

SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA IN DIFFERENT FERMENTED MILK TYPES

PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA U FERMENTIRANOM MLIJEKU RAZLIČITOG PORIJEKLA

MATIJEVIC, Bojan & PERKOVIC, Ana

Abstract: *This work examines the survival of two species of bacteria, *Lb. acidophilus* La-5 and *Lb. casei* Lc-1, in fermented cow's and oat milk at 6 °C during 28 days. It also examines the possibilities for obtaining new fermented probiotic products from oat milk. Results of this research show that bacteria *Lb. acidophilus* La-5 has good survival rate in fermented cow's milk, but in fermented oat milk the viable cells count has dropped under 10^6 CFU/mL on the 21st day of storage. Bacterium *Lb. casei* Lc-1 has good survival rate both in fermented cow's and oat milk.*

Key words: *cow's milk, oat milk, lactobacilli, survival*

Sažetak: *U ovom radu je ispitano preživljavanje dva soja bakterija *Lb. acidophilus* La-5 i *Lb. casei* Lc-1 u fermentiranom kravljem i zobenom mlijeku pri 6 °C tijekom 28 dana te mogućnosti dobivanja novih fermentiranih probiotičkih proizvoda iz zobenog mlijeka. Rezultati istraživanja pokazuju dobro preživljavanje bakterije *Lb. acidophilus* La-5 u fermentiranom kravljem mlijeku, ali u fermentiranom zobenom mlijeku broj živih stanica je pao ispod 10^6 CFU/mL već 21. dan čuvanja. Bakterija *Lb. casei* Lc-1 dobro preživljava u fermentiranom kravljem i zobenom mlijeku.*

Ključne riječi: *kravlje mlijeko, zobeno mlijeko, laktobacili, preživljavanje*



Authors' data: Bojan Matijevic, dr.sc. viši predavač, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, bojan.matijevic@vuka.hr; Ana Perkovic, ing., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, perkovic.a@gmail.com

1. Uvod

Posljednjih dvadesetak godina u proizvodnji hrane sve se više primjenjuju probiotici jer su rezultati različitih istraživanja ukazali na činjenicu da hrana koja sadržava probiotike osim prehrabene ima i direktnu i/ili indirektnu zdravstvenu vrijednost. Probiotici se koriste u prevenciji ili kao dopuna u liječenju mnogih vrsta bolesti (gastrointestinalnih, urogenitalnih infekcija, karcinoma i sl.), a fermentirana mlijeka ili probiotički pripravci u obliku kapsula pokazali su dobra terapijska svojstva.[1] [2] [3] Definicija probiotika glasi: „Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore“.[4] Teorijski, probiotici mogu blagotvorno djelovati na „domaćina“ putem dva mehanizma: neposrednog djelovanja živih mikrobnih stanica ili posrednog djelovanja putem metabolita tih stanica. [5]

Kao probiotici se najčešće koriste bakterije iz roda *Lactobacillus*, nešto manje iz roda *Bifidobacterium*, a mogu se primjenjivati i bakterije mliječne kiseline te i neki kvasci.[5] [6] [7] Blagotvoran učinak bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* na zdravlje ljudi usko je povezan sa sojem, brojem živih bakterijskih stanica u probiotičkom proizvodu i dnevnoj dozi. Minimalni broj živih stanica koje je potrebno svakodnevno unositi u organizam je 10^6 CFU/mL ili g proizvoda (terapijski minimum), a poželjno je da to bude 10^9 CFU te je u razvoju probiotičkih proizvoda izazov postići što veći broj živih bakterijskih stanica.[8] [9]. Osim toga takvi proizvodi imaju određeni rok trajanja, a pod utjecajem različitih čimbenika broj živih bakterijskih stanica u proizvodu može značajno varirati (kemijski sastav supstrata u kojem probiotici rastu, temperatura fermentacije, toksičnost produkata metabolizma probiotičkih bakterija, kompeticija s drugim mikroorganizmima u proizvodu, pH, sadržaj mliječne i octene kiseline, otopljeni kisik i H_2O_2 te temperatura čuvanja).[8] [12] [13] Stoga je prilikom razvoja novih proizvoda potrebno voditi računa i o spomenutim čimbenicima, a sve s ciljem zadržavanja broja živih stanica iznad terapijskog minimuma.[10] [11]

Najzastupljeniji probiotički proizvodi su fermentirana mlijeka, ali neke osobe ne konzumiraju fermentirano mlijeko zbog zdravstvenih razloga (intolerancija na laktozu, preosjetljivost na proteine ili druge sastojke mlijeka) ili vegetarijanskog načina prehrane.[14] [15] [16] [17] Kako bi se pronašla alternativa mlijeku razvijaju se zamjene na biljnoj bazi, a jedna od mogućih sirovina je zob.[18] [19] Proizvodi dobiveni od zobi sadrže topljiva i netopljiva vlakna koja reguliraju razinu kolesterola i lipida u krvi te direktno utječu na prevenciju srčanih oboljenja.[20]

Zobeno mlijeko se može fermentirati s bakterijama mliječne kiseline ili s probiotičkim bakterijama.[19] Fermentacijom s probiotičkim bakterijama dodatno se povećava nutritivna i zdravstvena vrijednost zobenog mlijeka.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati preživljavanje dva soja probiotičkih bakterija *Lactobacillus acidophilus* La-5 i *Lactobacillus casei* Lc-1 u fermentiranom kravljem i zobenom mlijeku tijekom 28 dana hladnog čuvanja te ispitati mogućnosti zobenog mlijeka kao zamjene kravljem mlijeku za nove fermentirane probiotičke proizvode.

2. Materijali i metode

2.1 Uzorci fermentiranog mlijeka

U radu je korišteno komercijalno UHT kravlje mlijeko (Dukat, Hrvatska) i zobeno mlijeko (Alnatura, Njemačka). Uzorci mlijeka su fermentirani s DVS monokulturama (Chr. Hansen, Danska), *Lactobacillus acidophilus* La-5 ili *Lactobacillus casei* Lc-1. Inokulum je priređen tako da je u 100 mL sterilnog mlijeka, temperature 37 °C otopljen 1 g mikrobne kulture uz vrijeme aktivacije od 30 minuta. Nakon aktivacije mlijeko je inokulirano s 2,5% (v/v) probiotičke monokulture. Fermentacija svih uzoraka mlijeka vođena je pri 37 °C do približno pH 4,6. Kako bi se utvrdila stabilnost probiotičkih bakterija uzorci fermentiranog mlijeka su čuvani pri 6 °C tijekom 28 dana.

2.2. Kemijske i mikrobiološke analize

Aktivna kiselost fermentiranog mlijeka određena je pH-metrom WTW 320 (Wissenschaftlich – Technische Werkstätten, Njemačka).[21]

Broj živih stanica (CFU/mL) *Lactobacillus acidophilus* La-5 ili *Lactobacillus casei* Lc-1 određen je standardnom metodom na MRS agaru (Biolife, Milano, Italija) nakon tri dana inkubacije na 37 °C. Inkubacija je provedena u mikroaerofilnim uvjetima koji su postignuti prelijevanjem inokuliranog MRS agara dodatnim slojem MRS.[22] Tijekom pohrane na temperaturi od 6 °C uzorci fermentiranog mlijeka su analizirani 1, 7, 14, 21 i 28 dana.

2.3. Obrada podataka

Pokusi su ponovljeni tri puta. Za dobivene rezultate su izračunate prosječne vrijednosti i odstupanja ($\bar{X} \pm \sigma$), a za utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika je korišten ANOVA test (SPSS 16.0).

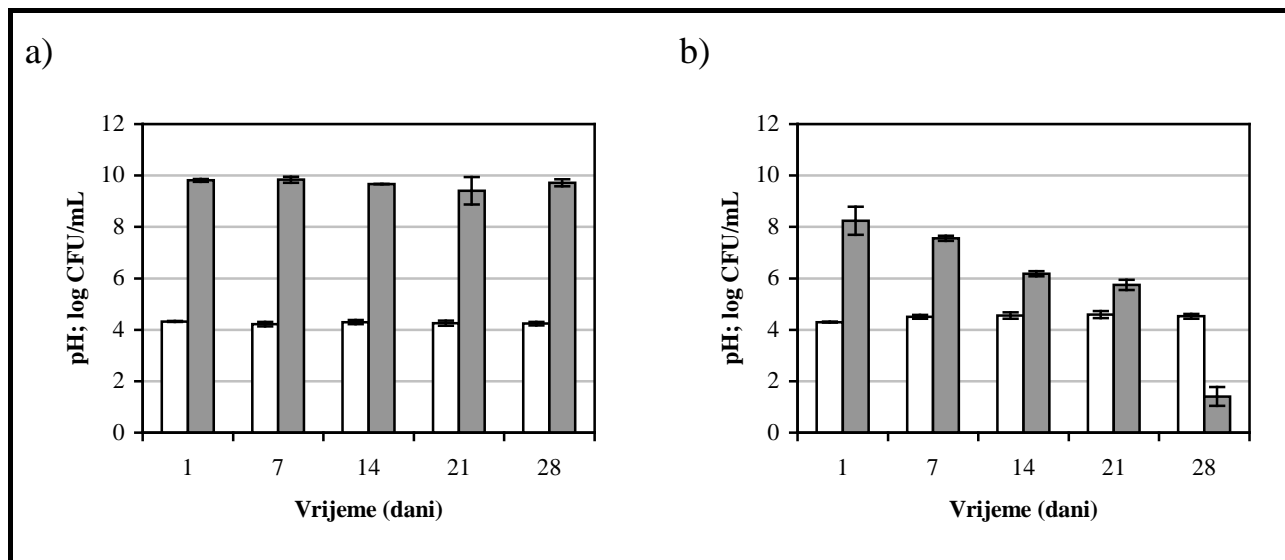
3. Rezultati i rasprava

Uzorci kravljeg i zobenog mlijeka su fermentirani s dva soja probiotičkih bakterija *Lactobacillus acidophilus* La-5 ili *Lactobacillus casei* Lc-1. Fermentacija je vođena do približno pH 4,6, kad je zaustavljena hlađenjem na temperaturu hladnjaka (6 °C) te su pri toj temperaturi uzorci fermentiranog mlijeka čuvani 28 dana.

Prvi dan čuvanja uzorci mlijeka fermentirani s *Lactobacillus acidophilus* La-5 imali su približno istu pH-vrijednost (oko 4,3) bez obzira na vrstu mlijeka (slika 1). Kod fermentiranog kravljeg mlijeka nije bilo statistički značajnih promjena pH-vrijednosti tijekom 28 dana čuvanja ($P=0,496$). Po završetku čuvanja pH-vrijednost fermentiranog kravljeg mlijeka je iznosila oko 4,2 jedinice (slika 1). Slične pH-vrijednosti kravljeg mlijeka s *Lactobacillus acidophilus* La-5 tijekom 28 dana čuvanja navode i prijašnja istraživanja.[23]

Suprotno, kod zobenog mlijeka fermentiranog s *Lactobacillus acidophilus* La-5 (slika 1) već nakon 7. dana čuvanja došlo je do statistički značajnog porasta pH-vrijednosti ($\Delta pH=0,3$) koja se zadržala do samog kraja čuvanja ($P=0,035$). Tijekom čuvanja

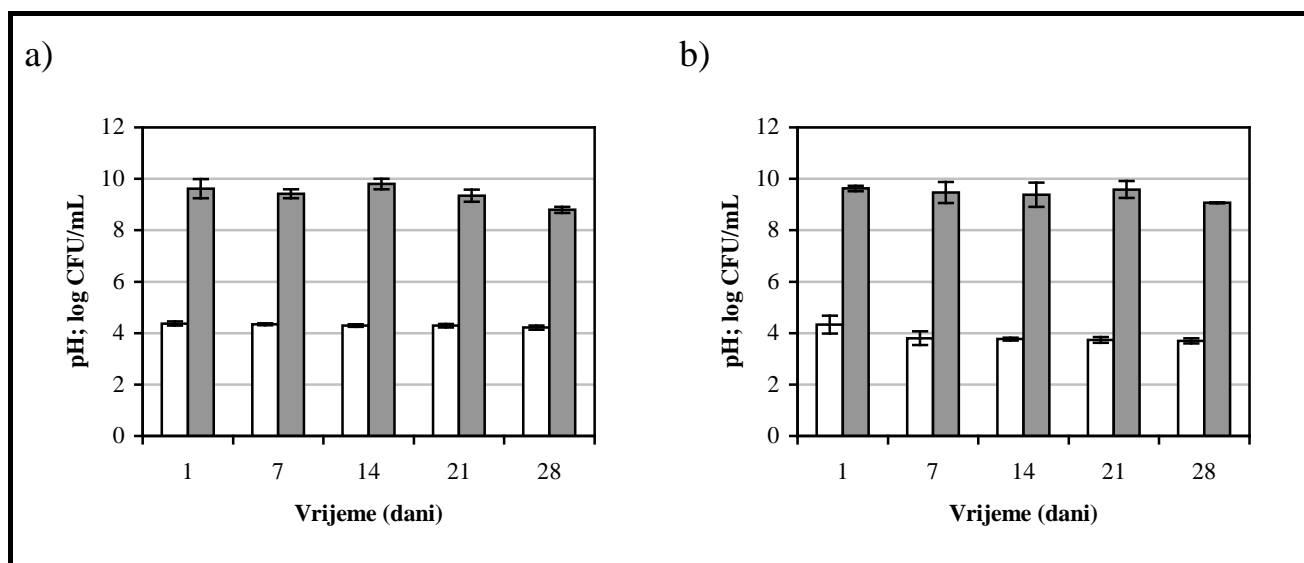
fermentiranog mlijeka dolazi do pada pH-vrijednosti kao posljedica postacidifikacije, ali kod fermentiranog zobnog mlijeka pH ukazuje na lošu aktivnost bakterije *Lactobacillus acidophilus* La-5.[24] Literatura navodi nešto niže pH-vrijednosti (oko 4,2) fermentiranog zobnog mlijeka tijekom čuvanja što nije potvrđeno u provedenim pokusima (oko 4,6).[19]



Slika 1. Promjena pH-vrijednosti (□) i broja živih bakterija (log CFU/mL) (■) *Lactobacillus acidophilus* La-5 u fermentiranom kravljem mlijeku (a) i zobnom mlijeku (b) tijekom 28 dana hladnog čuvanja.

Prvog dana čuvanja broj živih stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 bio je nešto veći kod uzoraka fermentiranog kravljeg mlijeka (oko 9,81 log CFU/mL) (slika 1) u odnosu na fermentirano zobeno mlijeko (oko 8,24 log CFU/mL). Tijekom čuvanja od 28 dana nije bilo statistički značajnih promjena u broju živih stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 (slika 1) u fermentiranom kravljem ($P=0,296$). Dobiveni rezultati su u skladu s vrijednostima koje navodi literatura.[23] Međutim, kod fermentiranog zobnog mlijeka dolazi do statistički značajnog pada broja živih stanica *Lactobacillus acidophilus* La-5 tijekom čuvanja (slika 1) ($P<0,05$). Već 21. dan čuvanja broj živih stanica je pao ispod terapijskog minimuma 10^6 CFU/mL što je potrebno zadovoljiti da bi se neki proizvod mogao deklarirati kao probiotički.[8] Provedeni pokusi pokazuju da odabir vrste mlijeka ima statistički značajnog utjecaja na preživljavanje bakterije *Lactobacillus acidophilus* La-5 ($P<0,05$). U prijašnjim istraživanjima fermentacije zobnog mlijeka s jogurtom kulturom i *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, dobiveni su slični rezultati kao i u ovom radu.[19] Već nakon 15. dana čuvanja broj živih stanica *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 je pao ispod 10^5 CFU/mL. Razlog lošijem preživljavanju bakterije *Lactobacillus acidophilus* u zobnom mlijeku mogu biti zahtjevi koje je potrebno zadovoljiti kao što su: ugljikohidrati, proteini, nezasićene masne kiseline, derivati nukleinskih kiselina, minerali, odgovarajuća temperatura ili niska koncentracija kisika.[25] Jedno od mogućih rješenja kojim bi se omogućilo preživljavanje *Lactobacillus acidophilus* La-5 u fermentiranom zobnom mlijeku je mikroinkapsulacija.[24]

Svi uzorci mlijeka fermentiranog s *Lactobacillus casei* Lc-1 imali su 1. dan čuvanja pH-vrijednost oko 4,3 jedinice (slika 2). Kod fermentiranog kravljeg mlijeka ta vrijednost se zadržala tijekom 28 dana čuvanja i nije bilo statistički značajnijih promjena ($P=0,096$). U fermentiranom zobenom mlijeku već 7. dana čuvanja došlo je do statistički značajnijeg pada pH-vrijednosti (oko 3,8) koja se zadržala do samog kraja čuvanja ($P=0,021$). Razlika u pH-vrijednosti je posljedica postacidifikacije i manjeg pufer kapaciteta zobenog mlijeka u odnosu na kravlje mlijeko. Slične pH-vrijednosti mlijeka fermentiranog s *Lactobacillus casei* Lc-1 tijekom 28 dana čuvanja navodi i literatura.[6]



Slika 2. Promjena pH-vrijednosti (□) i broja živih bakterija (log CFU/mL) (■) *Lactobacillus casei* Lc-1 u fermentiranom kravljem mlijeku (a) i zobenom mlijeku (b) tijekom 28 dana hladnog čuvanja.

Obje vrste mlijeka (slika 2) fermentiranog s *Lactobacillus casei* Lc-1 1. dana čuvanja sadržavale su isti broj živih bakterija (oko 9,62 log CFU/mL). Tijekom čuvanja od 28 dana *Lactobacillus casei* Lc-1 je dobro preživljavao bez obzira na vrstu fermentiranog mlijeka. Na kraju čuvanja, 28. dan, fermentirano kravlje mlijeko sadržavalo je nešto manje živih bakterija *Lactobacillus casei* Lc-1 (oko 8,80 log CFU/mL) u odnosu na fermentirano zobeno mlijeko (oko 9,07 log CFU/mL). U svim uzorcima fermentiranog mlijeka promjena broja živih bakterijskih stanica *Lactobacillus casei* (od 0,55 do 0,85 Δ log CFU/mL) tijekom 28 dana čuvanja bila je slična vrijednostima koje navodi literatura (od 0,75 do 1,85 Δ log CFU/mL).[6]

Utvrđena razlika u broju bakterija se nije pokazala statistički značajnom te se može zaključiti da vrsta mlijeka ne utječe na preživljavanje bakterije *Lactobacillus casei* Lc-1 odnosno spomenuta bakterija dobro preživljava u obje vrste mlijeka ($P=0,772$).

4. Zaključci

Rezultati istraživanja pokazuju da odabir vrste mlijeka utječe na preživljavanje bakterije *Lactobacillus acidophilus* La-5, ali nema utjecaja na *Lactobacillus casei* Lc-1 tijekom hladnog (6 °C) čuvanja. Nakon 28 dana čuvanja *Lactobacillus acidophilus* La-5 je dobro preživljavao u fermentiranom kravljem mlijeku, a broj živih stanica na kraju čuvanja je iznosio oko 9,72 log CFU/mL. Međutim, u fermentiranom zobenom mlijeku bakterija *Lactobacillus acidophilus* La-5 je loše preživljavala i već 21. dana čuvanja broj živih stanica je pao ispod vrijednosti terapijskog minimuma (10^6 CFU/mL). Bakterija *Lactobacillus casei* Lc-1 dobro preživljava tijekom 28 dana čuvanja u fermentiranom kravljem (oko 8,80 log CFU/mL) i zobenom mlijeku (oko 9,07 log CFU/mL). Fermentirano zobeno mlijeko s *Lactobacillus casei* Lc-1 je prihvatljiva zamjena fermentiranom kravljem mlijeku za dobivanje probiotičkih proizvoda.

5. Literatura

- [1] Falagas, M.E.; Petros, I.R. & Makris, G.C. (2008). Bacterial interference for the prevention and treatment of infections, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 31 (6)
- [2] Samaržija, D.; Tudor, M.; Prtilo, T.; Dolenčić-Špehar, I.; Zamberlin, Š. & Havranek, J. (2009). Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje, *Mljekarstvo*, 59 (1), 28-32, 1846-4025
- [3] Doyon, M. & Labrecque, J. (2008). Functional foods: a conceptual definition, *Br. Food J.*, 110 (11), 1133-1149, 0007-070X
- [4] Šušković, J. (2009). Zašto je uspostavljen koncept funkcionalne prehrane?, Drugi stručni skup "Funkcionalna hrana u Hrvatskoj", Zbornik radova, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, str. 2-15, Zagreb
- [5] Gillian, E.; Gardiner, G.E.; Ross, P.R.; Kelly, P.M.; Collins, J.K. & Fitzgerald, G. (2002). Microbiology of therapeutic milks, In: Dairy microbiology handbook, 3rd edition, Robinson, R.K., 431-478, John Wiley and Sons, Inc., 0-471-38596-4, New York
- [6] Gueimonde, M.; Delgado, S.; Mayo, B.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A. & de los Reyes-Gavilán C.G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks, *Food Res. Int.*, 37, 839–850, 0963-9969
- [7] Prado, F.C.; Parada, J.L.; Pandey, A. & Socol, C.R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages, *Food Res. Int.*, 41, 111–123, 0963-9969
- [8] Lacroix, C. & Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18 (2), 176-183, 0958-1669
- [9] Walstra, P.; Wouters, J.T.M. & Geurts, T.J. (2006). Dairy Science and Technology, 2nd ed., 17-26, Taylor and Francis Group, 0-8247-2763-0, London
- [10] Kearney, N.; Stanton, C.; Desmond, C.; Coakley, M.; Collins, K.J.; Gerald Fitzgerald, G. & Ross, R.P. (2008). Challenges Associated with the Development of Probiotic-Containing Functional Foods, In: Handbook of Fermented Functional

Foods, 2nd Edition, Farnworth, E.R., 25-70, CRC Press Taylor & Francis Group, 0-8493-1372-4, Boca Raton

[11] Siroá, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B. & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance, *Appetite*, 51, 456-467, 1095-8304

[12] Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, *Lait*, 85, 39-56, 0023-7302

[13] Vasiljevic, T.; Kealy, T. & Mishra, V.K. (2007). Effects of β -Glucan Addition to a Probiotic Containing Yogurt, *J. Food Sci. Biotechnol.*, 72 (7), C405-C411, 1226-7708

[14] Robinson, R.K.; Tamime, A.Y.; Wszolek, M. (2001). Microbiology of fermented milks, In: *Applied Dairy Microbiology*, 2nd edition, 367-430, Marth, E.H. & Steele, J.L., 0-2847-0536-X, Marcel Dekker, Inc., New York

[15] Matijević, B.; Božanić, R.; Tratnik, Lj. & Jeličić, I. (2008). Utjecaj koncentrata proteina sirutke na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija u sirutki, *Mljekarstvo*, 58 (3), 243-255, 1846-4025

[16] Özer, B.H. & Kirmaci, H.A. (2010). Functional milks and dairy beverages, *Int. J. Dairy Sci.*, 63 (1), 1-15, 1811-9751

[17] Abdel-Salam, A.M. (2010). Functional Foods: Hopefulness to Good Health, *Am. J. Food Tech.*, 5 (2), 86-99, 1557-4571

[18] Durand, A.; Franks, G.V. & Hosken, R.W. (2003). Particle sizes and stability of UHT bovine, cereal and grain milks, *Food Hydrocolloids*, 17, 671-678, 0268-005X

[19] Mårtenson, O.; Oste, R. & Holst, O. (2002). The effect of yoghurt culture on survival of probiotic bacteria in an oat-based, non-dairy products. *Food Res. Int.*, 35, 775- 784, 0963-9969

[20] Bazzano, L.A. (2008). Effects of soluble dietary fiber on low-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease risk, *Curr. Atherosclerosis Rep.*, 10 (6), 473-477, 1523-3804

[21] Sabadoš, D. (1996). Ispitivanje jogurta, kiselog mlijeka, mlaćenice i kefir, U: Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, II. dopunjeno izdanje, 166-169, Hrvatsko mljekarstvo društvo, 96089-2-9, Zagreb, 166-169.

[22] ISO (2006). Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony-count technique at 37 °C, *ISO 20128*, 1-11, 07.100.30

[23] Božanić, R.; Rogelj I. & Tratnik, Lj. (2001). Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk, *Milchwissenschaft*, 56, 618-622, 0026-3788

[24] Matijević, B. (2009). *Utjecaj različitih čimbenika na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija u rekonstituiranoj slatkoj sirutki*, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb, 637.043.3

[25] Božanić, R.; Pletikapić, G. & Lovković, S. (2008). Influence of temperature and glucose addition on growth and survival of bacteria from BCT culture in soymilk, *Mljekarstvo*, 58 (2), 171-179, 1846-4025



Photo 106. Wine tasting / Degustacija vina