

PROBIOOTIKUMIDE SISALDUS EESTI PIIMATOODETES

K. Juhkam, P. Elias, K. Laikoja

ABSTRACT. *The presence of probiotics in Estonian dairy products.* The aim of the study was to assess the multiplicity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the Estonian probiotic dairy products. The number of health benefits have been claimed for probiotic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Suggested minimum numbers of probiotic bacteria at consumption is 10^6 CFU/g. In order to assess viability of probiotic bacteria, the Christian Hansen's Laboratory methods were used.

Dairy products (n=36) of 3 Estonia dairy enterprises were investigated. Study covered selective enumeration and assessment of survival probiotic bacteria in bioyoghurts (n=18), biokefirs (n=5) and cultured milks (n=13). Viable numbers of probiotic bacteria in the probiotic products varied greatly including some products with very low *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* counts. The majority of the bioyoghurts and biokefirs contained viable counts above 10^6 per g even at the best before use period, but cultured milk products contained only 10^4 CFU/g. The survival of the *Lactobacillus acidophilus* strains during storage was lower in low fat milk products, but *Lactobacillus acidophilus* was more resistant to the environment conditions compared to *Bifidobacteria*.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, probiotic dairy products, selective enumeration, survival.

Sissejuhatus

Piimatoodetes kasutatavad probiootikumid on defineeritavad kui elusad mikroorganismid, mis mõjutavad soodsalt peremeesorganismi, aidates säilitada või taastada soolestiku mikrofloora tasakaalu (Shah, 2000). Enim kasutatavad probiootilised tüved Eesti piimatoodetes on *Lactobacillus acidophilus* ja *Bifidobacterium* spp. nn AB-kultuuridena. Kasutatakse ka *L. rhamnosus* GG'd ja *Lactobacillus fermentum* ME-3. Probiootiliste toodete edukas müük algas 1994. aastast, kui ettevõtted hakkasid lisama oma toodetele probiootilisi kultuure.

Erinevatel probiootikumidel on erinev toime peremeesorganismile. *Lactobacillus acidophilus*'el on väidetavalt vähemalt kuut liiki kasulikke omadusi: seedefloora tasakaalustamine ja diarröade ravi, laktoositalumatuse leevendamine, positiivne mõju immuunsüsteemile, toiduallergiatega ravi, kolesteroolisisalduse vähendamine vereplasmas, vähi ennetamine (Chandan, 1999). *Bifidobacterium* spp. annab oma panuse inimorganismi seedetrakti mikrofloora tasakaalustamiseks.

Probiootikumi mõju inimesele sõltub sissevõetavast doosist. Elusate, elujõuliste mikroobide hulk probiootilises tootes on otseses seoses toote mõjususega (Songisepp, 2002). Terapeutiliseks miinimumiks loetakse $1 \cdot 10^6$ elusat mikroobirakku grammis tootes (Kailasapathy, Chin, 2000). Eri autorid on leidnud, et probiootilised bakterid ei suuda tihti tootes kuni realiseerimisaja lõpuni ellu jääda või ei suuda säilida piisavates kontsentratsioonides, mis tagaksid probiootiliste toodete tarbijale vähemalt nende bakterite terapeutilise miinimumi taseme (Shah, 2000). Eri riikides on kehtestatud erinevad normid elusrakkude hulga kohta tootes: nt Prantsusmaal ja Hispaanias $5 \cdot 10^8$ mikroobi/g; Hiinas, Jaapanis ja Argentiinas $1 \cdot 10^7$ mikroobi/g; Portugalis $1 \cdot 10^6$ mikroobi/g (Songisepp, 2002). Samas Saksamaal, Itaalias, Põhja-Ameerikas ja Kanadas eeldatakse, et toode sisaldaks vähemalt $1 \cdot 10^6$ mikroobi/g (Kailasapathy, Chin, 2000).

Eestis pole toiduainetes leiduvaid probiootikumi doose analüüsitud ja on teadmata, kas seni on piimatoodetes probiootilisi baktereid ühesugustes hulkades ja kas seda võiks lugeda piisavaks. Käesoleva uurimistöö eesmärgiks seati määrata kodumaistes piimatoodetes *Lactobacillus acidophilus*'e ja *Bifidobacterium* spp. sisaldus toodete realiseerimisaja vältel.

Võtmesõnad: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, probiootilised piimatooted, selektiivne loendamine, eluvõimelisus.

Materjal ja meetodika

Käesolevas uurimistöös uuriti Eestis tegutsevatest piimatööstustest kolme ettevõtte probiootilistes toodetes *Lactobacillus acidophilus*'e ja *Bifidobacterium* spp. arvukust toodete ostmise päeval ja realiseerimisaja lõpus, säilitatuna 4 °C juures. Analüüsiti 36 erinevat toodet, millest 18 olid biojogurtid ja 18 hapupiimajoogid, sh biokeefirid. Uuriti ühtekokku 134 proovi (tabel 1). Tooted osteti Tartu kauplustest. Katsed viidi läbi 2003. aasta jaanuari-, veebruari- ja märtsikuus EPMÜ toiduteaduse osakonna mikrobioloogia laboris.

Uurimistöös kasutati kommertsiaalseid juuretisi tootva Christian Hanseni (Christian Hansen Holding AS, Taani) Laboratooriumi poolt välja töötatud *Lactobacillus acidophilus*'e ja *Bifidobacterium spp.* määramiseks mõeldud meetodikat. See meetodika võimaldab määrata tootes eraldi *Lactobacillus acidophilus*'t, lisades mikrobioloogilistes analüüsides MRS-IM põhisoõtmel lisandina maltoosi, ning bifidobaktereid, kasutades MRS-IM põhisoõtmes täiendavate komponentidena glükoosi, dikloksatsilliini, liitiumkloriidi ja tsüsteiinhüdrokloriidi. Kasvud inkubeeriti 72 tundi mikroaerofiilsetes tingimustes, mesofiilseid kultuure sisaldavaid proove temperatuuril $37\pm 0,5$ °C ja termofiilseid kultuure sisaldavaid proove temperatuuril $43\pm 0,5$ °C. Väljakasvanud mikroobipesad kirjeldati, loendati ning määrati mikroobide arv uuritavas materjalis. Mikroobide morfoloogia kirjeldamiseks tehti preparaadid söötmel väljakasvanud pesadest ja mikroskoobiti.

Saadud tulemused analüüsiti statistiliselt programmiga MS Excel.

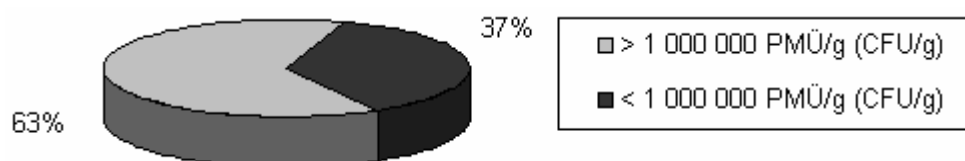
Tabel 1. Proovide iseloomustus ja arv
Table 1. Sample characterisation and number

Kaubamärk <i>Trade-mark</i>	Tooted <i>Products</i>	Proovide arv <i>No of samples</i>	Probiootilised liigid <i>Probiotic species</i>	
			<i>L. acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>
Tere	Biojogurt <i>Bioyoghurt</i>	16	8	8
	AB-hapupiim <i>AB-cultured milk</i>	16	8	8
	Atsidofiilhapupiim <i>Acidophilic milk</i>	10	10	–
Haps	Hapupiimajook <i>Cultured milk</i>	16	8	8
Meieri	Biojogurt <i>Bioyoghurt</i>	20	10	10
Mumuu	Biojogurt <i>Bioyoghurt</i>	16	8	8
	Biokeefir <i>Biokefir</i>	20	10	10
“Alma”	Biojogurt <i>Bioyoghurt</i>	20	10	10
Kokku <i>All together</i>		134	72	62

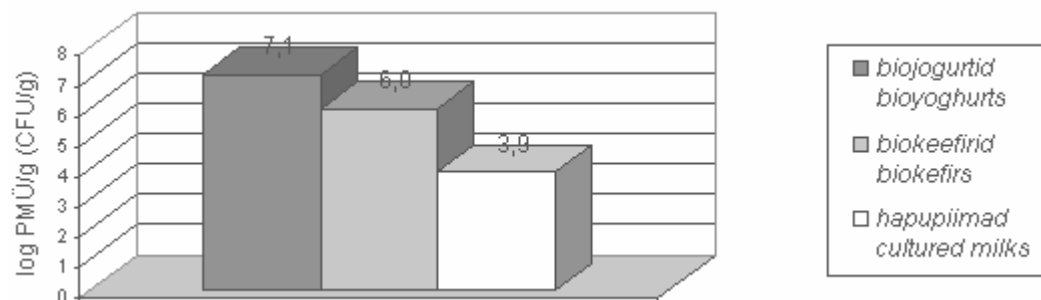
Tulemused ja arutelu

Analüüsides tulemused on toodud joonisel 1. Diagrammilt selgub, et 63% analüüsitud probiootilistest toodetest sisaldas rohkem kui 1 000 000 eluvõimelist probiootilist bakterit grammis tootes.

Joonisel 2 selgub, et probiootilistest toodetest sisaldasid tervislikke baktereid rahuldaval tasemel biojogurtid ja biokeefirid, kõige vähem probiootikume oli hapupiimades. Võrreldes *Lactobacillus acidophilus*'e ja *Bifidobacterium spp.* sisaldust erinevates toodetes ostmise päeval, leiti, et 36 tootest sisaldas atsidofiilkepikesi vähem kui 10^6 PMÜ/g 17 toodet (47%) ja bifidobaktereid 2 toodet (6%). Realiseerimisaja lõpuks olid need näitajad vastavalt 19 (53%) ning 10 toodet (28%). Seega iga kolmas nn biotoode turul ei sisalda piisaval hulgal tervislikke probiootilisi baktereid.



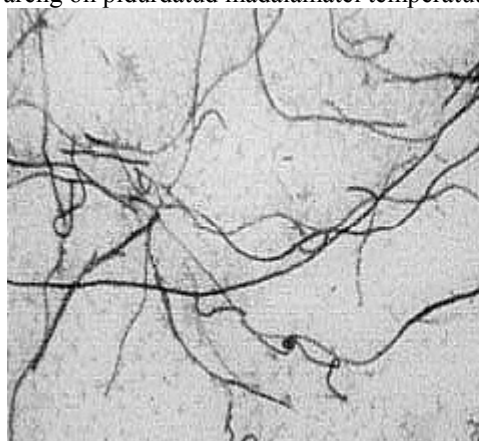
Joonis 1. Probiootikumide sisaldus piimatoodetes (n=36)
Figure 1. Content of probiotics in dairy products (n=36)



Joonis 2. Erinevate toodete probiotikumide sisaldus
Figure 2. The probiotic bacteria count of products

Selgus, et probiootilistest toodetest osutusid mittevastavaks (probiootiliste bakterite arv $<10^6$ PMÜ/g) eelkõige mesofiilsete kultuuridega fermenteeritud ning AB-kultuuridega täiendatud hapupiimajoogid. Nende toodete keskmine *Lactobacillus acidophilus*'e sisaldus jäi kogu säilivusaja vältel vahemikku 10^2 – 10^3 PMÜ/g ning bifidobakterite arvukus oli 10^5 – 10^6 PMÜ/g. Kuigi biojogurteid iseloomustas rahuldav probiootiliste bakterite sisaldus, keskmiselt 10^7 – 10^8 PMÜ/g, oli silmatorkavalt madal *Lactobacillus acidophilus*'e arvukus eelkõige rasvata (sisaldab rasva 0,1%) biojogurtites. Selgus, et ostmise päeval sisaldas vaid kaks toodet (40%) viiest $>10^6$ PMÜ/g ning realiseerimisaja lõpuks sisaldasid kõik viis analüüsitud rasvata biojogurtit (100%) atsidofiilkepikesi vahemikus 10^4 – 10^5 PMÜ/g. Erinevate uurimuste kohaselt ei pruugi rasvata biojogurtis *Lactobacillus acidophilus* ellu jääda piisavas koguses (Gardini, Lanciotti, 1999; Songisepp, 2002). Ühe põhjuseks on viidatud, et jogurti happesus sõltub lisaks mikroobide happeproduktiooni võimele ka toote valmistamiseks kasutatud toorainest, rasvasest (3,2%) piimast valmistatud jogurtites on pH edasine langus toote säilitamisel väiksem kui kooritud väherasvasest (0,5%) piimast valmistatud jogurtites (Songisepp, 2002).

Kõige stabiilsem oli probiotikumide arvukus biokeefirites, keskmiselt 10^6 PMÜ/g. Biojogurtites ja biokeefirites võis rahuldav *Lactobacillus acidophilus*'e (joonis 3^A) ja *Bifidobacterium spp.* (joonis 3^B) arvukus olla tingitud kompleksjuuretiste kasutamisest, kui fermentatsiooniprotsesside käivitamiseks lisati pastöriseeritud piimale lisaks põhijuuretisele ka AB-kultuure. Hapupiimajoogide madala probiootiliste bakterite arvukuse põhjuseks võis olla ebasobiv fermentatsioonitemperatuur toodete valmistamisel. Hapupiimade valmistamiseks kasutatakse põhiliselt mesofiilseid kultuure, aga probiotikumid on termofiilsed, mistõttu tervislike bakterite aktiivne areng on pidurdatud madalamatel temperatuuridel (Baron *et al.*, 2000).



^A*Lactobacillus acidophilus*



^B*Bifidobacterium spp.*

Joonis 3. Probiootiliste bakterite rakud
Figure 3. Cells of probiotic bacteria

Toodu põhjal võib öelda, et Eesti probiootilisi tooteid iseloomustab madal probiootiliste bakterite arvukus. Kesist bakterite eluvõimelisust biotoodetes kinnitavad ka Ameerikas, Kanadas, Itaalias, Austraalias ja Saksamaal läbi viidud uuringud (Kailaspathy, Chin, 2000). Shah (2000) toob põhjuseks eelkõige probiootiliste bakterite intensiivse paljunemise ja arengu jaoks vajaliku keskkonna puudumist piimatoodetes ning biotoodete realiseerimisaja jooksul keskkonnatingimuste halvenemist (ebaõige happesus, antimikroobsete ainete kuhjumine, maitseisandid).

Tabel 2. Muudatused ja sõltuvus probiootikumide arvukuses toodete säilimisaja vältel
Table 2. Changes and dependence in the number of probiotic bacteria during storage

Tooted Products	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (log PMÜ/g) <i>Lactobacillus acidophilus</i> viable counts (log CFU/g) n=72		<i>Bifidobacterium spp.</i> (log PMÜ/g) <i>Bifidobacterium spp.</i> viable counts (log CFU/g) n=62	
	Ostmise päeval Day of purchase	Realiseerimisaja lõpul End of best before use period	Ostmise päeval Day of purchase	Realiseerimisaja lõpul End of best before use period
Biojogurtid <i>Bioyoghurts</i>	7,02±0,9	6,36±1,0***	8,16±0,7	6,73±0,7***
Biokeefirid <i>Biokefirs</i>	6,42±1,2	6,08±0,6**	6,86±0,7	6,39±1,2**
Biohapupiimad <i>Bio-cultured milks</i>	3,29±0,1	2,25±0,2**	6,26±0,1	5,01±0,3

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Tabelist 2 selgub, et probiootilistes piimatoodetes domineerivad ostmise päeval bifidobakterid palju suuremates hulkades kui *Lactobacillus acidophilus*. Sellest järeldub, et piima fermentatsiooniprotsessis suudavad bifidobakterid efektiivsemalt kasvada ja paljuneda ning realiseerimisaja algul tootes suuremates hulkades säiluda. Realiseerimisaja lõpuks täheldati bifidobakterite arvukuses suuremat langustendentsi kui atsidoofiilkepikeste puhul. Kui *Lactobacillus acidophilus*'e arvukus kahanes 0,7 ühiku võrra, siis realiseerimisaja lõpuks vähenes bifidobakterite üldarv 1,4 ühiku võrra. Seega on bifidobakterid palju tundlikumad keskkonnatingimuste muutustele, millele on viidatud ka kirjanduses (Gomes, Malcata, 1999). Bakterite mikroskoopimisel täheldati, et atsidoofiilkepikekesed (joonis 3, A) toote säilivusaja lõpuks lühenesid ja kõhnesid. Bifidobakterid (joonis 3, B) on oma olemuselt pleomorfseid ja nende kuju varieerus märkimisväärselt (silinderja kujuga, kõverad, nuiakujulised, Y-kujulised kepid), mis sõltus nähtavasti kasvukeskkonna tingimustest tootes. Selgub, et biojogurtites ja biohapupiimades toimus märgatavalt suurem probiootiliste bakterite arvukuse kahanemine kui biokeefirites.

Kokkuvõte ja järeldused

Käesolevas uurimistöös analüüsiti probiootikumide sisaldust Eesti piimatoodetes. Uurimistöö tulemustel on praktiline väärtus Eesti akadeemilistele tootarendajatele, tööstuse vastavatele spetsialistidele ja biotoodete tarbijatele. Uurimuses näidati, et iga kolmas probiootiline piimatoodete ei sisalda piisaval hulgal *Lactobacillus acidophilus*'t ja *Bifidobacterium spp.* Probiootikume iseloomustab Eesti piimatoodetes madal eluvõimelisus. Et probiootikume sisaldavates toodetes on vastavalt toote iseloomule oluline saavutada ja säilitada nende optimaalne sisaldus, tuleks jälgida juuretistes ja toodetes aja jooksul toimuvaid juuretiste kooslussuhete arvukuse dünaamilisi muutusi ning leida täpsemad põhjused, millest madal eluvõimelisus toodetes on tingitud. Et rahuldaval tasemel sisaldasid probiootikume eelkõige biojogurtid ja biokeefirid, võiks neid ka enam kasutada põletikuliste protsesside profülaktikas ja ravis. Et *Lactobacillus acidophilus* suutis rasvarikkamas keskkonnas paremini ellu jääda, tuleks tervistava toime eesmärgil toota eelkõige rasvarikkamaid tooteid.

Seega tuleb biotoodete valmistamisel, arvestades bakterite arvukuse vähenemist toote säilivusaja lõpuks keskmiselt kümme korda, probiootikumide vähenemist toodetes arvesse võtta kas juuretise koguse kalkuleerimisel, fermentatsiooni temperatuuri või keskkonna tingimuste muutmisel ja see vajaks täiendavat uurimist.

Kirjandus

- Baron, M., Roy, D., Vuillemand, J.-C. 2000. Biochemical Characteristics of Fermented Milk Produced by Mixed-Cultures of Lactic Starters and Bifidobacteria. – EDP Sciences, No 80, p. 465–478.
- Chandan, R. C. 1999. Enhancing Market Value of Milk by Adding Cultures. – Dairy Science Journal, No 82, p. 2245–2256.
- Gardini, F., Lanciotti, R. 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus salivarius spp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. – International Dairy Journal, No 9, p. 125–134.
- Gomes, A. M., Malcata, F. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, Biochemical, Technological and Therapeutic Properties Relevant for Use as Probiotics. – Trends in Food Science & Technology, No 10, p. 139–157.

- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* – Immunology and Cell Biology, No 78, p. 80–88.
- Shah, N. P. 2000. Symposium: Probiotic Bacteria. Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. – Dairy Science Journal, No 83, p. 894–907.
- Songisepp, E. 2002. Eriliste biomarkeritega laktobatsillaarsed juuretised: biotehnoloogiline käitlemine ning mõju toote ja inimese laktofloorale. Trt, lk 5–17, 80–90.

The presence of probiotic bacteria in Estonian dairy products

K. Juhkam, P. Elias, K. Laikoja

Summary

This research explored *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* populations and their dynamics in domestic milk-based bioyogurts, biokefirs and acidified milk products. Three figures and two table have been supplied for illustrative purposes. The methods used were those developed for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* determination by “Christian Hansen Laboratory” (Christian Hansen Holding AS, Denmark), laboratory producing commercial starter cultures. The methodology enabled a separate award of *Lactobacillus acidophilus* per gram of product by adding maltose to the main substratum MRS-IM, and of *Bifidobacteria* by adding glucose, dichloxallin, lithium chloride and cysteine hydrochloride to the same. Incubation was performed in microaerophilic conditions for 72 h, at 37 ± 0.5 °C for samples containing only thermophilic cultures, and at 43 ± 0.5 °C for samples containing mesophilic cultures. The microbial colony that emerged were described, counted and the number of microbes in the material under study was determined. To describe microbe morphology, some colony grown on the substratum were prepared and microscoped.

The results indicated that 63% of the products contained probiotics in excess of 10^6 CFU/g (Figure 1). It may be concluded that *Lactobacillus acidophilus* (Figure 3^A) and *Bifidobacterium spp.* (Figure 3^B) are characterized by low viability, since every third product did not provide the consumer with a health-promoting therapeutic effect. A comparison between the *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria* content in different products on the day of purchase showed that out of 36 products, in 17 products (47%) the content of acidophilic bacteria and in two products (6%) the content of *Bifidobacteria* was less than 10^6 CFU/g. By the “best before” date, the corresponding figures had risen to 19 (53%) and 10 products (28%), respectively. Thus, *Bifidobacteria* revealed a much steeper downward curve than *Lactobacillus acidophilus* rods. While the population of *Lactobacillus acidophilus* decreased by 0,7 unit by the end of the “best before” period, that of *Bifidobacteria* decreased by 1,4 unit (Table 2). Accordingly, *Bifidobacteria* are much more sensitive to environmental changes. Considering that bacterial populations always decrease by 1 unit on average by the “best before” date, attention needs to be paid primarily to amount of starter and addition time, fermentation temperature and different environmental conditions.

It is important to achieve and maintain the optimal content of probiotics in probiotic products, depending on the nature of each product. Consequently, it is necessary to monitor the changes in the dynamics of starter populations occurring over time in starters cultures and products and to more exactly establish the reasons for the low probiotic viability in products.

In selecting strains of probiotics for addition to a milk product, their suitability for a particular probiotic product, that is, their survival in it, needs to be explored. As *Lactobacillus acidophilus* evidenced the highest degree of viability and as bioyogurts and biokefirs revealed satisfactory levels of probiotics (Figure 2), it is recommended to be used for the prevention and treatment of inflammatory processes.

It appeared that on the day of purchase only two products out of five contained more than 10^6 CFU/g, and by the “best before” date all of the fat-free bioyogurts analysed contained *Lactobacillus acidophilus* at the levels of 10^4 – 10^5 CFU/g. It was observed that *Lactobacillus acidophilus* survive better in products with a higher fat content. To achieve a health-promoting effect, priority should therefore be given to the production of cultured products containing more fat.