

# Morfološke i biohemijske karakteristike prirodnih izolata bakterija mlečne kiseline izolovanih iz Zlatarskog sira

Vesković Moračanin Slavica<sup>1</sup>, Borović Branka<sup>1</sup>, Velebit Branko<sup>1</sup>

*S a d r Ź a j:* U radu su izolovani i ispitani sojevi bakterija mlečne kiseline izdvojeni iz Zlatarskog sira, koji je proizveden u skladu sa načelima tradicionalne proizvodnje. Na odgovarajućim selektivnim podlogama (MRS agar, GM17 agar) izolovano je 96 sojeva bakterija mlečne kiseline. Svi izolati su dalje podvrgnuti ispitivanjima koja su obuhvatila Gram pripadnost, ćelijsku morfologiju, katalaza i oksidaza reakciju, stvaranje ugljen-dioksida iz glukoze, rast na različitim temperaturama (4°, 10°, 15°, 37° i 45°C), različitim vrednostima pH (4,5 i 6,5), u sredinama sa različitim koncentracijama soli (2%, 3%, 4,5% i 6,5%), stvaranje sluzi i ispitivanje acidogene aktivnosti. Izvršeno je preliminarno ispitivanje sposobnosti stvaranja nespecifičnih metabolita – bakteriocina. Determinacijom ovih sojeva pomoću API CHL 50 i Rapid ID 32 Strep testa utvrđeno je da ispitani izolati pripadaju rodovima: *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*. Kod 9 izolata utvrđeno je stvaranje antimikrobnih metabolita – bakteriocina.

**ključne reči:** bakterije mlečne kiseline, prirodni izolati, Zlatarski sir, karakterizacija.

## Uvod

Paralelno sa industrijalizacijom i standardizacijom savremene proizvodnje, proizvodnja sireva bazirana na tradicionalnim principima predstavlja značajno obeležje jednog naroda, država i regija. Tradicionalni način prerade mleka u sir još uvek je značajno zastupljen u našoj zemlji, kako kod individualnih proizvođača, tako i u poluindustrijskim pogonima. Ovakav način proizvodnje ima za posledicu širok spektar različitih vrsta sireva na tržištu, kao i sireva sa neujednačenim kvalitetom. Vrlo često se nazivaju „majstorski“ sirevi, jer su proizvedeni po tradicionalnim tehnologijama koje se prenose sa generacije na generaciju, bez upotrebe komercijalnih starter kultura. Primenom starter kultura, koje su uobičajene u industrijskoj proizvodnji, postigla bi se uniformnost sireva i standardizacija kvaliteta, ali bi se značajno promenila njihova senzorska svojstva koja ih sada čine prepoznatljivim na tržištu.

Zlatarski sir je jedan od najznačajnijih predstavnika domaćih autohtonih belih sireva u salamuri. Proizvodi se od nekuvanog punomasnog kravljeg mleka u okolini Nove Varoši, u podnožju i na obroncima

planine Zlatar (Vesković Moračanin i dr., 2012a; Vesković Moračanin i dr., 2012b). Autentičnost sireva zlatarskog podneblja, u odnosu na ostale sireve istog tipa, ali drugih regija, bazirana je na osobenosti autohtone mikroflora, prvenstveno bakterija mlečne kiseline (BMK), koje su nosioci mlečne fermentacije i procesa zrenja sireva. Pored osobenosti, važan element je i njihova raznolikost koja se ogleda u zastupljenosti velikog broja različitih vrsta BMK, ali i sojeva u okviru jedne vrste, koji, kao rezultat svoje metaboličke aktivnosti, dovode do nastanka gotovog proizvoda specifičnog ukusa (Vesković Moračanin i dr., 2013; Topisirović i dr., 2007). Dominantnost određene vrste BMK direktno zavisi od vrste mleka, porekla životinje, načina ishrane, vrste i kvaliteta pašnjaka, nadmorske visine i dr. (Topisirović i dr., 2006). Zbog svega toga, autohtone BMK predstavljaju značajan potencijal u oblasti selekcije tehnološki i protektivno značajnih vrsta ili sojeva koji, primenjeni u domaćoj proizvodnji, mogu dovesti do nastanka zdravstveno bezbednog i proizvoda ujednačenog, standardizovanog kvaliteta (Vesković Moračanin i Obradović, 2010, Radulović i dr., 2008; Mijačević i Bulajić, 2007; Barros i dr., 2008). Takođe,

**Napomena:** Rad je rezultat realizacije Projekata integralnih i interdisciplinarnih istraživanja, Evidencioni br. III 46009 i III 46010, koje u periodu 2011–2014. god. finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

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

njihova fiziološka, biohemijska, potencijalna protektivna svojstva i molekularno-genetske osobine daju osnovu za selekciju i odabir specifičnih sojeva BMK karakterističnih za određene regione. Proizvodnja sopstvenih (domaćih) starter kultura, sastavljenih od dobro izučених prirodnih izolata BMK, je osnova za dobijanje proizvoda sa deklaracijom specifičnog geografskog porekla (*Ostojić i Topisirović, 2006*).

Cilj ovoga rada bio je da se ispita i definiše dominantna mikroflora BMK koja je nosilac procesa fermentacije i zrenja Zlatarskog sira; da se izoluju čiste kulture BMK; da se utvrde njihove najvažnije morfološke i biohemijske karakteristike i potencijalna bakteriocinska svojstva kao deo preliminar-nih parametara u ispitivanju mogućnosti njihove šire primene u proizvodnji Zlatarskog sira.

## Materijal i metode

Sojevi BMK su izolovani iz četiri uzorka Zlatarskog sira koji su imali poželjna senzorska svojstva karakteristična za ovu vrstu sira (prijatan ukus i miris, dobra konzistencija i karakteristična aroma). Osnovna senzorska svojstva sira (spoljašnji izgled, boja, izgled preseka, konzistencija, miris i ukus), bila su visoko ocenjena, sa rasponom ocena od 4,2 do 4,8. Pripadali su I kategoriji sireva sa ocenom „odličan“ i sa % maksimalnog kvaliteta iznad 90.

### Izolacija BMK

Nakon uzorkovanja sira (20 g iz unutrašnjosti kriške sira), test uzorak za ispitivanje homogenizovan je sa 180 mL sterilnog 2% natrijum-citrata. Decimalna razblaženja ( $10^{-1}$  do  $10^{-7}$ ) pripremana su sa sterilnim fiziološkim rastvorom (0,85% NaCl). Po 1 mL svakog decimalnog razblaženja zasejavano je na selektivne podloge i inkubirano na određenim temperaturama karakterističnim za ispitane bakterije mlečne kiseline.

Laktobacili su izolovani metodom razblaženja zasejavanjem na MRS agara (Merck, Nemačka), u mikroaerofilnim uslovima (Anaerocult C mini, Merck, Nemačka) i inkubiranjem tokom 72h i 48h na temperaturama od 30°C i 37°C, respektivno. Nakon toga, „pikirane“ su različite kolonije izrasle na MRS agaru i trostruko prečišćavane (nazmenično ploča – bujon) u cilju dobijanja čistih kultura.

Određivanje okruglastih oblika bakterija mlečne kiseline, tj. laktokoka i enterokoka, vršeno je na M17 agaru (Merck, Nemačka) kome je dodato 0.5% glukoze (GM17 agar). Zasejane ploče inkubirane su na 30°C tokom 48h. Trostruko prečišćavanje izolovanih sojeva vršeno je na isti način kao kod laktobacila.

Dobijeni izolati BMK čuvani su u odgovarajućim medijumima sa 15% glicerola (w/v), na temperaturi od –80°C. Pre upotrebe, svaki izolat BMK dva puta je supkultivisan u 10 mL odgovarajućeg bujona (MRS ili GM17 sa 1% inokuluma, 24h na 30°C, odnosno na 37°C).

### Određivanje osnovnih morfoloških i fizioloških svojstava izolata BMK

Karakterizacija izolata BMK, bazirana na njihovim morfološkim i fiziološkim svojstvima, vršena je u skladu sa postupcima i analitičkim koracima koje je postavio Sharpe još 1979 (*Sharpe, 1979*). Naime, izolovane čiste kulture BMK determinisane su pomoću klasičnih mikrobioloških metoda, koje su obuhvatile ispitivanje Gram pripadnosti, ispitivanje ćelijske morfologije, određivanje katalaza i oksidaza reakcije. Sledeća analitička faza bila je primena biohemijskih kitova, API CHL 50 i Rapid ID 32 Strep test (Bio-Mérieux, Francuska), u cilju preliminarne identifikacije, prvenstveno vrsta BMK. Za očitavanje rezultata ovih testova u radu je korišćen softverski paket API Web.

Pripadnost metaboličkoj grupi (homo- ili heterofermentativni put razlaganja šećera) određivana je tako što je u epruvetu sa odgovarajućom tečnom podlogom koja sadrži šećer (glukoza), kojoj je dodata Durhamova cevčica, zasejavano po 0,1 mL ispitivane kulture BMK i, nakon inkubacije (24h, na 37°C tj. na 30°C), utvrđivano je prisustvo ili odsustvo gasa u cevčici.

Odnos izolata BMK prema soli (halotolerantnost) ispitana je zasejavanjem i inkubacijom u odgovarajućim hranljivim bujonima sa 2%, 3%, 4,5% i 6,5% NaCl. Na isti način određen je rast izolata BMK pri različitim temperaturama sredine (4°, 10°, 15°, 37° i 45°C) i različitim vrednostima pH medijuma (4,5 i 6,5). Navedena ispitivanja ponovljena su tri puta.

Osobina produkcije egzopolisaharida izolata BMK određena je ispitivanjem prisustva sluzi po površini zasejanog bujona, nakon inkubacije od 24–48h, na odgovarajućim temperaturama.

### Utvrdjivanje potencijalne bakteriocinske aktivnosti izolata BMK

Utvrdjivanje potencijalne bakteriocinske aktivnosti izolata BMK vršeno je metodom agar-difuzije („agar well-diffusion“ metod), (*Schillinger i Lucike, 1989*).

Ispitani izolati BMK su preko noći inkubirani u MRS bujonu na 37°C, odnosno u GM17 bujonu na 30°C. Nakon toga, po 1 mL bujonske kulture

prenošen je u mikrokivetu od 2 mL (Sarstedt, Nemačka) i centrifugirano tokom 10 minuta na 10000 obrtaja/min (centrifuga – Genofuge 16M, Techne, USA). Zatim je po 100 µL supernatanta prebacivano u dve mikrokivete; prvoj mikrokiveti je dodavano 50 µL 0,1 M KOH radi neutralisanja nastalih kiselih metabolita, a drugoj 10 µL proteinaze K (AppliChem – 600 m Ansou U/mL). Supernatant sa proteolitičkim enzimom termostatiran je 1 h na 37°C.

Istovremeno, pripremljene su i ploče sa test-mikroorganizmom (*Listeria monocytogenes* ATCC 19111). U BHI agar ((HiMedia, Indija) sa nižim sadržajem agara (10 g/L), inokulisana je 18-časovna kultura *L. monocytogenes* (0,1 mL kulture koncentracije  $10^7$ – $10^8$  ćelija/mL dodavano je na 100 mL osnovne podloge). Metalnim diskom, posle hlađenja podloge, pravljena su udubljenja u agaru zapremine, približno, 100 µL. Nakon toga, količina od 100 µL ispitivane kulture BMK je prebacivana u bunarčice u agaru i posle osnovne difuzije (30 min. na 4°C) ploče su termostatirane preko noći na 30°C.

Pored antilisterijske aktivnosti, ispitana je i potencijalna antimikrobna aktivnost izolata BMK u odnosu na *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Esherichia coli* ATCC 11303.

## Rezultat i diskusija

Na bazi preliminarnih analitičkih koraka (Gram-pripadnost, mikroskopski pregled u cilju utvrđivanja ćelijske morfologije, katalaza i oksidaza reakcija) odabrano je 96, potencijalno, različitih izolata BMK. Rezultati ispitivanja su pokazali

dominantno prisustvo okruglih/okruglastih oblika (83), dok je 13 izolata imalo štapičastu formu. Dalja determinacija izolata BMK je nastavljena pomoću biohemijskih kitova, API CHL 50 i Rapid ID 32 Strep, gde je, na osnovu biohemijskih reakcija i fizioloških osobina, utvrđena pripadnost rodu i, potencijalno, vrsti BMK (tabela 1).

Rezultati dobijeni upotrebom softverskog paketa API Web pokazali su da odabrani izolati (46) pripadaju rodu *Lactococcus* (41 pripada izolat *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 3 izolata pripadaju *Lactococcus garviae* i 2 izolata *Lactococcus* spp.). Rodu *Enterococcus* pripada 34 izolata (svi izolati su determinisani kao *Enterococcus faecalis*), dok je u rod *Lactobacillus* svrstano 13 izolata (11 izolata *Lactobacillus plantarum* i 2 izolata *Lactobacillus sakei*/*Lactobacillus curvatus*). Kao *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* identifikovano je 3 izolata.

BMK predstavljaju heterogenu grupu Gram-pozitivnih, katalaza i oksidaza-negativnih mikroorganizama. Zahvaljujući svojim metaboličkim svojstvima (stvaraju mlečnu kiselinu iz glukoze) nosioci su mlečnokiselinske fermentacije, procesa zrenja, razvoja konačnog ukusa i nutritivnih karakteristika fermentisanog proizvoda i imaju direktan uticaj na održivost gotovog proizvoda (Beresford i dr., 2001; Leroy i De Vuyst, 2004). Nastala mlečna kiselina utiče na nekoliko značajnih elemenata u procesu proizvodnje sireva, kao što je aktivnost koagulanata, kvalitet gruš, reološka svojstva sireva, vlažnost i dr. (Cogan i dr., 1997).

Mikroflora sira može se podeliti u dve grupe: starterni BMK i sekundarni mikroorganizmi ili nestarterni BMK (NSBMK) (Beresford i dr., 2001).

**Tabela 1.** Preliminarna identifikacija BMK izolata na bazi fizioloških osobina i Api testa

**Table 1.** Preliminary identification of LAB isolates based on physiological properties and Api test

BMK – Rod/ LAB – Genus	Broj izolata/ Number off isolated	BMK – Vrste/ LAB – Species	Broj izolata/ Number off isolates
<i>Lactococcus</i> spp.	46	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus garviae</i> <i>Lactococcus</i> spp.	41 3 2
<i>Enterococcus</i> spp.	34	<i>Enterococcus faecalis</i>	34
<i>Lactobacillus</i> spp.	13	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus sakei</i> / <i>Lactobacillus curvatus</i>	11 2
<i>Leuconostoc</i> spp.	3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	3
Ukupan broj izolata BMK/total number of LAB isolates			96

**Tabela 2.** Potvrdni test potencijalne bakteriocinske aktivnosti izolata BMK  
**Table 2.** Confirmatory test of the potential bacteriocin activity of LAB isolates

Bujonska kultura/ Broth cultures	Neutralisani bujon/ Neutrolized broth	Katalaza test/ Catalase test	Proteinaza test/ Proteinase test
+++	+++	+++	---

+++ izražena antimikrobna aktivnost/expressed antimicrobial activity

--- nema antimikrobne aktivnosti/no antimicrobial activity

NSBMK je termin koji se koristi da bi se opisala sporedna bakterijska flora sposobna da raste pod selektivnim uslovima zrenja sira. Ove bakterije mogu biti rezultat sastava mleka, ili posledica postpasterizacijske kontaminacija iz sirarske opreme ili okolne sredine (McSweeney i dr., 1993). Nalaze se, uglavnom, u tradicionalnim sirevima koji su proizvedeni u specifičnim ekološkim nišama. Ispitivanja su pokazala da su NSBMK 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 NSBMK koje su karakteristične za svaki region gde se sir proizvodi (McSweeney i dr., 1993). Zbog svega toga, danas je povećan interes za razvojem specifičnih starternih mikroorganizama sačinjenih od prirodnih izolata BMK, čijom primenom bi se omogućila bolja kontrola procesa proizvodnje i nastanak proizvoda ujednačenog kvaliteta. Primena NSBMK našla bi svoj značaj u poluindustrijskim i industrijskim uslovima proizvodnje tradicionalnih sireva.

Relativno visoka učestalost enterokoka u Zlatarskom siru ne iznenađuje, budući da se enterokoke javljaju u različitim tipovima evropskih sireva, naročito u sirevima pripremljenim iz sirovog ili pasterezovanog mleka (Cogan i dr., 1997). Smatra se da je izvor enterokoka u mleku i siru feces, kontaminirana voda, mlekarska oprema, loši higijenski uslovi ili pretrpani prostori za skladištenje (Gelsomino i dr., 2001). Iako je rod *Enterococcus* donedavno smatran indikatorom fekalne kontaminacije, danas se vrste ovog roda smatraju normalnom mikroflorom u hrani koja pozitivno utiče na razvoj specifičnih organoleptičkih karakteristika sira (Giraffa i dr., 1997; Fuller, 1989).

Svi izolati BMK (96) rasli su na 37°C i na 15°C, dok 15 izolata BMK loptastog oblika nije raslo na 45°C. Prisustvo dominantnih mezofilnih BMK je bilo očekivano (Macedo i dr., 1995; Radulović i dr., 2004). Mezofilna mikroflora je bila znatno zastupljenija od termofilne, što je u skladu sa tehnologijom izrade Zlatarskog sira (u procesu proizvodnje, pre postupka podsiravanja, ne postoji faza dogrevanja mleka), kao i sa samom klimom zlatarske regije

(umerena kontinentalna klima, bez visokih temperatura).

Svi izolati pripadaju grupi katalaza i oksidaza negativnih mikroorganizama.

Testiranjem pripadnosti homo- ili heterofermentativnom tipu razlaganja ugljenih hidrata (glukoze) utvrđeno je da 5 izolata BMK vrši fermentaciju šećera heterofermentativnim putem, dok ostali 91 izolat BMK fermentiše glukozu bez stvaranja gasa.

Svi izolati BMK rasli su u sredinama sa različitim sadržajem soli (2%, 3%, 4,5% i 6,5%), kao i u sredinama sa kiselošću od 4,5 i 6,5. S obzirom da se tehnologija izrade Zlatarskog sira zasniva na upotrebi relativno velikog procenta soli (aproksimativno šaka soli na red kriški u bačvama), otpornost izolata BMK i njihova sposobnost da rastu u sredinama sa većim % soli može se smatrati jednom od njihovih fizioloških karakteristika (Radulović i dr., 2004).

Tri izolata BMK stvarala su sluz na tečnoj podlozi za rast.

Utvrđeno je da od 96 ispitanih izolata BMK poreklom iz Zlatarskog sira, njih 9 pokazuje potencijalnu produkciju antimikrobnih jedinjenja, bakteriocina. Šest izolata *Lc. lactis* ssp. *lactis* i 3 izolata *E. faecalis* imali su tipičan profil u potvrđnom testu koji se koristi za utvrđivanje bakteriocinske aktivnosti, u podlozi sa *L. monocytogenes* (tabela 2).

Izvedeni test sa proteolitičkim enzimom, proteinazom K, (proteinaza test) doveo je do inaktivacije delovanja bakteriocina, čime je na indirektan način potvrđena njegova proteinska priroda (Joerger i sar., 2000).

U odnosu na izabrane test-mikroorganizme, svi izolati BMK pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost u odnosu na *L. monocytogenes*, dok je dejstvo na *S. aureus* i *E. coli* izostalo (tabela 3).

U prilog ovim rezultatima govore i nalazi drugih autora (Schilinger, 1990; Abbe, 1995) koji ukazuju na činjenicu da je inhibitorna aktivnost bakteriocina BMK dominantna, uglavnom na Gram-pozitivne bakterije. Velika taksonomska bliskost pozicija roda *Listeria* rodu *Lactobacillus* uslovljava visoku osetljivost *Listeria* vrsta prema bakteriocinima produkovanim od strane bakterija *Lactobacillus* spp. (Ludvig



**Tabela 3.** Antimikrobna aktivnost izolata BMK poreklom iz Zlatarskog sira  
**Table 3.** Antimicrobial activity of LAB isolates originating from Zlatar cheese

Test-mikroorganizmi/ Test microorganisms	Antimikrobna aktivnost izolata BMK/ Antimicrobial activity of LAB isolates <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (6 izolata/isolates), <i>E. faecalis</i> (3 izolata/isolates)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	+++
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	–
<i>E. coli</i> ATCC 11303	–

+++ izražena antimikrobna aktivnost/expressed antimicrobial activity

– nema antimikrobne aktivnosti/no antimicrobial activity

*i dr.*, 1984; Ruhland i Fiedler, 1987; Wilkinson i Jones, 1977).

Istraživanja iz oblasti antimikrobnog dejstva bakteriocina BMK, uglavnom, se, iz istog razloga, i proveravaju u odnosu na *L. monocytogenes* (Daeschel, 1989; Schillinger i Lücke, 1989, Vesković Moračanin, 2012), kao test mikroorganizam.

## Zaključak

Proizvodnja sira, kao i drugih proizvoda od mleka, ima dugu tradiciju izrade na području Balkana. Ovi proizvodi mogu predstavljati vredan izvor bakterija mlečne kiseline s obzirom da naseljavaju

različite ekološke niše. Naši rezultati daju značajan doprinos u istraživanju raznolikosti mikrobnih zajednica u Zlatarskom siru. Na temelju ovog istraživanja dobijene su nove informacije o ekologiji BMK i njihovim karakteristikama, ali je dat doprinos istraživanju BMK populacije u sirevima ovoga tipa, u celini. Ostale tehnološke i fiziološke karakteristike izolata koje mogu da utiču na konačan odabir i pripremu startera za proizvodnju sira biće analizirani u daljim eksperimentima. Naravno, neophodno je sprovesti i detaljnu, molekularno-genetsku, analizu izolovanih BMK, kako bi njihova potencijalna tehnološka primena, u proizvodnji Zlatarskog sira, bila u najskorije vreme realizovana.

## Literatura

- Abbe T., 1995. Pore-forming bacteriocins of gram-positive and self-protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiology Letters, 129, 1–10.
- Barros J. J. C., Azevedo A. C., Rossi D. A., Moura C. J., Penna A. L. B., 2008. Biochemical and sensorial changes in Parmesan cheese manufactured with autochthonous starters of *Lactobacillus helveticus*. 5th IDF Symposium on cheese ripening. Abstract book, Bern, Switzerland, 9–13 March 2008, 146.
- Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan, N. L., Cogan T. M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11, 259–274.
- Cogan T. M., Barbosa M., Beuviel E., Bianchi Salvadore B., Cocconelli P. S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M. C., Rodriguez E., 1997. Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal Dairy Research, 64, 409–421.
- Daeschel M. A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology, 43, 1, 164–167.
- Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriology, 66, 365–378.
- Gelsomino R., Vancanneyt M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T. M., 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar – type cheesemaking factory. International Journal of Food Microbiology, 71, 177–188.
- Giraffa G., Canniuti D., Neviani E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. Journal of Food Protection, 60, 732–738.
- Joerger R. D., Hoover D. G., Barefoot S. F., Harmon K. M., Grinstead D. A., Nettles-Cutter, C. G., 2000. Bacteriocins. In: Lederberg, editor. Encyclopaedia of microbiology, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edition. San Diego: Academic Press, Inc. 383–397.
- Leroy F., De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, 15, 67–78.
- Ludwig W., Schleifer K. H., Stackebrandt E., 1984. 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. FEMS Microbiol. Lett. 25, 199–204.
- Macedo C. A., Maicata X. F., Hoog A. T., 1995. Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. Journal of Applied Bacteriology, 79, 1–11.

- 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.
- Mijačević Z., Bulajić S., 2007. Prirodna mikroflora tradicionalnih sireva. *Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi*, 18, 1–2, 43–46.
- Ostojić M., Topisirović Lj., 2006. Geografska oznaka porekla autohtonih sireva. *Ekonomika poljoprivrede*, 53, 3, 591–604.
- Radulović Z., Martinović A., Radin D., Obradović D., 2004. Bakterije mlečne kiseline izolovane iz sjeničkog sira. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 20, 3–4, 49–54.
- Radulović Z., Petrović T., Paunović D., Mirković N., Obradović D., 2008. Karakterizacija autohtonog soja *Lactobacillus paracasei* 08 na potencijalne probiotske sposobnosti. *Prehrambena industrija*, 1–2, 23–7.
- Ruhland G. J., Fiedler F., 1987. Occurrence and biochemistry of lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 9, 40–46.
- Schillinger U., Lücke F. K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901–1906.
- Schilinger U., 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biotechnology, Food Quality*, 55–74.
- Sharpe M. E., 1979. Identification of Lactic Acid Bacteria. In: *Identification Methods for Microbiologists*, Skinner, F.A. and D.W. Lovelock (Eds.). Academic Press, London, 233–259.
- Topisirović Lj., Kojić M., Fira D., Golić N., Strahinić I., Lozo J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 230–235.
- Topisirović Lj., Veljović K., Terzić Vidojević A., Strahinić I., Kojić M., 2007. Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Genetika*, 39, 2, 125–138.
- Vesković Moračanin S., Obradović D., 2009. The microbiological ecosystem of traditional fermented sausages in Serbia – Possibility to create our own starter cultures. *Tehnologija mesa*, 50, 1-2, 60-67.
- Vesković Moračanin Slavica, 2012. Uticaj faktora sredine na intenzitet antimikrobne aktivnosti bakteriocina. *Tehnologija mesa*, 53, 2, 157-165.
- Vesković Moračanin S., Mirecki S., Trbović D., Turubatović L., Kurćubić V., Mašković P., 2012a. Traditional manufacturing of white cheeses in brine in Serbia and Montenegro: Similarities and differences. *Acta Periodica Technologica*, 43, 107–113.
- Vesković Moračanin S., Rašeta M., Karan D., Trbović D., Turubatović L., Šaponjić M., Škrinjar M., 2012b. Zlatarski sir – karakteristike tradicionalne proizvodnje i prikaz nekih parametara kvaliteta. *Veterinarski glasnik*, 66, 1–2, 85–96.
- Vesković Moračanin S., Borović B., Velebit B., 2013. Basic characteristics of natural isolates of lactic acid bacteria, *Proceedings, International 57<sup>th</sup> Meat Industry Conference*, 10-12<sup>nd</sup> June 2013, Belgrade, Serbia, 205–208.
- Wilkinson B. J., Jones D., 1977. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *Journal of General Microbiology*, 98, 399–421.

## Morphological and biochemical characteristics of natural isolates of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese

Vesković Moračanin Slavica, Borović Branka, Velebit Branko

*S u m m a r y:* In this research study, lactic acid bacteria (LAB) have been isolated from Zlatar cheese and subsequently scrutinized. The Zlatar cheese has been manufactured as an artisanal product. A total of 96 LAB strains have been isolated using selective media (MRS agar and GM17 agar, respectively). All isolates have been scrutinized using the following: Gram staining, cell morphology, catalase and oxidase reactions, production of carbon-dioxide converted from glucose, growth at the different temperatures (4°, 10°, 15°, 37° and 45°C), at different pH values (4.5 and 6.5) and different salt concentrations (2%, 3%, 4.5% and 6.5%), slime formation and testing of acidogenic activity. Preliminary testing on non-specific metabolites – bacteriocines has been conducted also. Determination of the strains using API CHL 50 and Rapid ID 32 Strep tests indicated that isolates tested belong to the following genera: *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Lactococcus*. A total of 9 strains have been confirmed positive on antimicrobial metabolites – bacteriocines synthesis.

Rad primljen: 19.08.2013.

Rad ispravljen: 5.09.2013.

Rad prihvaćen: 5.09.2013.