

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Iva Dvorneković
7259/BT

PRIMJENA PROBIOTIČKIH STARTER KULTURA U PROIZVODNJI SIRA
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4.

Mentor: prof.dr.sc Blaženka Kos

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Primjena probiotičkih starter kultura u proizvodnji sira

Iva Dvorneković, 0058208845

Sažetak: Cilj ovog rada je bio proizvesti sušene svježe sireve s dodanom funkcionalnom vrijednošću primjenom probiotičkih autohtonih sojeva *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactococcus lactis* ZG7-10 i *Lactobacillus fermentum* D12. Sojevi su dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Sveučilišta u Zagrebu, te su nakon provedenih znanstvenih istraživanja u istom laboratoriju, prema strogim selekcijskim kriterijima, odabrani kao probiotički sojevi. Svaki od njih ima određeno funkcionalno metaboličko svojstvo koje doprinosi aromi, teksturi i kvaliteti proizvedenog sira. Prema provedenim analizama udjela suhe tvari i mliječne masti, proizvedeni sušeni svježi sir pripada kategoriji „ekstra tvrdi sir“ i „polumasni sir“. Sekvencioniranje ukupne DNA iz uzoraka sireva je potvrdilo prisutnost svih dodanih probiotičkih sojeva, a broj živih bakterijskih stanica u proizvedenom siru je nakon proizvodnje i tijekom skladištenja bio veći od 10^6 CFU/g, što je minimalni preporučeni broj po gramu probiotičkog proizvoda. MALDI-TOF masenom spektrometrijom detektiran je ukupno 51 peptid u uzorcima proizvedenog sira u omjeru mase i naboja raspona od 312,130 do 4508,877, koji mogu imati potencijalno bioaktivno djelovanje.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus*, probiotici, sir, starter kulture

Rad sadrži: 31 stranica, 13 slika, 5 tablica, 37 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000

Zagreb Mentor: prof.dr.sc Blaženka Kos

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

Datum obrane: 18. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Application of probiotic starter cultures in cheese production

Iva Dvorneković, 0058208845

Abstract: The aim of this research was to produce batches of dry curd cottage cheese, with its functional value enriched, using probiotic autochthonous strains: *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactococcus lactis* ZG7-10 and *Lactobacillus fermentum* D12. These strains are a part of the microorganism collection at the Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology, at the University of Zagreb, and were chosen (based on extensive research and criteria) as probiotic strains. Each of these strains has a certain metabolic property which contributes to the cheese aroma, texture and overall quality. By analysing the dry matter and fat content of milk it was determined that this cheese falls into the 'hard cheese' and 'medium fat cheese' categories. Collective DNA sequencing confirmed the presence of all added probiotic strains and the number of live bacteria (after production and during storage) was over 10^6 CFU/g, which is the minimal recommended quantity per gram for probiotic products. Using MALDI-TOF mass spectrometry, a total of 51 peptides (with a mass-to-charge ratio from 312,130 to 4508,877), which may potentially exhibit bioactive activity, were detected in cheese samples.

Keywords: cheese, lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, probiotic, starter cultures

Thesis contains: 31 pages, 13 figures, 5 tables, 37 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: PhD Blaženka Kos, Full professor

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

Defence date: 18th September, 2019.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Bakterije mliječne kiseline | 2 |
| 2.2. Probiotici | 4 |
| 2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika | 4 |
| 2.3. Funkcionalna hrana i starter kulture | 5 |
| 2.3.1. Opći kriteriji za izbor starter kulture: | 6 |
| 2.4. Proizvodnja sira..... | 6 |
| 2.5. Proizvodni sojevi | 8 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 10 |
| 3.1. Materijali | 10 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizmi | 10 |
| 3.1.2. Mlijeko | 10 |
| 3.1.3. Hranjive podloge | 10 |
| 3.1.4. Kemikalije..... | 11 |
| 3.1.5. Aparatura i pribor | 11 |
| 3.2. Metode | 13 |
| 3.2.1. Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja sušenog svježeg sira s poboljšanim nutritivnim svojstvima i dodanom funkcionalnom vrijednošću | 13 |
| 3.2.2. Određivanje prinosa sira | 13 |
| 3.2.3. Broj živih stanica mješovite starter kulture u proizvedenim sirevima, primjenom klasičnih mikrobioloških metoda..... | 14 |
| 3.2.4. Određivanje pH-vrijednosti i kiselosti nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira ... | 14 |
| 3.2.5. Određivanje suhe tvari u siru nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira | 15 |
| 3.2.6. Mikrobiološka analiza nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira | 15 |
| 3.2.7. Određivanje količine masti i laktoze u uzorcima sireva | 16 |
| 3.2.8. Detekcija bioaktivnih peptida u uzorcima sireva | 16 |
| 3.2.9. Izolacija ukupne DNA iz uzoraka proizvedenih sušenih svježih sireva..... | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 18 |
| 4.1. Ustanovljavanje parametara kvalitete nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira..... | 18 |
| 4.2. Identifikacija probiotičke starter kulture u proizvedenim sirevima primjenom DNA sekvencioniranja..... | 25 |
| 5. ZAKLJUČAK | 27 |
| 6. LITERATURA | 28 |

1. UVOD

Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. S obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira, konzistenciji i građi, sireve možemo podijeliti na: ekstra tvrdi sir, tvrdi sir, polutvrdi, meki i svježi sir. Proizvodnja sira datira još iz doba prije Krista kada su se koristile mješine za dozrijevanje i čuvanje sira. Za proizvodnju sira je potrebno mlijeko, kalcijev klorid te bakterije mliječne kiseline. Proces proizvodnje je prilično jednostavan i nije potrebno puno ljudskog rada. Bakterije mliječne kiseline previru laktozu do mliječne kiseline. Tim procesom nastaje gruš koji se odvaja od sirutke i čijom daljnjom preradom nastaje sir (Leboš Pavunc i sur., 2012).

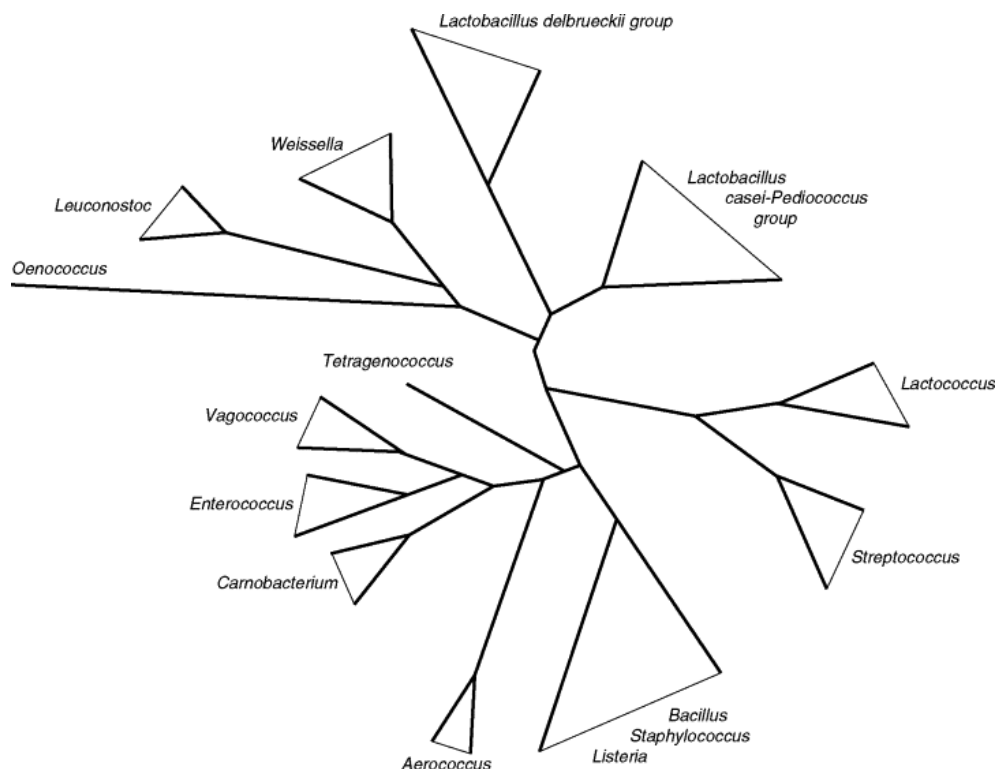
Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio ljudske prehrane i mogu se smatrati prirodnim načinom opskrbe probavnog sustava aktivnim tvarima. Koriste se u tradicionalnoj pripremi jogurta, kefira, sira, kobasica i kiselog kupusa. Razna istraživanja su dokazala da određeni sojevi BMK povoljno utječu na zdravlje jer djeluju antimikrobno, antimutageno, utječu na apsorpciju kalcija i poboljšavaju sustav crijevne mikrobne populacije (Kršev, 1996). Zbog svega navedenog, BMK smatraju se potencijalnim probiotičkim sojevima.

Cilj ovog rada je bio proizvesti sušene svježe sireve s dodanom funkcionalnom vrijednošću primjenom probiotičkih autohtonih sojeva *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactococcus lactis* ZG7-10 i *Lactobacillus fermentum* D12. Sojevi su dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Sveučilišta u Zagrebu, te su nakon provedenih znanstvenih istraživanja u istom laboratoriju, prema strogim selekcijskim kriterijima, odabrani kao probiotički sojevi. Svaki od njih ima određeno metaboličko svojstvo koje doprinosi aromi, teksturi i kvaliteti proizvedenog sira.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

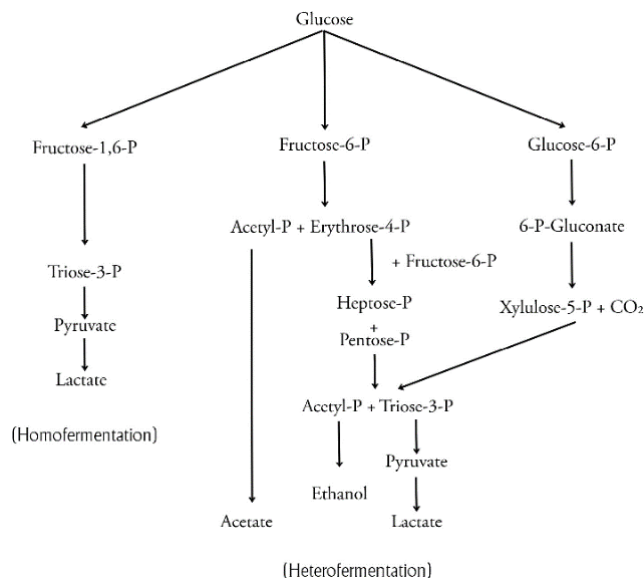
Bakterije mliječne kiseline su skup bakterija ujedinjenih morfološkim, metaboličkim i fiziološkim karakteristikama. One su Gram-pozitivne, nesporogene i glavi produkt fermentacije ugljikohidrata im je mliječna kiselina. Sastavni su dio zdravih humanih i animalnih sluznica te su ključne za proizvodnju fermentirane hrane. Bakterije mliječne kiseline obuhvaćaju velik broj vrsta svrstanih u preko 20 rodova, od kojih su najvažniji: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Oenococcus* te *Pediococcus* prikazani na slici 1. Klasifikacija bakterija mliječnih kiselina u rodove temelji se na različitoj morfologiji, metaboličkim putevima razgradnje ugljikohidrata, optimalnoj temperaturi rasta, mogućnosti rasta na podlogama s visokom koncentracijom soli i toleranciji kiselih i lužnatih područja (Salminen i sur., 2004).



Slika 1. Prikaz najvažnijih rodova bakterija mliječne kiseline (Narvhus, Axelsson, 2003)

Bakterije mliječne kiseline su aerotolerantne i od oksidirajućih sredstava poput hidrogen peroksida ih čuvaju peroksidaze. Imaju nizak sadržaj gvanina i citozina u genomske DNA. Nedavno je razvijena molekularna tehnika sekvencioniranja 16S rDNA koja omogućuje precizno i točno identificiranje pojedinih vrsta. Optimalna pH vrijednost za rast im je 5.5 - 5.8 i rastu na kompleksnim hranjivim podlogama zahtijevajući određene proteine, vitamine,

minerale, masne kiseline i ugljikohidrate. Dije se na homofermentativne, kod kojih je produkt fermentacije mliječna kiselina i heterofermentativne, koje uz mliječnu kiselinu još proizvode alkohol, CO₂ i octenu kiselinu što prikazuje slika 2 (Mokoena, 2017). Podjela pojedinih rodova na homofrmentativne i heterofermentativne prikazana je na slici 3.



Slika 2. Shematski prikaz produkata fermentacije homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija (Faria-Olivera i sur., 2015)

Optički izomeri mliječne kiseline koje proizvode neke homo- i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline

| Bakterije | Izomer mliječne kiseline |
|----------------------------|--------------------------|
| HOMOFERMENTATIVNE | |
| Rod <i>Lactobacillus</i> | D(-), L(+), DL |
| Rod <i>Pediococcus</i> | DL, L(+) |
| Rod <i>Streptococcus</i> | L(+) |
| Rod <i>Enterococcus</i> | L(+) |
| Rod <i>Lactococcus</i> | L(+) |
| HETEROFERMENTATIVNE | |
| Rod <i>Lactobacillus</i> | DL |
| Rod <i>Leuconostoc</i> | D(-) |
| Rod <i>Bifidobacterium</i> | L(+) |

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) ne preporučuje niti D(-) niti DL-mliječnu kiselinu kao dodatak dječjoj hrani, dok je za odrasle određena granica od 100 mg/kg tjelesne težine. Preferiraju se sojevi bakterija mliječne kiseline koji proizvode L(+) izomer mliječne kiseline.

Slika 3. Podjela rodova BMK na homofermentativne i heterofermentativne (Šušković, 2018)

Zbog GRAS statusa (eng. Generally Regarded as Safe) prema US FDA, bakterije mliječne kiseline imaju široku primjenu kao starter kulture. Proizvode specifične metabolite koji poboljšavanju aromu (diacetil i acetaldehid), teksturu (egzopolisaharidi), doprinose nutritivnoj vrijednosti i sprječavaju rast nepoželjnih i patogenih mikroorganizama pomoću antimikrobnih supstanci.

2.2. Probiotici

Riječ probiotik dolazi od grčkih riječi *pro* i *bios* što u prijevodu znači za život. Prvi put je upotrijebljena davne 1965. godine. Tijekom godina definicija se mijenjala, sve dok 1992. godine Havenaar i Huis in't Veld nisu definirali probiotik kao jednu ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina. Uz pojam probiotika veže se i pojam prebiotika. Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na domaćina pomoću selektivne stimulacije rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu i tako poboljšavaju zdravlje ljudi (Šušković, 1996).

Da bi se neki soj smatrao probiotikom mora zadovoljiti tri kriterija: opći, tehnološki i funkcionalni. Opći kriteriji obuhvaćaju točnu taksonomsku identifikaciju, humano podrijetlo za humane probiotike, netoksičnost i nepatogenost, genetičku stabilnost, otpornost prema niskim pH vrijednostima i otpornost prema želučanim kiselinama. Tehnološki kriteriji su stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke, brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, smrzavanje i liofiliziranje i visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu. Funkcionalni zahtjevi su sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela, antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama, imunomodulacijski učinak te sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje (Šušković i sur., 2001). Probiotici se mogu podijeliti u 3 skupine: dodaci hrani, funkcionalna hrana i živi lijekovi (slika 4).

2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika

2. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu

- i) proizvodnjom antibakterijskih supstancija, obuhvaćajući primarne metabolite: mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, diacetil, acetaldehid, vodikov peroksid i bakteriocine
- ii) natjecanjem za hranjive tvari

- iii) natjecanjem za mjesta vezanja na crijevnom epitelu
- 3. Modifikacija metaboličkih procesa u crijevima:
 - i) povećanjem aktivnosti nekih enzima
 - ii) smanjenjem aktivnosti enzima koji sudjeluju u kancerogenim procesima
- 4. Stimulacija imunološkog sustava domaćina
 - i) povećanjem razine antitijela
 - ii) povećanjem aktivnosti makrofaga (Šušković i sur., 1997)



Slika 4. Klasifikacija probiotičkih proizvoda (Sleator i Hill, 2008; Šušković i sur., 2010)

2.3. Funkcionalna hrana i starter kulture

Funkcionalna hrana definira se kao funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu (European Commission – International Life Science Institute, 1999).

Procesiranje mikrobnih sustava za fermentiranu hranu može biti podijeljeno na tri glavna dijela: procesiranje starter kultura, procesiranje proizvoda sa željenim funkcionalnim karakteristikama i procesiranje hrane koja sadrži probiotike.

Starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme, a primjenjuju se za dobivanje različitih fermentiranih namirnica s krajnjim ciljem oplemenjivanja tih namirnica različitim proizvodima metabolizma upotrijebljenih starter kultura (Šušković, 2018).

Funkcionalne starter kulture definiraju se kao kulture koje posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo s krajnjim ciljem poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje i fiziologiju potrošača (Šušković, 2018). Uloga funkcionalnih starter kultura u dobivanju fermentirane hrane je poboljšanje arome i teksture proizvoda, sprječavanje kvarenja i inhibicija patogena. Proizvodnja antimikrobnih supstanci često se smatra jednim od načina sprječavanja rasta patogenih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu (Salminen i sur., 1996) i produžuje vijek trajanja proizvoda.

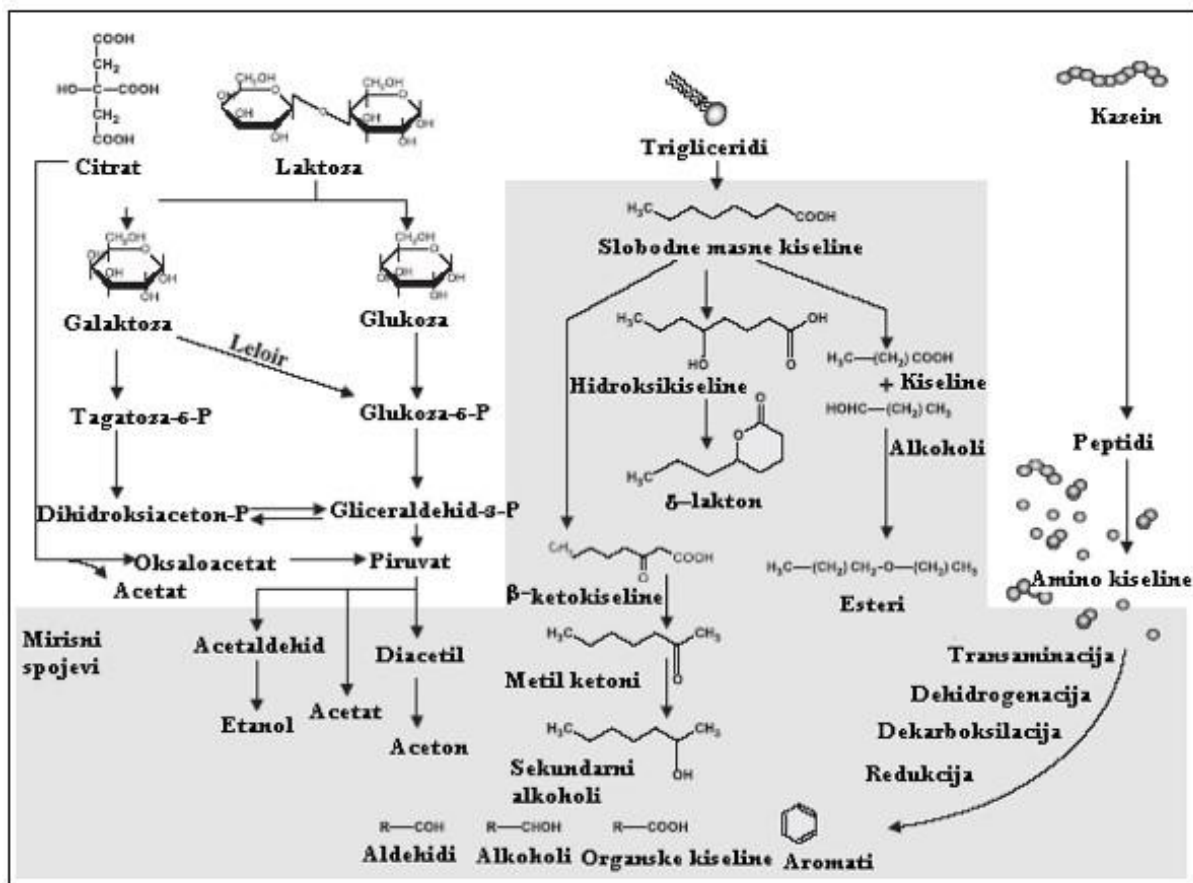
2.3.1. Opći kriteriji za izbor starter kulture:

- sigurnost: starter mikroorganizmi ne smiju imati patogeno ili toksično djelovanje. Priprema starter kultura mora biti provedena u strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima.
- tehnološke karakteristike: starter mikroorganizmi moraju dominirati nad spontanom mikroflorom i moraju provoditi određenu metaboličku aktivnosti. Tijekom tehnološkog postupka proizvodnje starter kultura ne smije doći do kontaminacije.
- ekonomski aspekti: uzgoj starter kulture mora biti lako izvediv s ekonomske točke gledišta. Čuvanje starter kultura može biti provedeno metodama smrzavanja ili liofilizacije s minimalnim gubitkom metaboličke aktivnosti kulture. Važna svojstva moraju biti stabilna u definiranim uvjetima čuvanja kroz nekoliko mjeseci. Rukovanje starter kulturama mora biti olakšano koliko god je moguće.

2.4. Proizvodnja sira

Proizvodnja sira klasičan je primjer čuvanja hrane tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Prvi zapisi o siru pronađeni su u kolijevci civilizacije, bogatom poljoprivrednom području, smještenom između rijeka Eufrat i Tigris, a datiraju 7000 - 6000 godina prije Krista. Arheološka istraživanja utvrdila su da je taj sir načinjen od ovčjeg i kozjeg mlijeka. Mješine su bile prva spremišta mlijeka nomadskih plemena koje su na taj način čuvale dnevne potrebe mlijeka. U toplim krajevima fermentacija mliječnog šećera vjerojatno je uzrokovala zgrušavanje mlijeka u mješinama, a potom je tijekom putovanja i trešnje došlo do razbijanja gruševine, što je pak uzrokovalo pojavu sirutke i sirnog gruša. Sirutka je postala ukusan, osvježavajući napitak za vruća razdoblja, dok je gruševina zaštićena kiselinom, uz dodatak soli, postala vrijedan izvor bjelančevina u nedostatku prehrane mesom (Lukač-Havranek, 1995).

Proizvodnja sira provodi se u 5 koraka: obrada mlijeka, koagulacija, odvajanje sirutke, soljenje i dozrijevanje. Prvi korak je toplinska obrada mlijeka pri 73°C na 15 sekundi kako bi se uništili patogeni mikroorganizmi. Može se provesti i proces standardizacije mlijeka tako da se regulira udio masti i kazeina. Zatim se dodaju prethodno odabrane starter kulture i slijedi proces koagulacije. Da bi došlo do procesa grušanja treba se narušiti struktura K-kazeina. K-kazein stabilizira prirodnu koloidnu strukturu mlijeka jer se njegova hidrofobna N-terminalna regija udružuje s lipofilnim (inače netopivim) molekulama α i β - kazeina, dok se negativno nabijena C-terminalna regija udružuje s vodom i sprječava da micela kazeina budu prevelike. Agregacija micela može se potaknuti na dva načina- enzimski i pomoću kiselina. U siru se koristi enzimski način, pomoću renina, enzima izoliranog iz četvrtog želuca teladi. Enzim se sastoji od dvije želučane proteaze: kimozi i pepsina (Andrén, 2002). Kimozin inducirana koagulacija odvija se u 3 koraka: prvi je hidroliza K-kazein na para K-kazein i glikomakropeptid koji odlazi u sirutku. Kad se hidrolizira 70% K-kazeina (Walstra i sur., 2006), koloidna stabilnost micela je dovoljno narušena da započne druga faza procesa - spontana agregacija. Lanci molekula povezuju se u trodimenzionalnu strukturu hidrofobnim vezama i učvršćuju vezanjem kalcija. Koagulacija se može poboljšati smanjenjem pH, povećanjem koncentracije kalcija i povišenjem temperature. Završni korak je rezanje gruša i uklanjanje sirutke (Hallen, 2008). Sir se soli kako bi se pojačao okus i da mu se produlji vijek trajanja. Faza dozrijevanja je ključna za razvijanje arome i okusa što se postiže raznim enzimima iz bakterija mliječne kiseline (Kongo, 2013). Slika 5. prikazuje biokemijske procese nastajanja spojeva okusa i arome sira.



Slika 5. Biokemijski procesi nastajanja spojeva okusa i arome sira (Marilley i Casey, 2004; Mikulec, 2010)

2.5. Proizvodni sojevi

Prema dosadašnjim istraživanjima provedenim u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Kos i sur., 2003, Kos i sur., 2008; Beganović i sur., 2011; Uroić i sur., 2016; Banić i sur., 2018), kao i prema istraživanjima drugih autora (Dicks i sur., 2018; Collins i sur., 2018; Roman i sur., 2018; Taverniti i sur., 2019) specifični ekstracelularni proizvodi metabolizma i određene komponente stanične ovojnice, prisutne na površini bakterijskih stanica, sudjeluju u interakcijama s mikrookolišem i uključene su u probiotičko djelovanje bakterijskih sojeva koji ih proizvode. Takva specifična metabolička svojstva daju dodatno funkcionalno svojstvo proizvedenim sirevima ako se dodaju kao funkcionalne starter kulture. Ovdje su navedena tri autohtona probiotička *Lactobacillus* soja sa specifičnim metaboličkim svojstvima, koji su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu:

a) *Lactobacillus brevis* D6 je autohtoni soj izoliran iz tradicionalno proizvedenog dimljenog sira s područja Zagorja. On je mikroaerofilna, Gram-pozitivna i heterofermentativna bakterija. Može biti izoliran iz različitih izvora kao što su fermentirana hrana ili probavni trakt ljudi i životinja. Neki sojevi *Lactobacillus brevis* ekspimiraju S-proteine na površinu svojih stanica što ih čini potencijalnim probioticima. *Lactobacillus brevis* D6 ekspimirira S-proteine veličine 45-kDa te ima svojstvo vezanja za ekstracelularne proteine i epitelne stanice probavnog trakta (Kant i sur., 2016, Uroić i sur., 2016). Soj *Lactobacillus brevis* SF9B također je izoliran, identificiran i okarakteriziran u okviru probiotičkog koncepta sa specifičnim svojstvom proizvodnje S-proteina (Banić i sur., 2018).

b) *Lactobacillus plantarum* D13 je aerotoleranta bakterija veličine 3 – 8 µm i širine 0.9 - 1.2 µm. Optimalni uvjeti za rast su mu pH od 3.4 do 8.8 i temperatura 12°C to 40°C. Ovaj soj je producent antimikrobnih peptida bakteriocina koji djeluju antimikrobno prema srodnim bakterijskim vrstama soja producenta. Bakteriocini uskog spektra inhibiraju Gram-pozitivnu bakteriju *Listeria monocytogenes*, dok oni širokog spektra inhibiraju Gram-negativne bakterije. U zrenju tvrdog sira bakteriocini bakteriolizinskog tipa liziraju starter kulture s ciljem oslobađanja intracelularnih enzima.

c) *Lactobacillus fermentum* D12 je soj koji proizvodi 3 različite vrste egzopolisaharida, jedan homopolisaharid te 2 heteropolisaharida. Egzopolisaharidi pokazuju antitumorsku i antioksidativnu aktivnost, stimuliraju aktivnost imunskog sustava te snižavaju razinu kolesterola u krvi, a u prehrambene svrhe koriste se kao dodaci hrani koji poboljšavaju teksturu, nutritivnu vrijednost i senzorske karakteristike (Zajsek i sur., 2013; Kim i sur., 2010).

d) *Lactococcus lactis* ZG7-10 je okrugla bakterija koja naraste do dužine 1.5 µm, nesporogena je i ima homofermentativni metabolizam. U proizvodnji sira dodaje se zbog svoje proteolitičke aktivnosti koja je nužan preduvjet u proizvodnji sireva zbog toga što pridonosi njegovoj aromi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Sojevi *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus fermentum* D12 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Sveučilišta u Zagrebu, te su nakon provedenih znanstvenih istraživanja u istom laboratoriju, prema strogim selekcijskim kriterijima, odabrani kao probiotički sojevi. Svaki od njih ima određeno metaboličko svojstvo koje doprinosi aromi, teksturi i kvaliteti sira te su stoga odabrani kao funkcionalne starter kulture za proizvodnju sušenog svježeg sira.

3.1.2. Mlijeko

Za proizvodnju sira korišteno je 2 L pasteriziranog mlijeka „Veronika“.

3.1.3. Hranjive podloge

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sustava (Biolife, Italija): pepton 10,0 g/L; mesni ekstrakt 10,0 g/L; kvašćev ekstrakt 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,1 g/L; MnSO₄·7H₂O 0,05 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; agar 20,0 g/L u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5.
- M17 agar sastava (Biolife, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5 g/L; pepton 2,5 g/L; sojin pepton 5,0 g/L; kvašćev ekstrakt 2,5 g/L; mesni ekstrakt 5,0 g/L; laktoza 5,0 g/L; natrijev glicerofosfat 19,0 g/L; magnezijev sulfat 0,25 g/L; askorbinska kiselina 0,5 g/L. pH vrijednost podloge iznosi 7,1.
- Aloa agar (selektivna podloga za izolaciju test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes*) (Biolab, Mađarska): pepton 34 g/L; glukoza 2 g/L; mineralne soli 15,5 g/L; natrijev piruvat 2 g/L; L-afosfatidilinozitol 2 g/L; kromogeni supstrat 0,05 g/L; antibiotici 0,17 g/L; amfotericin B 0,01 g/L; puferi 3,5 g/L; agar 13 g/L. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 mL destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 mL tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

- XLD agar (selektivni medij za izolaciju *Salmonella* i *Shigella* vrsta) (Biolife, Italija): ksiloza 3,5 g/L; L-lizin 5,0 g/L; laktoza 7,5 g/L; saharoza 7,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; kvašćev ekstrakt 3 g/L; deoksikolna kiselina 2,5 g/L; natrijev tiosulfat 6,8 g/L; amonij željezov citrat 0,8 g/L; fenol crveno 0,08 g/L; agar 13,5 g/L 55 g podloge se resuspendira u 1000 mL hladne destilirane vode. Zagrijavati uz miješanje dok se potpuno ne otopi (bez autoklaviranja) te ohladiti na 45-50°C, dobro promiješati i izliti u sterilnu Petrijevu zdjelicu.

3.1.4. Kemikalije

- sterilna fiziološka otopina
- destilirana voda
- fenolftalein (2%)
- 0,1 M NaOH
- 70% etanol
- HCCA matrice (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina u 50% acetonitrilu i 2.5% trifluorocetnoj kiselini)
- acetonitril
- mravlja kiselina
- otopina lizozima
- TE pufer
- Maxwell® DNA Tissue kit

3.1.5. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Eppendorf epruvete
- stalak za Eppendorf epruvete
- bag mixer (Interscience, Francuska)
- pH elektroda (Metrohm, Švicarska)
- tarionik i tučak
- sušionik (Instrumentaria, Hrvatska)
- eksikator
- Filtrak filter papir No.388
- UPLC sustav (Dionex, Švicarska)
- Amazon ETD (Bruker Daltonik, Njemačka)

- C18 (Acclaim Pepmap, ThermoFisher) HPLC kolona
- Maxwell® 16 Research System instrument (Promega, SAD)
- Biospec-nano (Shimadzu, Japan)
- Erlenmeyerove tikvice

3.2. Metode

3.2.1. Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja sušenog svježeg sira

Za proizvodnju jednog sušenog svježeg kravljeg sira, korišteno je 2 litre pasteriziranog mlijeka „Veronika“. Proizvedene su ukupno 3 paralele jednog sira. Sir je proizveden dodatkom funkcionalnih starter kultura koje pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Sveučilišta u Zagrebu. Svaki od dodanih sojeva ima odgovarajuće funkcionalno svojstvo, soj *Lactobacillus brevis* D6 eksprimira S-proteine na površini svojih stanica, soj *Lactobacillus plantarum* D13 je producent antimikrobnih peptida bakteriocina, a soj *Lactobacillus fermentum* D12 proizvodi 3 različite vrste egzopolisaharida (jedan homopolisaharid i dva heteropolisaharida). Soj *Lactococcus lactis* ZG7-10 je dodan zbog proteolitičke aktivnosti koja je nužan preduvjet u proizvodnji sireva zbog toga što pridonosi njegovoj aromi. Nakon optimizacije uvjeta potrebnih za proizvodnju sira odgovarajuće kvalitete, određeni volumeni prekonocnih kultura odabranih izolata BMK su centrifugirani 10 min pri 4200 o/min, a talog je ispran dva puta dodatkom sterilne fiziološke otopine. Nakon dodatka odgovarajućih autohtonih starter kultura određen je broj inokuluma, odnosno broj živih stanica indirektnom metodom, tj. nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja na de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Biolife, Italija) hranjivu podlogu za laktobacile i M17 (Biolife, Italija) hranjivu podlogu za laktokoke u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. MRS ploče s nacjepljenim *Lactobacillus* vrstama inkubirane su anaerobno pri 37°C, dok su M17 ploče s nacjepljenim sojem *Lactococcus lactis* ZG7-10 inkubirane aerobno pri 24°C. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije te je izračunata srednja vrijednost broja bakterijskih stanica (eng. Colony Forming Unit, CFU) po mililitru upotrijebljenog mlijeka. U svrhu dobivanja tradicionalnog sušenog svježeg sira, dobiveni svježi sirevi su sušeni tijekom 48 sati pri 40°C uz okretanje sireva nakon 24 sata, nakon čega je izmjerena masa dobivenih sireva (Leboš Pavunc i sur. 2012).

3.2.2. Određivanje prinosa sira

U svrhu dobivanja tradicionalnog sušenog svježeg sira, dobiveni svježi sirevi sušeni su tijekom 48 sati na temperaturi od 40°C, uz okretanje sireva nakon 24 sata. Također, nakon dobivanja konačnih tradicionalnih proizvoda, izvagana im je masa te određen prinos. Prinos je određen vaganjem mase proizvedenog sira, a izračunat je prema količini upotrijebljene sirovine, odnosno svježeg mlijeka „Veronika“, prema navedenoj formuli (Leboš Pavunc, 2012):

Prinos sira (%) = (masa proizvedenog sira/volumen upotrijebljene sirovine) x 100

3.2.3. Broj živih stanica mješovite starter kulture u proizvedenim sirevima, primjenom klasičnih mikrobioloških metoda

Broj živih mikroorganizama nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva pri temperaturi od 4°C nakon 5 i 10 dana određen je indirektnom metodom. 1 gram sira sterilno je uzet iz unutrašnjosti i suspendiran u 9 ml sterilne destilirane vode te smrvljen u bag mixer-u (Interscience, Francuska) do dobivanja homogene suspenzije. Nakon toga provedeno je 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* i *Leuconostoc* suspenzija je naciepljena na MRS agar, a u svrhu određivanja broja bakterijskih stanica roda *Lactococcus*, suspenzija je naciepljena na M17 agar. Nakon 48 sati anaerobne inkubacije pri 37°C za bakterije roda *Lactobacillus* i *Leuconostoc* i aerobne inkubacije pri 24°C za bakterije roda *Lactococcus*, izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu uzorka. Pad broja stanica bakterija mliječne kiseline 5 i 10 dana nakon skladištenja izražen je kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/g sira}$) od logaritamske vrijednosti broja živih bakterijskih stanica nakon proizvodnje sira (0. dan) (Božanić i sur., 2010).

3.2.4. Određivanje pH-vrijednosti i kiselosti nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

Kiselost i pH vrijednost proizvedenih sušenih svježih sireva, koja se koristi kao orijentacijski pokazatelj stupnja zrelosti sira, određena je nakon proizvodnje i tijekom skladištenja, odnosno nakon 5 i 10 dana.

Mjerenje pH vrijednosti provedeno je uranjanjem pH elektrode (Metrohm, Švicarska) u sir i očitavanjem izmjerene vrijednosti na mjernom instrumentu. pH metar je prije upotrebe baždaren uranjanjem u otopine poznate pH vrijednosti. Nakon svakog mjerenja, pH metar je ispran destiliranom vodom s ciljem uklanjanja zaostalih komadića sira.

Kiselost sira određena je tako da je 5 g sira u tarioniku tučkom izrađeno u finu, jednoličnu i kremastu masu dodatkom 100 mL destilirane vode zagrijane na 50°C. Dobivenoj emulziji dodan je 1 mL fenolftaleina (2%) i uzorak je titriran s 0,1 M NaOH do pojave blijedo ružičaste boje. Kiselost sira izračunata je prema dolje navedenoj formuli (modificirano prema Božanić i sur., 2010):

$$^{\circ}\text{SH} = \text{mL NaOH} \times f (\text{faktor NaOH}) \times 8 (f_{\text{NaOH}} = 1).$$

3.2.5. Određivanje suhe tvari u siru nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

Suha tvar određena je u uzorcima sireva tijekom skladištenja (0., 5. i 10. dan) u tri paralele, direktnom metodom prema Božanić i sur. (2010), koja se temelji na isparavanju vode iz uzoraka sira sušenjem u sušioniku do konstantne mase. Dno aluminijske posudice prekriveno je kvarcnim pijeskom promjera 0,1 - 0,5 mm (Gram mol, Hrvatska) i stavljeno u sušionik (Instrumentaria, Hrvatska) pri $102 \pm 2^\circ\text{C}$ tijekom 3 - 4 sata s ciljem dodatnog izvlačenja vlage iz pijeska. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom dodano je 2 - 3 g pripremljenog uzorka sira, nakon čega su uzorci sušeni pri temperaturi od $102 \pm 2^\circ\text{C}$ tijekom 2 sata. Nakon 2 sata sušenja, posudica s poklopcem i uzorkom hlađena je u eksikatoru najmanje 30 minuta i nakon toga izvagana. Postupak je ponavlján do dobivanja konstantne mase, pri čemu je za izračunavanje postotka suhe tvari u siru korištena najmanja zabilježena vrijednost. Svi uzorci pripremljeni su u tri paralele, pri čemu je izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija (\pm SD).

Iz razlike u masi izračunat je postotak suhe tvari prema formuli:

$$\% \text{ vode u siru} = a/c \times 100$$

a = razlika u masi aluminijske posudice s uzorkom prije i nakon sušenja (g)

c = masa odvaganutog uzorka (g)

3.2.6. Mikrobiološka analiza nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

Mikrobiološka čistoća nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva nakon 5 i 10 dana na temperaturi od 4°C određena je indirektnom metodom. 1 gram sira sterilno je uzet iz unutrašnjosti i suspendiran u 9 ml sterilne destilirane vode te smrvljen u bag mixer-u (Interscience, Francuska) do dobivanja homogene suspenzije. Nakon toga provedeno je naciepljivanje decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na odgovarajući agar u obliku kapi (10 μl) u dvije paralele. 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 sati aerobne inkubacije pri 37°C , izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu uzorka. Pad broja stanica bakterija mliječne kiseline izražen je kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log$ CFU/g sira) (Božanić i sur., 2010).

3.2.7. Određivanje količine masti i laktoze u uzorcima sireva

Količina masti i laktoze određena je iz 50 grama uzoraka sušenih svježih sireva u Centru za kontrolu namirnica (CKN). Količina masti određena je metodom po Soxhletu, a količina laktoze gravimetrijskom metodom (Gamero-Barraza i sur., 2018).

3.2.8. Detekcija bioaktivnih peptida u uzorcima sireva

Bioaktivni peptidi određeni su frakcioniranjem peptida prema Baptista i sur. (2018). 40 grama uzorka svakog sira homogenizirano je dodatkom 80 mL destilirane vode tijekom 10 minuta. Homogenat je inkubiran na temperaturi od 40°C tijekom 1 sata, nakon čega je provedeno centrifugiranje pri 3000 g tijekom 30 minuta i 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:

3.2.8.1. Priprema uzoraka liofiliziranog sira i sirutke za MALDI identifikaciju

Za analizu bioaktivnih peptida MALDI-TOF masenom spektrometrijom, izvagano je 10 mg liofiliziranog sira u dvije paralele i svakoj je dodan 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 i 4°C. (Baptista i sur.). Po 1 µL supernatanta nanesen je na Bruker Daltonik pločicu za uzorke, osušen na zraku i pokriven s 0.5 µL HCCA matrice (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina u 50% acetonitrilu i 2.5% trifluorocetnoj kiselini). MALDI TOF masena spektrometrija odrađena je na Bruker Daltonik Biotyper sustavu tipa Microflex LT. Spektri su snimljeni u pozitivnom linearnom modu, u području 300 - 40000 kDa uz FlexControl automatski program s metodama za identifikaciju peptida.

3.2.8.2. Priprema uzoraka liofiliziranog sira i sirutke za tripsinsku razgradnju i analizu peptida na nano-HPLC – maseni spektrometar sustavu

Uzorci liofiliziranog sira 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 ostavljene 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 nanese se na C18

(Acclaim Pepmap, ThermoFisher) HPLC kolonu u protoku 3.5 μ L/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.

3.2.9. Izolacija ukupne DNA iz uzoraka proizvedenih sušenih svježih sireva

Uzorci sireva (100 mg) za izolaciju mješovite DNA uzeti su sterilno iz unutrašnjosti te suspendirani u 1 mL fiziološke otopine. Nakon centrifugiranja 10 min pri 13000 o/min, talog je suspendiran u 400 μ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije od ukupno 1,5 sata DNA je izolirana iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell[®] 16 Research System instrumentu (Promega, SAD) primjenom odgovarajućeg Maxwell[®] DNA Tissue kita (modificirano prema Leenhouts sur., 1990). Koncentracija DNA izmjerena je uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan). Uzorci izolirane DNA poslani su 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ustanovljavanje parametara kvalitete nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

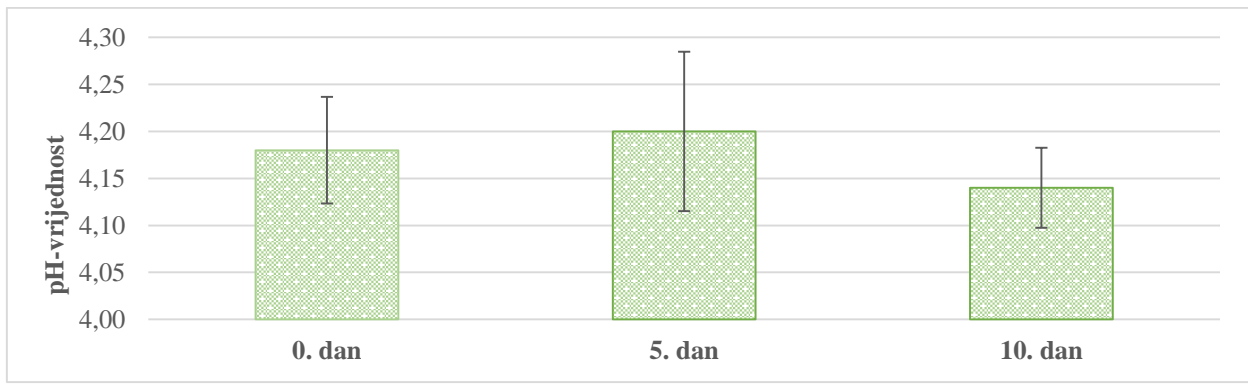
Prije dodatka mješovitih funkcionalnih starter kultura, odnosno prije početka fermentacije, izmjerena je pH-vrijednost svježeg mlijeka „Veronika“. pH-vrijednost je mjerena i tijekom fermentacije. Kad se pH-vrijednost spustila do izoelektrične točke kazeina, 4,60, fermentacija je zaustavljena kako ne bi došlo do povišenja kiselosti što može imati negativan utjecaj na organoleptička svojstva samog sira. Fermentacija je trajala prosječno 19 sati. Nakon što smo inokulirali, priredili smo razrjeđenja i nacijepili ih na hranjivu podlogu u svrhu određenja broja živih stanica. Rezultati su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Broj živih stanica (CFU) nakon inokulacije po mililitru mlijeka

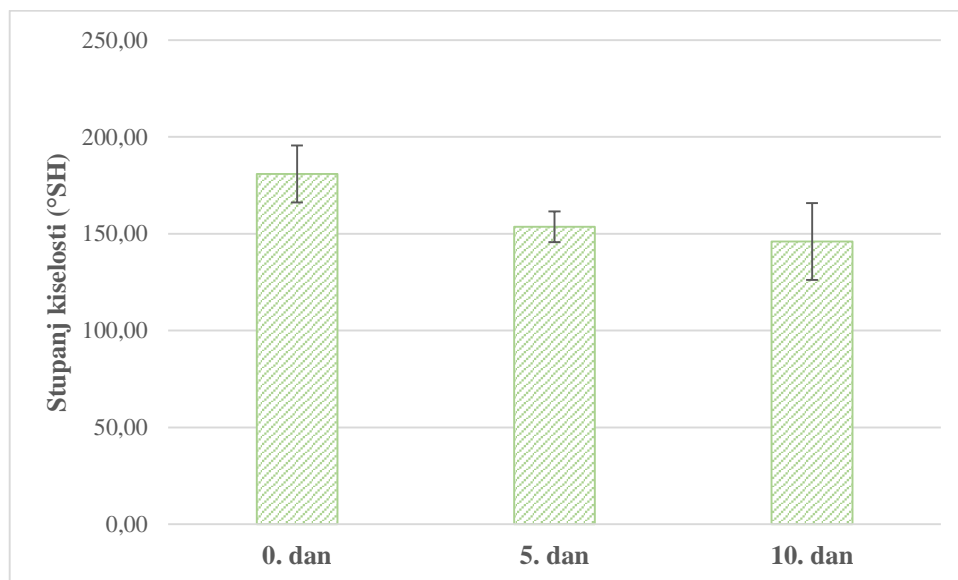
| Bakterijski soj | CFU/ml (\pm SD) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Lactobacillus brevis</i> D6 | $1.87 \cdot 10^6$ (± 0.862) |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> D13 | $1.44 \cdot 10^6$ (± 0.678) |
| <i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10 | $5.22 \cdot 10^6$ (± 1.65) |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 | $2.65 \cdot 10^6$ (± 0.617) |

Tijekom fermentacije, bakterije iskorištavaju laktozu iz mlijeka i proizvode mliječnu kiselinu što dovodi do smanjenja pH vrijednosti. Prije dodatka mješovitih funkcionalnih starter kultura, odnosno prije početka fermentacije izmjerena je pH-vrijednost svježeg mlijeka „Veronika“ ($6.72 (\pm 0.02)$), te je pH-vrijednost mjerena tijekom fermentacije. Kada se pH-vrijednost spustila do izoelektrične točke kazeina, 4,60, fermentacija je zaustavljena kako ne bi došlo do povišenja kiselosti što može imati negativan utjecaj na organoleptička svojstva samog sira. Fermentacija je trajala 19 sati, a izmjerena pH vrijednost je bila $4.53 (\pm 0.54)$. Proizvedena mliječna kiselina ujedno ima i antimikrobno djelovanje jer nije pogodan za rast mnogih mikroorganizama (Sung, Collins, 2000).

Slika 6 prikazuje pH vrijednosti sušenih svježih sireva nakon proizvodnje (0.dan) i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri temperaturi od 4 °C uz izračunate standardne devijacije (\pm SD), a slika 7 Stupanj kiselosti (°SH) sušenih svježih sireva nakon proizvodnje (0.dan) i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri temperaturi od 4°C uz izračunate standardne devijacije (\pm SD).



Slika 6. pH vrijednosti sušenih svježih sireva nakon proizvodnje (0.dan) i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri temperaturi od 4 °C uz izračunate standardne devijacije (\pm SD)



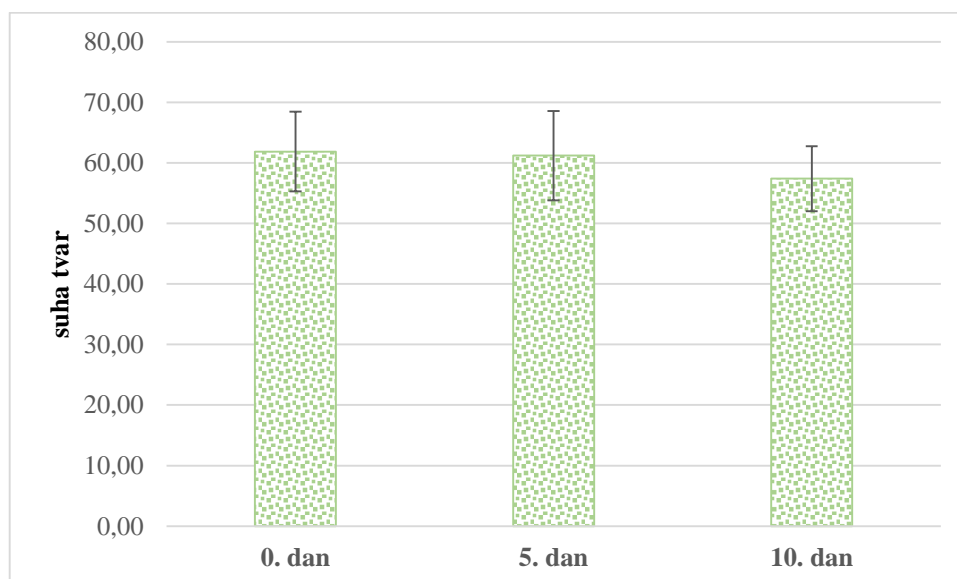
Slika 7. Stupanj kiselosti ($^{\circ}$ SH) sušenih svježih sireva nakon proizvodnje (0.dan) i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri temperaturi od 4°C uz izračunate standardne devijacije (\pm SD)

Kako bi dobili sušeni svježi sir, svježi sir smo sušili na temperaturi od 40° tijekom 48 sati. Kao što je prikazano u tablici 2, masa sušenog svježeg sira znatno je manja od mase svježeg sira jer je prilikom sušenja uklonjena voda.

Tablica 2. Mase svježeg i sušenog svježeg sira te izračunat prinos sušenog svježeg sira, uz prikazane standardne devijacije (\pm SD).

| Masa svježeg sira (g) | Masa sušenog svježeg sira (g) | Prinos sušenog svježeg sira ζ (%) |
|------------------------|-------------------------------|---|
| 711.67 (\pm 161.97) | 250.37 (\pm 25.61) | 12.54 (\pm 1.28) |

U sva tri mjerenja udio suhe tvari ne varira mnogo (slika 8) nego se zadržava oko 60%, što znači da je udio vode približno 40%. Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/2009) i udjelu suhe tvari, proizvedeni sir možemo svrstati u „ekstra tvrdi sir“.



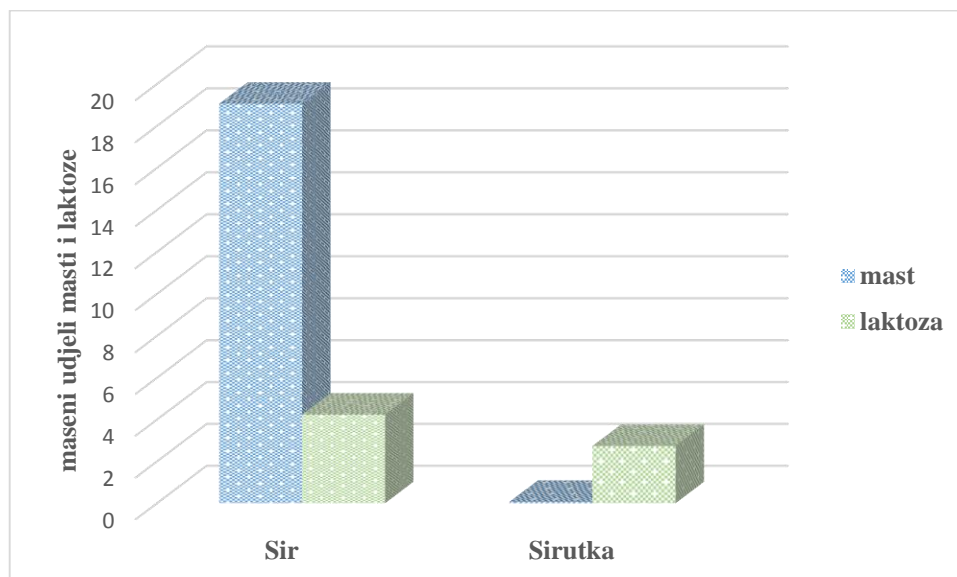
Slika 8. Suha tvar (ζ , %, \pm SD) u uzorcima sušenih svježih sireva nakon proizvodnje (0.dan) i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri 4 °C

Kako bi odredili mikrobiološku čistoću sireva, pripremljene uzorke i njihova decimalna razrjeđenja smo nacijepili na Aloa agar i XDL agar te pratili rast patogenih bakterija *Listeria* i *Salmonella*. Prema rezultatima iz tablice 3 možemo vidjeti da patogene bakterije nisu prisutne u siru.

Tablica 3. Određivanje mikrobiološke čistoće nakon proizvodnje i tijekom skladištenja u sušenom svježem siru

| | <i>Listeria sp.</i> | <i>Salmonella sp.</i> |
|----------------|---------------------|-----------------------|
| 0. dan | 0 | 0 |
| 5. dan | 0 | 0 |
| 10. dan | 0 | 0 |

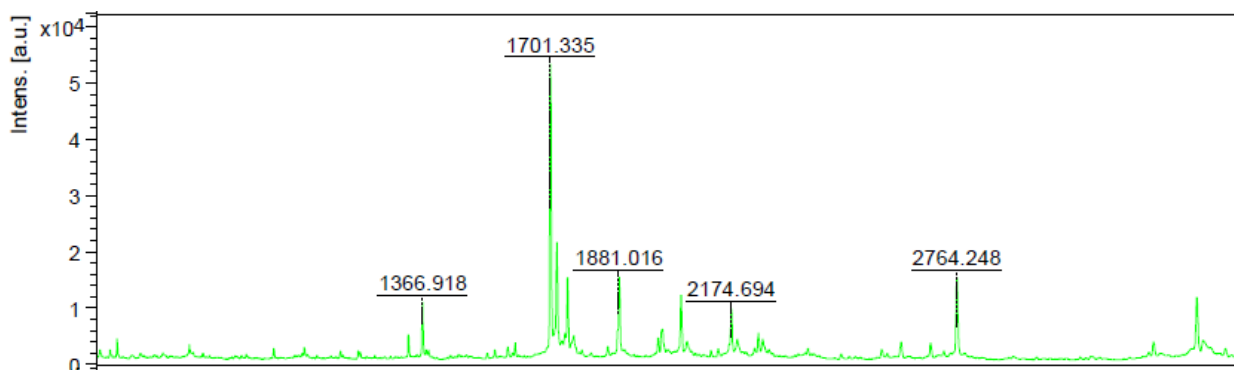
Slika 9 prikazuje rezultate određivanja laktoze i masti iz uzorka koji su poslani u Centar za kontrolu namirnica. Udio masti u siru iznosi 19,06 % što ga prema Pravilniku o siru svrstava u kategoriju polumasnih sireva (Pravilnik N/N 20/09 i 141/13).



Slika 9. Maseni udjeli masti (ζ , %) i laktoze (ζ , %) u uzorcima sušenih svježih sireva određena metodom po Soxletu i gravimetrijskom metodom

Masena spektrometrija je analitička metoda za razdvajanje ioniziranih molekula u plinovitom stanju na osnovu razlike u omjeru mase i naboja. Molekule uzorka se najprije ioniziraju, zatim u električnom polju ubrzavaju i uvode u odabirač brzine koji se sastoji od električnog polja i na njega okomito postavljenog magnetnog polja. Kroz izlaz odabirača brzine mogu proći samo oni ioni čija brzina je jednaka omjeru jakosti električnog i magnetnog polja. Ioni iste brzine nadalje kroz magnetno polje putuju zakrivljenim putanjama čiji se radijusi odnose kao njihove mase i konačno detektiraju na kolektoru. Masena sprektrometrija se sastoji od 3. osnovna dijela: ionizatora, analizatora masa i detektora. MALDI (Matrix Assisted Laser Ionizator) je jedan od

ionizatora koji se koristi za termolabilne i nehlapljive molekule velike molekulske mase. Uzorak kokristalizira s matriksom, nanese se na pločicu u analizatoru i na njega se usmjeri laserska zraka pri čemu glavninu energije apsorbira matriks koji se zbog toga brzo zagrijava. Uzorak pri tome desorbira s pločice i ionizira se. Time of flight (TOF) analizator se koristi za neograničeni raspon molekulskih masa, vrlo je brz i ima visoku osjetljivost. Ioni se iz MALDI unose direktno u analizator uključivanjem jakog električnog akceleracijskog polja koje im daje kinetičku energiju te kroz vakuum cijev putuju do detektora. Masena spektrometrija se koristi za identifikaciju proteina, određivanje čistoće uzoraka, praćenje enzimskih reakcija, određivanje makromolekulske strukture proteina, praćenje postsintetskih modifikacija i detekciju ligand-protein interakcija. Detekcija bioaktivnih peptida primjenom sustava MALDI (eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) i nano-HPLC- masenog spektrometra. Rezultati su prikazani na slici 10 i u tablici 4. MALDI-TOF masenom spektrometrijom detektirano je ukupno 51 peptid u uzorcima proizvedenog sira u omjeru mase i naboja raspona od 312,130 do 4508,877. Detektirani peptidi mogu imati potencijalno bioaktivno djelovanje na probavni, endokrini, kardiovaskularni, imunosni i živčani sustav (Sánchez i sur., 2017).

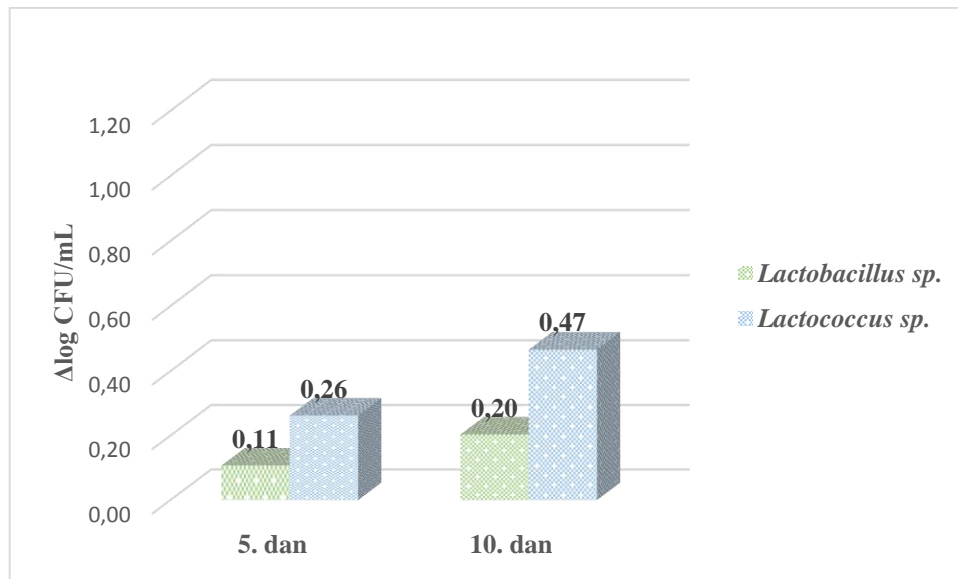


Slika 10. Spektar uzorka liofiliziranih peptida izoliranih iz proizvedenog sira dobivenih MALDI-TOF masenom spektrometrijom

Tablica 4. Prikaz omjera mase i naboja (engl.mass-to-charge ratio, m/z), peptida dobivenih primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa iz proizvedenog sira nakon ekstrakcije i liofilizacije

| Uzorak peptida | m/z | Uzorak peptida | m/z |
|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
| 1 | 312,130 | 27 | 1746,861 |
| 2 | 330,184 | 28 | 1877,254 |
| 3 | 358,286 | 29 | 1881,732 |
| 4 | 375,922 | 30 | 1984,528 |
| 5 | 505,844 | 31 | 1995,451 |
| 6 | 523,992 | 32 | 2042,848 |
| 7 | 550,335 | 33 | 2122,728 |
| 8 | 568,173 | 34 | 2141,684 |
| 9 | 757,395 | 35 | 2176,145 |
| 10 | 978,358 | 36 | 2247,708 |
| 11 | 1058,697 | 37 | 2258,555 |
| 12 | 1152,327 | 38 | 2463,722 |
| 13 | 1199,173 | 39 | 2569,733 |
| 14 | 1204,333 | 40 | 2583,979 |
| 15 | 1329,872 | 41 | 2620,193 |
| 16 | 1367,047 | 42 | 2696,425 |
| 17 | 1536,801 | 43 | 2698,259 |
| 18 | 1556,994 | 44 | 2765,006 |
| 19 | 1590,150 | 45 | 3282,425 |
| 20 | 1603,034 | 46 | 3282,680 |
| 21 | 1609,993 | 47 | 3393,806 |
| 22 | 1701,196 | 48 | 4454,373 |
| 23 | 1709,500 | 49 | 4474,202 |
| 24 | 1712,400 | 50 | 4492,933 |
| 25 | 1718,511 | 51 | 4508,877 |
| 26 | 1739,843 | / | / |

Bakterije roda *Lactobacillus* naciepljivali smo na MRS agar pri anaerobnim uvjetima i temperaturi od 37°C, dok smo one roda *Lactococcus* naciepljivali na M17 agar u aerobnim uvjetima i temperaturi od 24°C. Pratili smo pad broja stanica u roku od 5 i 10 dana. Rezultati su prikazani na slici 11.



Slika 11. Razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log$ CFU/g sira) broja živih bakterijskih stanica *Lactobacillus* i *Lactococcus* sojeva nakon proizvodnje sira (0. dan), te nakon 5 i 10 dana skladištenja proizvedenih sireva.

Veći pad broja stanica je uočen kod roda *Lactococcus* u oba mjerenja, 5. dan razlika logaritamskih vrijednosti između dva roda je 0,15, dok je 10. dan smrtnost *Lactococcus* duplo veća od bakterija roda *Lactobacillus*.

4.2. Identifikacija probiotičke starter kulture u proizvedenim sirevima primjenom DNA sekvencioniranja

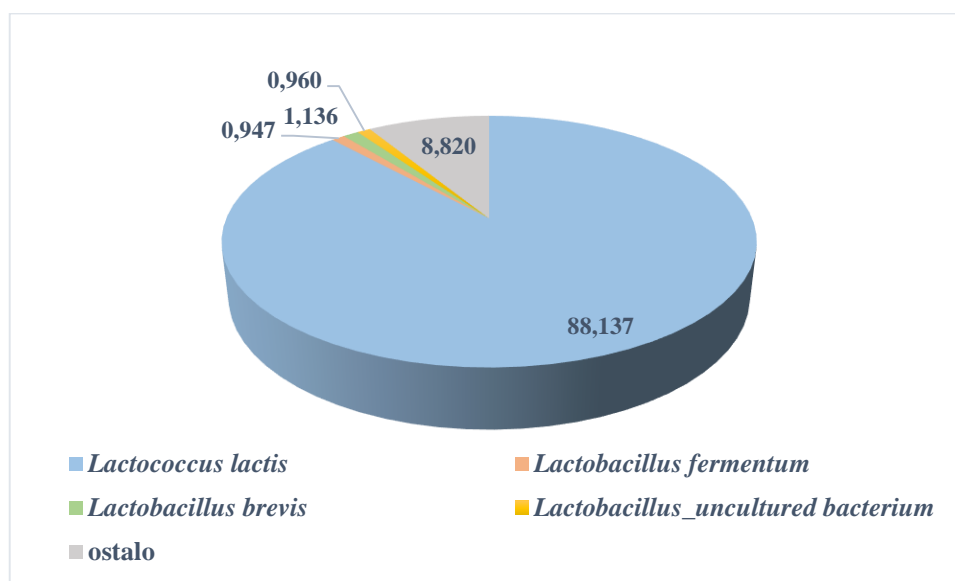
Nakon izolacije mješovite DNA iz uzoraka sireva, izmjerena je koncentracija DNA čiji rezultati su prikazani u tablici 5. U cilju detekcije dodanih bakterija mliječne kiseline u proizvedenim sirevima provedeno je Illumina MiSeq sekvencioniranje mješovite DNA izolirane iz uzoraka sira.

Tablica 5. Koncentracije DNA u uzorcima izoliranih iz sireva

| Uzorak | Koncentracija dsDNA (ng/ μ L) |
|-------------------|--------------------------------------|
| Sir (1. paralela) | 69,22 |
| Sir (2. paralela) | 73,89 |
| Sir (3. paralela) | 73,48 |

Izolacija dsDNA je uspješno obavljena i za sve tri paralele su vrijednosti približno iste. Do varijacija u vrijednostima može doći zbog neprecizne tehnike rada (nije uvijek upotrijebljen uzorak mase točno 100g).

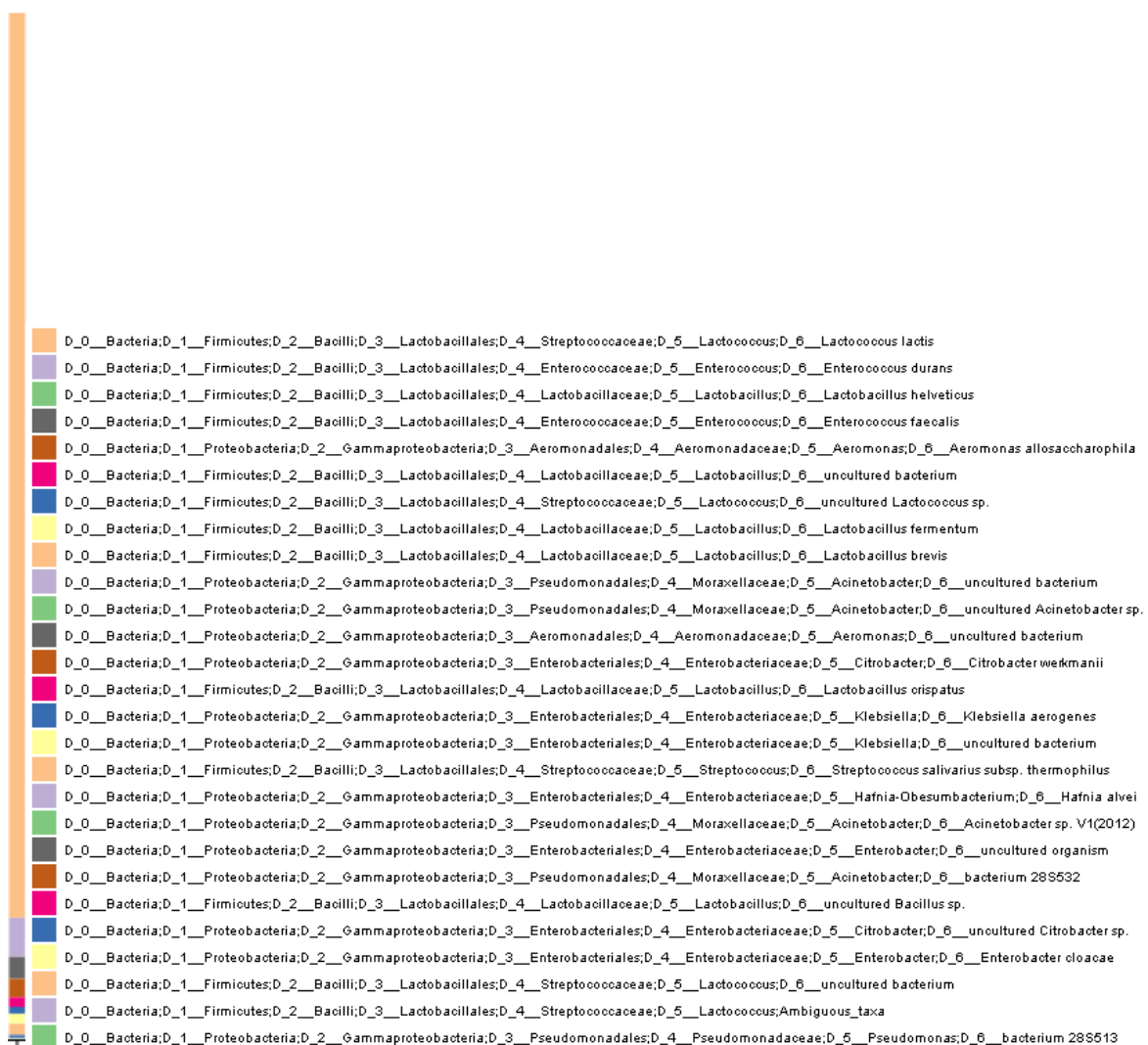
Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvencioniranje (Molecular Research, SAD) te su rezultati analizirani uz pomoć Kabineta za informatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 12. Prikaz udjela inokuliranih bakterijskih vrsta u mikrobiomu sira na temelju rezultata sekvencioniranja ukupne DNA izolirane iz uzoraka sireva.

Slika 12 prikazuje udio inokuliranih bakterijskih vrsta. Najveći postotak zauzima *Lactococcus lactis* sa 88,137%. 8.820% zauzimaju ostale bakterijske vrste i to su vrste koje su autohtono prisutne u mlijeku. Soj *Lactobacillus plantarum* nije detektiran, ali možemo pretpostaviti da njega predstavlja skupina *Lactobacillus uncultured bacterium* jer ona ima postotak približne vrijednosti kao ostale vrste koje smo mi inokulirali u mlijeko.

Na slici 13 prikazani su udjeli svih bakterijskih rodova detektiranih u siru, pri čemu svaka boja označava jednu vrstu. Uz naše dodane sojeve (izuzevši *Lactobacillus plantarum* koji je drugačije detektiran), u uzorku nalazimo *Streptococcus salvarius subsp. thermophilus*, *Acidobacter sp.*, *Klebsiella aerogenes* te mnoge druge prikazane na slici.



Slika 13. Prikaz udjela svih bakterijskih rodova u proizvedenom siru na temelju rezultata sekvencioniranja ukupne DNA.

5. ZAKLJUČAK

1. Provedena je proizvodnja sušenog svježeg sira kontroliranom fermentacijom svježeg mlijeka „Veronika“ implementacijom mješovitih funkcionalnih starter kultura sa detaljno okarakteriziranim funkcionalnim svojstvima: *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactococcus lactis* ZG7-10 i *Lactobacillus fermentum* D12.
2. Prema provedenim analizama udjela suhe tvari i mliječne masti, proizvedeni sušeni svježi sir pripada kategoriji „ekstra tvrdi sir“ i „polumasni sir“.
3. Sekvencioniranje ukupne DNA iz uzoraka sireva potvrdilo je prisutnost svih dodanih probiotičkih sojeva, a broj živih bakterijskih stanica u proizvedenom siru je nakon proizvodnje i tijekom skladištenja bio veći od 10^6 CFU/g, što je minimalni preporučeni broj po gramu probiotičkog proizvoda.
4. MALDI-TOF masenom spektrometrijom detektiran je ukupno 51 peptid u uzorcima proizvedenog sira u omjeru mase i naboja raspona od 312,130 do 4508,877, koji mogu imati potencijalno bioaktivno djelovanje.

6. LITERATURA

Andrén A. (2002) Rennets and coagulants. In: Roginski, H., et al. (Eds.) *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press. str. 281-286.

Banić M., Uroić K., Leboš Pavunc A., Novak J., Zorić K., Durgo K., Petković H., Jamnik P., Kazazić S., Kazazić S., Radović S., Scalabrin S., Hynönen U., Šušković J., Kos B. (2018) Characterization of S-layer proteins of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut, *LWT - Food Science and Technology* **93**, 257-267.

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. *Int. Dairy J.* **87**, 75-83.

Beganović J., Frece J., Kos B., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Šušković J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**(1), 43-53.

Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda*, Plejada, Zagreb

Faria-Oliveira F., Diniz R.H.S., Godoy-Santos F., Piló B.F., Mezadri H., Castro I.M. i Brandão R.L. (2015) The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America u: *Food Production and Industry*, Ayman Hafiz Amer Eissa, IntechOpen, str. 108-127

Gamero-Barraza J.I., Reyes-Jáquez D., Medrano-Roldán H., Morales-Castro J., Martínez-P M.A., Delgado. E., Cooke P., Rosas-Flores W. (2018) Effect of extrusion processing on cottonseed protein and corn flour interactions through molecular dynamics simulation. *Proceedings of 8th Food Science, Biotechnology & Safety Congress*.

Hallén E. (2008) *Coagulation Properties of Milk, Association with Milk Protein Composition and Genetic Polymorphism*, Doktorska disertacija, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences

Kant R., Uroić K., Hynönen U., Kos B., Šušković J. i Palva, A. (2016) Genome Sequence of *Lactobacillus brevis* Strain D6, Isolated from Smoked Fresh Cheese. *Genome announcements*, **4** (2): e00264-16. doi:10.1128/genomeA.00264-16

- Kim Y., Oh S., Yun H. S., Oh S., Kim S. H. (2010) Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Let. Appl. Microbiol.* **51**, 123 - 130
- Kongo J.M. (2013) Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments, *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, IntechOpen, str. 4 - 19
- Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92., *J. Appl. Microbiol.* **94**(6), 981-987
- Kos B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World J. Microb. Biot.* **24** (5), 699-707
- Kršev Lj. (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi, *Mljekarstvo*, **46** (1), 57-65
- Leboš Pavunc, A. (2012) Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterija mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura. Doktorski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.
- Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production, *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2), 141-151.
- Leenhouts, K., Kok, J. and Venema, G., 1990. Stability of Integrated Plasmids in the Chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (9), 2726-2735.
- Lukač Havranek J. (1995) Autohtoni sirevi Hrvatske, *Mljekarstvo* 45 (1), 19-37
- Marilley L., Casey M.G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains, *International Journal of Food Microbiology* **90** (2), 139-159
- Mikulec N., Habuš I., Antunac N., Vitale Lj., Havranek J. (2010) Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira, *Mljekarstvo* **60** (4), 219-227
- Mokoena M.P. (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review, *Molecules*. **22**(8): 1255

Narvhus J.A., Axelsson L. (2003) Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2.izd., Academic press, str. 3465-3472

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009) Narodne novine **20** (NN 20/2009)

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2013) Narodne novine **141** (NN 141/2013)

Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antoine van Leeuwenhoek* **70** (2-4), 347-358

Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3. izd., CRC Press, str. 1

Sánchez A., Vázquez A. (2017) Biactive peptides: A review. *Food Qual. Safe.* **1**, 29-46

Sleator R. D., Hill C. (2008) New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 143-147

Sung N., Collins M.T. (2000) Effect of Three Factors in Cheese Production (pH, Salt, and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Viability, *Applied and Environmental Microbiology* **66** (4), 1334-1339

Šušković J. (1996) The growth and probiotic effect of chosen lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia

Šušković J., Kos B., Goreta J., Matošić S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect, *Food Technol. Biotechnol.* **39** (3), 227-235

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K. (2010) Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotechnol.* **48** (3), 296-307

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

Šušković J. (2018) Predavanja iz kolegija Biotehnologija 3, Nove strategije u biotehnološkoj proizvodnji hrane

<https://moodle.srce.hr/2018-2019/course/view.php?id=32968>. Pristupljeno 01.09.2019.

Uroić K., Beganović J., Hynönen U., Pietilä T. E., Leboš Pavunc A., Kant R., Kos B., Palva A., Šušković J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunological properties of

probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. LWT - Food Sci. Technol. **69**, 623-632.

Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. (2006) Dairy science and technology, 2. izd., Taylor & Francis, str. 82

Zajsek K., Gorsek A., Kolar M. (2013) Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. Food Chem **139** (1-4), 970-977

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.

I. Dvomecovic

Ime i prezime studenta