

IZDELAVA PROBIOTIČNEGA SIRA Z DODATKOM *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) IN K7(Rif^r)

Bogdan PERKO ^{a)}, Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIĆ ^{b)} in Irena ROGELJ ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, doc. dr.

^{b)} Prav tam, dr., mag.

^{c)} Prav tam, izr. prof., dr., e-pošta: irena.rogelj@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 19. marca 2002, sprejeto 14. avgusta 2002.

Received March 19, 2002, accepted August 14, 2002.

IZVLEČEK

Lactobacillus gasseri LF221 in K7 sta humana izolata, ki proizvajata bakteriocine s širokim spektrom protimikrobne aktivnosti, sta odporna proti nizkim pH vrednostim in žolču, prezivita v prebavnem traktu miši in pujskov in s tem izpolnjujeta osnovne kriterije za probiotični sev. Proučevali smo možnost izdelave sira z dodatkom sevov LF221 ali K7 in njuno obstojnost med procesom zorenja sira. V raziskavi smo uporabili deriveate *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) in K7(Rif^r) rezistentne proti rifampicinu ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$). V eksperimentalni sirarni smo izdelovali poltrdi sir iz 80 L mleka. Mleko za sir smo cepili samo z živimi celicami LF221(Rif^r) ali K7(Rif^r) (približno 10^7 ml^{-1} mleka za sir) ali pa v kombinaciji s startersko kulturo *Streptococcus thermophilus* TH-4. Startersko kulturo TH-4 smo uporabili za pospešitev acidifikacije med sirjenjem in stiskanjem sirov. Med šest tedenskim zorenjem smo tedensko aseptično jemali vzorce sira in v g sira ugotavljal število kolonijskih enot (KE) laktobacilov (Rogosa), streptokokov (Chalmer), koliformnih bakterij (VRB) in celic LF221(Rif^r) in K7(Rif^r) (MRS+rifampicin). Za potrditev sevov LF221 in K7 smo uporabili RAPD analizo in oligonukleotidni začetnik 5' AGTCAGGCCAC 3'. Oba humana izolata počasi rasteta v mleku in ju ne moremo uporabiti kot samostojni starterski kulturi. Z dodatkom starterske kulture TH-4 smo izdelali probiotični sir dobrih senzoričnih lastnosti. Humana izolata nista vplivala na število streptokokov v siru. Medtem, ko se je v kontrolnem siru brez dodanih probiotičnih bakterij število nestarterskih laktobacilov med zorenjem povečevalo, sta v siru z dodanimi probiotičnimi bakterijami prevladovala seva LF221(Rif^r) in K7(Rif^r). Kolonije, zrasle na MRS agarju z rifampicinom smo z RAPD analizo uspešno potrdili kot seva LF221 in K7. Na koncu 6-tedenskega zorenja so siri vsebovali približno 10^8 KE g^{-1} probiotičnih bakterij.

Ključne besede: mlečni izdelki / siri / probiotiki / mikrobiologija / *Lactobacillus gasseri* / tehnologija

PRODUCTION OF PROBIOTIC CHEESE WITH ADDITION OF *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) AND K7(Rif^r)

ABSTRACT

Lactobacillus gasseri LF221 and K7 are human isolates which produce bacteriocins with wide range of inhibition, are resistant to low pH-values and bile, survive in the gastrointestinal tract of mice and pigs, and as such fulfil the basic criteria for probiotic strain. The possibility of cheese production with addition of LF221 or K7 and their survival during cheese ripening was studied. The derivatives of *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) strains resistant to rifampicin ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) were used in the experiments. A semi-hard cheese was produced in an experimental dairy from 80 L of milk. Cheese milk was inoculated with live LF221(Rif^r) or K7(Rif^r) cells (approximately 10^7 ml^{-1} of cheese milk) alone or in combination with starter culture *Streptococcus thermophilus* TH-4. TH-4 was used in order to speed up the acidification

during the cheesemaking and pressing of cheeses. During the ripening for six weeks, cheese samples were weekly aseptically collected and analysed. The microbiological analyses were performed by standard plate count on Rogosa agar for lactobacilli, on Chalmer for streptococci, on VRB for koliforms and on MRS agar with $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ of rifampicin for selective enumeration of the strains LF221(Rif^r) and K7(Rif^r). For the confirmation of LF221 and K7 strains the RAPD analysis was performed with the primer 5' AGTCAGCCAC 3'. Both human isolates grow slowly in milk therefore they can not be used as the only starter culture for cheese production. With the addition of TH-4 culture the probiotic cheeses of good organoleptic properties were produced. No adverse effect of human isolates on streptococcal population was observed. While in the cheeses without added probiotic strains, the number of non-starter lactobacilli increased during the ripening, the strains LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) prevailed in cheeses where added. The colonies grown on MRS agar with rifampicin were successfully confirmed by RAPD analysis as K7 or LF221 strain. After six weeks of ripening the number of probiotic bacteria was still approximately 10^8 cfu g^{-1} of cheese.

Key words: milk products / cheese / probiotics / microbiology / *Lactobacillus gasseri* / technology

UVOD

V sodobni prehrani postaja vse pomembnejša funkcionalna hrana, ki po definiciji oskrbuje organizem z osnovnimi hranili, prispeva k boljšemu in učinkovitejšemu delovanju organizma ter sodeluje v preventivi ali celo pri zdravljenju bolezni (Roberfroid, 1996; Pariza, 1999). Prva generacija funkcionalne hrane je vključevala izdelke, obogatene z različnimi snovmi kot so kalcij, vitamini, antioksidanti, v zadnjem času pa so raziskave usmerjene v izdelke, ki učinkujejo na sestavo in aktivnost mikroflore prebavnega trakta. V tej kategoriji izdelkov imajo probiotiki vodilno vlogo, saj je že po definiciji njihovo ciljno mesto mikroflora prebavnega trakta. Lahko trdimo, da osnovni koncept probiotikov, ki se je začel oblikovati v začetku 20. stoletja, velja še danes s to razliko, da je nekoč slonel na predvidevanjih, danes pa na znanstveno potrjenih dejstvih in dokazanih fizioloških učinkih.

Ne glede na to ali se uporablajo probiotiki kot prehranski dodatki ali zdravila, morajo izpolnjevati osnovne selekcijske kriterije, ki vključujejo natančno taksonomsko klasifikacijo, dokazano učinkovitost na ciljnem mestu v prebavnem traktu in varnost. Sev, ki ga želimo uporabiti kot prehranski dodatek, mora poleg naštetih izpolniti tudi tehnološke kriterije. Med te sodijo primernost za gojenje, obstojnost med tehnološkimi postopki, obstojnost med skladiščenjem in distribucijo živila. Dodatek probiotičnega seva ne sme negativno vplivati na senzorične lastnosti izdelka (Collins in sod., 1998; Mattila-Sandholm in sod., 1999; Klaenhammer in Kullen, 1999; Saarela in sod., 2000; Heller, 2001; Tuomola in sod., 2001).

Številne raziskave so bile v zadnjem času namenjene proučevanju možnosti vključevanja probiotičnih bakterij v hrano. Najpogosteje so dodane fermentiranim mlečnim izdelkom in otroškim formulam (Kok in sod., 1996; Schillinger, 1999), kar je razumljivo, saj so fermentirani mlečni izdelki naravna ekološka niša mlečno kislinskih bakterij, mleko pa pomemben dejavnik pri oblikovanju normalne črevesne mikroflore novorojenca (Salminen in sod., 1998). Zanimiv prenašalec probiotičnih bakterij postaja tudi sir, saj jih učinkovito zaščiti na poti do črevesa (Gomes in sod., 1995; Gardiner in sod., 1998, 1999; Stanton in sod., 1998; Gobbetti in sod., 1998; Daigle in sod., 1999).

Seva *Lactobacillus gasseri* LF221(prvotno identificiran kot *L. acidophilus*) in K7 sta humana izolata, odporna proti nizkim vrednostim pH in žolču, proizvajata bakteriocine s širokim spektrom protimikrobne aktivnosti, prezivita prehod do črevesa miši in/ali pujskov, spadata v skupino GRAS bakterij in kot tako izpolnjujeta osnovne kriterije za probiotike (Bogovič Matijašić in sod., 1998; Bogovič Matijašić in Rogelj; 1999, 2000; Rogelj in sod., 2002a). Zanimalo nas je, ali ju je možno vključiti v sir, kakšne so njune tehnološke lastnosti, ali ostaneta v zadostnem številu živa v zrelem siru in ali učinkujeta na ostalo mikrofloro sira.

MATERIAL IN METODE

Bakterijski sevi in kultivacija

Seva *Lactobacillus gasseri* LF221 in K7 sta izolata iz blata dojenčkov (Bogovič Matijašić, 1997; Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000), *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) in K7(Rif^r) pa njuna derivata, rezistentna proti rifampicinu ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$), pridobljena v našem laboratoriju. Kultivirali smo jih v MRS bujonu (Merk, Nemčija) pri 37°C . *Streptococcus thermophilus* TH-4 (Christian Hansen, Danska) smo uporabili kot podporno startersko kulturo pri izdelavi sira. Ker je v DVS obliki, smo jo dodajali direktno v mleko za sir.

Izdelava sira in vzorčenje

Sir smo izdelovali v eksperimentalni sirarni iz 80-tih L mleka. Mleko smo termizirali pri 65°C za 30 min. Po hitrem hlajenju na 32°C smo mleku dodali izbrano kombinacijo podporne starterske kulture TH-4 (1,6 g) in derivata probiotičnega seva v količini, da je bilo število živih celic derivata v ml mleka za sir okoli 10^7 . Kombinacije so bile sledeče: sir A (kontrolni) - TH-4, sir B - LF221(Rif^r), sir C - K7(Rif^r), sir D - TH-4 + LF221(Rif^r) in sir E - TH-4 + K7(Rif^r). Tako pripravljenemu mleku smo dodali kimozin Maxiren® (Gist-Brocades, Nizozemska) v takšni količini, da je mleko koaguliralo v 30-tih min. Koagulum smo razrezali do zrn velikosti 0,5 cm, sirno zrno dogreli do temperature 42°C in ga pri tej temperaturi sušili do ustrezne klenosti. Po potrebi smo sirno zrno spirali tako, da smo 50 % sirotke zamenjali s toplo vodo. Po oblikovanju in stiskanju sirnine smo sire solili 16 h v slanici ($20\%, \text{wt vol}^{-1}$), nato so siri zoreli dva meseca pri temperaturi 15°C . Kontrolni sir smo naredili samo z dodatkom 1,6 g starterske kulture TH-4 po enakem postopku. Vzorce sira smo jemali sterilno takoj po soljenju in nato tedensko do konca zorenja. Vzorčili smo s sterilnim sirarskim svedrom tako, da smo odvzeli vzorec od skorje do sredine sira. Vzorce sira smo raztopili v 2-odstotni (wt vol^{-1}) raztopini Na-citrata (Kemika, Hrvaška) in razredčevali v $\frac{1}{4}$ Ringerjevi raztopini (Merck, Nemčija).

Analize

Vrednost pH sirov smo merili s pH metrom Mettler Toledo MP120 (Mettler, Nemčija), s kombinirano vbodno elektrodo (Inlab 427) pred stiskanjem, med in po stiskanju ter tedensko med zorenjem.

V vzorcih sira smo s standardno metodo štetja kolonijskih enot (KE) ugotavljali število laktobacilov na agarju Rogosa (Merck, Nemčija) pri 37°C , laktolitičnih streptokokov na agarju Chalmer (Catteau, 1982) pri 42°C , koliformnih bakterij na agarju VRB (Merck, Nemčija) pri 30°C in proti rifampicinu rezistentnih sevov LF221(Rif^r) ter K7(Rif^r) na gojišču MRS (Merck, Nemčija) z rifampicinom ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$; Sigma-Aldrich, Nemčija) pri 37°C . Mikraerofilne pogoje za gojenje laktobacilov smo zagotovili z uporabo anaerobnih loncev in Generbox sistema (Bio-Mérieux, Francija).

Analiza kolonij zraslih na MRS z rifampicinom

Analizo DNA naključno izbranih kolonij s trdnega gojišča MRS z rifampicinom smo opravili z metodo RAPD, pri čemer smo uporabili isti protokol in oligonukleotidni začetnik (5' AGTCAGCCAC 3') kot Tynkkynen in sod. (1999).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Prilagajanje tehnološkega postopka

Za izdelavo poltrdih in trdih sirov navadno uporabljamo starterske kulture, ki so sposobne relativno hitre acidifikacije med stiskanjem sira. Hitra acidifikacija preprečuje razvoj tehnoloških kvarljivcev in vpliva na potek encimskih reakcij ter posledično na oblikovanje senzoričnih lastnosti sira med zorenjem. Istočasno je nezaželena naknadna acidifikacija, ki preprečuje zorenje sira.

Seva LF221 in K7, tako kot večina humanih izolatov, zelo počasi rasteta v mleku. Enako velja za njuna derivata. To se je odrazilo na zelo počasni acidifikaciji med stiskanjem sira, v primerjavi s kontrolnim sirom (Pregl. 1), saj je bilo za padec pH vrednosti do 5,3, kar zahteva tehnološki postopek, potrebnih kar 66 (LF221) oziroma 35 (K7) ur.

Preglednica 1. Padec vrednosti pH sirov med stiskanjem

Table 1. The drop of pH values of cheeses during pressing

Sir Cheese	Dodana kultura Added culture	Začetna pH vrednost Initial pH value	Končna pH vrednost Final pH value	Čas, ure* Time, Hours
A	TH-4	6,60	5,30	2
B	LF221(Rif ^r)	6,60	5,30	66
C	K7(Rif ^r)	6,50	5,34	35
D	TH-4 + LF221(Rif ^r)	6,56	5,32	5
E	TH-4 + K7(Rif ^r)	6,40	5,31	4

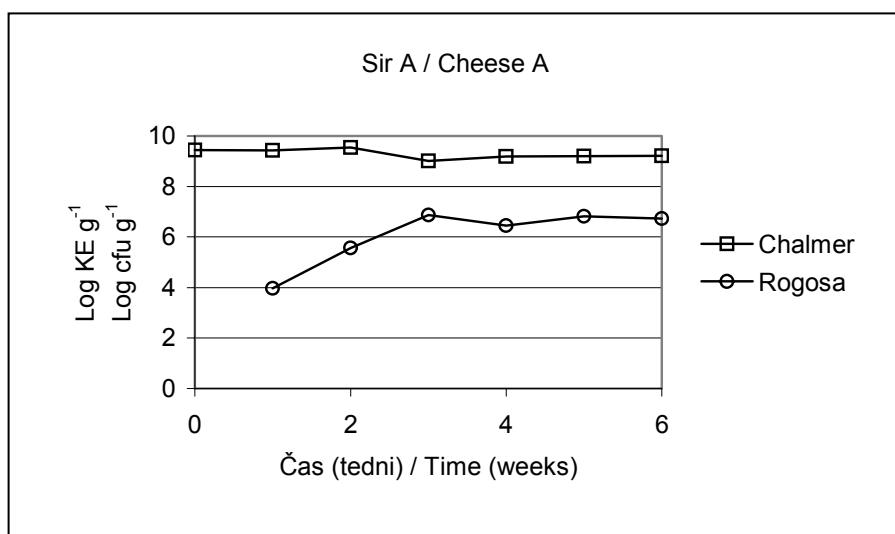
* = Čas stiskanja, potreben za padec pH vrednosti sira do približno 5,3 / Time of pressing needed to drop the pH value of cheeses approximately on 5,3

Rast humanih izolatov v mleku lahko pospešimo z dodatkom rastnih faktorjev, vendar je bolj priporočljiv dodatek tako imenovane podporne kulture (Saxelin in sod., 1999), ki je navadno tipična mlekarska starterska kultura. Pomembno je, da podpora kultura ne deluje zaviralno proti probiotičnemu sevu ali obratno. Dodatek podporne kulture *Streptococcus thermophilus* TH-4 je zagotovil normalno acidifikacijo med sirjenjem in stiskanjem sira (Preglednica 1), vendar pa je prišlo v kombinaciji s sevom LF221 do naknadne acidifikacije med zorenjem sirov, kar je negativno vplivalo na potek zorenja in senzorične lastnosti (Rogelj in sod., 2002b). Siri so bili kisli, sirno testo pa kredasto in drobljivo. Zorenje sirov pri nižjih temperaturah ni preprečilo naknadne acidifikacije, zato smo zmanjšali dodatek podporne starterske kulture za 50 % (0,8 g/80 L) in spirali sirno zrno tako, da smo 50 % sirotke po dogrevanju sirnega zrna zamenjali s toplo vodo. Vrednost pH probiotičnega sira (LF221), narejenega po modificiranem postopku, se je med zorenjem gibala v mejah vrednosti pH kontrolnega sira. Pri izdelavi probiotičnega sira z dodatkom seva K7 takšna modifikacija ni bila potrebna. Kar številne probiotične bakterije so že uspešno dodali različnim sirom, v večini primerov brez večjega poseganja v sam tehnološki postopek. Tako so Gardiner in sod. (1998) ter Stanton in sod. (1998) ugotovili primernost čedarja kot nosilca nekaterih sevov bifidobakterij in vrste *Lactobacillus paracasei*. Dodatki teh probiotičnih bakterij niso negativno vplivali na senzorične lastnosti sirov. Podobne težave, kot smo jih imeli pri uporabi samostojnih probiotičnih bakterij v naši raziskavi, pa navajajo Gomes in sod. (1995), ki so izdelali sir tipa gauda, kot samostojno startersko kulturo pa uporabili probiotična seva *Lactobacillus acidophilus* Ki in *Bifidobacterium* Bo. Zaradi slabe rasti v mleku

so bili potrebni veliki inokulumi, kar je povzročilo številne napake v okusu in aromi sira, ki je bil senzorično nesprejemljiv.

Mikrobiološka slika sirov

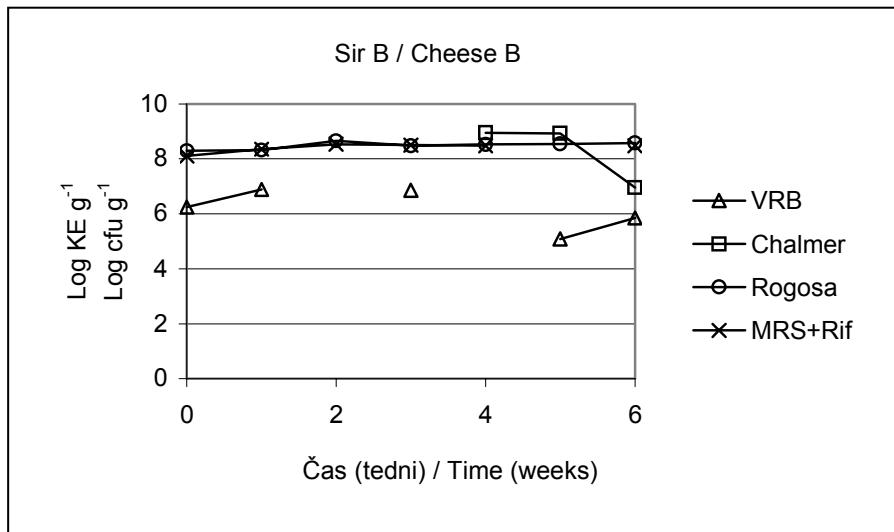
Števila laktobacilov, streptokokov, koliformnih bakterij in celic derivatov probiotičnih bakterij LF221(Rif^r) in K7(Rif^r) v 6 posameznih sirov med 6-tedenskim zorenjem so prikazana na slikah 1–5. Na sliki 1 so prikazani rezultati mikrobiološke analize kontrolnega sira (A), ki je bil izdelan samo z dodatkom tipične mlekarske starterske kulture *Streptococcus thermophilus* TH-4. Dodatek kulture se odraža na visokem številu streptokokov v 1 g sira med celotnim zorenjem. Druga pomembna skupina bakterij, ki med zorenjem do tretjega tedna postopno narašča, nato pa se ustali na nivoju okoli 10^7 KE g⁻¹ sira pa so nativni laktobacili. Pri vseh vzorčenjih smo v 1 g sira ugotovili manj kot 10 KE koliformnih bakterij. Nizko število koliformnih bakterij je rezultat dveh dejavnikov in sicer zadovoljive kakovosti surovine in hitre acidifikacije med stiskanjem sira.



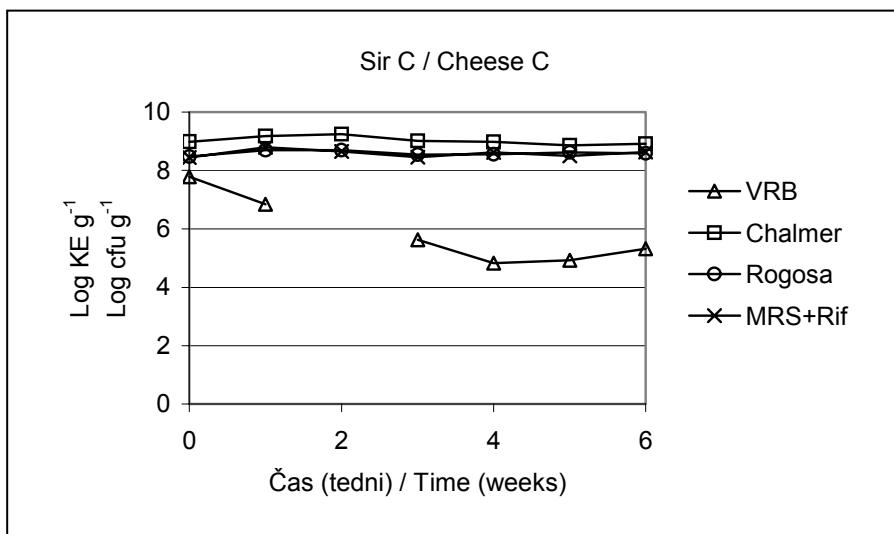
Slika 1. Število laktobacilov (Rogosa) in streptokokov (Chalmer) v kontrolnem siru (A) med zorenjem.

Figure 1. Numbers of lactobacilli (Rogosa) and streptococci (Chalmer) in control cheese (A) during ripening.

Na slikah 2 in 3 je prikazana mikrobiološka slika sirov, narejenih samo z dodatkom bakterij LF221(Rif^r) (Sir B) in K7(Rif^r) (Sir C). Glavna skupna značilnost pri obeh sirih je visoko število laktobacilov (Rogosa) v 1 g sira od začetka do konca zorenja, ki se povsem ujema s številom KE, preštetih na gojišču MRS z rifampicinom, namenjenemu selektivnemu štetju derivatov probiotičnih bakterij, rezistentnih na rifampicin. Visoko število koliformnih bakterij je v veliki meri posledica prepočasne acidifikacije med stiskanjem sirov. Nizka kislina, ugodna temperatura in dolg čas, predno smo potopili sire v slanico (inhibicija mikrobnega delovanja), so omogočili prekomerno razmnoževanje koliformnih bakterij med stiskanjem sirov. Med zorenjem sirov je število koliformnih bakterij sicer padlo, vendar je še vedno daleč presegalo normalne vrednosti.

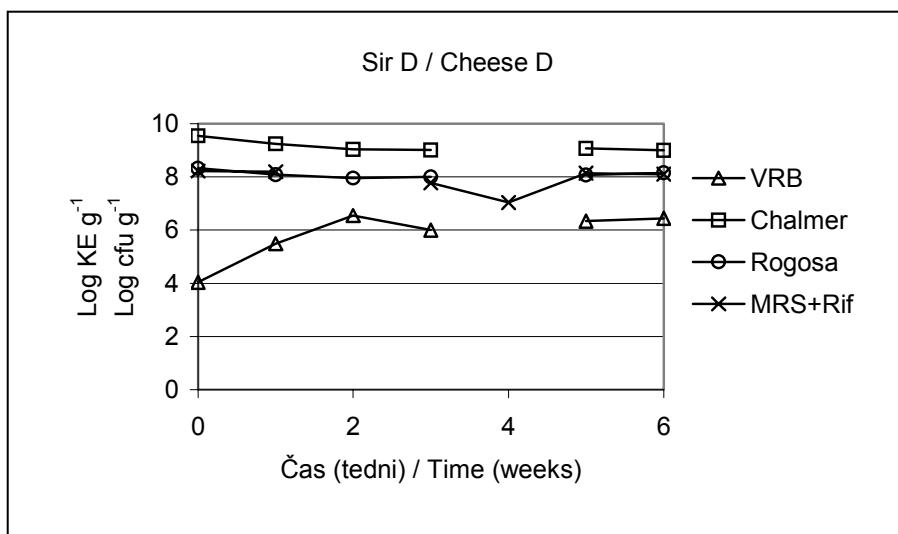


Slika 2. Število laktobacilov (Rogosa), streptokokov (Chalmer), koliformnih bakterij (VRB) in celic LF221 (MRS+Rif) v siru B med zorenjem.
 Figure 2. Numbers of lactobacilli (Rogosa), streptococci (Chalmer), coliform bacteria (VRB) and LF221 cells (MRS+Rif) in cheese B during ripening.



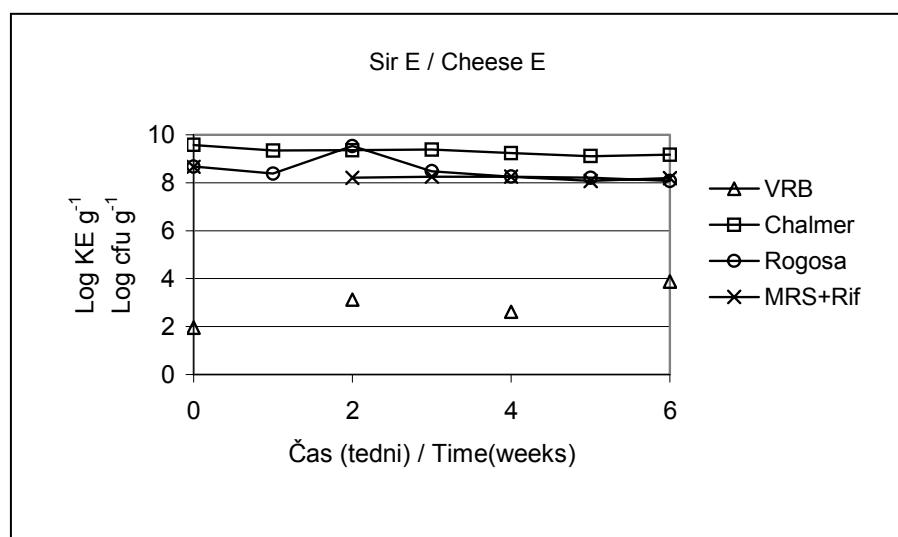
Slika 3. Število laktobacilov (Rogosa), streptokokov (Chalmer), koliformnih bakterij (VRB) in celic K7 (MRS+Rif) v siru C med zorenjem.
 Figure 3. Numbers of lactobacilli (Rogosa), streptococci (Chalmer), coliform bacteria (VRB) and K7 cells (MRS+Rif) in cheese C during ripening.

Pri izdelavi sirov D in E (Sliki 4 in 5) smo probiotična seva uporabili v kombinaciji s komercialno startersko kulturo *Streptococcus thermophilus* TH-4. V primerjavi z referenčnim sirom A (Slika 1) med zorenjem nismo opazili razlik v številu streptokokov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da dodatek probiotičnih sevov ni vplival na podporno startersko kulturo.



Slika 4. Število laktobacilov (Rogosa), streptokokov (Chalmer), koliformnih bakterij (VRB) in celic LF221 (MRS+Rif) v siru D med zorenjem.

Figure 4. Numbers of lactobacilli (Rogosa), streptococci (Chalmer), coliform bacteria (VRB) and LF221 cells (MRS+Rif) in cheese D during ripening.

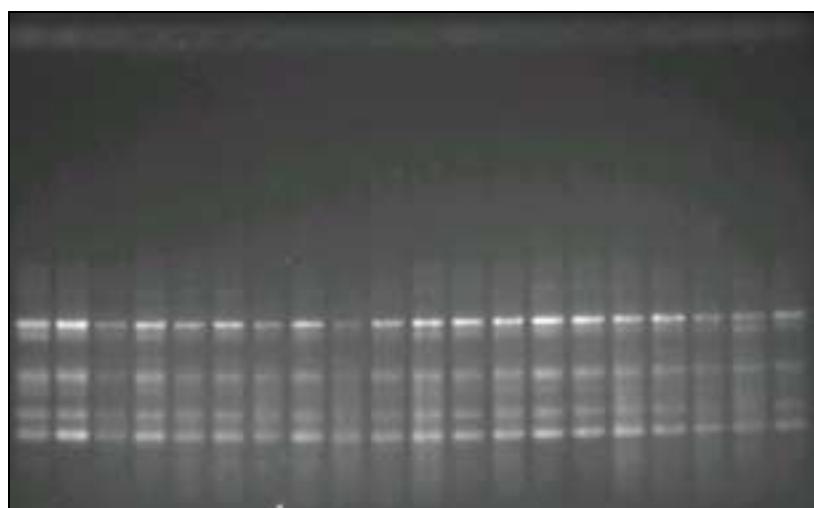


Slika 5. Število laktobacilov (Rogosa), streptokokov (Chalmer), koliformnih bakterij (VRB) in celic K7 (MRS+Rif) v siru E med zorenjem.

Figure 5. Numbers of lactobacilli (Rogosa), streptococci (Chalmer), coliform bacteria (VRB) and K7 cells (MRS+Rif) in cheese E during ripening.

Prisotnost koliformnih bakterij smo ugotovili že v sirnini pred stiskanjem (rezultati niso prikazani) zato lahko upravičeno pripisemo njihovo prisotnost slabi surovini. Števila KE, ki smo jih prešteli na agarju Rogosa (laktobacili) so se, tako kot pri sirih, narejenih samo z dodatkom posameznega probiotičnega seva (Sira B in C), pokrivala s števili KE, ki smo jih prešteli na MRS gojišču z dodanim rifampicinom. Ker probiotični laktobacili, odporni proti rifampicinu

zrastejo tudi na agarju Rogosa, smo s tem potrdili, da predstavljajo probiotični laktobacili prevladujočo populacijo laktobacilov. Da bi se prepričali o selektivnosti gojišča z antibiotikom, smo na to gojišče nacepili tudi vzorce kontrolnega sira, brez dodanih probiotičnih bakterij. Na ploščah ni zrasla nobena kolonija. Identičnost izolatov, zraslih na gojišču MRS z dodanim antibiotikom, s probiotičnima sevoma LF221 in K7, smo preverili tako, da smo naključno izbrane kolonije, zrasle na gojišču MRS z rifampicinom analizirali z metodo RAPD-PCR. Produkti reakcije PCR za potencialne izolate K7 so prikazani na sliki 6, iz katere je razvidno, da so produkti vseh analiziranih kolonij identični produktom kontrolnega seva *Lactobacillus* K7 (mesto 1) in njegovega derivata *Lactobacillus* K7(Rif^r) (mesto 2). Metoda se je pokazala kot uspešna za zasledovanje probiotičnih sevov v mešanih mikrobnih združbah. Uspešno uporabo derivatov probiotičnih bakterij odpornih proti rifampicinu, pri proučevanju preživelosti probiotičnih bakterij v različnih mikrobnih združbah ali možnosti njihovega vključevanja v sir navajajo tudi nekateri drugi avtorji (Gardiner in sod., 1999; von Wright in sod., 2002)



Slika 6. Vzorci RAPD, dobljeni z analizo liziranih kolonij, zraslih na agarju MRS+Rif ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$). Proga 1: izhodiščni sev *Lactobacillus* K7; Proga 2: *Lactobacillus* K7(Rif^r); Proge 3-20: izolati iz sirov z dodanim sevom K7(Rif^r).

Figure 6. RAPD profiles generated from lysed colonies from MRS+Rif agar ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$). Lane 1: *Lactobacillus* K7 parental strain; Lane 2: *Lactobacillus* K7(Rif^r); Lanes 3-20: isolates from cheeses with added K7(Rif^r) strain.

ZAKLJUČEK

V skladu z literurnimi podatki (Svensson, 1999) mora probiotični izdelek v 1 ml ali 1 g vsebovati več kot 10^6 živih celic probiotične bakterije. Sir, ki smo ga izdelali v naših eksperimentih, je v 1 g vseboval okoli 10^8 živih celic LF221 (Rif^r), oziroma K7 (Rif^r), ki se od izvornih celic, izoliranih iz blata dojenčkov, ločijo samo po odpornosti proti rifampicinu, zato lahko pričakujemo, da bi bilo isto tudi število izvornih celic. Dobro preživelost seva LF221 med tehnološkim postopkom sirjenja in zorenjem smo dokazali tudi že v predhodnih raziskavah (Rogelj in sod., 2002a in b). Sir se je torej pokazal kot primeren medij za prenos humanih izolatov *Lactobacillus gasseri* LF221 in K7, saj oba Rif^r derivata preživita tehnološki postopek sirjenja in 6-tedensko zorenje sirov, poleg tega pa dodana k tipični sirarski kulturi nimata negativnega vpliva na senzorične lastnosti sira. Ker oba seva v laboratorijskih pogojih izkazujeta

proti-klostridijsko delovanje, bomo v nadaljevanju proučili tudi njuno sposobnost preprečevanja poznega napihovanja trdih sirov.

SUMMARY

Probiotic products represent an important part of the functional food sector. The bacteria used for commercial development of probiotic food have to meet the rigorous selection criteria. Probiotic foods should contain specific probiotic strains and maintain a suitable level of viable cells during the product's shelf life. Probiotic strains must survive and retain their functionality during manufacturing process and in the food during storage. There are many technological demands for probiotic strains and new technologies may often be required for successful incorporation of probiotic strain into the food without producing off-flavours or textures. A lot of attempts on the incorporating probiotic bacteria in food and therapeutic preparations were reported lately, and nowadays numerous of probiotic products are commercially available for human consumption. Among dairy products cheese is becoming an attractive food carrier for delivery of probiotic strains. Strains *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 are human isolates and fulfil the basic criteria for probiotic strain. In the present paper, we report the attempt to incorporate the derivatives of LF221 and K7 strains resistant to rifampicin ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) into the cheese for their delivery to the consumer. LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) strains were used as the only starter culture or in combination with the starter culture *Streptococcus thermophilus* TH-4. The control cheese was produced by the addition of TH-4 starter culture alone. The probiotic strains were unsuitable in cheese production when used alone because of their slow growth in milk and therefore poor acidification activity during the cheesemaking and pressing. As a consequence the cheeses were organoleptically unacceptable. The addition of TH-4 as supporting culture speeded up the acidification and with little changes in the technology enabled the production of probiotic cheeses (LF221 and K7) with organoleptic properties comparable to or even better than control cheese. Moreover, the TH-4 culture did not have any adverse effect on the survival of strains LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) in the cheeses during manufacturing and ripening. After six weeks of ripening LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) counts remained above 10^8 cfu g^{-1} of cheese. With regard to results semi-hard cheese could be used as a carrier of human isolates LF221 and K7.

VIRI

- Bogovič Matijašić, B./ Rogelj, I. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. Food technol. biotechnol., 37(1999)2, 93–100.
- Bogovič Matijašić, B./ Rogelj, I. *Lactobacillus* K7 – a new candidate for a probiotic strain. Food technol. biotechnol., 38(2000)2, 113–119.
- Bogovič Matijašić, B. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF221: proučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti, biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fak., Biotehniška fak., 1997, 106 str.
- Bogovič Matijašić, B./ Rogelj, I./ Nes, I. F./ Holo, H. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. microbiol. biotechnol., 49(1998), 606–612.
- Catteau, M. *Streptococcus – Leuconostoc – Pediococcus*. V: Cours de microbiologie des denrees alimentaires. Lille, Institut Pasteur de Lille, 1982, 28 str.
- Collins, J.K./ Thornton, G./ Sullivan, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. Int. Dairy J., 8(1998)5/6, 487–490.
- Daigle, A./ Roy, D./ Bélanger, G./ Vuillemand, J.C. Production of Probiotic Cheese (Cheddar-Like Cheese) Using Enriched Cream Fermented by *Bifidobacterium infantis*. J. Dairy Sci., 82(1999)6, 1081–1091.
- Gardiner, G./ Ross, R.P./ Collins, J.K./ Fitzgerald, G./ Stanton, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. Appl. Environ. Microbiol., 64(1998)6, 2192–2199.
- Gardiner, G./ Stanton, C./ Lynch, P.B./ Collins, J.K./ Fitzgerald, G./ Ross, R.P. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. J. Dairy Sci., 82(1999)7, 1379–1387.

- Gobbetti, M./ Corsetti, A./ Smacchi, E./ Zocchetti, A./ DeAngelis, M. Production of Crescenza Cheese by Incorporation of Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.*, 81(1998)1, 37–47.
- Gomes, A.M.P./ Malcata, F.X./ Klaver, F.A.M./ Grande, H.G. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Neth. Milk Dairy J.*, 49(1995), 71–95.
- Heller, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(2001)suppl., 374S–379S.
- Klaenhammer, T.R./ Kullen, M.J. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 50(1999), 45–57.
- Kok, R.G./ De Waal, A./ Schut, F./ Welling, G.W./ Weenk, G./ Hellingwerf, K.J. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1996), 3668–3672.
- Mattila-Sandholm, T./ Mättö, J./ Saarela, M. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.*, 9(1999), 25–35.
- Pariza, M.W. Functional Foods: Technology, Functionality, and Health Benefits. *Nutrition Today*, 43(1999)4, 150–151.
- Roberfroid, M.B. Functional affects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutrition Reviews*, 54(1996), 538–551.
- Rogelj, I./ Bogovič Matijašić, B./ Čanžek Majhenič, A./ Stojković, S. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002a, v tisku.
- Rogelj, I./ Bogovič Matijašić, B./ Perko, B. Development of a probiotic semi-hard cheese – optimisation of technological process. V: Proceedings of the 4th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Central Europe Meeting, Opatija, 2001-10-3/5. 2002b, v tisku.
- Saarela, M./ Mogensen, G./ Fondén, R./ Mättö, J./ Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(2000), 197–215.
- Salminen, S./ Bouley, C./ Boutron-Ruault, Mc. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.*, 80(1998)suppl., S147–S171.
- Saxelin, M./ Grenov, B./ Svensson, U./ Fondén, R./ Reniero, R./ Mattila-Sandholm, T. The technology of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 10(1999), 387–392.
- Schillinger, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 47(1999), 79–87.
- Stanton, C./ Gardiner, G./ Lynch, P.B./ Collins, J.K./ Fitzgerald, G./ Ross, R.P. Probiotic Cheese. *Int. Dairy J.*, 8(1998), 491–496.
- Svensson, U. Industrial perspectives. V: Probiotics: A critical review (ur.: Gerald, W./ Tannock, G.W.). Wymondham, Horizon Scientific press, 1999, 57–64.
- Tuomola, E./ Crittenden, R./ Playne, M./ Isolauri, E./ Salminen, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(2001)suppl., 393S–398S.
- Tynkkynen, S./ Satokari, R./ Saarela, M./ Mattila-Sandholm, T./ Saxelin, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(1999), 3908–3914.
- von Wright, A./ Vilpponen-Salmela, T./ Llopis, M. P./ Collins, K./ Kiely, B./ Shanahan, F./ Dunne, C. The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patients with ulcerative colitis. *Int. Dairy J.*, 12(2002), 197–200.