

Proizvodnja svježeg probiotičkog sira s dodatkom transglutaminaze

Vinka Radošević, Katarina Tonković, Ljerka Gregurek,
Blaženka Kos, Jagoda Šušković

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.352/579.864.1

Sažetak

Svrha rada bila je istražiti utjecaj probiotičke kulture *Lactobacillus acidophilus* i enzima transglutaminaze (TG) na kvalitetu i senzorska svojstva autohtonog svježeg sira iz okolice Zagreba. Svježem, nepasteriziranom, obranom mlijeku dodan je enzim transglutaminaza (TG), a na različitim temperaturama i trajanju aktivacije (8 sati na 11 °C i 4 sata na 25 °C). Inaktivacija enzima provedena je postupkom pasterizacije (65 °C/30 min). Nakon hlađenja na 25 °C, mlijeko za proizvodnju svježeg sira inokulirano je mezofilnom kulturom bakterija mliječne kiseline MM101 i probiotičkom kulturom *L. acidophilus* LAC-1. Uz pokusne uzorke, s dodatkom TG i probiotičke kulture, proizvedeni su i kontrolni uzorci bez dodatka TG i probiotika te uzorci bez TG, ali uz dodatak probiotika. Uzorci svježeg sira proizvedeni uz dodatak TG, posebno oni gdje je TG djelovala 8 sati na 11 °C, imali su veću masu od uzoraka proizvedenih bez dodatka enzima, pa je stoga i prinos sira bio veći, a pokazali su i manju sinerezu tijekom 10 dana čuvanja svježeg sira na 10 °C negoli uzorci koji su proizvedeni bez dodatka enzima. Isti su uzorci dobili najviše ocjene senzorskih svojstava. Metabolička aktivnost mezofilne kulture MM101 i probiotičkog soja *L. acidophilus* LAC-1 utjecala je na bolji okus i miris svježeg sira, a broj živih stanica probiotičkog soja *L. acidophilus* LAC-1 u priređenim uzorcima bio je cca 5×10^6 cfu/g nakon 10 dana čuvanja na 10 °C, što je više od minimalnog preporučenog broja u probiotičkim proizvodima. Dodatak transglutaminaze doprinosi boljoj konzistenciji i općem izgledu svježeg sira.

Ključne riječi: svježi sir, transglutaminaza, probiotik, *Lactobacillus acidophilus*, senzorska svojstva

Uvod

Svježi sir je proizvod dobiven zgrušavanjem pasteriziranog mlijeka s mezofilnom kulturom bakterija mliječne kiseline i kimozinom. Karakteri-

stičnog je srednje kiselog, osvježavajućeg okusa, bijele je boje i konzistencije koja se «lista». Tradicionalno se proizvodi u okolini Zagreba. Sir se konzumira svjež, nakon završenog ocjeđivanja gruša (Kršev i sur., 1992.). Sir sadrži visoki postotak vode (55 - 80 %), a proizvodi se od punomasnog, djelomično obranog ili obranog mlijeka ohlađenog na 20 - 23 °C. Ako se za proizvodnju koaguluma koriste bakterijske kulture, onda su to mezofilne bakterije mliječne kiseline (Kršev, 1989.). Mlijeko fermentira 14 - 18 sati dok ne postigne pH-vrijednost 4,8 - 4,6. Dobiveni gruš reže se na veće kocke i cijedi se sirutka, a ocijeđeni sir odmah je spreman za konzumaciju.

Transglutaminaza (TG, EC 2.3.2.13) je enzim koji katalizira reakciju između glutaminskih i lizinskih ostataka u proteinu, a široko je rasprostranjen u prirodi i nalazi se u različitom životinjskom tkivu, ribama, biljkama i mikroorganizmima (Hinz i sur., 2007.). Transglutaminaza u ljudskoj je krvi poznata kao Faktor XIII koji ima ulogu u koagulaciji krvi kod ljudi, povezuje fibrinske molekule i stabilizira fibrinski polimer. Katalizira nastajanje veza između aminokiselinskih ostataka proteina ne samo u biološkom sustavu, već i u hrani bogatoj proteinima (Kuraishi i Sakamoto, 1996.). Transglutaminaza može inter- i intramolekularno povezati proteine iz mlijeka pomoću kovalentnih veza [ϵ -(γ -glutamil) lizin veze], a takvim vezanjem dolazi do oblikovanja čvršćeg i kompaktnijeg gela u mliječnom proizvodu. Sir, sladoled i jogurt proizvodi su za koje se predlaže upotreba transglutaminaze (Ozer i sur., 2007.). Kazeini iz mlijeka su dobri supstrati za TG, jer kazeini imaju otvorenu tercijarnu strukturu za razliku od globularne strukture sirutkinih proteina (Bönisch i sur., 2007.). Enzimska modifikacija se primjenjuje kao korisna metoda za povećanje funkcionalnosti proteina hrane.

Prikladno formulirani probiotički pripravci su prehrambeni proizvodi visokog potencijala koji na različite načine pozitivno utječu na zdravlje čovjeka i temelj su funkcionalne hrane (Šušćević i sur., 2001.; Frece i sur., 2005.a). Pod pojmom probiotik podrazumijeva se kultura mikroorganizama koja primijenjena u ljudi ili životinja djeluje korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Havenaar i Huisin't Veld, 1992.; Šušćević, 1996.). Bitan kriterij pri odabiru bakterija mliječne kiseline za probiotičku upotrebu je preživljavanje u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog sustava (Šušćević i sur., 2000.). Da bi probiotički sojevi mogli iskazati svoju aktivnost, važno je da imaju svojstvo adhezije i kolonizacije u ileumu i debelom crijevu domaćina (Kos i sur., 2003.; Frece i sur., 2005.b). Najznačajniji pozitivni učinci bakterija mliječne kiseline na zdravlje domaćina su: antimikrobno djelovanje

na patogene mikroorganizme, poboljšanje metabolizma laktoze, stimulacija imunološkog sustava, antikancerogeno djelovanje i snižavanje koncentracije kolesterola u serumu (Havenaar i Huisin't Veld, 1992.; Šušković i sur., 2001.; Guarner i Malagelada, 2003.). Probiotici se primjenjuju kao starter kulture ili se dodaju u fermentirane, najčešće mliječne proizvode. Budući da je soj *Lactobacillus acidophilus* humanog podrijetla, velika je vjerojatnost njegove uspješne primjene kao probiotika namijenjenog ljudima. Na temelju izrađene genomske mape *L. acidophilus* i drugih bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija, provode se daljnja istraživanja primjenom «omics» tehnika (genomike, proteomike i transkriptomike) u svrhu definiranja mehanizama njihovog probiotičkog djelovanja na molekularnoj razini (Klaenhammer i sur., 2005.).

Svrha ovog rada bila je istražiti zajednički utjecaj probiotičke kulture *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 i enzima transglutaminaze na kvalitetu i senzorska svojstva proizvedenog svježeg sira.

Materijal i metode

Za proizvodnju svježeg sira korišteno je obrano kravlje mlijeko proizvođača «Križevačka mljekara», Križevci, s prosječnim udjelom mliječne masti od 1,42 % i proteina od 3,35 %. Analiza mlijeka (ukupna i bezmasna suha tvar, proteini, mast i laktoza) određena je na uređaju «Milkoscan» tip FT 120, gustoća pomoću laktodenzimetra, pH-vrijednost pomoću pH metra «Knick» tip 911, a ledište krioskopski.

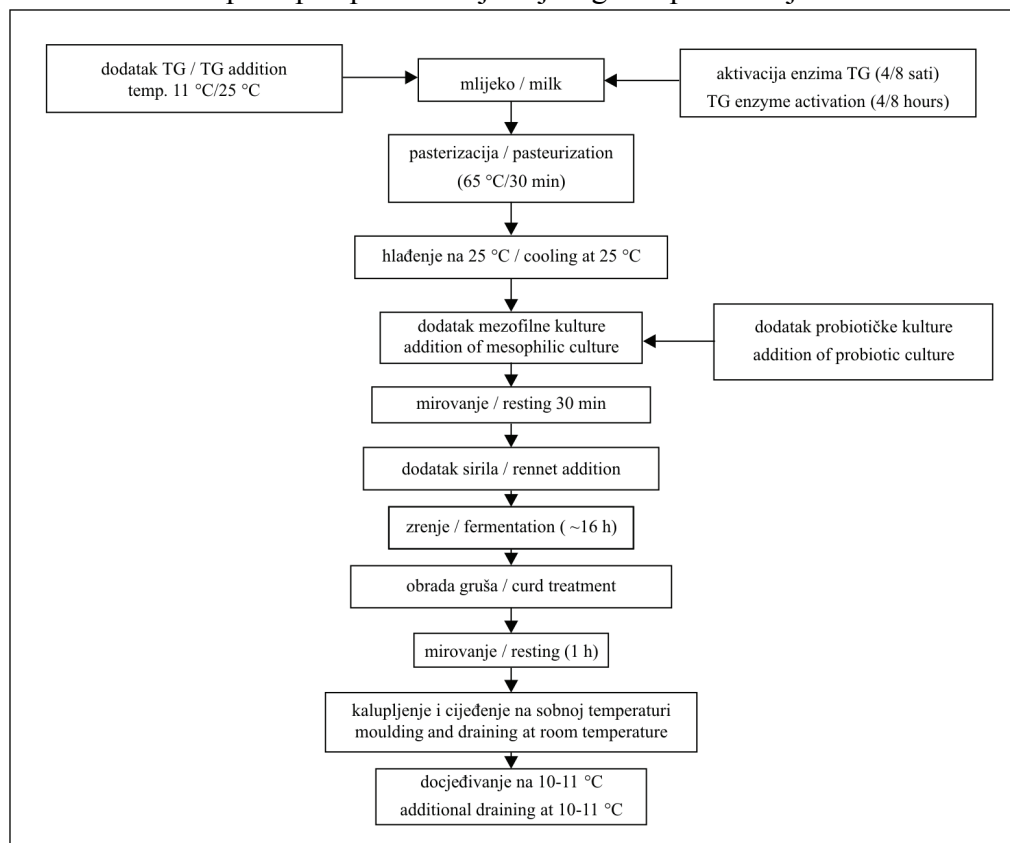
Proizvedeni su svježi sirevi s dodatkom probiotičke kulture *L. acidophilus* LAC-1 i enzima transglutaminaze (temperatura aktivacije enzima: 11 °C i 25 °C), te 2 kontrolna uzorka: bez transglutaminaze i probiotičke kulture, te samo s probiotičkom kulturom (tablica 1).

Tablica 1: Uzorci proizvedenih svježih sireva

Table 1: Produced fresh cheese samples

Uzorci proizvedenih svježih sireva s dodatkom: Produced fresh cheese samples with addition of:	
Uzorak A Sample A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-1
Uzorak B Sample B	TG (temperatura aktivacije 11 °C) + <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-1 TG (activation temperature 11 °C) + <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-1
Uzorak C Sample C	TG (temperatura aktivacije 25 °C) + <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-1 TG (activation temperature 25 °C) + <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAC-1
Uzorak D Sample D	Kontrolni uzorak bez dodataka Control sample without additions

Tehnološki postupak proizvodnje svježeg sira prikazan je na slici 1.



Slika 1: Shema proizvodnje svježeg sira tradicionalno i s dodatkom transglutaminaze (TG) i probiotičke kulture Lactobacillus acidophilus LAC-1

Figure 1: Diagram of fresh cheese production, traditionally and with addition of transglutaminase (TG) and probiotic culture Lactobacillus acidophilus LAC-1

Prije pasterizacije, u mlijeko za sirenje (uzorci B i C) dodano je 1,6 g/L TG (ACTIVA MP[®] transglutaminaza, Ajinomoto, Njemačka). U uzorku B, TG je aktivno djelovala na 11 °C tijekom 8h, a u uzorku C na 25 °C tijekom 4 sata. Mlijeko je nakon 8, odnosno 4 sata, pasterizirano na 65 °C/30 minuta. Postupkom pasterizacije inaktiviran je enzim TG u uzorcima B i C, odnosno prekinuto je njegovo aktivno djelovanje u mlijeku. Mlijeko je zatim ohlađeno na temperaturu fermentacije (25 °C).

U ohlađeno mlijeko, nakon pasterizacije, u sve je uzorke dodana mezofilna, koncentrirana, liofilizirana, mješovita starter kultura MM101 (Danisco, Francuska) koja sadrži *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Uzorcima A, B i C dodana je i koncentrirana probiotička kultura *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 (DSM Food Specialties, Nizozemska) koja sadrži minimalno 10^{11} cfu/unit-u (colony forming units/unit).

U mlijeko naciepljeno mezofilnom starter kulturom i probiotičkom kulturom dodana je mala količina mikrobnog sirila (Fromase 2200, DSM Food Specialties, Nizozemska) prema preporuci proizvođača.

Fermentacija se odvijala 14-15 sati na 25 °C do postizanja gruša povoljne čvrstoće i pH-vrijednosti 4,7-4,5. Gruš je zatim izrezan na kocke veličine 2 cm³ i ostavljen da miruje oko 1 sat. Nakon toga stavljen je u plastične kalupe ($\varphi = 9$ cm). Cijedenje gruša nastavljeno je 11 sati na 10 °C. Proizvedeni svježi sir čuvan je 10 dana na 10 °C.

Svaki pokus je ponovljen 5 puta, a rezultati su prikazani kao prosječne srednje vrijednosti. Proizvedeni uzorci čuvani su 10 dana, tijekom kojih su provedena sljedeća ispitivanja: prinos sira, sinereza, suha tvar, pH vrijednost, senzorska svojstva i određivanje broja živih probiotičkih bakterija u proizvedenom svježem siru. Prinos sira određen je vaganjem mase proizvedenog sira, a izračunat je prema količini upotrijebljene sirovine. Sinereza (izdvojena sirutka iz sira) iskazana je u postocima, a suha tvar je određena standardnom metodom sušenja na 105 °C do konstantne mase. Kiselost svježeg sira izmjerena je pH-metrom «Knick» tip 911. Senzorska svojstva proizvedenog sira (izgled, konzistenciju, boju, miris i okus) ocijenila je panel skupina od 5 članova koristeći tablicu za ocjenjivanje senzorske kvalitete svježih sireva i sirnih namaza (Pravilnik za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, 2004.). Za određivanje broja živih probiotičkih bakterija u uzorcima svježeg sira, priređena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. Petrijeve zdjelice s De Man, Rogosa, Sharp (MRS) agar (Biolife, Italija) naciepljene su sa 100 μ L petog, šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja. Nakon 48 sati inkubacije u anaerobnim uvjetima na 43 °C (temperatura na kojoj ne raste mezofilna kultura), izbroje se izrasle kolonije i preračuna broj živih stanica po gramu svježeg sira.

Rezultati i rasprava

Hrana koja sadrži probiotičke sojeve bakterija mliječne kiseline za humanu upotrebu pojavila se prvi puta u Japanu 20-tih godina 20. stoljeća. Prve upotrijebljene probiotičke bakterije pripadale su vrstama *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei*, a bile su primijenjene u fermentiranim mliječnim proizvodima koji su do danas ostali najzastupljeniji probiotički proizvodi (Svensson, 1999.). Sa stajališta proizvodnje probiotičkih proizvoda, od primarne je važnosti: izbor probiotičkog soja, koncentracija inokuluma, uvjeti proizvodnje, preživljavanje bakterijskih stanica tijekom čuvanja proizvoda te postizanje dobrih senzorskih svojstava proizvoda. Zbog toga se pri proizvodnji svježeg probiotičkog sira vodilo računa o svim ovim parametrima, te je ispitan utjecaj dodatka probiotičke kulture *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 i enzima transglutaminaze na kvalitetu i senzorska svojstva proizvedenih svježih sireva. Svježe, nepasterizirano obrano kravlje mlijeko, odabrano za proizvodnju svježih sireva sa i bez dodatka probiotika i enzima TG, pokazalo je zadovoljavajuću kvalitetu (tablica 2).

Tablica 2: Kemijski sastav, gustoća i kiselost mlijeka odabranog za proizvodnju svježeg sira (n=5)

Table 2: Chemical composition, density and acidity of milk for fresh cheese production (n=5)

Analički parametar / Analytical parameter	Srednje vrijednosti Average values
Kiselost (pH-vrijednost) / Acidity (pH-value)	6,84
Gustoća / Density (g mL ⁻¹)	1,033
Suha tvar / Dry matter (%)	11,23
Bezmasna suha tvar / Non-fat dry matter (%)	8,67
Mast / Fat (%)	1,42
Proteini / Proteins (%)	3,35
Laktoza / Lactose (%)	4,52
Ledište / Freezing point (°C)	- 0,506

Tijekom proizvodnje i 10-dnevnog čuvanja svježih sireva praćene su promjene pH-vrijednosti u svim uzorcima (tablica 3). pH-vrijednosti uzoraka svježih sireva, nakon koagulacije na temperaturi 22 - 23 °C, kretale su se u rasponu 4,58 - 4,65, što je u skladu sa zahtjevima procesa pri proizvodnji svježeg sira. Uzorci sira s TG bili su manje kiseli od uzoraka bez dodatka TG što je utjecalo i na senzorska svojstva sira.

*Tablica 3: pH vrijednosti mlijeka i uzoraka svježih sireva tijekom proizvodnje i čuvanja (n=5)**Table 3: pH values of milk and fresh cheese samples during production and storage (n=5)*

Proizvodni parametri Process parameters	T (°C)	Uzorak A Sample A ($\bar{a} \pm \delta$) n=5 pH	Uzorak B Sample B ($\bar{a} \pm \delta$) n=5 pH	Uzorak C Sample C ($\bar{a} \pm \delta$) n=5 pH	Uzorak D Sample D ($\bar{a} \pm \delta$) n=5 pH
pH mlijeka milk pH	10	6,84±0,029	6,84±0,00144	6,84±0	6,84±0
pH nakon dodatka TG pH after addition of TG	11 i 25	-	6,73	6,65	-
pH nakon pasterizacije pH after pasteurization	25	6,69±0	6,64±0	6,63±0	6,69±0,027
pH nakon dodatka kultura (MM101 i LAC-1) i sirila pH after addition of cultures (MM101 and LAC-1) and rennet	25	6,63±0,0058	6,62±0	6,59±0	6,63±0
Vrijeme koagulacije (h) Coagulation time (h)	-	14	15	15	14
pH nakon koagulacije pH after coagulation	22-23	4,58±0	4,65±0,00577	4,64±0	4,61±0
pH nakon docjeđivanja u toplom pH after warm drainage	20	4,51±0,121	4,57±0	4,55±0	4,49±0
pH nakon docjeđivanja u hladnom pH after cold drainage	10	4,41±0,237	4,46±0	4,50±0	4,40±0
2. dan čuvanja sira 2 nd day of storage	10	4,43±0,064	4,47±0	4,50±0	4,46±0
3. dan čuvanja sira 3 rd day of storage	10	4,39±0,0924	4,48±0	4,47±0	4,36±0
6. dan čuvanja sira 6 th day of storage	10	4,37±0,0635	4,41±0	4,42±0	4,33±0
10. dan čuvanja sira 10 th day of storage	10	4,35±0,0217	4,40±	4,41±	4,33±

n = broj pokusa / number of trials

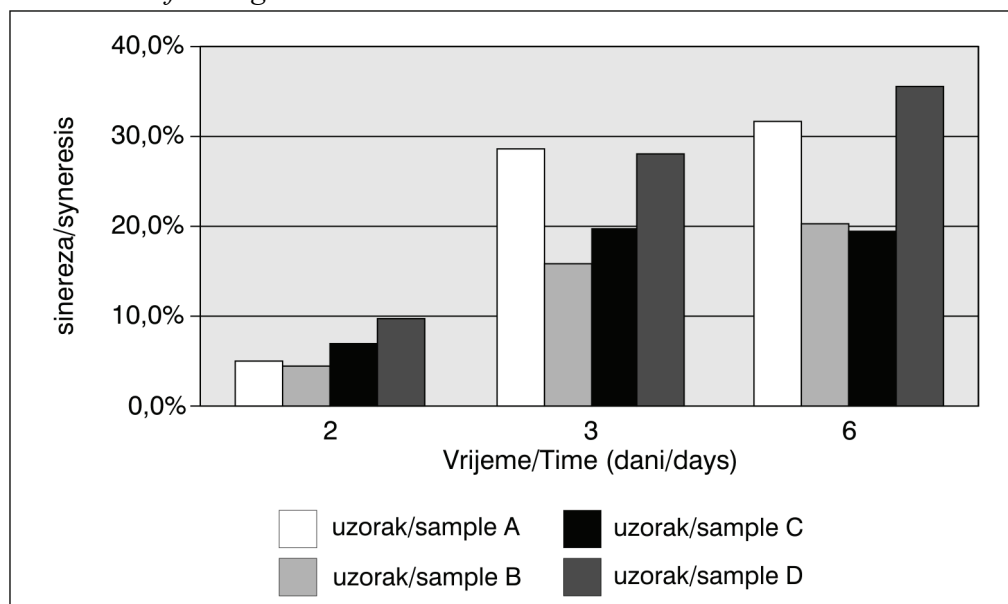
 \bar{a} = srednja vrijednost / average value δ = standardna devijacija / standard deviation

Tijekom čuvanja sira praćena je i sinereza (izdvajanje sirutke) tijekom 6 dana. Najmanji postotak izdvojene sirutke pokazali su uzorci B i C u koje je dodana TG i probiotička kultura (slika 2). Sinereza obuhvaća preuređenje proteinske mreže u nastalom grušu kidanjem vlakana i oblikovanjem čvršće,

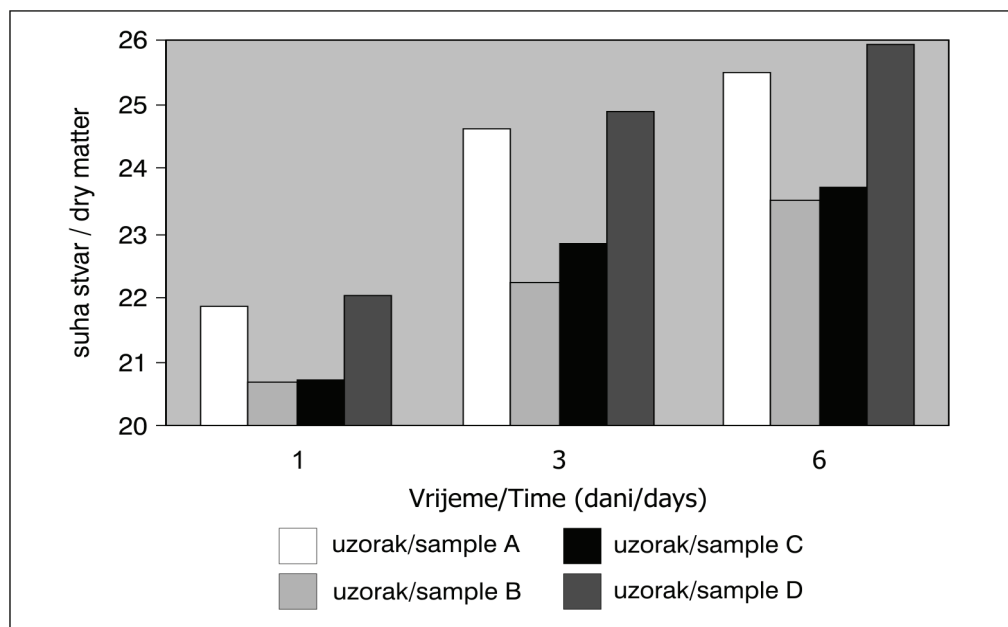
kompaktnije strukture uz otpuštanje sirutke (Tratnik, 1998.). Iz slike je vidljivo da su uzorci A i D (bez dodatka TG) pokazali značajno veću sinerezu od uzoraka u kojima je korišteno aktivno djelovanje enzima. Opći izgled i struktura te vrste svježeg sira često su narušeni izdvajanjem sirutke. Gruš dobiven od mlijeka u kojem je TG aktivno djelovala, a koji sadrži više stabilnih kovalentnih ϵ -(γ -Glu)Lys veza, zadržava molekule vode i sirutka ostaje inkorporirana u grušu, bez obzira na promjene temperature ili na fiziološke šokove (Kuraishi i Sakamoto, 1996.; Cozzolino i sur., 2003.).

Slika 2: Sinereza (% izdvojene sirutke) u uzorcima svježih sireva tijekom 6 dana čuvanja

Figure 2: Syneresis (% separated whey) of fresh cheese samples during 6 days of storage

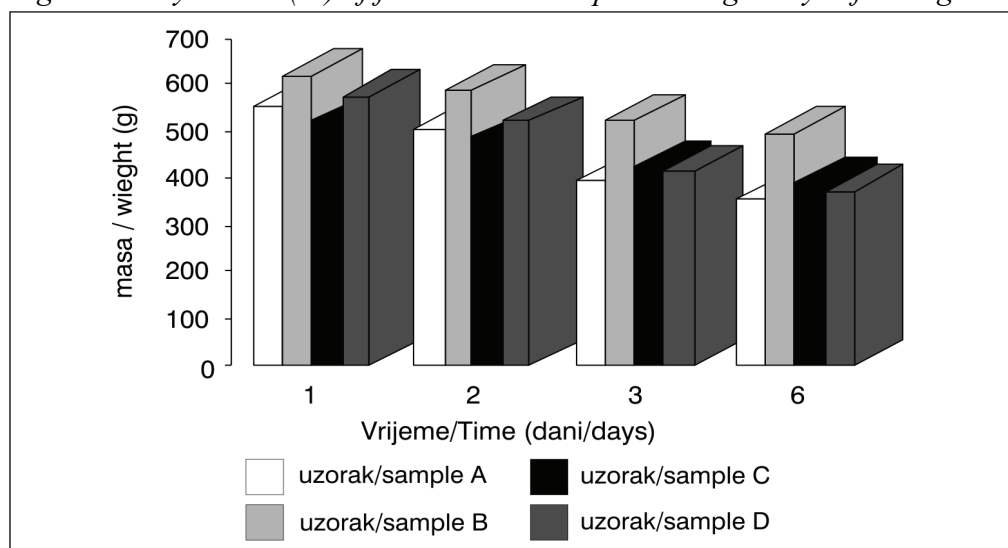


Suha tvar u uzorcima proizvedenog svježeg sira bila je u skladu s odredbama Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka, te metodama kemijskih i fizikalnih analiza mlijeka i mliječnih proizvoda za svježi sir od obranog mlijeka (Pravilnik o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura, 1982.) Tijekom 6 dana čuvanja sira suha tvar bila je najniža u uzorcima B i C s dodanom TG zbog slabijeg izdvajanja sirutke uslijed djelovanja tog enzima (slika 3).



Slika 3: Suha tvar (%) u uzorcima svježih sireva tijekom 6 dana čuvanja

Figure 3: Dry matter (%) of fresh cheese samples during 6 days of storage

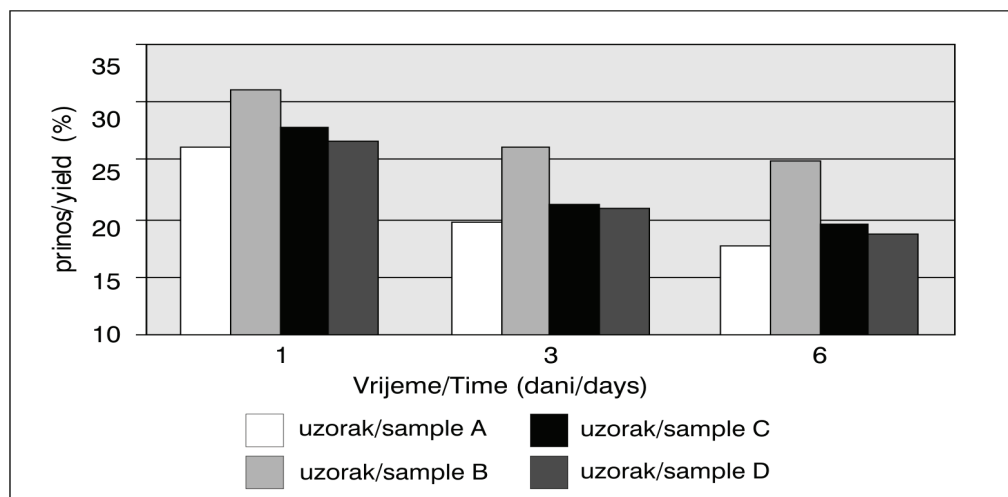


Slika 4: Masa proizvedenih uzoraka svježih sireva tijekom 6 dana čuvanja

Figure 4: Weight of fresh cheese samples during 6 days of storage

Osim izdvojene sirutke i suhe tvari, praćena je i masa uzoraka svježih sireva. Mase svih uzoraka mjerene su 1., 2., 3. i 6. dana čuvanja sira. Svi su uzorci sireva gubili na masi tijekom čuvanja, ali je taj gubitak bio najmanji u uzorcima B i C, dakle u sirevima priređenim s TG i probiotičkom kulturom. Najveću masu imali su sirevi oznake B s probiotičkom kulturom *L. acidophilus* LAC-1 i enzimom transglutaminaza (temperatura aktivacije enzima: 11 °C) (slika 4).

U skladu s tim rezultatima je i prinos svježeg sira, koji je praćen tijekom 6 dana skladištenja, a najveći je bio u uzorku B (slika 5). Prinos tog uzorka u prosjeku je za 5,3 % veći od ostalih uzoraka tijekom 6 dana čuvanja sira. Uzorak C nije pokazao značajnije povećanje prinosa u odnosu na uzorke bez dodatka TG (slika 5).



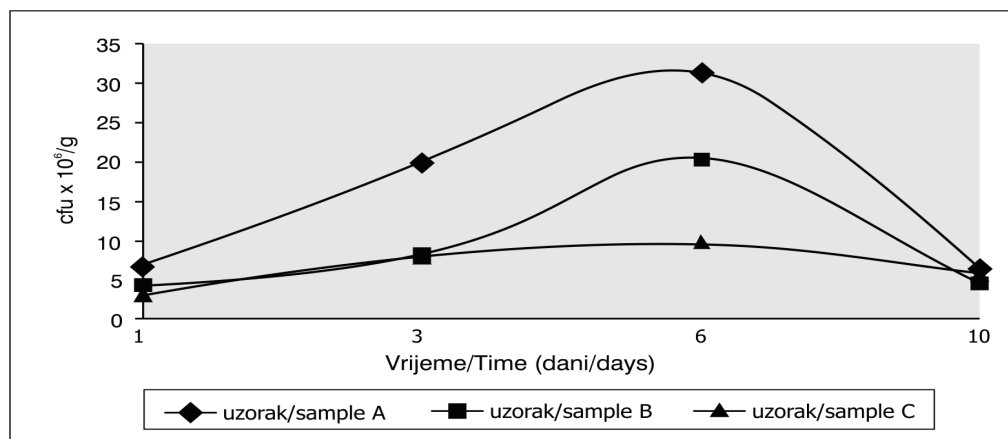
Slika 5: *Prinos svježeg sira (%) u uzorcima tijekom 6 dana čuvanja*

Figure 5: *Yield of fresh cheese (%) in samples during 6 days of storage*

Kao što se vidi na slici 6, broj živih stanica *L. acidophilus* LAC-1 tijekom 10 dana čuvanja svježeg sira, u svim ispitivanim uzorcima bio je veći od preporučenog broja živih stanica probiotičke bakterije u fermentiranim mliječnim proizvodima koji iznosi minimalno 10^6 stanica/g (Svensson, 1999.; Sanders i Huis in't Veld, 1999.).

U uzorku A (bez TG) izbrojeno je više kolonija nego u uzorcima B i C (sa TG). Pretpostavlja se da je uzrok tome aktivno djelovanje enzima TG, zbog čega je dostupnost niskomolekularnih peptida potrebnih za rast bakterija snižena (Lorenzen i sur., 2002.). Desetog dana čuvanja, broj stanica *L.*

acidophilus LAC-1 u sva tri uzorka sira bio je približno isti kao i prvog dana čuvanja, tj. oko 5×10^6 cfu/g proizvoda.



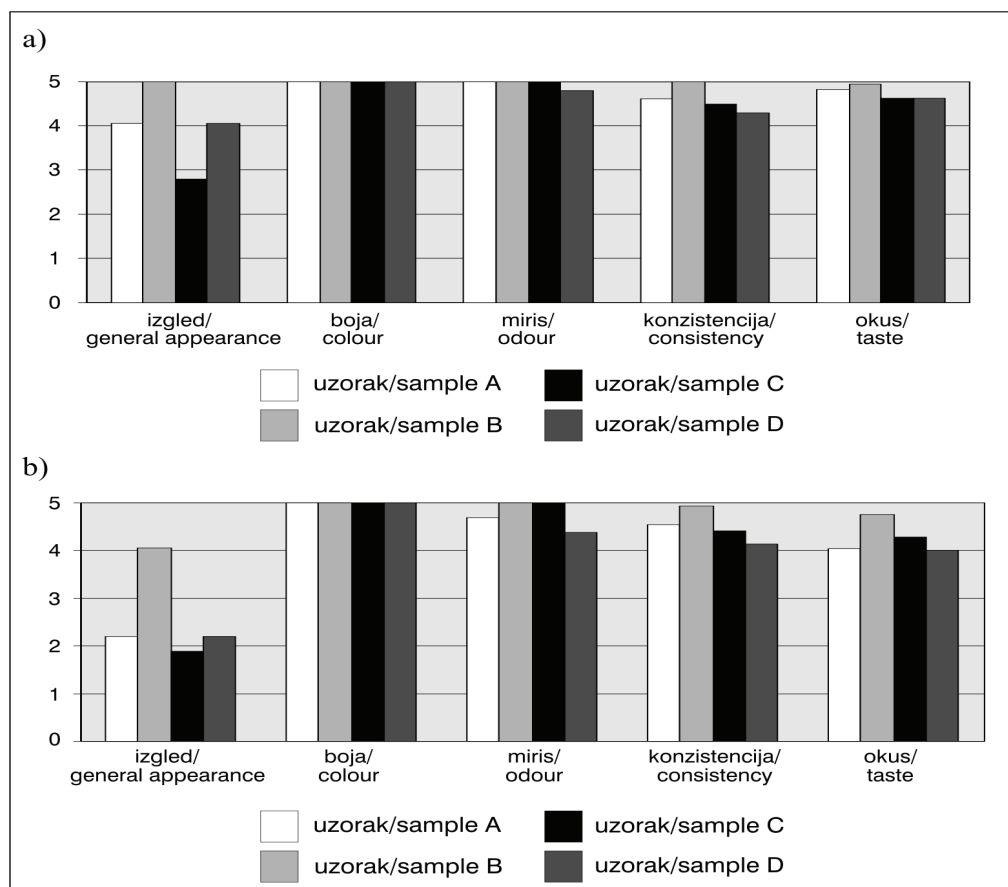
Slika 6: Preživljavanje probiotičkog soja *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 u svježem probiotičkom siru tijekom 10 dana čuvanja

Figure 6: Viability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LAC-1 in fresh probiotic cheese during 10 days of storage

Senzorska svojstva svježih sireva praćena su tijekom 10 dana čuvanja, a srednje vrijednosti senzorskih ocjena 1. i 10. dana nakon proizvodnje prikazane su na slici 7a) i 7b). Uzorak B (u kojem je dodana probiotička kultura i TG aktivirana na 11 °C) tijekom čuvanja pokazao je vrlo stabilnu kvalitetu: boja sira se nije promijenila i bila je intenzivnije bijela od drugih uzoraka, površina sira sjajnija, konzistencija grušica bila je čvršća nego ostalih uzoraka, a sir se «listao», što je karakteristično za ovaj tip svježeg sira. Prvog dana čuvanja dobio je maksimalni broj bodova za sve senzorske parametre, a i 10. dana čuvanja najbolje ocijenjen od svih uzoraka i to za sva ocjenjivana senzorska svojstva. Ostali uzorci lošije su ocijenjeni zbog općeg izgleda, osobito 10-tog dana čuvanja. Promijenili su boju u žućkastu i izgubili su pravilan oblik. Okus uzorka A bio je kiseo, uzorka D izrazito kiseo, a u uzorku C se pojavio strani okus.

Senzorska svojstva pokazuju da je dodatkom TG u mliječni proizvod moguće koristiti sirovinu s manjim udjelom mliječne masti i proteina. Prema nekim autorima (Lorenzen i sur., 2002.; Ozer i sur., 2007.), proizvedeni jogurti s 0,1% mliječne masti, uz dodatak enzima TG, po svojoj su teksturi bili slični jogurtima koji su proizvedeni iz punomasnog mlijeka. Nadalje, dodatak TG tijekom proizvodnje sira kvark smanjuje sinerezu grušica u usporedbi sa

sirevima kvark proizvedenim bez dodatka TG (Kuraishi i sur., 1995.). Navedeni primjeri, kao i rezultati prikazani u ovom radu, ukazuju na pozitivan utjecaj dodatka enzima transglutaminaze na fizikalna i senzorska svojstva proizvedenih mliječnih proizvoda.



Slika 7: Senzorska procjena svježeg sira 1. dan (a) i 10. dan (b) nakon proizvodnje

Figure 7: Sensory evaluation of fresh cheese 1st (a) and 10th day (b) after production

Zaključci

Prinos svježeg sira bio je najveći u uzorcima s dodanom transglutaminazom (aktiviranom na 11 °C) i probiotičkom kulturom

Lactobacillus acidophilus LAC-1 (uzorak B).

Broj živih stanica probiotičke kulture *L. acidophilus* LAC-1 tijekom svih 10 dana čuvanja svježeg sira, bio je veći od 10^6 cfu/g što je u skladu s preporukama o broju živih stanica probiotičke kulture po gramu proizvoda. Transglutaminaza pridonosi boljoj konzistenciji i općem izgledu svježeg sira. Dodatak transglutaminaze bitno mijenja strukturu proteina, jer smanjuje sinerezu (izdvajanje sirutke) što je posljedica boljeg zadržavanja vode unutar proteinske mreže svježeg sira.

PRODUCTION OF FRESH PROBIOTIC CHEESE WITH ADDITION OF TRANSGLUTAMINASE

Summary

*The aim of this research was to examine the influence of probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* and enzyme transglutaminase (TG) on quality and sensory properties of autochthonous fresh cheese from Zagreb region. Fresh, unpasteurized, skimmed milk was inoculated with TG at different temperatures and activation time (8 h at 11 °C and 4 h at 25 °C). Inactivation of the enzyme was carried out during the process of pasteurization (65°C/30 min). The milk for fresh cheese production was further inoculated with mesophilic culture of lactic acid bacteria MM101 and probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LAC-1. Besides the trial samples with addition of TG and probiotic bacteria, control samples without addition of TG and probiotic were produced, as well as the samples without addition of TG but with probiotic bacteria addition. Samples of fresh cheese produced with addition of TG, especially in which TG was active at 11 °C, had greater weight than samples produced without the enzyme addition. Therefore, their yield was also greater than yield of cheese produced without the addition of the enzyme. Furthermore, the samples of fresh cheese produced with addition of TG have shown lesser syneresis than other samples during 10 days of storage at 10 °C. The same samples also had the best sensory properties. Metabolic activity of mesophilic culture MM101 and probiotic culture *L. acidophilus* LAC-1 has resulted in better taste and odour of fresh cheese. The viable cell number of probiotic strain *L. acidophilus* LAC-1 in prepared samples was around 5×10^6 cells/g after 10 days of storage at 10 °C, which is higher than the minimal dose required for*

probiotic products. Addition of transglutaminase contributed to better consistency and general appearance of produced fresh cheese.

Keywords: fresh cheese, transglutaminase, probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, sensory properties

Literatura

- BÖNISCH, M. P., LAUBER, S., KULOZIK, U. (2007): Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition. *International Dairy Journal*, 17, 3-11.
- COZZOLINO, A., DI PIERRO, P., MARINIELLO, L., SORRENTINO, A., MASI, P., PORTA, R. (2003): Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 38, 289-295.
- FRECE, J., KOS, B., BEGANOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠUŠKOVIĆ, J. (2005a): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1401-1408.
- FRECE, J., KOS, B., SVETEC, I. K., ZGAGA, Z., MRŠA, V., ŠUŠKOVIĆ, J. (2005b): Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 285-292.
- GUARNER, F., MALAGELADA, J. R. (2003): Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519.
- HAVENAAR, R., HUISIN'T VELD, J. H. J. (1992) Probiotics: A General View. U: *The Lactic Acid Bacteria in health and Disease, Vol. 1*, B. J. W. Wood (ured.), Chapman and Hall, London, 209-221.
- HINZ, K., HUPPERTZ, T., KULOZIK, U., KELLY, A. L. (2007): Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal*, 17, 289-293.
- KLAENHAMMER, T. R., BARRANGOU, R., BUCK, B. L., AZCARATE-PERIL, M. A., ALTERMANN, E. (2005): Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health, Proceedings of the 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, *FEMS Microbiology Review*, 29, 393-409.
- KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOŠIĆ, S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981-987.
- KRŠEV, LJ. (1989.): *Mikrobne kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda*. Udruženje mljekarskih radnika, SRH, Zagreb.
- KRŠEV, LJ., ERI, S., BOROVIĆ, A., TRATNIK, LJ. (1992): Fresh soft cheese produced using concentrated starter culture. *Mljekarstvo*, 42 (4), 281-289.
- KURAIISHI, C., SAKAMOTO, J. (1996): *The usefulness of transglutaminase for food processing*. ACS Symposium Series 637, American Chemical Society.

KURAIISHI, C., SAKAMOTO, J., SOEDA, T (1995): Process for producing cheese using transglutaminase. 15th of May, EP Patent 0711504.

LORENZEN, P. Chr., NEVE, H., MAUTER, A., SCHLIMME, E. (2002): Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.

OZER, B., KIRMACI, H. A., OZTEKIN, S., HAYALOGLU, A., ATAMER, M. (2007): Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.

PRAVILNIK o kakvoći mlijeka, mliječnih proizvoda, sirila i čistih kultura (Službeni list, br. 51/1982.; preuzeto N.N. br. 53/1991.).

PRAVILNIK za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004.). Zavod za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

SANDERS, M. E., HUIS IN'T VELD, J. H. 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, 293-316.

SVENSSON, U. (1999): Industrial perspectives. U: *Probiotics: A Critical Review*, G. W. Tannock (ured.), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 57-64.

ŠUŠKOVIĆ, J. (1996.): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., GORETA, J., MATOŠIĆ, S. (2001): Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 227-235.

ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., MATOŠIĆ, S., BESENDORFER, V. (2000): The effect of bile salts on survival and morphology of potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 673-678.

TRATNIK, LJ. (1998.): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Adrese autora - Author's addresses:

Vinka Radošević, dipl. ing.¹
Katarina Tonković, dipl. ing.²
Dr. sc. Ljerka Gregurek²
Doc. dr. sc. Blaženka Kos³
Prof. dr. sc. Jagoda Šušković³

Prispjelo - Received: 30.01.2007.

Prihvaćeno - Accepted: 26.03.2007.

¹ Ulica Gaje Alage 1, Zagreb

² PROBIOTIK d.o.o., Ulica grada Gospića 3, Zagreb

³ Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Pierottijeva 6, Zagreb