

Proizvodnja fermentiranih probiotičkih napitaka od permeata mlijeka obogaćenih retentatom sirutke i identifikacija prisutnih bakterija mliječne kiseline

Andreja Leboš Pavunc¹, Josip Turk², Blaženka Kos¹, Jasna Beganović¹,
Jadranka Frece¹, Stjepan Mahnet², Slavko Kirin³, Jagoda Šušković^{1*}

¹Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb

²Dukat - mliječna industrija d.d., M. Čavića 9, Zagreb

³Dukat - mliječna industrija d.d. Tvornica Sirela, V. Sredice 11, Bjelovar

Prispjelo - Received: 17.09.2008.

Prihvaćeno - Accepted: 05.02.2009.

Sažetak

U ovom radu istražena je mogućnost primjene bakterijskih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 za proizvodnju probiotičkih napitaka od permeata mlijeka, obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke. U prethodnim istraživanjima, u sklopu probiotičkog koncepta, definirana su probiotička svojstva navedenih sojeva bakterija mliječne kiseline. Nakon kontrolirane fermentacije permeata mlijeka obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke, probiotički sojevi su proizveli cca 7,4 g/L mliječne kiseline, pH-vrijednost iznosila je oko 4,7, a broj živih stanica je bio cca 10⁸ CFU/mL. Broj živih stanica primijenjenih probiotičkih sojeva, identificiranih RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) metodom, održao se na cca 10⁷ CFU/mL tijekom 28 dana čuvanja pri temperaturi od 4 °C. Nadalje, provedena je i spontana fermentacija permeata mlijeka, obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, tijekom koje su izolirane bakterije mliječne kiseline prisutne u ovim supstratima. Svi bakterijski izolati su brzo zakiselili hranjivu podlogu i pokazali antibakterijsko djelovanje prema odabranim test-mikroorganizmima, što su važna svojstva potencijalnih starter kultura za fermentaciju mliječnih proizvoda. Rezultati biokemijskih API testova pokazali su da je riječ o dvije različite vrste bakterija mliječne kiseline koje su identificirane kao *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus*.

Ključne riječi: permeat mlijeka, retentat sirutke, probiotičke starter kulture, RAPD, antibakterijska aktivnost

Uvod

Posljednjih godina sirutka je postala popularna kao sastojak mnogih prehrambenih napitaka i namirnica. Funkcionalna svojstva proteina sirutke pružaju mogućnost njihove primjene kao nadomjestaka za proteine jaja u konditorskim i pekarskim proizvodima, te kao dodataka mlijeku i mliječnim proizvodima, npr. sladoledu. Sirutka je koristan izvor proteina, ugljikohidrata, vitamina, mineralnih tvari, elemenata u tragovima s niskim udjelom masti. Moguće ju je koristiti zaslađenu ili kiselu, te za proizvodnju koncentriranih proteina sirutke ili različitih fermentiranih napitaka (Tratnik, 2003). Sirutka je bez obzira na navedene primjere još uvijek nedovoljno iskorišten nusproizvod pri

proizvodnji sira (Radošević i sur., 2007.). Osim sirutke, nusproizvod pri proizvodnji sira je i permeat koji zaostaje nakon ultrafiltracije mlijeka. Zbog toga je u ovom radu ispitana mogućnost proizvodnje fermentiranih probiotičkih proizvoda na bazi permeata mlijeka, uz dodatak koncentriranih proteina sirutke dobivenih ultrafiltracijom.

Za uspješno vođenje kontrolirane fermentacije sirutke važno je dobro poznavanje fiziologije bakterija mliječne kiseline uključenih u fermentaciju (Šušković, 2005.). Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivne bakterije (s niskim sadržajem gvanina i citozina u molekuli DNA) koje su prirodno prisutne u ljudskom gastrointestinalnom sustavu te na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, biljni materijali itd. U novije vrijeme,

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 4605291; E-mail: jsusko@pbf.hr

bakterije mliječne kiseline primjenjuju se kao probiotici i sinbiotici (probiotici u kombinaciji s prebioticima). Probiotici su pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući svojstva njegove autohtone mikroflore (Havenaar i Huis in 't Veld, 1992.; Šušković, 1996.). Zahtjevi potrošača za što prirodnijim prehrambenim proizvodima i dodacima prehrani su sve veći, što je otvorilo mogućnost primjene probiotika kao funkcionalnih starter kultura u proizvodnji fermentirane hrane. Funkcionalne starter kulture definirane su kao starter kulture koje posjeduju najmanje jedno funkcionalno svojstvo u svrhu poboljšanja kvalitete finalnog proizvoda (Šušković, 2005.; Maaik i sur., 2005.). Probiotičke bakterije *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 su tri bakterijska soja selekcionirana u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu, na temelju istraživanja provedenih u sklopu probiotičkog koncepta. Odabrani sojevi dobro preživljavaju u simuliranim uvjetima probavnog sustava, rezistentni su na žučne soli i enzime probavnog sustava, asimiliraju kolesterol u prisutnosti žučnih soli te proizvode antimikrobne supstancije koje inhibiraju rast potencijalno patogenih mikroorganizama (Šušković i sur. 1993.; Šušković i sur., 1997.; Kos, 2001.; Kos i sur., 2008.). Nadalje, ustanovljena je *in vitro* adhezija svih triju sojeva na epitelne stanice ileuma i želuca miševa i svinja, što je potvrđeno i *in vivo* na pokusnim miševima, te je dokazano imunomodulacijsko djelovanje sva tri probiotička soja kroz povećanje razine ukupnih IgA i IgG antitijela u serumima pokusnih miševa (Kos i sur. 2003.; Frece i sur., 2005.; Frece, 2007.; Frece i sur., 2008.). Stoga je cilj ovog rada bio istražiti mogućnost primjene probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 u proizvodnji fermentiranih napitaka od permeata mlijeka obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke. Provedena je i spontana fermentacija permeata mlijeka obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, bez dodatka probiotičkih sojeva, te su izolirane i identificirane prisutne bakterije mliječne kiseline, odgovorne za spontanu fermentaciju.

Materijal i metode

Priprema probiotičkog napitka od permeata mlijeka obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke

Probiotički napici proizvedeni su od permeata mlijeka koji zaostaje nakon ultrafiltracije mlijeka u tvornici Sirela d.d., Bjelovar. Permeat je nusproizvod, dok se retentat (koncentrat) dobiven ultrafiltracijom mlijeka koristi u proizvodnji svježeg sira. Permeati mlijeka, obogaćeni sa 10 % (v/v) retentata sirutke (koji sadržava 4,31 % (w/v) laktoze i 54,3 % proteina na suhu tvar (w/w), nacijspljeni su sa 10 % (v/v) inokuluma liofiliziranih probiotičkih kultura *Lactobacillus helveticus*

M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, prethodno suspendiranih u permeatu mlijeka u koncentraciji cca 10⁸ CFU/mL. Tako priređeni uzorci su inkubirani 24 h pri 37 °C. Provedene su kemijske i mikrobiološke analize proizvedenih probiotičkih napitaka tijekom inkubacije, kao i tijekom 28 dana čuvanja pri +4 °C. Također, provedena je i spontana fermentacija permeata mlijeka obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, te su na MRS podlozi (pH-vrijednost podešena na 5,4, inkubacija 48 h anaerobno pri 30 °C) izolirane prisutne bakterije mliječne kiseline. Svi eksperimenti provedeni su tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti

Određivanje broja živih stanica indirektnom metodom

Iz uzoraka uzetih tijekom fermentacije i čuvanja fermentiranih permeata mlijeka (obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke) pripravljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj vodi i nacijspljena na Petrijeve zdjelice s MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agarom. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL).

Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

1 mL uzorka razrijeđen je sa 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je sa 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator.

$$\begin{aligned} \text{°SH} &= a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \\ \% \text{ mliječne kiseline} &= \text{°SH} \cdot 0,0225 \\ a &= \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH} \\ (1^\circ\text{SH} &\sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%)) \end{aligned}$$

Određivanje koncentracije šećera RS-metodom

Koncentracija reducirajućih šećera određivana je RS-metodom (Dyr i sur., 1963.).

Identifikacija izoliranih bakterija mliječne kiseline API biokemijskim testovima

Sojevi bakterija mliječne kiseline, izolirani tijekom spontane fermentacije, identificirani su pomoću biokemijskih testova API 50 CHL (za bakterije mliječne kiseline) i API 20 Strep (za streptokoke i srodne vrste) prema uputama proizvođača (API systems, BioMérieux).

Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja izoliranih bakterijskih kultura

Antimikrobno djelovanje izoliranih kultura bakterija mliječne kiseline ispitano je na test-mikroorganizmima

koji pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu - *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus cereus*. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 μ L supernatanta izoliranih kultura bakterija mliječne kiseline i 10 μ L test - mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivu bujonu. Antibakterijsko djelovanje supernatanta bakterijskih izolata na test-mikroorganizme, tijekom 24 h uzgoja pri 37 °C, određivano je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (LKB 5060-006, "GDV", Italija). Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen hranjivi bujon s test-mikroorganizmom bez dodanih supernatanta bakterijskih izolata) i uzoraka s dodanim supernatantima izoliranih kultura bakterija mliječne kiseline mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama.

Izolacija DNA

Postupak izolacije DNA proveden je kao što su opisali Frece (2007.) i Benković i sur. (2008.).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Umnožavanje DNA molekule RAPD metodom provedeno je u DNA uređaju za PCR, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u prethodnom poglavlju. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištena je oligonukleotidna početnica ISS1rev (5'-GGA TCC AAG ACA ACG TTT CAA A-3') za bakterije mliječne kiseline (Veyrat i sur., 1999.). Reakcijska smjesa volumena 50 μ L bila je sljedećeg sastava: DNA-kalup (4,0 ng/ μ L), početnica (50 pmol), 10x pufer (5,0 μ L), deoksiribonukleozid-

trifosfati (4 x 0,2 μ M), Taq polimeraza (jedna jedinica). Reakcijska smjesa denaturirana je 5 min. pri 95 °C, a reakcija je ponovljena 30 puta. Dvolančana DNA denaturirala se 40 sekundi pri 94 °C, a sinteza komplementarnih lanaca 3 min. pri 72 °C. Komplementarno sparivanje početnica s kalupom trajalo je 1 minutu, i to za umnažanje fragmenata odabranih za bakterije mliječne kiseline (upotrebom početnice ISS1rev) pri 52 °C.

Nakon reakcije, 10 μ L reakcijske smjese naneseo je na 1 % (w/v) agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadi GNA 100 pri naponu od 55 V kroz 2 h. Nakon provedene elektroforeze gel je 30 min. inkubiran u otopini etidij-bromida, te zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru i fotografiran kroz crveni filtar.

Rezultati i rasprava

Proizvedeni su probiotički napici od permeata mlijeka dobivenog nakon ultrafiltracije mlijeka, uz dodatak retentata sirutke. Kontrolirana fermentacija s dodanim probiotičkim kulturama *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 trajala je 24 h pri 37 °C. Pritom su praćeni parametri fermentacije: pH-vrijednost, koncentracija mliječne kiseline i reducirajućih šećera, te je određivan broj bakterija mliječne kiseline na MRS podlozi (tablica 1). Provedena je i spontana fermentacija permeata mlijeka obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, tijekom 24 h pri 37 °C, te su određivani isti parametri kao i tijekom kontrolirane fermentacije (tablica 2). Rezultati pokazuju da je permeat mlijeka, obogaćen retentatom sirutke, dobar supstrat za rast primijenjenih probiotičkih bakterija, kao i onih prirodno prisutnih, jer su kulture narasle u visokom broju, proizvele mliječnu kiselinu i fermentirale permeat. Naime, bakterije mliječne kiseline imaju posebne potrebe s obzirom na nutritivnu vrijednost medija u kojem rastu. Permeat mlijeka ne sadržava sve potrebne faktore rasta za bakterije mliječne kiseline, kao što su vitamini B grupe,

Tablica 1: Parametri kontrolirane fermentacije permeata mlijeka (obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke) s probiotičkim sojevima *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3

Table 1: Parameters of milk permeate controlled fermentation (enriched with 10 % (v/v) of whey retentate) with probiotic strains *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 and *Enterococcus faecium* L3

Vrijeme fermentacije (h) Time of fermentation (h)	pH			Mliječna kiselina* Lactic acid* (mg/mL)			Reducirajući šećeri Reducing sugars (mg/mL)			CFU/mL		
	M92	L4	L3	M92	L4	L3	M92	L4	L3	M92	L4	L3
0	6,49	6,37	6,48	1,80	0,90	0,90	62,18	62,18	62,18	1,95x10 ⁷	1,73 x10 ⁷	1,76 x10 ⁷
24	4,62	4,70	4,83	8,80	7,20	6,30	50,13	48,21	51,21	6,09x10 ⁸	4,25x10 ⁸	2,89 x10 ⁸

*izračunato preko titracijske kiselosti (°SH)

*calculated with respect to titratable acidity (°SH)

Tablica 2: Parametri spontane fermentacije permeata mlijeka (obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke)

Table 2: Parameters of milk permeate spontaneous fermentation (enriched with 10 % (v/v) of whey retentate)

Vrijeme fermentacije (h) Time of fermentation (h)	pH	Mliječna kiselina* Lactic acid* (mg/mL)	Reducirajući šećeri Reducing sugars (mg/mL)	CFU/mL
0	6,52	1,35	62,18	1,68x10 ³
24	4,75	7,20	51,58	1,03x10 ⁶

*izračunato preko titracijske kiselosti (°SH)

*calculated with respect to titratable acidity (°SH)

različite aminokiseline, pojedine masne kiseline, te purinske i pirimidinske baze (Kandler i Weiss, 1986.), te je zbog toga obogaćen dodatkom retentata sirutke. Broj preživjelih primijenjenih probiotičkih kultura te bakterija mliječne kiseline odgovornih za spontanu fermentaciju praćen je tijekom čuvanja gotovih proizvoda pri 4 °C. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se broj bakterija mliječne kiseline održao u visokom broju u svim ispitivanim uzorcima tijekom 28 dana čuvanja (tablica 3).

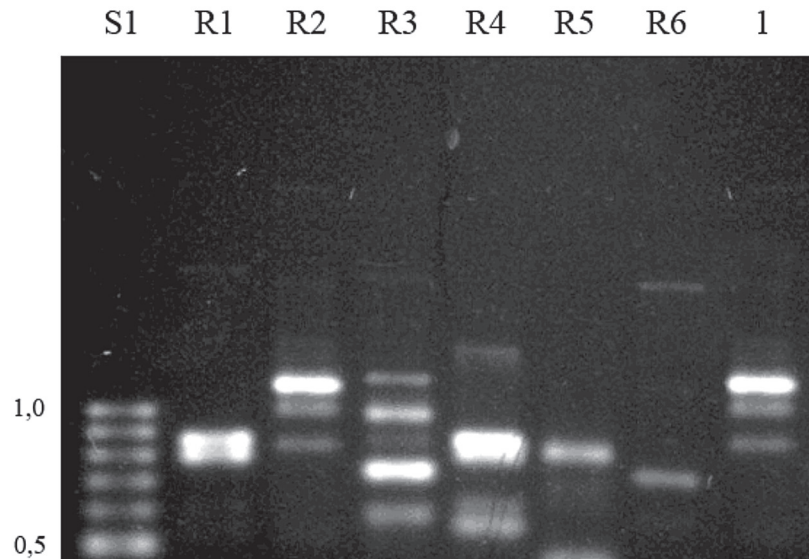
U svrhu potvrde prisutnosti primijenjenih probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 u proizvedenim probiotičkim napicima od permeata mlijeka s retentatom sirutke, provedena je RAPD metoda sa ISSI rev početnicom za bakterije mliječne kiseline (slika 1). Fragmenti DNA dobiveni RAPD metodom za bakterijske kolonije izolirane iz fermentiranih probiotičkih proizvoda odgovaraju fragmentima DNA za *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, a razlikuju se od fragmenata dobivenih za standardne sojeve *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus rhamnosus* GG i *Leuconostoc mesenteroides*

LMG 7954. Prema tome, na temelju rezultata o potvrdi prisutnosti primijenjenih probiotičkih kultura u visokom broju (cca 10⁷ CFU/mL), proizvedeni fermentirani napici su probiotički proizvodi, jer je broj živih bakterijskih stanica u skladu s Codex Alimentarius Standardom za fermentirane mliječne proizvode (Codex Alimentarius Commission, 2003.) i preporukama o broju živih stanica probiotičke kulture po gramu proizvoda (Swenson, 1999.; Sanders i Huis in 't Veld, 1999.; Shah, 2007.).

Tijekom spontane fermentacije permeata mlijeka, obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, izolirano je 5 bakterijskih sojeva. Nakon bojanja po Gramu i mikroskopiranja, ustanovljeno je da su sojevi SP1, SP2 i SP3 Gram-pozitivni koki, a sojevi SP4 i SP5 Gram-pozitivni štapići. Tijekom uzgoja izoliranih bakterijskih sojeva u tekućim MRS podlogama praćeni su parametri proizvodnje mliječne kiseline i promjene pH-vrijednosti (tablica 4). Dobiveni rezultati pokazuju da svi izolirani bakterijski sojevi proizvode visoke koncentracije mliječne kiseline (cca 18 g/L), a pH-vrijednost podloge s povećanjem koncentracije mliječne kiseline očekivano se smanjivala (cca pH 4,1).

Tablica 3: Preživljavanje prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline u permeatu mlijeka (obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke) (spontano) te sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 u fermentiranim napicima od permeata mlijeka (obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke) tijekom 28 dana čuvanja pri 4 °CTable 3: The viability of microorganisms naturally present in the milk permeate (enriched with 10 % (v/v) whey retentate) (spontaneous) and probiotic strains *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 and *Enterococcus faecium* L3 in fermented milk permeate (enriched with 10 % (v/v) of whey retentate) during 28 days of storage at 4 °C

Vrijeme čuvanja(dani) Time of storage (days)	CFU/mL			
	<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	<i>Lactobacillus plantarum</i> L4	<i>Enterococcus faecium</i> L3	Spontana fermentacija Spontaneous fermentation
7	3,23x10 ⁸	4,48x10 ⁸	2,96x10 ⁸	8,20x10 ⁶
14	7,00x10 ⁷	5,46x10 ⁷	9,40x10 ⁷	8,10x10 ⁶
21	4,95x10 ⁷	4,70x10 ⁷	4,90x10 ⁷	1,69x10 ⁶
28	2,90x10 ⁷	1,22x10 ⁷	1,30x10 ⁷	1,10x10 ⁶



Slika 1: DNA profili različitih bakterija mliječne kiseline dobiveni nasumičnim umnažanjem sa ISS1rev (5'-GGA TCC AAG ACA ACG TTT CAA A-3') početnicom

S1 - DNA standard 1 kb; R1 - *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; R2 - *Lactobacillus helveticus* M92; R3 - *Lactobacillus plantarum* L4; R4 - *Enterococcus faecium* L3; R5 - *Lactobacillus rhamnosus* GG; R6 - *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954; 1 - bakterija izoirana iz kontrolirane fermentacije sa sojem *L. helveticus* M92; 2 - bakterija izoirana iz kontrolirane fermentacije sa sojem *L. plantarum* L4; 3 - bakterija izoirana iz kontrolirane fermentacije sa sojem *E. faecium* L3

Figure 1: Random amplified polymorphic DNA patterns of different lactic acid bacteria obtained with oligonucleotide ISS1rev (5'-GGA TCC AAG ACA ACG TTT CAA A-3')

S1 - 1 kb DNA ladder; R1 - *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; R2 - *Lactobacillus helveticus* M92; R3 - *Lactobacillus plantarum* L4; R4 - *Enterococcus faecium* L3; R5 - *Lactobacillus rhamnosus* GG; R6 - *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954; 1 - bacterium isolated from the controlled fermentation with *L. helveticus* M92; 2 - bacterium isolated from the controlled fermentation with *L. plantarum* L4; 3 - bacterium isolated from the controlled fermentation with *E. faecium* L3

Antimikrobno djelovanje prema nepoželjnim i patogenim mikroorganizmima poželjno je svojstvo probiotičkih sojeva i starter kultura. Stoga je ispitivana antimikrobna aktivnost supernatanata izoliranih bakterijskih sojeva tijekom fermentacije permeata mlijeka, obogaćenog sa 10 %

(v/v) retentata sirutke (slika 2). Antibakterijska aktivnost izoliranih bakterija mliječne kiseline iz spontane fermentacije prema različitim test-mikroorganizmima određivala se turbidimetrijskom metodom koja osigurava izravnu interakciju ispitivane supstancije i stanica test-

Tablica 4: pH-vrijednost i koncentracija mliječne kiseline u supernatantima kultura nakon prekoćnog uzgoja izoliranih bakterijskih sojeva u MRS podlozi

Table 4: pH-value and lactic acid concentration in culture supernatants after overnight growth of isolated bacterial strains in MRS broth

Izolirani bakterijski soj Isolated bacterial strain	pH	Mliječna kiselina* Lactic acid* (mg/mL)
SP1	4,20	16,20
SP2	4,19	17,10
SP3	4,15	17,10
SP4	3,98	19,80
SP5	3,97	20,70

SP1, SP2 i SP3 - Gram-pozitivni koki; SP4 i SP5 - Gram-pozitivni štapići

SP1, SP2 and SP3 - Gram-positive cocci; SP4 and SP5 - Gram-positive bacilli

*izračunato preko titracijske kiselosti (°SH)

*calculated with respect to titratable acidity (°SH)

Tablica 5: Fermentacijski profili izoliranih bakterija mliječne kiseline dobiveni biokemijskim testom API 50 CHL

Table 5: Fermentation patterns of isolated lactic acid bacteria as revealed by biochemical test API 50 CHL

Ugljikohidrati Carbohydrates	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	Ugljikohidrati Carbohydrates	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
Kontrola / Control	-	-	-	-	-	Arbutin / Arbutine	+	+	+	-	-
Glicerol / Glycerol	-	-	-	-	-	Eskulin / Esculin	+	+	+	-	-
Eritriol / Erythriol	-	-	-	-	-	Salicin / Salicine	+	+	+	-	-
D-arabinoza / D-arabinose	-	-	-	-	-	Celobioza / Cellobiose	+	+	+	-	-
L-arabinoza / L-arabinose	-	-	-	-	-	Maltoza / Maltose	+	+	+	-	-
Riboza / Ribose	+	+	+	-	-	Laktoza / Lactose	+	+	+	+	+
D-ksiloza / D-xylose	±	±	±	-	-	Melibioza / Melibiose	-	-	-	-	-
L-ksiloza / L-xylose	-	-	-	-	-	Saharoza / Saccharose	±	±	±	-	-
Adonitol / Adonitol	-	-	-	-	-	Trehaloza / Trehalose	+	+	+	-	-
β-metil-ksilozid β-methyl-xyloside	-	-	-	-	-	Inulin / Inuline	-	-	-	-	-
Galaktoza / Galactose	+	+	+	+	+	Melezitoza / Melezitose	-	-	-	-	-
D-glukoza / D-glucose	+	+	+	+	+	D-rafinosa / D-raffinose	-	-	-	-	-
D-fruktoza / D-fructose	+	+	+	+	+	Amidon / Amidon	±	±	±	-	-
D-manoza / D-mannose	+	+	+	+	+	Glikogen / Glycogen	-	-	-	-	-
L-sorboza / L-sorbose	-	-	-	-	-	Ksilitol / Xylitol	-	-	-	-	-
Ramnoza / Rhamnose	-	-	-	-	-	β-gentobioza β-gentobiose	+	+	+	-	-
Dulcitol / Dulcitol	-	-	-	-	-	D-turanoza / D-turanose	-	-	-	-	-
Inozitol / Inositol	-	-	-	-	-	D-likoza / D-lyxose	-	-	-	-	-
Manitol / Mannitol	±	±	±	-	-	D-tagatoza / D-tagatose	-	-	-	-	-
Sorbitol / Sorbitol	-	-	-	-	-	D-fukoza / D-fucose	-	-	-	-	-
α-metil-D-manozid α-methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	L-fukoza / L-fucose	-	-	-	-	-
α-metil-D-glukozid α-methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	D-arabitol / D-arabitol	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin N-acetylglucosamine	+	+	+	+	+	L-arabitol / L-arabitol	-	-	-	-	-
Amigdalinalin / Amygdalin	+	+	+	-	-	Glukonat / Gluconate	-	-	-	-	-
2-keto-glukonat 2-keto-gluconate	-	-	-	-	-	5-keto-glukonat 5-keto-gluconate	-	-	-	-	-

SP1, SP2 i SP3 – Gram-pozitivni koki; SP4 i SP5 - Gram-pozitivni štapići

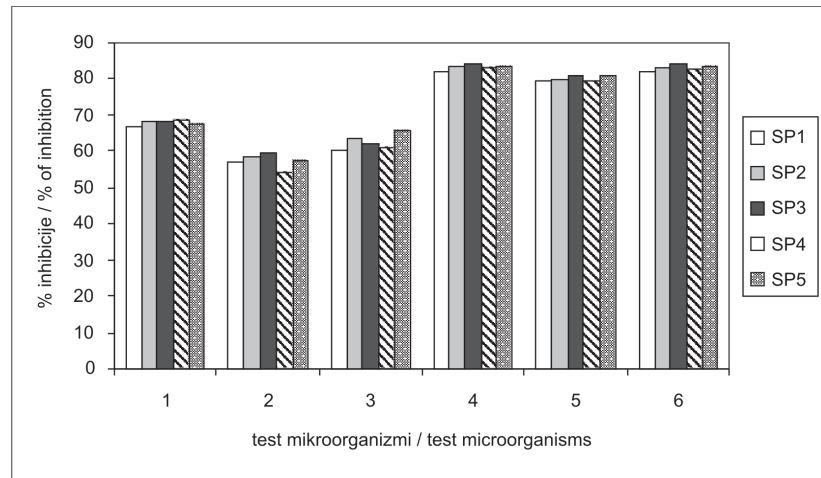
SP1, SP2 and SP3 – Gram-positive cocci; SP4 and SP5 - Gram-positive bacilli

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje; +, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati; ±, promjena boje između zelene i žute

-, negative reaction, the color did not change; +, positive reaction, the color changed to yellow in 48 h; ±, the color ranged between green and yellow

mikroorganizama (Šušković i sur., 1997.). Svi izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline pokazali su antimikrobnu aktivnost, a najjače su inhibicijski djelovali na rast test-mikroorganizma *Bacillus cereus*. Antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline potječe prvenstveno od mliječne kiseline koja, kao i kratkolančane masne kiseline, ulazi u stanice

acidnetolerantnih mikroorganizama u nedisociranom obliku i disocira tek unutar stanice. To rezultira zakiseljavanjem citoplazme što dovodi do inhibicije sinteze nukleinskih kiselina, lipida, peptidoglikana i proteina osjetljive stanice. Proizvodi metabolizma bakterija mliječne kiseline kao što su octena kiselina, ugljikov dioksid, vodikov peroksid, diacetil



Slika 2: Postoci inhibicije rasta pojedinih test-mikroorganizama s izoliranim bakterijskim sojevima iz permeata mlijeka, obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke.

SP1, SP2 i SP3 - Gram-pozitivni koki; SP4 i SP5 - Gram-pozitivni štapići;

Test-mikroorganizmi: 1 - *Staphylococcus aureus* 3048, 2 - *Staphylococcus aureus* K-144, 3 - *Escherichia coli*, 4 - *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, 5 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 6 - *Bacillus cereus*

Figure 2: Growth inhibition of test-microorganisms with isolated bacterial strains from milk permeate, enriched with 10 % (v/v) of whey retentate.

SP1, SP2 and SP3 - Gram-positive cocci; SP4 and SP5 - Gram-positive bacilli;

Test-microorganisms: 1 - *Staphylococcus aureus* 3048, 2 - *Staphylococcus aureus* K-144, 3 - *Escherichia coli* 3014, 4 - *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, 5 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 6 - *Bacillus cereus*

Tablica 6: Rezultati biokemijskog testa API 20 Strep dobiveni s izoliranim bakterijskim sojevima SP1, SP2 i SP3

Table 6: Reactions of isolated bacterial strains SP1, SP2 and SP3 as revealed by biochemical test API 20 Strep

Test / Test	SP1	SP2	SP3	Fermentacija / Fermentation of:	SP1	SP2	SP3
Voges-Proskauer Voges-Proskauer	+	+	+	Riboza / Ribose	+	+	+
Hidroliza hipurata Hippurate hydrolysis	±	±	±	Arabinoza / Arabinose	-	-	-
Hidroliza eskulina Esculin hydrolysis	+	+	+	Manitol / Mannitol	±	±	±
Pirolidonil arilamidaza Pyrrolidonyl arylamidase	±	±	±	Sorbitol / Sorbitol	-	-	-
α-galaktozidaza / α-galactosidase	-	-	-	Laktoza / Lactose	+	+	+
β-glukuronidaza / β-glucuronidase	-	-	-	Trehaloza / Trehalose	+	+	+
β-galaktozidaza / β-galactosidase	±	±	±	Inulin / Inuline	-	-	-
Alkalna fosfataza Alkaline phosphatase	-	-	-	Rafinoza / Raffinose	-	-	-
Leucin aminopeptidaza Leucine aminopeptidase	+	+	+	Škrob / Starch	+	+	+
Arginin dihidrolaza Arginine dihydrolase	+	+	+	Glikogen / Glycogen	-	-	-

SP1, SP2 i SP3 - Gram-pozitivni koki

SP1, SP2 and SP3 - Gram-positive cocci

-, negativna reakcija; +, pozitivna reakcija

-, negative reaction; +, positive reaction

i bakteriocini, inhibicijske su supstancije koje mogu biti prisutne u supernatantima kultura bakterija mliječne kiseline (Pelaez i Requena, 2005.). Antimikrobno djelovanje hranjivih podloga kojima su pH-vrijednosti podešene na pH-vrijednosti ispitivanih supernatantata izoliranih bakterija mliječne kiseline nije se značajno razlikovalo od rezultata inhibicije test-mikroorganizama sa supernatantima (rezultati nisu prikazani). To upućuje na to da inhibicijsko djelovanje izoliranih bakterijskih sojeva potječe prvenstveno od proizvedene mliječne kiseline, dok bi se potencijalna bakteriocinska aktivnost morala još dodatno istražiti.

Biokemijskim su testom API 50 CHL sojevi SP4 i SP5 identificirani kao *Lactobacillus helveticus*, a sojevi SP1, SP2 i SP3 kao *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, što je potvrđeno i biokemijskim testom API 20 Strep (tablice 5 i 6).

Zaključci

Tijekom 24 sata spontane fermentacije permeata mlijeka, obogaćenih sa 10 % (v/v) retentata sirutke i kontrolirane fermentacije uz dodatak probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, proizvedeno je 6,3-8,8 g/L mliječne kiseline, pH-vrijednost je iznosila 4,62-4,83, a broj živih stanica iznosio je od 10^6 CFU/mL u spontanoj fermentaciji do 10^8 CFU/mL u kontroliranoj fermentaciji s probiotičkim sojevima. Visok broj stanica probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 održao se tijekom 28 dana čuvanja pri temperaturi od +4 °C. Prema tome, permeat mlijeka, obogaćen sa 10 % (v/v) retentata sirutke se pokazao kao dobra sirovina za proizvodnju fermentiranih probiotičkih napitaka koji sadržavaju žive stanice dodanih probiotičkih sojeva u visokom broju (cca 10^7 CFU/mL). Bakterijski sojevi izolirani tijekom spontane fermentacije iz permeata mlijeka, obogaćenog sa 10 % (v/v) retentata sirutke, snizili su pH-vrijednost MRS podloge na 4,0 tijekom preakoćnog uzgoja, zbog proizvedene mliječne kiseline. Svi bakterijski izolati pokazali su značajnu inhibiciju rasta odabranih test-mikroorganizama tijekom ispitivanja antimikrobne aktivnosti, što je jedno od poželjnih svojstava starter kultura. Prema dobivenim rezultatima spontane fermentacije permeata mlijeka sa 10 % (v/v) retentata sirutke, može se zaključiti da je prirodno prisutna mikrobna populacija bila dostatna za fermentaciju. Rezultati biokemijskih testova pokazali su da je riječ o dvjema različitim vrstama bakterija mliječne kiseline koje su identificirane kao *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus*.

Production of fermented probiotic beverages from milk permeate enriched with whey retentate and identification of present lactic acid bacteria

Summary

In this research the application of bacterial strains *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 and *Enterococcus faecium* L3 in the production of fermented probiotic beverages from milk permeate enriched with 10 % (v/v) whey retentate, was investigated. In the previous researches of probiotic concept, probiotic properties of these three strains of lactic acid bacteria have been defined. At the end of controlled fermentation, probiotic strains have produced 7.4 g/L lactic acid, pH was decreased to 4.7, and number of live cells was around 10^8 CFU/mL. Number of viable count of probiotic bacteria, which were identified with RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method, was maintained at around 10^7 CFU/mL during 28 days of the preservation at 4 °C. Furthermore, a spontaneous fermentation of milk permeate enriched with 10 % (v/v) of whey retentate was carried out and lactic acid bacteria present in these substrates were isolated. All of these bacterial strains have rapidly acidified the growth media and have shown antibacterial activity against chosen test-microorganisms, what are important properties of potential starter cultures for the fermentation of dairy products. The results of biochemical API analysis have identified isolated strains as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus helveticus*.

Key words: milk permeate, whey retentate, probiotic starter culture, RAPD, antibacterial activity

Literatura

1. Benković, M., Kos, B., Tonković, K., Leboš, A., Šušković, J., Gregurek, L.J. (2008): Utjecaj probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94, inulina i transglutaminaze na svojstva čvrstog jogurta, *Mljekarstvo* 58 (2), 95-115.
2. Codex Alimentarius Commission (2003): CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003.
3. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf, pristupljeno 17.05.2008.
4. Dyr, J., Gregr, V., Seiler, A. (1963): Lichvarstvi, Statni Nakladatelstvi Technicke Literaturi, Praha, 147-157.
5. Frece, J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
6. Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.

7. Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009): Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice, *J. Dairy Res.* 76, 1-7.
8. Havenaar, R., Huis In't Veld J. (1992): Probiotics: A General View. U: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Vol 1*, B. J. W. Wood (ured.), Elsevier Applied Science, London, str. 151-170.
9. Kandler, O., Weiss, N. (1986): Regular, non sparing Gram-positive rods. U: *Bergey's Manual of Systematic applied Microbiology. Vol.2*, P.H.A. Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Hott (ured.), Williams i Wilkins, Baltimore, str. 1209-1234.
10. Kos, B. (2001): Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
11. 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, 981-987.
12. 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. Microbiol. Biotechnol.* 24, 699-707.
13. Maaik, C. De Vries, Vaughan, E. E., Kleebezem, Willem M. De Vos (2005): *Lactobacillus plantarum*- survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.* 16, 1018-1028.
14. Peláez, C., Requena, T. (2005): Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15, 831-844.
15. Radošević, V., Tonković, K., Gregurek, L.J., Kos, B., Šušković, J. (2007): Proizvodnja svježeg probiotičkog sira s dodatkom transglutaminaze. *Mljekarstvo*, 57, 15-29.
16. Sanders, M. E., Huis In't Veld, J. (1999): Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. U: *Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, *Antonie van Leeuwenhoek* 76, str. 293-316.
17. Shah, N.P. (2007): Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17, 1262-1277.
18. Svensson, U. (1999): Industrial perspectives. U: *Probiotics. A Critical Review*, G. W. Tannock (ured.), Horizon Scientific Press, London, str. 57-64.
19. Šušković, J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
20. Šušković, J. (2005): Starter kulture, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
21. Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline, *Mljekarstvo* 47, 107-112.
22. Šušković, J., Krobot, M., Mehak, M., Matošić, S. (1993): Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*, *Mljekarstvo* 43, 95-106.
23. Tratnik, L.J. (2003): Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane, *Mljekarstvo* 53 (4), 325-352.
24. Veyrat, A., Miralles, M. C., Pérez-Martinez, G. (1999): A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* 87, 49-61.

Zahvala

Autori zahvaljuju na financijskoj potpori Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (Tehnološki projekt HITRA TP-5822 "Proizvodnja i primjena probiotičkih starter kultura" čiji je voditelj dr. sc. Jagoda Šušković, red. prof.) te Sektoru za razvoj proizvoda i tehnologije tvrtke Dukat - mliječna industrija d.d., Zagreb.