

# Razvoj inovativnog funkcionalnog napitka s dodanim probiotičkim bakterijama

---

**Medved, Vanna**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:354545>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Vanna Medved**

7281/N

**Razvoj inovativnog funkcionalnog napitka s dodanim probiotičkim bakterijama**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** HRZZ projekt „Probiotici i starter kulture-površinski proteini i bakteriocini“

**Mentor:** red. prof. dr. sc. Jasna Novak

**Zagreb, 2019.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Razvoj inovativnog funkcionalnog napitka s dodanim probiotičkim bakterijama

*Vanna Medved, 0058209057*

**Sažetak:** Cilj ovog rada je razvoj inovativnog funkcionalnog napitka na bazi sirutke izdvojene nakon proizvodnje sira s odabranim autohtonim bakterijama mliječne kiseline (BMK) koje iskazuju specifična svojstva značajna za proces fermentacije ili funkcionalnost konačnog proizvoda. Odabrana četiri autohtona soja BMK: *Lactococcus brevis* ZG1 koji eksprimira S-protein, *Lactobacillus plantarum* ZG1C koji sintetizira plantaricin, *Lactobacillus fermentum* D12 koji proizvodi egzopolisaharide i *Lactococcus lactis* ZG7-10 s proteolitičkim djelovanjem. Prema rezultatima, očuvan je visok broj bakterijskih stanica dodanih BMK nakon proizvodnje i tijekom skladištenja koncentrirane sirutke priređene liofilizacijom i tekuće sirutke. Analiza sirutke pokazala je da se radi o kiseloj sirutki s niskim udjelima masti i laktoze te su masenom spektrometrijom, prema preliminarnim rezultatima, dokazani peptidi čije se bioaktivno djelovanje mora još ustanoviti. Prisutnost odabranih autohtonih BMK je potvrđena analizom mikrobne populacije sirutke primjenom tehnika nove generacije sekvencioniranja. Prema provedenoj senzorskoj analizi, inovativni napitak na bazi sirutke može se proizvesti kao tekući napitak s dodatkom vanilije ili maline ali i u obliku koncentrirane sirutke nakon liofilizacije.

**Ključne riječi:** sirutka, inovativni funkcionalni napitak, probiotici

**Rad sadrži:** 28 stranica, 8 slika, 10 tablica, 22 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjenu knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** red. prof. dr. sc. Jasna Novak

**Pomoć pri izradi:** Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

**Datum obrane:** 9.9.2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study of Nutrition**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory of Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Development of innovative functional beverage with added probiotic bacteria**

***Vanna Medved, 0058209057***

**Abstract:** The aim of this study is to develop an innovative functional whey-based beverage extracted after cheese production with selected autochthonous lactic acid bacteria (LAB), each of which exhibits specific properties relevant to the fermentation or functionality of the final product. Four different autochthonous LAB strains were selected: *Lactococcus brevis* ZG1 expressing S-protein, *Lactobacillus plantarum* ZG1C synthesizing plantaricin, *Lactobacillus fermentum* D12 producing exopolysaccharides and *Lactococcus lactis* ZG7-10 with proteolytic activity. According to the results, a high number of bacterial cells were preserved in samples after production and during storage of freeze-dried (concentrated) whey and liquid whey. Analysis of whey showed that it was acidic whey containing low fat and lactose content, while preliminary results of mass spectrometry, revealed the presence of peptides whose bioactive potential has yet to be established. The presence of selected autochthonous LAB was confirmed by analysis of the whey microbial population using New Generation Sequencing techniques. According to sensory analysis, an innovative whey-based beverage can be produced as a liquid beverage with the addition of vanilla or raspberry, but also in a form of concentrated whey after lyophilization.

**Keywords:** cheese whey, innovative functional beverage, probiotics

**Thesis contains:** 28 pages, 8 figures, 10 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** full professor Jasna Novak, PhD

**Technical support and assistance:** Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

**Defence date:** 9th September 2019

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Funkcionalna hrana.....	2
2.2. Sirutka.....	2
2.3. Starter kulture.....	5
2.4. Probiotici.....	6
2.5. Bakterije mliječne kiseline.....	8
3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Materijali.....	9
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	9
3.1.2. Hranjive podloge.....	9
3.1.3. Kemikalije.....	9
3.1.4. Aparatura i pribor.....	10
3.2. Metode rada.....	10
3.2.1. Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja funkcionalnog napitka na bazi sirutke primjenom probiotičkih starter kultura .....	10
3.2.2. Određivanje parametara kvalitete proizvedene sirutke.....	11
3.2.2.1. Preživljenje probiotičkih sojeva u uzorcima sirutke i liofiliziranog napitka.....	11
3.2.2.2. Mikrobiološka analiza.....	12
3.2.2.3. Analiza kemijskog sastava proizvedene sirutke.....	12
3.2.2.4. Određivanje pH-vrijednosti proizvedene sirutke.....	12
3.2.2.5. Određivanje bioaktivnih peptida u uzorcima sirutke.....	12
3.2.3. Izolacija i analiza ukupne DNA iz uzoraka sirutke.....	14
3.2.4. Senzorska svojstva sirutke.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS LITERATURE.....	27

## 1. UVOD

Koncept funkcionalne hrane obuhvaća namirnice koje u svom sastavu sadržavaju ili su im dodane tvari, koje imaju poželjne učinke na zdravlje čovjeka. Koncept funkcionalne hrane počeo se razvijati u Japanu 80-ih godina prošlog stoljeća, a još uvijek se razvija i primjenjuje, prvenstveno kod kroničnih bolesti od kojih obolijeva sve više ljudi. Takav pristup čovjekovu zdravlju i prehrani drugačiji je od uobičajenog te je dobro prihvaćen od strane potrošača.

Pojam funkcionalne hrane obuhvaća mliječne proizvode, čija se funkcionalnost povezuje s probiotičkim bakterijama. Dosadašnja saznanja o probioticima govore o njihovoj velikoj ulozi u očuvanju zdravlja čovjeka, zbog čega su i predmet brojnih znanstvenih radova. To dovodi do sve većeg broja potencijalnih probiotičkih starter kultura koje se mogu primjenjivati u prehrambenoj industriji, u smislu unaprijeđenja prisutnih ili proizvodnje inovativnih probiotičkih proizvoda, a u svrhu poboljšanja zdravlja opće populacije.

Postoji čitav niz mliječnih proizvoda s funkcionalnim probiotičkim svojstvima, a u ovom radu posebna pažnja se posvećuje nusproduktu mliječne industrije koji je kao proizvod na tržištu često zanemaren, a to je sirutka. Sirutka je nusprodukt u proizvodnji sira te se u tom procesu često smatra otpadnom vodom. Sirutka predstavlja veliki problem u mliječnoj industriji jer je, s obzirom na svoj sastav i na volumen koji nastane u proizvodnji sira, veliki zagađivač okoliša. Upravo iz tog razloga, poželjno je razmatrati načine i metode iskorištavanja sirutke umjesto njenog ispuštanja u okoliš.

Jedan od potencijalnih načina iskorištenja sirutke, polazeći od koncepta funkcionalne hrane, je proizvodnja funkcionalnih napitaka primjenom probiotičkih starter kultura. Cilj ovog rada je razviti mogući inovativni funkcionalni napitak, nakon proizvodnje sira uz pomoć autohtonih funkcionalnih starter kultura, utemeljen na sirutci s funkcionalnim probiotičkim svojstvima.

## **2. Teorijski dio**

### **2.1. Funkcionalna hrana**

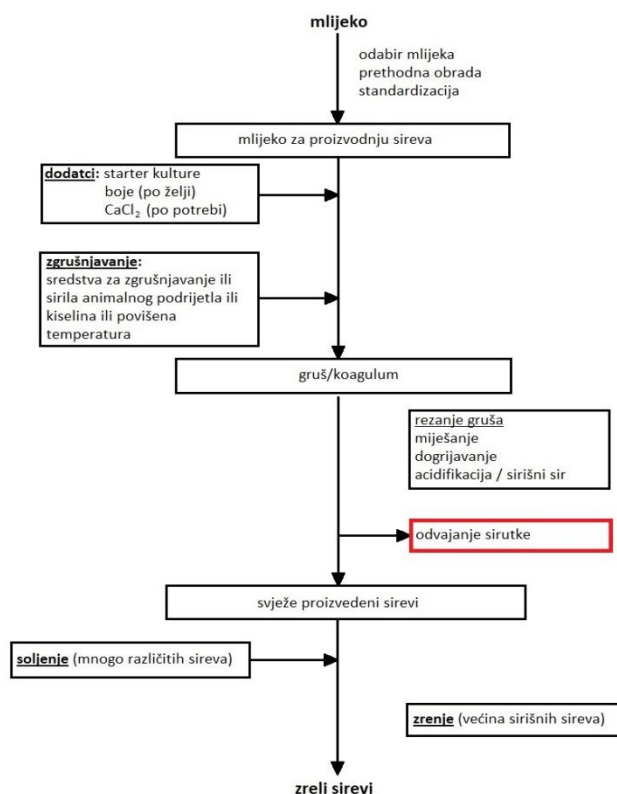
Postoje brojne definicije funkcionalne hrane, prema definiciji Europske komisije funkcionalna hrana je ona koja povoljno utječe na jednu ili više funkcija u tijelu te time unaprjeđuje zdravlje i/ili smanjuje rizik za nastanak bolesti. Dio je uobičajenog obrasca prehrane, ne primjenjuje se kao tableta, kapsula ili neki drugi oblik dodatka prehrani (Europska komisija, 2010). Prema tome, hrana koja spada u skupinu funkcionalne hrane može biti:

- Prirodna hrana
- Hrana kojoj je određen funkcionalni sastojak dodan ili iz koje je nepoželjni sastojak izdvojen
- Hrana kojoj je jedan ili više sastojaka modificiran (Roberfroid, 2000).

Popis sastojaka hrane koje se povezuju s povoljnim učincima na zdravlje čovjeka je opsežan, i obuhvaća vitamine i minerale kojima se obogaćuju određene namirnice, npr. obogaćivanje mlijeka i žitarica za doručak kalcijem, dijetalna vlakna kojima prirodno obiluju voće, povrće, cjelovite žitarice, mahunarke, ali kojima se i dodatno obogaćuju neki proizvodi, biološki aktivne komponente začina i začinskog bilja koje se povezuju s antioksidativnim, antiupalnim djelovanjem, probiotici i prebiotici koji se povezuju s fermentiranim mliječnim proizvodima itd. Prema procjeni, funkcionalna hrana koja sadrži probiotičke sojeve čini 60-70% sve funkcionalne hrane dostupne na tržištu (Kareb i Aider, 2018). To se prvenstveno odnosi na mliječne proizvode, odnosno jogurt i ostale proizvode od fermentiranog mlijeka.

### **2.2. Sirutka**

Sirutka je nusprodukt tijekom procesa proizvodnje sira u mliječnoj industriji (slika 1). Zaostaje u velikim količinama, tako se primjerice prema procjeni iz 10 L mlijeka dobije 1-2 kg sira i 8-9 L sirutke. Izdvaja se kada se mlijeku prilikom proizvodnje sireva doda odabrana starter kultura te ostale tvari, kao što su kalcijev klorid, boje te sredstva za zgrušavanje, što rezultira zgrušavanjem mlijeka. Od gruša daljnim postupcima dobiva se sir, a sinerezom se izdvaja žuto-zelenkasta tekućina, odnosno sirutka. Postoje dvije vrste sirutke: slatka i kisela. Slatka se dobiva prilikom proizvodnje tvrdih sireva, dok kisela nastaje kao nusprodukt u proizvodnji svježeg sira.



**Slika 1.** Shema proizvodnje sira (Grgurek, 2015)

Otpriblike 94% sirutke je voda, a sirutka sadži 50% suhe tvari mlijeka. Većinski dio mliječne masti mlijeka zaostaje u grušu, što čini sirutku proizvodom s niskim udjelom masti. Komponente mlijeka koje su topljive u vodi prelaze u sirutku, a ovdje se prvenstveno misli na laktozu, čiji mali dio zaostane u grušu, vitamine topljive u vodi, minerale te proteine sirutke (tablica 1 i tablica 2)

**Tablica 1.** Usporedba kemijskog sastava mlijeka i sirutke (Preuzeto i korigirano prema Duvnjak i Kosaric, 1983 te Božanić, 2015)

Komponenta	Sirutka	Mlijeko
Suha tvar	6,5%	11-14%
Voda	93,5%	86-89%
Masti	0,04%	3,2-5,5%
Proteini	0,75%	2,6-4,2%
Laktoza	4,9%	4,6-4,9%
Pepeo	0,8%	0,6-0,8%



**Tablica 2.** Vitamini u mlijeku i sirutki (Duvnjak i Kosaric, 1983)

Vitamini		Mlijeko	Sirutka
Topljivi u vodi (10 <sup>-6</sup> %)	B1	47	38
	B2	186	137
	B6	34	44
	B12	0,38	0,29
	B5	281	385
	Biotin	1,7	1,8
Vitamin C	440	203	
Topljivi u mastima (I.J./100g)	Vitamin A	102	87

Proteini mlijeka se dijele na kazein te na proteine sirutke. Kazein čini 80% proteina mlijeka, a proteini sirutke 20%. Pri uvjetima kiseljenja mlijeka za proizvodnju sireva dolazi do denaturacije i taloženja kazeina, dok proteini sirutke ostaju stabilni, odnosno ostaju topljivi i prelaze u sirutku. Proteine sirutke čine β-laktoglobulin, α-laktalbumin, serumski albumin, imunoglobulin te proteoze/peptoni. To su proteini koji sadržavaju sve esencijalne aminokiseline, za razliku od kazeina, zbog čega se sirutka smatra visokovrijednim izvorom proteina. Kada se određuje kvaliteta nekog proteina, često ga se uspoređuje s referentnim proteinom, čiji je sastav aminokiselina u skladu s količinom i omjerom aminokiselina potrebnih čovjeku. Do sredine 1990-ih proteini jaja smatrali su se referentnim proteinom, te im se dodijelila biološka vrijednost 100. Iz tablice 3 vidljivo je kako je biološka vrijednost proteina sirutke veća od biološke vrijednosti proteina jajeta.

**Tablica 3.** Prosječna biološka vrijednost različitih proteina (Duvnjak i Kosaric, 1983)

Proteini	Prosječna biološka vrijednost	
	Cijelog jajeta	100
Mlijeka	88	92
Kazeina	72	73
Sirutke	124	104

Osim nabrojanih proteina, sirutka je bogata i bioktivnim peptidima. Bioaktivni peptidi su specifični fragmenti proteina mlijeka koji imaju pozitivan utjecaj na tjelesne funkcije te je uočen njihov utjecaj na zdravlje čovjeka (Kareb i Aider, 2018). Oni nastaju prilikom probave hrane u gastrointestinalnom (GI) sustavu ili prilikom procesa proizvodnje uslijed djelovanja proteolitičkih enzima bakterija. To nisu dugolančani spojevi, sastoje se od svega 2-20 aminokiselina. S obzirom da mlijeko sadrži raznovrsne proteine, raznovrsni su i produkti koji nastaju njihovim proteolitičkim cijepanjem. Najčešće biološke funkcije koje posjeduje ova raznovrsna skupina spojeva su antihipertenzivna, antioksidativna, imunomodulatorska, antimikrobna, antikancerogena, protiv pretilosti, dijabetesa itd. Neki od njih su i multifunkcionalni, čime posjeduju više od jedne biološke funkcije. Djeluju na način da stupaju u interakcije sa specifičnim receptorima ili specifičnim mjestima ciljnih stanica brojnih organskih sustava u tijelu; imunološkim, živčanim, kardiovaskularnim i gastrointestinalnim sustavom.

Sirutka, kao nusproizvod, je jedan od najvećih zagađivača okoliša u mliječnoj industriji, upravo zbog velikih volumena koji se izdvajaju tijekom proizvodnje sira, kao i visokih vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika sirutke. Iz tog razloga, proteklih godina su se tražili novi pristupi obrade sirutke u svrhu zaštite okoliša. Otkako su se utvrdila funkcionalna svojstva sirutke, prvenstveno sadržaj biološki aktivnih peptida, kao i aminokiselinski sastav proteina sirutke, percepcija o sirutki i njenoj upotrebi polako se mijenja. Jedna od mnogih mogućnosti njenog korištenja odnosi se na proizvodnju raznovrsnih napitaka od sirutke te njihova implementacija na tržište, čime bi se smanjila količina otpadnih voda u mliječnoj industriji.

### **2.3. Starter kulture**

Starter kulture su kulture živih mikroorganizama koje se koriste u proizvodnji fermentiranih proizvoda, s ciljem obogaćivanja tih proizvoda produktima metabolizma upotrijebljenih starter kultura (Šušković, 2017). Iako se većina fermentiranih proizvoda može proizvesti bez upotrebe starter kulture, dodatkom koncentrata mikroorganizama u obliku pripravka starter kulture osigurava se dosljednost proizvodnog procesa i ujednačena kvaliteta fermentiranih proizvoda. Kod proizvodnje sira, starter kulture se dodaju kako bi konvertirale laktozu iz mlijeka u mliječnu kiselinu te time dolazi do zakiseljavanja mlijeka, što pogoduje nastanku grušā, odnosno sira. Osim toga, starter kulture su odgovorne za stvaranje karakterističnih okusa i aroma koje određuju pojedine fermentirane proizvode. Imajući na umu koncept

funkcionalne hrane, u proizvodnji fermentiranih proizvoda mogu se koristiti funkcionalne starter kulture. Funkcionalne starter kulture su one, koje imaju jedno ili više funkcionalno svojstvo kojim povoljno utječu na kvalitetu završnog proizvoda, a time i na zdravlje potrošača (Šušković, 2017). Kada se govori o mliječnoj industriji, poželjno je koristiti starter kulture čija se funkcionalnost očituje u probiotičkom djelovanju.

## **2.4. Probiotici**

Probiotici su jedno od žarišta ispitivanja u današnje vrijeme, upravo zbog svojih višestrukih povoljnih utjecaja na ljudsko zdravlje, koji su dokazani u znanstvenim radovima diljem svijeta. Povezuju se prvenstveno sa smanjenjem rizika od nastanka bolesti, što dugotrajno znači smanjenje korištenja antibiotika odnosno smanjenje antibiotske rezistencije, kao jednog od glavnih problema 21. stoljeća (Ghosh i sur., 2019; Eslami i sur., 2019). Isto tako, djelovanje probiotika povezuje se i s prevencijom nezaraznih kroničnih bolesti, kao što su pretilost, metabolički sindrom, karcinom i ostale, čija je prevalencija u svijetu sve veća (Zoumpopoulou i sur., 2017). Integracija funkcionalne hrane koja sadržava probiotike jedna je od strategija borbe protiv antibiotske rezistencije te protiv incidencije bolesti povezanih s hranom.

Probiotici označavaju žive mikroorganizme, koji se unose u organizam u adekvatnim količinama te time uzrokuju pozitivne učinke na domaćina (FAO/WHO 2002). Krajnji cilj prehranbenog unosa probiotika je njihova kolonizacija humanog GI sustava, odnosno crijeva. Sastav crijevne mikroflore svakoga od nas drugačiji je i ovisi o našem genotipu, prehranbenim navikama i stilu života, kao i o fiziološkom i zdravstvenom stanju. U gastrointestinalnom sustavu čovjeka živi više od 1000 vrsta bakterija, prema nekim pretpostavkama čak do 10 000 različitih vrsta bakterija (Samaržija, 2015). Svaka od njih različito djeluje na čovjeka, pa ih se time laički može podijeliti na „dobre“ i „loše“ bakterije. „Dobre“ bakterije bi, u tom slučaju, označavale one bakterije čiji metaboliti povoljno utječu na zdravlje čovjeka, dok bi „loše“, u najmanju ruku, uzrokovale probavne tegobe ukoliko svojim brojem nadvladaju „dobre“. Smatra se da zdrava osoba ima uravnoteženi sastav crijevne mikrobiote, što znači da je zastupljenost korisnih u odnosu na nepoželjne bakterijske vrste u ravnoteži. Ukoliko dođe do disbalansa u sastavu bakterija, odnosno ukoliko dođe do prevage „loših“ bakterija, takvo stanje povezuje se s raznim poremećajima, kao što su pretilost, dijabetes, bolest „masne jetre“ koja nije uzrokovana alkoholom, upalne bolesti

crijeva, pa čak i karcinom (Vallianou i sur., 2019; Parvez i sur., 2006). Probiotičke bakterije u tom smislu mogu ponovo uspostaviti ravnotežu sastava crijevne mikrobiote.

Da bi probiotička bakterija uspješno kolonizirala GI sustav čovjeka, ona mora preživjeti tranzit od usne šupljine do crijeva. U usnoj šupljini žlijezde slinovnice izlučuju slinu koja sadrži lizozim, kao prvu prepreku preživljenju. Dalje slijedi niski pH želuca i pepsin, kao i probavni enzimi gušterače u tankom crijevu zajedno sa žučnim solima (Šušković i sur., 2009). Sojevi koji prije preživljavaju ove prepreke su oni izolirani iz GI sustava zdravog čovjeka (Saarela i sur., 2000).

Oni probiotički sojevi koji uspiju preživjeti uvjete u gornjem dijelu GI sustava, po svom dolasku u crijevo mogu iskazati svoje funkcionalno djelovanje. Da bi mogli iskazati pozitivne učinke u specifičnom ekosustavu, moraju kolonizirati, odnosno adhezirati za specifična mjesta vezanja, gdje će im biti osiguran izvor hrane. Kako bi osigurali kompetitivnu prednost, probiotičke bakterije imaju svojstvo sinteze antimikrobnih komponenata, koje imaju inhibicijsko djelovanje prema pojedinim bakterijskim sojevima mikrobiote humanog GI sustava. Time probiotičke bakterije djeluju povoljno na čovjekov organizam jer inhibiraju rast patogenih mikroorganizama (Šušković, 1997). Tvari koje pritom izlučuju su diacetil, vodikov peroksid kojeg proizvode u aerobnim uvjetima, organske kiseline, mliječna i octena, koje uzrokuju sniženje pH. Osim toga, pojedini sojevi probiotičkih bakterija, izlučujući bakteriocine, specifične antimikrobne metabolite, koji su proteinske prirode, inhibiraju rast srodnih vrsta bakterija. Za kolonizaciju u kolonu, poželjno je svojstvo adhezije na crijevni epitel. Prvotno, adhezija bakterija omogućena je nespecifičnim fizikalnim interakcijama površine bakterijske stanice i epitela crijeva, a potom slijede specifične interakcije adhezina, odnosno proteina na površini bakterija i receptora epitelnih stanica. Slijede autoagregacija probiotičkog soja te koagregacija s drugim sojevima, što sprječava adheziju patogenih mikroorganizama. Upravo iz tog razloga, važno je ispitati fizikalno kemijske karakteristike površine bakterijske stanice, kao i njenu hidrofobnost. Oni sojevi koji na površini eksprimiraju S-proteine, pokazuju bolja svojstva adhezije (Kos i sur., 2003).

Naseljavanjem crijeva i inhibicijom rasta drugih mikroorganizama, probiotički sojevi mogu utjecati na metabolizamske reakcije u crijevima. Npr, poboljšavaju metabolizam laktoze kod laktoza-intolerancije jer osiguravaju izvor enzima  $\beta$ -galaktozidaze, inhibicijom rasta drugih MO sprječavaju reakcije enzima odgovornih za kancerogene procese, kao što su  $\beta$ -glukuronidaza, nitroreduktaza, azoreduktaza i steroid-7 $\alpha$ -dehidroksilaza. Treba naglasiti i njihovo svojstvo snižavanja kolesterola u krvi. Naime, imaju dekonjugacijsku (hidrolaznu)

aktivnost zbog koje dolazi do taloženja žučnih soli, a s njima i kolesterola te ne dolazi do njegove apsorpcije. Osim toga, važno je naglasiti još jedno svojstvo probiotičkih bakterija, a to je stimulacija imunološkog sustava. Crijevo, osim što je dio probavnog sustava, smatra se i najvećim imunološkim organom. Prisutstvo probiotika uzrokuje povećanje koncentracije specifičnih protutijela domaćina te ga time čine otpornijim na bolesti (Šušković, 1996).

Da bi se bakterija koristila kao probiotik, mora proći strogu evaluaciju, odnosno mora se izolirati, pročititi, pomno okarakterizirati te se prije administracije mora dokazati njezina djelotvornost.

## **2.5. Bakterije mliječne kiseline**

S obzirom na veliki broj poželjnih funkcionalnih svojstava probiotika, potrebno je istaknuti koje bakterije su potencijalno probiotičke te koje se mogu upotrebljavati kao starter kulture kod proizvodnje sira. Veliku primjenu, u tom pogledu, imaju bakterije mliječne kiseline. Bakterije mliječne kiseline su heterogena skupina srodnih bakterija, čiji je završni produkt metabolizma ugljikohidrata mliječna kiselina, po čemu su i dobile ime. Imaju sposobnost mliječne fermentacije, odnosno previranja laktoze iz mlijeka u mliječnu kiselinu, zbog čega se uz bifidobakterije najčešće koriste kao starter kultura u proizvodnji mliječnih proizvoda. To su nesporogene, katalaza- negativne, Gram-pozitivne bakterije koje morfološki dolaze u obliku štapića i koka. Pripadaju koljenu Firmicutes, razredu Bacilli, redu Lactobacillales, unutar kojeg su raspoređene u porodice. Već se dugo koriste kao starter kulture, a tome u prilog ide i njihov GRAS status (engl. Generally Recognized As Safe) prema FDA, odnosno QPS status (engl. Qualified Presumption of Safety) prema Europskoj zajednici. Neki od sojeva određenih vrsta bakterija mliječne kiseline pokazuju funkcionalna svojstva, pa se takvi sojevi mogu koristiti kao funkcionalne probiotičke starter kulture.

Osim stvaranja mliječne kiseline, koja između ostalog, ima ulogu u konzerviranju završnog proizvoda, bakterije mliječne kiseline sintetiziraju i druge tvari koje utječu na kvalitetu proizvoda, odnosno utječu na njegov izgled, okus, aromu i teksturu. Neke bakterije na teksturu proizvoda utječu na način da imaju sposobnost sinteze egzopolisaharida, dugolančanih polimera velike molekulske mase. Egzopolisaharide bakterija može izlučivati u okolni medij ili mogu obavijati bakterijsku stanicu, odnosno za nju biti vezani. Bakterija ih sintetizira kako bi se zaštitila od isušivanja, infekcije bakteriofaga, djelovanja antibiotika, dezinficijensa i drugih štetnih agenasa, a u proizvodnji sira korištenjem bakterija koje

sintetiziraju egzopolisaharide poboljšava se tekstura i kožistencija sira, čineći ga mekšim (Wang i sur., 2019).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Radni mikroorganizmi**

U ovom radu korišteni su slijedeći odabrani sojevi bakterija mliječne kiseline:

- a) *Lactobacillus brevis* ZG1
- b) *Lactobacillus plantarum* ZG1C
- c) *Lactobacillus fermentum* D12
- d) *Lactococcus lactis* ZG7-10

##### **3.1.2. Hranjive podloge**

Za uzgoj BMK, korištene su hranjive podloge:

- MRS agar
- M17 agar,

a za provjeru prisutnosti nepoželjnih bakterijskih vrsta iz roda *Salmonella* i *Listeria* korišteni su:

- Aloa agar (Biolab, Mađarska)
- XLD agar (Biolife, Italija)

##### **3.1.3. Kemikalije**

- Acetonitril 2%
- Destilirana voda
- Etanol 70%-tni (Carlo Erba, Fluka)
- Fenolftalein (2%)
- HCCA ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina u 50% acetonitrilu i 2,5% trifluorocenoj kiselini)
- Mravlja kiselina 0,1%

- Natrijev hidroksid 0,1 M
- Lizozim (5 mg/mL)
- TE pufer

#### **3.1.4. Aparatura i pribor**

- Amazon ETD (Bruker Daltonik, Njemačka) spektrometar masa
- Biospec-nano uređaj (Shimadzu, Japan)
- Bruker Daltonik pločica za uzorke
- C18 (Acclaim Pepmap, ThermoFisher) HPLC kolona
- Ependorvice
- Epruvete
- Filtrak filter papir No.388
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“
- MALDI (eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
- Maxwell® 16 Research System instrument (Promega, SAD)
- Nano-HPLC- masenog spektrometra
- Petrijeve zdjelice
- pH metar (Metrohm, Švicarska)
- Pinceta
- staklena vuna
- Stalci za ependorvice
- Stalci za epruvete

### **3.2. METODE RADA**

#### **3.2.1 Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja funkcionalnog napitka na bazi sirutke uz dodatak probiotičkih starter kultura**

Proizvodnja sira provedena je u suradnji s tvrtkom Probiotik, a za fermentaciju je korišteno 2 litre pasteriziranog mlijeka „Veronika“. Pri tome je u proizvodnji kontrolnog uzorka sira, korištena komercijalna starter kultura DSM CT-203 koja sadrži *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp. Za proizvodnju sira pomoću autohtonih BMK primjenjeni su odabrani sojevi *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* ZG1C, *Lactobacillus fermentum* D12 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, koji su u prethodnim istraživanjima laboratorija iskazala specifična

svojstva. Primjena ovakvih bakterija kao funkcionalnih starter kultura može doprinijeti funkcionalnosti samih konačno proizvedenih fermentiranih proizvoda. Autohtoni sojevi, odabrani za fermentaciju sira, koji su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, imaju određeno funkcionalno svojstvo. Soj *Lb. brevis* ZG1 je detaljno okarakterizirani kao soj koji eksprimira S-proteine na površini svojih stanica, soj *Lb. plantarum* ZG1C je producent bakteriocina, dok soj *Lb. fermentum* D12 proizvodi egzopolisaharide, a soj *Lc. lactis* ZG7-10 je odabran zbog svoje proteolitičke aktivnosti. Nakon proizvodnje sira odgovarajuće kvalitete, kao nusproizvod izdvojena je sirutka čija svojstva kao funkcionalnog napitka su ispitana u ovom završnom radu. Sinereza je određena mjerenjem volumena izdvojene sirutke zaostale nakon proizvodnje svježeg sira.

### **3.2.2. Određivanje parametara kvalitete proizvedene sirutke**

#### **3.2.2.1. Preživljenje probiotičkih sojeva u uzorcima sirutke i liofiliziranog napitka**

U svrhu povećanja aktivnosti i broja živih stanica upotrijebljenih starter kultura tijekom primjene sirutke kao funkcionalnog napitka i nutraceutičkog probiotičkog proizvoda, provedena je liofilizacija sirutke, nakon čega je određen broj živih stanica tijekom skladištenja, 5 i 10 dana čuvanja pri 4 °C. Za usporedbu se koristio neliofilizirani tekući uzorak sirutke čuvan pri 4 °C. Uzorci sirutke (1 mL) su zamrznuti pri -80 °C preko noći, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“. Broj živih mikroorganizama nakon proizvodnje i tijekom skladištenja liofilizirane i neliofilizirane sirutke nakon 5 i 10 dana pohranjenih pri 4 °C određen je indirektnom metodom na način da je 1 mililitar sirutke suspendiran u 9 mL sterilne destilirane vode. Nakon toga je provedeno naciepljivanje decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na odgovarajući agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. U svrhu određivanja broja bakterijskih stanica roda *Lactobacillus* (*Leuconostoc* u slučaju kontrolne sirutke), suspenzija bakterijskih stanica je naciepljena na MRS agar, a u svrhu određivanja broja bakterijskih stanica roda *Lactococcus*, suspenzija bakterijskih stanica je naciepljena na M17 agar. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, za bakterije roda *Lactobacillus* (odnosno *Leuconostoc*) i aerobne inkubacije pri 24 °C za bakterije roda *Lactococcus*, izbrojane su porasle kolonije, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po mililitru uzorka. Pad broja stanica bakterija mliječne kiseline 5 i 10 dana nakon skladištenja izražene su kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta \log$  CFU/mL sirutke) od logaritamske vrijednosti broja živih bakterijskih stanica nakon proizvodnje sirutke (0.dan).



### **3.2.2.2. Mikrobiološka analiza**

Kako bi se provjerila prisutnost nepoželjnih bakterijskih vrsta, nakon proizvodnje i tijekom skladištenja liofilizirane i neliofilizirane sirutke pri 4 °C nakon 5 i 10 dana indirektnom metodom na način da je 1 mililitar sirutke sterilno suspendiran u 9 ml sterilne destilirane vode, nakon čega je provedeno naciepljivanje decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na odgovarajući agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele, određen je broj bakterijskih kolonija. U svrhu detekcije patogenih bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, bakterijske suspenzije su naciepljene na Aloa agar (Biolab, Mađarska) i XLD agar (Biolife, Italija). Nakon 48 h aerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije, te je izračunat broj bakterijskih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL).

### **3.2.2.3. Analiza kemijskog sastava proizvedene sirutke**

Količina masti i laktoze određena je u 50 mL uzorka u Centru za kontrolu namirnica PBF. Količina masti određena je metodom po Soxhletu, a količina laktoze gravimetrijskom metodom.

### **3.2.2.4. Određivanje pH-vrijednosti proizvedene sirutke**

pH vrijednost određena je pH uređajem (Metrohm, Švicarska) u uzorcima sirutke i očitavanjem izmjerene vrijednosti na mjernom instrumentu. pH metar je prije upotrebe baždaren uranjanjem u otopine poznate pH vrijednosti.

Kiselost sirutke određena je titracijom s 0,1 M NaOH 20 mL sirutke i 1 mL fenolftaleina (2%) do promjene boje koja je stabilna 1 minutu. Izračun kiselosti se radi prema formuli (Božanić i sur., 2010):

$$^{\circ}\text{SH} = \text{mL NaOH} \times f \times 2$$

### **3.2.2.5. Određivanje bioaktivnih peptida u uzorcima sirutke**

Bioaktivni peptidi određeni su frakcioniranjem peptida prema Baptista i sur. (2018). Uzorci svake sirutke (40 mL) se suspendiraju dodatkom 80 mL destilirane vode tijekom 10 minuta. Smjesa je inkubirana pri 40 °C tijekom 1 sata, nakon čega je provedeno centrifugiranje pri 3000 g tijekom 30 minuta pri 4 °C. Supernatant je profiltriran kroz staklenu vunu i kroz Filtrak filter papir No.388, a zatim zamrznut na -80 °C i koncentriran liofilizacijom pri čemu je dobiven uzorak nalik vati. Detekcija izoliranih i liofiliziranih bioaktivnih peptida provedena je

na Institutu Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska) primjenom sustava MALDI (eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) i nano-HPLC- masenog spektrometra. Priprema i analiza uzoraka provedena je kako slijedi:

Za analizu bioaktivnih peptida MALDI-TOF masenom spektrometrijom uzorci liofilizirane sirutke su odvagani u količini 10 mg (svaki pojedinačni uzorak u dvije paralelne odvage), potom je u odvagu dodano 1 ml 70% etanola (Carlo Erba, Fluka; puriss). Uzorci su lagano vorteksirani, ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 min, nakon čega su centrifugirani 10 min na 13000 rpm, 4°C (Baptista i sur., 2018). Po 1 µL supernatanta uzorka nanoseno je na Bruker Daltonik pločicu za uzorke, osušeno na zraku i pokriveno s 0,5 µL HCCA matrice ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina u 50% acetonitrilu i 2,5% trifluorooctenoj kiselini). MALDI TOF masena spektrometrija odrađena je na Bruker Daltonik Biotyper sustavu tipa Microflex LT. Spektri su snimljeni u pozitivnom linearnom modu, u području od 300-40000 kDa uz FlexControl automatski program s metodama za identifikaciju peptida.

Uzorci liofilizirane sirutke pripremljeni su za tripsinsku razgradnju na sljedeći način; paralelne odvage svakog uzorka u količini od 10 mg otopljene su u 70% etanolu najviše čistoće (uz kratkotrajno lagano vorteksiranje) i zatim ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 min.

Za analizu peptida korišten je UPLC sustav (Dionex, Švicarska) povezan s Amazon ETD (Bruker Daltonik, Njemačka) spektrometrom masa. Po 1 µL otopine svakog uzorka nanoseno je na C18 (Acclaim Pepmap, ThermoFisher) HPLC kolonu u protoku 3,5 µL /min. Peptidi su isprani s kolone u gradijentu otapala:

A 98% voda, 2% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina

B 98% acetonitril 2% voda, 0,1% mravlja kiselina

kroz 45 min.

MS/MS spektri masa peptida snimljeni su na AmaZon ETD Ion Trap (Bruker Daltonik, Njemačka) spektrometru masa u pozitivnom modu, u rasponu m/z 300-1500 uz Hystar 3.2 software.

### **3.2.3. Izolacija i analiza ukupne DNA iz uzoraka sirutke**

Uzorci sirutke (15 mL) za izolaciju ukupne DNA mikrobne populacije centrifugirani su tijekom 10 min pri 13000 o/min, nakon čega je talog suspendiran u 400 µL otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije tijekom 1,5 sata, DNA je izolirana iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell<sup>®</sup> 16 Research System instrumentu (Promega, SAD) primjenom odgovarajućeg Maxwell<sup>®</sup> DNA Cell kita. Koncentracija DNA je izmjerena uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan). Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvenciranje (Molecular Research, SAD). Dobiveni podaci u fasta formatu korišteni su za bioinformatičku analizu pomoću QIIME (eng. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) programa u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **3.2.4. Senzorska svojstva sirutke**

Kod provođenja senzorske analize kvalitete proizvoda na bazi sirutke praćeni su okus, boja, talog i izgled nakon proizvodnje napitka. Ocjenjivanje je provodilo 5 nasumično odabranih članova koji su pojedino svojstvo sirutke ocjenili ocjenama od 1 do 5, a rezultati ocjene senzorskih svojstava sirutki navedeni su kao srednja vrijednost svih ocjenjivača. U tablici 4 prikazani su opisni parametri svojstava napitka na bazi sirutke, dok tablica 5 prikazuje obrazac za senzorsko ocjenjivanje proizvedenih napitaka sa i bez dodatka aroma komponenata (malina i vanilija) u svrhu poboljšanja senzorskih svojstava proizvedenih sirutki. Za hedonističku senzorsku analizu prihvatljivosti fermentiranog proizvoda (s i bez dodatka aroma komponenata) grupa ocjenjivača se također sastojala od 5 nasumično odabranih članova, koji su na ljestvici od 1 do 9 ocjenili sviđanje pojedinog uzorka (sirutka bez dodatka aroma komponenata, sirutka uz dodatak aroma komponenata maline i vanilije).

**Tablica 4.** Opisni parametri senzorskih svojstava napitaka na bazi sirutke sirutke

<b>SENZORSKO SVOJSTVO</b>	<b>OPISNI PARAMETRI</b>	<b>OCJENA</b>
<b>Okus</b>	Jasno izražen, karakterističan za sirutku, bez stranih okusa, dobro ili vrlo dobro izražena aroma i okus, dobro ili vrlo dobro izražena svježina, slatkoća	4-5
	Preizražen okus na sirutku, tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, tragovi stranih okusa	3
	Proizvod stranog i nekarakterističnog okusa, užegao, kiseo i korak, okus po plijesni	1-2
<b>Miris</b>	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan za napitke na bazi sirutke, bez ikakvih stranih mirisa	4-5
	Prenaglašen miris ili nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris sirutke, tragovi užglosti	3
	Potpuno nekarakterističan za sirutku, stran, užegao, po plijesni	1-2
<b>Boja</b>	Boja karakteristična za sirutku (prema dodanom koncentratu, jednolična, bez vidljivih nepravilnosti)	4-5
	Dobra, ali prisutna prošaranost	3
	Neprihvatljiva ili netipična	1-2
<b>Bistroća (talog)</b>	Bez taloga	4-5
	Prisustvo taloga u manjim količinama	3
	Puno taloga, neprihvatljivo	1-2
<b>Izgled</b>	Odličan, tipičan za sirutku s dodanim koncentratima, bez nepoželjnih karakteristika	4-5
	Manje izražene nepoželjne karakteristike	3
	Neprihvatljiv, strane boje, prisutna strana tijela	1-2

**Tablica 5.** Obrazac za ispitivanje prihvatljivosti napitaka na bazi sirutke i uz dodatak aroma maline i vanilije

**HEDONISTIČKA SENZORSKA ANALIZA PRIHVATLJIVOSTI FERMENTIRANOG  
PROIZVODA**

Na ljestvici od 1 do 9 ocjenite **svidanje** pojedinog uzorka, pri čemu je značenje ocjena:

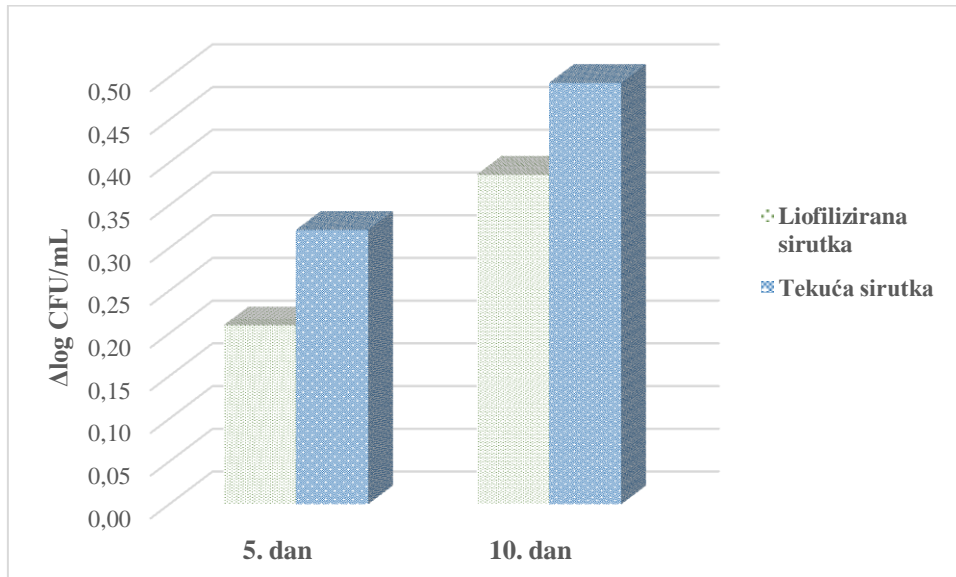
- 1 - izrazito mi se ne sviđa
- 2 - veoma mi se ne sviđa
- 3 - umjereno mi se ne sviđa
- 4 - neznatno mi se ne sviđa
- 5 - niti mi se sviđa, niti mi se ne sviđa
- 6 - neznatno mi se sviđa
- 7 - umjereno mi se sviđa
- 8 - veoma mi se sviđa
- 9 - izrazito mi se sviđa

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

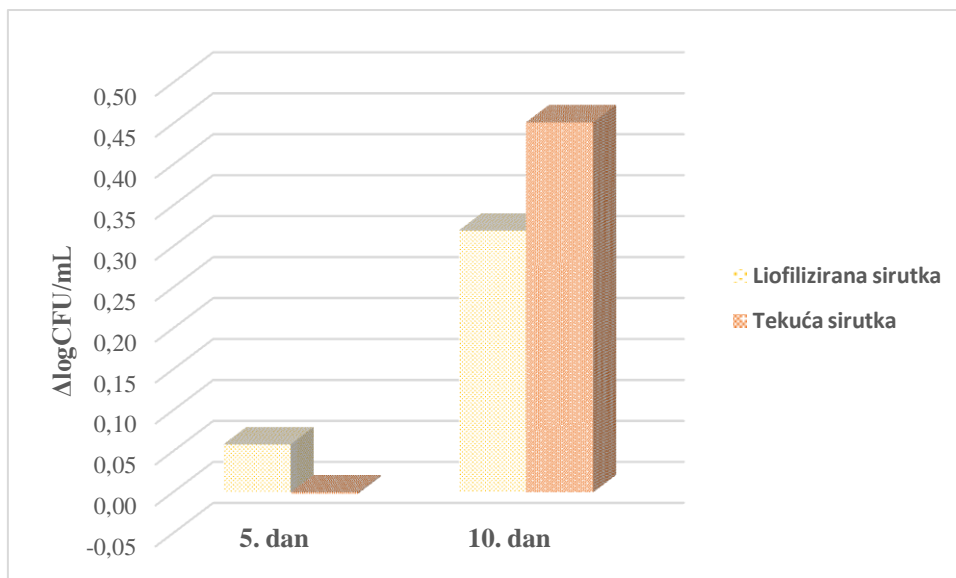
Prema rezultatima prikazanima na slici 2 i slici 3, primjenjeni bakterijski sojevi su uspješno preživjeli postupak liofilizacije jer je u uzorcima sirutke ustanovljen visok broj preživjelih bakterijskih stanica vrste *Lactobacillus*, dok je broj preživjelih bakterijskih stanica iz roda *Lactococcus* smanjen u usporedbi s brojem stanica u sirutki. Kod kontrolne sirutke, također je vidljiv veći pad broja stanica vrsti *Lactococcus* u liofiliziranoj sirutki u odnosu na tekuću, dok je nakon liofilizacije određen visok broj poraslih kolonija u uzorcima kontrolne sirutke. Prema navedenom, može se zaključiti da se proizvedena sirutka može prirediti kao liofilizirani proizvod, odnosno koncentrirana sirutka, u svrhu povećanja aktivnosti i broja bakterijskih stanica, no potrebno je procijeniti trošak postupka liofilizacije u industrijskom mjerilu. Broj bakterijskih stanica *Lactococcus* i *Lactobacillus* u proizvedenoj sirutki veći je od

$10^6$  CFU/mL, što je minimalna koncentracija bakterijskih stanica u proizvodu da bi se postigao povoljan učinak na zdravlje domaćina.

a)

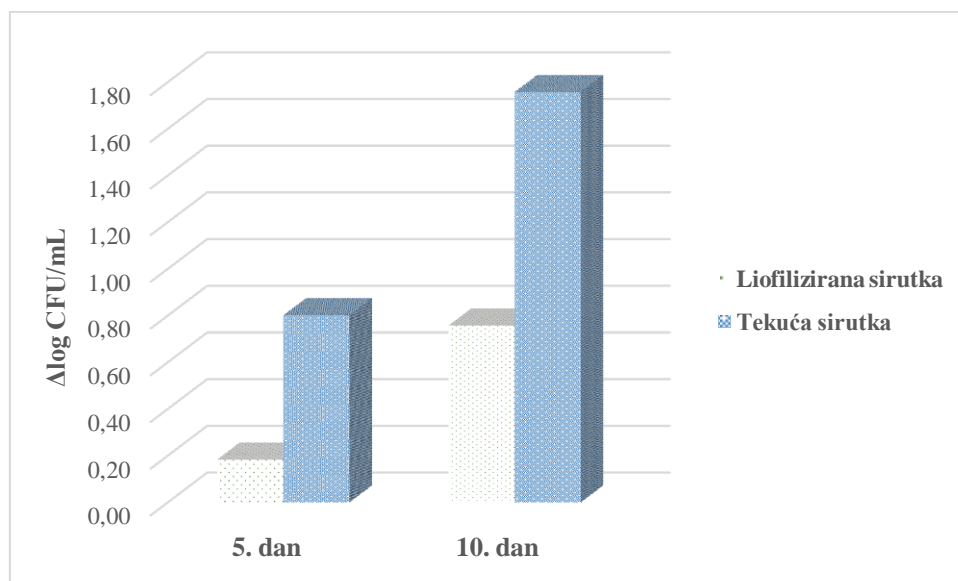


b)

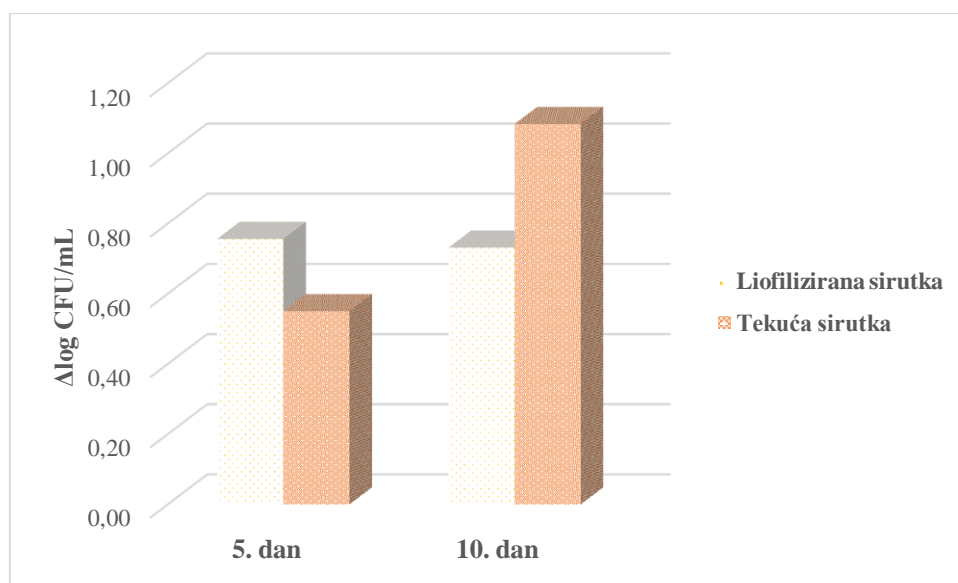


**Slika 2.** Broj stanica bakterija mliječne kiseline roda *Lactobacillus* (a) i roda *Lactococcus* (b) nakon 5 i 10 dana izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta \log \text{CFU/mL}$  sirutke) u liofiliziranoj i tekućoj sirutki.

a)



b)



**Slika 3.** Broj stanica bakterija mliječne kiseline roda *Leuconostoc* (a) i roda *Lactococcus* (b) nakon 5 i 10 dana izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta \log \text{CFU/mL}$  sirutke) u liofiliziranoj i tekućoj kontrolnoj sirutki.

Mikrobiološka analiza uzoraka sirutke (tablica 6 i tablica 7) u skladu je sa zahtjevima postavljenim u Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu, jer su svi uzorci sirutke mikrobiološki ispravni do 10. dana čuvanja sirutke, bilo da je sirutka u liofiliziranom ili tekućem obliku.

**Tablica 6.** Provjera prisutnosti bakterija iz roda *Listeria* i *Salmonella* nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sirutke

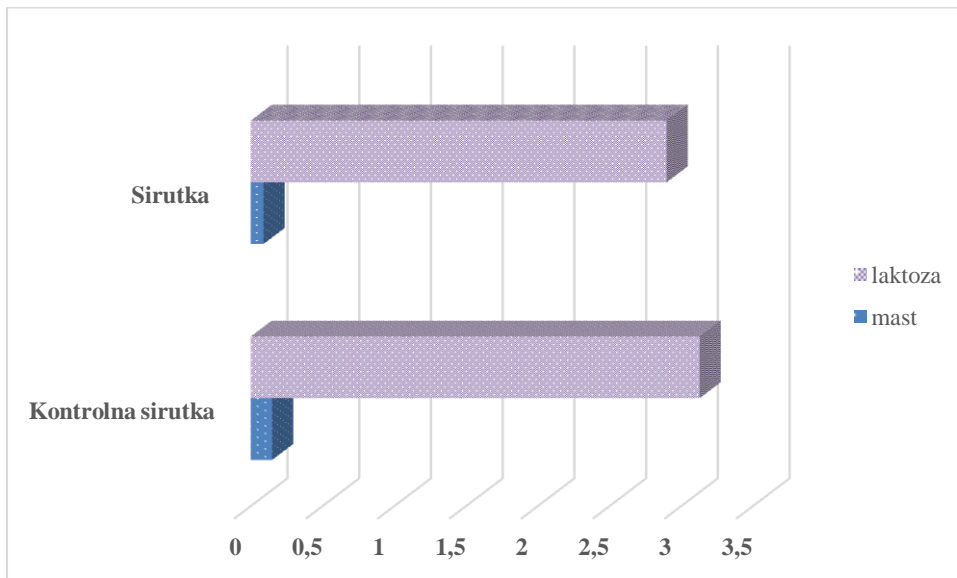
		<i>Listeria sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<b>Tekuća sirutka</b>	<b>0. dan</b>	0	0
	<b>5. dan</b>	0	0
	<b>10. dan</b>	0	0
<b>Liofilizirana sirutka</b>	<b>0. dan</b>	0	0
	<b>5. dan</b>	0	0
	<b>10. dan</b>	0	0

**Tablica 7.** Provjera prisutnosti nepoželjnih bakterija iz roda *Listeria* i *Salmonella* nakon proizvodnje i tijekom skladištenja liofilizirane i tekuće sirutke

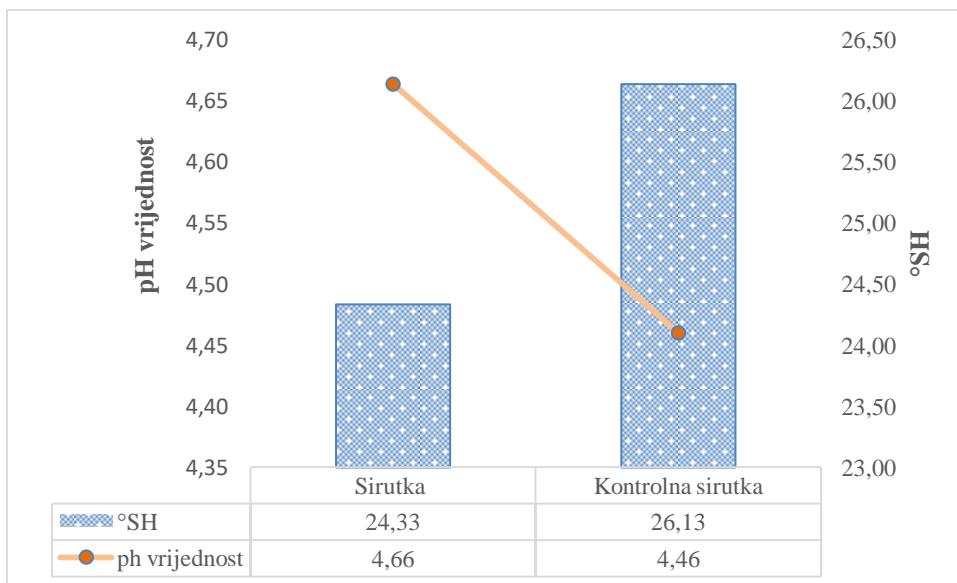
		<i>Listeria sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<b>Neliofilizirana kontrolna sirutka</b>	<b>0. dan</b>	0	0
	<b>5. dan</b>	0	0
	<b>10. dan</b>	0	0
<b>Liofilizirana kontrolna sirutka</b>	<b>0. dan</b>	0	0
	<b>5. dan</b>	0	0
	<b>10. dan</b>	0	0



Postotak masti u proizvedenoj i kontrolnoj sirutki ne razlikuju se značajno, te su prema rezultatima oba uzorka sirutke proizvodi s niskim udjelom masti. Što se tiče postotka laktoze, uzorak kontrolne sirutke sadrži neznatno manje laktoze, u odnosu na proizvedenu sirutku, dok se po kiselosti ne razlikuju u velikoj mjeri (slika 4 i slika 5).

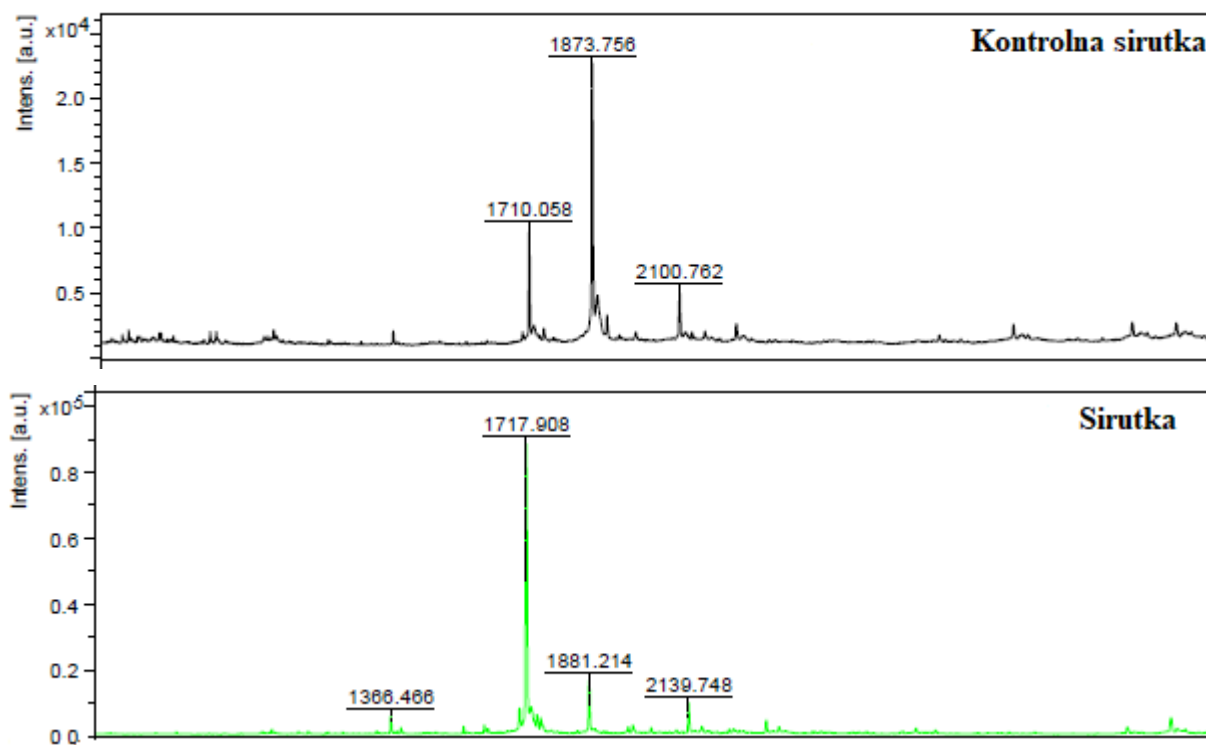


**Slika 4.** Količina masti (%) i laktoze (%) u uzorcima sirutki određeno metodom po Soxletu i gravimetrijskom metodom



**Slika 5.** Stupanj kiselosti (°SH) i pH vrijednosti izdvojenih sirutki

Sirutka je bogat izvor bioaktivnih sastojaka, a što prvenstveno podrazumijeva proteinsku frakciju sirutke te se intenzivno istražuje biološka uloga peptida sadržanih u proteinima. Biološke aktivnosti peptida uključuju imunomodulacijsko djelovanje, antibakterijsko djelovanje, smanjenje hipertenzije, zatim antioksidativno djelovanje te ublažavanje bolova (Mann i sur., 2019). Stoga je primjenom spektrometrije masa provedena analiza sastava peptida u uzorcima proizvedene sirutke kako bi se preliminarno ustanovila prisutnost mogućih bioaktivnih komponenti. U uzorcima sirutke ustanovljena je prisutnost peptida, ali je potrebno pretraživanje baze podataka te daljnja istraživanja kako bi se utvrdila njihova bioaktivnost (slika 6, tablica 8).



**Slika 6.** Usporedba spektara peptida izoliranih iz uzoraka sirutke, nakon ekstrakcije i liofilizacije, dobivenih primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa

**Tablica 8.** Analiza sastava peptida u uzorku proizvedene sirutke peptida dobivenih primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa. Prikazan je omjer mase i naboja (engl. mass-to-charge ratio, m/z).

<b>KONTROLNA SIRUTKA</b>	<b>SIRUTKA</b>
<b>m/z</b>	
1705,830	822,521
1871,550	869,926
2099,459	922,375
2248,111	1021,632
2967,127	1046,750
3275,659	1356,714
3390,955	1546,859
3576,577	1600,217
3734,008	1610,656
4034,729	1692,485
4060,861	1709,131
4099,622	1722,171
4238,257	1872,715
4379,825	1887,748
4490,503	1911,705
4529,380	1974,124
4697,442	1987,040
4734,635	2034,626
4766,817	2082,177
4997,131	2100,053
5035,494	2131,442
5229,523	2334,367
5269,448	2690,410
5600,631	2722,928
5694,699	2775,265
5715,867	3276,268
5734,952	3390,485
6122,625	3429,176
7090,365	3690,289

KONTROLNA SIRUTKA	SIRUTKA
m/z	
7407,863	3734,427
7449,755	3774,110
8148,840	4034,796
8189,401	4050,743
8520,120	4060,906
8557,273	4234,679
8632,692	4489,980
9186,061	4529,400
14179,058	4696,931
18394,347	4734,826
28407,955	4997,168
32643,074	5196,641
36837,281	5228,946
	5269,019
	5695,461
	7088,983
	9184,608
	14186,949
	18387,113

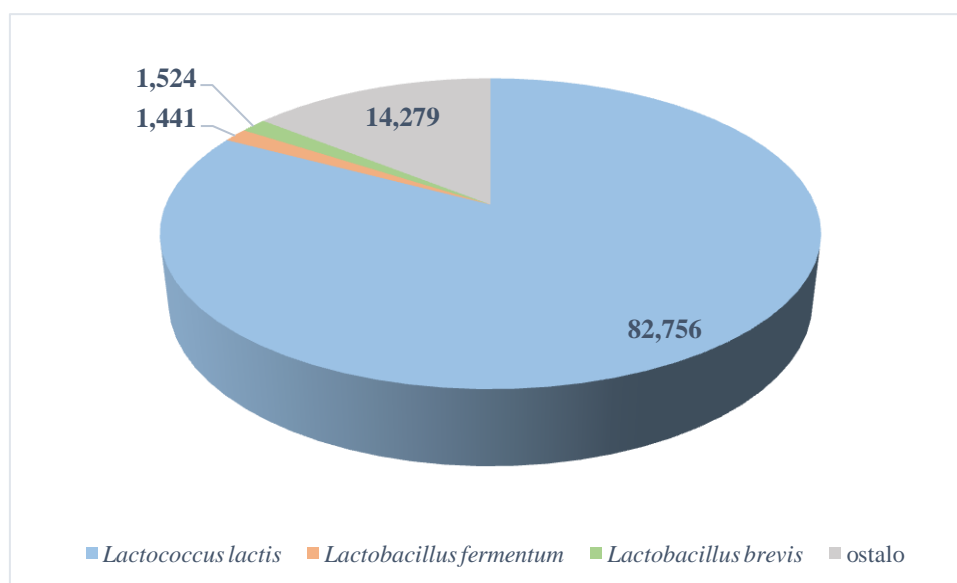
Nakon izolacije mješovite DNA iz uzoraka sirutki, izmjerena je koncentracija DNA čiji su rezultati prikazani u tablici 10. U cilju detekcije dodanih bakterija mliječne kiseline u proizvedenim sirutkama provedeno je Illumina MiSeq sekvenciranje mješovite DNA izolirane iz sirutke.

U uzorcima proizvedenog sira primjenom autohtonih sojeva kao starter kultura (*Lactococcus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* ZG1C, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus lactis* ZG7-10), uspješno smo izolirali željene sojeve, što je potvrđeno sekvencioniranjem izolirane mješovite DNA. Isti princip primjenjen je i na proizvedenu sirutku, gdje se iz DNA kojima su izmjerene koncentracije (Tablica 10), provelo sekvencioniranje te su na slici 7 prikazani udjeli inokuliranih bakterijskih vrsta u mikrobiomu sirutke. Najveći udio čini *Lactococcus lactis* (82,756%), slijede *Lactobacillus brevis* (1,524%) te *Lactobacillus fermentum* (1,441%), dok

ostatak čine druge vrste koje nismo upotrijebili kao starter kulture, odnosno koje su nastanile sirutku tijekom procesa proizvodnje i skladištenja sirutke. Time se može zaključiti, kako inokulacija svih željenih sojeva, u značajnoj količini, u mikrobiom sirutke nije bio uspješan te su potrebna daljnja ispitivanja kojima bi se utvrdili razlozi te korekcije provedenog procesa.

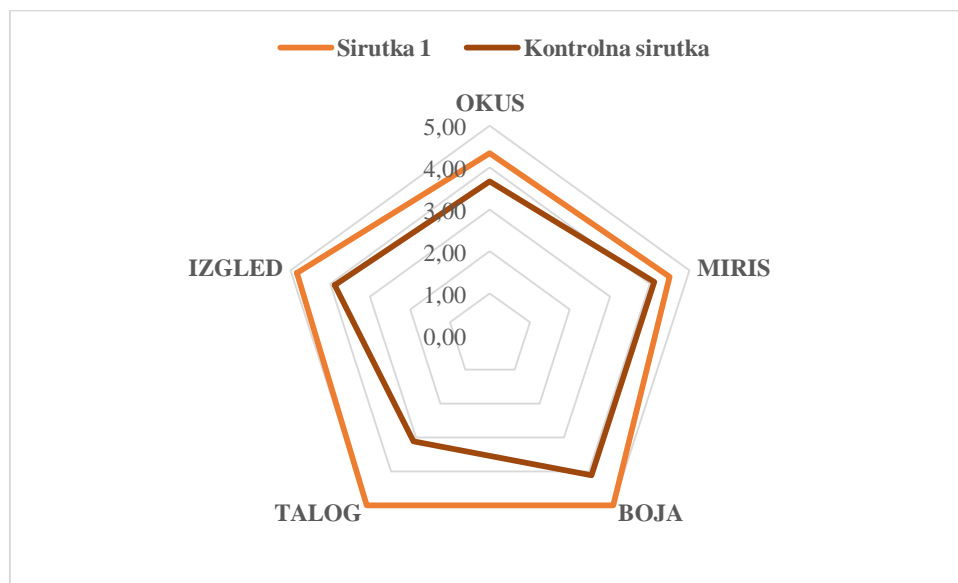
**Tablica 9.** Izmjerene koncentracije uzoraka DNA izoliranih iz sirutki (0.7 mm)

Uzorak	Koncentracija dsDNA (ng/ $\mu$ L)
Sirutka	23,78
Sirutka	44,22
Sirutka	29,77
Kontrolna sirutka	36,50



**Slika 7.** Prikaz zastupljenosti inokuliranih bakterijskih vrsta u mikrobnjoj populaciji sirutke

Provedenom senzorskom analizom, kojom su se ispitivala svojstva proizvedene sirutke i kontrolne sirutke, sva ispitivana svojstva, odnosno okus, miris, boja, talog te izgled pokazala su se boljima kod proizvedene sirutke (slika 8). Hedonističkom analizom, veću ocjenu sviđanja dobila je proizvedena sirutka bez dodane arome u odnosu na kontrolnu sirutku bez dodane arome, a najveću ocjenu dobile su proizvedena sirutka s dodatkom arome maline te proizvedena sirutka s dodatkom vanilije (tablica 10).



**Slika 8.** Rezultati senzorskog ispitivanja svojstava proizvedene sirutke

**Tablica 10.** Prosječna ocjena prihvatljivosti fermentiranog napitka na bazi sirutke s i bez dodatka aroma komponenata (malina i vanilija)

Uzorak	Sirutka (bez dodatka arome)	Sirutka (dodatak arome maline)	Sirutka (dodatak arome vanilije)
Proizvedena sirutka	6,80	7,20	7,20
Sirutka (kontrola)	6,20	5,60	5,00

## 5. ZAKLJUČCI

- Razvijen je inovativni napitak na bazi sirutke koji sadrži više od  $10^6$  probiotičkih bakterijskih stanica po mL, čime se može kategorizirati kao funkcionalni probiotički napitak.
- Primjenom spektrometrije masa ustanovljena je prisutnost peptida u inovativnom napitku, kojima se u daljnjim istraživanjima treba odrediti biološka aktivnost s ciljem karakterizacije bioaktivnih peptida.
- Prema provedenoj senzorskoj analizi, inovativni napitak na bazi sirutke može se prirediti kao tekući napitak s dodatkom vanilije ili maline, ali i u obliku koncentrirane sirutke kao liofilizirani proizvod.

## 6. POPIS LITERATURE

- Baptista, D. P., Galli, B. D., Cavalheiro, F. G., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M. L. (2018) *Lactobacillus helveticus* LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *International Dairy Journal* **87**:75-83.
- Božanić, R. (2015) Mlijeko [s predavanja Sirovine prehrambene industrije održanog u ak.god. 2015./2016. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu]. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Duvnjak Z., Kosaric N. (1983) Sirutka i njeno korištenje u prehrambenoj i fermentacijskoj industriji, *Mljekarstvo* **33**(2) 1983.
- Eslami M., Yousefi B., Kokhaei P., Moghadas A.J., Moghadam B.S., Arabkari V., Niazi Z. (2019) Are probiotics useful for therapy of Helicobacter pylori diseases? *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **64**: 99-108.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report*. 1–11.
- Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. (2019) Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology* **27**(4): 323-338.
- Grgurek Lj. (2015) PROIZVODNJA SIREVA-TEORIJA I PRAKSA. Zagreb: Probiotik d.o.o., 1. Izd., Tonković K., Begić D., ur., str. 15
- Kareb, O., Aïder, M. (2018) Whey and Its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: a Critical Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **11**(2): 348-369.
- Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 981–987.
- Mann B., Athira S., Sharma R., Kumar R., Sarkar P. (2019) Whey proteins, From Milk to Medicine. U: Academic Press, 1. Izd., Deeth, H. C. i Bansal N., ur., poglavlje 14
- Parvez S., Malik K. A., Ah Kang S., Kim H. Y. (2006) Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* **100**:1171–1185.



Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008) Narodne novine **74** (NN 74/2008).

Publications Office of European Union (2019), Functional Foods <<https://publications.europa.eu>>. Pristupljeno 17.7.2019.

Roberfroid, M.B. (2000) *Functional Foods*, Concept to Product. U: Gibson, 1.izd., G.R. and Williams, C.M., ur., Woodhead Publishing, Cambridge, str. 1

Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J, Mattila-Sandholm T. (2009) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* **28;84**(3):197-215.

Samaržija, D. (2015) Fermentirana mlijeka. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga, str. 311

Šušković J., Kos B., Frece J., Beganović J., Leboš Pavunc A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(3-4): 77-84.

Šušković, J. (1997): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1): 57-73.

Šušković, J. (2017) Probiotici i starter kulture [s predavanja Probiotici i starter kulture održanog u ak.god. 2017./18. na Prehrambeno-biotehnoškom fakultetu]. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet

Vallianou N., Stratigou T., Christodoulatos G. S., Dalamaga M. (2019) Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives. *Current Obesity Reports* **8**(3):332-332.

Wang J., Wu T., Fang X., Yang Z. (2019) Manufacture of low-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* JLK0142 and its functional properties. *Journal of Dairy Science* **102**(5):3825-3838.

Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. (2017) Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal* **67**:46–60.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Ime i prezime studenta