

DOI: 10.7251/VETJ1602004B

UDK 502.51:504.5:669.018.674

Milijana Babić, Radoslava Savić Radovanović, Aleksandra Nikolić, Silvana Stajković*

Stručni rad

METABOLIČKA AKTIVNOST TERMOREZISTENTNIH MIKROORGANIZAMA

Kratak sadržaj

Termorezistentni mikroorganizmi, zahvaljujući otpornosti na termičke tretmane koji se primenjuju u industriji mleka, kao i mogućnostima rasta i metaboličkim aktivnostima u uslovima čuvanja gotovih proizvoda, imaju značaja kao mikroorganizmi kvara. Ova osobina definiše tehnološki značaj termorezistentnih mikroorganizama.

Među populacijom termorezistentnih mikroorganizama, *Bacillus* spp. pokazuju značajnu proteolitičku aktivnost, a s obzirom na njihovo svojstvo razlaganja kazeina, potencijal njihove proteolize može se uspešno koristiti u koagulaciji mleka i zrenja sireva. Veliki značaj imaju proteinaze *Bacillus subtilis*, čiji se proteolitički enzimi uspešno primenjuju u proizvodnji Chedar, Munster i Camembert sira. Suprotno ovome, aktivnost proteina za *Bacillus* spp. u sterilisanom mleku, u uslovima neadekvatnog čuvanja dovodi do slatkog grušanja ili pojave gorkog ukusa mleka, kao rezultat nastanka gorkih peptida, dok preterana aktivnost proteinaza bacila pri proizvodnji Chedar sira uslovljava gruš mekše konzistencije, veći sadržaj proteina i masti u surutki, što dovodi do smanjenog randmana sira za 10%. Oslobođanjem nižih masnih kiselina delovanjem lipolitičkih enzima poreklom od mikroorganizama, razvija se neprijatan ukus i miris, što predstavlja manu poznatu pod imenom hidrolitička užeglost. Od termorezistentnih mikroorganizama, sposobnost hidrolize masti pokazuju mikroorganizmi roda *Bacillus*.

Cilj ovog rada bio je da se ispita sposobnost termorezistentnih mikroorganizama izolovanih iz mleka da razlažu proteine, masti i skrob, što dovodi do kvara mleka i proizvoda od mleka.

* Vet. spec. Milijana Babić, stručni saradnik, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd, Srbija;

Doc. dr Radoslava Savić Radovanović, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd, Srbija (mimica@vet.bg.ac.rs);

Aleksandra Nikolić, student Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd, Srbija;

Mr. sc. Silvana Stajković, biohemičar, stručni saradnik, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd, Srbija;

* Department for hygiene and technology of food, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Belgrade, Republic of Serbia

Adresa korespondentnog autora/ Address of Corresponding Author: mimica@vet.bg.ac.rs

Od ukupno 80 izolata termorezistentnih mikroorganizama, proteolitičku aktivnost je ispoljilo 35 (43,75%) izolata u uslovima inkubacije pri 30°C/72h i 30 (37,50%) izolata u uslovima inkubacije pri 20±2°C/72h, dok nijedan izolat nije ispoljio proteolitičku aktivnost u uslovima inkubacije pri 10±1°C/10 dana. Amilolitička aktivnost je utvrđena kod 16 (20,0%) izolata u uslovima inkubacije pri 30°C/72h i 15 (18,75%) izolata u uslovima inkubacije pri 20±2°C/72h. Amilolitička aktivnost termorezistentnih mikroorganizama izostaje u uslovima inkubacije pri 10±1°C/10 dana. Ispitivani izolati termorezistentnih mikroorganizama nisu pokazali lipolitičku aktivnost, bez obzira na primenjene različite uslove inkubacije.

Ključne reči: *termorezistentni mikroorganizmi, amilolitička aktivnost, proteolitička aktivnost, lipolitička aktivnost.*

Milijana Babić, Radoslava Savić Radovanović, Aleksandra Nikolić, Silvana Stajković

Professional work

METABOLIC ACTIVITY OF HEAT-RESISTANT MICROORGANISMS

Abstract

Heat-resistant microorganisms, thanks to their resistance to thermal treatments are applied in the dairy industry, and growth opportunities, as well as metabolic activity in the conditions of storage of final products, are important as spoilage microorganisms. This attribute defines technological significance of heat-resistant microorganisms.

Among a population of heat-resistant microorganisms, *Bacillus* spp. shows a significant proteolytic activity, and due to its caseolytic activity, proteolytic potential can be successfully applied in the coagulation of milk and cheese ripening. Proteinases produced by *Bacillus subtilis* has great importance and are successfully used in the production of Cheddar, Munster and Camembert cheese. However, the activity of proteinase *Bacillus* spp. in sterilized milk in inadequate storage conditions, leads to the sweet coagulation, or occurrence of sweet or bitter taste of milk as a result of the formation of bitter peptides, while excessive activity of bacillus proteinases in production process of Cheddar cheese causes soft curd consistency, a higher content of proteins and fat in the whey, which leads to reduced dressing of cheese for 10%. Release of low fatty acids due to activity of lipolytic enzymes from a microorganisms, develops an unpleasant taste and odor, which is a foible known as hydrolytic rancidity. Among heat-resistant microorganisms, bacteria of the genus *Bacillus* show the ability to hydrolyse fats.

The aim of this study was to examine the ability of heat-resistant microorganisms,

isolated from milk to degrade proteins, fats and starches, which can lead to spoilage of milk and milk products.

Out of 80 isolates of heat-resistant microorganisms, proteolytic activity showed 35 (43.75%) isolates in condition of incubation at 30°/72h and 30 (37.50%) isolates under conditions of incubation at 20 ±2°C/72h, while neither isolate showed proteolytic activity under conditions of incubation at 10±1°C/10 days. Amylolytic activity was found in 16 (20.0%) isolates under conditions of incubation 30°C/72h and 15 (18.75%) isolates under conditions of incubation at 20±2°C/72h. The heat-resistant microorganisms did not show amylolytic activity under conditions of incubation at 10±1°C/10 days. Investigated thermoresistant bacteria did not show lipolytic activity, regardless of the applied different incubation conditions.

Key words: *heat-resistant microorganisms, amylolytical activity, proteolytic activity, lipolytic activity*

UVOD/INTRODUCTION

Kvalitet i trajnost mleka i proizvoda od mleka u najvećoj meri zavisi od njegove higijenske ispravnosti. Mleko, od momenta dobijanja, preko transporta i u toku prerade, izloženo je velikim mogućnostima zagađenja. Zbog svog hemijskog sastava mleko je sredina veoma pogodna za razvoj velikog broja mikroorganizama. Mikroorganizmi koji se nalaze u mleku kao kontaminanti dospevaju iz kanala i sa površine vimena, preko uređaja za mužu, ljudi koji rade na muži, iz vazduha, vode, hrane, transportnih cisterni, kao i tokom prerade mleka. Time se kao imperativ nameće neophodna primena termičke obrade mleka. U mlekarskim industrijama primenjuju se temperature pasterizacije radi uništenja patogenih i redukcije saprofitnih mikroorganizama. Među saprofitnim mikroorganizmima postoje mikroorganizmi koji preživljavaju temperature pasterizacije i mogu biti sporigene i nesporogene Gram-pozitivne

bakterije. Termorezistentni mikroorganizmi definišu se kao oni mikroorganizmi koji preživljavaju 30 minuta pri temperaturi 63-65°C. Pojedini mezofilni mikroorganizmi imaju termorezistentne spore koje preživljavaju visoke termičke režime, i po završenoj termičkoj obradi postoji mogućnost isključavanja spora koje se potom razmnožavaju u uslovima čuvanja proizvoda ili u uslovima zrenja sireva. Termorezistentni mikroorganizmi poseduju enzime kojima mogu da hidrolizuju kazein i mast, što dovodi do kvara mleka, ako se u procesu proizvodnje i čuvanja stvore uslovi za njihov rast i razmnožavanje. Prisustvo termorezistentnih mikroorganizama, koji ispoljavaju proteolitičku aktivnost, u sterilisanom mleku tokom njegovog skladištenja dovodi do slatkog grušanja ili pojave gorkog ukusa. Takvo mleko nije prihvatljivo za upotrebu. U proizvodnji sireva, proteolitička aktivnost ima za posledicu gruškije konzistencije. Zahvaljujući sposobnosti formiranja endospora i

biofilmova, termofilni bacili služe kao higijenski indikatori u mlekarskoj proizvodnji (Burgess i sar., 2010). Intenzivnijim ispitivanjima određenih vrsta bacila poslednjih decenija, utvrđeno je da pojedini sojevi mogu stvarati toksine, pa se predstavnicima roda *Bacillus* pridodaje atribut patogenosti i kao takvi predstavljaju rizik po zdravlje potrošača. *Bacillus cereus* produkuje veći broj toksina od kojih su dva toksina odgovorna za manifestaciju dijarejičnog odnosno emetičnog sindroma (Melling i sar. 1976). Takođe, neki od fakultativnih termofila uključujući *B. licheniformis*, *B. pumilis* i *B. subtilis* mogu da proizvode toksine samo pri mezofilnim temperaturama (De Jonghe i sar., 2010; Oh i Cox, 2009).

Termofilni mikroorganizmi imaju sposobnost stvaranja kiselina i termostabilnih enzima, uključujući lipaze i proteinaze, koje dovode do kvara mlečnih proizvoda (Chen i sar., 2004; Gundogan i Arik, 2004; Murugan i Villi, 2009).

U industriji mleka, termofilni bacili se dele u dve grupe i to na: obligatne i fakultativne termofilne mikroorganizme. Obligatni termofili rastu na višim temperaturama (približno 40-68°C) uključujući *Anoxybacillus flavithermusi* *Geobacillus* spp. (Ronimus i sar., 2003; Scott i sar. 2007). Fakultativnim termofilima pripadaju bakterije roda *Bacillus* koje rastu na termofilnim i mezofilnim temperaturama u zavisnosti od soja, kao što su *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus sporothermodurans* i *Bacillus subtilis* (Ronimus i sar., 2003; Schedeman i sar., 2005).

Termorezistentni mikroorganizmi su često i uzročnici kvara namirnica, jer

poseduju lipolitičke i proteolitičke enzime, koji imaju sposobnost da menjaju supstrat oslobađajući gorke peptide i masne kiseline palećeg ukusa.

Proteoliza pod uticajem mikroorganizama može teći do različitog stepena, uključujući peptide, aminokiseline, amonijak, sve do slobodnog azota. Neke od njih izazivaju slatko grušanje. Proteolitičke bakterije koje ne stvaraju spore pripadaju rodovima *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*. Proteolitičke sporogene bakterije su otporne na delovanje visokih temperatura, pa mogu preživeti pasteurizaciju. Mogu se naći u pasteurizovanom mleku i proizvodima napravljenim od njega. Tu spadaju mnoge vrste iz roda *Bacillus* i *Clostridium*.

Proteinaze su enzimi koji katalizuju hidrolizu peptidnih veza unutar peptidnih lanaca. Diferencijacija unutar ove grupe enzima se postiže na osnovu specifičnosti peptidnih veza koje grade određene amino kiseline, kao i na osnovu strukture katalitičkog centra. Prema katalitičkom centru, odnosno koje bočne grupe aminokiselina ga čine, proteinaze se klasifikuju u četiri tipa: serinske, aspartične, cisteinske i metaloproteinaze. Proteinaze *Bacillus* spp. većinom pripadaju tipu serinskih i metaloproteinaza (Fira, 1998).

Lipolitičke bakterije sintetišu enzime lipaze, koje vrše razgradnju mlečne masti uz oslobađanje masnih kiselina i glicerida. Oslobađanje nižih masnih kiselina dovodi do neprijatnog mirisa i ukusa, što se naziva hidrolitička užglost (Đorđević, 1982). Lipolitičke bakterije imaju sposobnost rasta na niskim temperaturama (5°C), što otežava zaštitu proizvoda od njihovog delovanja. Najznačajniji predstavnici lipolitičkih bakterija su vrste

rodova *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella* i *Bacillus*.

CILJ

Cilj ovog rada bio je da se ispita sposobnost termorezistentnih mikroorganizama izolovanih iz mleka da razlažu proteine, masti i skrob, što može da ima za posledicu kvar mleka i proizvoda od mleka.

MATERIJAL I METODE /MATERIAL AND METHODS

Mikroorganizmi: 80 izolata termorezistentnih mikroorganizama iz mleka.

Proteolitička aktivnost izolata termorezistentnih mikroorganizama ispitana je na agaru sa kazeinom. Podloga sa kazeinom (3% Hranljivi agar "Torlak" + sterilno obrano mleko) zasejana je sa ispitujućim izolatima i inkubisana pri tri različite temperature (30°C; 20±2°C i 10±1°C dana). Prosvetljenja duž linije zasejavanja ispitujućeg izolata su procenjena kao pozitivan rezultat. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti izolata termorezistentnih mikroorganizama izvedeno je na tributirin agaru (Torlak), inkubacijom 72h pri 30°C, a 20±2°C i 10±1°C/10 dana, a zona prosvetljenja oko izraslih kolonija tumačena je kao lipolitička aktivnost. Sposobnost razlaganja skroba je procenjena na podlozi sa dodatkom skroba (Hranljivi agar "Torlak" + 2-3% skroba). Podloga posle inkubacije (30°C/72h, i 20±2°C i 10±1°C/10 dana) preliva se Lugolovim rastvorom, a zona prosvetljenja oko izraslih kolonija tumači kao amilolitička aktivnost.

REZULTATI I DISKUSIJA /RESULTS AND DISCUSSION

Termorezistentni mikroorganizmi, zahvaljujući otpornosti na termičke tretmane primenljive u industriji mleka, kao i mogućnosti rasta, ali i metaboličkim aktivnostima u uslovima čuvanja gotovih proizvoda, imaju značaja kao mikroorganizmi kvara. Ova osobina definiše tehnološki značaj termorezistentnih mikroorganizama.

Među populacijom termorezistentnih mikroorganizama, *Bacillus* spp. pokazuju značajnu proteolitičku aktivnost (Marino i sar., 1995; Degheidi i sar., 1996), a s obzirom na njihovo svojstvo razlaganja kazeina, potencijal njihove proteolize se može uspešno koristiti u koagulaciji mleka i zrenja sireva. Posebno dobro su okarakterisane proteinaze *Bacillus subtilis*, čiji se proteolitički enzimi uspešno primenjuju u proizvodnji Chedar, Munster i Camembert sira (Puhan, 1969). Suprotno ovome, aktivnost proteinaza *Bacillus* spp. u sterilisanom mleku, u uslovima neadekvatnog čuvanja dovodi do slatkog grušanja ili pojave gorkog ukusa mleka, kao rezultat nastanka gorkih peptida, dok preterana aktivnost proteinaza bacila pri proizvodnji Chedar sira uslovljava gruš mekše konzistencije, veći sadržaj proteina i masti u surutki, što rezultuje u smanjenom randmanu sira za 10%. Oslobođanjem nižih masnih kiselina delovanjem lipolitičkih enzima poreklom od mikroorganizama, razvija se neprijatan ukus i miris, što predstavlja manu poznatu pod imenom hidrolitička užeglost. Od termorezistentnih mikroorganizama, sposobnost hidrolize masti pokazuju bakterije roda *Bacillus*.

Tabela 1. Metabolička aktivnost termorezistentnih mikroorganizama u odnosu na supstrat i uslove inkubacije.

Supstrat	Uslovi inkubacije	Broj izolata	Broj pozitivnih	Procenat (%)
Agar sa kazeinom	30°C/72h	80	35	43,75
	20±2°C/72h		30	37,50
	10±1°C/10 dana		0	0
Podloga sa dodatkom skroba	30°C/72h	80	16	20,00
	20±2°C/72h		15	18,75
	10±1°C/10 dana		0	0
Tributirin agar	30°C/72h	80	0	0
	20±2°C/72h		0	0
	10±1°C/10 dana		0	0

Od ukupno 80 izolata termorezistentnih mikroorganizama, najveći broj 35 (43,75%) izolata je pokazao proteolitičku aktivnost u uslovima inkubacije pri 30°C/72h. U uslovima inkubacije pri 20±2°C/72h, proteoliza je utvrđena kod 30 (37,50%) izolata, a pri inkubaciji na temperaturi od 10±1°C tokom deset dana, nije utvrđena proteolitička aktivnost ispitivanih izolata (tabela 1). Na značajnu proteolitičku aktivnost bacila ukazuju i rezultati Bulajić (2001), koja je utvrdila da je od ukupno 473 ispitana soja *Bacillus* spp., proteolizu na agaru sa kazeinom pokazalo 248 (52,43%) sojeva, što je nešto veća vrednost od one koju smo mi dobili.

Amilolitička aktivnost ispitivanih izolata termorezistentnih mikroorganizama najizraženija je u uslovima inkubacije pri 30°C/72h kod 16 (20%) izolata, i pri 20±2°C/72h kod 15 (18,75%) izolata, dok se aktivnost u odnosu na skrob ne utvrđuje u uslovima inkubacije pri 10±1°C/10 dana (tabela 1). Naši rezultati pokazali su da ispitivani izolati termorezistentnih mikroorganizama ne pokazuju lipolitičku aktivnost bez obzira

na primenjene različite uslove inkubacije. Iako pojedini sojevi u okviru populacije termorezistentnih mikroorganizama pokazuju sposobnost rasta u uslovima inkubacije pri nižim temperaturama, koje ujedno predstavljaju i temeprature zrenja sireva, njihova metabolička aktivnost u odnosu na kazein i skrob nije izražena u istim uslovima inkubacije. U nekim istraživanjima (Chen i sar. 2004), za razliku od naših rezultata, lipolitička aktivnost je bila veća u odnosu na proteolitičku, ali su oba enzima preživela temperature pasterizacije od 72°C tokom dva minuta. Enzimi mogu preživeti i toplotni režim za proizvodnju mleka u prahu. Ukoliko su enzimi prisutni u mleku u prahu, oni opstaju tokom skladištenja i postaju aktivni u mlečnim proizvodima napravljenim od rekombinovanog mleka u prahu.

Naši rezultati razlikuju se od rezultata Marchand i sar. (2007), koji su dokazali da 73% termorezistentnih mikroorganizama poreklom iz mleka ispoljava proteolitičku aktivnost nakon zagrevanja uzoraka mleka pri 95°C/8,45min.

Termorezistentne bakterije poseduju enzime koji mogu da hidrolizuju kazein i masti i da na taj način kvare namirnice, ako se u procesu proizvodnje i čuvanja stvore uslovi za njihov rast i razmnožavanje. Iz literature se vidi da pojedini mezofilni mikroorganizmi imaju termorezistentne spore koje preživljavaju visoke termičke režime, ali po završenoj termičkoj obradi postoji mogućnost iskljivanja spora, koje se potom razmnožavaju u uslovima temperature ambijenta ili u uslovima zrenja sireva.

Naši rezultati se razlikuju se od rezultata Mijačević i Bulajić (1998) koje su ispitale biohemijske karakteristike *Bacillus* spp. i utvrdile da je od 108 ispitanih izolata izolovanih iz sirovog mleka, 86 (79,63%) izolata pokazalo proteolitičku aktivnost, što je veća vrednost od vrednosti koju smo mi dobili. Isti autori su utvrdili da je od 27 psihrotrofna izolata *Bacillus* spp., 23 (85,18%) izolata pokazalo sposobnost razgradnje kazeina, dok u našem ispitivanju nijedan soj nije pokazao proteolitičku aktivnost pri temperaturi od 10 °C. Iz navedenog se zapaža da nalaz *Bacillus* spp. u sirovom mleku može biti uzrok slabe održivosti termički obrađenog mleka, jer može dovesti do slatke koagulacije mleka, ili do pojave gorkog ukusa.

U prilog značaju termorezistentnih mikroorganizama govore i rezultati Oljačić i Kasalica (2006), koje su ispitale prisustvo termorezistentnih mikroorganizama, njihovu lipolitičku i proteolitičku aktivnost, kao i sposobnost rasta na temperaturama skladištenja do navedenog roka upotrebe sira. Uzorci sira uzeti su u mlekari posle proizvodnje nakon čuvanja sira šest meseci pri temperaturi od 7°C. U ispitanim uzorcima

dokazano je prisustvo termorezistentnih mikroorganizama koji su pripadali rodu *Bacillus* i *Micrococcus* i koji su pokazali psihrotrofne karakteristike, što se odrazilo na povećanje ukupnog broja mikroorganizama na kraju perioda skladištenja sira. Prisustvo ovih mikroorganizama uticalo je na trajnost i organoleptička svojstva sira. Isti autori su ustanovili kod polutvrđog sira, odmah posle proizvodnje, da je ukupan broj termorezistentnih mezofilnih mikroorganizama (2,33 log cfu/g) bio veći u odnosu na termorezistentne termofilne mikroorganizme (2,14 log cfu/g). Takođe, ukupan broj termorezistentnih mezofilnih lipolitičkih (2,22 logcfu/g) i proteolitičkih (2,16 logcfu/g) mikroorganizama bio je veći od ukupnog broja termorezistentnih termofilnih lipolitičkih (1,34 log cfu/g) i proteolitičkih (1,78 log cfu/g) mikroorganizama. Autori smatraju da je veće prisustvo termorezistentnih mikroorganizama u ispitivanom polutvrđom siru posledica lošeg kvaliteta sirovog mleka. Rezultati ispitivanja prisustva mikroorganizama u polutvrđom siru posle skladištenja šest meseci pri 7°C pokazuju da je došlo do znatnog povećanja ukupnog broja termorezistentnih mezofilnih (3,35 log cfu/g) i termorezistentnih termofilnih (3,13 log cfu/g) mikroorganizama. Uočava se da se broj termorezistentnih mikroorganizama u odnosu na početni broj povećao za jedan logaritam, a da je odnos između mezofilnih i termofilnih lipolitičkih i proteolitičkih mikroorganizama ostao nepromenjen.

ZAKLJUČAK/CONCLUSION

Od ukupno 80 izolata termorezistentnih mikroorganizama, proteoli-

tičku aktivnost je ispoljilo 43,75% izolata u uslovima inkubacije pri 30°C/72h i 37,50% izolata u uslovima inkubacije pri 20±2°C/72h, dok ni jedan izolat nije ispoljio proteolitičku aktivnost u uslovima inkubacije pri 10±1°C/10 dana. Amilolitička aktivnost je utvrđena kod 20,00% izolata u uslovima inkubacije pri 30°C/72h i 18,75% izolata u uslovima inkubacije pri 20±2°C/72h. Amilolitička aktivnost termorezistentnih bakterija izostaje u uslovima inkubacije pri 10±1°C/10 dana. Ispitivani izolati termorezistentnih mikroorganizama nisu pokazali lipolitičku aktivnost, bez obzira na primenjene različite uslove inkubacije.

LITERATURA/REFERENCES

1. Bulajić S. (2001): *Biohemijske karakteristike i patogenost vrsta roda Bacillus od važnosti za higijenu i tehnologiju mleka*. Magistarska teza, Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, str. 153.
2. Burgess A. S., Lindsay D., Flint H. S. (2010): *Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing*. International Journal of Food Microbiology.144, 215–225.
3. Chen L., Coolbear T., Daniel R. M. (2004): *Characteristics of proteinas and lipases produced by seven Bacillus sp. isolated from milk powder production lines*. International Dairy Journal 14, 495–504.
4. De Jonghe V., Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. (2010): *Toxinogenic and spoilage potential of aerobic sporeformers isolated from raw milk*. International Journal of Food Microbiology 136, 318–325.
5. Degheidi M., El-Tanboly E., Sayed A. (1996): *The use of extracted filtrate from some species of Bacillus subtilis accelerate the ripening of Ras cheese*. Egyptian Journal of Dairy Sci. 1:61-74.
6. Đorđević J. (1982): *Mleko*, INI “PKB-Agroekonomik” Beograd.
7. Fira Đ. (1998): *Karakterizacija ekstracelularnih proteinaza bakterija iz rodova Staphylococcus i Lactobacillus*. Doktorska disertacija, Beograd.
8. Gundogan N., Arik M.T. (2004): *Comparison of the protease activity of psychrotrophic and thermophilic Bacillus spp. isolated from raw milk samples*. The Indian Veterinary Journal 81, 1013–1015.
9. Marchand S., Coudijzera K., Heyndrickxa M., Dewettinckb K., De Blocka J. (2007): *Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk*. International Dairy Journal 18, 514–519.
10. Marino M., Butta P., Cocolin L., Comi G., Duratti G. (1995): *Microbiological control of critical points in the manufacture of Mozzarella cheese*. Industrie Alimentari, 34, 1027-1031.
11. Melling J., Capel B. J., Turnbull P. C. B. and Gilbert R. J. (1976): *Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with Bacillus cereus*. Journal of Clinical Pathology, 29,938-940.
12. Mijačević Z., Bulajić S. (1998): *Examination of biochemical characteristics of bacilli isolated from raw milk*, Acta Veterinaria, Beograd, Vol. 48, No.1. 59-68.

13. Murugan B., Villi R. A. (2009): *Lipolytic activity of Bacillus species isolated from milk and dairy products*. The Indian Veterinary Journal 86, 80–81.
14. Oh M. H., Cox J. M. (2009): *Toxigenic bacilli associated with food poisoning*. Food Science and Biotechnology 18, 594–603.
15. Oljačić M. E. i Kasalica J. A. (2006): *Prisustvo termorezistentnih mikroorganizama u polutvrdom siru tokom skladištenja*, Prehrambena industrija, mleko i mlečni proizvodi, Vol. 17, (1-2), 12-14.
16. Puhan Z. (1969): *Protease composition of a rennet substitute from Bacillus subtilis and properties of its component proteases*. Journal of Dairy Science, 52:1372.
17. Ronimus R. S., Parker L. E., Turner N., Poudel S., Ruckert A., Morgan H. W. (2003): *ARAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders*. International Journal of Food Microbiology 85, 45–61.
18. Scheldeman P., Pil A., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. (2005): *Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms*. Applied and Environmental Microbiology 71, 1480–1494.
19. Scott S. A., Brooks J. D., Rakonjac J., Walker K. M. R., Flint S. H. (2007): *The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder*. International Journal of Dairy Technology 60, 109–117.

