

Probiotički fermentirani mliječni proizvodi

Adnan Y. Tamime, Rajka Božanić, Irena Rogelj

Revijalni prikaz – Review

UDK: 637.146

Sažetak

Fermentirani mliječni napitci su najpopularniji komercijalni industrijski proizvodi zbog unosa probiotičkih mikroba u ljudski probavni sustav. Stoga je u ovom radu dan pregled novijih spoznaja o probiotičkim fermentiranim mliječnim proizvodima. Obuhvaćen je povijesni pregled, komercijalni probiotički mikroorganizmi te proizvodi, njihova terapijska svojstva, mogućnosti poboljšanja kvalitete različitih tipova novorazvijenih mliječnih proizvoda kao i probiotički fermentirani proizvodi od kozjeg mlijeka.

Ključne riječi: probiotici, fermentirana mlijeka

Povijesni osvrt na probiotička fermentirana mlijeka

Osnovni kemijski sastav fermentiranih mliječnih proizvoda velike je nutritivne vrijednosti. Glavni sastojci su proteini, mast, ugljikohidrati, mineralne tvari i vitamini. No ne smije se zaboraviti i blagotvorni zdravstveni utjecaj bioaktivnih peptida (npr. kazomorfini, α - i β -laktorfini, imunopeptidi, laktoferin ili fosfopeptidi) (Meisel & Bockelmann, 1999.). Konzumiranje takvih proizvoda zbog blagotvornog zdravstvenog utjecaja datira unazad nekoliko tisuća godina; spomenuti su u Bibliji, a znanstvenici su ih od davnine opisivali kao lijekove za metaboličke poremećaje probavnog sustava (Oberman & Libudzisz, 1998.). Tako je u 76. godini prije Krista, rimski povjesničar Plinius preporučio konzumiranje fermentiranih mlijeka za tretiranje probavnih poremećaja (Bottazzi, 1983.). Od davnine je najproučavaniji fermentirani napitak jogurt koji postaje popularan krajem 19. i početkom 20. stoljeća. Njegova se popularnost djelomično može objasniti znanstvenim otkrićima Tissiera i Moroa (Rašić & Kurman, 1983.) te Mečnikova (1910.). Tissier je izolirao *Bacillus bifidus communis* (danas poznat kao *Bifidobacterium bifidum*), mikroorganizam koji je dominantan u fecesu dojenčadi hranjene majčinim mlijekom, dok je Moro, otprilike u istom

periodu, iz stolice dojenčadi hranjene majčnim mlijekom izolirao *Bacillus acidophilus* (danas poznat kao *Lactobacillus acidophilus*). Otkriće Tissiera da bifidobakterije imaju ključnu ulogu u djece hranjene majčnim mlijekom utemeljilo je hipotezu da su takve specifične bakterije važne u očuvanju zdravlja. 1906. godine Tissier je ukazao na kliničke prednosti modificirane mikrobne populacije u dojenčadi s probavnim infekcijama. On je tvrdio da u dojenčadi, koja pate od dijareje, uzimanjem *Bacillus bifidus* bifidobakterije dolazi do kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija (Shortt, 1999.). Mečnikov (1910.) je naveo blagotvorno djelovanje bakterija mliječne kiseline *Bulgarian bacillus* (kasnije preimenovan u *Lactobacillus bulgaricus*, a danas u *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) prisutnih u jogurtu. Blagotvorno djelovanje jogurta na dugovječnost bez starenja potvrđena je kod Kavkažana koji takve proizvode konzumiraju u velikoj mjeri. U Japanu, u ranim 1930. godinama liječnik Shirota je fokusirao svoja istraživanja na selekcionirani soj intestinalne bakterije koja preživljava prolaz kroz probavni sustav i na korištenje takvog soja u pripravljanju fermentiranih mlijeka za korištenje u njegovoj klinici. Ti proizvodi, koji sadrže *Lactobacillus casei* Shirota, još uvijek su na tržištu pod imenom Yakult (Shortt, 1999.).

Istraživanja Tissiera, Moroa i Mečnikova pobudila su velik interes znanstvenika i liječnika o korisnom djelovanju određenih mikroorganizama (npr. *Bifidobacterium* spp. i bakterija jogurtne kulture) koji mogu kolonizirati ljudski probavni trakt i eventualno u njemu inhibirati mikroorganizme koji proizvode toksine. Iako je došlo do prave poplave znanstvenih studija o ljekovitoj djelotvornosti bakterija mliječne kiseline iz fermentiranih mlijeka, sve do prve polovice prošlog stoljeća nije se znalo da *Lb. acidophilus* bolje kolonizira ljudski probavni trakt i tamo se razmnožava za razliku od bakterija standardnih jogurtne kulture *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* (Rettger & Cheplin, 1921.; Rettger i sur. 1935.). Brojne istraživačke studije u tom području, te spoznaje vezane uz zdravstveni boljitak ljudi uzrokovan konzumiranjem fermentiranih mlijeka djelomično su utjecale na povećanje potrošnje takvih proizvoda u mnogim zemljama. Ipak, tko je mogao zamisliti 1950. godine da će se takvi proizvodi uspješno koristiti u terapiji nekih ljudskih bolesti tijekom 80-tih ili 90-tih godina 20. stoljeća. (Shortt, 1999.; Canzi i sur., 2002.).

Probiotički mikroorganizmi

Definicija probiotičkih sojeva bakterija mijenjana je nekoliko puta. Posljednju je definiciju probiotika dao Europski odbor stručnjaka (European Expert Committee): «Živi mikroorganizmi koji konzumirani u određenom broju (najmanje 10^9 CFU po danu) uzrokuju zdravstveni boljitak iznad granica normalne prehrane» (Guarner & Schaafsma, 1998.). Moguće je da će se definicija probiotika ponovo promijeniti u budućnosti, ako neka znanstvena zajednica ustanovi da i inaktivirani probiotički mikroorganizmi mogu imati blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje (Ouwehand & Salminen, 1998; Salminen i sur., 1999.). Zdravstveni boljitak uzrokovan djelovanjem probiotičkih bakterija mora biti znanstveno utvrđen kliničkim studijama i ispitan na ljudima, a mora ih provesti nekoliko neovisnih istraživačkih timova (Ouwehand i sur., 2002.).

Mikrobna populacija probavnog sustava djece i odraslih vrlo je složena te su identificirane brojne bakterijske vrste. Kolonizacija probavnog sustava novorođenčadi započinje odmah nakon rođenja. Sam način rođenja (prolaz kroz porođajni kanal odnosno carski rez) te način hranjenja (dojenje odnosno hranjenje rehidriranim bebi formulama) može utjecati na vrstu bakterijske kolonizacije probavnog sustava. Svaka pojedina osoba ima nekoliko stotina bakterijskih vrsta, s određenim kombinacijama dominantnih sojeva koje je razlikuju od drugih jedinki. Sastav individualne mikrobne populacije mijenja se pod određenim uvjetima (na primjer kod akutne dijareje, tretmana antibioticima), a manje promjene mogu biti izazvane utjecajem prehrane (Guarner & Malagelada, 2003.). Ta je tema intenzivno istraživana i brojne revije donose informacije sa specifičnim osvrtom na probiotičke mikroorganizme i njihovu zdravstvenu primjenu (Robinson, 1991.; Fuller, 1992.; 1997.; Sanders, 1994.; Salminen i sur., 1996a, 1998b, c; Marshall & Tamime, 1997a; Holzapfel i sur., 1998.; Salminen & von Wright, 1998.; Dunne i sur., 1999.; Hirayama & Rafter, 1999.; Lee i sur., 1999.; Tannock, 1999.; Fuller & Perdigon, 2000.; Salminen, 2001.). Danone Vitapole Recherche periodično publicira monografije (Malagelada i sur., 1999.; Denariáz i sur., 1999.; Gibson i sur., 2000.; Hartley i sur., 2001.) i *World Newsletter* (publicirana su 23 izdanja) daju nove informacije zdravstvenih aspekata vezanih uz fermentirana mlijeka.

Bakterije mliječne kiseline (BMK), kvasci, plijesni ili njihove kombinacije se u širokom spektru koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka i sireva. Ipak, samo neki od sojeva imaju probiotička svojstva. Probiotički

mikroorganizmi moraju podnositi djelovanje želučane kiseline i žučnih soli u probavnom sustavu ljudi za razliku od «tradicionalnih» mliječnih starter kultura, te kolonizirati debelo crijevo. U različitim zemljama identificirani su različiti probiotički mikroorganizmi, a u tablici 1 su prikazani neki primjeri korišteni u mliječnim proizvodima.

Tablica 1: Komercijalni probiotički mikroorganizmi u fermentiranim mliječnim proizvodima uključivši napitke, sireve i pasterizirana mlijeka (prema Reid, 2001.)

Table 1: List of probiotic organisms sold in fermented dairy products including drinks, cheese and pasteurised milk (adapted from Reid, 2001)

Bakterijski sojevi Bacterial strains	Tvrtka, država Company, Country
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rhodia, Madison, SAD
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Lincoln, SAD
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Valio, Finska
<i>Lb. reuteri</i> SD2112	McNeil Consumers, SAD
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult, Tokyo, Japan
<i>Lb. casei</i> DN114001	Dannon, Paris, Francuska
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	Nestle, Lausanne, Švicarska
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand, Tokyo, Japan
<i>Lb. acidophilus</i> La-5	Chr. Hansen, Copenhagen, Danska
<i>Lb. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Milwaukee, SAD
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probi, Lund, Švedska
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Essum, Umea, Švedska
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College Cork, Cork, Irska
<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb-12	Chr. Hansen, Copenhagen, Danska
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga, Zama-City, Japan
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand, Tokyo, Japan
<i>Lb. rhamnosus</i> DR20	New Zealand Dairy Board, Palmerston North, N.Z.

Klein i suradnici (1998.) dali su noviju taksonomiju i fiziologiju probiotičkih sojeva laktobacila. Oni probiotičke sojeve laktobacila svrstavaju u tri grupe: (a) *Lb. acidophilus* grupa; (b) *Lb. casei* grupa; i (c) *Lb. reuteri* / *Lb. fermentum* grupa. Većina sojeva *Lb. acidophilus* korištenih u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka bila je identificirana kao *Lb. johnsonii* ili

Lb. gasseri; oba soja su pripadnici *Lb. acidophilus* grupe. Stoga zdravstveno promovirajuća svojstva takvih proizvoda postaju dvojbeni, te se ne može pretpostavljati da svi sojevi *Lb. acidophilus* imaju željena probiotička svojstva (Salminen i sur., 1996b; Hamilton-Miller & Gibson, 1999.; Ouwehand i sur., 1999.). Osim toga, svi komercijalni probiotički fermentirani proizvodi nemaju deklariran broj živih stanica kao ni točan naziv korištenog probiotičkog soja (Hamilton-Miller, 1999.; Sanders & Huis in't Veld, 1999.). U nekim primjerima, istraživači govore o *Lb. rhamnosus* GG kao o *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* subsp. *casei* ili *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Sve do sredine 80-tih godina 20. st. bifidobakterije su taksonomski svrstavane u rod *Lactobacillus*. Prema posljednjoj taksonomskoj klasifikaciji rod *Bifidobacterium* uključuje 29 vrsta. Sojevi bifidobakterija, koji se koriste u mliječnim proizvodima prikazani su u tablici 1. Prema Klein i suradnicima (1998.) većina tih sojeva je *B. animalis*, iako su deklarirani na nekim proizvodima kao *B. longum*. *B. animalis* bio je preimenovan u *B. lactis* kasnih 90-tih (Meile i sur., 1997.), a danas je opet klasificiran kao *B. animalis* (Ca i sur., 2000.). Možda termin 'bifidus' nije najsretnije rješenje zbog stare terminologije (*Lactobacillus bifidus*) pa može izazvati konfuziju.

Malo je dostupnih podataka o korištenju probiotičkih kvasaca (*Saccharomyces boulardii*) u fermentiranom mlijeku (Lourens – Hattling & Viljoen, 2001a). Oni se uglavnom koriste u proizvodnji kefira i kumisa. Najčešće (ostale) bakterije koje se koriste u probiotičkim proizvodima širom svijeta uključuju *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* i *Clostridium butyricum* (Tamime i sur., 1995.; Tamime & Marshall, 1997.; Short, 1997.; Lee i sur., 1999.; Sanders & Huis in't Veld, 1999.; Shortt, 1999.).

Terapijska svojstva biofermentiranih mlijeka

Teorijski, bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije mogu blagotvorno djelovati na «domaćina» putem dva mehanizma: neposrednog djelovanja živih mikrobnih stanica ili posrednog djelovanja putem metabolita tih stanica. U prvom slučaju govori se o probiotičkim mikroorganizmima, a za mikrobnim metabolitima Mitsouka (2000.) predlaže termin «*biogeni*». «*Biogeni*» su definirani kao sastojci hrane nastali mikrobnom aktivnošću koji omogućuju zdravstveni boljitak bez uplitanja probavne mikrobne populacije. Tijekom fermentacije sastojci mlijeka se modificiraju što rezultira nastajanjem različitih

funkcionalnih supstancija kao što su mliječna kiselina, maslačna kiselina, bioaktivni peptidi, β -galaktozidaza te egzopolisaharidi. Ustanovljeno je, da probiotički mikroorganizmi zadržavaju terapijska svojstva i kada se dodaju zajedno s «tradicionalnim» starter kulturama tijekom proizvodnje fermentiranih mlijeka (tablica 2).

Uspješna primjena probiotičkih fermentiranih mlijeka u terapiji određenih humanih bolesti, uključuju sljedeće: (a) adheziju probiotičkih mikroorganizma na humane intestinalne stanice; (b) opadanje fekalne mutagenosti; (c) poboljšanje konstipacije; (d) proizvodnju bakteriocina; (e) utjecaj na površinski karcinom mjehura; (f) utjecaj na mikrobnu populaciju sline. Rezultati ekstenzivnih istraživanja potvrdili su blagotvorno djelovanje fermentiranih mliječnih proizvoda u slučajevima netolerancije laktoze, infekcija probavnog sustava, viralne dijareje, dijareje uzrokovane antibioticima, u prevenciji i tretmanu putničke dijareje te gastritisa uzrokovanog bakterijom *Helicobacter pylori*. Manje konzistentni rezultati dobiveni su proučavanjem djelovanja fermentiranih mlijeka pri utjecaju radioterapije, konstipacije i prevencije karcinoma (Mattila – Sandholm & Salminen, 1998.; Salminen i sur., 1998b; Mattila – Sandholm i sur., 1999a, b; Ouwehand i sur., 1999.; Fondén i sur., 2000.; Petti i sur., 2001.). Postoje i brojne studije nutritivnih aspekata primjene probiotičkih bakterija (Oberhelman i sur., 1999.; Alander i sur., 1999.; Lee i sur., 1999.; Kar, 1999.; Ashar & Prajapati, 1999.; Arunachalam, 1999.; Barone i sur., 2000.; Heyman, 2000.; Arunachalam i sur., 2000.; Ahn i sur., 2000.; Chiang i sur., 2000.; Meydani & Ha, 2000.; Armuzi i sur., 2001.; Collins, 2001.; Volpe i sur., 2001.; Kawase i sur., 2001.; Perdigon i sur., 2001.; Reid i sur., 2001.; Madsen (2001.); MacFarlane & Cummings (2002.); Gil & Rueda (2002.); Mastretta i sur., (2002.); Locascio i sur., (2002.); Ouwehand i sur., (2002.)).

Drugi aspekti, vezani za poboljšanje zdravlja, uključuju prebiotike koji su definirani kao «neprobavljivi sastojci hrane koji povoljno utječu na domaćina selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu, što poboljšava zdravlje domaćina» (Gibson & Roberfroid, 1995.). Većina potencijalnih prebiotičkih sastojaka hrane su ugljikohidrati bazirani na oligosaharidima (Hartemink, 1999.; Gibson & Angus, 2000.). Kombinacija probiotičkih mikroorganizama i prebiotičkih sastojaka hrane poznata je pod imenom sinbiotik.

Tablica 2: Primjeri korisnog djelovanja probiotičkih fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje (Ouwehand et al., 1999.)

Table 2: A summary of some health-promoting activities in humans associated with probiotic fermented milks (Ouwehand et al., 1999.)

Blagotvorni učinak Beneficial effect	Mogući mehanizam djelovanja Possible mechanism of action
Poboljšanje tolerancije laktoze Improved lactose tolerance	Smanjena koncentracija laktoze u proizvodu, laktazna aktivnost BMK, aktivna laktaza prisutna u proizvodu Lower lactose concentration in product, lactase activity of LAB, active lactase present in product
Suzbijanje dijareje uzrokovane antibioticima te putničke dijareje Suppression of antibiotic associated diarrhoea and travellers' diarrhoea	Suzbijanje patogenih probiotičkim bakterijama i « <i>biogenima</i> » (mliječna kiselina, laktoferin, laktoperoksidaze), kompetitivna inhibicija, normalizacija intestinalne mikrobne populacije Suppression of pathogens by probiotic bacteria and « <i>biogenics</i> » (lactic acid, lactoferrin, lactoperoksidase), competitive exclusion, normalisation of intestinal microflora
Suzbijanje gastroenteritičkog rotavirusa Suppression of rotavirus gastroenteritis	Modulacija sastava intestinalne mikrobne populacije, indukcija ekspresije intestinalnog mucin gena, obnavljanje oštećene permeabilnosti epitela, imunomodulacija Modulation of intestinal microflora composition, induction of intestinal mucin gene expression, restoration of disturbed epithelium permeability, immunomodulation
Kontrola upalnih bolesti crijeva Control of inflammatory bowel diseases	Normalizacija intestinalne mikrobne populacije, imunomodulacija koja dovodi do uravnoteženog imuno odgovora, opskrba epitelnih stanica debelog crijeva kratkolančanim masnim kiselinama i vitaminima (folati) Normalisation of intestinal microflora, immunomodulation which leads to balanced immune response, supply of short chain fatty acids and vitamins (folate) to the colonic epithelium

<p>Redukcija faktora rizika za nastajanje karcinoma debelog crijeva</p>	<p>Redukcija toksičnih/mutagenih reakcija u crijevima (redukcija aktivnosti fekalnih enzima uključenih u mutagenu aktivaciju i proizvodnju genotoksičnih tvari, opskrba epitelnih stanica debelog crijeva kratkolančanim masnim kiselinama i vitaminima (folati), smanjenje dekonjugacije žučnih soli i njihove sekrecije, poboljšanje nutritivne bioraspoloživosti te antikarcinogena aktivnost sastojaka mlijeka (konjugirana linolna kiselina, bioaktivni peptidi, glutation)</p>
<p>Reduction in risk factors for colon cancer</p>	<p>Reduction of toxigenic/mutagenic reactions in the gut (reduction of faecal enzymatic activities involved in mutagen activation and production of genotoxic compounds), supply of SCFA and vitamins (folate) to the colonic epithelium, bile salt deconjugation and secretion, improved nutrient bioavailability and anticarcinogenic activity of milk components (CLA, bioactive peptides, glutation)</p>

Komercijalni probiotički fermentirani mliječni proizvodi

Kriterije izbora probiotičkih mikroorganizama za komercijalnu proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda detaljno su opisali Marshal i Tamime (1997b), a neki aspekti mogu uključiti: (a) otpornost na želučanu kiselinu i proteolitičke enzime, (b) stabilnost na prilično brzu promjenu pH-vrijednosti tijekom proizvodnje i tijekom perioda čuvanja, (c) otpornost prema žučnim kiselinama, i (d) da ne utječu negativno na okus i teksturu proizvoda. S obzirom da potječu iz probavnog sustava, probiotičkim bakterijama mlijeko često nije pogodan supstrat rasta, pa su brzina rasta i proizvodnja kiseline prespori te se javlja suokus, kao na primjer u proizvodnji velike količine octene kiseline (Saxelin i sur., 1999.; Saarela i sur., 2000.; Mattila – Sandholm i sur., 2002.). Da bi se to izbjeglo, probiotičke bakterije u komercijalnoj upotrebi često se kombiniraju s tradicionalnim kulturama kao što je jogurtna kultura ili kulturama za proizvodnju sireva.

Većina komercijalnih probiotičkih fermentiranih mlijeka na tržištu širom svijeta (oko 80 – 100) proizvedena je kombinacijom netradicionalnih i tradicionalnih starter kultura o čemu detaljno govore brojni autori (Hoier, 1992.; Tamime i sur., 1995.; Tamime & Marshall, 1997.; Holzapfel i sur., 1997.; Tamime, 1998.) (tablica 3). Stoga se probiotički mikroorganizmi koriste i kao terapijski dodatak u fermentiranim mliječnim proizvodima (vidi reviju Lourens – Hattingh & Viljoen, 2001b).

Za poboljšanje teksture i senzorskih svojstava probiotičkih fermentiranih mlijeka često se koriste bakterije koje proizvode egzopolisaharide (EPS). Poznato je nekoliko bakterija mliječne kiseline koje proizvode EPS. Njihova točna funkcija je još uvijek nejasna, iako se smatra da djeluju na adhezijska svojstva stanice te njenu zaštitu u različitim eko sistemima. Bakterije mliječne kiseline koje proizvode EPS imaju važnu ulogu u mljekarskoj industriji zbog njihovog utjecaja na teksturu, osjet u ustima i stabilnost fermentiranih mlijeka. Osim tehnološke funkcionalnosti, za neke se EPS, koje te bakterije proizvode, smatra da imaju blagotvorno fiziološko djelovanje.

Pretpostavlja se, da povećanje viskoznosti uzrokovano EPS može povećati vrijeme preživljavanja mikrobne populacije fermentiranih mlijeka u probavnom sustavu i na taj način omogućiti kolonizaciju probiotičkim bakterijama.

Zbog specifičnog sastava i male razgradivosti EPS mogu djelovati kao prebiotici i tako blagotvorno utjecati na domaćina selektivno stimulirajući rast i aktivnost korisnih intestinalnih bakterija u debelom crijevu. Neki od tih EPS spojeva sadrže gluko- i/ili frukto-oligosaharide te mogu hidrolizom proizvesti kratkolančane masne kiseline u probavnom sustavu, i tako blagotvorno zdravstveno i nutritivno djelovati poput prebiotika. Neki od korisnih zdravstvenih djelovanja pojedinih EPS su antitumorna i imunomodulacijska aktivnost te snižavanje kolesterola. Ova je tema ekstenzivno proučavana (IDF, 1998.; Cerning & Marshall, 1999.; De Vuyst i sur., 2001.; Ruas – Madieto i sur., 2002.; Jolly i sur., 2002.) pa je dan prikaz mikrostrukture mezofilnih i termofilnih fermentiranih mlijeka (Tamime & Marshall, 1997.; Tamime & Robinson, 1999.).

Na kvantitativna i kvalitativna svojstva EPS spojeva utječu sljedećih aspekti: (a) soj mikroorganizma; (b) sastav podloge za uzgoj i/ili faktora rasta; i (c) procesni uvjeti koji uključuju temperaturu i vrijeme fermentacije.

Tijekom 2001. godine, znanstvenim radovima prezentiranim na prvom Simpoziju EPS bakterija mliječne kiseline iznesena su najnovija dostignuća na tom području, uključivši i njihovu strukturu te primjenu u mljekarskoj industriji (Monsan i sur., 2001.; de Vuyst i sur., 2001.; Boels i sur., 2001.; Jolly & Stingele, 2001.; Degeest i sur., 2001.; Duboc & Mollet, 2001.; Marshall i sur., 2001.).

Tablica 3: Neki primjeri probiotičkih fermentiranih mlijeka proizvedeni u različitim zemljama (prema Tamime i sur., 1995.; Tamime, 1998.; Sanders & Huis in't Veld, 1999.; Lee i sur., 1999.; Gomes & Xavier Malcata, 1999.)

Table 3: Some examples of probiotic fermented milk products available in different countries (according Tamime et al, 1995; Tamime, 1998; Sanders & Huis in't Veld, 1999; Lee et al, 1999, Gomes & Xavier Malcata, 1999)

Proizvod Product	Država Country	Mikroorganizmi ^a Microorganisms ^a
I. Fermentirana mlijeka I. Fermented milks		
ABT, Biogarde, Philus, LC ProBio*, Bifidus*	Njemačka Velika Britanija Danska Švedska Slovenija*	<i>Lb.acidophilus</i> + <i>B.lactis</i> ^b ili <i>bifidum</i> + <i>S.thermophilus</i>
ACT4 LCA*	Austrija Slovenija*	kao ABT + <i>Lb.casei</i>
Vifit, Gefilus	Njemačka Velika Britanija Nizozemska Belgija Finska	jogurt ^c + <i>B.bifidum</i> + <i>Lb.acidophilus</i> + <i>Lb.rhamnosus</i> GG
Bioaktiv* Vivis*	Hrvatska*	jogurt ^c + <i>Lb.rhamnosus</i> GG
SymBalance	Hrvatska*	jogurt ^c + <i>B.longum</i>
Actimel	Švedska	<i>Lb.casei</i> + <i>Lb.reuteri</i> + <i>Lb.acidophilus</i> + <i>Bifidobacteria</i> ^d
Biola	Francuska	
Gaio	Norveška Danska Velika Britanija	jogurt ^c + <i>Lb.casei</i> soj <i>imunitas</i> ^e <i>B.lactis</i> + <i>Lb.rhamnosus</i> + <i>Lb.acidophilus</i> <i>S.thermophilus</i> + <i>E.faecium</i>
BRA Meiji Bulgaria Yoghurt LB81 Bifidus Yoghurt	Njemačka Finska Švedska Japan Japan	<i>B.infantis</i> + <i>Lb.reuteri</i> + <i>Lb.acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038 + <i>S. thermophilus</i> 1131 <i>B. longum</i> BB536

II. Fermentirani mliječni napitci II. Fermented dairy beverages		
Onaka He GG Yakult	Japan Japan Brazil neke azijske zemlje	jogurt + <i>Lb.rhamnosus</i> GG <i>Lb.casei</i> soj <i>Shirota</i>
Caldus Vitagen	Japan Malezija Singapur	<i>B.longum</i> + <i>Lb.acidophilus</i> <i>Lb.acidophilus</i>
Aktifit LC1 ili LC1 GO	Švicarska mnoge europske zemlje	kao ABT + <i>Lb.rhamnosus</i> GG ^f <i>Lb.acidophilus</i> ^g ili <i>Lb.helveticus</i>

^aLb.=*Lactobacillus*; S.=*Streptococcus*; B.=*Bifidobacterium*; E.=*Enterococcus*

^btrenutno preklasificiran kao *B. animalis* / Currently it is reclassified as *B. animalis* (Cai i sur., 2000.)

^cjogurt=*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S. thermophilus*

^dčešće su nađene jogurtne starter kulture nego bifidobakterije (Sanders & Huis in't Veld, 1999.)

Yogurt starter cultures have been found in the product rather than bifidobacteria

^e*Lb. casei*+*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* su jedini nađeni u proizvodu (Sanders & Huis in't Veld, 1999.)

Lb. casei + *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were the only organisms identified in the product

^f*Lb. rhamnosus* je jedini mikroorganizam u proizvodu (Sanders & Huis in't Veld, 1999.)

Lb. rhamnosus was the only organism present in the product

^g*Lb. johnsonii*+*S.thermophilus* su nađeni u proizvodu (Sanders & Huis in't Veld, 1999.)

Lb. johnsonii + *S. thermophilus* were found in the product

* usmeno priopćenje / personal communication

Djelomična karakterizacija kakvoće probiotičkih fermentiranih mlijeka

Na velikom broju tržišta trenutno su potrošačima dostupni brojni različiti probiotički mliječni proizvodi: pasterizirano mlijeko, sirevi, sladoledi, mlijeko u prahu za dojenčad i fermentirana mlijeka (Tamime & Marshall, 1997.). Fermentirani mliječni proizvodi su najpopularniji proizvodi koji se koriste u industriji za unos probiotičke mikrobne populacije u ljudski probavni sustav. Sredinom 90-tih godina uspostavljen je suradnički istraživački program između SAC (Scottish Agricultural College) i HRI (the Hannah Research Institute) radi poboljšanja kvalitete (kemijskog sastava, mikrobiološke analize, reoloških svojstava i senzoričke) različitih tipova novorazvijenih mliječnih proizvoda (npr. jogurt s biljnim uljem, kishk, jogurt proizveden sa zamjenicama masti, kefir i probiotička fermentirana mlijeka). U tim radovima prikazani su neki aspekti kakvoće probiotičkih fermentiranih mlijeka (La Torre, 1997.; Hartley i sur., 2001.; La Torre i sur., 2002.).

U prvim pokusima proizvodnje fermentiranih mlijeka korištene su monokulture *Bifidobacterium* spp.: *B. adolescentis* NCFB 2230, *B. bifidum* NCFB 2715, *B. breve* NCFB 2205 i *B. longum* NCFB 2259 (National Collection of Food Bacteria); *B. longum* BB 46 i *B. bifidum* BB11 (Chr.

Hansen); *B. longum* BBL i BL i *B. infantis* 410 (Rhodia); *B. longum* 2 i 913 (Visby). Kakvoća proizvoda proizvedenih NCFB sojevima nije zadovoljila ni minimalne zahtjeve; pH vrijednosti bile su granične (npr. između 4,8 i 5,4), došlo je do velikog izdvajanja sirutke, koagulum je bio vrlo slab, a u nekim slučajevima ni miris ni okus nisu bili zadovoljavajući. Zapaženo je lagano poboljšanje kakvoće proizvoda kada je mlijeko bilo obogaćeno prebiotičkim dodatkom Raftaline®. Ipak, prosječni pH bio je u granicama 4,79 – 5,91 nakon 24 sata inkubacije (s izuzetkom *B. longum* BBL i 2; gdje je pH=4,6). S obzirom da rezultati nisu bili zadovoljavajući, odlučeno je u daljnjim pokusima koristiti mješovitu starter kulturu koja će sadržavati BMK i različite sojeve bifidobakterija (tablica 4).

Tablica 4: Mikroorganizmi u komercijalnim mješovitim starter kulturama

Table 4: The microorganisms used in commercial mixed starter cultures

Kod Code	Proizvođa Supplier	Tip ¹ Type ²	<i>Bifidobacterium</i> spp.				<i>Lactobacillus</i> spp.		<i>Streptococcus thermophilus</i>
			<i>bifidum</i>	<i>lactis</i> ³	<i>longum</i>	<i>infantis</i>	<i>acidophilus</i>	<i>bulgaricus</i> ⁴	
AB	Chr.Hansen	SO	✓	✓			✓		
AC/BL	Rhodia	SO			✓	✓	✓		
DVB-100	SBI ⁵	SO	✓				✓		✓
MSK 2	Visby	DS			✓		✓		✓
AB1 1 ⁶	Chr.Hansen	SO	✓	✓			✓		✓
ABT 3	Chr.Hansen	SO	✓	✓			✓		✓
MSK13 2 ⁶	Visby	SO		✓	✓		✓		✓
MY 087 ⁷	Rhodia	SO						✓	✓

¹SO=smrznuto i osušeno / freeze dried, DS=duboko smrznuto / deep frozen

²trenutno preklasificiran kao *B. animalis* / Currently it is reclassified as *B. animalis* (C a i i sur., 2000.)

³*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

⁴SBI= Systems Bio-Industries Ltd.

⁵starter kulture koje proizvode egzopolisaharide / The starter cultures produces exopolysaccharide (EPS) material

⁶jogurtna starter kultura korištena kao kontrolna / This is a yoghurt starter culture, which is used as a control.

simbol (✓) označava prisustvo mikroorganizma u starter kulturi

The symbol (✓) denotes the presence of the microorganism in the starter culture

Kakvoća fermentiranih mlijeka proizvedenih mješovitim bakterijskim kulturama bila je puno bolja od kakvoće napitaka proizvedenih monokulturama i rezultati se mogu sumirati:

- Acidifikacija mlijeka (suha tvar 14,5 g/100g, proteini 5,5 g/100g, mast 1,5 g/100g) do pH vrijednosti ~ 4,4 trajala je između 6 i 10 odnosno 13 i 22 sata.
- Analiza organskih kiselina pokazala je da starter kulture proizvode znatne količine mliječne kiseline, a samo dvije kulture (AB i AC/BL) proizvode velike količine octene kiseline (3229 µg/g kultura AB i 2794 µg/g kultura AC/BL).

- Broj živih stanica u svježe proizvedenim i skladištenim proizvodima nije bio jednak. U dvije kulture (AB i AC/BL) pokazivao je porast, u tri kulture (DVB-100, ABT 3 i MSKB 2) ostao je konstantan, a u dvije kulture (ABT 1 i MSK 2) je opadao. Broj živih stanica *Lb. acidophilus* tijekom proizvodnje je rastao, ali u nekim se proizvodima (DVB-100, MSK 2, ABT1 i 3 te MSKB) nakon čuvanja broj stanica smanjio. Broj živih stanica *S. thermophilus* u svim starter kulturama dobro je rastao tijekom proizvodnje i dobro preživljavao tijekom čuvanja. Slične su rezultate prezentirali Rogelj i suradnici (1998.) koji su proučavali bakterijski rast i preživljavanje sojeva *Str. thermophilus*, *Lb. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. tijekom čuvanja komercijalnih fermentiranih mlijeka. Jedini soj koji je tijekom ukupnog perioda čuvanja zadržao jednak nivo preživljavanja bio je *Str. thermophilus* koji je preživljavao u broju većem od 10^8 cfu/mL tijekom četiri tjedna čuvanja. Broj živih bakterijskih stanica *Lb. acidophilus* ostao je u skladu s preporučenim limitom od 10^6 cfu/mL tijekom perioda čuvanja, dok je najpromjenjiviji bio soj *Bifidobacterium* spp. Usprkos dobrom preživljavanju ovih bakterija tijekom čuvanja, nivo preživljavanja je u većini slučajeva bio ispod preporuke od 10^6 cfu/mL, jer su prosječne vrijednosti broja živih bakterija nakon proizvodnje bile u granicama od $4,6 \times 10^2$ do $2,3 \times 10^6$ /mL.

La Torre i sur. (2002.) su posebnu pažnju posvetili proučavanju reoloških i senzorskih osobina fermentiranih mlijeka proizvedenih s različitim komercijalnim probiotičkim i jogurtnim kulturama (Tablica 4) i ustanovili da organoleptički rezultati pokazuju značajne razlike, vezano za korištenu starter kulturu, kod svih parametara (aroma, okus, paokus, sinereza), s izuzetkom viskoznosti. Bilo je očigledno da kiseli karakter jako utječe na profil okusa nezaslađenih i prirodnih fermentiranih mlijeka te da količina proizvedene octene kiseline ima najveći utjecaj na senzorska svojstva proizvoda.

Probiotički napitci od kozjeg mlijeka

Probiotički fermentirani napitci mogu se proizvoditi i od drugih vrsta mlijeka pa tako i od kozjeg. Kozje mlijeko ima neke nutritivne i zdravstvene prednosti pred kravljim mlijekom (Božanić i sur, 2002.), prije svega bolju probavljivost i antialergijska svojstva. Ono fermentacijom djelomično gubi svojstven okus, neprihvatljiv mnogim potrošačima, pa fermentacija kozjeg

mlijeka probiotičkim bakterijskim kulturama, uz eventualni dodatak prebiotika, može rezultirati proizvodom velike nutritivno-zdravstvene vrijednosti.

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu istraživana je fermentacija kozjeg mlijeka pa je proizveden jogurt, probiotički jogurt, fermentirano acidofilno i fermentirano bifido mlijeko te kefir od kozjeg mlijeka s dodatkom mlijeka u prahu, koncentrata proteina sirutke i inulina i uspoređen s kravljim mlijekom. U pokusima su korištene DVS kulture: jogurtna kultura YC 180, mješovita kultura *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. ABT 4, *Lactobacillus acidophilus* La 5 i *Bifidobacterium bifidum* Bb 12 (Chr. Hansen) te zamrznuta kefirna kultura KC 1 (Visby) odnosno kefirna zrnca iz domaćinstva.

Rast bakterija jogurtne kulture YC 180 u proizvodima od kravljeg i kozjeg mlijeka bio je podjednak. Odnos broja laktobacila i streptokoka mijenjao se tijekom fermentacije. Streptokoki su rasli puno brže bez obzira na vrstu mlijeka te dodatke u mlijeko (mlijeko u prahu i koncentrat proteina sirutke), a broj živih stanica bio je u prosjeku za 1,3 logaritamskih jedinica veći od broja laktobacila. Dodatci su stimulirali rast laktobacila tijekom fermentacije obje vrste mlijeka. Viskoznost svih proizvedenih jogurta od kozjeg mlijeka bila je niža u odnosu na viskoznost jogurta od kravljeg mlijeka, a senzorska ocjena jogurta od kozjeg mlijeka bila je slabija (Božanić i sur, 2003a).

Slični su rezultati dobiveni i kod probiotičkog jogurta. Rast bakterija *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. u kozjem mlijeku bio je vrlo dobar i usporediv s rastom u kravljem mlijeku, a odnos Str : Bif : Lb na kraju fermentacije u svim je proizvodima bio podjednak: 40:33:27. Tijekom čuvanja broj streptokoka i bifidobakterija nije opadao, a u proizvodima s dodatkom inulina došlo je čak i do laganog povećanja broja bifidobakterija tijekom čuvanja ($\Delta \log N=0,6$). Preživljavanje laktobacila bilo je lošije u fermentiranom kozjem mlijeku u odnosu na kravlje mlijeko. Senzorska svojstva jogurta od kozjeg mlijeka su tijekom ukupnog perioda čuvanja bolje ocijenjena u odnosu na jogurte od kravljeg mlijeka (Božanić i sur, 2002a).

Fermentacija kozjeg mlijeka sojem *Lactobacillus acidophilus* La 5 bila je brža, i broj laktobacila na kraju fermentacije bio je veći (u prosjeku za oko 0,5 logaritamskih jedinica) u odnosu na kravlje mlijeko. Prema Hebert i suradnicima (1998.) bakterija *Lactobacillus acidophilus* usprkos svojoj β -

galaktozidaznoj aktivnosti slabo raste u mlijeku. Razlog tome može biti vezan uz nisku koncentraciju slobodnih aminokiselina i malih peptida u mlijeku. S obzirom da kozje mlijeko sadrži više manjih peptida od kravljeg, to bi mogao biti razlog boljeg rasta te bakterije u kozjem mlijeku. Najbolji utjecaj na bakterijski rast imao je dodatak koncentrata proteina sirutke. Broj živih stanica laktobacila tijekom čuvanja u proizvodu od kozjeg mlijeka je rastao i bio je veći nego u proizvodu od kravljeg mlijeka. Senzorska svojstva proizvoda od kozjeg mlijeka, s izuzetkom kontrolnog, su tijekom čuvanja dobivala bolje ocjene u odnosu na proizvode od kravljeg mlijeka (Božanić i sur, 2003b).

Na kraju fermentacije provedene bifidobakterijama kao i tijekom čuvanja, broj bifidobakterija bio je veći u proizvodima od kozjeg mlijeka. U obje vrste mlijeka bifidobakterije su bolje rasle u proizvodima s dodacima. Senzorska svojstva svih bifido proizvoda od kozjeg mlijeka tijekom ukupnog perioda čuvanja bolje su ocjenjena u odnosu na proizvode od kravljeg mlijeka (Božanić i Tratnik, 2001.).

Kefir od kozjeg mlijeka imao je lošija senzorska svojstva u odnosu na kefir od kravljeg mlijeka, bez obzira na dodatke i korištenu kulturu odnosno zrnca (Božanić i sur, 2002c i 2002d).

Općenito, u ovim istraživanjima svi fermentirani proizvodi od kozjeg mlijeka imali su mekšu konzistenciju u odnosu na iste od kravljeg mlijeka. Konzistencija kontrolnih proizvoda od kozjeg mlijeka (bez dodataka) bila je gotovo tekuća.

Zaključak

Fermentirana mlijeka mogu se uspješno proizvoditi korištenjem različitih vrsta mlijeka i mješovitih kultura bakterija mliječne kiseline i probiotičkih mikroorganizama. Premda je u proteklom razdoblju tijekom brojnih istraživanja odgovoreno na mnoga pitanja vezana uz tehnološke osobine fermentiranih mlijeka, fiziološka svojstva kultura i probiotičkih organizama, još uvijek se o mehanizmima djelovanja tih bakterija na zdravstveni boljitak ljudi malo zna. Zato bi buduća istraživanja mogla uključiti:

- odgovarajuću internacionalnu definiciju jogurta i drugih fermentiranih mlijeka uključivši probiotičke proizvode;

- više pravilno dizajniranih kliničkih studija utemeljenih na zdravstvenom boljitku ljudi; *in vitro* rezultati ne mogu uvijek biti potvrđeni *in vivo*, a rezultati istraživanja provedenih na životinjama ne mogu se izravno prevesti na ljude; problem je i u generaliziranju rezultata dobivenih od velikog broja vrsta korištenih mikroorganizama, a u nekim slučajevima broj probiotičkih mikroorganizama u kliničkim studijama nije prikazan. Kliničke studije bi trebalo provoditi na ljudima različitih rasa i u različitim državama kako bi se moglo govoriti o mogućem zdravstvenom boljitku ljudske populacije općenito.
- kako starter kulture polimeriziraju laktozu u mlijeku za proizvodnju egzopolisaharidnih materijala;
- što potiče mikroorganizme da proizvode bakteriocine i koji su njihovi mehanizmi kontrole patogena u crijevima;
- patogenost određenih kultura zahtijeva daljnja razjašnjenja.

PROBIOTIC FERMENTED DAIRY PRODUCTS

Summary

Fermented dairy products are the most popular vehicle used in the industry for the implantation of the probiotic microflora in humans. Therefore this paper provides an overview of new knowledge on probiotic fermented dairy products. It involves historical developments, commercial probiotic microorganisms and products, and their therapeutic properties, possibilities of quality improvement of different types of newly developed fermented dairy products together with fermented goat's milk products.

Key words: probiotics, fermented milk

Zahvala

Zahvaljujemo se časopisu *European J. Clinical Nutrition* što nam je dopustio da se u ovom radu koristimo dijelom članka A. Tamime [Fermented milks: a historical food with modern applications - a review; (2002.) vol. 56, Suppl. 4, S2-S15].

Literatura

- AHN Y., KIM B. H. & KIM H. U. (2000.): Effect of acidophilus milk on the reduction of serum cholesterol level of Korean adults. *Korean J. Ani. Sci.* 42, 223-234. (*Dairy Sci. Abstr. J.* 4791 (2000) 62, 664)
- ALANDER M., SATOKARI R., KORPELA R., SAXETLN M., VILPPONEN-SALMELA T., MATTILA-SANDHOLM T. & VON WRIGHT A. (1999.): Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 351-354.
- ARMUZI A., CREMONINI F., OJETTI V., BARTOLOZZI F., CANDUCCI F., CANDELLI M., SANTARELLI L., CAMMAROTA G., DE LORENZO A., POLA P., GASBARRINI G. & GASBARRINI A. (2001.): Effect of *Lactobacillus*GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion* 63, 1- 7.
- ARUNACHALAM K. (1999.): Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* 19, 1559-1597.
- ARUNACHALAM K., GILL H. & CHANDRA RK. (2000.): Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HNO19). *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 263-267.
- ASHAR MN. & PRAJPATI J.B. (1999.): Evaluation of hypolipemic effect of feeding *Lactobacillus acidophilus* V3 in human subjects. *J. Dairying Food Home Sci.* 18, 78-84.
- BARONE C, PETTINATO R, AVOLA E, ALBERTI A, GRECO D, FAILLA P & ROMANO C (2000.): Comparison of three probiotics in the treatment of diarrhea in mentally retarded children. *Minerva Pediatr.* 52, 161-165.
- BOELS I C., VAN KRANENBURG R., HUGENHOLTZ J., KLEEREBEZEM M. & DE VOS WM. (2001.): Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 11, 723 -732.
- BOTTAZZI, V. (1983.): Food and feed production with microorganisms. *Biotechnology*, 5, 315-363.
- BOŽANIĆ R., ROGELJ I., TRATNIK LJ. (2002a): Fermentacija i čuvanje probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo*, 52 (2), 93-111.
- BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ. (2001.): Quality of Cow's and Goat's Fermented Bifido Milk during Storage. *Food Technology and Biotechnology*, 39 (2), 109-144.
- BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ., DRGALIĆ I. (2002b): Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti (Goat's milk: characteristics and possibility) *Mljekarstvo* 52 (3) 207-235.
- BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ., HERCEG Z., HRUŠKAR M. (2002c): The quality of goat's and cow's kefir; IDF Symposium on New developments in technology of fermented milk products, Kolding, Danska, 3-5. lipnja 2002. str. 14.

BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ., HERCEG Z., HRUŠKAR M. (2002d): The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk; 26th IDF World Dairy Congress, Pariz, Francuska, 24-27. rujana 2002.

BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ., HERCEG Z., HRUŠKAR M. (2003a) Quality of cow and goat acidophilus milk with different supplementation. *Acta Alimentaria* (u tisku)

BOŽANIĆ R., TRATNIK LJ., HRUŠKAR M. (2003b) Influence of culture activity on aroma components in yoghurts produced from goat's and cow's milk. *Acta Alimentaria* 32 (2) 151-160.

CAI Y.M., MATSUMOTO M. & BENNO Y. (2000.): *Bifidobacterium lactis* (Meile i sur., 1997.) is subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka, 1969., Scardovi i Trovatelli, 1974.). *Microbiol. Immunol.* 44, 815-820.

CANZI E., CASIRAGHI M.C., ZANCHI R., GANDOLFI R., FERRARI A., BRIGHENTI F., BOSIA R., CRIPPA A., MAESTRI P., VESLEY R. & BIANCHI SALVADORI B. (2002.): Yogurt in the diet of the elderly: a preliminary investigation into its effect on the gut ecosystem and lipid metabolism. *Lait*, 82, 713-723.

CERNING J. & MARSHALL V.M.E. (1999.): Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Rec. Res. Microbiol.* 3, 195-209.

CHIANG B.L., SHEIH Y.H., WANG L.H., LIAO C.K. & GILL H.S. (2000.): Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HNO19): optimisation and definition of cellular immune responses. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 849-855.

COLLINS J.K. (2001.): Demonstration of functional properties of probiotic lactic acid bacteria. *Ind. Latte* 37, 39-61.

DEGEEST B., VANINGELEM F. & DE VUYST L. (2001.): Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 747-757.

DENARIAZ G., DUGAS B., KASPER H., SCBMUCKER D. & SCHREZENMIER J. (ured.) (1999.): *Immunity and Probiotics*. Nutrition and Health Collection. Montrouge: John Libbey Eurotext.

DUBOC P. & MOLLET B. (2001.): Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J.* 11, 759-768.

DUNNE C., MURPHY L., FLYNN S., O'MAHONY L., O'HALLORAN S., FEENEY M., MORRISSEY D., THORNTON G., FITZGERALD G., DALY C., KIELY B., QUIGLEY EMM., O'SULLIVAN GC., SHANABAN F. & COLLINS J.K. (1999.): Probiotics: from myth to reality. -Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 279-292.

FONDÉN R., MOGENSEN G., TANAKA R., SALMINEN S. (2000.): Effect of Culture-Containing Dairy Products on Intestinal Microflora, Human Nutrition and Health - Current Knowledge and Future Perspectives. Bulletin if IDF N° 352/2000.

- FULLER R. (ured.) (1992.): *Probiotics 1: The Scientific Basis*. London: Chapman & Hall.
- FULLER R. (ured.) (1997.): *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*. London: Chapman & Hall.
- FULLER R. & PERDIGON G. (ured.) (2000.): *Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic.
- GIBSON G.R. & ANGUS F. (ured.) (2000.): *LFRA Ingredients Handbook: Prebiotics and Probiotics*. Leatherhead: Leatherhead Food Research Association.
- GIBSON G.R. & ROBERFROID M.B. (1995.): Dietary modulation of the human microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J.Nutr.* 125, 1401-1412.
- GIBSON G., HEBER D., MEYDANI S., POSTAIRE E. & SANDERS M.E. (ured) (2000.): *Functional Dairy Products*. Nutrition and Health Collection. Montrouge: John Libbey Eurotext.
- GIL A. & RUEDA R. (2002.): Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutr. Res. Reviews*, 15, 263-292.
- GOMES A.M.P. & XAVIER MALCATA F. (1999.): *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science&Technology*, 10, 139-157.
- GUARNER F., SCHAAFSMA GJ. (1998.): Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 237-238.
- GUARNER F., MALAGELADA JR (2003.): Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 360, 512-519.
- HAMILTON-MILLER J.M.T. (1999.): Probiotics-panacea or nostrum? *Br. Nutr. Foundation Nutr. Bull.* 21, 199-208.
- HAMILTON-MILLER J.M.T & GIBSON GR (1999.): Efficacy studies of probiotics: a call for guidelines- nutrition discussion forum. *Br. J. Nutr.* 82. 73-75.
- HARTEMINK R. (1999.): *Prebiotic Effects of Non-Digestible Oligo- and Poly- Saccharides*. PhD Thesis, Landbouwniversiteit Wageningen. Wageningen: Ponsen & Looijen.
- HARTLEY D., MARCOS A., ROSADO J., RUBEGLIO E. & TANNOCK G. (2001): *Fermented Foods and Healthy Digestive Functions*. Montrouge: John Libey Eurotext.
- HEBERT E.M., FERNANDEZ MURGA M.L., DE VALDEZ G.F., DE GIORI G.S. (1998.): Proteolysis plays a key role for the growth of *Lactobacillus acidophilus* in milk; *Milshwissenschaft* 53 (4) 184-190.
- HEYMAN M. (2000.): Effect of lactic add bacteria on diarrheal diseases. *J. Am. College Nutr.* 19, 137s-146s.
- HIRAYAMA K. & RAFTER J. (1999.): The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 391-394.
- HOIER E. (1992.): Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Australia* 44, 418-420.

HOLZAPFEL W.H., SCHILLINGER U., DU TOIT M. & DICKS L. (1997.): Systematics lactic acid bacteria with reference to modern phenotypic and genomic methods. *Microecol. Ther.* 10, 1-10.

HOLZAPFEL W.H., HABERER P., SNEL J., SCHILLINGER U. & HUIS IN'T VELD JHJ (1998.): Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85-101.

IDF (1998.): *Texture of Fermented Milk Products and Dairy Desserts*. Special Issue no. 9802. Brussels: International Dairy Federation.

JOLLY L. & STINGELE F. (2001.): Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene cluster in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 733-745.

JOLLY L., VINCENT S.J.F., DUBOC P., NEESER J.R. (2002.): Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 367-374.

KAR T. (1999.): *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in lactose intolerance individuals. *Environ. Ecol.* 17, 351-355.

KAWASE M., HASHIMOTO H., HOSODA M., MORITA H. & HOSONO A. (2001.): Effect of fermented milk with *Streptococcus thermophilus* TMC1543 on serum lipid levels induced by high-cholesterol diet in adult subjects. *Milchwissenschaft* 56, 496-499.

KLEIN G., PACK A., BONAPARTE C. & REUTER G. (1998.): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103-125.

LA TORRE L.R. (1997.): Some aspects of the production and quality of fermented milks using bifidobacteria. PhD Thesis, University of Glasgow, UK.

LA TORRE L.R., TAMIME A.Y. & MUIR D.D. (2002.): Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial 'bio' and yoghurt starter cultures. *Milchwissenschaft* (in press).

LEE Y.K., NOMOTO K., SALMINEN S. & GORBACH S.L. (1999.): *Handbook of Probiotics*. New York: John Wiley.

LOCASCIO M., GONZALEZ S., APELLA M.C., DE LABANDA E.B. & OLIVER G. (2002.): Probiotic bacteriotherapy in chronic infantile diarrhea. *Interciencia* 27, 365-368.

LOURENS-HATTINGH A. & VILJOEN B.C. (2001a): Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Res. Int.* 34, 791-796.

LOURENS-HATTINGH A. & VILJOEN B.C. (2001b): Review: Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* 11, 1-17.

MALAGELADA J.R., MARTINEZ A., RAFTER J., SAVIANO D. & MATEOS J.A. (ured.) (1999.): *Yoghurt: Eighty Years of Active Research for Health*. Nutrition and Health Collection. Montrouge: John Libbey Eurotext.

MACFARLANE G.T. & CUMMINGS J.H. (2002.): Probiotics, infection and immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15, 501-506.

- MADSEN K.L. (2001.): The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Canadian J. of Gastroenterology*, 15, 817-822.
- MARSHALL V.M.E. & TAMIME A.Y. (1997a): Physiology and biochemistry of fermented milks. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2. izdanje, ured. BA Law, 153-192. London: Blackie Academic & Professional.
- MARSHALL V.M.E. & TAMIME A.Y. (1997b): Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *Int. J. Dairy Technol.* 50, 35 -41.
- MARSHALL V.M.E., LAWS A.P., LEVANDER F., RADSTROM V., DE VUYST L., DEGEEST B., VANINGELGEM F., DUNN H. & ELVIN M. (2001.): Exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria cluster into groups according to their EPS structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 433-437.
- MASTRETTA E., LONGO P., BALBO L., RUSSO R MAZZACCARA A. & GIANINO P. (2002.): Effect of *Lactobacillus* GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. *J. Pediatric Gastroenterology Nutr.* 35, 527-531.
- MATTILA-SANDHOLM T. & SALMINEN S. (1998.): Up-to-date on probiotics in Europe. *Gastroenterol. Int.* 11 (1), 8-16.
- MATTILA-SANDHOLM T., MATTO J. & SAARELA M. (1999a): Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* 9, 25-35.
- MATTILA-SANDHOLM T., BLUM S., COLLINS J.K., CRITTENDEN R., DE VOS W., DUNNE C., FONDEN R., GRENOV G., LSOLAURI E., KIELY B., MARTEAU P., MORELLI L., OUWEHAND A., RENIERO R., SAARELA M., SALMINEN S., SAXELIN M., SCHIFFRIN E., SHANAHAN F., VAUGHAN E. & VON WRIGHT A. (1999b): Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 393-399.
- MATTILA-SANDHOLM T., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. (2002.): Technological challenges for futur probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12, 173-182.
- MEILE L., LUDWIG W., RUEGER U., GUT C., KAUFMANN P., DASEN G., WENGER S. & TEUBER M. (1997.): *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.* 20, 57-64.
- MEISEL H. & BOCKELMANN W. (1999.): Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 207 - 215.
- MEČNIKOV E. (1910.): *Proiongation of Life*, revidirano od 1907, prevod. C Mitchell. London: Heinemann.
- MEYDANI S.N. & HA W.H. (2000.): Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 861-872.
- MITSUOKA T. (2000.): Significance of dietary modification of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci. Microflora* 19, 15-25.

- MONSAN P., BOZONNET S., ALBENNE C., JOUCLA G., WILLEMONT R.M. & REMAD-SIMEON M. (2001.): Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 675-685.
- OBERHELMAN R.A., GILMAN R.H., SHEEN P., TAYLOR D.N., BLACK R.E., CABRERA L., LESCANO A.G., MEZA R. & MADICO G. (1999.): A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undemourished Peruvian children. *J. Pediatr.* 134, 15-20.
- OBERMAN H. & UBUDZISZ Z. (1998.): Fermented milks. In: *Microbiology of Fermented Foods*, 2. izdanje, ured. BJB Wood, 308-350. London: Blackie Academic & Professional.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J. (1998): The Health Effects of Cultured Milk Products with Viable and Non-viable Bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 749-758.
- OUWEHAND A.C., KIRJAVAINEN P.V., SHORTT C. & SALMINEN S. (1999.): Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9, 43-52.
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S.J., ISOLAURI E. (2002.): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- PERDIGON G., FULLER R. & RAYA R. (2001.): Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* 2, 27 -42.
- RAŠIĆ J. & KURMANN J.A. (1983.): *Bifidobacteria* and their Role. *Experientia Supplementum* Vol. 39, 3-7. Basel: Birkhauser.
- REID G., BRUCE A.W., FRASER N., HEINEMANN C., OWEN J. & HENNING B. (2001.): Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Immunol. Med. Microbiol.* 30, 49-52.
- REID G. (2001.): Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Reid.pdf>
- RETTGER L.F. & CHEPLIN H.A. (1921.): *A Treatise on the Transformation of the Intestinal Flora with Special Reference to the Implantation of Bacillus acidophilus*. New Haven: Yale University Press.
- RETTGER L.F., LEVY M.N. & WEINSTEIN L. (1935.): *Lactobacillus acidophilus* and its Therapeutic Application. New Haven: Yale University Press.
- ROBINSON R.K. (ured) (1991.): *Therapeutic Properties of Fermented Milks*. London: Elsevier Applied Science.
- ROGELJ I., MIKLIČ-ANDERLIČ A., BOGOVIČ-MATIJAŠIĆ B. (1998.): The survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. during the storage of fermented milk. *Mljekarstvo*, 48, 27-36.
- RUAS-MADIEDO P., HUGENHOLTZ J., ZOON P. (2002.): An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12, 163-171.

- SAARELA M., MOGENSEN G., FONDÉN R., MÄTTÖ J., MATTILA-SANDHOLM T. (2000.): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- SALMINEN S. (2001.): Human studies on probiotics: aspects of scientific documentation. *Scand. J. Nutr.* 45, 8-12.
- SALMINEN S., OUWEHAND A., BENNO Y., LEE Y.K. (1999): Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10, 107-110.
- SALMINEN S. & VON WRIGHT A. (ured.) (1998.): *Lactic Acid Bacteria*, 2. izdanje. New York: Marcel Dekker.
- SALMINEN S., ISOLAURI, E. & SALMINEN E. (1996a): Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains for future challenge. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 347 -358.
- SALMINEN S., LAINE M., VON WRIGHT A., VUOPIO-VARKILA J., KORHONEN T. & MATTILA-SANDHOLM T. (1996b): Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Biosci. Microflora* 15, 61-67.
- SALMINEN S., OUWEHAND A.C. & ISOLAURI E. (1998a): Clinical application of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 563-572.
- SALMINEN S., BOULEY C., BOUTRON- RUAULT M.C., CUMMINGS J.H., FRANCK A., GIBSON G.R., LSOLAURI E., MOREAU M.C., ROBERFROID M. & ROWLAND I. (1998b): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80 (1), S147 -S171.
- SALMINEN S., VON WRIGHT A., MORELLI L., MARTEAU P., BRASSART D., DE VOS WM, FONDEN R., SAXELIN M., COLLINS K., MOGENSEN G., BIRKELAND S.E. & MATTILA-SANDHOLM T. (1998c): Demonstration of safety of probiotics: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93 -106.
- SANDERS M.E. (1994.): Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: *Functional Food*, ured. I. Goldberg, 294-322. New York: Chapman & Hall.
- SANDERS M.E. & HUIS IN'T VELD J (1999.): Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293-315.
- SAXELIN M., GRENOV B., SVENSSON U., FONDÉN R., RENIERO R., MATTILA-SANDHOLM T. (1999.): The technology of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 387-392.
- SHORTT C. (1997.): Innovative ingredients for optimum gut health. *Eur. Food Drink Rev.* Winter, 31-35.
- SHORTT C. (1999.): The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 411-417.

TAMIME A.Y. (1998.): (Tendenze del consumo Europeo di prodotti probiotici a base di latte fermentato.) *Latte* 23 (1), 52-59.

TAMIME A.Y. (2002.): Microbiology of starter cultures. In: Dairy Microbiology Handbook, ed. RK Robinson, 261-366. New York: J. Wiley & Sons.

TAMIME A.Y. & MARSHALL V.M.E. (1997.): Microbiology and technology of fermented milks. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2. izdanje, ured. BA Law, 57-152- London: Blackie Academic & Professional.

TAMIME A.Y. & ROBINSON R.K. (1999.): *Yoghurt Science and Technology*, 2. izdanje Cambridge: Woodhead Publishing.

TAMIME A.Y., MARSHALL V.M.E. & ROBINSON RK (1995.): Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 62, 151-187.

TANNOCK G.W. (ured.) (1999.): *Probiotics- A Critical Review*. Wymondham: Horizon Scientific Press.

VOLPE R., NIITYNEN L., KORPELA R., SIRTORI C., BUCCI A., FRAONE N. & PAZZUCCONI F. (2001.): Effects of yoghurt enriched with plant sterols on serum lipids in patients with moderate hypercholesterolaemia. *Br. J. Nutr.* 86, 233-239.

DE VUYST L., DE VIN F., VANINGETGEM F. & DEGEEST B. (2001.): Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 687-707.

Adrese autora – Author’s addresses:

Dr.sc. Adnan Y. Tamime
Dairy Science & Technology Consultant
24 Queens Terrace, Ayr KA71DX
Scotland-United Kingdom
Dr.sc. Rajka Božanić
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
Prof. dr.sc. Irena Rogelj
Biotehniška fakulteta, Domžale, SLO

Prispjelo – Received: 18. 04. 2003.

Prihvaćeno – Accepted: 20. 06. 2003.