

## Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na fermentaciju mlijeka bifidobakterijama

doi: 10.15567/mljekarstvo.2015.0201

Anamarija Ljubić<sup>1</sup>, Anita Jurić<sup>1,2</sup>, Katarina Lisak Jakopović<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Mostaru, Biskupa Čule bb, Mostar, Bosna i Hercegovina<sup>2</sup>Hercegovačka pivovara, Bišće polje bb, Mostar, Bosna i Hercegovina<sup>3</sup>Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 07.07.2014.

Prihvaćeno - Accepted: 02.03.2015.

### Sažetak

Tretiranje hrane ultrazvukom je relativno novi način procesiranja hrane, a razvijen je u posljednja dva desetljeća. Koristi se, između ostalog, prilikom fermentacije mlijeka, za smanjenje broja štetnih mikroorganizama, ali i za stimulaciju rasta probiotičkih bakterija u mlijeku, a naročito bifidobakterija. Najčešće korištene probiotičke kulture pri proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda jesu upravo bifidobakterije. Glavni problem njihove upotrebe je što mlijeko nije prirodna sredina za njihov rast i preživljavanje stoga je njihovo korištenje u fermentaciji mlijeka ograničeno. Pokazalo se da primjena ultrazvuka visokog intenziteta može skratiti trajanje fermentacije kod mlijeka fermentiranog s *B. infantis*, *B. brevis* i *B. animalis* subsp. *lactis*. Isto tako, pokazalo se da je mehanizam stimulacije rasta bifidobakterija ultrazvučnim tretiranjem povezan s kinetikom ugljikohidrata i organskih kiselina tijekom fermentacije. Cilj ovoga rada je prikazati kako upotrebom ultrazvuka visokog intenziteta dolazi do stimulacije rasta bifidobakterija u mlijeku, a samim time do ubrzanja procesa fermentacije.

*Ključne riječi:* fermentacija mlijeka, ultrazvuk, probiotičke bakterije, bifidobakterije

### Uvod

Probiotik se definira kao: "jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje primijenjene u ljudi ili životinja djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina" (Šušković, 1996). Znanstveni temelji izučavanja i razvoja probiotičkih bakterija polaze od spoznaje da je crijevna mikroflora uključena u zaštitu "domaćina" (čovjeka ili životinje) od naseljavanja probavnog sustava neautohtonim mikroorganizmima. Zbog mnogih pogodnosti za ljudsko zdravlje svrstane su u funkcionalnu hranu. Probiotičke bakterije se najčešće nalaze u fermentiranim mliječnim proizvodima. Razmnožavanje probiotičkih bakterija tijekom fermentacije, kao i preživljavanje stanica tijekom skladištenja proiz-

voda, uvelike ovisi o soju i njihovoj pH tolerantnosti (osobito sojevi bifidobakterija). Osobito su značajne probiotičke vrste *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*. Okosnica ovoga rada su upravo bifidobakterije, odnosno njihov učinak na fermentaciju mlijeka, rast tijekom fermentacije te faktori koji utječu na njihov rast i sposobnost proizvodnje sekundarnih metabolita. Rast bifidobakterija i drugih probiotičkih bakterija u mlijeku je često usporen u usporedbi s bakterijama mliječne kiseline koje se najčešće koriste za fermentacije mliječnih proizvoda (Božanić i sur., 2002). Mlijeko sadrži mnoge esencijalne hranjive tvari, međutim nema dovoljno slobodnih amino-kiselina i manjih peptida potrebnih za optimalan rast bifidobakterija. Povrh toga, bifidobakterije su manje otporne na različite uvjete medija u kojem se nalaze poput temperature i pH vrijednosti,

\*Dopisni autor/Corresponding author: Tel/Phone: +385 (0)1 4605 024; E-mail: klisak@pbf.hr

osmotskog tlaka, koncentracije kisika te prisutnosti žučnih soli (Tannock, 2002). Navedeni uvjeti imaju negativan utjecaj na preživljavanje bifidobakterija, a naposljetku i na njihovu aktivnost. Stoga je poželjno stimulirati rast i fermentativnu sposobnost bifidobakterija prilikom primjene u različitim proizvodnim procesima. Brojna istraživanja posvećena su optimiranju procesa koji mogu poboljšati mliječnu fermentaciju bifidobakterijama (Dave i Shah, 1997.; Donkor i sur., 2006).

U mljekarskoj je industriji dosad istraživana primjena ultrazvuka visokog intenziteta u svrhu inaktivacije nepoželjnih mikroorganizama i enzima te za homogenizaciju mlijeka (Jeličić i sur., 2012). Sposobnost ultrazvuka da stimulira fermentaciju poslužila je kao poticaj za provedbu brojnih istraživanja o primjeni ultrazvuka za povećanje rasta probiotičkih bakterija u mlijeku, posebno bifidobakterija, te samim time i u svrhu poboljšanja procesa fermentacije (Nguyen, 2011).

### Upotreba bifidobakterija u fermentiranom mlijeku

Upotrebom probiotičkih bakterija stimulira se rast željenih mikroorganizama, inhibiraju se potencijalno štetne bakterije i uspostavlja se prirodni obrambeni mehanizam organizma (Dunne, 2001). Zbog blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje probiotičke se bakterije u prehrambenoj industriji uglavnom koriste u razvoju funkcionalne hrane. Ponajviše korištene probiotičke kulture su roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* budući da pripadaju autohtonoj crijevnoj mikroflori čovjeka (Champagne i Gardner, 2005.; Nguyen i sur., 2013). Kao nositelji probiotičkih bakterija najčešće se koriste mliječni proizvodi jer već imaju pozitivnu sliku glede utjecaja na ljudsko zdravlje, a potrošači su upoznati s činjenicom da takvi proizvodi sadrže žive mikroorganizme (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001). Stoga hrana obogaćena probiotičkim bakterijama većinom podrazumijeva mliječne proizvode poput jogurta, sira, sladoleda i mliječnih deserta (Lavermicocca, 2006).

Minimalan broj živih stanica probiotičkih bakterija u proizvodu najvažniji je kvalitativni parametar probiotičkog napitka, važan za njegovu terapijsku učinkovitost. Smatra se da je probiotički minimum koji treba biti zadovoljen tijekom roka

trajanja proizvoda  $10^6$  CFU/mL (Donkor i sur., 2006). Neki znanstvenici smatraju da bi taj broj trebao biti veći od  $10^6$  CFU/mL, dok drugi predlažu broj veći od  $10^7$  ili čak  $10^8$  CFU/mL (Mortazavian i sur., 2007). Inkorporacija probiotičkih bakterija u mlijeko predstavlja značajan tehnološki izazov te može biti otežana uslijed okolišnih uvjeta prisutnih tijekom procesa fermentacije pa sve do ciljanog mjesta u domaćinu. Osim toga, izrazito je važno obratiti pozornost na odabir sojeva, budući da neke vrste probiotičkih bakterija mogu djelovati antagonistički jedna na drugu (Nguyen, 2011).

Bifidobakterije pripadaju najvažnijim sojevima probiotičkih bakterija budući da među prvima nastanjuju sterilni gastrointestinalni sustav novorođenčadi (Fanaro i sur., 2003). Osim toga, bifidobakterije igraju ključnu ulogu u zaštiti od crijevnih patogena te tako stimuliraju imunološki sustav, a djeluju i antimikrobno, antimutageno i antikancerogeno, te reduciraju koncentraciju kolesterola i poboljšavaju toleranciju na laktozu (Doleyres i Lacroix, 2005). Također, ultrazvuk može povećati i nutritivnu vrijednost fermentiranog mlijeka. Naime, bifidobakterije mogu proizvesti prebiotičke galaktooligosaharide i sintetizirati vitamine iz B skupine, osobito vitamin B<sub>12</sub> (Lamoureux i sur., 2002). U prehrambenoj se industriji uglavnom koristi sljedećih sedam sojeva bifidobakterija: *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. brevis*, *B. infantis* i *B. longum* (Holzapfel, 2006.; Shah i Lankaputhra, 2004).

Bifidobakterije se najčešće nalaze u mliječnim proizvodima kao što su fermentirana mlijeka ili infant formule za dojenčad, a prvi put su implementirane u mlijeko u Njemačkoj kao tzv. "Bifidus mlijeko" (Tratnik i Božanić, 2012).

Na samim počecima proizvodnje probiotičkog jogurta koristio se soj *B. bifidum*, no kako je pokazao slabu toleranciju na koncentracije kiseline i žuči prisutne u gastrointestinalnom sustavu, počeo se koristiti puno acidotolerantniji soj *B. longum*. Međutim, u zadnje se vrijeme *B. longum* zamjenjuje s *B. animalis*, radi potrebe za što većim brojem živih stanica u krajnjem proizvodu, potrebnih za postizanje terapijskog učinka. Kako je *B. animalis* životinjskog podrijetla, moguće je da ne može preživjeti i kolonizirati se u ljudskom probavnom sustavu (Salar-Bezadi i sur., 2013).

Zbog slabe proteolitičke aktivnosti bifidobakterije sporo rastu u mlijeku, a zbog čimbenika kao što su visoke koncentracije kiseline ili povišena temperatura kojima mogu biti izložene tijekom proizvodnje, skladištenja i konzumacije imaju nisku stopu preživljavanja (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001.; Champagne i Gardner, 2005.; Bolduc i sur., 2006.; Donkor i sur., 2006). Stoga je prisutnost bakterija mliječne kiseline neophodna za normalan rast bifidobakterija pa se najčešće koriste u kombinaciji s jogurnom starter kulturom (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ili drugim probiotičkim bakterijama. Proteolitička aktivnost soja *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulira rast bifidobakterija i skraćuje vrijeme fermentacije, dok soj *Streptococcus thermophilus* djeluje kao akceptor kisika smrtonosnog za bifidobakterije. Međutim, jogurtna se kultura dodaje i iz tehnoloških razloga, tj. za brže kiseljenje, te postizanje bolje teksture i arome proizvoda (Dave i Shah, 1997). Međutim, starter kulture nastavljaju s proizvodnjom kiseline i tijekom skladištenja što rezultira smanjenjem broja živih stanica bifidobakterija s malom tolerancijom na kiselinu. Upravo zbog takvog inhibitornog učinka starter kultura, bifidobakterije slabo preživljavaju u komercijalnim proizvodima. Dva čimbenika utječu na preživljavanje bifidobakterija u gotovom proizvodu - pH vrijednost i temperatura čuvanja proizvoda. Da bi bifidobakterije preživjele u proizvodu, pH vrijednost fermentiranog napitka mora iznositi 4,6, a temperatura mora biti od 4 do 8 °C (Shah, 2004). Mlijeko fermentirano samo s bifidobakterijama može se proizvesti, no dva glavna ograničenja takvog procesa su dulja fermentacija i neodgovarajuća aroma proizvoda (Shah, 2004).

### Ultrazvuk kao izvor energije za stimulaciju fermentacije hrane

#### *Mehanizam djelovanja ultrazvuka*

Ultrazvuk se odnosi na zvučne valove frekvencije iznad 20 kHz koji nastaju uslijed mehaničkih vibracija (Herceg i sur., 2009). Prilikom prolaska valova kroz tekućinu dolazi do naizmjenične kompresije i ekspanzije medija zbog promjene tlakova (Butz i Tauscher, 2002.; Jeličić i sur., 2010). Pri tom se ovisno o namjeni razlikuju ultrazvuk niskog i visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta

odnosi se na intenzitete manje od 1 W/cm<sup>2</sup> i frekvencije više od 100 kHz, a primjenjuje se za različite analitičke metode, primjerice za kontrolu pakiranja prehrambenih proizvoda. Ultrazvuk visokog intenziteta odnosi se na intenzitete više od 1 W/cm<sup>2</sup> i frekvencije između 18 i 100 kHz, a primjenjuje se u svrhu inaktivacije i redukcije broja mikroorganizama (Knorr i sur., 2004). Ukoliko je amplituda ultrazvučnog vala dovoljno velika, javlja se kavitacija - fenomen odgovoran za mikrobiocidni učinak ultrazvuka. Kavitacija se može objasniti nizom idućih pojava: uslijed izmjena tlakova nastaju mjehurići plina čija veličina raste tijekom svakog ciklusa sve dok ne postignu kritičnu veličinu unutar koje energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinovita faza u mjehuriću, te oni implodiraju. Svaka implodzija mjehurića ponaša se kao lokalizirana "vruća točka" pri čemu se razvijaju vrlo visoke temperature (iznad 5000 K) i tlakovi (oko 50 MPa) (Patist i Bates, 2008.; Cameron i sur., 2009). Mikrobiocidni učinak ultrazvučne kavitacije uključuje razbijanje nakupina mikroorganizama, izazivanje napuknuća staničnih stijenki, modificiranje unutarstaničnih mehanizama te povećavanje osjetljivosti na djelovanje topline (Fellows, 2000; Cameron i sur., 2009). Navedene promjene također za posljedicu mogu imati fragmentaciju staničnih membrana, kao i strukturalne promjene, te interakcije s DNA (Butz i Tauscher, 2002). Novija istraživanja ukazuju i na to da kavitacija može inducirati apoptozu, staničnu smrt koja je kontrolirana genima, tzv. "stanično samoubojstvo", što jedinstveno definira morfološke i molekularne karakteristike (Kagiya i sur., 2006). Osim toga, iznimno visoke temperature i tlakovi nastali implodzijom mjehurića mogu izazvati raspad vodene pare na OH<sup>-</sup> radikale i H<sup>+</sup> ione koji su odgovorni za inaktivaciju bakterijskih stanica oksidacijom (Shin i sur., 1994). Pri tome treba uzeti u obzir kako učinkovitost ultrazvučne kavitacije ovisi o nizu čimbenika poput vrste testnog mikroorganizma, mediju u kojem se isti nalazi, veličini stanica, te ulaznoj snazi ultrazvučnog vala (Cameron i sur., 2009).

#### *Upotreba ultrazvuka u fermentaciji hrane*

Ultrazvuk se može koristiti za unaprjeđivanje fermentacije stimulacijom dva glavna faktora uključena u sam proces - mikroorganizmi i enzimi. Ultrazvuk može uvelike povećati brzinu prijenosa kisika između

plina i tekućine, te može ubrzati uklanjanje ugljičnog dioksida i otapanje raspršenih krutih čestica i kapljica. Time se povećava opskrba nisko topljivih supstrata i indirektno se poboljšava produktivnost kultura (Chisti, 2003). Stimulacija ultrazvukom može utjecati na propusnost membrane, ubrzati prijenos tvari, te promicati rast stanica i razmnožavanje, što upućuje na to da je ova tehnologija obećavajuća za primjenu u procesu fermentacije hrane (Lanchun i sur., 2003). Učinak ultrazvučnih valova na kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) i fermentaciju u proizvodnji alkoholnih pića je još odavno proučavan (Euler i Skarzynski, 1943), no uspješni procesi u kojima ultrazvučni valovi stimuliraju fermentaciju tek su nedavno implementirani. U mljekarskoj industriji ultrazvuk se može koristiti kao ekonomski povoljnija tehnologija za proizvodnju fermentiranog mlijeka s niskom koncentracijom laktoze (Wang i Sakakibara, 1997.; Brnčić i sur., 2009) ili za skraćivanje fermentacije u proizvodnji jogurta i kefira. Reiner i sur. (2009) uspoređivali su fizikalno-kemijska svojstva i mikrostrukturu jogurta proizvedenog od mlijeka tretiranog ultrazvukom u odnosu na konvencionalno proizvedeni jogurt. Dobiveni rezultati pokazali su kako je mlijeko tretirano ultrazvukom kroz 10 minuta i 24 kHz koaguliralo pri višim pH vrijednostima, tj. fermentacija je bila skraćena, a proizvedeni jogurt odlikovao se boljom viskoznošću i većom sposobnošću zadržavanja vode u odnosu na tradicionalno proizvedeni jogurt (Reiner i sur., 2009). Wu i sur. (2010) dobili su slične rezultate u istraživanju u kojem se ispitivao utjecaj ultrazvuka na homogenizaciju mlijeka i trajanje fermentacije u proizvodnji jogurta, te na neka fizikalna svojstva jogurta. Dobiveni rezultati su ukazivali da primjena ultrazvuka ulazne snage 225 W i 450 W u trajanju 8 minuta nakon inokulacije mlijeka jogurtom kulturom skraćuje fermentaciju i do 30 min u odnosu na kontrolni uzorak.

#### *Utjecaj ultrazvuka na bifidobakterije*

Učinak ultrazvuka razlikuje se ovisno o jačini i frekvenciji valova, čvrstoće stijenke ciljanih mikroorganizama i medija u kojem se nalaze. Pri određenoj frekvenciji i tretiranom volumenu, vrijeme izlaganja i snaga ultrazvuka su ključni parametri koji određuju količinu upotrijebljene ultrazvučne energije, što naposljetku uvjetuje ponašanje tretiranih uzoraka (Nguyen, 2011). Primjerice, ultrazvuk visokog

intenziteta frekvencije 20 kHz utječe na laktobacile u mlijeku tako da uzrokuje poremećaj u metabolizmu stanica, no u isto vrijeme uzrokuje i otpuštanje enzima, među kojima je  $\beta$ -galaktozidaza, te time ubrzava hidrolizu laktoze (Wu i sur., 2000).

U slučaju bifidobakterija i drugih probiotičkih bakterija, međustanična  $\beta$ -galaktozidaza katalizira pretvorbu laktoze u glukozu i galaktozu. Time se utječe na odvijanje transgalaktozilaznih reakcija u kojima je laktoza donor galaktozila i akceptor galaktooligosaharida (GOS). Galaktooligosaharidi su prebiotički sastojci koji utječu na rast i razmnožavanje bifidobakterija u crijevima pa prema tome ostvaruju pozitivan učinak na organizam domaćina (Depeint i sur., 2008). Nadalje, na učinkovitost ultrazvuka utječe i vrsta mikroorganizama koja se tretira. Tako različite vrste bifidobakterija pri jednakim uvjetima imaju različitu otpornost. *B. animalis* subsp. *lactis* ima nešto manju otpornost od *B. brevis* i *B. infantis*, dok je otpornost *B. longum* bila najmanja u usporedbi s navedenim vrstama. Nekoliko je mogućih objašnjenja za različitu otpornost, a prvi je razlika u debljini stanične stijenke, obliku i veličini stanice, budući su manje stanice otpornije na učinak ultrazvuka. Drugi razlog bi mogao biti u razlici kemijskog sastava stanične stijenke, što može rezultirati različitom osjetljivošću na stanične poremećaje (Palma i Bucalon, 1987.; De Dea i sur., 2007.; Ventura i sur., 2007.; Villamiel i de Jong, 2000). Također, gram negativne bakterije su manje otporne od gram pozitivnih (Aires i sur., 2010).

#### *Utjecaj ultrazvuka na preživljavanje bifidobakterija*

Bifidobakterije prilikom rasta u tekućinama formiraju male nakupine, a izlaganjem ultrazvuku dolazi do kavitacije i razdvajanja tih nakupina, te nastaje veći broj zasebnih bakterija u suspenziji (Joyce i sur., 2003). Razdvajanje bakterija događa se samo prilikom tretiranja suspenzija s malim brojem stanica ultrazvukom niskog intenziteta (512 i 850 kHz), dok pri višem intenzitetu (20 i 38 kHz) i koncentriranijim otopinama ne dolazi do preživljavanja stanica (Joyce i sur., 2003). Dakle, sveukupno djelovanje ultrazvuka svodi se na nadmetanje između preživljavanja i razdvajanja bakterija u suspenziji. Međutim, prilikom tretiranja ultrazvukom vrste *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. brevis* i *B. infantis* u potpunosti preživljavaju (Nguyen, 2011).

Kod *B. longum* se pokazalo da povećanje početnog broja, odnosno inokuluma, uzrokuje lošije preživljavanje bakterija u fermentiranom mlijeku. Povećanje početnog broja tj. inokuluma mlijeka fermentiranog s *B. infantis* rezultira povećanim preživljavanjem bakterija pri niskom intenzitetu ultrazvuka (512 i 850 kHz), a s druge strane ako je to povećanje veće od  $2,39 \times 10^8$  CFU/mL rezultira većim brojem uništenih bakterija (Nguyen, 2011). Kako je već prethodno obrazloženo, preživljavanje bakterija pozitivno djeluje na proces fermentacije, kao i na profil ugljikohidrata (koncentracije glukoze, galaktoze i galaktooligosaharida) koji se pojavljuju u fermentiranom mlijeku (Nguyen, 2011).

#### *Utjecaj ultrazvuka na fermentaciju mlijeka bifidobakterijama*

Tijekom tretiranja ultrazvukom dolazi do smanjenja broja živih stanica, no istovremeno se povećava aktivnost enzima  $\beta$ -galaktozidaze kod bifidobakterija (Nguyen, 2011). Naime, uslijed ultrazvučnog tretiranja dolazi do oštećenja stanica te se na taj način osiguravaju određene tvari koje stimuliraju rast bakterijskih kultura. Samim time ubrzava se proces fermentacije mlijeka. Među spomenute stimulatore ubrajaju se enzim  $\beta$ -galaktozidaza koji potiče metabolizam ugljikohidrata, kompleksni proteolitički enzimi koji ubrzavaju hidrolizu kazeina te lizati stanica koji sadržavaju brojne promotore rasta (Gaudreau i sur., 2004). Taj mehanizam potvrdilo je i istraživanje provedeno na jogurtima koji su sadržavali bifidobakterije i *L. acidophilus* (Shah i Lankaputhra, 1997). Dakle, moguća su dva međusobno suprotna učinka ultrazvuka na uzorak koji se tretira. Obzirom da u mliječnoj fermentaciji zakiseljavanje provode žive bakterije, smanjenje broja živih stanica rezultira sporijim zakiseljavanjem ili fermentacijom. Stoga tretiranje ultrazvukom može stimulirati mliječnu fermentaciju sve dok je pozitivni učinak dominantniji od negativnog, tj. sve dok prevladavaju stimulaturni faktori koji promiču rast bakterija. Time se postiže brže snižavanje pH mlijeka tretiranog ultrazvukom u kasnijoj fazi fermentacije u odnosu na konvencionalnu proizvodnju.

#### *Utjecaj ultrazvuka na koncentraciju ugljikohidrata*

Povećana aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze u uzorcima mlijeka podvrgnutim ultrazvučnom tretiranju može

djelovati kao promotor fermentativne sposobnosti bifidobakterija. Uslijed hidrolize povećava se potrošnja laktoze, što rezultira povećanjem koncentracije jednostavnih ugljikohidrata, glukoze i galaktoze koje se dalje koriste u metabolizmu bifidobakterija. U istraživanju Matijević i sur. (2011) ispitivano je kako hidroliza laktoze utječe na fermentativnu aktivnost probiotičkih bakterija *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 u sirutki, a rezultati ukazuju da je fermentacija bila brža za oko 2 sata u odnosu na kontrolni nehidrolizirani uzorak. Prema tome, može se reći da bifidobakterije bolje iskorištavaju jednostavne ugljikohidrate kao što je glukoza (Matijević i sur., 2011). Bifidobakterije tijekom fermentacije proizvode oligosaharide koji služe kao prebiotici koji potiču njihovu aktivnost. Proizvodnja oligosaharida razlikuje se među sojevima bifidobakterija. *B. animalis* subsp. *lactis* i *B. longum* imaju veću mogućnost njihove sinteze u usporedbi s *B. brevis* i *B. infantis*. Razlike u količini proizvedenih oligosaharida nastaju zbog različite količine i aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze (Lamoureux i sur., 2002). Iako bifidobakterije općenito nisu izrazito proteolitičke i amilolitičke (Champagne i Gardner, 2005), nakon što se postigne ravnoteža između bakterijskog preživljavanja i enzimske aktivnosti, ultrazvuk potpomaže proces mliječne fermentacije bifidobakterijama. Promjene u svojstvima ugljikohidrata povećavaju brzinu rasta bakterijske populacije tijekom fermentacije. Dakle, može se reći da ultrazvuk visokog intenziteta ima dobar potencijal za proizvodnju fermentiranog mlijeka s povećanom koncentracijom oligosaharida i niskom koncentracijom laktoze.

#### *Utjecaj ultrazvuka na organske kiseline*

Sadržaj organskih kiselina u fermentiranom mlijeku rezultat je proizvodnje i potrošnje, te je indikator metaboličke aktivnosti dodanih bakterijskih kultura. Organske kiseline ponašaju se kao prirodni konzervansi i pridonose karakterističnim senzorskim svojstvima fermentiranog mlijeka (Adhikari i sur., 2002). Koncentracije organskih kiselina razlikuju se ovisno o tome koja se vrsta bifidobakterija koristi za fermentaciju mlijeka. Octena i mliječna kiselina nalaze se u mnogo većoj koncentraciji kod mlijeka fermentiranog s *B. animalis* subsp. *lactis*, dok je koncentracija istih kiselina gotovo neznatna kod

mlijeka fermentiranog vrstama *B. brevis* i *B. infantis*. Također, tijekom fermentacije mlijeka moguća je proizvodnja propionske kiseline, a koju proizvodi *B. bifidum* i *B. longum* u mediju čiji je udio vode između 54,5 % i 68,8 % (Han i sur., 2005). Nadalje, tijekom fermentacije mlijeka može doći i do nastanka pirogroždane kiseline (Adhikari i sur., 2002). Pirogroždana kiselina je važan posrednik ili početni metabolit u mnogim metaboličkim putovima. Bakterije koriste pirogroždanu kiselinu za provedbu osnovnih metaboličkih procesa, što znači da visoka koncentracija pirogroždane kiseline u kasnijem stadiju fermentacije može biti samo privremena (Adhikari i sur., 2002.; Fernandez-Garcia i McGregor, 1994). Ultrazvuk visokog intenziteta utječe na potrošnju laktoze, no organske kiseline proizvode se unutar stanica tako da njihova količina ovisi o broju živih stanica. Tijekom izlaganja mlijeka s bifidobakterijama ultrazvuku na početku fermentacije, dolazi do raspadanja pojedinih stanica, dok se rast preostalih potiče tijekom fermentacije. Rezultat toga je manja količina organskih kiselina na početku fermentacije, no pri kraju kada je broj stanica znatno povećan, dolazi do nakupljanja organskih kiselina. Ranije je obrazloženo kako ultrazvuk utječe na značajne promjene u koncentraciji ugljikohidrata i organskih kiselina tijekom fermentacije koja traje 24 sata. Takva drastična promjena u koncentraciji ugljikohidrata rezultira različitim karakteristikama i brzini stvaranja organskih kiselina u fermentiranom mlijeku podvrgnutom tretiranju ultrazvukom. Stoga se ultrazvuk visokog intenziteta može primjenjivati kao alternativa konvencionalnom procesiranju, a u svrhu proizvodnje funkcionalnih fermentiranih mlijeka poboljšane kvalitete bez dodanih prebiotika i  $\beta$ -galaktozidaze. Takvi proizvodi sadržavali bi i niže koncentracije laktoze, odnosno visoke koncentracije oligosaharida, te manje količine nepoželjnih tvari arome koja potječe od octene i propionske kiseline.

#### Utjecaj ultrazvuka na količinu vitamina B<sub>12</sub>

Bakterije mliječne kiseline koje proizvode vitamin B<sub>12</sub> još nisu u potpunosti identificirane, no poznato je da neke bifidobakterije ljudskog podrijetla (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* i *B. brevis*) mogu sintetizirati vitamin B<sub>12</sub> (Deguchi i sur., 1985). Osim bifidobakterija samo su još vrste *Lactobacillus reuteri* (Santos i sur., 2007) i *Lacto-*

*bacillus plantarum* (Madhu i sur., 2010) pokazale tu rijetku sposobnost. Stoga bifidobakterije imaju visok potencijal za proizvodnju fermentiranog mlijeka koji sadrži prirodni vitamin B<sub>12</sub>. Količina vitamina B<sub>12</sub> u punomasnom mlijeku je oko 3,1-4,5 ng/g (Arkbåge i sur., 2003; Rao i sur., 1984). U mlijeku inokuliranom s *B. longum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. brevis* i *B. infantis* razina vitamina B<sub>12</sub> povećava se prije fermentacije, što upućuje na to da je vitamin B<sub>12</sub> sintetiziran intracelularno i akumuliran u bakterijskim stanicama. *B. infantis* se pokazao najboljim za proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> tijekom fermentacije, dok je *B. animalis* subsp. *lactis* proizveo najmanju količinu. Također, navedene vrste bifidobakterija nastavljaju proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> tijekom fermentacije (Deguchi i sur., 1985.; Nguyen, 2011).

Međutim, tijekom fermentacije mlijeka nastaje mliječna kiselina uslijed koje se smanjuje koncentracija vitamina B<sub>12</sub> (Friend i sur., 1983.; Arkbåge i sur., 2003) što ovisi o kulturama korištenim za fermentaciju. Nadalje, na koncentraciju vitamina B<sub>12</sub> u fermentiranom mlijeku također utječu vrijeme i temperatura skladištenja. Arkbåge i sur., (2003) određivali su količinu vitamina B<sub>12</sub> u jogurtu tijekom 14 dana skladištenja, a dobiveni rezultati ukazuju da tijekom perioda skladištenja dolazi do smanjenja koncentracije vitamina B<sub>12</sub> za 40 do 60 %. Tretiranje ultrazvukom ne uzrokuje značajne gubitke vitamina B<sub>12</sub> u inokuliranom mlijeku koje je podvrgnuto raznim uvjetima obrade. Povećanje koncentracije vitamina B<sub>12</sub> uslijed izlaganja ultrazvuku nije u korelaciji s brojem preostalih živih bifidobakterija u mlijeku nakon tretiranja, niti s vremenom fermentacije. U usporedbi s fermentiranim mlijekom koje nije ultrazvučno obrađeno, mlijeko fermentirano vrstama *B. brevis* i *B. infantis* i tretirano ultrazvukom odlikuje se kraćom fermentacijom i većim brojem stanica u finalnom proizvodu, te neznatno većom koncentracijom vitamina B<sub>12</sub>. Stoga se može pretpostaviti da proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> korelira s rastom bakterija (Nguyen, 2011). Koncentraciju vitamina B<sub>12</sub> proizvedenog tijekom fermentacije moguće je povećati i smanjenjem aktivnosti *Propionibacterium* spp. koje provode inhibitore rasta bifidobakterija (Wang i sur., 2010).

## Zaključci

Ovisno o amplitudi ultrazvuka, vremenu izlaganja i vrsti bifidobakterija, učinci ultrazvuka su različiti. Pokazalo se da primjena ultrazvuka može skratiti trajanje fermentacije kod mlijeka fermentiranog s *B. infantis*, *B. brevis* i *B. animalis* subsp. *lactis*. Mehanizam stimulacije rasta bifidobakterija ultrazvučnim tretiranjem povezan je s kinetikom ugljikohidrata i organskih kiselina tijekom fermentacije. Utrošak laktoze i proizvodnja glukoze, galaktoze i oligosaharida kod mlijeka fermentiranog bifidobakterijama (*B. brevis*, *B. infantis*, *B. animalis* subsp. *lactis* i *B. longum*) povećava se prilikom obrade ultrazvukom. Osim toga, dolazi i do promjene u koncentraciji organskih kiselina tijekom fermentacije, odnosno pokazalo se da tretiranje ultrazvukom potiče proizvodnju glavnih organskih kiselina u kasnijem stadiju fermentacije bakterijama *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. brevis* i *B. infantis*, a omjer octene i mliječne kiseline smanjuje se pri fermentaciji vrstom *B. longum*. Nadalje, upotreba ultrazvuka u proizvodnji mlijeka fermentiranog bifidobakterijama može povećati i proizvodnju sekundarnih metabolita poput vitamina B<sub>12</sub>. U usporedbi s uobičajenim količinama vitamina B<sub>12</sub> u obranom mlijeku, bifidobakterije mogu povećati njegovu razinu u fermentiranom mlijeku za više od 100 %. Ultrazvuk visokog intenziteta može se koristiti u budućnosti za skraćivanje procesa fermentacije mlijeka bifidobakterijama.

### *Effect of high intensity ultrasound on the milk fermentation by bifidobacteria*

#### Abstract

Treating food by ultrasound is a relatively novel food processing method which has been developed in the last two decades. When considering milk processing, ultrasound might be used to reduce the count of harmful microorganisms, and to stimulate the growth of probiotic bacteria during milk fermentation, especially bifidobacteria. The most commonly used probiotic cultures in fermented dairy products are bifidobacteria. The main problem related to the fermentation by bifidobacteria is that milk does not provide a natural environment for their growth and survival. Thus the application of bifidobacteria in milk fermentation is limited. Many

studies indicated that the application of high intensity ultrasound (20 kHz) may shorten the duration of milk fermentation by *B. infantis*, *B. brevis* and *B. animalis* subsp. *lactis*. Also, studies showed that the stimulating mechanism of bifidobacteria growth by ultrasound was associated with the kinetics of carbohydrates and organic acids during fermentation. The aim of this review was to demonstrate how the application of the high intensity ultrasound stimulates the growth of bifidobacteria in the milk, and thus improves the fermentation process.

*Key words:* milk fermentation, ultrasound, probiotic bacteria, bifidobacteria

#### Literatura

1. Adhikari, K., Grün, I.N., Mustapha, A., Fernando, L.N. (2002): Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurts during manufacture and refrigerated storage, *Journal of Food Quality* 25, 435-451.  
doi: dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.2002.tb01038.x
2. Aires, J., Anglade, P., Baraige, F., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M., Butel, M.J. (2010): Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705, *BMC Microbiology* 10, 29.  
doi: dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-29
3. Amaretti, A., Bernardi, T., Tamburini, E., Zanoni, S., Lomma, M., Matteuzzi, D. (2007): Kinetics and Metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides, *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3637-3644.  
doi: dx.doi.org/10.1128/AEM.02914-06
4. Arkbåge, K., Witthöft, C., Fondén, R., Jägerstad, M. (2003): Retention of vitamin B<sub>12</sub> during manufacture of six fermented dairy products using a validated radio protein binding assay, *International Dairy Journal* 13, 101-109.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00146-2
5. Bolduc, M.P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C.P., Vuilleumard, J. (2006): Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk, *International Dairy Journal* 16, 1038-1048.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.030
6. Božanić, R., Rogelj, I., Tratnik, Lj. (2002): Fermentacija i čuvanje probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka, *Mlijekarstvo* 52 (2), 93-111.
7. Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009): Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4 (1-2), 32-37.

8. Butz, P., Tauscher, B. (2002): Emerging technologies: chemical aspects, *Food Research International* 35, 279-284.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1
9. Cameron, M., McMaster, L., Britz, T. (2009): Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components, *Dairy Science & Technology* 1, 83-89.  
doi: dx.doi.org/10.1051/dst/2008037
10. Champagne, C., Gardner, N. (2005): Challenges in the addition of probiotic cultures to foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (1), 61-84.  
doi: dx.doi.org/10.1080/10408690590900144
11. Chisti, Y. (2003): Sonobioreactors: using ultrasound enhanced microbial productivity, *Trends in Biotechnology* 21, 89-93.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00033-1
12. Dave, R.I., Shah, N.P. (1997): Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures, *International Dairy Journal* 7, 31-41.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00046-5
13. De Dea, L., Canchaya, C., Zhang, Z., Neviani, E., Fitzgerald, G. (2007): Exploiting Bifidobacterium genomes: the molecular basis of stress response, *International Journal of Food Microbiology* 120, 13-24.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.016
14. Deguchi, Y., Morishita, T., Mutai, M. (1985): Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of *Bifidobacterium*, *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 13-19.  
doi: dx.doi.org/10.1271/bbb1961.49.13
15. Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., I'Anson, K., Gibson, G.R. (2008): Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study, *American Journal of Clinical Nutrition* 87, 785-91.
16. Doleyres, Y., Lacroix, C. (2005): Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection, *International Dairy Journal* 15, 973-988.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.014
17. Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2006): Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal* 16, 1181-1189.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.008
18. Dunne, C. (2001): Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder, *Inflammatory Bowel Diseases* 7, 136-145.  
doi: dx.doi.org/10.1097/00054725-200105000-00010
19. Euler, H., Skarzynski, B. (1943): The effect of ultrasonic waves on yeast, *Naturwissenschaften* 31, 389.
20. Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., Vigi, V. (2003): Intestinal microflora in early infancy: composition and development, *Acta Paediatrica* 92, 48-55.  
doi: dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00646.x
21. Fellows, P. (2000): Food Processing Technology - Principles and Practice, Woodhead Publishing, Engleska.
22. Fernandez-Garcia, E., McGregor, J.U. (1994): Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt, *Journal of Dairy Science* 77, 2934-2939.  
doi: dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77234-9
23. Friend, B.A., Fiedler, J.M., Shahani, K.M. (1983): Influence of culture selection on the flavour, antimicrobial activity,  $\beta$ -galactosidase and B-vitamins of yogurt, *Milchwissenschaft - Milk Science International* 38, 133-136.
24. Gaudreau, H., Champagne, C., Jelen, P. (2004): The use of crude extracts of *Lactobacillus delbrueckii* spp. 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk, *Enzyme and Microbial Technology* 36, 83-90.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.06.006
25. Han, R., Ebert, C.E., Z., Z., Li, L., Zhang, H., Tian, R. (2005): Novel Characteristics of Bifidobacterium bifidum in Solid State Fermentation System, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 1245-1258.  
doi: dx.doi.org/10.1007/s11274-005-1805-z
26. Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009): Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo* 59 (1), 65-69.
27. Holzapfel, W. (2006): Introduction to prebiotics and probiotics. In Probiotics in Food Safety and Human Health, Taylor Francis Group.
28. Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, L.J., Lisak, K. (2010): Mogućnosti primjene netradicionalnih postupaka procesiranja u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo* 60 (2), 113-126.
29. Jeličić, I., Lisak, K., Božanić, R. (2012): Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka, ultrazvuka i pulsirajućeg električnog polja na sastojke i svojstva mlijeka, *Mljekarstvo* 62 (1), 3-13.
30. Joyce, E., Phull, S.S., Lorimer, J.P., Mason, T.J. (2003): The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species, *Ultrasonics Sonochemistry* 10, 315-318.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00101-9
31. Kagiya, G., Ogawa, R., Tabuchi, Y., Feril, L.B., Nozaki, T., Fukuda, S. (2006): Expression of heme oxygenase-I due to intracellular reactive oxygen species induced by ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry* 13, 388-396.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.004
32. Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D. (2004): Applications and potential of ultrasonics in food processing, *Trends in Food Science and Technology* 15, 261-266.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.001
33. Lacroix, C., Yildirim, S. (2007): Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality, *Current Opinion in Biotechnology* 18, 176-183.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.002

34. Lamoureux, L., Roy, D., Gauthier, S. (2002): Production of Oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures, *Journal of Dairy Science* 85, 1058-1069.  
doi: dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74166-0
35. Lanchun, S., Bochu, W., Zhiming, L., Chuanren, D., Chuanyun, D., Sakanishi, A. (2003): The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S. cerevisiae*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30, 43-49.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00023-7
36. Lavermicocca, P. (2006): Highlights on new food research, *Digestive and Liver Disease* 38, 295-299.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60014-0
37. Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. (2001): Yogurt as probiotic carrier food, *International Dairy Journal* 11, 1-17.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X
38. Madhu, A.N., Giribhattanavar, P., Narayan, M., Prapulla, S. (2010): Probiotic lactic acid bacterium from kanjika as a potential source of vitamin B12: evidence from LC MS, *Biotechnology Letters* 32, 503-506.  
doi: dx.doi.org/10.1007/s10529-009-0176-1
39. Matijević, B., Lisak, K., Božanić, R., Tratnik, Lj. (2011): Impact of enzymatic hydrolyzed lactose on fermentation and growth of probiotic bacteria in whey, *Mljekarstvo* 61 (2), 154-160.
40. Mortazavian, A.M., Rehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A. (2007): Effect of refrigerated storage temperature on viability of probiotic micro-organisms in yogurt, *International Journal of Dairy Technology* 60, 123-127.  
doi: dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00306.x
41. Nguyen, H.T.H., Ong, L., Lefèvre, C., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2014): The Microstructure and Physicochemical Properties of Probiotic Buffalo Yoghurt During Fermentation and Storage: a Comparison with Bovine Yoghurt, *Food Bioprocess Technology* 7, 937-953.
42. Nguyen, T.M.P. (2011): High Intensity Ultrasound Aided Milk Fermentation by Bifidobacteria, NUS National University, Singapore.
43. O'Leary, V., Woychik, J.H. (1976): Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme, *Applied and Environmental Microbiology* 32, 89-94.
44. Palma, M., Bucalon, A. (1987): Sonochemical aspects of cell disruption by ultrasound, *Ultrasonics* 25, 370-371.  
doi: dx.doi.org/10.1016/0041-624X(87)90200-9
45. Patist, A., Bates, D. (2008): Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.004
46. Rao, D.R., Reddy, A., R., P.S., Cornwell, P.E. (1984): Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> by lactic cultures in skim milk, *Journal of Dairy Science* 67, 1169-1174.  
doi: dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81419-8
47. Reiner, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D., Lyng, J.G. (2009): The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation, *Food Chemistry* 114, 905-911.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.037
48. Santos, F., Vera, J.L., Lamosa, P., de Valdez, G.F., de Vos, W.M., Santos, H. (2007): Pseudovitamin B<sub>12</sub> is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions, *FEBS Letters* 581, 4865-4870.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.012
49. Shah, N., Lankaputhra, W. (1997): Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt, *International Dairy Journal* 7, 349-356.  
doi: dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00023-X
50. Shah, N. (2004): Bifidobacterium spp.: Applications in fermented milks. Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier Ltd..
51. Shah, N.P., Lankaputhra, W.E. (2004): Bifidobacterium spp. morphology and physiology. Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier Ltd..
52. Salar-Behzadi, S., Wu, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F.M., Wirth, M., Viernstein, H. (2013): Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12, *Food Research International* 54, 93-101.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.024
53. Shin, S., Calvisi, E., Beaman, T., Pankratz, H., Gerhardt, P., Marquis, R. (1994): Microscopic and thermal characterisation of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators and antioxidants, *Applied Environmental Microbiology* 60, 3192-3197.
54. Šušković, J. (1996): Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
55. Tannock, G.W. (2002): Probiotics and Prebiotics: Where Are We Going, Caister Academic Press, England.
56. Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
57. van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K., Vuyst, L. D. (2006): Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD<sup>+</sup> through its growth-associated production, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5204-5210.  
doi: dx.doi.org/10.1128/AEM.00146-06
58. Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. (2007): From bacterial genome to functionality: case bifidobacteria, *International Journal of Food Microbiology* 120, 2-12.  
doi: dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.011
59. Villamiel, M., de Jong, P. (2000): Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk, *Agricultural and Food Chemistry* 48, 472-478.  
doi: dx.doi.org/10.1021/jf990181s

60. Wang, D., Sakakibara, M. (1997): Lactose hydrolysis and  $\beta$ -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains, *Ultrasonics Sonochemistry* 4, 255-261.  
doi: [dx.doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00042-9)
61. Wang, Z. J., Wang, H.Y., Li, Y.L., Chu, J., Huang, M. Z., Zhuang, Y. P. (2010): Improved vitamin B<sub>12</sub> production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process, *Biore-source Technology* 101, 2845-2852.  
doi: [dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.048](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.048)
62. Wu, H., Hulbert, G.J., Mount, J.R. (2000): Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 211-218.  
doi: [dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)