

Utjecaj probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94, inulina i transglutaminaze na svojstva čvrstog jogurta

Maja Benković, Blaženka Kos, Katarina Tonković, Andreja Leboš,
Jagoda Šušković, Ljerka Gregurek

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.146/579.873.13

Sažetak

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94, inulina i transglutaminaze na kvalitetu i senzorska svojstva čvrstog jogurta. Za proizvodnju jogurta korišteno je svježe homogenizirano mlijeko s 3,3% mliječne masti kojemu je, uz jogurtne starter kulture, dodana probiotička kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94, inulin i enzim transglutaminaza, aktiviran 1 h i 30 min. pri 55 °C. Inaktivacija enzima provedena je postupkom pasterizacije 15 min. pri 85 °C. Proizvedeni su i kontrolni uzorci čvrstog jogurta, bez dodatka probiotičke kulture, inulina i transglutaminaze. U radu su određivana fizikalno-kemijska i senzorska svojstva proizvedenih čvrstih jogurta. Radi pouzdane identifikacije probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94, izolira-nog iz proizvedenog jogurta, provedena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) ukupnih staničnih proteina i lančana reakcija polimera-zom (PCR) s početnicama specifičnim za rod *Bifidobacterium*. Proizvedeni čvrsti jogurti s dodanom probiotičkom kulturom, inulinom i transglutami-nazom su bili čvršći i pokazali su manju sinerezu, te su dobili više ocjene senzorskih svojstava u odnosu na kontrolne uzorke jogurta. Broj živih stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94 nakon 28 dana čuvanja bio je viši u uzorcima jogurta koji su sadržavali inulin kao prebiotik. Fermentacija jogurta s inulinom i transglutaminazom je kraće trajala od fermentacije jogurta bez dodatka inulina i transglutaminaze. SDS-poliakrila-midnom gel elektroforezom ukupnih staničnih proteina i lančanom reakcijom polimeraze, primjenom početnica specifičnih za rod *Bifidobacterium*, potvrđena je prisutnost probiotičke kulture u proizvedenom čvrstom jogurtu u visokom broju (više od 10⁶ stanica/mL).

Ključne riječi: čvrsti jogurt, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, inulin, senzorska svojstva, transglutaminaza

Uvod

Jogurt je mliječni proizvod koji se dobiva fermentacijom mlijeka uz dodatak starter kultura *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*. Koristan učinak bakterija mliječne kiseline, unesenih fermentiranim mliječnim proizvodima, na regulaciju mikroflore crijevnog sustava uočio je Metchnikoff još početkom prošlog stoljeća (Metchnikoff, 1907.). Danas su korisni učinci fermentiranih proizvoda i probiotičkih kultura bakterija mliječne kiseline dobro istraženi (Vaughan, 2005.; Frece i sur. 2005.).

Probiotici su jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Havenaar i Huis in't Veld, 1992.; Šušćković, 1996.). Probiotički sojevi uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji su dio prirodne mikroflore u ljudskom probavnom sustavu, a primjenjuju se najčešće u fermentiranim mliječnim proizvodima zbog njihovog povoljnog učinka na zdravlje (Šušćković i sur., 2001.; Akin i sur., 2007.). Radi povećanja broja korisnih bakterija u probavnom sustavu uvode se prebiotici - selektivni izvori ugljika i energije koji korisnim (probiotičkim) bakterijama osiguravaju kompetitivnu prednost pred drugim bakterijama u ovom ekosustavu. Jedan od najčešće primjenjivanih prebiotičkih supstrata je inulin, polisaharid sastavljen od fruktooligosaharida koji se dobiva iz korijena cikorije. Kombinirana primjena probiotičkih bakterija i prebiotičkih supstrata, tzv. sinbiotički koncept, potiče preživljavanje i aktivnost autohtono prisutnih i alohtono unesenih (probiotičkih) bakterija u intestinalnom sustavu (Šušćković i Kos, 2000.; Frece, 2007.).

Enzim transglutaminaza je transferaza koja formira inter- i intramolekularne veze između proteina. Reakcije katalizirane transglutaminazom rezultiraju stvaranjem ϵ -(γ -glutamil) lizin veza (Bönisch i sur., 2007.a). Najviše se primjenjuje u industriji mesa i ribe, a preporučuje se primjena transglutaminaze pri proizvodnji sira, sladoleda i jogurta jer se njezinim djelovanjem proteini iz mlijeka kovalentno vežu inter- i intramolekularno te dolazi do oblikovanja čvršćeg i kompaktnijeg gela (Ozer i sur., 2007.; Radošević i sur., 2007.).

Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94, prebiotika inulina i enzima transglutaminaze na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva proizvedenog čvrstog jogurta.

Materijali i metode

Za proizvodnju čvrstog probiotičkog jogurta korišteno je svježe kravlje mlijeko proizvođača Dukat d.d. s prosječnim udjelom mliječne masti od 3,30% i proteina od 3,52%. Analiza mlijeka (bezmasna suha tvar, proteini, mast i laktoza) provedena je na uređaju «Milcoscan» tip FT 120, a pH-vrijednost pomoću pH metra «Knick» tip 911.

Proizvedeni su uzorci čvrstog jogurta kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1: Proizvedeni uzorci čvrstog jogurta

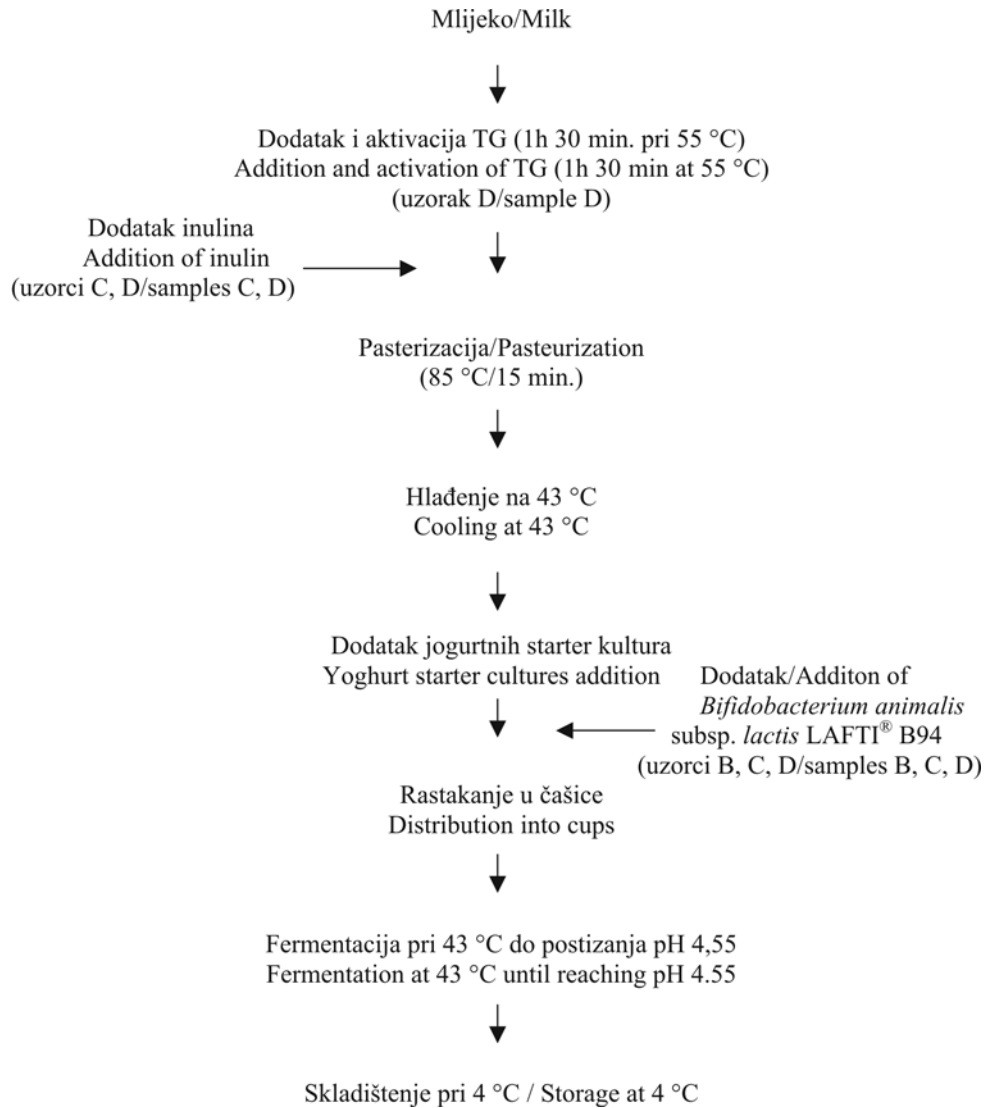
Table 1: Produced set yoghurt samples

Proizvedeni uzorci čvrstog jogurta s dodatkom: Produced set-style yoghurt samples with addition of:	
Uzorak A Sample A	jogurtna starter kultura (kontrolni uzorak) yoghurt starter culture (control sample)
Uzorak B Sample B	jogurtna starter kultura + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94 yoghurt starter culture + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94
Uzorak C Sample C	jogurtna starter kultura + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94 + inulin yoghurt starter culture + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94 + inulin
Uzorak D Sample D	jogurtna starter kultura + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94 + inulin + transglutaminaza yoghurt starter culture + <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> LAFTI® B94 + inulin + transglutaminase

Tehnološki postupak proizvodnje uzoraka čvrstog jogurta A, B C i D prikazan je na slici 1.

Proizvodnja uzoraka A i B čvrstog jogurta započinje pasterizacijom mlijeka pri 85 °C tijekom 15 minuta, a zatim slijedi hlađenje mlijeka na temperaturu inokulacije i fermentacije (43 °C). U mlijeko za proizvodnju uzoraka A i B čvrstog jogurta dodano je 0,12 g/L starter kulture BT10X (*Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) i 0,05 g/L starter kulture 100F (*Streptococcus thermophilus* subsp. *filant*). U uzorak B je, osim jogurtne starter kulture, dodano i 0,031 g/L probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94. Sve bakterijske kulture, proizvođača DSM Food Specialties, Nizozemska, su dubokosmrznute koncentrirane kulture, čuvane pri -45 °C.

Proizvodnja uzoraka C započinje dodatkom 8,87 g/L inulina (Raftiline® - HP), a zatim slijedi pasterizacija mlijeka pri 85 °C tijekom 15 minuta. Nakon toga slijedi hlađenje mlijeka na temperaturu inokulacije i fermentacije (43 °C). U mlijeko su zatim dodane jogurtne (BT10X i 100F) i probiotička starter kultura (LAFTI® B94), kako je već opisano za uzorak B.



Slika 1: Shematski prikaz proizvodnje uzoraka čvrstog jogurta (A, B, C, D) sa i bez dodatka probiotičke kulture, inulina i/ili transglutaminaze (TG)

Figure 1: Diagram of set-style yoghurt production (samples A, B, C, D) with or without probiotic culture, inulin and/or transglutaminase (TG) addition

Proizvodnja uzoraka jogurta D započinje zagrijavanjem mlijeka na 55 °C. Kada je postignuta zadana temperatura, u mlijeko se dodaje 0,33 g/L transglutaminaze ACTIVA[®] YG (Ajinomoto, Njemačka). Pri toj temperaturi tijekom 1h i 30 min. traje aktivacija enzima. Zatim se dodaje inulin (kao i u uzorak C) i slijedi pasterizacija 15 min. pri 85 °C tijekom koje se transglutaminaza inaktivira. Nakon hlađenja do 43 °C dodane su starter kulture BT10X, 100F i probiotik LAFTI[®] B94, kako je već opisano za uzorke B i C.

Tako priređeni uzorci A, B, C i D rastočeni su u čašice i inkubirani pri 43 °C do postizanja pH-vrijednosti 4,55. Nakon završetka fermentacije svi proizvedeni uzorci čvrstog jogurta čuvani su tijekom 28 dana pri +4 °C.

Svaki pokus je ponovljen 3 puta, a rezultati su prikazani kao prosječne srednje vrijednosti. Proizvedeni uzorci čuvani su tijekom 28 dana, tijekom kojih su provedena sljedeća određivanja: pH-vrijednost, sinereza, čvrstoća gela jogurta, senzorska svojstva, broj živih mikroorganizama indirektnom metodom, elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu ukupnih staničnih proteina (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) i lančana reakcija polimerazom (PCR - Polymerase chain reaction). Kiselost uzoraka jogurta mjerena je pH-metrom «Knick» tip 911. Sinereza (izdvojena sirutka iz jogurta) je određena mjerenjem mase izdvojene sirutke iz 35 grama uzorka jogurta tijekom 2 sata pri +4 °C, a preko analitičkog sita promjera pora 0,4 mm (Nielsen, 1995.). Čvrstoća gela jogurta određena je mjerenjem penetracije na penetrometru (Stevens-L.F.R.A. Texture Analyser, CNS, UK). Penetrometar je bio podešen na sljedeće mjerne uvjete: cilindrična sonda 4,90 cm², konstanta brzine penetracije 0,5 mm/s, a sonda je ulazila u uzorak na dubinu 0,5 mm. Senzorska svojstva proizvedenih uzoraka jogurta (izgled, konzistencija, boja, miris i okus) ocijenila je panel grupa od 4 člana koristeći metodu ponderiranih bodova (ISO, 1985.). Za određivanje broja živih probiotičkih bakterija u uzorcima jogurta, priređena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj vodi i naciepljena na Petrijeve zdjelice sa MRS agarom. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C u anaerobnim uvjetima, izbrojane su izrasle kolonije i proračunan je broj živih stanica po mililitru uzorka.

U svrhu identifikacije izoliranih bakterijskih sojeva iz čvrstog jogurta provedena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) ukupnih staničnih proteina (Sánchez i sur., 2003.). Bakterijske stanice, koncentrirane centrifugiranjem pri 9 000 okr./min. i isprane sterilnom otopinom natrijeva klorida (0,9%), resuspendirane su u 100 µL sterilne otopine natrijeva klorida (0,9%) kojoj je dodan 1 g staklenih kuglica. Suspenzija izmiješana na vibromješaču kroz 4 minute, tretirana je s 1 mL otopine SDS-a. Uzorci su

prokuhani 10 min., ohlađeni u ledu i centrifugirani pri 9 000 okr./min. tijekom 15 min. Nakon što je određena koncentracija proteina u supernatantu, provedena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza. U 15 μ L svakog od priređenih uzoraka dodano je 5 μ L reducirajućeg reagensa i prokuhano 2 do 3 min. Nakon kuhanja ukupni volumen uzorka je nanesen na 10 %-tni poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza se provodi u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1 % metilenskom modrilu R-250 s 50 % metanola i 7 % octene kiseline kroz najmanje 3 h. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 7 %-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine. Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze i fenotipske karakterizacije izoliranih bakterijskih sojeva, provedena je i genotipska identifikacija lančanom reakcijom polimeraze (PCR) sa specifičnim početnicama za *Bifidobacterium* vrste: oligo-1 (5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3') i oligo-2 (5'-CGGGTGCTACCCACTTTCATG-3') (Kaufmann i sur., 1997.). Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u DNA-termobloku, Mastercycler personal, «Eppendorf». Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94. Reakcijska smjesa volumena 50 μ L bila je sljedećeg sastava: DNA-kalup (4,0 ng/ μ L), početnice (1 μ M), pufer (10x, 5,0 μ L), deoksiribonukleotid-trifosfati (4 x, 0,2 μ M), Taq polimeraza (jedna jedinica). Prije dodavanja deoksiribonukleotida i Taq polimeraze reakcijska smjesa denaturirana je 1 minutu pri 94 °C, a reakcija je ponovljena 35 puta. Dvolančana DNA denaturirala se 1 minutu pri 94 °C, a sinteza komplementarnih lanaca četiri minute pri 72 °C. Komplementarno sparivanje početnica oligo-1 i oligo-2 s kalupom trajalo je tri minute pri 57 °C. Elektroforeza u kadicama GNA 100 se provodi pri naponu do 70 V oko 3 sata. Nakon provedene elektroforeze gel je 15 do 20 min. inkubiran u otopini etidij-bromida na tamnom mjestu te zatim osvjetljen ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru i fotografiran kroz crveni filter.

Rezultati i rasprava

Funkcionalna hrana je hrana koja sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu (Scientific Concept of Functional Foods in Europe: Consensus Document, 1999.). Koncept funkcionalne hrane prvi put se pojavio u Japanu 80-tih godina 20. stoljeća, pod nazivom «hrana za specifičnu zdravstvenu namjenu» (FOSHU - Food for specified health use).

Najraširenija funkcionalna hrana u Europi su fermentirani mliječni proizvodi s dodatkom probiotika i prebiotika. Vrlo često se kao probiotičke kulture primjenjuju vrste iz roda *Bifidobacterium* jer su te bakterije zastupljene u visokom broju u intestinalnom sustavu zdrave djece i odraslih ljudi (Klijn i sur., 2005.). Stoga je u ovom radu, pri proizvodnji čvrstog jogurta, dodana probiotička kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94. Svježe pasterizirano mlijeko korišteno za proizvodnju uzoraka čvrstog jogurta, po kemijskom sastavu i kiselosti (tablica 2), odgovara zahtjevima za kakvoću mlijeka (Pravilnik, 2000.).

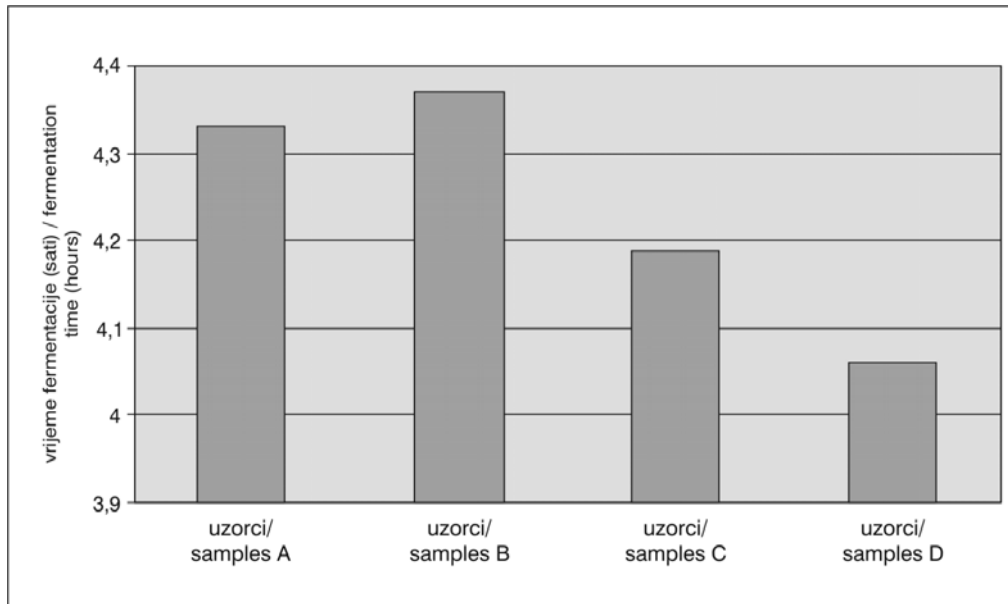
Tablica 2: Kemijski sastav mlijeka korištenog za proizvodnju čvrstog jogurta

Table 2: Chemical composition of milk used for set yoghurt production

Kemijski sastav i kiselost Chemical composition and acidity	Mlijeko Milk
Mliječna mast/Milk fat (%)	3,31
Bjelančevine/Proteins (%)	3,52
Laktoza/Lactose (%)	4,44
Bezmasna suha tvar/Non-fat dry matter (%)	8,66
pH-vrijednost/pH value	6,63

Tijekom proizvodnje čvrstog jogurta praćeno je trajanje fermentacije, a rezultati su prikazani na slici 2. Iz dobivenih podataka vidi se da je vrijeme trajanja fermentacije uzorka D, u koji je dodan enzim transglutaminaza, kraće od vremena trajanja fermentacije ostalih uzoraka bez dodanog enzima. U istraživanjima Lorenzena i sur. (2002.) dodatak transglutaminaze nije utjecao na trajanje fermentacije s jogurtnom kulturom. Međutim, kraće trajanje fermentacije uzoraka C i D u odnosu na kontrolni uzorak bi moglo upućivati na fermentaciju dodatnog izvora ugljika - inulina s dodanom probiotičkom bakterijom. Naime, većina *Bifidobacterium* vrsta raste puno bolje na prebioticima fruktooligosaharidnog tipa, kakav je i inulin, nego na glukozu. To pokazuje da bifidobakterije mogu koristiti neprobavljive ugljikohidrate (prebiotike) u debelom crijevu što im osigurava kompetitivnu prednost pred drugim mikroorganizmima u probavnom sustavu. Zbog selektivne stimulacije rasta bifidobakterija u intestinalnom traktu, ti se neprobavljivi izvori ugljika nazivaju i «bifidogeni faktori». Mnogim kliničkim istraživanjima je dokazano

da dodatak inulina prehrani povećava broj bifidobakterija u fekalnim uzrocima (Tuohy i sur., 2001.; Burns i Rowland, 2004.; Bouhnik i sur., 2007.).

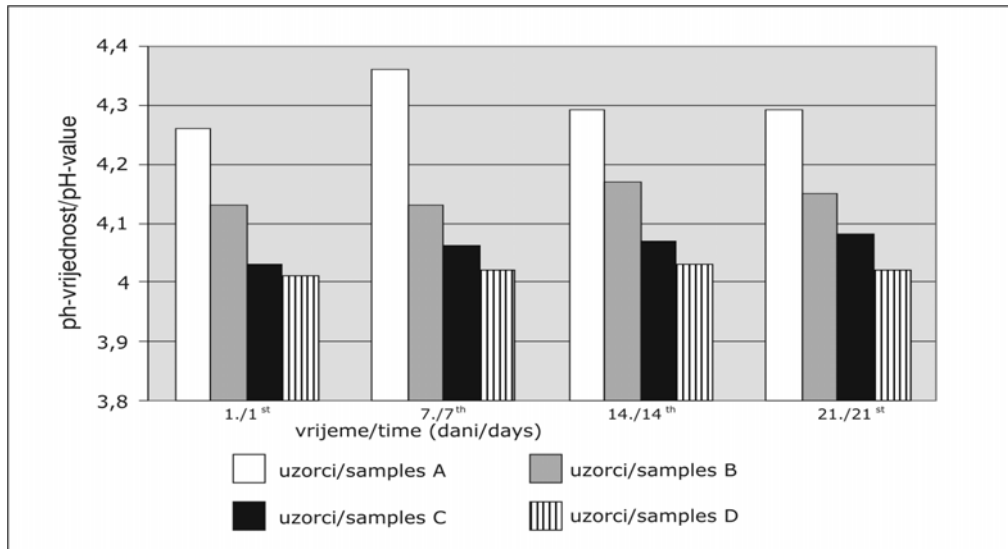


Slika 2: Trajanje fermentacije u različitim uzorcima proizvedenih čvrstih jogurta

Figure 2: Duration of set-style yoghurt fermentation in different samples

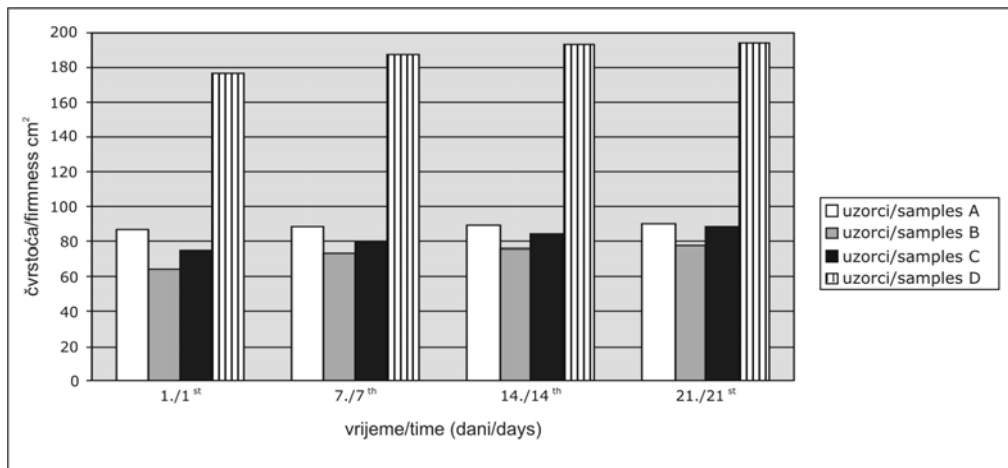
Tijekom 21-dnevnog čuvanja, pH vrijednost uzoraka s dodanim inulinom (C i D) i transglutaminazom (D) je bila nešto niža nego u uzorcima A i B (slika 3). Iz slike 3 je također vidljivo da se pH vrijednost tijekom čuvanja najmanje mijenjala u uzorcima D, a najviše u uzorcima A (kontrolni uzorci). Prethodni rezultati su pokazali da je dodatak transglutaminaze u čvrsti jogurt, proizveden samo s jogurnom starter kulturom, utjecao na snižavanje pH-vrijednosti tijekom 21 dan čuvanja jogurta (Martinović, 2003.).

Čvrstoća gela mjerena je pomoću penetrometra i praćena je tijekom 21 dan čuvanja uzoraka čvrstog jogurta (slika 4). Jogurt s dodanom transglutaminazom imao je veću čvrstoću od ostalih uzoraka. U uzorcima A, B i C, u koje nije dodan enzim transglutaminaza, čvrstoća gela je podjednaka. Tijekom čuvanja dolazi do malog povećanja čvrstoće gela u svim uzorcima.



Slika 3: Promjene pH vrijednosti u uzorcima čvrstog jogurta tijekom 21 dan čuvanja

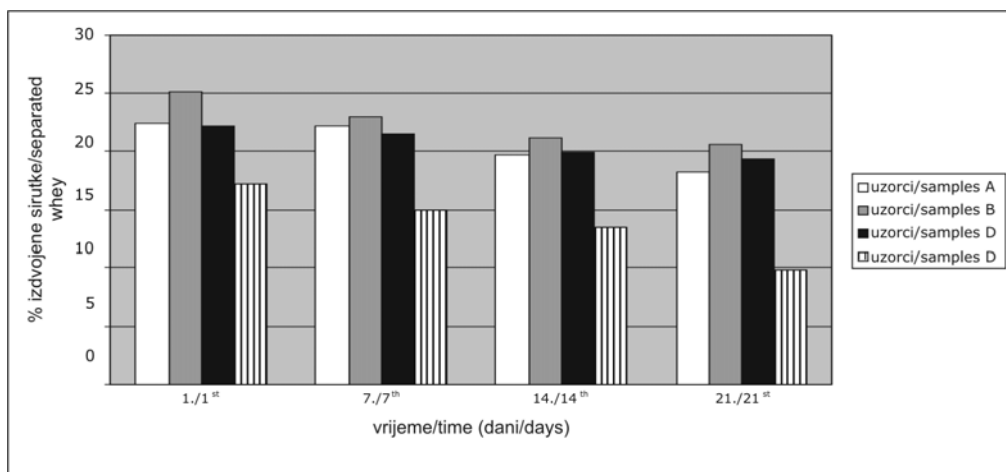
Figure 3: Changes in pH values of set yoghurt samples during 21 days of storage



Slika 4: Promjene čvrstoće gela u uzorcima čvrstog jogurta tijekom 21 dan čuvanja

Figure 4: Gel strength changes of set yoghurt samples during 21 days of storage

Masa izdvojene sirutke također je praćena tijekom 21 dana čuvanja (slika 5). U jogurtu s dodatkom transglutaminaze izmjeren je najmanji postotak izdvojene sirutke, što je u skladu sa rezultatima dobivenim za čvrstoću gela proizvedenih uzoraka jogurta te literaturnim podacima (Bönisch i sur., 2007.a; Bönisch i sur., 2007.b; Ozer i sur., 2007.). Veza ϵ -(γ -glutamil) lizin je kovalentna i termostabilna. Takvo povezivanje kazeinske frakcije, prvenstveno natrijevog kazeinata, omogućuje bolju, kremastiju teksturu i povećanje čvrstoće gela punomasnih i nemasnih jogurta (Lauber i sur., 2000.; Bönisch i sur., 2007.a).

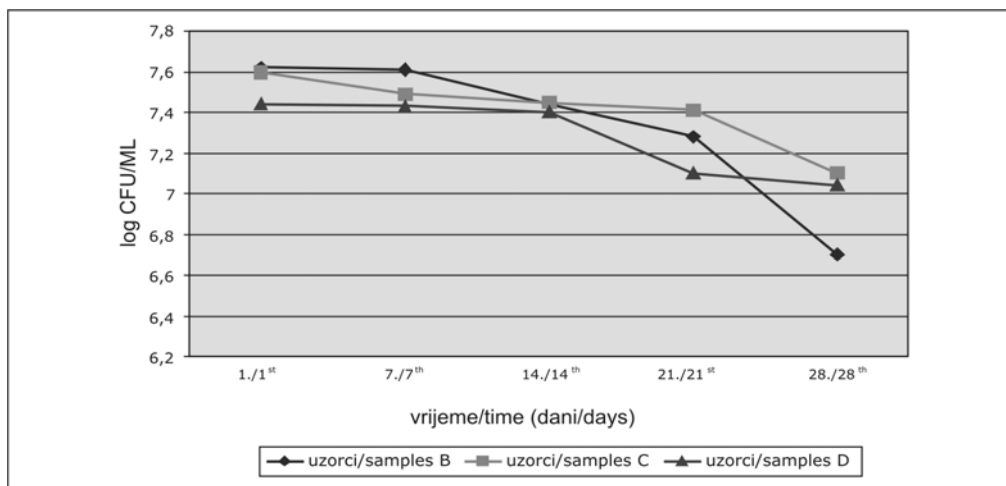


Slika 5: Sinereza (% izdvojene sirutke) u uzorcima čvrstih jogurta tijekom 21 dan čuvanja

Figure 5: Syneresis (% of separated whey) of set-style yoghurt samples during 21 days of storage

Broj živih stanica probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 u svim je proizvedenim uzorcima jogurta tijekom 28 dana čuvanja jogurta bio veći od 10^6 stanica/mL (slika 6), što je u skladu s Codex Alimentarius Standardom za fermentirane proizvode (Codex Alimentarius Commission, 2003.) i preporukama o broju živih stanica probiotičke kulture po gramu proizvoda (Shah, 2007.). Na slici se vidi da je preživljavanje bifidobakterija bolje u uzorcima C i D, u koje je dodan inulin, što potvrđuje prebiotička svojstva inulina. U uzorku B, u koji je uz jogurtu starter kulturu dodana samo probiotička kultura, vidljivo je slabije preživljavanje probiotičkih bakterija nakon 28 dana čuvanja, u odnosu na preživljavanje u ostalim uzorcima. Prema nekim istraživanjima, proteolitička aktivnost starter kulture

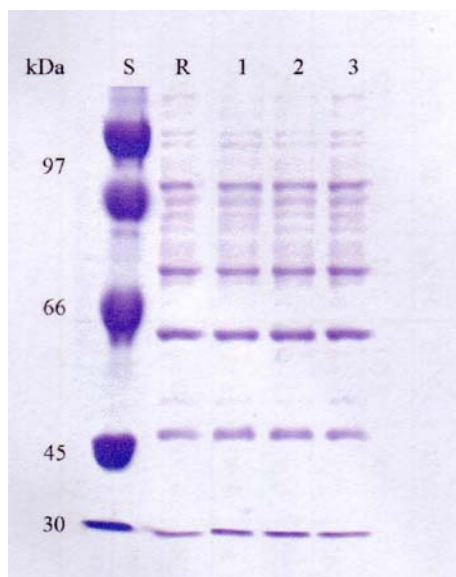
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* tijekom skladištenja, potiče preživljavanje i rast ove bakterije, što rezultira snižavanjem pH-vrijednosti jogurta, a to bi moglo imati utjecaja na preživljavanje *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 (Donkor i sur., 2006.). Radi boljeg preživljavanja probiotičkih bakterija u fermentiranim mliječnim proizvodima i u gastrointestinalnom traktu nakon konzumiranja, sve se više provodi njihova mikroinkapsulacija, najčešće u alginatu, hitozanu, karagenanu, želatini i pektinu. Takvi mikroinkapsulirani probiotički mikroorganizmi ne utječu značajno na izgled, boju, miris i okus, a poboljšavaju konzistenciju jogurta (Kailasapathy, 2006.).



Slika 6: Preživljavanje probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 u uzorcima čvrstog jogurta tijekom 28 dana čuvanja

Figure 6: Viability of probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 in set-style yoghurt samples during 28 days of storage

Identifikacija bakterijskih kolonija, poraslih na MRS pločama naciepljenim uzorcima jogurta B, C i D, provedena je SDS-PAGE elektroforezom i PCR metodom. SDS-PAGE elektroforezom ukupnih staničnih proteina potvrđeno je da su bakterijski sojevi, izolirani u velikom broju iz proizvedenih čvrstih jogurta, probiotički sojevi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 (slika 7). Radi se o fenotipskoj metodi koja se koristi za identifikaciju bakterijskih sojeva na temelju usporedbe sa

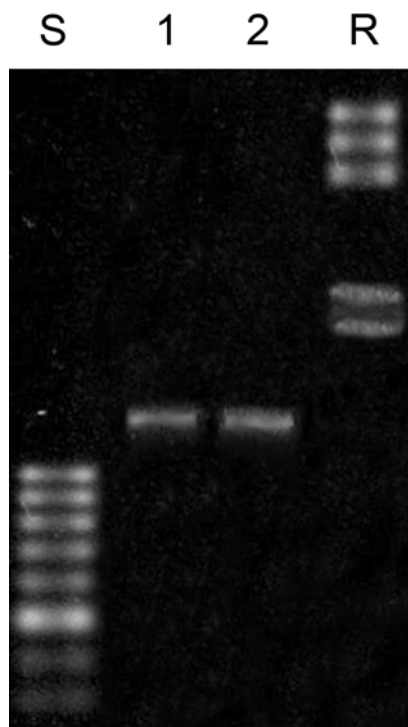


Slika 7: SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI® B94* i bakterijskih izolata iz proizvedenih čvrstih jogurta s dodanim probiotičkim sojem. S - standard, proteini male molekulske mase; R - *Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI® B94*; 1 - bakterijski soj izoliran iz uzorka B; 2 - bakterijski soj izoliran iz uzorka C; 3 - bakterijski soj izoliran iz uzorka D

Figure 7: SDS-PAGE of whole cell protein profiles of bacterial strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI® B94* and bacterial isolates from set yoghurt samples with added probiotic strain. S - low molecular weight protein standards; R - *Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI® B94*; 1 - strain isolated from sample B; 2 - strain isolated from sample C; 3 - strain isolated from sample D

standardnim (referentnim) vrstama. Uz ovu, fenotipsku identifikaciju, razvijene su i mnoge genotipske metode koje se u pravilu zasnivaju na usporedbi duljine fragmenata DNA pomoću gel elektroforeze, kao npr: lančana reakcija polimerazom (PCR - Polymerase chain reaction), analiza

polimorfizama pomoću restriksijskih fragmenata (RFLP - Restriction fragment length polymorphism), elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE - Puls field gel electrophoresis), i posebno, analiza gena koji kodiraju za ulomak RNA (rDNA)(Ribotyping). Mnoge od ovih brzih tehnika osiguravaju informaciju o razlikama među bakterijskim vrstama, čak i unutar istog roda te se primjenjuju za identifikaciju bakterija (Frece, 2007.). Stoga je u ovom radu provedena identifikacija soja *Bifidobacterium* lančanom reakcijom polimeraze (PCR) sa specifičnim parom početnica za bakterijske vrste roda *Bifidobacterium* (slika 8).



Slika 8: PCR produkti dobiveni sa specifičnim parom početnica za *Bifidobacterium* vrste. S - standard 1 kb; 1 - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94; 2 - bakterijski soj izoliran iz uzorka D; R - standard λ -HindIII

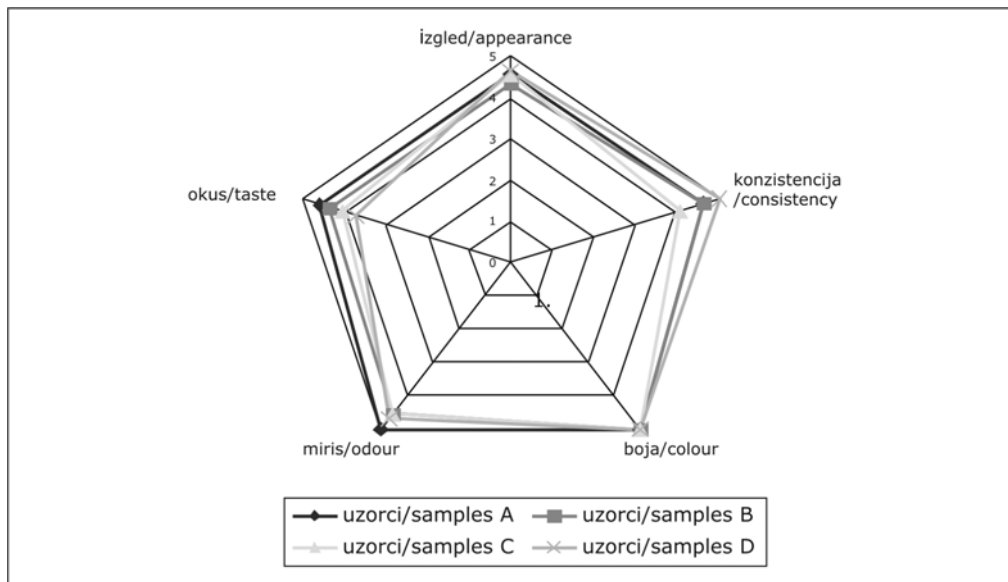
Figure 8: PCR fragments obtained by *Bifidobacterium* specific primer pair. S - standard 1 kb; 1 - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94; 2 - strain isolated from sample D; R - standard λ -HindIII

Naime, mnoge probiotičke kulture koje se nalaze u proizvodima različitih proizvođača nisu ispravno deklarirane, a molekularnim metodama rješavaju se ti problemi i jamči sigurnost kvalitete probiotičkih proizvoda (Kos i sur., 2007.; Mayer i sur., 2007.). Fragmenti DNA dobiveni PCR-om za bakterijske kolonije izolirane iz jogurta odgovaraju fragmentima DNA čiste kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94 čime je potvrđena prisutnost probiotičkog soja u visokom broju u proizvedenim čvrstim jogurtima (slika 8).

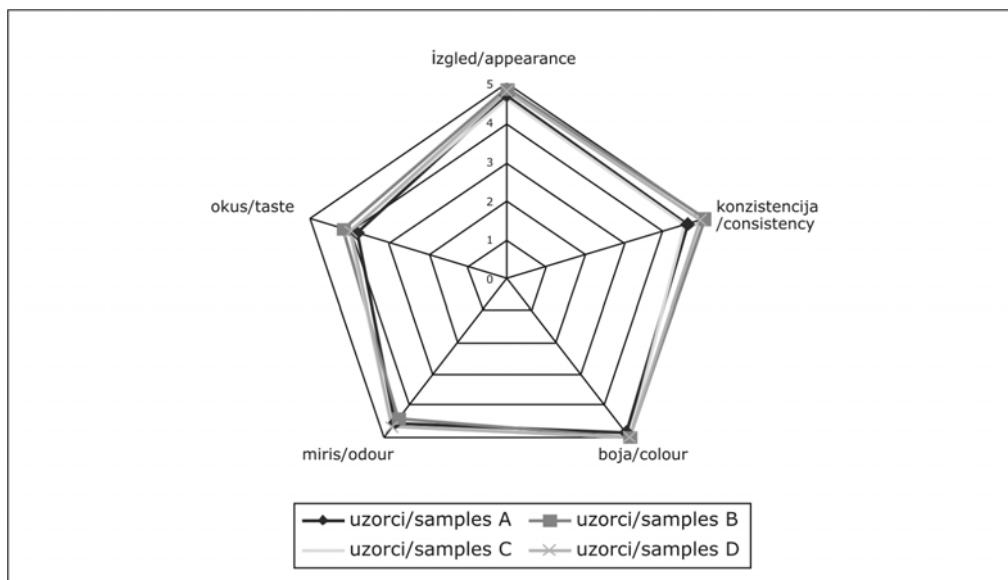
Rezultati senzorskih ocjena proizvedenih čvrstih jogurta prikazani su na slici 9. Ocjenjivanje je provela panel grupa od 4 ocjenjivača, a ocijenjeni su svi uzorci 1., 7., 14. i 21. dan čuvanja proizvedenih jogurta. Uzorci čvrstog jogurta D tijekom čuvanja su pokazali vrlo stabilnu kvalitetu: boja jogurta nije se promijenila i bila je intenzivno bijela, a površina sjajnija od površine ostalih uzoraka, što nije bio slučaj sa uzorcima jogurta A, B i C. Prema Lorenzenu i sur. (2002.) uzorci jogurta s dodanom transglutaminazom imaju glatkiju, sjajniju i površinu intenzivnije bijele boje u odnosu na uzorke jogurta bez dodatka transglutaminaze, jer je proteinska struktura jogurta s dodanom transglutaminazom čvršća i time bolje reflektira svjetlo na površini. Uzorci D uglavnom su dobili više ocjene vezane za izgled, boju i konzistenciju proizvoda, dok se ocjene vezane uz miris i okus ne razlikuju bitno od uzoraka bez dodatka transglutaminaze. Analizom rezultata senzorskih svojstava jogurta B utvrđeno je da dodatak bifidobakterija bitno ne utječe na boju, okus i miris, ali su ti uzorci jogurta dobili niže ocjene za opći izgled i konzistenciju, jer je na površini uzoraka jogurta bilo izdvojene sirutke i pjene, koja je nepoželjna za opću ocjenu izgleda kod ocjenjivanja uzoraka jogurta. Prema Tratnik (1998.), fermentirani mliječni proizvodi proizvedeni samo sa dodatkom bifidobakterija, a bez dodane jogurtne starter kulture, imaju slabo izraženu kiselost i aromu koja odbija potrošača. Uzorci C, u koje je bio dodan inulin, nisu imali zamjetno bolji okus, iako su istraživanja Kip i sur. (2006.) pokazala da inulin poboljšava okus i daje kremastu teksturu proizvodu.

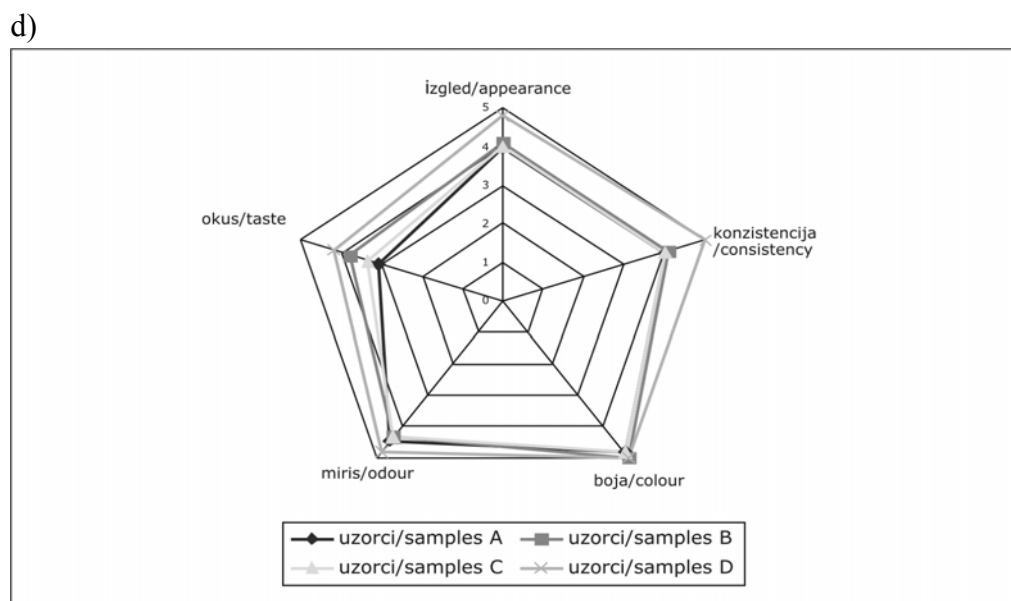
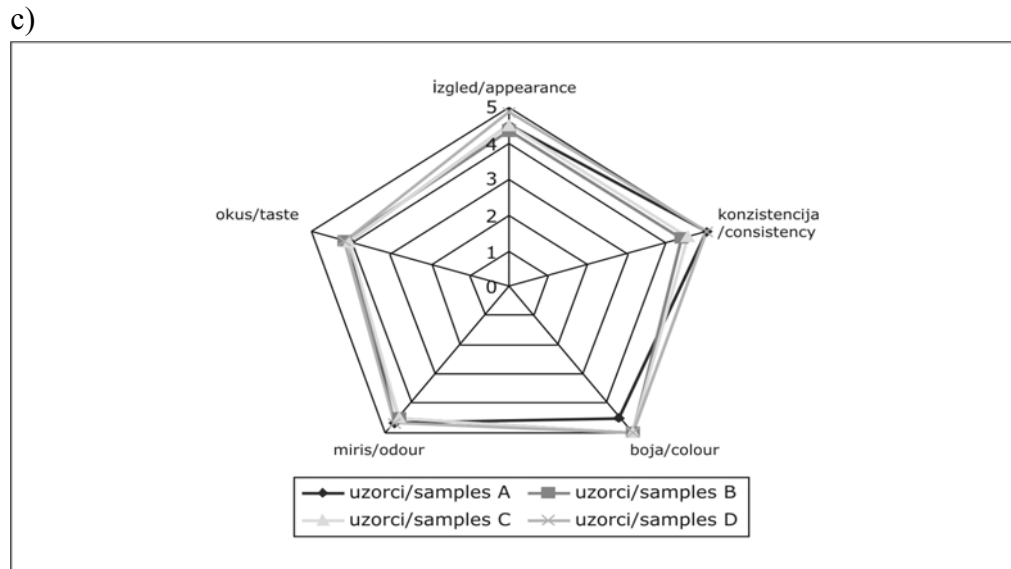
Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na pozitivan utjecaj inulina na preživljavanje probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI® B94 te pozitivan utjecaj transglutaminaze na povećanje čvrstoće, smanjenje sinereze i poboljšanje konzistencije i općeg izgleda jogurta.

a)



b)





Slika 9: Senzorska procjena uzoraka čvrstog jogurta 1. (a), 7. (b), 14. (c) i 21. dan (d) nakon proizvodnje

Figure 9: Sensory evaluation of set-style yoghurt samples on 1st (a), 7th (b), 14th (c) and 21st day (d) after production

Zaključci

Dodatak transglutaminaze u mlijeko bitno mijenja njegovu proteinsku strukturu, što povećava čvrstoću i smanjuje sinerezu zbog većeg zadržavanja vode unutar proteinske mreže jogurta. Dodatak transglutaminaze i inulina skraćuje trajanje fermentacije čvrstog jogurta. Dodatak inulina poboljšao je preživljavanje probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94, dok dodatak transglutaminaze nije utjecao na preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom čuvanja jogurta. Visok broj živih stanica probiotičkog soja održao se i nakon 28 dana čuvanja pri +4 °C. Prema tome, proizvedeni čvrsti jogurti s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] probiotički su proizvodi jer sadrže više od 10⁶ probiotičkih stanica/mL. Fenotipska i genotipska identifikacija probiotičkog soja uspješno je provedena SDS-PAGE i PCR metodom. Nakon 21 dan čuvanja proizvedenih uzoraka čvrstog jogurta najbolja senzorska svojstva zadržao je jogurt s dodatkom probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94, inulina i transglutaminaze.

INFLUENCE OF PROBIOTIC STRAIN BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SUBSP. LACTIS LAFTI[®] B94, INULIN AND TRANSGLUTAMINASE ON THE PROPERTIES OF SET- STYLE YOGHURT

Summary

The aim of this research was to examine the influence of probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI[®] B94, inulin and transglutaminase on quality and sensory properties of set-style yoghurt. Fresh, homogenized milk with 3,3% of milk fat was used for yoghurt production, with addition of Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI[®] B94, inulin and transglutaminase activated during 1h 30 min at 55 °C. Enzyme inactivation was carried out by pasteurization of milk during 15 minutes at 85 °C. Control samples were prepared without addition of probiotic culture, inulin and transglutaminase. Physico-chemical parameters and sensory properties of produced set-style yoghurt have been determined. For reliable identification of probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis LAFTI[®] B94, isolated from the produced yoghurt, SDS-PAGE of whole cell proteins and PCR with species specific primers for Bifidobacterium were carried out. It has

been shown that produced set-style yoghurt with probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94, inulin and transglutaminase had higher firmness, less syneresis and better sensory properties than control yoghurt samples. After 28 days of storage the viable count of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LAFTI[®] B94 was higher in samples containing inulin as prebiotic. Fermentation of yoghurt samples containing inulin and transglutaminase lasted shorter than fermentation of samples without inulin and transglutaminase. The presence of high number of probiotic culture (more than 10^6 cells/mL) in produced set yoghurts was confirmed by SDS-PAGE of whole cell proteins and PCR with species specific primers for *Bifidobacterium*.

Key words: Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*, inulin, sensory properties, set-style yoghurt, transglutaminase

Literatura

- AKIN, M. B., AKIN, M. S., KIRMACI, Z. (2007): Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream, *Food Chemistry*, 104, 93-99.
- BÖNISCH, M. P., HUSS, M., WEITL, K., KULOZIK, U. (2007a): Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt properties, *International Dairy Journal*, 17, 1360-1371.
- BÖNISCH, M. P., HUSS, M., LAUBER, S., KULOZIK, U. (2007b): Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation, *Food Hydrocolloids*, 21, 585-595.
- BOUHNİK, Y., RASKINE, I., CHAMPION, K., ANDIEUX, C., PENVEN, S., JACOBS, H., SIMONEAU, G. (2007): Prolonged administration of low dose inulin stimulates the growth of bifidobacteria in humans. *Nutrition Research*, 27, 187-193.
- BURNS, A. J., ROWLAND, I. R. (2004): Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551, 233-243.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2003): CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf, pristupljeno 10.03.2008.
- DONKOR, O. N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIĆ, T., SHAH, N. P. (2006): Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189.

FRECE J. (2007): Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

FRECE, J., KOS, B., BEGANOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠUŠKOVIĆ, J. (2005): *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1401-1408.

HAVENAAR, R., HUIS IN'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, str. 209-221.

ISO (TC 34) SC 12 (Secretariat - 139) E (1985): «Sensory analysis» DC.

KAILASAPATHY, K. (2006): Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 1221-1227.

KAUFMANN, P., PFEFFERKORN, A., TEUBER, M., MEILE, L. (1997): Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1268-1273.

KIP, P., MEYER, D., JELLEMA, R. H. (2006) Inulins improve sensory and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16, 1098-1103.

KLIJN, A., MERCENIER, A., ARIGONI, F. (2005): Lessons from the genomes of bifidobacteria. U: Proceedings of the 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Elsevier B.V., Amsterdam, *FEMS Microbiology Reviews*, 76, str. 491-510.

KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., BEGANOVIĆ, J., GJURAČIĆ, K., FRECE, J., IANNACCONE, C., CANGANELLA, F. (2007): Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Published online 20 August 2007. (DOI 10.1007/s11274-007-9528-y).

LAUBER, S., HENLE, T., KLOSTERMEYER, H. (2000): Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210, 305-309.

LORENZEN, P. C., NEVE, H., MAUTER, A., SHLIMME, 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.

MARTINOVIĆ, R. (2003): Utjecaj enzima transglutaminaze na svojstva jogurta, diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

MAYER, H. K., AMTMANN, E., PHILIPPI, E., STEINEGGER, G., MAYRHOFER, S., KNEIFEL, W. (2007): Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strain and commercial probiotic strains, *International Dairy Journal*, 17, 565-573.

- METCHNIKOFF, E. (1907): The Prolongation of Life. Heinemann, London.
- NIELSEN, P. M. (1995): Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9, 119-156.
- OZER B., KIRMACI, H. A., OZTEKIN, S., HAYALOGLU, A., ATAMER, M. (2007): Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yoghurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- PRAVILNIK o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/2000).
- RADOŠEVIĆ, V., TONKOVIĆ, K., GREGUREK, LJ., KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J. (2007): Proizvodnja svježeg probiotičkog sira s dodatkom transglutaminaze. *Mljekarstvo*, 57, 15-29.
- SÁNCHEZ, I., SESENA, S., PALOP, L. (2003): Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of «Almagro» eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 181-189.
- SCIENTIFIC CONCEPTS OF FUNCTIONAL FOODS IN EUROPE: CONSENSUS DOCUMENT (1999): *British Journal of Nutrition*, 81 (1): S1-S27.
- SHAH, N. P. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
- ŠUŠKOVIĆ, J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B. (2000): Probiotici i prebiotici, Interna skripta, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.
- TRATNIK, LJ. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- TUOHY, K. M., FINLAY, R. K., WYNNE, A. G., GIBSON, G. R. (2001): A human volunteer study on the prebiotic effects on HP-inulin - faecal bacteria enumerated using fluorescent in situ hybridisation (FISCH). *Anaerobe*, 7, 113-118.
- VAUGHAN, E. E. (2005): Molecular approaches to study the role of lactic acid bacteria in gut health. U: *Food fermentation*, R.M.J. Nout, W. M. de Vos, M. H. Zwietering (ured.), Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, str. 79-86.

Zahvala

Autori zahvaljuju za financijsku potporu Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, u okviru programa EUREKA (Projekt «Development of Probiotic Yoghurt Technology with Improved Yoghurt Characteristics» E13488-EUROAGRI +DEPROYOG).

Adrese autora - Author's addresses:

Maja Benković, dipl. ing.¹

Doc. dr. sc. Blaženka Kos²

Katarina Tonković, dipl. ing.³

Andreja Leboš, dipl. ing.²

Prof. dr. sc. Jagoda Šušković²

Dr. sc. Ljerka Gregurek³

¹Nikole Tesle 10a, Čakovec

²Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Pierottijeva 6, Zagreb

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

Prispjelo - Received: 19. 02. 2008.

Prihvaćeno - Accepted: 11. 04. 2008.