

BIOHEMIJSKE AKTIVNOSTI SELEKTOVANIH SOJEVA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE¹

Aleksandra Martinović, R. K. Abrahamsen, D. Obradović²

Sadržaj: U ovom radu su prikazani rezultati istraživanja biohemijske aktivnosti selektovanih sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz autohtonih fermentisanih mlečnih proizvoda sa područja Crne Gore i Srbije kao i ispitivanje mogućnosti primene ovih sojeva u industrijskoj proizvodnji. Utvrđen je nivo rasta ispitivanih sojeva tokom fermentacije u UHT mleku u trajanju od 24h, sposobnost produkcije ugljen-dioksida, sposobnost stvaranja/ razlaganja pojedinih šećera, organskih kiselina, kao i sposobnost stvaranja isparljivih komponenti koje bitnije utiču na aromu krajnjeg proizvoda. Analize ispitivanja sposobnosti stvaranja šećera, organskih kiselina i isparljivih komponenti vršene su primenom tehnike direktne headspace gasne hromatografije (AutomaticDirect Headspace Gas Chromatography) (HSGC) i tečne hromatografije (High-PerformanceLiquid Chromatography), (HPLC). Ispitivani sojevi pokazali su značajan nivo biohemijskih aktivnosti koje ih mogu svrstati u potencijalne starter kulture za industrijsku proizvodnju različitih fermentisanih mlečnih proizvoda.

Ključne reči: Bakterije mlečne kiseline (BMK), HPLC, HCGC.

Uvod

Metabolička aktivnost bakterija mlečne kiseline (BMK) uvek je zauzimala značajno mesto u proizvodnji i konzerviranju različitih vrsta namirnica. Tradicionalna proizvodnja fermentisanih proizvoda odvijala se bez dodavanja određenih, definisanih starter kultura. Danas, moderna industrija teži standardizaciji proizvodnje, obezbeđivanju kvaliteta i higijenskoj ispravnosti proizvoda, pa se u cilju ispunjenja svih ovih uslova koristi i dodavanje aktivnih starter kultura.

¹ Originalni naučni rad – Original scientific paper

² Dr Aleksandra Martinović: Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija i Crna Gora; Dr Roger K. Abrahamsen: Agricultural University of Norway, Dept. of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Ås, Norway; Dr Dragojlo Obradović, Poljoprivredni fakultet Zemun, Odsek za tehnološku mikrobiologiju, Beograd, Srbija i Crna Gora

Većina kultura, koje se danas koriste u proizvodnoj praksi, predstavljaju prirodne izolate BMK za koje je dokazano da imaju efekta u poboljšanju kvaliteta proizvoda. Uloga ovakvih startera je da rade brže i pouzdanije od prirodne mikroflore, da imaju dejstvo koje se može predvideti i kontrolisati, a da pritom, nemaju štetan uticaj na kvalitet proizvoda i zdravlje potrošača. U cilju sticanja što boljeg uvida u karakteristike BMK koje se koriste kao starteri neophodno je izvršiti njihovu tačnu identifikaciju kako na nivou vrste tako i u cilju diferencijacije različitih sojeva koji pripadaju istoj vrsti. Sojevi selektovani u ovom istraživanju determinisani molekularnim metodama od strane *Martinović i sar.* (2005).

Da bi došlo do uspešne primene sojeva BMK u mlekerskoj industriji, neophodno je, pored tačne klasifikacije i determinacije istih, utvrditi i biohemijske reakcije koje se odigravaju aktivnošću ovih bakterija kada se one koriste kao starter kulture u mlekerskoj industriji (*Cogan, 1996; Escamilla-Hurtado i sar., 1996; Henriksen i Nilsson, 2001*). Tehnike direktne headspace gasne hromatografije (Automatic Direct Headspace Gas Chromatography) (HSGC) i tečne hromatografije (High-Performance Liquid Chromatography), (HPLC), prilagođene za ovu vrstu ispitivanja daju kompletnu sliku metaboličkih sposobnosti svakog od ispitivanih sojeva BMK (*Narvhus i sar., 1998*).

Ova istraživanja imala su za cilj ispitivanje biohemijskih karakteristika BMK izolovanih iz fermentisanih mlečnih proizvoda Srbije i Crne Gore u cilju njihove buduće primene kao starter kultura u različitim granama mlekarske idustrije.

Materijal i metod rada

Sojevi bakterija mlečne kiseline izolovani su iz autohtonih fermentisanih mlečnih proizvoda sa područja Srbije i Crne Gore. Nakon fizioloških testova i genetske determinacije izvršenoj od strane *Martinović i sar.* (2005) od ukupno 23 soja izdvojeno je njih 3 (ABO 57-1 i ABO19-3, za koje je utvrđeno da pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (označeni kao sojevi A i M respektativno) i soj ABO19-2 koji pripada vrsti *Lactobacillus plantarum* (označen ako soj L)) koji su podvrgnuti daljoj analizi. Sojevi čuvani u glicerolu na -80°C subkulturirani su tri puta u M17 bujonu (Merck, Germany) za laktokoke i MRS bujonu (Merck, Germany) za laktobacile na 30°C tokom noći, pre finalne inkubacije.

Uzorci za analizu, tokom fermentacije u UHT mleku (TINE, Norway) uzimani su na svakih 0, 3, 6, 9, 12 i 24 časa. Za svako vreme uzorkovanja, za utvrđivanje broja bakterija pravljen su razređenja (10^{-2} – 10^{-8}) u

sterilnoj destilovanoj vodi te je, potom, zasejavano po 1 ml ovih razređenja na odgovarajuće agarne ploče. Broj bakterija mlečne kiseline (BMK) bio je određivan zasejavanjima u Petri ploče na MRS agaru (Merck, Germany) i M17 agaru (Merck, Germany) koje su inkubirane na 30°C u trajanju od 24h za laktokoke i 48h za laktobacile.

Kvantitativna analiza produkcije ugljen dioksida je determinisana putem IR CO₂ aparata (ADC 225 Mk3, analytical development, Hoddesdon, Hertfordshire, UK) po metodi razrađenoj od strane *Narvhus i sar. (1991)*. Stabilna struja azota (0,3 l/ min) je propuštana kroz detektorsku ćeliju i stabilnost protoka je vizuelno proveravana Gilmontovim aparatom za merenje protoka (Cole-Parmer Instrument, Chicago, USA). Kontrolna ćelija je konstantno snabdevana vazduhom bez CO₂. Odgovor detektora praćen je Shimatzu C-R3A Chromatopac integratorom (Shimatzu, Kyoto, Japan). Kalibracija odgovora detektora bazirala se na oslobađanju različitih koncentracija CO₂ (0- 4000 mg/kg) iz rastvora natrijum bikarbonata poznate koncentracije. Staklena tuba koja se analizirala manuelno je miksana u trajanju od 2 minuta. Uzorci gasa za analizu su iz tube uzimani upotrebom jednokratnog plastičnog šprica od 1ml i direktno su injektovani u gumenu cev koja aparat snabdeva azotom. Svaki uzorak je dvostruko injektovan i na kraju je izračunavana srednja vrednost, dok je stabilnost sistema proveravana na svaki sat između analiza injektovanjem 0,5 ml standardnog gasa koji sadrži 10% CO₂ u azotu (Hydrogas, Porsgrunn, Norway).

Isparljive komponente su kvantifikovane uz korišćenje automatske direktne headspace gasne hromatografije (Automatic Direct Headspace Gas Chromatography- HSGC). Uzimano je 10 ml uzorka u staklenu tubu (20CV, Chromocol, Welwyn, Garden City, UK) koja je zapečaćena sa aluminijumskim zatvaračem (20-CBT3, Chromocol). Isparljive komponente razdvajane su na GC koloni, Supelco SPB-1TM: 30m X 0.53 mm I.D., debljine filma od 5µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Odgovor detektora bio je sniman Turbochrom Chromatography radnom stanicom v4.1 (Perkin Elmer). Analize su eksterno kalibrisane korišćenjem standardnih rastvora pripremljenih u sterilnom (10% v/v) rekonstituisanom mleku u prahu (TINE, Norway). Sledeće komponente su korišćene kao referentne: acet-aldehid (Fluka, Buchs, Switzerland), etanol (Vinmonopolet, Oslo, Norway), aceton (Tokyo Kasei, Japan), diacetil (Sigma) i acetoin (Merck, Germany).

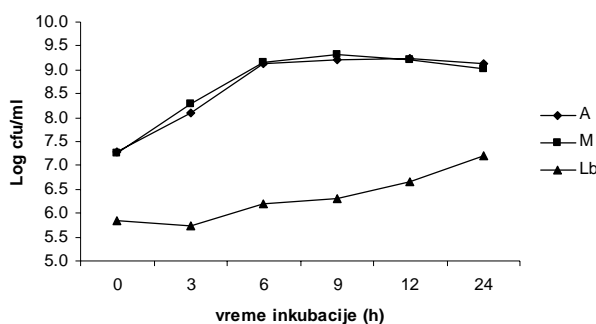
Organske kiseline i ugljeni hidrati kvantifikovani su primenom tačne hromatografije (High-Performance Liquid Chromatography), (HPLC) kako je opisano do strane *Narvhus i sar. (1998)*. Jednom gramu uzorka dodavano je 0.2 ml 0.5M H₂SO₄, 2,5 ml dejonizovane vode i 8 ml acetonitrila (Rathburn Chemicals) i to je miksano 30 minuta (Multifix, WEG, Germany). Nakon centrifugacije (3500 rpm, 10 min) (Kubota 2010,

Tokyo, Japan) i filtarcije (0.2 μm MFS-13 PTFE filter, Advantec MFS, California, USA), 25 μl uzorka je injektovano u HPLC (Perkin Elmer), sa UV/VIS detektorom na 210 nm. Mobilna faza bila je H_2SO_4 pri protoku od 0.4 ml/min a temperatura kolone bila je 30°C. Odgovor detektora bio je sniman Turbochrom Chromatography radnom stanicom v4.1 (Perkin Elmer). Organske kiseline bile su identifikovane na osnovu upoređenja njihovog retencionog vremena sa standardnim rastvorima sledećih kiselina: limunske, orotične, piruvinske, sukcinke, mlečne, mravlje, sirćetne, ureinske, propionske i buterne (Sigma). Analiza je eksterno kalibrisana uz korišćenje standardnih rastvora u dejonizovanoj vodi.

Analiza varijanse i LSD test za rezultate dobijene u ovom istraživanju urađeni su primenom statističkog softvera STATISTICA 6.0 (StatSoft). Opisani termini poređeni su na tri nivoa značajnosti: statistički veoma značajan ($P < 0.01$), statistički značajan ($P < 0.05$) i nije statistički značajan ($P > 0.05$).

Rezultati istraživanja i diskusija

Nakon inokulacije (0h), L fermentacija imala je znatno niži broj pokretljivih mikroorganizama (5.83 log CFU) u poređenju sa fermentacijama A i M (7.28 i 7.24 log CFU respektativno). Sojevi A i M pokazali su slične nivoe rasta i dostigli su maksimum (9.22 i 9.23 log₁₀ cfu ml⁻¹ respektativno) i stacionarnu fazu nakon 9 h inkubacije, dok soj L svoj maksimum od 7.21 log₁₀ cfu ml⁻¹ dostiže tek nakon 24h inkubacije. Utvrđene razlike u nivou rasta između sojeva A i M i soja L pokazale su da se soj L odlikuje sporijim rastom u UHT mlijeku u poređenju sa druga dva ispitivana soja.

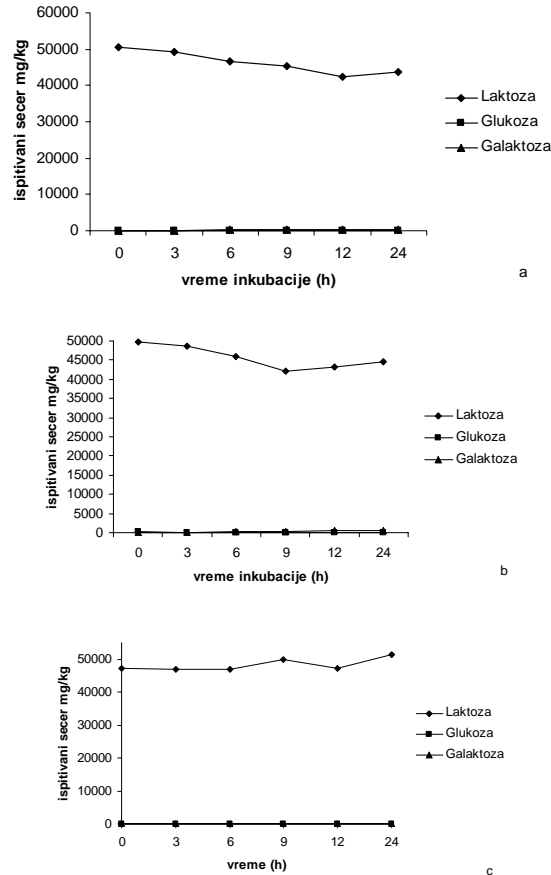


Grafik 1. Rast BMK u UHT mleku tokom perioda fermentacije
Graph 1. The growth of LAB in UHT milk during the fermentation period

Sojevi A, M i L stvorili su 126,891, 120, 242 i 17, 382 mg/kg CO₂ respektativno. Nivo stvorenog ugljen dioksida bio je u korelaciji sa metabolizmom citrata i budući da su svi sojevi homofermentativni *Martinović i sar. (2005)* stvorene količine ovog gasa bile su zanemarljive.

Laktoza je najvažniji šećer za fermentaciju koji BMK metabolišu da bi obezbedile energiju. Inicijalni sastav laktoze u mleku bio je oko 4.7-5.2 g 100⁻¹. Količina laktoze koja je iskorišćena bila je skoro ista za sve tri izučavane fermentacije. Vreme redukcije laktoze variralo je i bilo je sporije tokom prvih 9 sati fermentacije, ali je do intenzivnijeg razlaganja došlo tokom poslednjih 12h fermentacije. Koncentracija glukoze opadala je kod svih ispitivanih fermentacija, pa je nakon 24h imala prosečne vrednosti od 45.59, 40.92 i 101. 18 mg/kg za sojeve A, M i L respektativno. Sojevi A i M odlikovali su se intenzivnijom sposobnošću razlaganja glukoze u poređenju sa sojem L. Tako je kod sojeva A i M prosečna vrednost glukoze u medijumu iznosila 4.6 i 4.5 mg/kg respektativno, za razliku od soja L gde je ona bila 4.8 mg/kg. Galaktoza se akumulirala kod svih uzoraka, sa maksimumom u poslednjih 12h inkubacije. Najveća koncentracija galaktoze zabeležena je kod soja M (631.20 mg/kg), dok se soj L odlikovao jako niskim nivoom sinteze galaktoze sa prosečnom vrednošću od 78.96 mg/kg.

Rezultati analize varijanse pokazali su da je uticaj soja, vremena kao i interakcije ova dva faktora bio statistički veoma značajan ($P < 0.01$) za sintezu/razlaganje ispitivanih šećera.



Grafikon 2. Promene u sastavu šećera kod fermentacija sa sojevima: a) A, b) M i c) L
Graph 2. Changes in sugar content in fermentations with strains a) A, b) M and c) L

Usvajanje laktoze kod laktokoka najčešće se odigrava kroz specifični fosfoenol- piruvat (PEP)- zavisni fosfotransferazni sistem (PTS), u kojem se produkti hidrolize laktoze, glukoza i galaktozo-6- fosfat, dalje metabolišu do mlečne kiseline (Hickey i sar., 1986, Hutkins i Morris, 1987). Usled toga, akumulacija galaktoze kod A i M fermentacija bila je jako interesantna. Ovakav metabolizam bio je uočen i kod *Streptococcus thermophilus* (Thomas i Crow, 1984, Hickey i sar., 1986, Hutkins i Morris, 1987) a takođe i kod mutanata nekih industrijskih sojeva (Benthin i sar., 1987). *S. thermophilus*-u nedostaje PEP-PTS aktivnost i umesto nje on poseduje laktozo- permeazni sistem.

Dok se glukoza dalje metaboliše do mlečne kiseline, galaktoza se izbacuje kroz laktozo- galaktozo antiport mehanizam (Hutkins i Morris,

1987). Laktokoke, pored β -P- galaktozidaze, posjeduju i β - galaktozidazu (Thomas i Crow, 1984), pa će organizam iskorišćavati samo galaktozu kada je količina glukoze ograničena. Fermentacija laktoze od strane BMK je obično ograničena niskom pH vrednošću, koja inhibira starterne organizme (Narvhus i sar.,1998). Laktoza nije ograničavajući faktor. Galaktoza se verovatno izbacuje iz ćelije da bi se ova zaštitila od inhibitorne intracelularne koncentracije a u isto vreme izbacivanje služi kao potencijalna pokretačka sila za reakcije koje zahtevaju energiju (Hutkins i Ponne, 1991).

Limunska kiselina bila je iskorišćavana u sve tri fermentacije. Inicijalna koncentracija limunske kiseline kretala se u rasponu od 2036-2147 mg/kg. Svi su sojevi metabolisali citrate ali je brzina redukcije varirala u zavisnosti od soja. Soj M je ispoljio najveći stepen degradacije citrata do 9h inkubacije, za razliku od sojeva A i L kod kojih je citrat dostigao najnižu vrednost nakon 12h inkubacije.

Sirćetna, mlečna, piruvinska, mravlja i ureinska kiselina stvarane su kod sve tri ispitivane fermentacije, gde su veće količine zabeležene kod A i M fermentacija, dok se L fermentacija odlikovala niskim nivoom sinteze ovih organskih kiselina. Prosečne vrednosti stvorene sirćetne kiseline kod sojeva A i M bile su 178.23 i 188.69 mg/kg, mlečne kiseline 3.7 i 3.4 mg/kg, piruvinske kiseline 9.07 i 11.5 mg/kg i mravlje kiseline 46.42 i 48.68 mg/kg, respektativno. Soj L pokazao je najslabiju sposobnost sinteze ovih kiselina sa maksimalnom količinom stvorenom nakon 24h inkubacije. Rezultati analize varijanse za limunsku i sirćetnu kiselinu pokazali su da je na razlaganje/ sintezu ovih kiselina uticaj različitih sojeva, vremena i interakcije ova dva faktora bio statistički veoma značajan ($P < 0.01$).

Iz navedenih rezultata lako je uočiti da je sintezi sirćetne kiseline prethodila redukcija limunske, pa inicijalnoj koncentraciji limunske kiseline od 2036- 2147 mg/kg, odgovara količina stvorene sirćetne kiseline, što se poklapa sa rezultatima dobijenim od strane Hilde Ostile i sar. (2003) za homofermentativne sojeve BMK.

Mravlja kiselina takođe predstavlja važan metabolit kod fermentacija vezanih za BMK. Laktokoke mogu proizvoditi format aktivnošću piruvat/format lijaze (Teuber, 1995). Nadalje, kako navodi Hugenholtz (1993), fermentacija citrata vodi do mešavine produkata koja uključuje laktat, acetat, format, acetoin, diacetil i 2,3-butanediol.

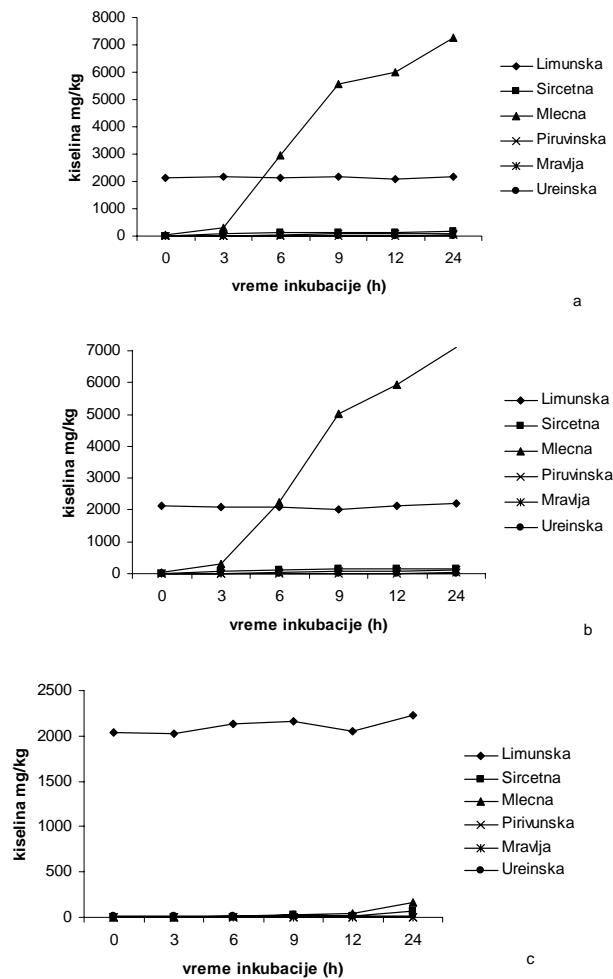
Nivo ureinske kiseline svoj maksimum dostizao je nakon 9h inkubacije kod sojeva A i L, a nakon 12h kod soja M. Svi sojevi u proseku stvorili su približno iste količine ureinske kiseline- 16.42, 15.95 i 13.04 za sojeve A, M i L respektativno.

Rezultati analize varijanse pokazali su da je sposobnost sinteze ureinske kiseline statistički veoma značajna između različitih sojeva ($P < 0.01$),

značajna u zavisnosti od vremena inkubacije ($P < 0.05$) i opet, statistički veoma značajna kada se posmatra interakcija ova dva faktora ($P < 0.01$).

S obzirom da su sva tri izučavana soja homofermentativna i da se ne odlikuju stvaranjem CO_2 (Martinović, 2005), ovde ne možemo govoriti o intenzivnom metabolizmu citrata.

Koncentracija laktoze u medijumu ne predstavlja ograničavajući faktor za sintezu mlečne kiseline, već nivo fermentacije laktoze ograničava produkciju mlečne kiseline koja s vremenom inhibira starterne organizme (Narvhus i sar., 1998).

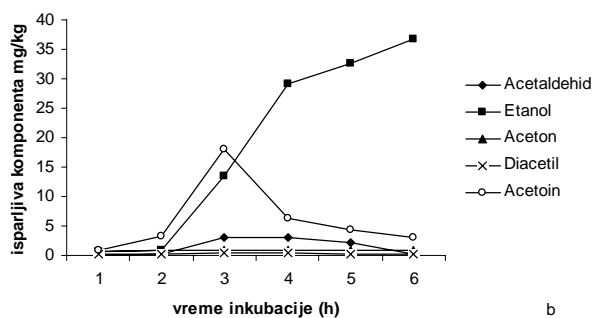
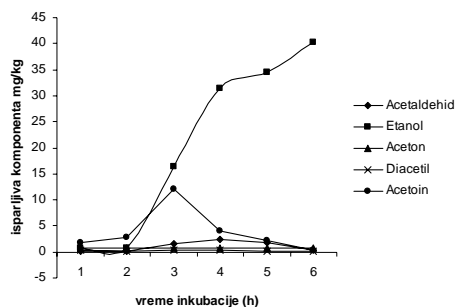


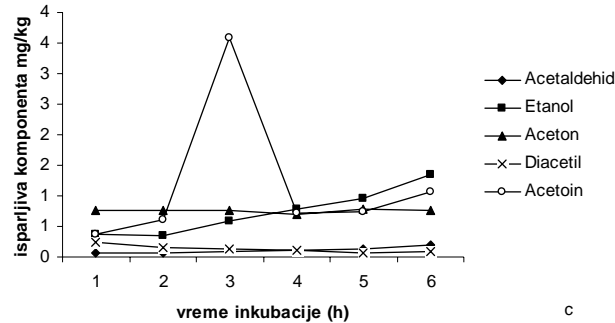
Grafik 3. Promene u sastavu organskih kiselina kod ispitivanih fermentacija
Graph 3. Changes in the content of organic acids in examined fermentations

Najveća količina acetaldehida stvorena je nakon 9h fermentacije sa sojem M – 3.10 mg/kg, dok je najslabiju aktivnost u pogledu stvaranja ove komponente pokazao soj L sa maksimalnom količinom od 0.12 mg/kg u periodu od 9-12h inkubacije.

Produkcija diacetila i acetoina bila je zavisna od nivoa metabolizma citrata. Obe komponente su se najviše akumulisale tokom prvih 9h inkubacije, a potom njihova koncentracija opada. Maksimalna koncentracija stvorenog diacetila bila je u M fermentaciji, 0.49 mg/kg nakon 6h inkubacije. Koncentracija acetoina maksimum dostiže nakon 9h inkubacije, gde je najveća vrednost zabeležena kod soja M, 19.07 mg/kg i minimalnim nultim vrednostima.

Vrednosti stvorenog etanola razlikovale su se između različitih fermentacija, pa je kod fermentacija sa sojevima A i M koncentracija bila u proseku 20.712 i 18.902 mg/kg respektativno, a maksimalne vrednosti za ove sojeve od 41.09 do 36.97 mg/kg, postignute su nakon 24h inkubacije. Soj L sintetisao je znatno niže količine etanola, prosečno 0.771 mg/kg sa maksimumom od 2.03 mg/kg nakon 24h inkubacije. Tokom svih fermentacija koncentracija etanola se povećavala analogno dužini trajanja inkubacije, a maksimalne vrednosti dostignute se nakon 24h.





Grafik 4. Promene u koncentraciji isparljivih komponenti kod fermentacija sa sojevima:
a) A, b) M i c) L

Graph 4. Changes in concentration of volatile compounds in fermentations with strains
a) A, b) M and c) L

Rezultati analize varijanse pokazali su da je na sintezu acet aldehyda statistički veoma značajno uticala vrsta soja koji se upotrebljavao u fermentaciji ($P < 0.01$), na sintezu diacetila i acetoina statistički značajno uticala je vrsta soja ($P < 0.05$), vreme je bilo od statistički veoma značajnog uticaja ($P < 0.01$), dok interakcija ova dva faktora nije bila statistički značajna ($P > 0.05$). Na sintezu etanola uticaj sva tri ispitivana faktora bio je statistički veoma značajan ($P < 0.01$).

Svi ispitivani sojevi stvorili su neznatne količine acetona i prosečno stvorene vrednosti bile su u intervalu od 0.749 do 0.793 mg/kg. Analiza varijanse pokazala da je na sintezu acetona veoma značajno uticalo vreme zrenja, vrsta soja i interakcija ova dva faktora.

BMK proizvode različite količine acet- aldehyda i etanola tokom svog rasta (Gonzales i sar., 1994). Akumulacija acetaldehyda u medijumu zavisi od toga da li organizam ima aktivne enzime koji konvertuju ovu komponentu u druge metabolite, u prvom redu etanol (Gonzales i sar., 1994). U našem istraživanju rezultati pokazuju da je kod sva tri izučavana soja u toku fermentacije došlo do smanjenja koncentracije acetaldehyda i povećanja koncentracije etanola, što ukazuje da je u toku fermentacije došlo do redukcije acet- aldehyda do etanola, a to se poklapa sa rezultatima dobijenim od strane Gran i sar. (2003).

Nadalje, svi ispitivani sojevi proizveli su količine acetaldehyda koje nemaju značajan uticaj na senzorne karakteristike proizvoda, što ukazuje na činjenicu da je specifična aktivnost enzima koji fermentuje acetaldehyd manja od specifične aktivnosti enzima koji acetaldehyd fermentuje do etanola (Gonzales i sar., 1994).

Diacetil se ireverzibilno redukuje do acetoina, acetoin- reduktazom i, u sledećem koraku, acetoin se reverzibilno redukuje do butandiola istim enzimom (*Hugenholtz i Starrenburg, 1992*).

Prosečni nivoi diacetila i acetoina kod sojeva testiranih u ovom istraživanju su bili relativno niski 0.226- 0.131 i 14.856-1.176 mg/kg. Moguće je da su diacetil i acetoin bili dalje metabolisani do 2.3 butandiola čiji sadržaj nije utvrđivan u ovom istraživanju. Citrat je možda metabolisan do piruvata, pa potom do ostalih proizvoda.

Zaključak

Nakon testiranja sposobnosti rasta ispitivanih selektovanih sojeva u UHT mleku utvrđeno je da sojevi A i M postižu maksimum i stacionarnu fazu nakon 9h inkubacije (9.22 i $9.23 \log_{10}$ cfu ml⁻¹ respektativno), dok soj Lb maksimalan rast dostiže nakon 24h inkubacije ($7.21 \log_{10}$ cfu ml⁻¹). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su ispitivani sojevi pokazali očekivani rast i da mogu naći primenu kao industrijske starter kulture.

Stvaranje/ razlaganje šećera bilo je ujednačeno kod svih sojeva, pa je redukcija laktoze bila 4.6, 4.5 i 4.8 g 100⁻¹, akumulacija galaktoze: 280, 631.120 i 78.96 mg/kg a nivo razlaganja glukoze bio je prosečno: 45.59, 40.92 i 101.18 mg/kg za sojeve A, M i L respektativno. Aktivni metabolizam šećera kod BMK vodi do snižavanja pH vrednosti medijuma (usled sinteze mlečne kiseline), te se na taj način povećava održivost proizvoda i stvaraju mikroslovi nepovoljni za razvoj patogene mikroflore. Tome ide u prilog i činjenica da su se svi ispitivani sojevi odlikovali približno istim nivoima stvaranja/razlaganja ispitivanih organskih kiselina, među kojima u prvom redu mlečne kiseline.

Najveću sposobnost sinteze acetaldehida ispoljio je soj M. Sojevi A i M sintetisali su u proseku 20. 712 i 18.902 mg/kg etanola za razliku od soja L koji je sintetisao svega 2.03 mg/kg etanola. Acetoin i diacetil akumulirali su se najviše nakon prvih 9h inkubacije.

Iz svega gore navedenog može se zaključiti da se sva tri ispitivana soja odlikuju specifičnom i poželjnom metaboličkom aktivnošću, tako da bi njihova primena kao starter kultura u mlekarskoj industriji mogla dovesti do dobijanja proizvoda zadovoljavajućeg kvaliteta i održivosti.

BIOCHEMICAL ACTIVITIES OF SELECTED STRAINS OF LACTIC
ACID BACTERIA

Aleksandra Martinović , R. K. Abrahamsen, D. Obradović

Summary

In this paper the results of the research on biochemical activities of selected strains of Lactic Acid Bacteria, isolated from indigenous fermented milk products of Serbia and Montenegro have been shown. The growth rate of the selected strains has been examined during 24 hrs period of time as well as carbon dioxide production ability, ability of production/degradation of specific sugars, organic acids and rate of production of volatile compounds that are significantly influencing the aroma of the final products. The analyses for determination of synthesis of sugars, organic acids and volatile compounds have been done by automatic direct headspace gas chromatography (HCGC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The examined strains have shown significant level of biochemical activities that can introduce them to the group of potential starter cultures for industrial production of different fermented milk products.

Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), HPLC, HCGC.

Literatura

1. Cogan, T.M. (1996): History and taxonomy of starter cultures. In T. M. Cogan, & J.-P. Accolas (Eds.), Dairy starter cultures (pp.1–20). New York: VCH Publishers Inc.
2. Escamilla-Hurtado, M.L., Tomasini-Campocoso, A., Valde's-Marti' - nez, S., Soriano-Santos, J. (1996): Diacetyl formation by lactic bacteria. Rev. Latinoam. Microbiol. 38, 129– 137.
3. Gran, H.M., Gadaga, H.T., Narvhus, J.A. (2003): Utilization of various starter cultures in the production of Amasi, a Zimbabwean naturally fermented raw milk product. Int. J. Food Micr., 88, 19-28.
4. Gonzales, S., Morata de Ambrosini, V., Manca de Nadra., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. (1994): Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. J. Food Prot. 57, 436-440.
5. Henriksen, C.M., Nilsson, D. (2001): Redirection of pyruvate catabolism in *Lactococcus lactis* by selection of mutants with

- additional growth requirements. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 767–775.
6. Hickey, M. W., Hillier, A.J., Jago, R.G. (1986): Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative *Lactobacilli*. Appl. Environ. Microbiology 51, 825-831.
 7. Hugenholtz, J., 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12, 165–178.
 8. Hugenholtz, J., Starrenburg, M.J.C.(1992): Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 17-22.
 9. Hutkins, R. W., Morris, H.A.(1987): Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. J. Food Prot. 50, 876-884.
 10. Hutkins, R. W., Ponne, C. (1991): Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for galactose- lactose antiporter. Appl. Environ. Microbiology 57, 941- 944.
 11. Martinović, A., Radulović Z., Wind A., Janzen T., Obradović D. (2005): Isolation ad characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. Acta Veterinaria, Vol.55,No. 4, pp. 307-318, Beograd.
 12. Narvhus, J.A., Østeraas, K., Mutukumira, T., Abrahamsen, R.K., 1998. Production of fermented milk using a malty compound producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. Int. J. Food Microbiol. 41, 73–80.
 13. Narvhus, J.A., Hulbækdal, A., Baugerød, H., Abrahamsen, R.K. (1991): Measurement of CO₂ production and O₂ metabolism by pure and mixed cultures of lactic acid bacteria growing in milk. Actes du colloque Lactic, vol. 91. Centre de Publications de l'Universite de Caen, Caen, France, p. 371.
 14. Ostile, H. M., Helland, M.H., Narvhus, J.A.(2003): Growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. Int. J. Food Microbiol. 87, 17-27.
 15. Teuber, M. (1995): The genus *Lactococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzappel, W.H. (Eds.), The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, London, pp. 173-234.
 16. Thomas, T.D., Crow, V.L. (1984): Selection of galactose fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose- limited chemostat cultures Appl. Environ. Microbiology 48, 186-191.