

Utjecaj dodatka probiotičkih kultura na svojstva polutvrđog ovčjeg sira

Marijana Blažić¹, Blaženka Kos^{2*}, Carlos A. Zalazar³,
Susana Bernal³, Carlos Meinardi³, Bojan Matijević¹

¹Veleučilište u Karlovcu, Trg J.J.Strossmayera 9, Karlovac, Hrvatska

²Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

³Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) (UNL-CONICET), Santa Fe, Argentina

Received - Prispjelo: 9.8.2011.

Accepted - Prihvaćeno: 18.11.2011.

Sažetak

Dodatak probiotičkih bakterija u fermentirane mliječne napitke bio je predmet mnogih istraživanja, međutim dodatak tih bakterija u sireve, posebno one proizvedene od ovčjeg mlijeka, nije do sada detaljno istražen. Stoga su u ovom radu proizvedeni probiotički polutvrđi ovčji sirevi s dodatkom probiotika *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 i *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Zrenje sireva se odvijalo 45 dana pri 13 °C i 85 % relativne vlažnosti. Tijekom tog razdoblja određivani su kemijski parametri i provedene su mikrobiološke analize proizvedenih probiotičkih sireva. Dodatak probiotičkih kultura nije značajno utjecao na kemijska i mikrobiološka svojstva proizvedenih sireva u usporedbi s kontrolnim sirevima bez dodatka probiotičkih kultura. Broj živih probiotičkih bakterija održao se na ca 10⁶-10⁷ CFU/g probiotičkih sireva tijekom 45 dana zrenja, što je potvrđeno RAPD metodom. Probiotički polutvrđi ovčji sirevi s bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 su imali slična senzorska svojstva sirevima proizvedenim bez dodatka probiotika, dok je dodatak bakterije *Lactobacillus acidophilus* LA-5 doveo do poboljšanja okusa polutvrđog ovčjeg sira. Dobiveni rezultati pokazuju da je polutvrđi ovčji sir pogodan matriks za primjenu probiotičkih kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 i *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

Ključne riječi: probiotik, polutvrđi ovčji sir, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, bakterije mliječne kiseline

Uvod

Funkcionalnom hranom smatra se hrana koja sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. Stoga je sve više potrošača zainteresirano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi poboljšanja zdravlja (Šušković i sur., 2009).

Među funkcionalne dodatke hrani ubrajaju se i probiotici koji, ako se upotrebljavaju u dovoljnoj količini, pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore, a mogu se koristiti i kao bioterapeutici (Leboš Pavunc i sur., 2009; Šušković i sur., 2010; Beganović i sur., 2011a i 2011b). Na temelju znanstvenih i kliničkih istraživanja može se reći da probiotici mogu biti vrlo učinkoviti u sprječavanju različitih

vrsta crijevnih i urogenitalnih infekcija, te posebice za uspostavljanje normalne crijevne mikroflore nakon antibiotske terapije (Šušković i sur., 2009). Današnja istraživanja upozoravaju na sve veći učinak probiotičkih mikroorganizama u suzbijanju različitih bolesti, a posebice u suzbijanju kancerogenih procesa u probavnom sustavu (Šušković i sur., 2010).

Mliječni proizvodi, posebice fermentirani mliječni proizvodi, često se koriste kao matriks za probiotičke bakterije. U novije vrijeme sve je više proizvedenih probiotičkih kravljih sireva koji zbog svoje više pH vrijednosti, te većeg udjela masti i zatvorenije teksture od fermentiranih mlijeka mogu efikasnije zaštititi bakterije, no problem može biti puno dulji vijek trajanja, u kojem je potrebno očuvati visok broj živih probiotičkih bakterija u proizvodu (Bergamini

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 4605 291; E-mail: bkos@pbf.hr

i sur., 2006; Bergamini i sur., 2009). Međutim, u odnosu na kravlje sireve, dodatak probiotičkih bakterija ovčjim sirevima do sada je slabo proučavan (Kourkoutas i sur., 2006; Candiotti i sur. 2010). Stoga je cilj ovog rada bio istražiti utjecaj dodatka probiotičkih kultura *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 i *Lactobacillus acidophilus* LA-5 na kemijska i mikrobiološka svojstva polutvrđih ovčjih sireva.

Materijal i metode

Starter kulture i probiotici

Za proizvodnju polutvrđih ovčjih sireva korištena je komercijalna liofilizirana starter kultura koja se izravno dodaje u mlijeko za proizvodnju sira (DVS - "direct vat set"), a koju čine sojevi: *Streptococcus thermophilus* (60 %), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (20 %) i *Lactobacillus helveticus* (20 %) (Chr. Hansen, Danska). Za proizvodnju probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva korištena su, uz starter kulturu, dva komercijalna soja probiotičkih bakterija: *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 i *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Danska).

Proizvodnja polutvrđih ovčjih sireva

Za proizvodnju polutvrđih ovčjih sireva korišteno je ovčje mlijeko, dobiveno od ovaca uzgajanih pri srednjoj poljoprivrednoj školi "Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja of Universidad Nacional del Litoral". Tehnologija proizvodnje polutvrđih ovčjih sireva razvijena je na Institutu za mljekarstvo (Instituto de lactología industrial-INLAIN, Facultad de ingeniería química), Santa Fe, Argentina (Candiotti i sur., 2010). Proizvedena su dva eksperimentalna sira sa svakom od korištenih probiotičkih bakterija: polutvrđi ovčji sir s probiotičkom bakterijom *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i polutvrđi ovčji sir s probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 (uzorak QLB). Polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotičke kulture služio je kao kontrola (QLT). Sva tri uzorka ovčjih polutvrđih sireva proizvedena su tri puta.

Ovčje mlijeko je nakon mužnje ohlađeno i dopremljeno na institute te rashlađeno na 4 °C. Toplinska obrada je provedena pri 65 °C/20 min. Nakon hlađenja na 37 °C u mlijeko je dodano 0,2

g L⁻¹ CaCl₂ (Merck, Njemačka) te starter kultura u koncentraciji od 10⁶ CFU/mL mlijeka. Probiotička kultura dodana je samo u mlijeko za proizvodnju probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva u koncentraciji 10⁶-10⁷ CFU mL⁻¹. Kimozin (Maxiren® 150, DSM Food Specialities, Francuska) je dodan 15 min nakon dodatka bakterijskih kultura, u koncentraciji od 0,014 g L⁻¹. Kada je formiran gruš potrebne čvrstoće, usitnjen je do veličine zrna kukuruza (oko 1 cm³). Smjesa usitnjenog gruša i sirutke lagano je miješana i zagrijavana vodenom parom, brzinom od 1 °C min⁻¹, sve do postizanja temperature od 45 °C jer je korištena termofilna starter kultura. Gruš je nakon toga prenesen u okrugle kalupe (9 cm visine, promjera 10 cm) uz opterećenje od 0,2-0,3 kg cm⁻² tijekom 24 h. Soljenje sira provedeno je u vodenoj otopini soli (salamuri) koncentracije 200 g L⁻¹ NaCl (pH 5,4) pri 12 °C tijekom 7 h (svaki sir težio je oko 700 g). Zrenje sira odvijalo se pri 13 °C i 85 % relativne vlažnosti tijekom 45 dana.

Kemijske, mikrobiološke i senzorske analize sireva

Tijekom zrenja sireva praćene su promjene pH vrijednosti (pH metar MPC 227 Mettler Toledo) i kemijskog sastava sira: određivanje masenog udjela vode, mliječne masti po Grossfeldu, proteina i topivog dušika pri pH 4,6 u trikloroctenoj kiselini po Kjeldahlu (International Dairy Federation (IDF) 1988). Mikrobiološke analize provedene su na selektivnim hranjivim podlogama (Wienerlab, Rosario, Argentina) prema standardnim IDF metodama (1988). Broj enterokoka određivan je na KF - *Streptococcus* agaru, broj laktobacila na MRS agaru kojemu je pH vrijednost podešena na pH 5,5, a broj laktokoka na M17 agaru. Broj probiotičkih bakterija određivan je na selektivnoj podlozi za probiotičke laktobacile (MRS-maltoza agar uz dodatak 0,3% (w/v) žučnih soli), odnosno bifidobakterije (MRS-NPNL agar). Dodatno je provedena identifikacija probiotičkih sojeva izoliranih iz proizvedenih probiotičkih polutvrđih sireva na selektivnim hranjivim podlogama, primjenom RAPD metode (Leboš Pavunc i sur., 2009) sa specifičnim početnicama za bakterije mliječne kiseline 5'-ACG AGG CAC -3' i 5'-ACG CGC CCT -3' (Gardiner i sur., 2002).

Senzorska svojstva proizvedenih uzoraka polutvrđih ovčjih sireva određivana su nakon 45 dana zrenja. Ocjenjivanje senzorskih svojstava sireva provela je panel skupina od 5 senzorskih analitičara

Tablica 1. Maseni udio vode, masti i proteina određivan tijekom zrenja u probiotičkim polutvrđim ovčjim sirevima proizvedenim uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB). Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Uzorak	Udio vode (%)			Mast (%)	Proteini (%)
	2. dan	20. dan	45. dan	45. dan	45. dan
QLT	48,3±0,6	39,8±0,9	34,3±0,1	30,0±0,5	28,2±0,7
QLA	48,7±0,9	39,3±0,2	34,2±0,2	29,3±0,5	28,2±0,5
QLB	48,0±0,9	38,6±0,6	34,0±0,1	30,0±0,5	27,8±0,3

Tablica 2. Maseni udio topivog dušika i stupanj zrenja probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva proizvedenih uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB). Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Uzorak	Topivi dušik (g N/100 g)		Stupanj zrenja sira	
	2. dan	45. dan	2. dan	45. dan
QLT	0,060±0,00057	0,076±0,09979	4,633±0,0577	8,033±0,0577
QLA	0,065±0,00057	0,225±0,00057	4,7±0	9,033±0,0577
QLB	0,054±0,00011	0,126±0,093821	3,566±0,0577	8,433±0,0577

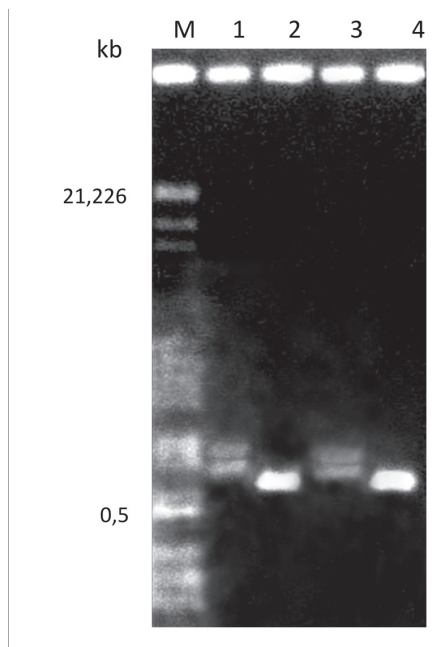
sustavom bodovanja po tablici s maksimalno mogućih 20 bodova (FIL-IDF, 1997).

Rezultati i rasprava

Sirevi Cheddar, Gouda i Cottage su samo neki od primjera kravljih sireva u koje su uspješno dodane probiotičke bakterije (Ong i sur., 2009, Ibrahim i sur., 2010; Heller, 2001). Međutim, za razliku od kravljih sireva, vrlo je malo literature o ovčjim sirevima s probiotičkim bakterijama (Kourkoutas i sur., 2006; Candioti i sur., 2010). Osim toga, kao matriks za dodatak probiotičkih bakterija odabrano je ovčje mlijeko jer ono za razliku od kravljeg mlijeka, u svom sastavu ima višu koncentraciju srednjelančanih triacilglicerola i konjugiranu linolnu kiselinu, čiji su pozitivni učinci na zdravlje ljudi znanstveno dokazani (Carloni i sur., 2010). Stoga su u ovom radu proizvedeni polutvrđi ovčji sirevi s dodatkom probiotičkih bakterija *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB) i *Lactobacillus acidop-*

hilus LA-5 (uzorak QLA). Tehnologija proizvodnje ovog sira ne uključuje tretmane sirnog gruša kao što su npr. stalno miješanje, visoka temperatura dogrižavanja, izravan dodatak soli i ispiranje gruša što bi moglo imati negativan utjecaj na preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom proizvodnje sira. Iskustveno je također ustanovljeno da je za postizanje najbolje kakvoće sira dovoljno provesti pasterizaciju ovčjeg mlijeka pri 65 °C tijekom 20 min (Bergamini i sur., 2006). Svojstva proizvedenih probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva uspoređivana su sa svojstvima polutvrđih ovčjih sireva bez dodatka probiotičkih kultura koji su služili kao kontrola (uzorak QLT). Najprije su određivani i uspoređivani maseni udjeli vode, masti i proteina tijekom 45 dana zrenja proizvedenih sireva (tablica 1).

Iz tablice je vidljivo da nije bilo značajne razlike u masenim udjelima vode, masti i proteina između tri vrste proizvedenih sireva tijekom zrenja. Rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja su pokazala da dodatak probiotičkih bakterija ne utječe



Slika 1. DNA profili dobiveni nasumičnim umnažanjem sa specifičnim početnicama za bakterije mliječne kiseline; **M** - standardi λ -Hind III i GeneRuler 100bpb; **1** - *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12; **2** - *L. acidophilus* LA-5; **3** - izolat iz sira proizvedenog sa *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, **4** - izolat iz sira proizvedenog sa *L. acidophilus* LA-5

na glavna kemijska svojstva sireva (Ong i sur., 2006; Ong i sur., 2009; Kılıç i sur., 2009). U proizvedenim sirevima praćena je proteoliza preko topivog dušika i stupnja zrenja sireva u 2. i 45. danu zrenja (tablica 2). Na početku zrenja nije bilo većih razlika u koncentraciji topivog dušika među proizvedenim uzorcima sireva, no nakon 45 dana zrenja najbolja je proteoliza postignuta u polutvrđim ovčjim sirevima s dodatkom probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5.

U literaturi se navodi da dodatak probiotičkih kultura iz roda *Bifidobacterium* ne povećava proteolizu u siru jer vrste iz roda *Lactobacillus*, koje i inače čine uobičajenu mikrofloru sirovog mlijeka, posjeduju složeniji proteolitički sustav od *Bifidobacterium* vrsta koje su podrijetlom iz intestinalnog sustava (Boylston i sur., 2004). Na proteolitičku aktivnost prisutnih sojeva bakterija mliječne kiseline u proizvedenim sirevima utječu nepovoljni uvjeti u siru kao matriksu, kao što su: niska pH vrijednost, povećana koncentracija soli, niski aktivitet vode, niska temperatura skladištenja i kompeticija unutar prisutne mješovite kulture mikroorganizama tijekom zrenja. Svojstvo primijenjenih sojeva bakterija mliječne kiseline da se prilagode i budu aktivni u takvim stresnim industrijskim uvjetima proizvodnje

sira je presudno za dobivanje kvalitetnog finalnog proizvoda. Na osnovu poznatih sekvencija genoma različitih vrsta bakterija mliječne kiseline uskoro će biti razvijeni modeli kojima će se moći predvidjeti, između ostalog, i njihova proteolitička aktivnost u matriksu gdje će ti sojevi biti primijenjeni (Smit i sur., 2005; Goh i sur., 2011). Rezultati istraživanja proteolitičke aktivnosti sojeva *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* vrsta u mlijeku su također pokazali slabiju aktivnost *Bifidobacterium* vrsta u odnosu na preostale ispitivane sojeve (Shihata i Shah, 2000).

Dodatak probiotičkih kultura u različite vrste kravljih sireva te u kozji sir, prema rezultatima dosadašnjih istraživanja nije značajno doprinio proteolizi (Bergamini i sur., 2009; Gomes da Cruz i sur., 2009). Međutim, prema rezultatima dobivenim u ovom radu, dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 je ipak potaknuo proteolizu u polutvrđom ovčjem siru što bi se moglo pripisati njegovoj sinergijskoj aktivnosti s autohtonim sojevima bakterija mliječne kiseline, zaostalim nakon procesa pasterizacije ovčjeg mlijeka, a koji mogu biti zaslužni za otpuštanje slobodnih aminokiselina u siru kao najvažnijih prekursora okusa i arome gotovog proizvoda (Yvon, 2006). Na to upućuju i rezultati mikrobioloških ana-

Tablica 3. Broj bakterija mliječne kiseline (CFU/g) tijekom zrenja u probiotičkim polutvrđim ovčjim sirevima proizvedenim uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB). Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Mikroorganizmi	Uzorak	log CFU/g		
		2. dan	20. dan	45. dan
Enterokoki	QLT	3,98±1,72	3,52±2,59	4,19±1,31
	QLB	4,51±0,80	3,45±0,44	4,04±0,42
	QLA	4,44±0,57	4,56±0,45	4,26±0,37
Laktobacili (mezofilni)	QLT	7,34±1,34	7,57±0,51	7,95±0,33
	QLB	7,06±2,05	7,90±0,33	7,08±1,17
	QLA	7,84±0,63	7,88±0,95	7,72±0,34
Laktobacili (termofilni)	QLT	7,25±1,05	7,07±1,08	7,02±1,49
	QLB	7,20±1,47	7,02±1,63	6,06±2,06
	QLA	7,44±1,35	7,19±1,53	6,82±1,84
Laktokoki (mezofilni)	QLT	8,61±0,15	8,19±0,93	8,22±0,48
	QLB	8,73±0,28	8,47±0,73	8,35±0,32
	QLA	8,66±0,49	8,63±0,17	8,47±0,22
Laktokoki (termofilni)	QLT	7,89±1,42	7,78±1,40	8,22±0,36
	QLB	7,83±1,46	8,05±1,12	8,22±0,36
	QLA	8,04±1,50	8,51±0,31	8,22±0,47
Probiotički mikroorganizmi	QLT	-	-	-
	QLB	6,12±1,84	5,58±1,80	6,32±0,92
	QLA	7,89±1,17	8,18±0,75	7,12±0,50

liza proizvedenih uzoraka sireva prema kojima je u probiotičkom polutvrđom ovčjem siru s dodatkom kulture *L. acidophilus* LA-5 određen i najveći broj bakterija iz roda *Enterococcus* (tablica 3), a koje su mogle zaostati u mlijeku nakon pasterizacije kao autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline (eng. NSLAB - non-starter lactic acid bacteria) (Wouters i sur., 2002). Enterokoki su skupina mikroorganizama koji mogu bitno utjecati na proces zrenja zbog njihove lipolitičke i proteolitičke aktivnosti, te njihove sposobnosti da stimuliraju proizvodnju mliječne kiseline od strane laktokoka te proizvodnju CO₂ od strane *Leuconostoc* vrsta (Sarantiopoulos, 2001). Broj mezofilnih i termofilnih laktokoka i laktobacila se tijekom 45 dana zrenja nije bitno razlikovao u probiotičkim sirevima i u kontrolnom siru (tablica 3). Laktobacili, uz enterokoke i laktokoke, čine većinu autohtonih bakterija mliječne kiseline koje zaostaju u siru nakon pasterizacije mlijeka (Wouters i sur., 2002). Rezultati proteolitičke aktivnosti laktobacila u sirevima tijekom zrenja ovise o početnom broju i

vrsti prisutnih laktobacila, tipu sira te načinu proizvodnje. Općenito je prihvaćeno da autohtoni sojevi laktobacila mogu značajno doprinijeti proteolizi i lipolizi sira i u prisutnosti starter kultura (Di Cagno i sur., 2006). Autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline (NSLAB) su obično na početku zrenja polutvrđih sireva prisutni u malom broju (<1 log jedinice), da bi se njihov broj tijekom 60 dana zrenja povećao na oko 10⁵ CFU/g, a nakon 7 mjeseci zrenja do čak oko 10⁷ CFU/g (Sheehan i sur., 2007; Van Hoorde i sur., 2008).

U svrhu potvrde prisutnosti primijenjenih probiotičkih sojeva *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 u proizvedenim uzorcima probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva, osim njihove identifikacije na selektivnim hranjivim podlogama s dodatkom žučnih soli, provedena je i RAPD metoda s početnicama za bakterije mliječne kiseline (tablica 3, slika 1). Fragmenti DNA dobiveni RAPD metodom za bakterijske kolonije izolirane iz probiotičkih sireva odgovaraju fragmenti-

Tablica 4. Broj enterobakterija, koliformnih bakterija, kvasaca i plijesni (CFU/g) tijekom zrenja u probiotičkim polutvrđim ovčjim sirevima proizvedenim uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB). Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Mikroorganizmi	log CFU/g			
	Uzorak	2. dan	20. dan	45. dan
Enterobakterije	QLT	2,67±1,06	2,12±0,96	1,59±0,71
	QLB	2,45±0,70	1,53±0,38	1,26±0,61
	QLA	2,17±0,42	1,39±0,39	1,14±0,25
Koliformne bakterije	QLT	2,68±0,24	1,92±1,11	0,85±1,11
	QLB	2,32±0,43	1,41±0,40	1,09±0,38
	QLA	2,17±0,59	1,17±0,28	0,85±0,82
Kvasci i plijesni	QLT	0,58±1,15	1,62±0,92	1,59±0,74
	QLB	-	1,08±0,49	1,09±0,57
	QLA	-	1,06±0,47	1,03±0,63

ma DNA za *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. Na temelju dobivenih rezultata u tablici 3 i rezultata RAPD metode može se zaključiti da je broj probiotičkih mikroorganizama u oba proizvedena probiotička polutvrda ovčja sira nakon 45 dana zrenja bio iznad propisanog minimuma (10^6 CFU/g) potrebnog da bi se proizvod mogao definirati kao probiotički (Shah, 2007). Veći broj probiotičkih bakterija na početku zrenja u siru proizvedenom s *Lactobacillus acidophilus* LA-5 u odnosu na sir proizveden s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 posljedica je boljeg preživljavanja ove bakterije tijekom procesa proizvodnje sira, jer soj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 treba anaerobne uvjete za rast i preživljavanje. Međutim, tijekom zrenja se broj probiotičkih bakterija u sirevima nije značajno mijenjao i održao se većim od 10^6 CFU/g sira (tablica 3). Prema tome, preporučena dnevna doza probiotičkih bakterija od najmanje 10^8 - 10^9 živih stanica može se dostići sa dnevnom konzumacijom od najmanje 100 g proizvoda koji sadrži 10^6 - 10^7 živih stanica/g, što je predloženo kao minimum da bi se postigao terapijski učinak dodanih probiotika (Shah, 2007).

Broj mikroorganizama indikatora mikrobiološke sigurnosti (enterobakterije i koliformne bakterije) u proizvedenim sirevima sugerira da tijekom procesa toplinske obrade ovčjeg mlijeka nisu uništene sve prisutne bakterije te se njihov broj mogao i povećati tijekom samog procesa proizvodnje sireva (tabli-

ca 4). U svim uzorcima sireva broj enterobakterija i koliformnih bakterija je bio podjednak na početku procesa zrenja, dok je na kraju procesa zrenja pao za oko jednu logaritamsku jedinicu što znači da su uvjeti tijekom zrenja sireva uzrokovali inhibiciju njihovog rasta.

Broj kvasaca i plijesni, na početku procesa zrenja (2. dan) u kontrolnom siru bio je vrlo nizak ($0,58 \pm 1,15$ log CFU/g) dok u probiotičkim sirevima nisu pronađeni. Međutim, tijekom zrenja sireva, broj kvasaca i plijesni bio je podjednak i u kontrolnom i u probiotičkim sirevima. Relativno visok broj kvasaca i plijesni pojavljuje se u mnogim mekim, polutvrđim i tvrdim sirevima, tijekom proizvodnje i zrenja, a potječu vjerojatno iz okoliša i procesne opreme korištene pri proizvodnji. Svakako treba imati na umu da relativno visok broj kvasaca u uzorcima sireva može biti i posljedica neučinkovite pasterizacije (Viljoen, 2001).

U tablici 5 prikazane su promjene pH vrijednosti tijekom zrenja sireva kroz 45 dana. Početne pH vrijednosti kod svih sireva bile su gotovo iste s vrlo malim odstupanjima. Nakon 45 dana zrenja kontrolnog i probiotičkih sireva pH vrijednosti su se malo povećale u odnosu na početne. Prema McSweeney i Fox (2004) veći dio laktoze se izdvoji iz sira kroz sirutku, a ostatak je na raspolaganju probiotičkim i starter kulturama za fermentaciju do organskih kiselina. Međutim, kako nije došlo do pada pH vrijednosti tijekom zrenja sireva, to bi se moglo pripisati

Tablica 5. Promjene pH vrijednosti tijekom zrenja u probiotičkim polutvrđim ovčjim sirevima proizvedenim uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB). Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Uzorak	pH vrijednost	
	2. dan	45. dan
QLT	5,31±0,01	5,53±0,02
QLA	5,26±0,01	5,51±0,01
QLB	5,25±0	5,51±0

Tablica 6. Senzorske procjene probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva proizvedenih uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 (uzorak QLA) i probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (uzorak QLB) nakon 45 dana zrenja. Kontrola je polutvrđi ovčji sir bez dodatka probiotika (uzorak QLT)

Senzorsko svojstvo	Ponderirani bodovi/ Weighted points			
	Max.	QLT	QLA	QLB
Opći izgled	2	2±0	2±0	2±0
Boja	2	2±0	2±0	2±0
Miris	2	2±0	2±0	2±0
Konzistencija	4	3,6±0,11	3,8±0,11	3,6±0,11
Okus	8	7,0±0,2	7,4±0,11	7,0±0,2
Tijesto	2	1,6±0,11	1,8±0,11	1,6±0,2
Ukupno	20	18,2	19	18,2

puferskom kapacitetu prisutnih peptida i proteina u sirevima. Osim toga, bakterijski rast može biti inhibiran prisutnošću organskih kiselina, prije svega mliječne i octene kiseline, i ostalim proizvodima metabolizma bakterija mliječne kiseline nastalih tijekom proizvodnje i zrenja sireva (Šušaković i sur., 2010). Tako je ustanovljeno da probiotički soj *L. acidophilus* LA-5 proizvodi bakteriocin laktacin B te da prisutnost starter kultura *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulira njegovu proizvodnju, a antimikrobna aktivnost tog bakteriocina usmjerena je prvenstveno na srodne bakterijske vrste, kao što su NSLAB prisutne u siru, što i jest glavno obilježje bakteriocinskog djelovanja (Tabasco i sur., 2009).

Senzorska svojstva probiotičkih polutvrđih ovčjih sireva proizvedenih uz dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 uspoređena su sa senzorskim svojstvima polutvrđog ovčjeg sira bez dodatka probiotika. Prema dobivenim rezultatima, dodatak

bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nije imao utjecaja na senzorska svojstva, dok je probiotička kultura *L. acidophilus* LA-5 potaknula proteolizu i pozitivno djelovala na okus proizvedenog polutvrđog ovčjeg sira. Međutim, prema rezultatima Gomes i sur. (2011) prisutnost probiotičke kulture *L. acidophilus* može imati i negativan utjecaj na senzorska svojstva sira ako je prisutna u koncentraciji $\geq 10^9$ CFU/g što rezultira snižavanjem pH vrijednosti i većom koncentracijom mliječne kiseline u siru. U ovom radu to nije bio slučaj jer se broj probiotičkih bakterija kretao u rasponu od 10^6 do 10^8 CFU/g, a nije bilo niti većih odstupanja od uobičajene pH vrijednosti u sirevima (4,8-5,6) (Boylston i sur., 2004).

Zaključak

Rezultati kemijskih i mikrobioloških analiza proizvedenih probiotičkih ovčjih polutvrđih sireva pokazuju da su primijenjeni probiotički sojevi *Lacto-*

bacillus acidophilus LA-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 preživjeli tijekom tehnološkog procesa proizvodnje sira i to u vrlo visokom broju, te da se taj broj održao i tijekom 45 dana zrenja. Primenjena tehnologija proizvodnje pogodovala je preživljavanju probiotičkih kultura iako je odabrana temperatura zagrijavanja grušta od 45 °C, zbog termofilne starter kulture, bila viša od uobičajene (35-40 °C). Odabrane probiotičke kulture preživljavale su u broju većem od 10⁶ CFU/g, kako tijekom proizvodnje, tako i tijekom 45 dana zrenja, koje je provedeno u kontroliranim uvjetima vlažnosti i temperature, kako bi se isključio utjecaj promjene tih čimbenika na preživljavanje probiotika u sirevima tijekom zrenja. Dodatak probiotičkih bakterija nije utjecao na kemijski sastav proizvedenih sireva (maseni udio vode, masti i proteina), ali je dodatak probiotičke kulture *L. acidophilus* LA-5 potaknuo proteolizu tijekom zrenja sireva. Sukladno tome, probiotički polutvrđi ovčji sirevi s bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nisu se po senzorskim svojstvima razlikovali od sireva proizvedenih bez dodatka probiotika, dok je s dodatkom bakterije *Lactobacillus acidophilus* LA-5 postignuto poboljšanje okusa polutvrđog ovčjeg sira. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je polutvrđi ovčji sir pogodan matriks za odabrane probiotičke sojeve.

Zahvala

Istraživanje je provedeno na Instituto de Lactología Industrial UNL-CONICET, Santa Fe, República Argentina uz financijsku potporu (stipendiju) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske "Jednokratna novčana pomoć za doktorski studij u inozemstvu" i u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske "Probiotici, prebiotici i funkcionalne starter kulture" (šifra 058-0581990-2007) kojeg je voditelj prof. dr. sc. Jagoda Šušković.

Influence of probiotic cultures addition on the properties of semi-hard ewe's cheese

Summary

Addition of probiotic bacteria into fermented milk beverages has been the subject of many studies, however, addition of these bacteria into cheeses, especially the ones made from ewe's milk, has not been thoroughly investigated. Therefore, the aim of this study was to produce probiotic semi-hard ewe's cheese with addition of probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Cheese ripening occurred during 45 days at 13 °C and 85 % of relative humidity. During that period, chemical parameters were determined and microbiological analysis of manufactured probiotic cheeses was performed. Addition of probiotic cultures did not significantly influence the chemical properties and microbiological quality of produced cheeses in comparison with the control cheeses without addition of probiotic cultures. Number of live probiotic bacteria remained at about 10⁶-10⁷ CFU/g of probiotic cheeses during 45 days of ripening, which was confirmed by RAPD method. Sensory properties of probiotic semi-hard ewe's cheese with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 were similar to those obtained for cheeses without addition of probiotic, while addition of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 improved the taste of cheeses. Obtained results demonstrated that semi-hard ewe's cheese can be an effective matrix for addition of probiotic cultures *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5.

Key words: probiotic, semi-hard ewe's cheese, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, lactic acid bacteria

Literatura

1. Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanić, K., Šušković, J. (2011a): Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek* 1 (100), 43-53.
2. Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Gjurčić, K., Špoljarec, M., Šušković, J., Kos, B. (2011b): Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *Journal of Food Science: Food Microbiology and Safety* 2 (76), 124-129.
3. Bergamini, C., Hynes, E., Palma, S.B., Sabbag, N.G., Zalazar, C.A. (2009): Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal* 8 (19), 465-475.
4. Bergamini, C., Hynes, E., Zalazar, C. (2006): Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi hard cheese. *International Dairy Journal* 8 (16), 856-866.
5. Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A. (2004): Incorporation of Bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 5 (14), 375-387.
6. Candiotti, M., Bergamini, C., Palma, S., Busetti, M., Meinardi, C., Zalazar, C. (2010): Characterization of proteolysis profile of Argentinean ewe's cheeses made by two different production methods. *Journal of Science in Food and Agriculture* 1 (90), 36-42.
7. Carloni, M., Fedeli, D., Roscioni, T., Gabbianelli, R. (2010): Seasonal variation of fat composition in ewe's milk from areas of central Italy. *Mediterranean journal of Nutrition and Metabolism* 1 (3), 55-60.
8. Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobetti, M. (2006): Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system, *International Dairy Journal* 16, 119-130.
9. FIL-IDF Standard 99C (1997). Sensory evaluation of dairy products by scoring-reference method.
10. Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., Reid, G. (2002): Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (1), 92-96.
11. Goh, Y., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., Hutkins, R. (2011): Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microbial Cell Factories* 10 (Suppl 1): S22.
12. Gomes da Cruz, A., Buriti, F.C.A., Souza, C.H.B., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. (2009): Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8 (20), 344-354.
13. Gomes, A.A., Braga, S.P., Cruz, A.G., Cadena, R.S., Lol-lo, P.C.B., Carvalho, C., Amaya-Farfan, J., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A. (2011): Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science* 94, 4777-4786.
14. Heller, K.J. (2001): Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 374S-379S.
15. Ibrahim, F., Ruvio, S., Granlund, L., Salminen, S., Viitanen, M., Ouwehand, A.C. (2010): Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59, 53-59.
16. International Dairy Federation (IDF) (1988) IDF Standard 135A:1988 - Milk and milk products: precision characteristics of analytical methods; Outline of collaborative study procedure. Brussels, Belgium, IDF.
17. Kılıç, G.B., Kuleaşan, H., Eralp, İ., Karahan, A.G. (2009): Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LWT-Food Science Technology* 5 (42), 1003-1008.
18. Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., Kanellaki, M. (2006): Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. *Journal of Dairy Science* 5 (89), 1439-1451.
19. Leboš Pavunc, A., Turk, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Mahnet, S., Kirin, S., Šušković, J. (2009): Proizvodnja fermentiranih probiotičkih napitaka od permeata mlijeka obogaćenih retentatom sirutke i identifikacija prisutnih bakterija mliječne kiseline, *Mljekarstvo* 59 (1), 11-19.
20. McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (2004): Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, M.C.Timothy, & P.G.Timothy (Eds.): *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol 1, Elsevier Academic Press, London, pp. 361-371.
21. Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. (2006): Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal* 5 (16), 446-456.
22. Ong, L., Shah, N.P. (2009): Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT-Food Science and Technology* 7 (42), 1260-1268.
23. Sarantiopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2001): Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 8 (11), 621-647.
24. Shah, N.P. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1267-1277.
25. Sheehan, J.J., Fenelon, M.A., Wilkinson, M.G., McSweeney, P.L.H. (2007): Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal* 17, 704-716.

26. Shihata, A., Shah, N.P. (2000): Proteolytic profiles of yoghurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 5-6 (10), 401-408.
27. Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 591-610.
28. 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* 3-4 (4), 77-84.
29. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010): Antimicrobial Activity - The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48 (3) 296-307.
30. Tabasco, R., Garcia-Cayuela, T., Pelaez, C., Requena, T. (2009): *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 132, 109-116.
31. Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., Huys, G. (2008) Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology* 25, 929-935.
32. Viljoen, B.C., (2001): The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 1-2 (69), 37-44.
33. Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002): Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12, 91-109.
34. Yvon, M. (2006): Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 2 (61), 16-24.