

**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE  
UNIVERZITETA U BEOGRADU  
KATEDRA ZA HIGIJENU I TEHNOLOGIJU NAMIRNICA  
ANIMALNOG POREKLA**

**2.  
SIMPOZIJUM**

**BEZBEDNOST I KVALITET NAMIRNICA  
ANIMALNOG POREKLA**

ZBORNIK RADOVA

Beograd, 11. i 12. novembar 2010.

CIP – Каталогизација у публикацији  
Народна библиотека Србије, Београд

637 . 04/ . 07 (082)  
664 : 658 . 56 (082)  
614 . 31 (082)

**СИМПОЗИЈУМ Безбедност намирница анималног порекла  
(2 ; 2010 ; Београд)**

Zbornik radova / 2. simpozijum Bezbednost namirnica animalnog porekla, Beograd, 11. i 12. novembar 2010. ; [ organizator Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla ; urednik Vera Katić ] . – Beograd : Fakultet veterinarske medicine, 2010 (Beograd : Naučna) . – 125 str. : graf. prikazi, tabele ; 24 cm.

Tekst ćir. i lat. – Tiraž 300. – Napomene uz tekst. – Bibliografija uz većinu radova. - Summaries.

ISBN 987-86-81043-52-3

1. Факултет ветеринарске медицине (Београд) . Катедра за хигијену и технологију намирница анималног порекла

а) Животне намирнице – Контрола квалитета – Зборници

б) Животне намирнице – Хигијена – Зборници

ц) Ветеринарска хигијена – Зборници

COBISS.SR-ID 179444236

## 10. PROBIOTICI: ISTINA, ZABLUDA ILI MARKETING

*Snežana Bulajić, Zora Mijačević\**

### **Kratak sadržaj**

Na pravilan način formulisani probiotski proizvod ne predstavlja rizik po potrošača, a dodatno ima potencijal da promoviše zdravstveni efekat. Jednom kada su prepoznati i identifikovani korisni efekti probiotski formulisanih proizvoda, pre njegovog pozicionisanja na tržište potrebno je pozabaviti se pitanjima mikrobiološke specifikacije, stabilnosti i deklarisanja takvog proizvoda, a u skladu sa važećim propisima. Mikrobiološka specifikacija i karakterizacija probiotskog proizvoda uključuje aspekt bezbednosti, definisanje aktivnosti probiotika, stabilnost tokom proizvodnje, definisanje efektivne doze i „target“ populacije. Propisi koji regulišu sektor probiotskih proizvoda, kao i pitanja njihovog pravilnog deklarisanja su dosta složeni i različiti, ali ujedno predstavljaju kritičan momenat budući da se jedino usaglašavanjem ovih kriterijuma može obezbediti pravilna i jasna komunikacija sa potrošačima.

*Ključne reči: probiotski formulisani proizvodi, mikrobiološki, regulatorni aspekt, deklarisanje*

### **Uvod**

Hrana i nauka o ishrani danas imaju potpuno nove dimenzije i koncepte. Novija saznanja na području biohemije, molekularne biologije i fiziologije, podupiru hipotezu da hrana (ishrana) kontroliše i usmerava različite funkcije u organizmu, te tako utiče na zdravstveno stanje organizma domaćina. Pored toga, svetska naučna zajednica je odavno prepoznala problem rezistencije na antibiotike, i između ostalih rešenja, predlaže koncept funkcionalne hrane, odnosno probiotski koncept. Koncept probiotika je prvi put predstavljen od strane Elie Metchnikoff (1907), koji zagovara hipotezu da je potrošnja fermentisanih proizvoda od mleka odgovorna za dug život određenih etničkih grupa, pre svega, zahvaljujući sposobnosti bakterija mlečne kiseline da manipulišu intestinalnom mikroflorom, održavajući normalan balans između patogenih i nepatogenih bakterija. Van svake sumnje je činjenica da prisustvo i aktivnost populacije od  $10^{14}$  mikroorganizama, koji naseljavaju gastrointestinalni trakt ljudi, ima značajan uticaj na fiziologiju organizma domaćina (Holzapfel i sar., 1998; Tannock, 1998). Sposobnost probiotskih bakterija, da prilikom naseljavanja ekosistema ispolje uticaj na aktivnost rezidentne mikroflora, bilo na osnovu direktnog efekta na intestinalnu mukozu, ili posredno putem funkcionalnih enzima ili drugih ćelijskih produkata, predstavlja naučnu osnovu probiotske teorije i racionalan pristup u razvoju probiotski formulisanih proizvoda (Sanders i Huis in't Veld, 1999).

U kom delu probiotski koncept prati naučnu istinu, koja su ograničenja široke primene probiotika kroz sektor funkcionalnih proizvoda, a pre svega, koja se količina i vrsta dokaza traži u opravdanju toga da probiotski ispoljavaju određeni efekat po zdravlje ljudi, i dalje

\* Doc. dr Snežana Bulajić, prof. dr Zora Mijačević, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica životinjskog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

predstavljaju aktuelna pitanja, gde nauka u saradnji sa industrijom, i regulatornim telima, prepoznavajući potrebu i želju osvešćenih potrošača da se „zdravo“ hrane, pokušava dati odgovor.

### Strategija selekcije probiotskih sojeva

Budući da ne postoji međunarodni konsenzus o metodologiji procene efikasnosti i bezbednosti probiotika, FAO i WHO su, kroz zajedničku aktivnost, preduzeli sažimanje i kritičnu evaluaciju svih naučnih dokaza o funkcionalnim i bezbednosnim aspektima probiotika, sa ciljem uspostavljanja standarda kroz set kriterijuma predstavljenim u smernicama za procenu probiotika u hrani („Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food“) (FAO/WHO, 2001.; FAO/WHO, 2002.). U predloženim smernicama naglašava se važnost tačne klasifikacije i pouzdane identifikacije probiotskih sojeva, jedinstvena metodologija u proceni „*in vitro*“ probiotskog potencijala, razjašnjenje mehanizma delovanja na molekularnom nivou, aspekt bezbednosti, pre svega određivanje profila rezistencije na antibiotike i potencijala transfera determinanti rezistencije na druge mikroorganizme. Posebno važan kriterijum jeste i definisanje količine i vrste dokaza neophodnih za opravdano postavljanje zdravstvenih izjava na deklaraciji probiotski formulisanih proizvoda.

Prilikom selekcije sojeva mikroorganizama sa probiotskim potencijalom (većinom rodovi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, manjim delom *Enterococcus*, i ostali) poštuju se određena pravila oko kojih, generalno, postoji naučni konsenzus. Ovako postavljene kriterijumi, usled specifičnosti probiotskog koncepta, multifaktorijske uslovljenosti biološke aktivnosti i ograničenosti metodologije ispitivanja kliničke efikasnosti probiotika, ujedno predstavljaju izazov industriji probiotika u postavljanju zdravstvenih izjava pri deklarisanju probiotski formulisanih proizvoda. Pitanje je koliko je industrija probiotika spremna odgovoriti na postavljene izazove. Kriterijumi selekcije probiotika dati su u tabeli 1.

Tabela 1. Kriterijumi selekcije probiotskih sojeva

1.	Tačna taksonomska identifikacija	<b>Opšti kriterijumi</b>
2.	Humano poreklo za probiotike primenjive kod ljudi	
3.	Netoksičnost i nepatogenost	
4.	Genetička stabilnost /nema prenosa plazmida	
5.	Otpornost prema žučnim solima	
6.	Otpornost prema niskim vrednostima pH	
7.	Stabilnost poželjnih karakteristika tokom proizvodnje kulture, skladištenja	<b>Tehnološki kriterijumi</b>
8.	Visok broj živih bakterija u probiotskom proizvodu ( $10^6$ - $10^8$ /ml/g) 100 grama proizvoda osigurava $10^8$ - $10^{10}$ živih ćelija	
9.	Brzo i lako razmnožavanje, koncentrisanje, smrzavanje i liofiliziranje tokom proizvodnje, te visok stepen preživljavanja za vreme čuvanja i distribucije	
10.	Dobijanje željenih organoleptičkih svojstva kada su uključeni u procese fermentacije	
11.	Sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti u „target“ mestu delovanja u organizmu	<b>Funkcionalni kriterijumi</b>
12.	Sposobnost adhezije i kolonizacije crevnog epitela	
13.	Produkcija antimikrobnih komponenti (bakteriocina, vodonik peroksida i organskih kiselina)	
14.	Antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama	
15.	Mogućnost kompeticije sa pripadnicima autohtone intestinalne mikroflore	
16.	Imunomodulatorni efekat	
17.	Sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentovanih korisnih učinaka na zdravlje	

### Pitanje tačne identifikacije i označavanja probiotskih sojeva

Iako je poslednjih nekoliko godina postignut značajan napredak u istraživanjima vezanim za probiotike, činjenica jeste da mnogi probiotski sojevi mikroorganizama, prisutni na tržištu kroz probiotski formulisane proizvode, nemaju potrebnu naučnu dokumentaciju (Sanders i Huis in't Veld, 1999). U mnogim slučajevima nisu zadovoljeni opšti kriterijumi za selekciju, tačna taksonomska identifikacija i potpuna karakterizacija soja, a poznato je da su probiotska svojstva isključivo karakteristika pojedinih sojeva, te je precizno definisanje ovih bioloških entiteta neophodno. Samo u slučaju jasne identifikacije probiotskih sojeva moguće je postaviti vezu između određenog soja i specifičnog efekta po zdravlje ljudi, čime se daje mogućnost da epidemiološke studije potvrde ili ospore probiotski efekat, odnosno daje se mogućnost pravilnog nadzora. Naglašava se da su svojstva (npr., rezistencija na nizak pH, sposobnost preživljavanja tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt), funkcionalnost i određeni zdravstveni efekti jedinstvena karakteristika pojedinih probiotskih sojeva, i kao takvi se ne mogu ekstrapolirati na druge sojeve, čak i unutar iste vrste. Rezultati studije Isolauri i sar. (1991) potvrđuju da se administracija soja *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) pokazuje

efikasnom u skraćenju trajanja dijareje kod dece izazvane rotavirusom. Takav efekat LGG se nikako ne može ekstrapolirati na druge sojeve *L. rhamnosus* bez eksperimentalne procedure (kliničke studije na ljudima, uz isključivanje placebo efekta) i jasnog dokaza. Za sigurnu identifikaciju, i potom tačnu klasifikaciju sojeva, zahteva se primena molekularnih metoda i informativnih tehnika (Kneifel i sar., 1999). Pouzdana identifikacija mikroorganizama na nivou soja, u današnje vreme, podrazumeva polifazičnu karakterizaciju kombinujući fenotipske, biohemijske, genotipske podatke i rezultate sekvencionisanja (Mainville i sar., 2006). Iz tog razloga, mnoge bakterijske kulture sadržane u probiotski formulisanim proizvodima različitih proizvođača nisu ispravno deklarirane (Reuter, 1997; Holzapfel i sar., 1998). Tako se u nekim probiotskim jogurtima umesto deklarirane vrste *Lactobacillus acidophilus* potvrđuje *L. johnsonii* ili *L. gasserii*, umesto *L. casei* bakterija *L. paracasei*, a vrsta deklarirana kao *Bifidobacterium longum* često se primenom molekularnih metoda identifikuje kao *B. animalis*.

### Definisanje probiotskog principa i doze

Definicija probiotika naglašava da živi mikroorganizmi moraju biti uzeti u odgovarajućoj količini, kako bi probiotski efekat bio ostvaren. Generalno, pretpostavka jeste da vijabilnost probiotika predstavlja racionalnu meru njihove aktivnosti. Čak i u slučajevima gde mehanizam delovanja probiotika ne zahteva žive ćelije, vijabilnost ćelija je, skoro sasvim sigurno, u pozitivnoj korelaciji sa mnogim efektima, bez obzira što predstavlja aktivni princip. Situacije u kojima se vijabilnost ćelija ne zahteva za probiotsku aktivnost uključuju poboljšanu digestiju laktoze (Vesa i sar., 1996), određene aktivnosti modulacije imunog sistema (Hosono i sar., 1997; Marin i sar., 1997), i antihipertenzivni efekat (Maeno i sar., 1996). U navedenim slučajevima nosioci aktivnog principa su određene ćelijske komponente, enzimi ili produkti fermentacije. Rezultati studije Titze i sar. (1996) pokazuju da ćelije probiotskih sojeva uništene primenom radijacije, zadržavaju aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze i time sposobnost poboljšane digestije laktoze nije dovedena u pitanje. Žive ćelije *Lactobacillus helveticus* CP790 se ne zahtevaju u slučaju ostvarivanja antihipertenzivnog efekta, gde aktivnu komponentu predstavljaju tripeptidi koji se oslobađaju po digestiji kazeina akcijom proteinaza dotičnog soja laktobacila. Navedeni podaci naglašavaju važnost definisanja aktivnog principa probiotika (živa ćelija, ćelijska komponenta, enzim, ili produkt fermentacije) kako bi se pravilno postavili parametri kontrole kvaliteta tokom proizvodnje i čuvanja probiotskih proizvoda. I pored mnogih studija, malo se zna o minimalnoj dozi i/ili frekvenciji uzimanja probiotika potrebnog za ispoljavanje fiziološkog efekta. Nekoliko kliničkih studija pokazuje da se po oralnoj administraciji, probiotski sojevi laktobacila izoluju u broju  $10^6$ - $10^8$  cfu/g fecesa (Goldin, 1992; Spanhaak i sar., 1998). *In vitro* modeli koji simuliraju uslove prisutne u gastrointestinalnom traktu ljudi, demonstriraju preživljavanje pojedinih probiotskih bakterija u broju koji predstavlja 10-40% od ukupno administriranih bakterija. Smatra se da je za funkcionalno delovanje probiotika potrebno da najmanje  $10^8$ - $10^9$  živih bakterija kolonizuje debelo crevo domaćina. Pod pretpostavkom da je ovo tačno, dnevna doza iznosi  $10^9$ - $10^{10}$  probiotskih mikroorganizama. Međutim, ovakva pretpostavka nije objektivna budući da su probiotski biološki entiteti i mnogi faktori imaju uticaja na njihovu biološku aktivnost. Probiotski proizvodi se smatraju potentnim ukoliko velika populacija živih ćelija dostigne "target" mesto delovanja, obično tanko ili debelo crevo domaćina. Stoga, relevantna karakteristika nije, neophodno, konzumirana doza, nego doza koja se postigne na "target" mesto delovanja. Sojevi probiotika, dobro adaptirani na preživljavanje u uslovima gastrointestinalnog trakta, imaju veću mogućnost efikasnog delovanja, ali opet u zavisnosti od uslova koji karakterišu milje digestivnog trakta.

individualnih za svakog pojedinca ponaosob. *In vivo* preživljavanje probiotika sigurno nije isto kod npr. potrošača starije dobne kategorije sa atrofičnim gastritisom, u poređenju sa mladim zdravim potrošačima. Na biološku aktivnost probiotskih sojeva utiču i genetički "makeup" sojeva, tehnologija fermentacije, uslovi proizvodnje (homogenizacija, način pakovanja), temperatura i dužina fermentacije, uslovi čuvanja i stabilizacije probiotika primenom tehnika enkapsulacije ili mikroenkapsulacije, primena stabilizujućih agenasa, ali i aktivnost vode, nivo kiseonika. Ne manje značajan parametar jesu i metode koje se koriste pri određivanju broja živih ćelija probiotika prisutnih u proizvodu. Prisustvo selektivnih agenasa u diferencijalnim podlogama može redukovati nivo oporavljenih ćelija, posebno u slučaju prisustva subletalno oštećenih ćelija probiotika. Kako je otpornost oštećenih ćelija probiotika na kiselinu i žuč kompromitovana, može se pretpostaviti da bi primena selektivnih podloga dala fiziološki relevantan, mada manji broj probiotskih mikroorganizama. Navedeni podaci nam govore da je veoma teško postići mikrobiološku stabilnost probiotski formulisanih proizvoda i očuvati funkcionalnost probiotika tokom deklarisanog perioda čuvanja. Niska pH vrednost fermentisanih proizvoda od mleka, najčešćih vehikuluma probiotskih sojeva, dodatno inhibirno deluje na probiotike. Rezultati ispitivanja broja probiotskih mikroorganizama u probiotski formulisanim jogurtima na tržištu Amerike, potvrđuju prisustvo *L. acidophilus* u broju  $< 10^5$  cfu/ml, čak tri nedelje pre isteka deklarisanog roka upotrebe. Rezultati studija Hamilton-Miller i sar. (1996) i Caganella i sar. (1997) pokazuju daleko manji broj probiotskih mikroorganizama od deklarisanog, u nekim slučajevima se utvrđuje samo 20% od očekivanog broja.

Kako bi se opravdalo isticanje zdravstvene izjave na deklaraciji probiotski formulisanih proizvoda, imperativ jeste da proizvođač osigura i istakne podatke o broju živih mikroorganizama na kraju roka upotrebe takvih proizvoda, kao i da naznači metodologiju korištenu pri određivanju broja, kako bi bila moguća verifikacija deklarisanih podataka. I pored toga, ne postoje zakonski zahtevi o isticanju broja živih mikroorganizama, kao ni obaveza deklarisanja sojeva prema prihvaćenoj nomenklaturi, ali se isto tako ne zahteva ni dokaz o vijabilnosti probiotskih sojeva (Farnworth, 2008).

Najnovija istraživanja predlažu strategiju tzv. pato-biotehnologije u poboljšanju fiziološke robustnosti i tolerancije na stres kod probiotskih sojeva (Sleator i Hill, 2006; 2008). U svojoj osnovi, ovakav pristup podrazumeva generisanje "poboljšanih" probiotskih sojeva, korištenjem mehanizma preživljavanja stresa kojim raspolažu daleko fiziološki otporniji patogeni mikroorganizmi (Sleator i Hill, 2009). Fiziološka raznolikost patogenih mikroorganizama, oscilirajući između habitata spoljašnje sredine i unutrašnjosti organizma domaćina, čini ih rezervoarom gena sa potencijalnom primenom u poboljšanju robustnosti manje adaptiranih probiotskih sojeva (Sheehan i sar., 2007). Rezultati eksperimentalne studije pokazuju da kloniranje i heterologna ekspresija gena rezistencije na žuč sa patogenog soja *L. monocytogenes* na probiotski soj *Bifidobacterium breve*, ne samo da poboljšava gastrointestinalnu kolonizaciju i perzistenciju, već dodatno osnažuje i kliničku efikasnost probiotskog soja (Watson i sar., 2008).

### **Objektivnost “*in vitro* screening” analiza**

“*In vitro* screening” analize daju mogućnost mudrog izbora kandidat probiotičkih sojeva sa potencijalom “*in vivo*” funkcionalnosti (Huis in't Veld i Havenaar, 1997; Collins i sar., 1998). Uspešnost ovakvih analiza u osiguravanju fiziološki relevantnih podataka se može poboljšati primenom dinamičkih modela. Jedan takav model je razvijen od strane istraživača TNO Nutrition and Food Research u Zeist-u (Holandija), opisan u detalje u studiji Minekus i sar. (1995), a primenjen u modelisanju preživljavanja ingestiranih bakterija mlečne kiseline (Marteau i sar., 1997). Model sadrži sve glavne konstituente gastrointestinalnog sistema ljudi (želudac, tanko crevo i kolon), kao i brojne dodatne karakteristike u poređenju sa prijašnjim modelima kao što su peristaltični pokreti, fiziološke oscilacije pH, gastrointestinalnu sekreciju, intestinalnu apsorpciju hranjivih materija i vode, fiziološko pražnjenje želuca, intestinalni transport i visoko efikasnu apsorpciju vode u kolonu. Nedavno je razvijen i novi tip intestinalnog modela, kombinujući uklanjanje metabolita i vode, što je neophodno u postizavanju fiziološke koncentracije mikroorganizama, suve materije i mikrobnih metabolita. Nedostaci ovakvog modela se ogledaju u nepostojanju epitelne barijere, aktivnog transporta metabolita i direktnog imunog odgovora, ali u poređenju sa statičnim “*in vitro*” modelima, daleko je realističniji, i time objektivniji. Konačno, model može imati primenu i u studijama ekologije intestinalne flore, prokarcinogene konverzije i uloge antimikrobnih komponenti.

### **Testiranje efikasnosti**

Efikasnost probiotika je proučavana u odnosu na mnoga patološka stanja i metaboličke poremećaje uključujući Kronovu bolest (Guslandi i sar., 2000; Shultz i sar., 2004), sindrom osetljivih creva (Sen i sar., 2002; Niedzielin i sar., 2001), metabolizam holesterola (Simons i sar., 2006), antikancerogena svojstva (Russo i sar., 2007; Commane i sar., 2005). Delovanje probiotika se objašnjava različitim mehanizmima: produkcija organskih kiselina, sinteza bakteriocina, redukcija broja toksogenih bakterija (Walker i Duffy, 1998), kao i efekat na epitel mukoze creva, odnosno limfoidno tkivo (Saavedra i Tschernia, 2002). Potrebno je naglasiti, da i pored toga, što se u sprovedenim kliničkim studijama demonstrira pozitivan efekat, bilo bi pogrešno zaključiti da postoji dobar dokaz da se sva navedena patološka stanja mogu poboljšati primenom probiotika. U pojedinim studijama nije dobro odabran biomarker, ili nije okarakterisan probiotički soj, kao ni doza ingestiranih probiotičkih bakterija, ne postoje podaci o fiziološkom stanju posmatranih subjekata, tako da je efikasnost probiotika pod znakom pitanja. Hove i sar. (1999) nakon pregleda postojaće literature, zaključuju da naučni konsenzus postoji oko efikasne primene probiotika samo u slučaju intolerancije na laktozu (Martini i sar., 1991; de Vrese i sar., 2001) i dijareje, prvenstveno dijareje kod dece izazvane rotavirusom (Huang i sar., 2002). Aplikacija probiotika u slučaju ova dva stanja su dosada najbolje dokumentovani i pružaju pouzdane podatke na osnovu kojih je moguća autorizacija zdravstvenih izjava.

### **Klinička ispitivanja i aktivni sastojci**

Placebo kontrolisana klinička ispitivanja, uz isključivanje subjektivnosti na osnovu “double-blind” eksperimenta se smatraju zlatnim standardom u proceni kliničke efikasnosti probiotika. Ali, kao i u mnogim kliničkim studijama gde se testira matriks namirnica, teško je uspostaviti odgovarajuću kontrolu (Farnworth, 2000; 2002). Pored toga, što dodatno komplikuje ispitivanje, često je problem definisati aktivni sastojak u probiotički formulisanim proizvodima. Ukoliko proizvod podleže procesu fermentacije, potencijalnim kandidatima sa



mogućnošću aktivnog delovanja smatraju se žive ćelije probiotika, komponente ćelijskog zida, metaboliti bakterija (egzopolisaharidi), ili sastojci koji se proizvode tokom fermentacije kao npr. bioaktivni peptidi. Dokaz da se oralno administrirane probiotske bakterije izoluju u fekalnom materijalu posmatranih subjekata (Rochet i sar., 2006) ili promene pH crevnog sadržaja, kao ni promene u sadržaju kratkolančanih masnih kiselina ili koncentracije fekalnih enzima, i pored toga što demonstriraju efekat na intestinalnu mikrofloru (Spanhaak i sar., 1998), ne mogu se, sasvim sigurno, dovesti u korelaciju sa pozitivnim kliničkim efektom (Farnworth, 2008).

### Aspekt bezbednosti

I pored toga što većina probiotskih bakterija, pre svega pripadnici roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, imaju tzv. „*Generally Recognized As Safe –GRAS*“ status, odnosno prema evropskom ekvivalentu „*Qualified Presumption of Safety-QPS*“ odrednicu, preporuka postoji da se probiotski sojevi testiraju u odnosu na sledeće testove: (1) određivanje profila rezistencije na antibiotike, kao i potencijala transfera determinanti antibiotske rezistencije, (2) procena određenih metaboličkih aktivnosti (produkcija D-laktata, dekonjugacija žučnih soli), (3) procena nuspojava kod ljudi, (4) epidemiološki nadzor incidenata kod potrošača dovedenih u vezu sa konzumacijom probiotika, (5) testiranje na produkciju toksina (ukoliko ispitivani soj pripada vrsti poznatoj kao producent toksina), (6) testiranje hemolitičke aktivnosti (ukoliko soj pripada vrsti sa poznatim hemolitičkim potencijalom).

### Probiotici: ima li dokaza koji podržavaju isticanje zdravstvenih izjava na probiotski formulisanim proizvodima?

Eksperimentalni dokaz o jasnoj identifikaciji i karakterizaciji probiotskih sojeva i demonstriranju njihove efikasnosti u kliničkim studijama, predstavlja daleko veći izazov u poređenju sa ostalim kategorijama funkcionalne hrane. Probiotski efekat je posredovan živim mikroorganizmima i time uslovljen mnogim varijablama u odnosu na status samih probiotika, ali i status organizma ljudi, gde se očekuje ispoljavanje pozitivnog efekta. Mehanizam aktivnog delovanja, u mnogim slučajevima, ostaje nepoznanica, pouzdani fiziološki biomarkeri nisu dostupni, a efekat matriksa može biti veoma izražen, čime se situacija uslošnjava. Nepotpuno saznanje o značaju i ulozi autohtone mikroflore intestinum ljudi predstavlja glavnu barijeru uspostavljanju validnih biomarkera. Usled nedostatka dobro dizajniranih i kontrolisanih kliničkih studija kod ljudi, regulatorna tela nisu dovoljno ubeđena da postoji ona zahtevana količina dokaza koja će opravdati isticanje zdravstvenih izjava na probiotski formulisanim proizvodima. Svega je nekoliko zdravstvenih izjava vezanih za probiotike dobilo autorizaciju (Sanders i Huis in't Veld, 1999), i pored rastućeg tržišta probiotika, pre svega na području Evrope i Japana.

Iako koncept probiotika deluje obećavajuće, za njihovo pravilno pozicionisanje na tržištu i deklarisanje, u kom slučaju bi nosili jasnu, nedvosmislenu i razumljivu poruku potrošačima, potrebno je razjasniti nekoliko ključnih problema:

- identifikacija fiziološki relevantnih biomarkera koji će poslužiti u objektivnoj i naučno zasnovanoj proceni efikasnosti probiotika;
- definisanje aktivnog principa i razjašnjenje mehanizma koji stoji u pozadini aktivnog delovanja;
- razjašnjenje taksonomije probiotskih mikroorganizama i razvoj metodologije koja omogućava pouzdanu identifikaciju, i potom klasifikaciju probiotika;

- prihvatiti neophodnost sprovođenja dobro dizajniranih kliničkih studija na ljudima koji potvrđuju efikasnost probiotika.  
Postojeća problematika se može rešiti samo kooperativnim delovanjem regulatornih tela, akademske javnosti i industrije, a korist je mnogostruka i zajednička za sve nas.

### Literatura

1. Canganella F, Paganini S, Ovidi M, Vettrano AM, Bevilacqua L, Massa S and Trovatelli LD. 1997. A microbiological investigation of probiotic pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.* 152:171-179; 2. Collins JK, Thornton G and Sullivan GO. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8:487-490; 3. Commane D, Hughes R, Shortt C, Rowland I. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res.* 591:276-89; 4. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. 2001. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 73 (2, Suppl) 421S-9S; 5. FAO/WHO.2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. [ftp://ftp.fao.org/es/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/food/probio_report_en.pdf); 6. FAO/WHO.2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/food/wgreport2.pdf>; 7. Farnworth ER. 2000. Designing a proper control for testing the efficacy of a probiotic product. *J Nutraceut Funct Med Food.* 2:55-63; 8. Farnworth ER. 2002. Unique problems in designing and testing probiotics food. *Int Food Info Service.* 2002. FoodInfo Online Features 31 January; 9. Farnworth, E.R. 2008. The Evidence to Support Health Claims for Probiotics. *The Journal of Nutrition* 138:1250S-1254S; 10. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri J and salminen S. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci.* 37:121-128; 11. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 45:1462-4; 12. Hamilton-Miller JMT, Shah S and Smith CT. 1996. "Probiotic" remedies are not what they seem. *Brit. Med. J.* 312:55-56; 13. Holzapfel W H; Haberer P; Snel J; Schillinger U; Huis in't Veld J H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 1998;41(2):85-101; 14. Hosono A, Lee J, Ametani A, Natsume M, Hirayama M, Adachi T and Kaminogawa S. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biochem.* 61:312-316; 15. Hove H, Norgaard H, Mortensen PB. 1999. Lactic acid bacteria and human gastrointestinal tract. *Eur J Clin Nutr.* 53:339-50; 16. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. 2002. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 47: 2625-34; 17. Huis in't Veld JHJ and Havenaar R. 1997. Selection criteria and application of probiotic microorganisms in man and animal. *Microecol. Ther.* 26:43-57; 18. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics.* 1991; 88:90-7; 19. Kneifel W, Mattila-Sandholm T, von Wright A. 1999. Probiotic bacteria detection and estimation in fermented and non-fermented dairy products. In: Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of food microbiology.* San Diego:Academic Press; 1999 p.1783-9; 20. Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth ER. 2006. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol.*2006; 29:59-68; 21. Marin ML,, Lee

- JH, Murtha J, Ustunol Z and Pestka JJ. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 80:2713-2720; 22. Marteau P, Minekus M, Havenaar R and Huis in't Veld JHJ. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effect of bile. *J. Dairy Sci.* 80: 1031-1037; 23. Martini MC, Lerebours EC, Lin W-J, Harlander SK, Berrada NM, Antoine JM, Savaiano DA. 1991. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. *Am J Clin Nutr.* 54:1041-6; 24. Metchnikoff, E. 1907. *The prolongation of life.* London, UK:William Heinemann, 1907; 25. Minekus M, Marteau P, Havenaar R and Huis in't Veld JHJ. 1995. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA (Alternative to Laboratory Animals)* 23:197-209; 26. Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13:1143-7; 27. Reuter G. 1997. Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. *Biosci.Microflora* 16:43-51; 28. Rochet V, Rigottier-Gois L, Sutren M, Kremetscki M-N, andrieux C, Furet J-P, Tailliez P, Levenez F, Mogenet A, et al. 2006. Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. *Br J Nutr.* 95:421-9; 29. Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. 2007. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutr Cancer.* 59:106-14; 30. Saavedra JM, Tschernia A. 2002. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications *Br J Nutr.* 87 Suppl 2:S241-6; 31. Sanders, Mary Ellen and Huis in't Veld, Jos. 1999. Bringing a probiotic/containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:293-315; 32. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. 2004. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 2004;4:5-8; 33. Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 2002;47:2615-20; 34. Sheehan VM, Sleator RD, Hill C, Fitzgerald GF. 2007. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology* 153:3563-3571; 35. Simons LA, Amansec SG, Conway P. 2006. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16:531-5; 36. Sleator RD, Hill C. 2006. Patho-biotechnology: using bad bugs to do good things. *Curr Opin Biotechnol* 17:211-216; 37. Sleator RD, Hill C. 2008. „Bioengineered Bugs“- a patho-biotechnology approach to probiotic research and applications. *Med Hypotheses* 70:167-169; 38. Sleator RD, Hill C. 2009. Rational design of improved pharmabiotics. *J Biomed Biotechnol* 2009:87-2752; 39. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr.* 52:899-907; 40. Tannock, G.W. 1998. Studies of the intestinal microbiota: a prerequisite for the development of probiotics. *Int. Dairy J.* 8:527-533; 41. Titze A, Kuhn C, Lorenz A, de Vrese M and Barth C. 1996. The influence of viable lactobacilli on lactose degradation in the gut of gnotobiotic animals. XIIth International Symposium on Gnotobiology, Honolulu, pp. 43; 42. Vesa TH, Marteau Ph, Zidi S, Briet F, Pochart Ph and Rambaud JC. 1996. Digestion and tolerance of lactose from yoghurt and different semi-solid fermented dairy products containing *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in lactose

maldigesters - Is bacterial lactase important? Euro.J.Clin.Nutr.50:730-733; 43. Walker WA, Duffy LC. 1998. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. J Nutr Biochem. 9:668-75; 44. Watson D, Sleator RD, Hill C, Gahan CG. 2008. Enhancing bile tolerance improves survival and persistence of *Bifidobacterium* and *Lactococcus* in the murine gastrointestinal tract. BMC Microbiol 2008, 57:176

## PROBIOTICS: TRUE, DECEPTION OR JUST MARKETING

*Snežana Bulajić, Zora Mijačević\**

### Summary

Properly formulated probiotic-containing foods offers consumers a low risk and additionally has the potential to promote health in a variety of ways. Once healthful attributes of a probiotic product have been identified, there remain microbiological, product, regulatory and labeling issues to be addressed prior to marketing. Microbiological and product issues include safety, definition of probiotic activity, probiotic stability in the product over the course of product manufacture, definition of effective dose and target population. Regulatory and labeling issues are complicated because they differ for each country, but are likewise critical because they provide the means for communication of the product benefits to the consumers.

**Key words:** probiotic foods, microbiological, regulatory and labeling issue

---

\* Snežana Bulajić, Zora Mijačević, Department of Food Hygiene and Technology of Food of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade