetila, egzopolisaharida i bakteriocina.

BMK koje ulaze u sastav starter kultura bi trebalo da proizvede dovoljno mlečne kiseline tako da snižavaju pH mleka ispod 5,3 za 6 sati inkubacije na 30°C (Beresford *et al.*, 2001). U radovima Herrerosa i saradnika (2003) proučavana je aktivnost izolata iz rodova *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Lactobacillus* koji su dobijeni iz kozjih sireva. Izolati identifikovani kao *Lc. lactis* subsp *lactis* imali su najbolju aktivnost u mleku nakon 6 i 24 sata inkubacije, dok izolati identifikovani kao *Ln. mesenteroides* subsp *dextranicum* i *Lb. plantarum* nisu grušali mleko nakon 24 sata inkubacije. Slični rezultati dobijeni su i u ovom radu. Najbolju aktivnost u mleku pokazuju izolati iz roda *Lactococcus*. Većina izolata identifikovanih kao *Lc. lactis* subsp. *lactis* dobro raste u mleku i nakon 6 sati inkubacije snižava pH inokulisanog mleka na 5,4 do 5. Izolati koji pripadaju biovarijetetu *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* znatno slabije rastu u mleku i ne zgrušavaju mleko ni nakon 24 sata inkubacije. Najbolju aktivnost u mleku pokazuje izolat BGGJ3-20 koji nakon 6 sati inkubacije na 30°C snižava pH inokulisanog mleka na 5. Po svojim tehnološkim svojstvima izolati BGGJ3-20 i BGGJ4-1 mogu biti uključeni u sastav starter kultura.

Svi izolati iz roda *Lactobacillus* jako sporo rastu u mleku čak i sa dodatkom glukoze i kvašćevog ekstrakta. Slab rast u mleku može se javiti zbog tipa proteinaza koje ovi sojevi sintetišu ili zbog specifičnosti oligopeptidaznog transportnog sistema (Centeno *et all.*, 1996) Laktobacili koji pokazuju slabu aktivnost bi mogli da budu uključeni u sastav starter kultura kao pomoćni sojevi s obzirom da je pokazano da imaju ulogu u ubrzanju procesa zrenja (Fitzsimons *et all.*, 1999).

Lb. plantarum BGGJ6-40 produkuje diacetil i egzopolisaharide prilikom rasta na glukozi, dok *Lb. paraplantarum* BGGJ6-16 pokazuje dobru aktivnost u

mleku i sintetiše diacetil. Kako su ova svojstva bitna za formiranje finalnih organoleptičkih karakteristika fermentisanih mlečnih proizvoda, ovi sojevi mogu biti iskorišćeni kao pomoćni starteri u industrijskoj proizvodnji

Ln. mesenteroides subsp. *cremoris* BGGJ4-27 najbolje raste u mleku od svih sojeva iz roda *Leuconostoc*. Iz literature je poznato da ova podvrsta ulazi u sastav starter kultura za meke i polutvrde sireve (Tamime, 1983). Korišćenje *Leuconostoc* vrsta u proizvodnji sireva zasniva se i na njihovoj sposobnosti da proizvode diacetil. U ovom radu izolati koji pripadaju rodu *Leuconostoc* nisu sintetisali diacetil u mleku, iako neki od njih rastu na podlogama sa citratom. Kako vrste iz roda *Leuconostoc* sintetišu diacetil samo u kometabolizmu citrata i šećera (Marty-Teyssset *et al.*, 1995), u daljem radu je neophodno analizirati sposobnost sinteze diacetila na različitim šećernim podlogama uz dodatak citrata.

U novije vreme se intenzivnije istražuje uloga *Enterococcus* sp. u procesima zrenja sireva, kao i mogućnost njihove primene u starter kulturama. Iako mnogi autori navode da enterokokalni sojevi imaju dobru proteolitičku aktivnost, Andrighetto i saradnici (2001) su ispitivanjem izolata iz italijanskih sireva došli do zaključka da samo 20% enterokokalnih sojeva snižava pH vrednost inokulisanog mleka do 5,2 nakon 16 sati inkubacije na 37°C. Produkcija diacetila u okviru ovog roda se poslednjih godina intenzivno izučava, iako su dobijeni različiti rezultati. U nekim radovima je pokazano da enterokoke mogu da sintetišu acetoin, etanol i acetaldehid ali ne i diacetil (Andrighetto *et al.*, 2001). Međutim, u novije vreme potvrđeno je da izolati iz mlečnih proizvoda koji pripadaju vrstama *En. faecium* i *En. faecalis* mogu da sintetišu diacetil u velikom procentu (Giraffa, 2003). U ovom radu *En. faecium* izolati slabo rastu u mleku ali dobro u obogaćenom mleku. Svi izolati roda *Enterococcus* sa tipičnim fenotipskim karakteristikama ovog roda sintetišu diacetil.

Veliki broj enterokokalnih sojeva sintetiše bakteriocine tkz. enterocine koji su značajni zbog moguće primene u industriji hrane s obzirom da sprečavaju rast bakterija iz roda *Listeria* (Giraffa, 2003). Dva *En. faecium* izolata BGGJ5-2 i BGGJ7-6 pokazuju antimikrobijalnu aktivnost ukoliko se kao indikator soj koristi *Lc. lactis* subsp. *lactis* MN1-596. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je antimikrobna supstanca proteinske prirode tj. da se radi o bakteriocinima. Da bi se utvrdila tačna priroda ove supstance potrebno je uraditi dalju karakterizaciju bakteriocina.

ZAKLJUČAK

Na osnovu tehnološke karakterizacije izolata dobijenih iz autohtonog sira utvrđeno je da izolati imaju različita tehnološka svojstva. Sojevi BGGJ3-20, BGGJ4-1, BGGJ4-27, BGGJ6-16, BGGJ6-40, BGGJ5-2, BGGJ7-3 i BGGJ7-6 koji poseduju najmanje dve osobine koje se koriste kao kriterijumi za

selekciju startera za industrijsku proizvodnju mogu da uđu u sastav definisanih starter kultura.

LITERATURA

- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J and Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheese. *J. Dairy Research*. **68**: 303-316.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, **11**:259-274.
- Centeno, A.J., Cepedo, A. and Rodriguez-Otero, L.J. 1996. Lactic Acid Bacteria Isolated from Arzua Cow`s Milk Cheese. *Int. Dairy J.*, **6**: 65-78.
- Fitzsimons, N. A, Cogan, T.M., Condon, S and Beresford, T., 1999. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. *Appl. and Environ. Microb.*, vol65, 8: 3418-3426
- Gilliland, E.S. 1985. Role of starter culture bacteria in food preservation. *Bacterial starter cultures for food*. Edited by Stanley E. Gilliland, CRC Press, Inc/ Florida, p:176-184.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Rev. Int. J.Food Microbiol.*, **88**: 215-222.
- Herreros, M.A., Fresno, M.J., Prieto, G. and Tornadijo, M.E. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (A Spanish goat`s milk cheese). *Int. Dairy J.*, **13**: 469-479.
- Joković, N. 2004. Izolacija i karakterizacija bakterija mlečne kiseline iz sira sa planine Radan, magistarski rad, Biološki fakultet, Beograd.
- Marty-Teyssset, C., Loklema, J.S., Schmitt, P., Divies, C. and Konings, W.N. 1995. Membrane potential-generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*. *J.Biol. Chem.*, **270**: 25370-25376.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**: 1-29.
- Tamime, A.Y. 1983. *Microbiology of starter cultures*: cit.ed. Robinson R.K: Dairy Microbiol., Elsevier Sci. Publishing, New York.

SUMMARY

TECHNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RADAN'S CHEESE

Nataša Joković¹, D. Savić¹, Maja Vukašinić², Lj. Topisirović³

¹Faculty of Technology, Leskovac

²Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade

³Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade

Isolation of lactic acid bacteria from artisanal dairy products is base for selection of new strains with properties which are important for their industrial application. In this work, characterization of 69 strains isolated from home-made cheese from mountain Radan was done. Characterization of isolates included examination of their acidifying activity, proteolytic activity and production of diacetyl, exopolysaccharides and antimicrobial substances. Isolates from genus *Lactococcus* showed the best acidifying activity, while lactobacilli grew slowly in milk. The most isolates from genera *Lactococcus* i *Lactobacillus* synthesized extracellular proteinases, while isolates identified as *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* showed weak acidifying activity. Two isolates of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. diacetyllactis, all isolates of *En. faecium* with typical phenotypical characteristics and 3 isolates of the genus *Lactobacillus* were able to produce diacetyl. All isolates identified as *Ln. mesenteroides* (except one identified as subspecies *cremoris*) were able to produce dextran growing on medium with sucrose and also some isolates from the genus *Lactobacillus* produced exopolysaccharides. Only two isolates of *En. faecium* produced bacteriocins.