

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Darija Franić

**INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes*
TIJEKOM FERMENTACIJE MLIJEKA S DODATKOM MEDA
POMOĆU *Bifidobacterium longum***

Diplomski rad

Osijek, lipanj 2009.

BIBLIOGRAFSKI PODACI

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**
Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**
Znanstvena grana: **Inženjerstvo**

Institucija u kojoj je rad izrađen:
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Nastavni predmet: **Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda**

Mentori: **Dr. sc. Vedran Slačanac, doc.; dr. sc. Hrvoje Pavlović, doc.**

Broj stranica: **34**

Broj slika: **25**

Broj tablica: **8**

Datum obrane: _____ **2009.**

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. | predsjednik |
| 2. Dr. sc. Vedran Slačanac, doc. | član – mentor |
| 3. Dr. sc. Hrvoje Pavlović, doc. | član – komentor |
| 4. Dr. sc. Jurislav Babić, doc. | zamjena člana |

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Franje Kuhača 20.

Predlagatelj teme **dr. sc. Jovica Hardi, red. prof.** imenovan je mentorom izrade diplomskog rada na III. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta, održanoj 26. svibnja 2008. godine, temeljem članka 62. Pravilnika o studiranju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.



Mentorstvo nad izradom i obranom ovog diplomskog rada **prof. Hardi dodijelio je** suradnicima dr. sc. Vedranu Slačancu, docentu i dr. sc. Hrvoju Pavloviću, docentu, zbog iznimnog doprinosa i angažmana u svim fazama izrade i pripreme rada za javnu obranu.

Diplomski rad je izrađen u okviru istraživanja na znanstvenom projektu pod šifrom 113-1130475-0336, pod imenom „Funkcionalna svojstva raznih vrsta mlijeka i sirutke fermentiranih probioticima“, čiji je voditelj prof. dr. sc. Jovica Hardi, a financiran je od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* TIJEKOM FERMENTACIJE MLIJEKA S DODATKOM MEDA POMOĆU *Bifidobacterium longum*

Sažetak

U radu je ispitivan utjecaj dodatka meda na tijek fermentacije kozjeg, kravljeg i sojinog mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb-46. Također, ispitivan je utjecaj medom zaslađenog fermentiranog mlijeka na inhibicijsko djelovanje rasta bakterije *Listeria monocytogenes*. Mlijeku su dodavane dvije vrste meda: tamna vrsta kestenovog meda i svijetla vrsta bagremovog meda. Osnovna pretpostavka u radu bila je da dodatak meda može utjecati na tijek fermentacije kozjeg, kravljeg i sojinog mlijeka, te na brzinu rasta *Bifidobacterium longum* Bb-46 u mlijeku. Pretpostavljen je i jači inhibicijski učinak fermentiranog mlijeka na rast *Listeria monocytogenes* uzrokovan dodatkom meda mlijeku prije fermentacije. Rezultati ispitivanja pokazali su da obje vrste meda poboljšavaju rast i aktivnost *Bifidobacterium longum* Bb-46, u svim vrstama mlijeka tijekom fermentacije. Istovremeno, u kozjem mlijeku je tijekom cijelog perioda fermentacije zabilježena viša kiselost i veći broj stanica *Bifidobacterium longum* Bb-46 nego u kravljem mlijeku. Testovi inhibicije rasta bakterije *Listeria monocytogenes* pokazali su da su veličine zona inhibicije ovisile o svim ispitivanim činiocima: vrsti mlijeka, vrsti dodanog meda, kao i o udjelu dodanog meda mlijeku prije fermentacije. Uzorci fermentiranog mlijeka s dodatkom kestenovog meda jače su inhibirali rast bakterije *Listeria monocytogenes* nego uzorci s dodatkom bagremovog meda.

Ključne riječi: *Bifidobacterium longum* Bb-46, fermentirano kozje, kravlje i sojino mlijeko, bagremov i kestenov med, inhibicijski učinak, *Listeria monocytogenes*

THE INHIBITION OF THE GROWTH OF BACTERIUM *Listeria monocytogenes* DURING THE MILK FERMENTATION WITH ADDITION OF HONEY BY *Bifidobacterium longum*

Summary

The aim of the study was to determine the influence of honey addition on fermentation of goat, cow and soya milk with *Bifidobacterium longum* Bb-46. Additionally, inhibitory potential of honey-sweetened fermented goat, cow and soya milk against *Listeria monocytogenes* strain was examined. Two monofloral honey types, dark-colored chestnut and light-colored acacia honey were added. The basic hypothesis of this study was that addition of honey could have influence on the growth of *Bifidobacterium longum* during the fermentation of milks. Furthermore, higher inhibitory potential caused by honey addition against *Listeria monocytogenes* has been assumed. Compared to cow milk, higher acidity and CFU of *Bifidobacterium longum* were noted in the fermented goat milk in all phases of the fermentation process. The results of this study show that both types of honey enhanced growth and acidity of the *Bifidobacterium longum* Bb-46 in both types of milk during fermentation.

Key words: Cows milk, goats milk, soya milk, *Bifidobacterium longum* Bb-46, accacia honey, chestnut honey, *Listeria monocytogenes*, inhibition

Prije svega, zahvalila bih se svojim roditeljima i sestri na bezuvjetnoj ljubavi i potpori. Hvala vam što ste mi omogućili školovanje i uvijek nastojali pružiti sve u životu. Zahvalu upućujem i svojoj baki Dragici koja se molila za svaki položen ispit i na taj način mi pružala potporu.

Velika hvala i mojim dragim prijateljima, a osobito Kristini. Hvala ti na svakom trenutku našeg studentskog života, svakom veselju, radosti i smijehu, ali i svim mukama i problemima koje smo zajedno uvijek lakše svladale. To su neprocjenjivi trenuci koji su obogatili moj život i zauvijek će mi ostati u lijepom sjećanju.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Jovici Hardiju, Mireli Lučan, dipl. ing., te dr. sc. Hrvoju Pavloviću, doc., i dr. sc. Vedranu Slačancu, doc. na pomoći u ostvarenju ovog rada.

SADRŽAJ

Str.

1. UVOD

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kravlje mlijeko.....	1
2.1.1. Energetska i nutritivna vrijednost.....	1
2.1.2. Ljekovitost.....	2
2.1.3. Sastojci mlijeka.....	3
2.1.3.1. Mliječna mast.....	3
2.1.3.2. Laktoza.....	3
2.1.3.3. Proteini.....	4
2.1.3.4. Enzimi.....	5
2.1.3.5. Mineralne tvari.....	5
2.2. Kozje mlijeko.....	6
2.2.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka.....	6
2.2.2. Okus kozjeg mlijeka.....	6
2.2.3. Terapijske vrijednosti.....	7
2.3. Sojino mlijeko.....	7
2.3.1. Definicija i svojstva sojinog mlijeka.....	7
2.3.2. Nutritivna vrijednost sastojaka sojinog mlijeka.....	8
2.3.3. Usporedba sastava sojinog i kravljeg mlijeka.....	8
2.4. Med.....	9
2.4.1. Bagremov med.....	9
2.4.2. Kestenov med.....	10
2.5. Terapijske kulture bakterija mliječne kiseline.....	10
2.5.1. <i>Bifidobacterium longum</i>	11
2.6. Bakterija <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.6.1. Opće karakteristike.....	12

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada.....	14
3.2. Materijal i metode.....	14
3.2.1. Priprava uzoraka i materijala.....	15
3.2.1.1. Priprava filtrata bez stanica.....	15
3.2.2. Priprema fiziološke otopine.....	16
3.2.3. Priprema Mueller-Hinton agara.....	16
3.2.4. Priprema MRS agara.....	16
3.2.5. Pasterizacija meda.....	16
3.2.6. Određivanje pH vrijednosti.....	16
3.2.7. Određivanje kiselosti.....	17
3.2.8. Priprema suspenzije bakterijskih stanica <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.2.9. Određivanje broja probiotičkih bakterija (CFU).....	17
3.2.10. Priprema podloge za inhibiciju.....	18

4. REZULTATI

4.1. Praćenje promjena fizikalno - kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom <i>Bifidobacterium longum</i>	19
4.2. Rezultati određivanja stupnja inhibicije rasta test organizma <i>Listeria monocytogenes</i> tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom <i>Bifidobacterium longum</i>	28

5. RASPRAVA

5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije.....	30
5.2. Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije.....	30
5.3. Promjena broja bakterija <i>Bifidobacterium longum</i> tijekom fermentacije.....	31
5.4. Usporedba inhibicije bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.....	31

6. ZAKLJUČCI.....	32
-------------------	----

7. LITERATURA.....	33
--------------------	----

1. UVOD

1. Uvod

Potražnja za fermentiranim probiotičkim napicima raste iz dana u dan. Razlog tome je njihov pozitivan učinak i blagotvorno djelovanje na zdravlje koje je narušeno svakodnevnim stresovima i različitim naporima koje donosi sve užurbaniji tempo života.

Probiotičke kulture selektivno stimuliraju rast poželjnih mikroorganizama, a ujedno inhibiraju patogene bakterije, što u konačnici rezultira boljim i značajno jačim imunitetom organizma.

Jedna od patogenih bakterija čiji se negativan utjecaj pokušava spriječiti ili donekle smanjiti je *Listeria monocytogenes*. Ova bakterija ima sposobnost preživljavanja pri niskim vrijednostima pH i zbog toga je potencijalno opasna za ljudski organizam u kojem može izazvati infekcije.

Premda na tržištu postoje različite vrste mlijeka, primjena probiotičkih kultura se uglavnom bazira na kravljem mlijeku, te u manjoj mjeri na kozjem, a u zadnje vrijeme i na sve više cijenjenom sojinom mlijeku [1].

Pozitivnom učinku na zdravlje, osim samog mlijeka i probiotičkih kultura, može doprinjeti i primjena različitih vrsta meda.

Cilj rada bio je ispitati u kojoj mjeri fermentirani probiotički napici od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka, uz dodatak kestenovog i bagremovog meda inhibiraju bakteriju *Listeria monocytogenes*. Fermentacija se pratila, te analizirala preko: aktivne kiselosti, titracijske kiselosti i promjene broja probiotičkih stanica u fermentiranim proizvodima.

Svrha ovog rada je bila ispitati koja vrsta fermentiranog mlijeka, te koja vrsta i udio dodatka meda imaju najbolji inhibirajući učinak na odabranu bakteriju.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. Kravlje mlijeko

Mlijeko je proizvod mliječne žlijezde različitih vrsta sisavaca (krava, koza, ovaca), predodređen za prehranu mladog organizma, jer sadrži gotovo sve tvari potrebne za razvoj i rast. Kravlje mlijeko dobiva se od zdravih, dobro njegovanih i ispravno hranjenih krava. Kvaliteta mlijeka ovisi o pasmini krave, dobi, zdravlju i hranjenju životinje, o načinu mužnje i postupku s mlijekom nakon mužnje.

Kvalitetno mlijeko je žućkaste boje, neprozirno, čisto, ugodnog mirisa, blagog i slatkastog okusa, dok je mlijeko loše kvalitete plavkasto, vodenasto, kiselkastog okusa, mogućeg neugodnog mirisa po staji ili hrani životinje. Nakon prijema u mljekaru, sirovo se mlijeko u posebnim uređajima pasteurizira, na temperaturi od 65 do 75 °C u trajanju od 20 sekundi, čime se uništavaju patogeni i uvjetno patogeni mikroorganizmi. Kravlje mlijeko dolazi na tržište bez pobliže oznake podrijetla, dok se mlijeko drugih životinja mora posebno deklarirati. [1].

2.1.1. Energetska i nutritivna vrijednost

Mlijeko se koristi u ljudskoj prehrani već 10 000 godina, a kroz povijest je u mnogim civilizacijama bilo visoko cijenjeno. Prodaje se u niz varijanti, ovisno o udjelu mliječne masti, a na našem tržištu on se kreće od 0,9% do 3,7%, često obogaćeno vitaminima i kalcijem. Od mlijeka se proizvode raznovrsni proizvodi kao što su sir, fermentirani mliječni napitci (jogurt, kefir), a sve češće dodaju se probiotički mikroorganizmi, te poboljšivači teksture i prebiotici. Nutritivno, 100 g mlijeka s udjelom od 3,25% mliječne masti, ima energetske vrijednosti od 60 kcal/ 251 kJ, 3,22% proteina, 3,25% masti, 4,52% ugljikohidrata. Od minerala dobar je izvor kalcija 113 mg (11% preporučenog dnevnog unosa) i fosfora 91 mg (11,4% preporučenog dnevnog unosa). Od vitamina dobar je izvor vitamina B12 (18% preporučenog dnevnog unosa) i riboflavina (14% preporučenog dnevnog unosa) [2].

Mlijeko i mliječni proizvodi, u prehrani čovjeka osiguravaju, osim bjelancevina, i lako probavljivu mast, šećer, mineralne tvari, lipide, vitamine A i D, pa se može naglasiti, sumarno, veliku količinu raznovrsnih hranjivih tvari.

Kazein je glavni protein mlijeka (u koji je ugrađen kalcij, tako da se lako apsorbira) čijim se izdvajanjem pomoću sirila i daljnjom obradom dobiva sir, a iz ostataka, sirutke, proizvodi se protein sirutke, a može se proizvoditi albuminski sir različitih svojstava.

Tablica 1 Energetska i nutritivna vrijednost 100 g kravljeg mlijeka s 3,25% m.m. [2]

Hranljive tvari	Mjerna jedinica	Količina
Energetska vrijednost	kcal / kJ	60 / 251
Ukupno bjelančevina	g	3,22
Ukupno ugljikohidrata	g	4,52
Ukupno masti	g	3,25
Dijetalna vlakna	g	0,00
Kolesterol	mg	10,00

Optimalni unos kalcija u ljudski organizam bi se trebao kretati u vrijednosti od 800 mg do 1,5 g na dan. Kronično pomanjkanje kalcija tijekom adolescencije može kočiti razvoj koštane mase, što može pridonijeti pojavi osteoporoze u kasnijoj životnoj dobi.

Vitamin D i fosfor zajedno s kalcijem sudjeluju u izgradnji zdravih, snažnih kostiju. Kalcij također pomaže regulaciji krvnog tlaka i normalnom radu srca.

2.1.2. Ljekovitost

Mlijeko je najpoznatije po sadržaju minerala kalcija koji održava jačinu i gustoću kostiju. Kalcij i fosfor se vežu u kompleks koji kostima daje strukturu. Kalcij iz mlijeka bolje se resorbira u organizmu nego iz drugih namirnica. Nedavne studije otkrile su da kalcij štiti stanice debelog crijeva od tvari koje uzrokuju rak, sprječava slabljenje kostiju tijekom menopauze ili kod bolesti kao što je reumatoidni artritis. Ublažava simptome PMS-a, pomaže u sprječavanju migrene i dječje pretilosti, a kod odraslih pomaže u gubitku težine, osobito u struku. Kalcijem bogati mliječni proizvodi utječu na brzu potrošnju masti nakon obroka. Vitamin D, u suradnji s hormonima, održava optimalnu razinu kalcija u krvi. Također sudjeluje u regulaciji stvaranja i rasta stanica, što upućuje na to da vitamin D ima ulogu u prevenciji i tretmanu raznih oblika raka [2].

Kravlje mlijeko i fermentirani proizvodi, kao što je jogurt, sadrže laktoferin, protein koji potiče rast i aktivnost osteoblasta (koštanih stanica), a u isto vrijeme usporava razgradnju kostiju za 50-70%, smanjuje stvaranje osteoklasta (stanica odgovornih za razlaganje kostiju), te potiče rast kronocita, stanica za izgradnju hrskavice. Učinci proteina ovise o dozi - veće doze mogu povećati učinkovitost i do 5 puta. Rezultati novih istraživanja pokazuju da svakodnevno konzumiranje mlijeka smanjuje opasnost od moždanog i srčanog udara, rizik od raka debelog crijeva i pojavu gihta.

Od vitamina B kompleksa u mlijeku se nalaze riboflavin (B2) i vitamin B12, koji su važni kofaktori u proizvodnji energije u organizmu. Organski proizvedeno mlijeko je dobar izvor omega-3 masnih kiselina, važnih za održavanje mentalnog zdravlja i zdravlja krvožilnog sustava. Fermentirani mliječni proizvodi lakše su probavljivi, olakšavaju probavu i povoljno djeluju kod crijevnih poremećaja i preporučuju se u prehrani ljudi s manjkom želučanog soka. Mlijeko kao izuzetno kvalitetna namirnica, ima i svojih nedostataka. Sve je veći broj ljudi koji ne mogu podnijeti laktozu, mliječni šećer, ali, na sreću, postoje alternative koje su obogaćene kalcijem, dobrog su okusa i bogat su izvor proteina, vitamina i minerala. Jedna od opcija je mlijeko od soje, bogato izoflavonima, koji imaju antikancerogeni učinak [2].

2.1.3. Sastojci mlijeka

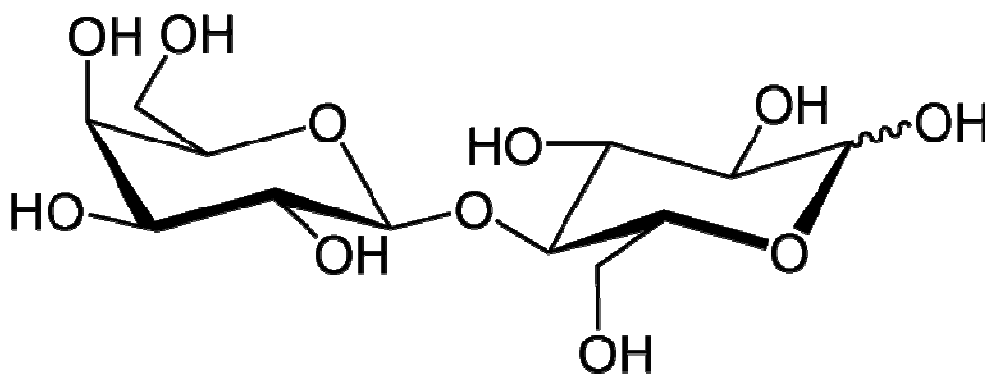
2.1.3.1. Mliječna mast

Mliječna mast je kompleks različitih lipidnih tvari, od kojih se neke u neznatnoj količini nalaze i u plazmi u slobodnom stanju. Nalazi se u obliku globula obavijenih adsorpcijskim slojem ili membranom koja ju stabilizira u okolnoj sredini mlijeka.

U plazmi mlijeka se nalazi nešto slobodnih sterola i slobodnih masnih kiselina, te fosfolipida. Mliječna mast se sastoji uglavnom od triacilglicerola zajedno s malom količinom diacil- i monoacilglicerola. Drugi sastojci mliječne masti nalaze se u vrlo malim količinama. To su vitamini topivi u mastima, uglavnom A, D i E, te tragovi vitamina K, kao i sastojci arome, te karotenoidni pigmenti [3].

2.1.3.2. Laktoza

Laktoza je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) sastavljen od molekula α -D-glukoze i β -D-galaktoze. To je mliječni šećer koji je prisutan u majčinom mlijeku i mlijeku velike većine sisavaca, ali u različitim udjelima.



Slika 1 Laktoza [4]

Od sastojaka suhe tvari, laktoza je u svježem kravljem mlijeku najviše zastupljena i to u količini od 4,7%. Pojavljuje se u dva strukturno izomerna oblika: α i β - oblik. Oni se međusobno razlikuju po položaju H i OH skupine na prvom C atomu glukozidnog dijela laktoze. To laktozu čini optički aktivnom pa se može odrediti polarimetrijski.

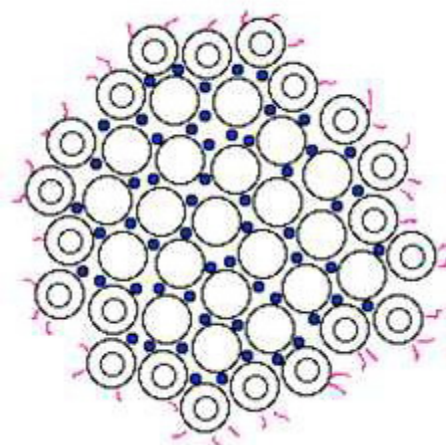
U mlijeku može doći do fizikalno-kemijskih promjena na laktozi i to najviše djelovanjem mikroorganizama, koji raznim biokemijskim putovima provode nekoliko vrsta fermentacija, ovisno o vrsti mikroorganizama i nizu ostalih uvjeta.

To su:

- Mliječno - kiselo vrenje (bakterije mliječne kiseline)
- Propionsko - kiselo vrenje (bakterije propionske kiseline)
- Maslačno - kiselo vrenje (bakterije maslačne kiseline)
- alkoholno vrenje (kvasci)
- koliformno - plinovito vrenje (*Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes*) [3].

2.1.3.3. Proteini

Mlijeko sadrži oko 95% proteina i 5% neproteinskih dušičnih tvari u koje se ubrajaju: slobodne aminokiseline, aminošećeri, mali peptidi, kreatin, kreatinin, urea, ureinska kiselina i amonijak. Od proteinskih tvari, dva su glavna tipa proteina bitna. To su kazein i proteini sirutke.



Slika 2 Struktura kazeinske micela [5]

Kazein je po udjelu najzastupljeniji protein mlijeka. Sastoji se od nekoliko frakcija: α_{S1} -; α_{S2} -; β -; γ - i κ -kazeina, koji su osim γ - kazeina genski proizvodi mliječne žlijezde. Kazein je u mlijeku oblikovan u složene nakupine, tzv. "micela", kazeina. To su nakupine određenog broja manjih globularnih jedinica (submicela), koje nastaju povezivanjem kazeinskih frakcija.

Micele kazeina su koloidno dispergirane u svježem mlijeku i vrlo su stabilne. Ali djelovanjem različitih čimbenika mogu nastati različite promjene kao:

- promjena stabilnosti kazeina
- razgradnja kazeina
- interakcija s drugim sastojcima mlijeka
- koagulacija kazeina

Od ukupnih proteina sirutke u mlijeku najviše ima β -laktoglobulina i α -laktoalbumina, te u manjem udjelu manjih polimera, proteoza – peptoni i manjih udjela proteina koji potječu iz krvi: imunoglobulini i albumini krvnog seruma [3].

2.1.3.4. Enzimi

Endogeni enzimi mlijeka potječu iz mliječne žlijezde, a egzogeni od mikroorganizama i ne smatraju se normalnim sastojkom mlijeka. Po sastavu su to proteini složene strukture, a prema funkciji su to biokemijski katalizatori, koji utječu na brzinu reakcije. Enzimi mogu uzrokovati promjene sastojaka, što može utjecati na senzorsku kakvoću mlijeka, ali i finalnog mliječnog proizvoda.

U mlijeku je prisutno oko 60 različitih enzima: lipaze, fosfataze, alkalna fosfataza, peroksidaze, katalaze, reduktaze, proteinaze i drugi. Jedni od najbitnijih enzima u mlijeku koje kataliziraju hidrolizu masti uz oslobađanje masnih kiselina su lipaze. Uzročnici su *užeglosti mlijeka* te daju gorak okus i neugodan miris. U svježe pomuženom mlijeku količina lipaza je vrlo mala [3].

2.1.3.5. Mineralne tvari

U mlijeku je prisutno oko 40 različitih mineralnih tvari. Mikroelemenata ima brojčano puno više i uglavnom su utvrđeni u tragovima (Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Cu, F, Ba i drugi), dok se makroelementi u mlijeku nalaze u obliku organskih i anorganskih soli.

Najviše mineralnih tvari se nalazi u obliku topljivih disociranih ili nedisociranih anorganskih soli, uglavnom klorida, fosfata i citrata, a mogu se naći i u ionskom, molekularnom ili koloidnom obliku.

Količina kalcija u svježem mlijeku je prilično stabilna, a na njega povoljno djeluje omjer Ca i P koji iznosi 1,2-1,4 : 1 i pomaže da ga ljudski organizam bolje iskoristi [3].

2.2. Kozje mlijeko

Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih i pravilno uzgajanih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog mirisa [6]. Iako kozje mlijeko čini svega 2% ukupne svjetske proizvodnje, u prehrani se sve više ističu njegove prednosti. U posljednjih 20 godina proizvodnja kozjeg mlijeka u svijetu bilježi sve veći porast [7].

2.2.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka

Osnovni sastav kozjeg i kravljeg mlijeka vrlo je sličan. Sastav kozjeg mlijeka značajno se mijenja, ovisno o pasmini i genotipu koza, redoslijedu i stadiju laktacije te godišnjem dobu. Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka i efikasnija je apsorpcija aminokiselina. Iako je biološka vrijednost ova dva mlijeka približno jednaka ipak analiza aminokiselina pokazuje nešto veću količinu slobodnih aminokiselina u kozjem mlijeku, a osobito slobodnih esencijalnih aminokiselina.

Mast kozjeg mlijeka je probavljivija od masti kravljeg mlijeka, jer su masne globule kozjeg mlijeka manje i ima ih više pa je ukupna masna površina veća, te ih lipaze u crijevima lakše razgrađuju. Takve manje globule masti bolje su raspršene u mlijeku pa osiguravaju puno bolju homogenost kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje.

Kozje mlijeko sadrži veću količinu mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan. Krajem laktacije mlijeko sadrži više mineralnih tvari pa je ta slanost izraženija. Kozje mlijeko je izvrstan izvor biorazgradivog kalcija, fosfora i magnezija, jer sadrži veće udjele tih tvari u topljivom obliku u odnosu na kravlje.

2.2.2. Okus kozjeg mlijeka

Karakterističan kozji okus kozjem mlijeku daje frakcija slobodnih masnih kiselina unutar lipida [8]. Vrlo je rašireno mišljenje o neprihvatljivom okusu i mirisu kozjeg mlijeka. Do karakterističnog nepoželjnog okusa može doći tijekom lošeg postupanja s mlijekom, od trenutka mužnje do predaje ili proizvodnje određenih proizvoda.

2.2.3. Terapijske vrijednosti

Kozje mlijeko ima i neke terapijske prednosti i važno je za ljude koji su alergični na kravlje mlijeko. Oko 40 od 100% osoba alergičnih na kravlje mlijeko tolerira kozje mlijeko. Te osobe su vjerojatno osjetljive na kravljji laktalbumin koji je specifičan za vrstu.

Kozje mlijeko sadrži više selena ($1,33 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) u odnosu na kravlje ($0,96 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ selena). Selen je neophodan za aktivnost enzima glutation peroksidaze, koji veže slobodne radikale, te pogoduje prevenciji karcinoma i krvožilnih bolesti.

Od ostalih vrijednosti ističe se suzbijanje alergija, povećanje imunološkog sustava, umanjuje rizik raka pluća, preporuča se pušačima i dijabetičarima te liječi bronhitis [8].

2.3. Sojino mlijeko

2.3.1. Definicija i svojstva sojinog mlijeka

Sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna ili fina emulzija sojinog brašna odnosno izoliranih sojinih proteina u vodi s dodatkom vitamina, mineralnih tvari i arome. To je bjelkasta emulzija/suspencija koja sadrži u vodi topljive proteine i ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u zrnu soje. Postoji još mnogo definicija sojinog mlijeka, kao što postoji mnogo načina na koje se ono može proizvesti. Ipak, svi se slažu u tome da je sojino mlijeko, u užem smislu, vodeni ekstrakt sojinog zrna [9,12].

Graškast, sirov okus najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka. Taj nepoželjni okus potječe od nekih aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksigenaza (Tsangalis i Shah, 2004.). Tih sastojaka nema u neoštećenom, suhom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrnje smoči i melje [10].

Postoji nekoliko pristupa rješavanju problema nepoželjnog okusa u sojinom mlijeku:

- Inaktivacija lipoksigenaze toplinom u suhom zrnju ili tijekom procesa mokrog mljevenja;
- Upotreba odmašćenih početnih sirovina (odmašćeno sojino brašno, koncentrat proteina soje ili čak izolati sojinih proteina);
- Odstranjivanje tvari arome evaporacijom (deodorizacija);
- Prikrivanje gorčine i nepoželjnih okusa zaslađivanjem i aromatiziranjem (npr. aroma čokolade ili kave);
- Razvoj genetički modificiranih sorti soje bez lipoksigenaze [10].

2.3.2. Nutritivna vrijednost sastojaka sojinog mlijeka

Sojini proteini, koji se nalaze i u sojinom mlijeku, sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za zdravu prehranu čovjeka. Oni su prikladni za gotovo svačiju prehranu, obzirom da uopće ne sadrže kolesterol niti laktozu. Nutritivna prednost sojinih proteina je u tome što potrošaču pružaju zamjenu za životinjske proteine uz manji udjel masti, a potpuno su bez kolesterola.

Posljednja dva desetljeća istraživači i znanstvenici iz cijelog svijeta dokumentiraju povoljne utjecaje sojinih proteina na ljudsko zdravlje. Sojini proteini pomažu smanjivanju razine kolesterola u krvi, ublažavaju simptome menopauze, umanjuju rizik oboljenja od raznih bolesti, kao što su karcinomi, osteoporoza, žučni kamenac, a čak se istražuje mogućnost poboljšavanja stanja bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti i AIDS-a.

Novim otkrićima soja ulazi na popis funkcionalne hrane, tj. trenutno se nalazi između hrane i lijeka. Put od stočne hrane do lijeka, soja je prešla za samo desetak godina. Proizvođači hrane posljednjih nekoliko godina počinju ozbiljno razmatrati sojin potencijal u području funkcionalne hrane, jer njeni sastojci nadilaze osnovne nutritivne potrebe, te pružaju zaštitu od bolesti i poboljšavaju sveukupno zdravlje.

Zbog povećanog interesa za sojine proizvode i njihove pozitivne učinke po ljudsko zdravlje, proizvođači traže što više načina da soju kao sastojak uklope u nove, ukusne i hranjive proizvode [10].

2.3.3. Usporedba sastava sojinog i kravljeg mlijeka

Sojino i kravlje mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih svojstava, osim velikog udjela visokovrijednih proteina [12]. Punomasno sojino mlijeko sadrži 2,86 do 3,12% proteina, 90 do 93,81% vode, 1,53 do 2% lipida, 0,27 do 0,48% pepela, 1,53 do 3,90% ugljikohidrata računato kao ostatak do 100%. Sojino mlijeko obično sadrži više vode od kravljeg mlijeka, a i ostali sastojci se znatno razlikuju. Proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein, a proteine sojinog mlijeka čini pretežno glicinin i u manjoj mjeri neke druge proteinske frakcije. Poznata mana proteina sojinog mlijeka je nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistin [12].

Ugljikohidrati u kravljem mlijeku isključivo su u obliku laktoze, dok su u sojinom mlijeku oligosaharidi stahioza i rafinoza. Iako kravlje mlijeko sadrži znatno veće udjele kalcija i fosfora, ono je vrlo siromašno željezom (oko 1 mg/L). Sojino mlijeko sadrži oko 10 puta više željeza u odnosu na kravlje, ali je njegova bioiskoristivost manja [12].

Energijska vrijednost 100 g punomasnog kravljeg mlijeka je 64 kcal, a sojinog mlijeka 49 kcal. Ista masa kravljeg mlijeka sadrži oko 14 mg kolesterola, laktozu i ne sadrži dijetalna vlakna, dok sojino mlijeko sadrži 1,3 g vlakana, a nema kolesterola niti laktoze. U oba mlijeka nalazi se puno proteina s kompletnim rasponom potrebnih aminokiselina, ali sojino mlijeko sadrži veće udjele arginina, alanina, glicina i asparaginske kiseline [10].

2.4. Med

2.4.1. Bagremov med

Bagremov med je gust, izrazito svijetao, gotovo proziran, ugodnog mirisa i blagog okusa koji podsjeća na okus soka od bagrema. Ubraja se u najcjenjenije vrste meda. Pomaže kod nesanice, umiruje previše nadraženi živčani sustav i otklanja posljedice nagomilanog stresa. Mjesecima ostaje u tekućem stanju i jedan je od vrsti meda koji vrlo sporo kristalizira zbog toga što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Bagremov med dobar je za umirenje, kod vrtoglavice, nesanice i sličnih smetnji.

Obilnih bagremovih paša za pčele nalazimo gotovo u svim kopnenim krajevima Hrvatske u kojima je nekad sađen ili se proširio prirodnim putem kao vrlo prilagodljiva biljka [13]. U nas su poznatija područja Podravine, Hrvatskog Zagorja i Moslavačke gore. Voli pjeskovita tla. Šumari ga koriste u zasadima za zaštitu tla od erozija. Cvjeta u prvoj polovini svibnja. Ovisno o reljefu i klimatskim prilikama može cvjetati i mediti do kraja svibnja [11].



Slika 3 Bagremov med [14]

2.4.2. Kestenov med

Med kestena je taman, a tamna boja mu varira ovisno o podneblju i godini, prepoznatljivog je mirisa i izrazito karakterističnog pomalo gorkog okusa. Povoljno djeluje na cjelokupni probavni sustav. Potiče rad crijeva, olakšava rad preopterećenih jetara i žuči, te štiti želučanu i crijevnu sluznicu.

Kestenov med se preporuča protiv bolesti probavnih organa: želuca, dvanaesterca, žuči i jetara. Med kestena ima izvanredno djelovanje u oporavku kod žutice, poslije operacije žuči i sl. [15].



Slika 4 Kestenov med [16]

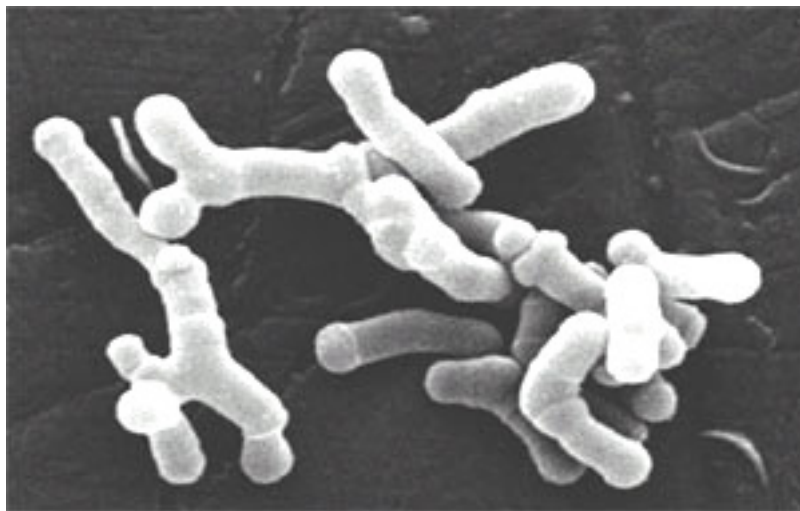
2.5. Terapijske kulture bakterija mliječne kiseline

Bifidobakterije su uobičajeni stanovnici ljudskog i životinjskog probavnog sustava, a novorođenčad naseljavaju ubrzo nakon rođenja. Ime roda su dobile po karakterističnom Y obliku stanica. Populacija ostaje stabilna tijekom života, sve do uznapredovale dobi kada im se broj smanjuje [17].

Bifidobakterije su štapičaste, anaerobne, G+, nepokretne, nesporogene bakterije od kojih je iz ljudskog organizma izolirano 10 vrsta [18].

2.5.1. *Bifidobacterium longum*

Bifidobacterium longum je jedna od najznačajnijih bakterija koja nastanjuje ljudski gastrointestinalni trakt. To je bakterija koja omogućuje lak i normalan rad probavnog sustava, sprječava rast štetnih bakterija i potiče rad imunološkog sustava.



Slika 5 *Bifidobacterium longum* [19]

Bakterije poput *B. longum* fermentiraju šećere u mliječnu kiselinu i imaju mnoge pozitivne učinke na zdravlje. Zbog tih razloga se ljudska prehrana obogaćuje tim mikrobima, a takve namirnice se nazivaju probioticima.

Bakterije mliječne kiseline se nalaze u namirnicama mliječnog podrijetla ili se mogu uzimati u obliku praha, tekućeg ekstrakta ili tableta, a liječnici ih osobito preporučaju pacijentima koji uzimaju antibiotike ili koji imaju bakterijske, virusne ili gljivične infekcije ili probleme sa probavnim traktom [19].

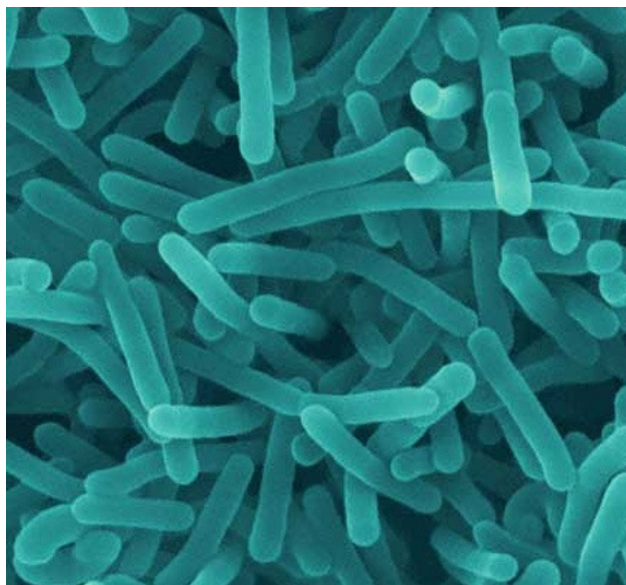
Novija istraživanja ukazuju kako su sojevi *B. longum* najviše prilagođeni za fermentaciju mlijeka u usporedbi s ostalim vrstama roda *Bifidobacterium*. Potrebno je napomenuti kako svaka vrsta (a i soj) bifidobakterija posjeduje jedinstvena tehnološka svojstva: brzinu rasta, proizvode metabolizma, proteolitičku aktivnost i aromu [18].

2.6. Bakterija *Listeria monocytogenes*

2.6.1. Opće karakteristike

Listeria monocytogenes je novi patogen u mikrobiologiji namirnica. Ova bakterije je prisutna posvuda u prirodi. Iako je izolirana prvenstveno iz sirove hrane biljnog i životinjskog porijekla, također može biti prisutna i u kuhanoj hrani i tada je rezultat naknadne kontaminacije onečišćenim priborom i posuđem [20].

Listeria monocytogenes su gram pozitivni, mikroaerofilni do aerobni, asporogeni, pokretni štapići. Raste na temperaturama od 1 °C do 45 °C, a optimalna temperatura rasta je između 30 do 37 °C, a pH vrijednost između 6 do 9. Ne sadrže kapsulu i imaju tendenciju formiranja lanca [21].



Slika 6 *Listeria monocytogenes* [24]

Ima veliku toleranciju na ekstremne uvjete okoliša, pa tako može preživjeti uz raspon pH od 4,3 do 10 i uz prisutnost 10% NaCl (a_w 0,92) [23]. *Listeria monocytogenes*, prvi puta je izolirana prije više od 75 godina iz krvi zaraženih životinja, a može se izolirati i iz tla, silaže i drugih okolišnih izvora. Prilično je otporna na zamrzavanje, sušenje i dobro podnosi toplinu za bakteriju koja ne stvara spore.

Većina sojeva vrste *Listeria monocytogenes* su patogene do određenog stupnja, uzrokuju akutnu bolest listeriozu, koja se manifestira u obliku septikemije, meningitisa, encefalitisa i intrauterinih infekcija ili infekcija vrata maternice trudnih žena, što može biti uzrokom pobačaja. Povezana je sa hranom kao što su sirovo mlijeko, loše pasterizirano mlijeko, sir, sladoled i slični proizvodi, puretina, piletina i povrće, ali za razliku od drugih bolesti koje se javljaju konzumiranjem hrane, posljedice infekcija djelovanjem *Listeria monocytogenes* mogu završiti s visokom smrtnošću čak do 30 %.

Infekcija ovom bakterijom je izuzetno opasna za malu djecu, trudnice (kod kojih uzrokuje pobačaj, smrt fetusa, neonatalnu sepsu), starije i imuno kompromitirane osobe, sa relativno visokim mortalitetom. Ulazak bakterije u organizam jest oralnim putem, preko hrane. S obzirom da je još uvijek nepoznata infekcijska doza *L. monocytogenes*,

mikrobiološki standard za ovu bakteriju je vrlo strog; bakterija ne smije uopće biti prisutna u hrani, a namirnica iz koje se izolira *L. monocytogenes* smatra se zdravstveno neispravnom [20].

Rod *Listeria* je podijeljen u sedam vrsta:

L. monocytogenes

L. ivanovii

L. seeligeri

L. welshimeri

L. innocua

L. grayi

L. murray [22].

Premda samo 3 od 6 vrsta uzrokuju infekcije kod ljudi i životinja, a to su *L. monocytogenes*, *L. Ivanovii* i *L. seeligeri*, samo je *L. monocytogenes* važna kao patogen koji potječe iz hrane [23].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadatak rada je bio pripremiti probiotičke fermentirane napitke od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka uz dodatak kestenovog i bagremovog meda u različitim udjelima (3%, 5%, i 10%), te kontrolne uzorke bez dodatka meda. Tijekom 25 sati fermentacije svakih 5 sati (0., 5., 15., 20. i 25.) pratiti promjene pH-vrijednosti, ukupne kiselosti i broj probiotičkih bakterija u uzorcima s medom. Tijekom rada se pratio stupanj inhibicije u uzorcima s medom, uzorcima bez meda, u nenacjepljenom mlijeku na početku, u sredini i na kraju fermentacije (0., 15. i 25. sat), te u supernatantu: uzorku bez probiotičkih stanica uklonjenih mikrofiltracijom.

3.2. Materijal i metode

Za pripremu probiotičkih napitaka korišteno je:

- Kravlje mlijeko: kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano s 2,8% mliječne masti (proizvođač Vindija Varaždin),
- Kozje mlijeko: kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano s 3,2% mliječne masti (proizvođač Vindija Varaždin),
- Sojino mlijeko: 2,2% masti, bez šećera i soli (proizvođač Alpro Soya, Belgija).

Za inokulaciju mlijeka korištena je liofilizirana komercijalna DVS kultura:

- *Bifidobacterium longum* Bb-46 proizvođača Laboratorij Christian Hansen, Copenhagen, Danska. Za inokulaciju je korišteno 0,03 g/100 mL uzorka.

Kao prebiotički dodatak u sve tri vrste mlijeka korišteni su:

- kestenov i
- bagremov med

(proizvođač Apimel, Hrvatska) u udjelima od:

- 3% (6 g/200 mL)
- 5% (10 g/200 mL)
- 10% (20 g/200 mL)

Kao patogena kultura korištena je bakterija:

Listeria monocytogenes

3.2.1. Priprava uzoraka i materijala

Uzorci od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka uz dodatak mikrobne kulture, te kestenovog i bagremovog meda su pripremljeni prema Tablici 2, nakon čega su inkubirani u termostatu 25 h na 37 °C.

Tablica 2 Priprava uzoraka

Broj	Oznaka	Mlijeko			<i>B. longum</i>	Med					
		kravlje	kozje	sojino		Bagrem			Kesten		
						3%	5%	10%	3%	5%	10%
1.	Kr-0	200 ml			0,06 g						
2.	Kr-3%B	200 ml			0,06 g	6 g					
3.	Kr-5%B	200 ml			0,06 g		10 g				
4.	Kr-10%B	200 ml			0,06 g			20 g			
5.	Kr-3%K	200 ml			0,06 g				6 g		
6.	Kr-2%K	200 ml			0,06 g					10 g	
7.	Kr-2%K	200 ml			0,06 g						20 g
8.	Ko-0		200 ml		0,06 g						
9.	Ko-3%B		200 ml		0,06 g	6 g					
10.	Ko-5%B		200 ml		0,06 g		10 g				
11.	Ko-10%B		200 ml		0,06 g			20 g			
12.	Ko-3%K		200 ml		0,06 g				6 g		
13.	Ko-5%K		200 ml		0,06 g					10 g	
14.	Ko-10%K		200 ml		0,06 g						20 g
15.	So-0			200 ml	0,06 g						
16.	So-3%B			200 ml	0,06 g	6 g					
17.	So-5%B			200 ml	0,06 g		10 g				
18.	So-10%B			200 ml	0,06 g			20 g			
19.	So-3%K			200 ml	0,06 g				6 g		
20.	So-5%K			200 ml	0,06 g					10 g	
21.	So-10%K			200 ml	0,06 g						20 g

3.2.1.1. Priprava filtrata bez stanica

Iz uzoraka za određivanje 25-og sata se odlije po 30 mL u 7 označenih kiveta tako da se kiveta zajedno sa čepom i 30 mL uzorka izvaže i zabilježi se masa. Sljedeće kivete se nadopunjavaju na vagi uzorkom do te iste mase. Jedna kiveta se napuni destiliranom vodom zbog ravnoteže tijekom centrifugiranja. Nakon 15 minuta centrifugiranja na 2200 g, čisti supernatant se sterilizira membranskom filtracijom (Nylon Ø 30 mm, pore 0,45 µm).

3.2.2.Priprema fiziološke otopine

U tikvicu od 1000 mL se doda 8,5 g NaCl i nadopuni do oznake destiliranom vodom i promješa. Tako pripremljena fiziološka otopina se dodaje u potrebni broj epruveti koje se steriliziraju u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

3.2.3.Priprema Mueller Hinton agara

13,3 g Mueller Hinton agara se rastopi u 350 mL vode. Priprave se 2 tikvice. Tada se zagrijava uz povremeno mućkanje i otvaranje čepa boce da se ispusti para i da ne dođe do puknuća tikvice. Nakon što se agar dobro rastopio, razlije se u odgovarajući broj epruveta po 10 mL i zatim se sterilizira u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

Prije upotrebe se sadržaj otopi u vodenoj kupelji (100 °C), ohladi na 45 do 50 °C i dobro promućka te se nakon dodatka patogene kulture raspodijeli u sterilne Petrijeve zdjelice (25 mL / 9 cm promjera / 4 mm visina).

3.2.4. Priprema MRS agara

Priredi se 5 tikvica u kojima se rastopi 21,06 g agara u 300 mL hladne destilirane vode te se sterilizira u autoklavu na 121 °C 15 minuta.

3.2.5. Pasterizacija meda

Med se pasterizirao u vodenoj kupelji na 70 °C / 30 minuta, nakon čega se ohladi i čuva u hladnjaku.

3.2.6. Određivanje pH vrijednosti

Prije samog određivanja pH-metar se baždari puferima poznate vrijednosti (pH 4,00 i pH 7,00). U 7 označenih kiveta odlije se po 10 mL uzorka, a određivanje se vrši na način da se u svaku kivetu uroni elektroda, a nakon zvučnog signala se očita pH, a zatim i elektrokemijski potencijal. Između svakog mjerenja potrebno je elektrodu isprati i ako uređaj to zahtjeva, ponovno baždariti.

3.2.7. Određivanje kislosti

Nakon prethodnog određivanja, uzorak se razrijedi s 10 mL destilirane vode. U Erlenmayerovu tikvicu se doda 2 do 3 kapi fenolftaleina (10% u etanolu) i titrira se sa 0,1 M NaOH do pojave svijetlo ružičaste boje postojeane nekoliko sekundi. Tada se očita utrošeni volumen NaOH koji se koristi u izračunu:

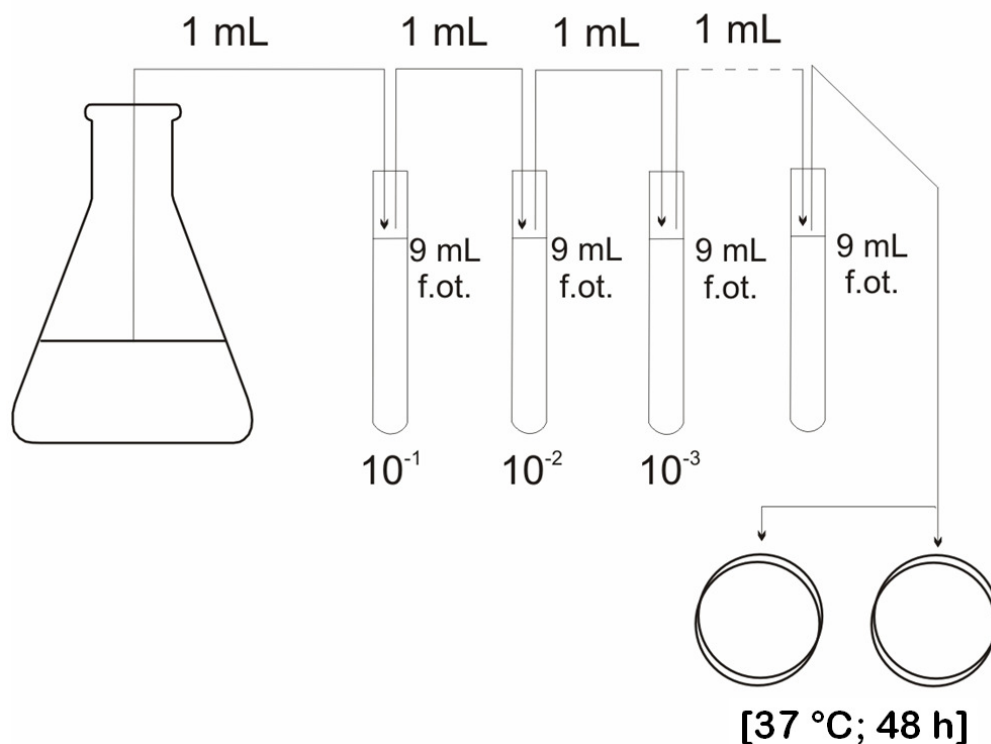
- **stupanj po Soxhlet-Henkelu ($^{\circ}\text{SH}$) = volumen NaOH (u ml) $\times$ 2**
- **% mliječne kiseline = $^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$**

3.2.8. Priprema suspenzije bakterijskih stanica *Listeria monocytogenes*

U epruvetu s 24 sata starom kulturom doda se 1 mL fiziološke otopine. Povlači se lagano ušicom po uzgoju i prenese po 1 mL pipetom u epruvetu s 9 ml fiziološke otopine. Zatim se homogenizira i uspoređi dobivena suspenzija stanica s 0,5 Mc Farlandovim standardom (10^8 stanica u mL) i ako je potrebno prilagodi se.

3.2.9. Određivanje broja probiotičkih bakterija (CFU)

Prije samog određivanja, označe se petrijeve zdjelice oznakama uzoraka i satom u kojem se određuje CFU (Colony Forming Unit). Rade se 2 paralele. Iz uzorka se prenese odgovarajući volumen pipetom u epruvetu sa fiziološkom otopinom, homogenizira se i pipetom opet prenosi u drugu epruvetu sa fiziološkom otopinom i sve dok se ne postigne željeno razrjeđenje. Uzorak se zatim pipetom prenese u petrijevu zdjelicu, ulije se dobro rastopljeni Müller Hinton agar i sve se dobro promješa na propisani način kružnim pokretima. Postupak se ponavlja na isti način za svaki ostali uzorak s određenim postotkom i vrstom meda. Nakon što se agar skrutne, petrijevke sa oznakama istoga sata se stave anaerobni lonac, okrenute naopako. U lonac se stavi vrećica u koju se doda 12 mL zasićene otopine NaOH i 12 mL 20 % otopine pirogalola u vodi, zatvori se i termostatira 48 sati na 37 °C.



Slika 7 Određivanje broja bakterija (CFU)

3.2.10. Priprema podloge za inhibiciju

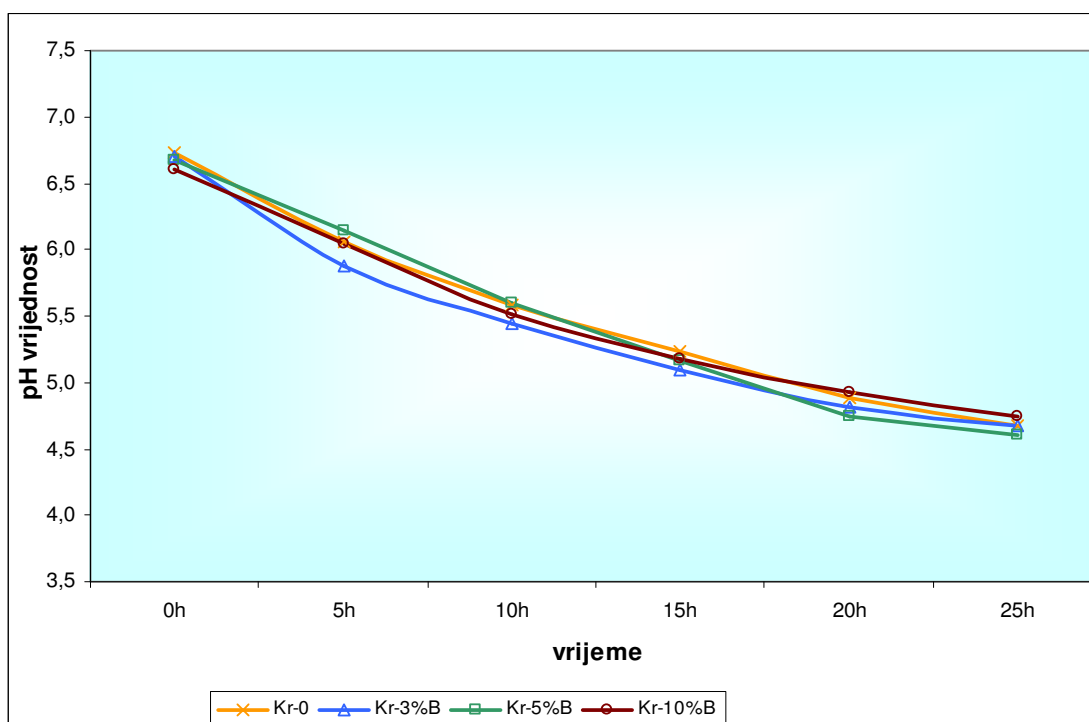
Petrijeve zdjelice se obilježe oznakama vrste i postotka meda te sata i to po 2 paralele. U svaku se dodaju 2 epruvete rastopljenog Mueller-Hinton agara: 1 nenacijepljena epruveta i 1 naciepljena sa 1 mL suspenzije patogena. Nakon dodatka, lagano se promješa, a kada se podloga skrutne, posebnim sterilnim bušačem čepova br. 5 (promjera 9 mm) se režu i pincetom vade čepovi kako bi se u podlozi formirale otvori u koje se dodaje po 150 μ L uzorka digitalnom pipetom sljedećim redoslijedom:

1. otvor: nefermentirano mlijeko
2. otvor: fermentirano mlijeko bez meda
3. otvor: fermentirano mlijeko sa 3% meda
4. otvor: fermentirano mlijeko sa 5% meda
5. otvor: fermentirano mlijeko sa 10% meda

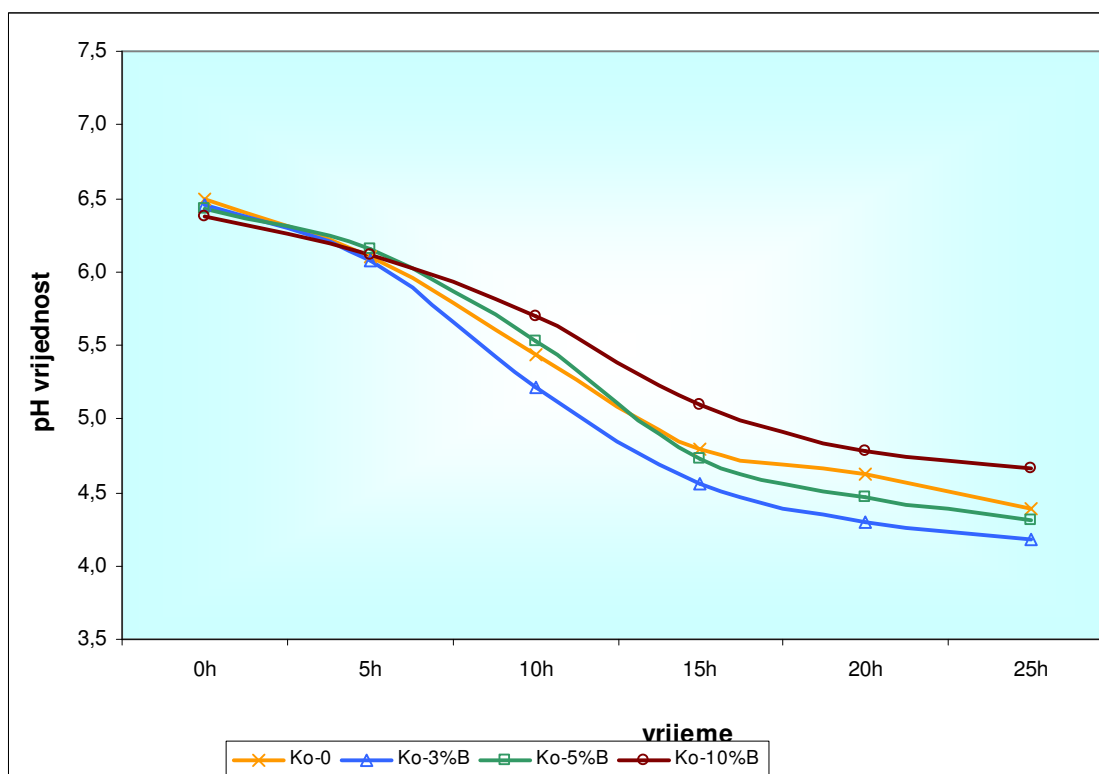
Nakon dodatka mlijeka, petrijevke idu u termostat na 37°C, 24 sata, nakon čega se određuje inhibicija. Inhibicija se određuje mjerenjem promjera područja inhibicije u mm za svaki sat fermentacije te koncentraciju i vrstu meda. Treba odrediti dali je inhibicija djelomična ili potpuna.

4. REZULTATI

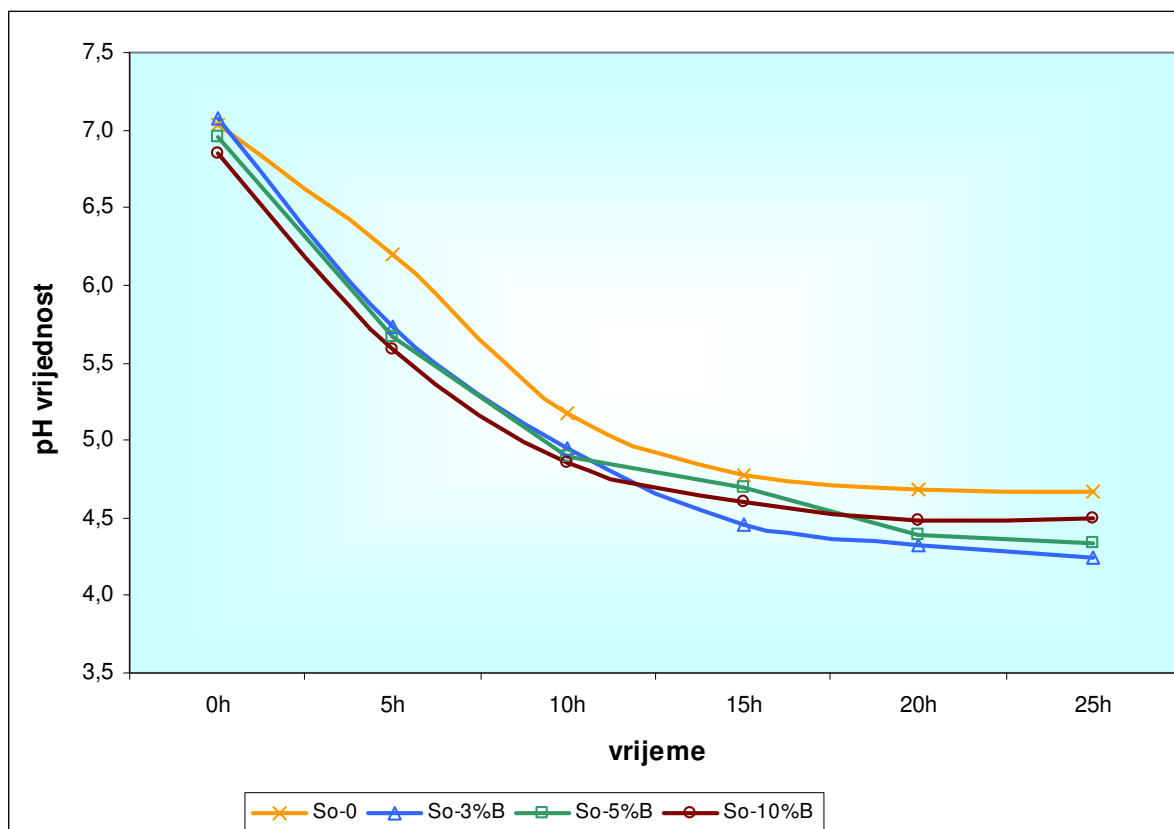
4.1. Praćenje promjena fizikalno – kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom *Bifidobacterium longum*



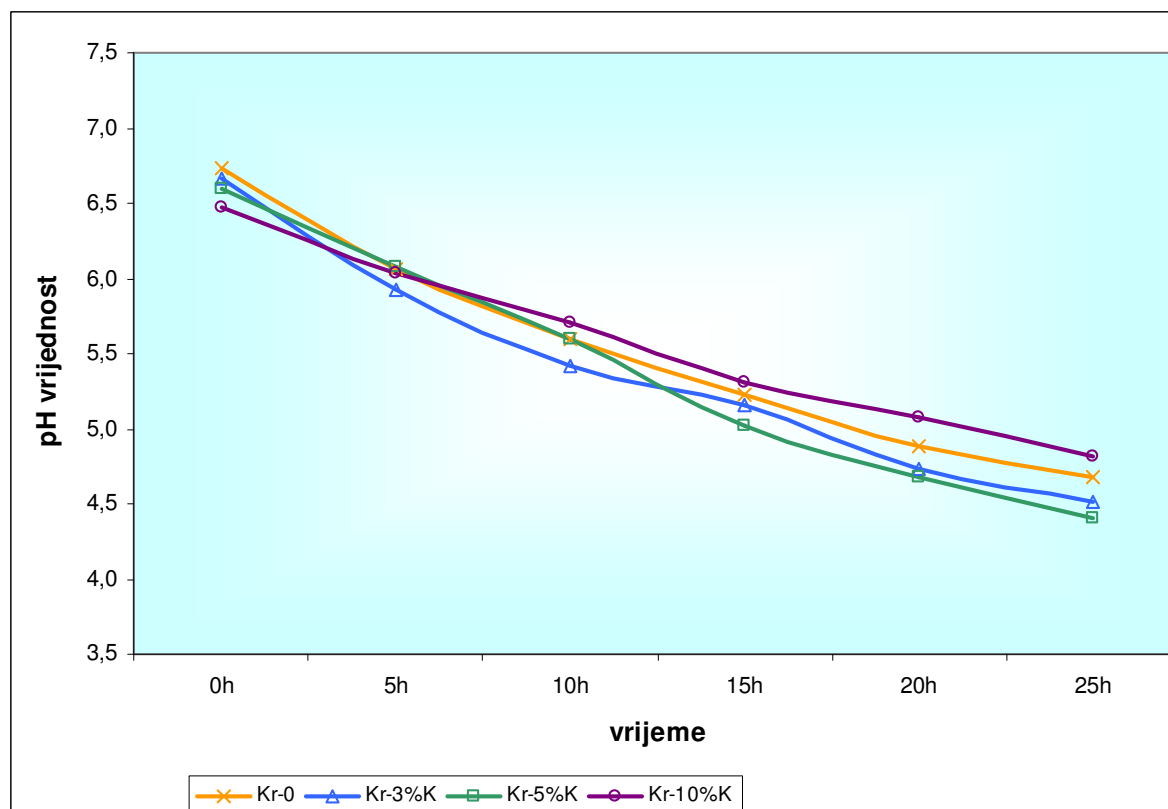
Slika 8 Promijena pH vrijednosti kravljeg mlijeka (Kr) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



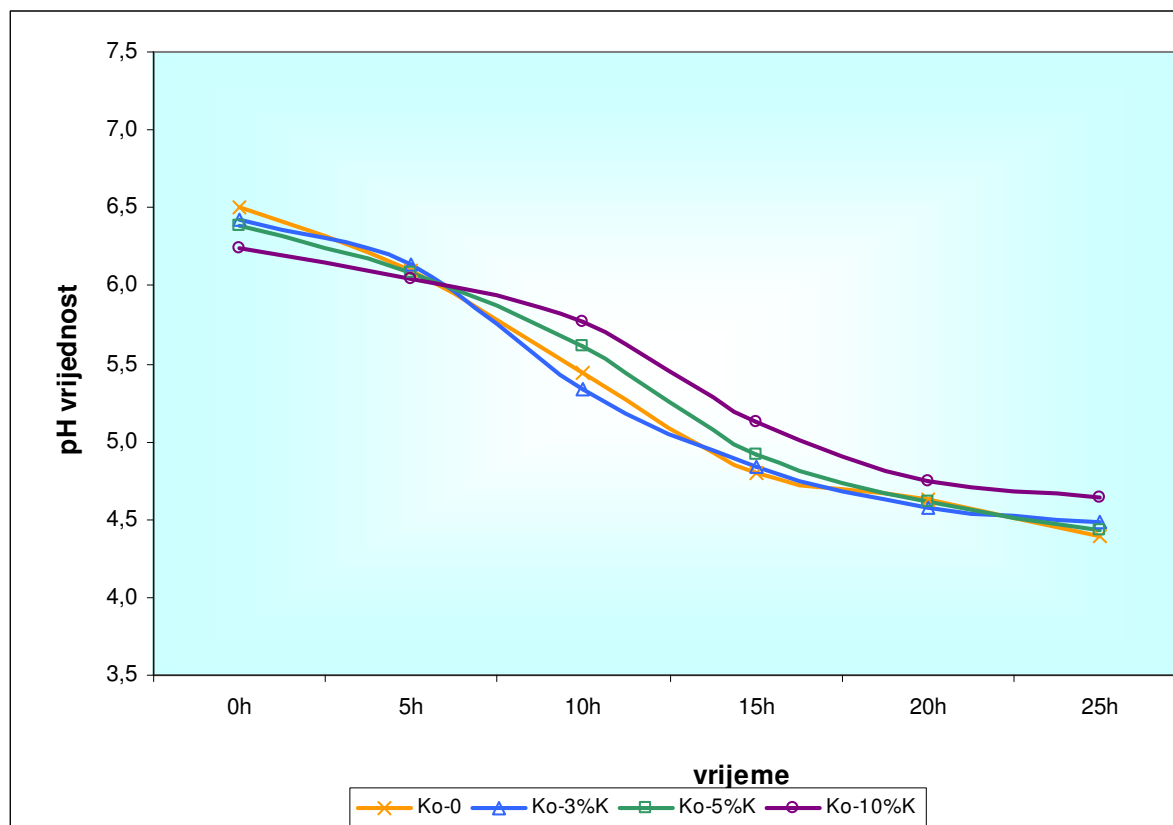
Slika 9 Promijena pH vrijednosti kozjeg mlijeka (Ko) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



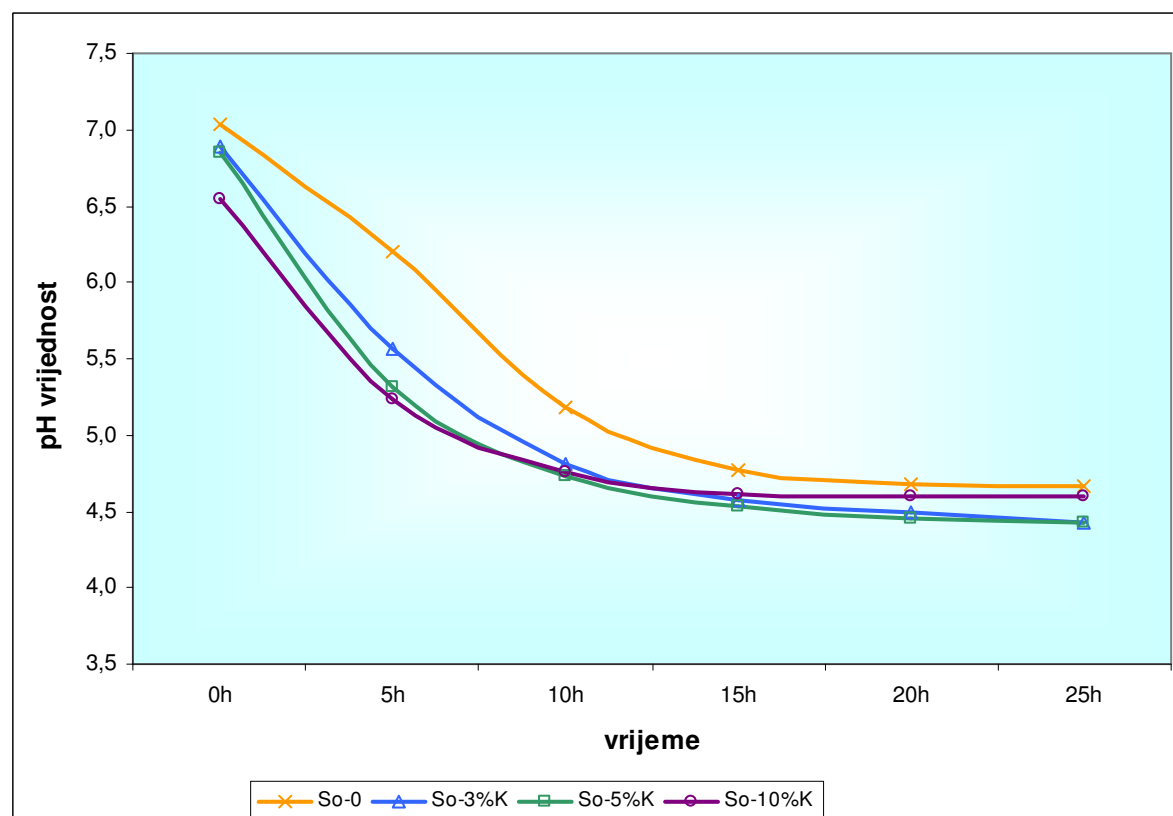
Slika 10 Promijena pH vrijednosti sojinog mlijeka (So) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



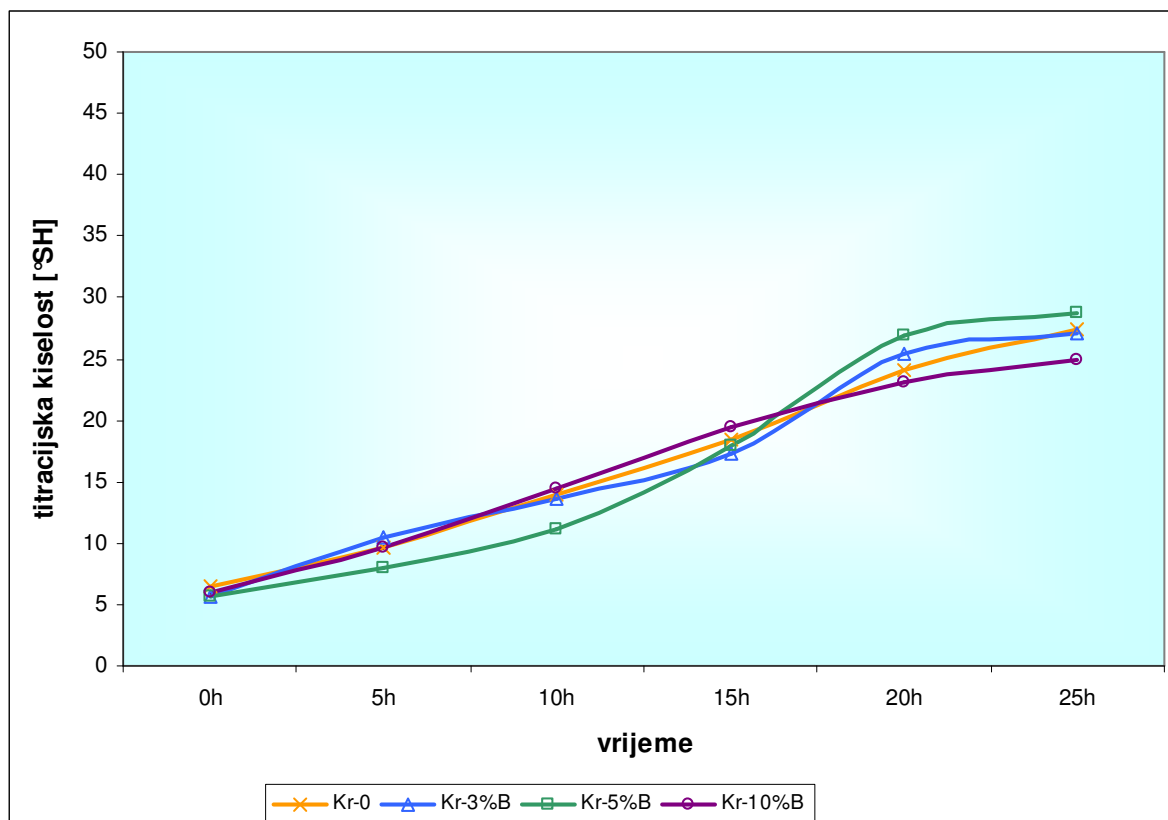
Slika 11 Promijena pH vrijednosti kravljeg mlijeka (Kr) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



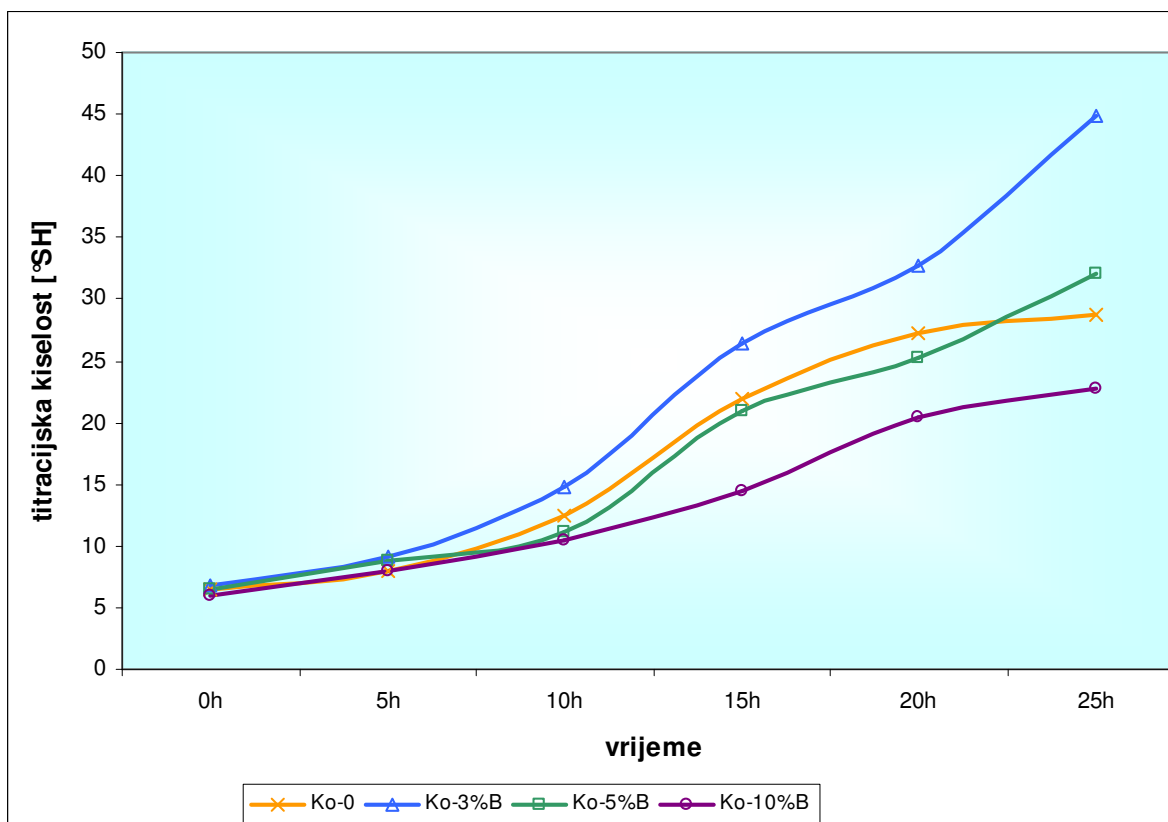
Slika 12 Promijena pH vrijednosti kozjeg mlijeka (Ko) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



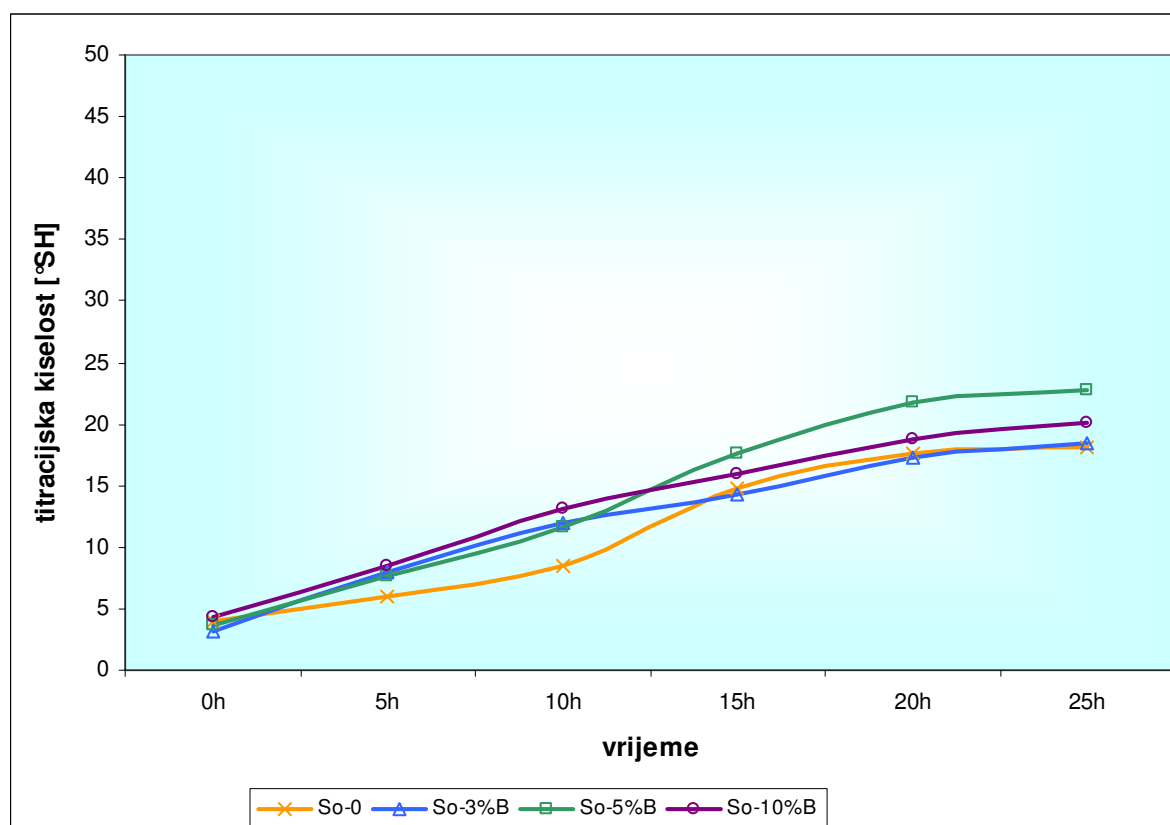
Slika 13 Promijena pH vrijednosti sojinog mlijeka (So) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



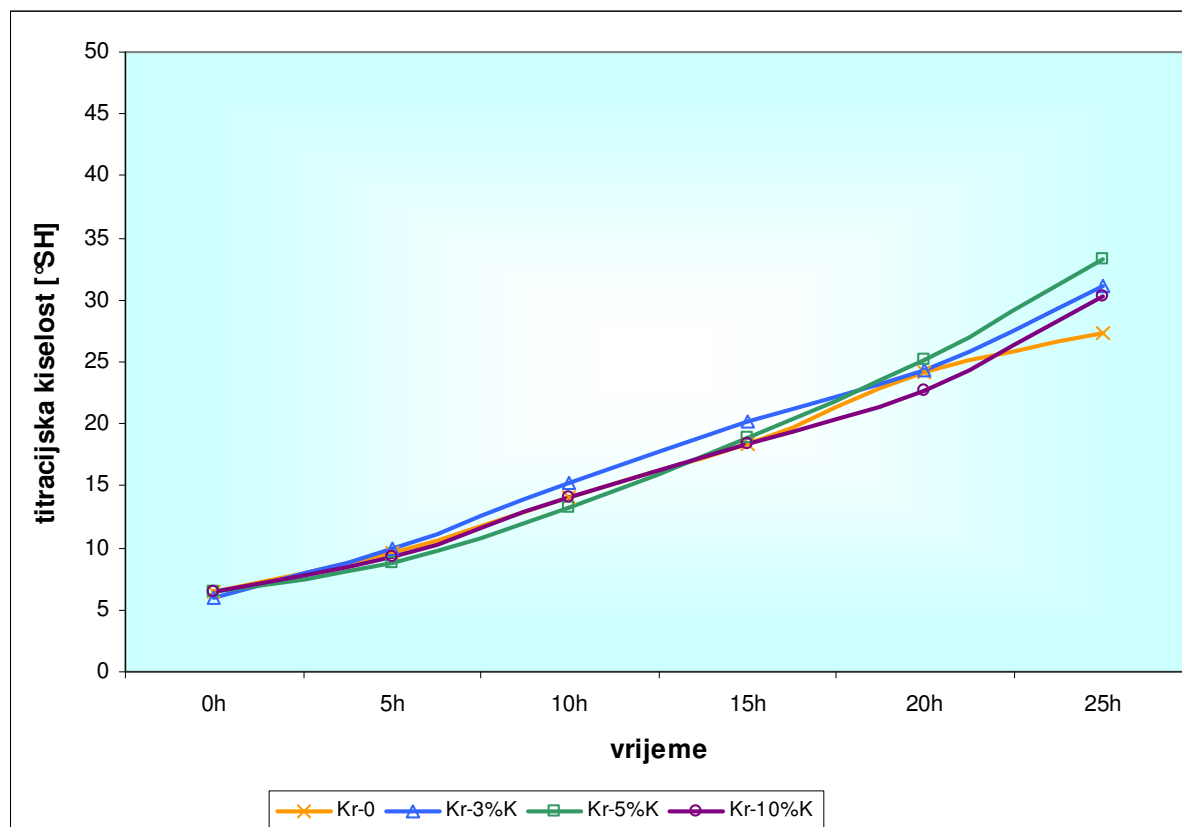
Slika 14 Promijena kiselosti kravljeg mlijeka (Kr) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



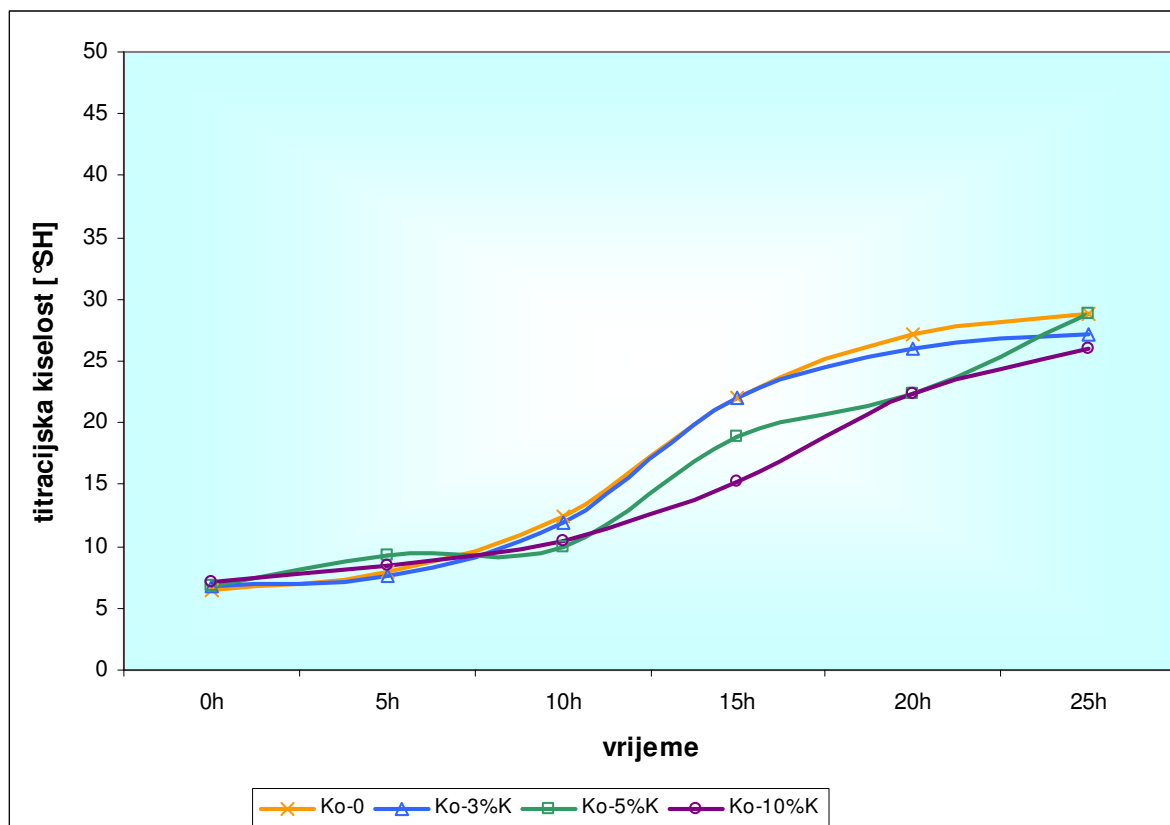
Slika 15 Promijena kiselosti kozjeg mlijeka (Ko) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



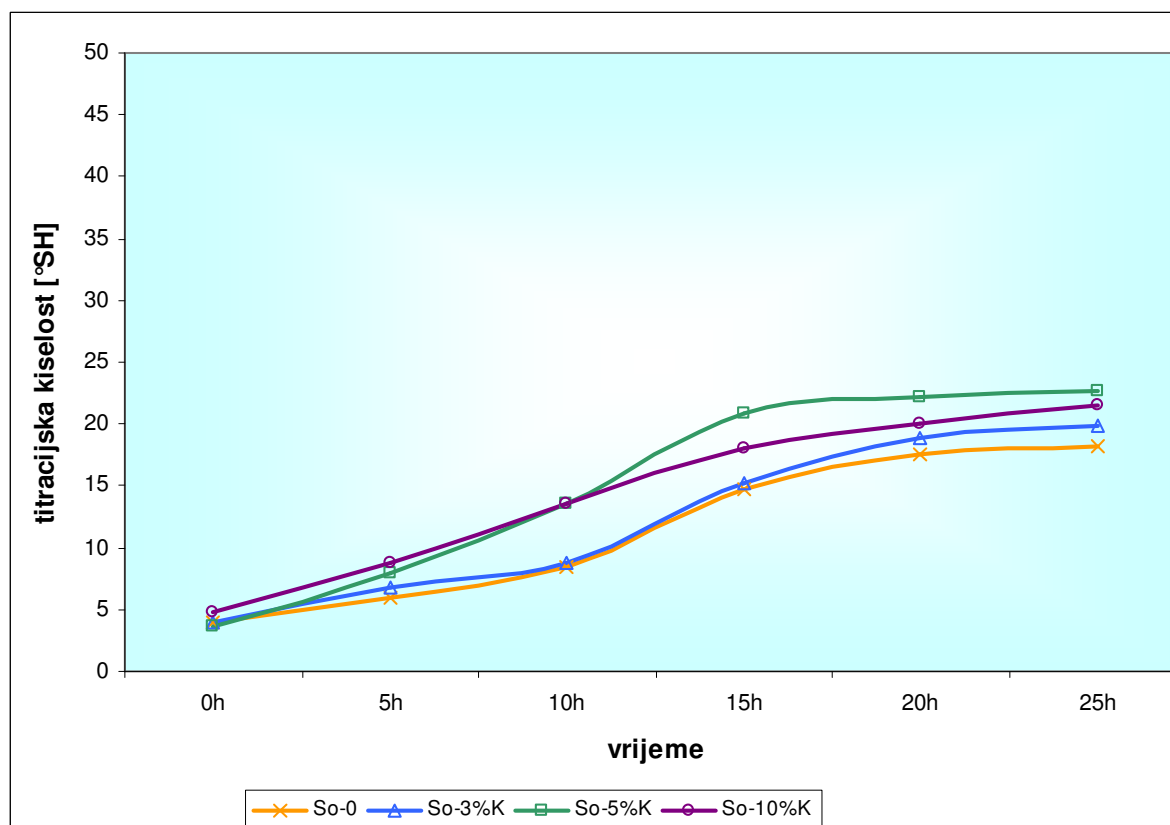
Slika 16 Promijena kiselosti sojinog mlijeka (So) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog meda (B)



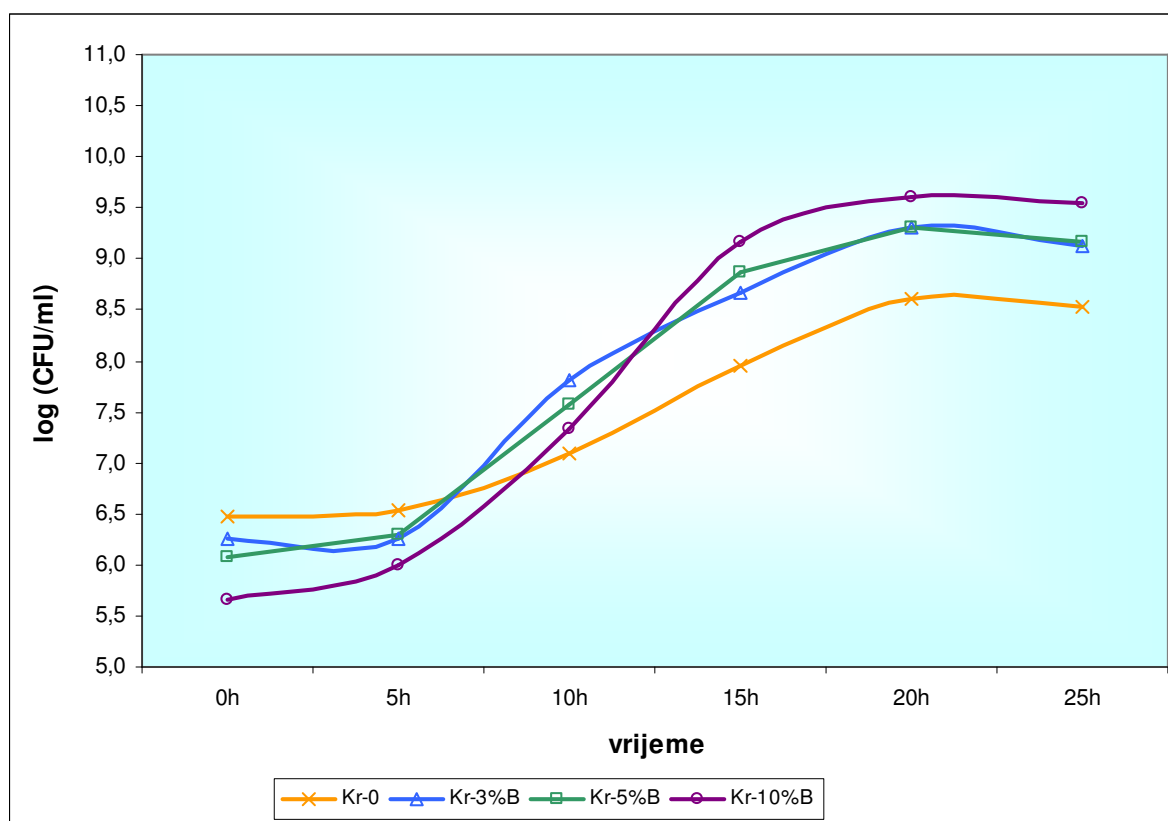
Slika 17 Promijena kiselosti kravljeg mlijeka (Kr) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



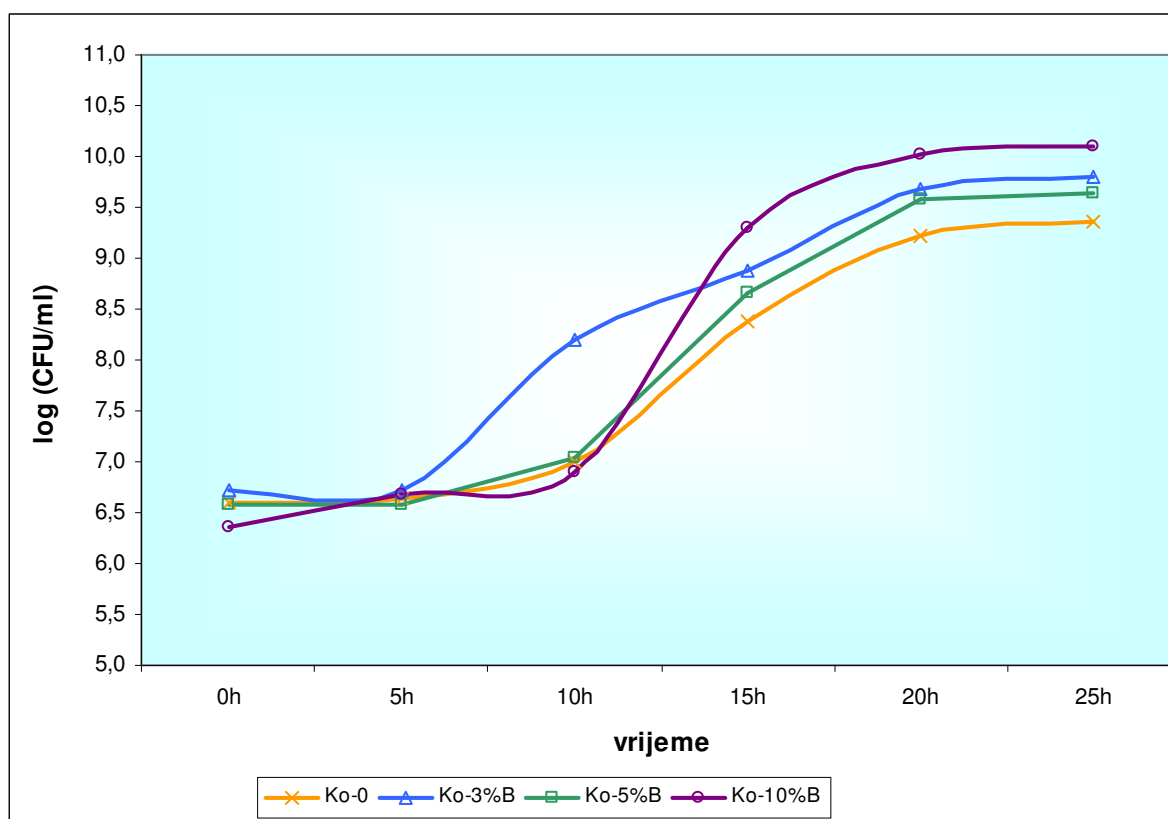
Slika 18 Promijena kiselosti kozjeg mlijeka (Ko) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



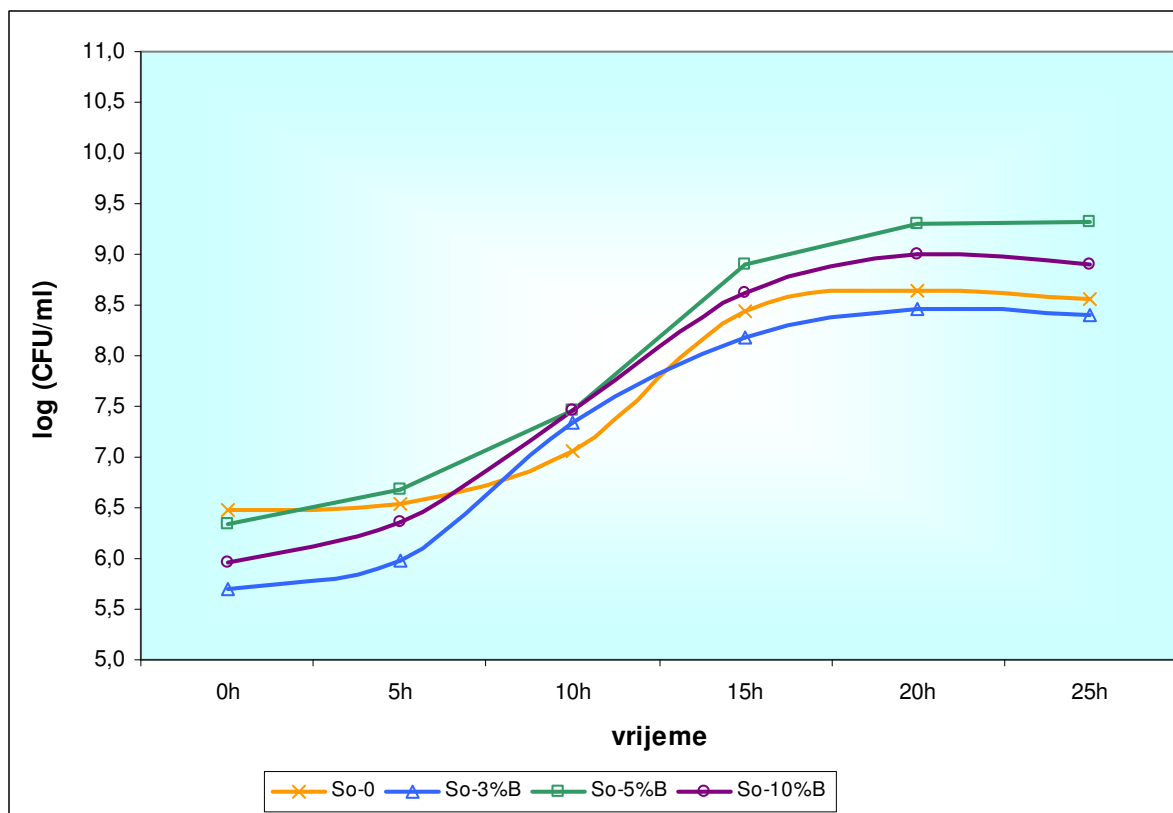
Slika 19 Promijena kiselosti sojinog mlijeka (So) tijekom fermentacije kulturom *Bifidobacterium longum* uz dodatak kestenovog meda (K)



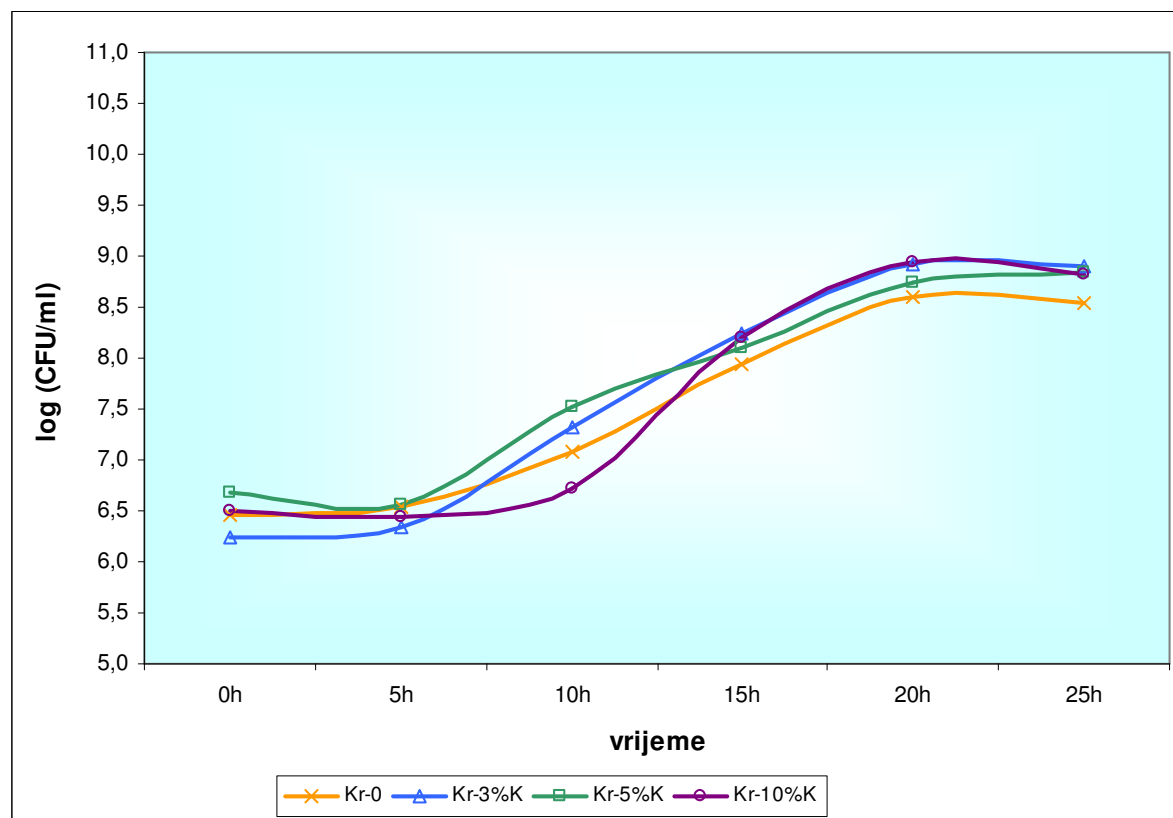
Slika 20 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije kravljeg mlijeka (Kr) uz dodatak bagremovog meda (B)



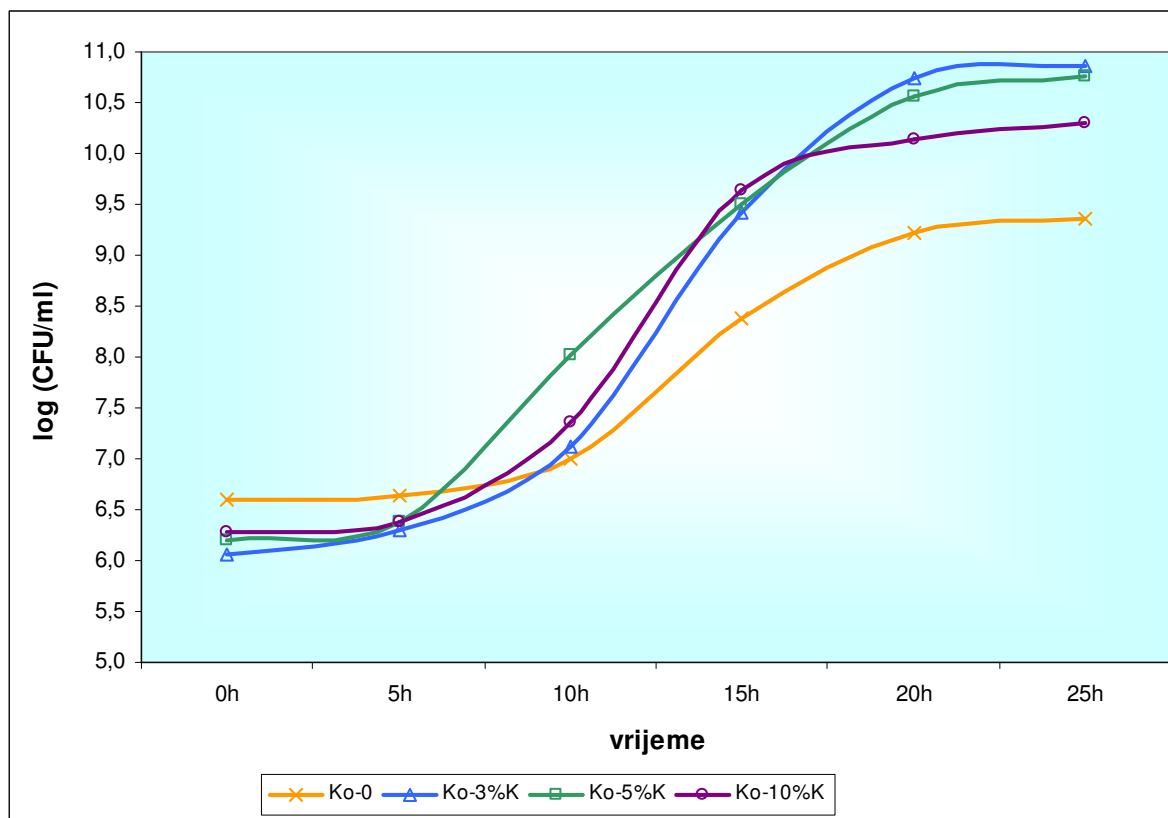
Slika 21 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije kozjeg mlijeka (Ko) uz dodatak bagremovog meda (B)



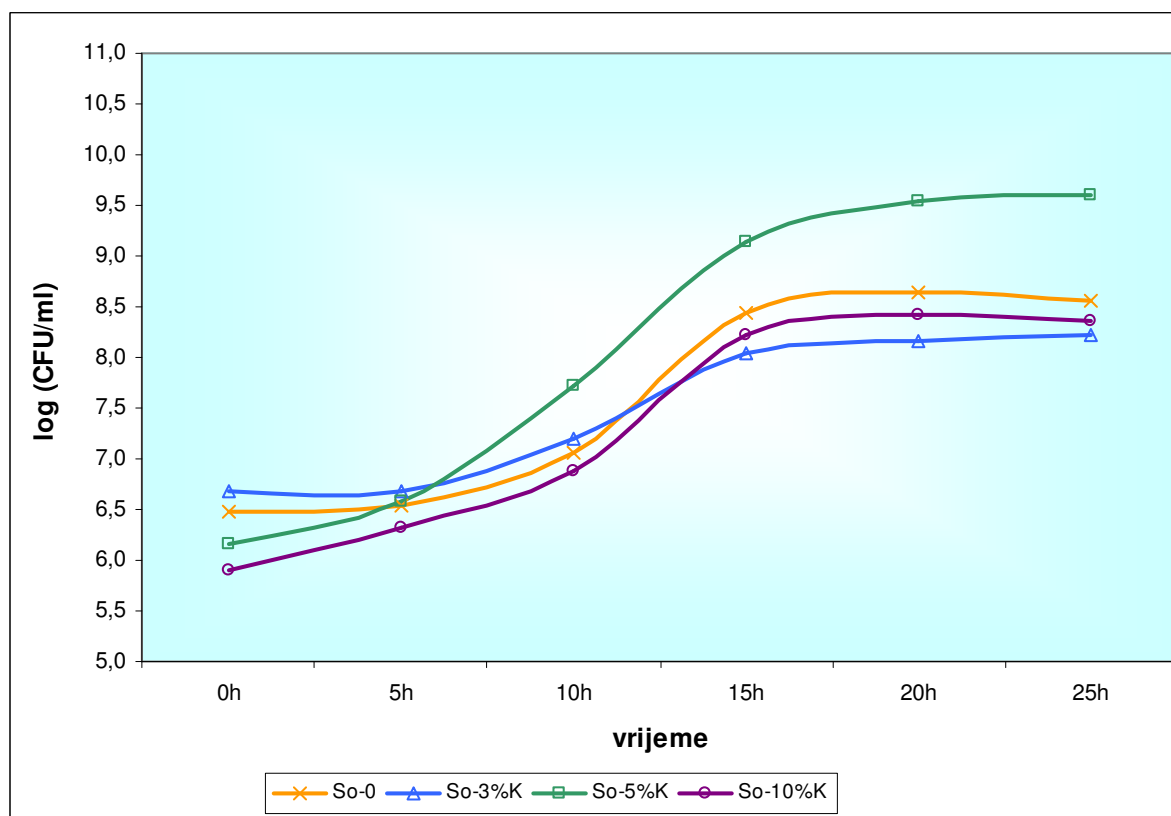
Slika 22 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije sojinog mlijeka (So) uz dodatak bagremovog meda (B)



Slika 23 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije kravljeg mlijeka (Kr) uz dodatak kestenovog meda (K)



Slika 24 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije kozjeg mlijeka (Ko) uz dodatak kestenovog meda (K)



Slika 25 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije sojinog mlijeka (So) uz dodatak kestenovog meda (K)

4.2. Rezultati određivanja stupnja inhibicije rasta test organizma *Listeria monocytogenes* tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom *Bifidobacterium longum*

Tablica 3 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak bagremovog meda

UZORCI	Kr-0	Kr-3%B	Kr-5%B	Kr-10%B
0h	±	±	±	±
15h	±	±	±	±
25h	–	–	–	+++
25h(cent)	–	–	–	–

Tablica 4 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak bagremovog meda

UZORCI	Ko-0	Ko-3%B	Ko-5%B	Ko-10%B
0h	±	±	±	±
15h	±	+++	++	+++
25h	±	++	++	++
25h(cent)	–	–	–	–

Tablica 5 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak bagremovog meda

UZORCI	So-0	So-3%B	So-5%B	So-10%B
0h	–	±	+++	+++
15h	++	++	++	+++
25h	++	±	±	–
25h(cent)	–	–	–	–

Legenda:

- nema zone inhibicije
- ± djelomična inhibicija
- + vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije > 15 mm

Tablica 6 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak kestenovog meda

UZORCI	Kr-0	Kr-3%K	Kr-5%K	Kr-10%K
0h	±	±	±	±
15h	±	±	±	+++
25h	–	±	++	++
25h(cent)	–	–	–	–

Tablica 7 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak kestenovog meda

UZORCI	Ko-0	Ko-3%K	Ko-5%K	Ko-10%K
0h	±	++	++	–
15h	±	++	++	+++
25h	±	–	–	±
25h(cent)	–	–	–	–

Tablica 8 Inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 uz dodatak kestenovog meda

UZORCI	So-0	So-3%K	So-5%K	So-10%K
0h	–	±	±	±
15h	++	++	++	+++
25h	++	±	+++	±
25h(cent)	–	–	–	–

Legenda:

- nema zone inhibicije
- ± djelomična inhibicija
- + vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije > 15 mm

5. RASPRAVA

5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije

Fermentacija kravljeg mlijeka pokazuje kontinuirani pad pH vrijednosti pri svim udjelima meda, s time da je veći postotak meda na kraju rezultirao i većom pH vrijednošću. Uzorci sa kestenovim medom imaju niže pH vrijednosti od onih u kojima je dodan bagremov med (slika 8 i 11).

Fermentacija kozjeg mlijeka ne pokazuje u tolikoj mjeri kontinuirani pad pH vrijednosti kao fermentacija kravljeg mlijeka, već je značajniji pad između 5. i 15. sata. Pokazalo se da su veće vrijednosti pH kod uzoraka kozjeg fermentiranog mlijeka s kestenovim medom, za razliku od kravljeg mlijeka, gdje su veće vrijednosti bile kod dodatka bagremovog meda (slika 9 i 12).

Brzina fermentacije sojinog mlijeka ima značajniji nagli pad od samog početka pa sve do 10. sata kada se brzina usporava. Niže pH vrijednosti su utvrđene kod uzoraka sa bagremovim medom i pri tome su te vrijednosti bile niže što je bio niži udio meda i niže su od uzoraka bez meda (slika 10 i 13).

5.3. Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije

Najveći porast kiselosti pri fermentaciji kravljeg mlijeka je u uzorku sa 5 %, a najmanji sa 10% bagremovog meda. Značajniji skok se pokazuje oko 20. sata fermentacije. Kod uzoraka sa kestenovim medom, porast kiselosti je kontinuiran kod svih udjela dodatka bagremovog meda (slika 14 i 17).

Povećanje kiselosti kod kozjeg mlijeka sa bagremovim medom je oko 10. sata fermentacije, a najviše je izraženo kod uzorka sa 3% meda. Dodatak kestenovog meda je rezultirao nižim vrijednostima titracijske kiselosti u odnosu na uzorak bez meda (slika 15 i 18).

Tijekom fermentacije sojinog mlijeka došlo je do najmanjeg porasta kiselosti bez obzira na vrstu meda i njegov udio, ali se blago povećanje vidi kod udjela od 5% bagremovog, ali i kestenovog meda (slika 16 i 19).

5.4. Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom fermentacije

Fermentacija kravljeg mlijeka sa dodatkom kestenovog meda uzrokovala je manji porast bakterija, u odnosu na uzorke sa bagremovim medom. Kod bagremovog meda u sva tri udjela, broj poraslih bakterija kretao se iznad vrijednosti uzorka bez dodatka meda, a porast kod uzoraka sa 3% i 5% meda je gotovo isti (slika 20 i 23).

Fermentacijom kozjeg mlijeka sa obje vrste meda došlo je do znatnijeg povećanja broja bakterija nakon 10. sata, a najveći porast je kod udjela 10% bagremovog meda i 3 % kestenovog meda (slika 21 i 24).

Tijekom fermentacije sojinog mlijeka uz dodatak bagremovog meda su zapažene gotovo iste vrijednosti svih uzoraka u 10. satu fermentacije. Kod dodatka kestenovog meda, najveće vrijednosti pokazale su se kod udjela od 5% (slika 22 i 25).

5.5. Usporedba inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka sa *Bifidobacterium longum*

U istraživanju je ispitan inhibicijski učinak bakterije *Bifidobacterium longum* na bakteriju *Listeria monocytogenes* tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.

Svi uzorci sa kravljim mlijekom uz dodatak bagremovog meda pokazali su djelomični inhibicijski učinak u 0. i 15. satu fermentacije. U ostalim satima nije došlo do inhibicije, osim u 25. satu sa 10% bagremovog meda, gdje je inhibicija bila nešto izraženija. Kestenov med u udjelu od 5% u kravljem mlijeku pozitivno je djelovao na inhibiciju rasta bakterije *Listeria monocytogenes*, naročito u 15. i 25. satu, dok su ostale vrijednosti kao kod uzoraka sa bagremovim medom (tablica 3 i 6).

Kozje mlijeko bez dodatka meda također je pokazao djelomičnu inhibiciju bakterije *L. monocytogenes*. Najjači inhibicijski učinak je izražen u 15. satu, gdje je zona inhibicije bila do 15 mm kod uzoraka sa obje vrste meda i to u udjelu od 10% (tablica 4 i 7).

Kod sojinog mlijeka sa 5 i 10% bagremovog meda u 0. satu fermentacije zona inhibicije je bila najjača i iznosila je preko 15 mm. Dodatak kestenovog meda imao je izraženiji inhibicijski učinak u 25. satu kod udjela od 5% i u 15. satu kod udjela od 10% (tablica 5 i 8).

Najveći inhibicijski učinak od sve tri vrste mlijeka se pokazao kod sojinog i to uz dodatak bagremovog meda. Dodatak bagremovog meda je također imao bolje inhibicijsko djelovanje kod kozjeg mlijeka, za razliku od kravljeg gdje je taj učinak bio veći dodatkom kestenovog meda.

6. ZAKLJUČCI

6. Zaključci

Zaključci koji proizlaze iz rezultata dobivenih istraživanjem u ovome radu su sljedeći:

- Fermentacijom kravljeg mlijeka dolazi do kontinuiranog pada pH vrijednosti, a kod kozjeg mlijeka je to u intervalu od 5. i 15. sata, te kod sojinog mlijeka do 10. sata fermentacije
- Dodatak kestenovog meda uzrokuje niže pH vrijednosti kod kravljeg mlijeka, dok je kod kozjeg i sojinog mlijeka takav učinak utvrđen pri dodatku bagremovog meda
- Najviše stanica *Bifidobacterium longum* je utvrđeno pri fermentaciji kozjeg mlijeka sa obje vrste meda, a najmanje kod sojinog mlijeka. Broj stanica kod sve tri vrste mlijeka sa dodanim medom je veći u odnosu na uzorke bez meda
- Inhibicija *L. monocytogenes* uz dodatak kulture Bb-46 kod kravljeg mlijeka je najveća sa obje vrste meda u udjelu od 10 %
- Kozje mlijeko fermentirano sa Bb-46 najjače je inhibiralo *L. monocytogenes* u uzorcima sa 10% bagremovog i 10% kestenovog meda u 15. satu fermentacije
- Fermentacija sojinog mlijeka sa Bb-46 najveći inhibicijski učinak na *Listeriu monocytogenes* ima sa 5% (0. sat) i 10% bagremovog meda (15. sat), dok je isti učinak sa istim postocima kestenovog meda u 15. i 25. satu fermentacije
- Kestenov med je slabije inhibirao rast *L. monocytogenes* od bagremovog meda

7. LITERATURA

7. Literatura

1. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Mlijeko> (siječanj 2009.)
2. <http://www.coolinarka.com/namirnica/mlijeko> (siječanj 2009.)
3. Lj. Tratnik: Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
4. www.chemia.dami.pl (travanj, 2009.)
5. <http://www.tehnologijahrane.com/mleko/hemija-mleka/kazein> (travanj 2009.)
6. B. Mioč, V. Pavić: Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
7. S. Feldhofer, S. Banožić, N. Antunac: Uzgoj i hranidba koza – proizvodnja i prerada kozjeg mlijeka. Hrvatsko mljekarsko društvo. Zagreb, 1994.
8. <http://ambientpark.com/kozje-mlijeko/index.php#> (siječanj 2009.)
9. http://hr.wikipedia.org/wiki/Sojino_mlijeko (siječanj 2009.)
10. <http://hrcak.srce.hr> (travanj, 2009.)
11. <http://www.cursor.hr/ZdravaHrana.nsf> (travanj, 2009.)
12. R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. **Mljekarstvo** **56**, 233-254, 2006.
13. <http://proizvodi-pcelarstvo.hr/index.php/vrste-meda/12-bagremov-med.html> (veljača 2009.)
14. http://www.alibaba.com/product/imkesz-104878719-0/Hungarian_Acacia_honey.html (travanj 2009.)
15. <http://proizvodi-pcelarstvo.hr/index.php/vrste-meda/18-kestenov-med.html> (veljača 2009.)
16. <http://www.nytimes.com/2006/06/14/dining/14hone.html?fta=y> (travanj 2009.)
17. K. D. Arunachalam: Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* **19**, 1559–1597, 1999.
18. A. M. P. Gomes, F. X. Malcata: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trends in Food Sci. Technolog.* **10**, 139–157, 1999.
19. http://www.genomenewsnetwork.org/articles/10_02/bifido.shtml (travanj 2009)
20. http://www.zzjzdnz.hr/djelatnosti/zdravstvena_ekologija (travanj 2009.)
21. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-listeria> (veljača 2009.)

22. I. Žele-Starčević: Korinebakterije. Listerija. Erizipelotriks. Gardnerella. Legionella. Laktobacili. U *medicinska bakteriologija i mikologija*. S. Kalenić, E. Mlinarć-Missoni (ur.). Prehrambeno tehnološki inženjering. Zagreb, 283-285, 1995.
23. Elmer H. Marth, James L. Steele: Applied dairy microbiology. Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, 2001.
24. <http://popsci.com/inspired-nature/artide/2008-04/bacteria-rescue> (veljača 2009.)