

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

KRISTINA BERTOVIĆ

**ANTAGONIZAM *Bifidobacterium longum* TIJEKOM
FERMENTACIJE TRI VRSTE MLIJEKA S DODATKOM MEDA
NA BAKTERIJU *Yersinia enterocolitica***

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 mlječnih proizvoda**

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

Mentori: **Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. ; Vedran Slačanac, doc.**

Broj stranica: **38**

Broj slika: **27**

Broj tablica: **13**

Datum obrane: 2009.

Sastav povjerenstva za obranu:

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



Komentorstvo nad izradom i obranom ovog diplomskog rada **prof. Hardi dodijelio je** dr. sc. Vedranu Slačancu, 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.

**ANTAGONIZAM *Bifidobacterium longum* TIJEKOM FERMENTACIJE TRI VRSTE
MLIJEKA S DODATKOM MEDA NA BAKTERIJU *Yersinia enterocolitica***

Sažetak

U radu je istražen utjecaj probiotičkih fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka sa dodatkom bagremovog i kestenovog meda prema patogenoj bakteriji *Yersinia enterocolitica*. Za inokulaciju mlijeka korištena je monokultura *Bifidobacterium longum*.

Za pripremu probiotičkih napitaka korišteno je UHT sterilizirano kravlje mlijeko s 2,8% mliječne masti, UHT sterilizirano kozje mlijeko s 3,2% mliječne masti, te sojino mlijeko s 2,2% masti, a med je dodavan u udjelima od 3%, 5% i 10%. Fermentacija se provodila na 37 °C, a sva mjerena su se provodila 0 (nulti), te nakon 5, 10, 15, 20, 25 sati. Praćena je promjena aktivne kiselosti, titracijske kiselosti, te promjena broja probiotičkih bakterija. Utvrđen je povoljan utjecaj dodatka meda na brzinu fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka, pri čemu je utjecaj bagremovog meda bio izražajniji od kestenovog meda. Probiotički napitak od kozjeg mlijeka s dodatkom bagremovog meda je pokazao jači inhibitorni učinak u usporedbi s probiotičkim napitkom od kravljeg i sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog meda, a pri tome je inhibicijski učinak jače bio izražen kod udjela meda od 10%.

Ključne riječi: kravlje, kozje i sojino mlijeko, *Bifidobacterium longum*, med, *Yersinia enterocolitica*, inhibicija

**ANTAGONISTIC ACTION OF THREE SORT OF MILK FERMENTED
WITH *Bifidobacterium longum* AND ADDITION OF HONEY
ON THE *Yersinia enterocolitica* GROWTH**

Summary

The influence of probiotic fermented milk beverages of cow, goat and soy milk with acacia and chestnut honey addition against pathogenic *Yersinia enterocolitica* was examined in this work. For the milk inoculation monoculture *Bifidobacterium longum* was used. Probiotic drink was produced from UHT sterilized cow milk with 2.8% milk fat, UHT sterilized goat milk with 3.2% milk fat and UHT sterilized soy milk with 2.2% fat. Honey was added in content of 3, 5 and 10 percentages. The fermentation was conducted on 37 °C and all the measurements were after 5, 10, 15, 20, and 25 hours. pH-value, titration acidity and changes of number probiotic bacterium were measured, respectively. Addition of honey had high influence on course and of fermentation cow, goat and soy milk. Acacia honey had stronger influence in comparison with chestnut honey.

The probiotic potion of goats milk with added acacia honey had a greater inhibitory effect than probiotic potion of cows or soya milk with added acacia honey, where the inhibitory effect was greater with 10% proportion of honey.

Key words: Cows milk, goats milk, soya milk, *Bifidobacterium longum*, honey,
Yersinia enterocolitica, inhibition

Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Jovici Hardiju na predloženoj temi, stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada, te komentoru dr. sc. Vedranu Slačancu, docentu.

Zahvaljujem dipl. ing. Mireli Lučan i dr. sc. Hrvoju Pavloviću na pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju i obradi rezultata rada.

Zahvaljujem se roditeljima i sestri što su me podržavali u svakom trenutku, vjerovali u mene i molili se za mene, te mi s puno ljubavi, podrške i razumijevanja pomogli da dođem do cilja.

Hvala vam što ste bili uz mene kroz sve uspone i padove.

Zahvaljujem se mojoj ljubavi, Tomislavu, što je bio uz mene kada mi je to bilo najpotrebnije, na svakoj riječi podrške i utjehe. Hvala ti za svaku minutu strpljivosti. Hvala ti što si tu...

Zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama s kojima su mi dani bili bolji i veseliji, a posebno Dariji, bez koje ovi studenski dani nebi bili toliko ispunjeni.

Hvala ti na pruženom razumjevanju i prijateljstvu.

SADRŽAJ

Str.

1. UVOD

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KRAVLJE MLJEKO-----	1
2.1.1. SASTOJCI KRAVLJEG MLJEKA-----	1
2.1.1.1. Voda-----	2
2.1.1.2. Proteini-----	2
2.1.1.3. Mliječna mast-----	3
2.1.1.4. Mliječni šećer (laktoza)-----	3
2.1.1.5. Mineralne tvari-----	4
2.1.1.6. Vitamini-----	4
2.2. KOZJE MLJEKO-----	5
2.2.1. SASTOJCI KOZJEG MLJEKA-----	5
2.2.1.1. Proteini-----	6
2.2.1.2. Mliječna mast-----	6
2.2.1.3. Laktoza-----	6
2.2.1.4. Mineralne tvari-----	6
2.2.1.5. Vitamini-----	7
2.2.2. Usporedba sastava kravljeg i kozjeg mlijeka-----	7
2.3. SOJINO MLJEKO-----	8
2.3.2. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka-----	9
2.4. PROBIOTICI-----	10
2.4.1. Svojstva probiotika-----	10
2.4.1.1. Funkcionalna svojstva probiotika-----	10
2.4.1.2. Terapijska svojstva fermentiranih mlijeka-----	11
2.4.2. Izbor sojeva za probiotičku uporabu-----	12
2.4.3. Probiotički fermentirani mliječni proizvodi-----	13
2.5. VRSTE RODA <i>Bifidobacterium</i> -----	13
2.5.1. Bakterija <i>Bifidobacterium longum</i> -----	14
2.6. MED-----	15
2.6.1. Bagremov med -----	15
2.6.2. Kestenov med-----	16
2.7. BAKTERIJA <i>Yersinia enterocolitica</i> -----	17

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA-----	18
3.2. MATERIJAL I METODE RADA-----	18
3.2.1. Priprava uzoraka-----	18
3.2.1.1. Priprema fiziološke otopine-----	18
3.2.1.2. Priprema Mueller-Hinton agara-----	19
3.2.1.3. Priprema MRS agara-----	19
3.2.1.4. Priprava filtrata bez stanica-----	19
3.2.2. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala-----	19
3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti-----	20
3.2.4. Priprava suspenzije bakterijskih stanica <i>Yersinia enterocolitica</i> -----	20
3.2.5. Određivanje broja probiotičkih bakterija-----	20
3.2.6. Određivanje stupnja inhibicije bakterije <i>Yersinia enterocolitica</i> različitim vrstama fermentiranih mlijeka-----	21

4. REZULTATI

4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MIJEKA S MONOKULTUROM <i>Bifidobacterium longum</i> -----	23
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA <i>Yersinia enterocolitica</i> FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLJEKOM S MONOKULTUROM <i>Bifidobacterium longum</i> -----	32

5. RASPRAVA

5.1. PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE-----	34
5.2. PROMJENE INTENZITETA ZAKISELJAVANJA (TITRACIJSKE KISELOSTI) TIJEKOM FERMENTACIJE-----	34
5.3. PROMJENA BROJA BAKTERIJA <i>Bifidobacterium longum</i> TIJEKOM FERMENTACIJE-----	35
5.4. USPOREDBA INHIBICIJE BAKTERIJE <i>Yersinia enterocolitica</i> FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLJEKOM S MONOKULTUROM <i>Bifidobacterium longum</i> -----	35

6. ZAKLJUČCI-----

37

7. LITERATURA-----

38

1. UVOD

1. UVOD

Mlijeko je proizvod mliječne žljezde različitih vrsta sisavaca (krava, koza, ovaca...), predodređen za prehranu mladog organizma jer sadrži gotovo sve tvari potrebne za razvoj i rast. Kvalitetno mlijeko je žućkaste boje, neprozirno, čisto, ugodnog mirisa, blagog i slatkastog okusa. Kravlje mlijeko dolazi na tržište bez pobliže oznake podrijetla, dok se mlijeko drugih životinja mora posebno deklarirati.

Fermentirani mliječni proizvodi se dobivaju mliječno-kiselom fermentacijom koju izazivaju mliječno-kisele bakterije. Samo se određene bakterije mliječne kiseline izolirane iz probavnog trakta ljudi koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka (pojedine vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium*).

Probiotici su pojedinačne ili mješovite kulture živih mikroorganizama koji blagovorno djeluju na organizam domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore. U humanoj prehrani kao probiotici najčešće se koriste bakterije mliječno kiselog vrenja iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Med je sladak gust sok što ga pčele medarice tvore od nektara, koji je glavni izvor ugljikohidrata koje pčele pretvaraju u lako probavljivi slador - glukozu i fruktozu, a to je upravo ono što mliječno-kiselo bakterije najviše trebaju za svoj rast.

Yersinia enterocolitica je psihrofilna bakterija, veličine od oko $3 \mu\text{m}$, može rasti na temperaturi od 4 do 42°C . Optimalna temperatura rasta je od 28 do 29°C , a optimalna pH vrijednost 4.

Cilj rada bio je ispitati utjecaj fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog i kestenovog meda s udjelima od 3%, 5% i 10% i s probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* (Bb-46) na odabranu patogenu bakteriju *Yersinia enterocolitica*. Tijekom rada, u uzorcima fermentiranog mlijeka, praćeni su odabrani parametri fermentacije: pH, ukupna kiselost i promjena broja probiotičkih stanica u fermentiranom mlijeku.

Svrha rada bila je istražiti koja vrsta mlijeka fermentirana s probiotičkom bakterijom mliječne kiseline, te dodatkom dvije vrste meda u različitim udjelima, posjeduje veći inhibirajući učinak na odabranu patogenu bakteriju.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KRAVLJE MLIJEKO

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složenog sastava, žućkastobijele boje, karakteristična okusa i mirisa, koju izlučuje mliječna žljezda ženki sisavaca ili žene, određeno vrijeme nakon poroda [1].

Kravlje mlijeko dolazi na tržiste bez pobliže oznake podrijetla, dok se mlijeko drugih životinja mora posebno deklarirati. 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 [2].



Slika 1 Kravlje mlijeko

2.1.1. SASTOJCI KRAVLJEG MLIJEKA

Mlijeko i mliječni proizvodi daju nam veliku količinu hranjivih tvari, osim bjelančevina, i lako probavljivu mast, šećer, mineralne tvari, lipide, vitamine A i D. Kemijski sastav mlijeka je vrlo promjenjiva veličina na koju utječe čitav niz čimbenika kao što su : pasmina, individualne osobine svake jedinke, stadij laktacije, način hranidbe, zdravstveno stanje krave, a posebno vimena. Tijekom laktacije sastav mlijeka se gotovo i ne mijenja. Tijekom 4 do 8 tjedana pred kraj laktacije udio bjelančevina, masti i mineralnih tvari postupno raste, a udio laktoze se smanjuje [3].

Tablica 1 Osnovni sastojci kravljeg mlijeka [1]

SASTOJAK	UDIO (%)
Voda	86,0-89,0
Ukupna suha tvar	11,0-14,0
Mast	3,2-5,5
Proteini	2,6-4,2
Laktoza	4,6-4,9
Mineralne tvari	0,6-0,8

2.1.1.1. VODA

Voda je jedan od glavnih sastojaka u mlijeku u udjelu od 86% do 89%. U mlijeku se voda nalazi u dva oblika, najčešće kao slobodna (u kojoj se nalaze otopljeni sastojci mlijeka) ili kao vezana (mala količina u suhoj tvari mlijeka). Vezana se voda nalazi adsorbirana u hidratacijskom sloju pojedinih sastojaka suhe tvari, i to na: kazein (oko 50%), albumin i globulin (oko 30%), membranu masne globule (oko 15%), laktuzu i ostale sastojke (oko 5%).

Zbog različitih udjela hidrofilnih skupina pojedini sastojci suhe tvari mlijeka imaju različitu sposobnost vezivanja vode, pa tako najveću sposobnost vezivanja vode imaju fosfolipidi mlijeka i albumini, te kazein, laktuzu i ostali proteini sirutke. Hidratacijski sloj vezane vode utječe na stabilnost sastojaka mlijeka, a najviše na stabilnost proteina, jer smanjuje površinsku energiju koloidne čestice, pa je i mogućnost njihova spajanja tada svedena na minimum [1].

2.1.1.2. PROTEINI

Mlijeko je i izvrstan izvor visokokvalitetnih proteina koji sudjeluju u izgradnji našeg organizma a to su kazein, α -laktalbumini, β -laktoglobulini. Proteini mlijeka sadržavaju brojne frakcije, pod frakcije i njihove genetičke varijante, a razlikuju se po udjelu aminokiselina, po svojstvima, stabilnosti i načinu koagulacije.

Kazein (80%) je glavni protein mlijeka (u koji je ugrađen kalcij, tako da se lako apsorbira) čijim se izdvajanjem pomoću sirila i dalnjom obradom dobiva sir, a iz ostataka, sirutke, proizvodi se protein sirutke (20%) [2].

Kazeini se lako talože iz mlijeka djelovanjem kiseline ili enzima, pa se tako mogu izdvojiti iz mlijeka. Stabilnost kazeina ovisi o temperaturi, kiselosti mlijeka, te količini soli u mlijeku. Samo svježe mlijeko sadržava vrlo malu količinu topljivog kazeina, dok tijekom skladištenja mlijeko sadrži nešto više kazeina. Proteini sirutke su neosjetljivi na djelovanje kiselina ili enzima, pa zaostaju u otopini (sirutka) jer su izrazito hidrofilni, ali su osjetljivi na djelovanje topline. Oni su kompaktni globularni proteini s podjednakom raspodjelom niza nepolarnih, polarnih, te nenabijenih i nabijenih ostataka aminokiselina [1].

2.1.1.3. MLIJEČNA MAST

U mlijeku se mliječna mast nalazi u obliku globula obavijenih adsorpcijskim slojem ili membranom koja stabilizira mliječnu mast u okolnoj sredini. U masnoj globuli najviše ima triacilglicerola. Mlijeko sadrži 3,5 do 5,0% masti. U mliječnoj masti nalazi se 10 do 12% masnih kiselina kraćeg lanca, te masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma. Mliječna mast utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda [3].

Mliječna mast se sastoji uglavnom od triacilglicerola, zajedno s malom količinom diacil- i monoacilglicerola, fosfolipida, slobodnih masnih kiselina, slobodnih sterola i estera sterola. Nakupine globula masti se razbijaju nakon pasterizacije mlijeka, pa se teže izdvajaju na površini mlijeka. Nakon homogenizacije mlijeka, globule masti se razbijaju na manje, tako da manje globule masti u mlijeku nastoje plutati. Neposredno nakon mužnje mlijeko je toplo (oko 37 °C) pa se mliječna mast nalazi u tekućem stanju kao emulzija (jer nije topljiva), i to u obliku sitnih kapljica. Hlađenjem mlijeka masne se kapljice skrućuju te postaju kuglice, a emulzija postaje suspenzija. Tako mliječna mast u mlijeku istodobno može biti u stanju emulzije ili suspenzije. Temperatura taljenja mliječne masti je od 30 do 40 °C, a skrućivanja od 18 do 26 °C [1].

2.1.1.4. MLIJEČNI ŠEĆER (LAKTOZA)

Laktoza je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) koji je sastavljen od molekula α -D-glukoze i β -D-galaktoze i u mlijeku se nalazi u udjelu od 4,6 do 4,9%. Ona je mliječni šećer i u usporedbi s ostalim vrstama šećera najmanje je topljiva u vodi. S povećanjem temperature ili uz prisutnost nekih kalcijevih soli topljivost raste, dok povećanjem koncentracije šećera topljivost se smanjuje.

Laktoza u mlijeku potpomaže apsorpciju kalcija i peristaltiku crijeva, lako je probavljiva i pogodna za dijabetičare. Laktoza povećava energetsku vrijednost hrane, ali osobe s nedostatkom enzima laktaze teško ju podnose jer potrošnja mlijeka u njih uzrokuje dijareju. Toplinska obrada mlijeka može uzrokovati pretvorbu laktoze u laktulozu koja je jedan od promotora rasta bifidobakterija. Najveće promjene laktoze u mlijeku događaju se pod utjecajem mikroorganizama (bakterije mliječne kiseline), uzročnika fermentacije laktoze [1].

2.1.1.5. MINERALNE TVARI

Mineralnih tvari u mlijeku se nalazi u udjelu od 0,6 do 0,8%, a ima ih 40 različitih vrsta. Nalaze se u mlijeku kao makroelementi u obliku organskih i anorganskih soli, i mikroelementi (brojčano ih je više - Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Bo, Cu, F, Sr, Mo i drugi). Mineralne tvari mogu biti topljive i netopljive i to u ionskom, koloidnom i molekularnom obliku. Utječu na fizikalne osobine mlijeka kao što su osmotski tlak, elektroprovodljivost, titracijska kiselost, pH vrijednost, gustoća, viskoznost mlijeka itd.

Količina mineralnih tvari u mlijeku se najčešće izražava kao količina pepela koji se određuje spaljivanjem mlijeka pri 550 °C [1].

2.1.1.6. VITAMINI

Udio vitamina u masti (A, D, E i K) ovisi o količini prisutne masti u mlijeku i njihovom udjelu u hrani za prehranu krave. Mlijeko je bogato vitaminima B₂ i B₁₂, dok količinski u svježem mlijeku najviše ima vitamina C koji je termolabilan i osjetljiv na svjetlost. Vitamin A se nalazi u obliku vitamina i njegova provitamina-β-karotena (o njemu ovisi žuta boja mlijeka). Otporan je na visoke temperature i oksidaciju. Vitamin D se u mlijeku nalazi u obliku provitamina u vrlo malim količinama, isto kao i vitamini K i E.

2.2. KOZJE MLIJEKO

U većini zemalja koze se smatraju mliječnim životinjama jer je mlijeko njihov glavni proizvod. Postoje razlike u mliječnosti među pojedinim pasminama, a unutar pasmine postoje razlike kako u količini proizvedenog mlijeka, tako i u njegovom kemijskom sastavu. Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih, pravilno uzgajanih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog (kozjeg) mirisa [4].



Slika 2 Kozje mlijeko

2.2.1. SASTOJCI 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. Ova dva zadnja parametra mogu se i povezati jer je većina mliječnih koza u istom stadiju laktacije u određeno doba godine. U odnosu na kravljje, kozje mlijeko se odlikuje većim sadržajem neproteinskog dušika, manjim udjelom koagulirajućih bjelančevina, većom varijabilnošću fizikalnih svojstava i kemijskog sastava [5].

Tablica 2 Osnovni sastojci kozjeg mlijeka [4]

SASTOJAK	UDIO (%)
Voda	86,0
Mliječna mast	4,5
Mliječni šećer	4,5
Bjelančevine	4,2
Mineralne tvari	0,8

2.2.1.1. PROTEINI

Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka, ali količinski ih je manje nego u kravljem mlijeku i efikasnija je apsorpcija aminokiselina. Količina ukupnih i esencijalnih aminokiselina podjednaka je u oba mlijeka. Iako je bioška vrijednost ova dva mlijeka približno jednaka ipak analiza aminokiselina pokazuje nešto veću količinu slobodnih aminokiselina u kozjem mlijeku, a osobito slobodnih esencijalnih aminokiselina. Kazein čini 75,6% ukupnih bjelančevina.

2.2.1.2. MLIJEČNA MAST

Mliječnu mast kozjeg mlijeka čine trigliceridi (96 do 99%), dok ostatak otpada na fosfolipide, mono- i di- gliceride, slobodne masne kiseline i sterole. Kozje mlijeko sadrži manje kolesterola u odnosu na kravlje. Razlika u mliječnoj masti kozjeg i kravljeg mlijeka je u zasićenosti i duljini lanaca masnih kiselina, što ima veliku nutritivnu i zdravstvenu važnost. Gotovo 28% masnih kiselina kozjeg mlijeka je kraćih lanaca (C4 do C12), a 38% je srednje lančanih masnih kiselina (C6 do C14).

Od ukupne količine masnih kiselina u mliječnoj masti kozjeg mlijeka, 67% su zasićene masne kiseline. 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 [5].

2.2.1.3. LAKOZA

Kozje mlijeko sadrži manje laktoze od kravljeg mlijeka. Udio laktoze u mlijeku koristi se za izračunavanje energetske vrijednosti mlijeka. Laktoza je važan izvor energije za aktivnost mikroorganizama koji fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu, a ne fermentirani ostatak prelazi u sir i sirutku [4].

2.2.1.4. MINERALNE TVARI

Kozje mlijeko ima veći udio mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan. Kozje mlijeko je izvrstan izvor biorazgradivog kalcija, fosfora i magnezija jer ima veće udjele tih tvari u topljivom obliku u odnosu na kravljje. Kozje mlijeko ima oko 40% manje citrata u odnosu na kravljje mlijeko i bolji je izvor biorazgradivog željeza [5].

2.2.1.5. VITAMINI

Kozje mlijeko sadrži više vitamina A (retinola) od kravljeg mlijeka. U njemu je sav karoten konvertiran u vitamin A, što je razlog njegove karakteristične vrlo bijele boje. Kozje mlijeko sadrži manju količinu vitamina C i B₆ nego kravljie mlijeko. Udjeli pojedinih vitamina u litri kozjeg mlijeka gotovo da su dovoljni za podmirenje dnevnih potreba čovjeka za većinom vitamina.

2.2.2. USPOREDBA SASTAVA KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Kravljie i kozje mlijeko sadržavaju iste sastojke, ali udjeli i međusobni odnosi sastojaka pa i njihova struktura mogu biti vrlo različiti.

Tablica 3 Prosječni sastav (%) različitih vrsta mlijeka (prema Bylundu, 1995.) [1]

Vrsta mlijeka	Ukupni proteini	Kazein	Proteini sirutke	Mast	Ugljikohidrati	Mineralne tvari
Kravljie	3,5	2,8	0,7	3,7	4,8	0,7
Kozje	3,6	2,7	0,9	4,1	4,7	0,8

U usporedbi s kravljim mlijekom kozje mlijeko ima veću probavlјivost, veći puferski kapacitet, manji promjer globula mlječne masti, veći udio niže (SCFA) i srednje (MCFA) lančanih masnih kiselina, veći udio cinka, željeza i magnezija, jači antimikrobni (laktoperoksidazni) sustav te jače izražene imunološke i baktericidne osobine.

Proteini kozjeg mlijeka su probavlјiviji od proteina kravljeg mlijeka i efikasnija je apsorpcija aminokiselina čija je količina podjednaka je u oba mlijeka. Veća količina slobodnih aminokiselina je u kozjem mlijeku u odnosu na kravljie mlijeko, a osobito slobodnih esencijalnih aminokiselina. Kazeinske micele kozjeg mlijeka su manje u odnosu na kazeinske micele kravljeg mlijeka, a udio proteina sirutke (albumina i globulina) u kozjem mlijeku je veći. Dok je u kravljem mlijeku s- kazein glavna frakcija kazeina, u kozjem mlijeku to je β-kazein. Kozje mlijeko daje manji prinos sira u odnosu na kravljie.

Gruš od kozjeg mlijeka je obično suši i probavlјiviji u odnosu na kravljie mlijeko. Mast kozjeg mlijeka je probavlјivija 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. Kozje mlijeko sadrži veću količinu mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan. Krajem laktacije svježe pomuzeno kozje mlijeko s kojim se pravilno i higijenski postupa ne razlikuje se značajno po okusu i mirisu od kravljeg mlijeka [6].

2.3. SOJINO MLIJEKO

Sojino mlijeko je voden 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/suspenzija koja sadrži u vodi topljive proteine i ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u sojinom zrnu. Može biti izvornog okusa, nezaslađeno i zaslăđeno, okusa jednakog kravljem mlijeku, s raznim okusima kao npr. vanilije, čokolade, banane, jagode i slično, sa dodatkom vitamina i minerala. Sojino mlijeko može se na tržištu naći i u obliku praha koji se miješa s vodom [7].



Slika 3 Sojino mlijeko

Grašast sirov okus najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka. Taj nepoželjan okus potječe od aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom više nezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksigenaza. Tih sastojaka nema u suhom, neoštećenom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrnje smoči i melje.

Sojni proteini, a koji se nalaze i u sojinom mlijeku, sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za zdravu prehranu čovjeka. Nutritivna prednost sojinih proteina je u tome, što potrošaču pružaju zamjenu za životinske proteine uz manji udjel masti, a potpuno su bez kolesterola, ublažavaju simptome menopauze, umanjuju rizik oboljenja od raznih bolesti, kao što su karcinomi, osteoporozna, žučni kamenac, a čak se istražuje mogućnost poboljšanja stanja bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti i AIDS-a [8].

Kako bi se dodatno povećala nutritivna vrijednost i umanjio karakteristični okus i miris po soji, sojinom mlijeku dodani su šećer, kuhinjska sol, vitamini i minerali.

Bez dodataka je sojino mlijeko izvrstan izvor visokovrijednih proteina, kalcija, vitamina D i B₁₂. Nema kolesterola niti laktoze i ima vrlo nizak sadržaj zasićenih masti (0,34%).

Tablica 4 Osnovni sastojci sojinog mlijeka [9]

SASTOJAK	UDIO (%)
Voda	90,0-93,0
Proteini	3,4-4,0
Masti	1,5-2,5
Ugljikohidrati	1,4-3,0
Mineralne tvari	0,4

2.3.1. USPOREDBA SASTAVA KRAVLJEG I SOJINOG MLIJEKA

Iako je sojino mlijeko slično kravljem mlijeku ipak postoji razlike. Zbog razlike u organoleptičkim osobinama i u sadržaju mineralnih tvari sojinom mlijeku se dodaje 2 do 3% šećera, 0,15% kuhinjske soli, vitamina i minerala.

Tablica 5 Hranjiva vrijednost kravljeg i sojinog mlijeka [10]

PARAMETAR	Kravlje mlijeko (%)	Sojino mlijeko (%)
Biološka vrijednost	87	80
Probavljivost	91	95
Netto proteinsko iskorištenje	79	76

Sličnost kravljeg i sojinog mlijeka je što imaju sličnu boju, stajanjem se ukisele, dodavanjem kiseline, soli ili proteolitičkih enzima (pepsin) dolazi do koagulacije i stvaranja gruša, imaju sličan sadržaj glicina i kazeina. Potpuno je uspješna zamjena kravljeg mlijeka sojinim, kako u nutritivnom tako i u fiziološkom smislu. Danas je veliki broj djece alergičan na kravljе mlijeko, te se sojino mlijeko prvenstveno koristi kao zamjena kravljem mlijeku [10].

2.4. PROBIOTICI

Probiotici su jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstava autohtone crijevne mikroflore probavnog sustava domaćina, (pro i bios = bitan za život).

Najčešće korišteni probiotici su različite vrste roda ***Bifidobacterium*** (normalni stanovnici debelog crijeva, izolirano 30 vrsta) i ***Lactobacillus*** (normalni stanovnici crijeva i vagine, izolirano 56 vrsta) poput:

- ***Bifidobacterium bifidum***
- ***Bifidobacterium breve***
- ***Bifidobacterium infantis***
- ***Bifidobacterium longum***
- ***Lactobacillus acidophilus***
- ***Lactobacillus casei***
- ***Lactobacillus plantarum***
- ***Lactobacillus reuteri***
- ***Lactobacillus rhamnosus***
- ***Lactobacillus rhamnosus soj GG***
- ***Lactobacillus fermentum***

Ostale vrste: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* (probiotički kvasac).

2.4.1. SVOJSTVA PROBIOTIKA

2.4.1.1. FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROBIOTIKA

Probiotički mikroorganizam mora, prije unošenja u ljudski organizam, zadovoljiti vrlo kompleksne opće, tehnološke i funkcionalne zahtjeve. Za funkcionalnu hranu, upravo su funkcionalna svojstva probiotika jedan od najvažnijih kriterija izbora.

Vezivanje na stanice crijevnog epitela : može biti nespecifično (fizikalno-kemijski) ili specifično (adhezivne molekule na površini mikroorganizma i receptori epitelnih stanica).

Stimulacija imunološkog sustava : aktivacija difuzno raspršenih stanica limfoidnog tkiva crijeva bilo interakcijom limfoidnog tkiva i stanice ili dijelova stanice ili metabolita koji nastaju na mjestu prianjanja.

Antagonističke osobine : natjecanje za hranjive tvari (kompetitivna inhibicija) s patogenim bakterijama, proizvodnja antimikrobnih tvari npr. bakteriocina i nisko molekularnih metabolita (H_2O_2), mlječne, octene, maslačne kiseline i dr.).

Antimutagene i antikarcinogene osobine : vezivanje i degradacija (pro) karcinogena, proizvodnja antimutagenih tvari, onemogućavanje djelovanja prokarcinogenih enzima u crijevima i sprječavanje nastanka tumora imunološkim mehanizmima; probiotičke bakterije pojačavaju proizvodnju interferona, leukocita i eritrocita, stimuliraju proizvodnju protutijela još nepoznatih svojstava, te pojačavaju izlučivanje imunoglobulina A sluznice crijeva ili serumskog imuno globulina A u krvotoku [11].

2.4.1.2. TERAPIJSKA SVOJSTVA FERMENTIRANIH MLJEKA

Zbog povoljnog učinka na zdravlje, probiotičke bakterije se sve više rabe u proizvodnji fermentiranih mlječnih proizvoda koji su ujedno i najčešći put unošenja probiotičkih mikroorganizama u ljudski organizam. Probiotici pomažu u uspostavljanju ravnoteže (između tzv. "dobrih i loših" bakterija) u našim crijevima, jer mikroflora se može poremetiti uslijed bolesti, stresa, starenja, uzimanja antibiotika ili drugih lijekova, izlaganja toksinima, prekomjernoj konzumaciji alkohola, te čak i kod korištenja antibakterijskih sapuna. Probiotičke vrste kompetitivno inhibiraju stvaranje toksičnih supstancija i rast manje poželjnih vrsta natječući se za prostor i hranu. Dosadašnja znanstvena istraživanja upućuju da probiotici ne mogu zamijeniti uništenu prirodnu tjelesnu floru, međutim kao privremene naseljene stanice mogu pomoći organizmu obavljajući iste funkcije kao prirodna flora, dajući prirodnoj flori dovoljno vremena da se oporavi. Probiotičke vrste se potom ubrzano zamjenjuju prirodnom crijevnom florom [12].

Pozitivni efekti mikroflore unijete u organizam preko fermentiranih mlječnih napitaka su: poboljšanje probave laktoze, antikancerogena aktivnost (stimulacija imunološkog sustava), redukcija razine kolesterola i triglicerida, aktivacija digestivnih enzima, povećanje rezistentnosti organizama od gastrointestinalnih infekcija, sprječavanje dijareje, produkcija organskih kiselina (octena i dr.), produkcija vitamina, povećanje apsorpcije mineralnih tvari i dr. Ustanovljeno je da probiotički mikroorganizmi zadržavaju terapijska svojstva i kada se dodaju zajedno s tradicionalnim starter kulturama tokom proizvodnje fermentiranih mlijeka [13].

2.4.2. IZBOR SOJEVA ZA PROBIOTIČKU UPORABU

Većina probiotičkih proizvoda sadrži sojeve *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* sp. ili obje zajedno. *Lactobacillus acidophilus* je homofermentativan - razgrađuje laktozu u mlijecnu kiselinu i postiže kiselost u mlijeku čak do 160 °SH. Osim mlijecne kiseline i tvari arome, proizvodi vitamine (npr. folnu kiselinu) i antibiotike. *Bifidobacterium bifidum* se vrlo sporo razvija u mlijeku gdje heterofermentativno razdrađuje laktozu u mlijecnu i octenu kiselinu. Velik broj bakterija probavnog sustava proizvodi inhibitorne tvari s bakteriostatskim i bakteriocidnim djelovanjem. Probiotičke bakterije sporije rastu u mlijeku i proizvode manju količinu kiseline i tvari arome od ostalih bakterija mlijecne kiseline, i to tek nakon dulje prilagodbe ili dodatka promotora rasta.

Pri izboru sojeva za probiotičku primjenu moraju biti zadovoljeni sljedeći zahtjevi:

- a) trebaju preživjeti u uvjetima okoline gdje je potrebna njihova aktivnost
- b) razmnožavanje i naseljavanje mjesta gdje su aktivni
- c) da ne izazivaju imunoreakciju
- d) da nisu patogeni ni toksični, da ne izazivaju alergiju, te da nisu mutageni ili kancerogeni sami po sebi, kao ni njihovi fermentirani proizvodi ili stanične komponente nakon smrti stanice
- e) da su genetički stabilni (nema prijenosa plazmida)
- f) da se brzo i lako razmnožavaju
- g) tijekom priprave i čuvanja trebaju imati visok stupanj preživljavanja [14]

Tablica 6 Svojstva odabranih probiotičkih bakterija mlijecne kiseline [1]

Probiotičke bakterije	Optimalni rast	Tip fermentacije	Mlijecna kiselina	Potiče tvorbu	Proteolitička aktivnost
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37 °C	homofermentativni	0,6-0,9%	mlijecna (L, D ili DL)	vrlo slaba
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	37-41 °C	heterofermentativni	0,4-0,9%	mlijecna (L) + octena	vrlo slaba

2.4.3. PROBIOTIČKI FERMENTIRANI MLJEČNI PROIZVODI

Fermentirani mlječni napitci su najpopularniji komercijalni industrijski proizvodi zbog unosa probiotičkih mikroba u ljudski probavni sustav. Osnovni kemijski sastav fermentiranih mlječnih proizvoda velike je nutritivne vrijednosti. Glavni sastojci su proteini, masti, ugljikohidrati, mineralne tvari i vitamini. Konzumiranje takvih proizvoda datira unazad nekoliko tisuća godina: spomenuti su u Bibliji, a znanstvenici su ih od davnina opisivali kao ljekove za metaboličke poremećaje probavnog sustava.

U proizvodnji fermentiranih probiotičkih proizvoda važno je da uporabljena probiotička kultura doprinosi dobim senzorskim svojstvima gotovog proizvoda. Često se probiotičke kulture rabe zajedno s drugim tipovima bakterija namjenjenih fermentiranju specifičnog proizvoda. U fermentiranim mlječnim namicima, često se probioticima dodaju *Streptococcus thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* za postizanje željenog okusa i teksture. Također se često dodaju i voćni pripravci kojima se poboljšava okus proizvoda.

Najčešći je unos probiotika u ljudski organizam preko fermentiranih namirnica, čak iako se probiotici mogu nalaziti u sastavu pripravaka za dojenčad, voćnim namicima, namicima od sirutke ili nefermentiranom mlijeku. Simbiotičkim rastom probiotičkih i neprobiootičkih startera u mlijeku moguće je proizvesti fermentirani mlječni proizvod s izvrsnim senzorskim svojstvima i dobrim preživljavanjem probiotičkih stanica tijekom skladištenja.

2.5. VRSTE RODA *Bifidobacterium*

Bifidobakterije su uobičajeni stanovnici ljudskog i životinjskog probavnog sustava. Ime roda su dobole po karakterističnom Y obliku stanica. To su štapićaste, fakultativno anaerobne, G +, nepokretne, nesporogene i termofilne (37 do 40 °C) bakterije. Iz ljudskog organizma izolirano ih je 10 vrsta: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. globosum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*.

Ubrajamo ih u terapijske bakterije mlječne kiseline. Provode heterofermentativno mlječno kiselo vrenje. Bifidobakterije su vrlo spor proizvođač kiseline te koaguliraju mlijeko za 18 do 28 sati. Da bi rasle u mlijeku potrebna im je dulja prilagodba za rast te dodatak promotora rasta.

Kod fermentacije mlijeka bifidobakterijama, potrebno ih je kombinirati sa drugim bakterijama mliječno kiselog vrenja jer same daju fermentirane proizvode slabe arome što nije privlačno za potrošače. Sve bifidobakterije izolirane iz ljudskog organizma, pored glukoze, mogu metabolizirati galaktozu, laktozu i često fruktozu. No, pored ovih šećera, bifidobakterije mogu fermentirati i složene ugljikohidrate.

Optimalno rastu pri pH 6 do 7, s gotovo nikakvim rastom pri pH 4,5 do 5 ili nižim i pri većim pH vrijednostima od 8 do 8,5. Optimalna temperatura za rast je 37 do 41 °C, maksimalna 43 do 45 °C, a pri nižim temperaturama od 25 do 28 °C ne rastu.

2.5.1. BAKTERIJA *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* (*Bb-46*)



Slika 4 *Bifidobacterium longum* [15]

Bifidobacterium longum se zbog povoljnog učinka na crijevnu populaciju koristi u fermentaciji mliječnih proizvoda i farmaceutskih pripravaka, a njena svojstva su:

- u velikom broju naseljava probavni sustav,
- sprječava invaziju patogenih bakterija,
- razgrađuje žučne soli, pomaže u sintezi vitamina B skupine i djeluje antikarcinogeno,
- stimulira imunološki sustav preko imunoglobulina A (Ig A),
- proizvodi octenu i mliječnu kiselinu koje snižavaju pH crijeva,
- poboljšava probavu laktoze i uklanja zatvor.

2.6. MED

Med je sladak gust sok što ga pčele medarice tvore od nektara koji skupljaju na cvjetovima ili slatkim izlučevinama (medene rose) nekih kukaca. U medu se nalaze gotovo svi sastojci koji grade ljudski organizam. Nektar koji pčele skupljaju iz cvijeća glavni je izvor ugljikohidrata koje pčele pretvaraju u lako probavljivi slador - glukozu i fruktozu, koji je glavni sastojak meda. Zreli med ne sadrži više od 15% vode, a pčele ga u saču pokrivaju voštanim poklopcima i tako čuvaju od upijanja vlage i kvarenja. U medu se nalaze minerali, aminokiseline, visoko vrijedne organske kiseline kao što su mravlja, jabučna, limunska, octena, jantarna kiselina, pigmenti, razni derivati klorofila, vosak, inulin, te elementi kompleksa vitamina B.

Tablica 7 Prehrambena vrijednost meda (mjereno na 21gram) [16]

Energetska vrijednost	64 kcal
Proteini	0,06 g
Ugljikohidrati	17,3 g
Ukupne masti	0,0 g
Prehrambena vlakna	0,042 g

S vremenom prije ili kasnije svaki med mora kristalizirati. Kristalizacija je prirodno svojstvo svakog meda. Brzina same kristalizacije ovisi o vrsti meda, a može biti za nekoliko tjedana do nekoliko godina. To je sasvim prirodan proces koji ne utječe na kvalitetu meda.

2.6.1. BAGREMOV MED

Bagremov med izrazito je svijetle žute boje, blaga ugodna mirisa i okusa, lagan i ukusan, preporučuje se djeci i rekonvalescentima. Zbog svojih osobina 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 vrsta meda koji vrlo sporo kristalizira zato što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Same pčele dobro i uspješno prezimaju ako im se osigura zimovanje na bagremovu medu. Bagremov med dobar je za umirenje, kod vrtoglavice, nesanice i sličnih smetnji [16].



Slika 5 Bagremov med [16]

2.6.2. KESTENOV MED

Kestenov med je tamne boje, a boja mu varira ovisno o podneblju i godini, prepoznatljivog je mirisa i izrazito karakterističnog, pomalo gorkog okusa. Povoljno djeluje na cijelokupni probavni sustav. Potiče rad crijeva, olakšava rad preopterećene jetre i žuči te štiti želučanu i crijevnu sluznicu. Kestenov med preporučuje se protiv bolesti probavnih organa: želuca, dvanaesnika, žuči i jetre. Med kestena ima izvanredno djelovanje u oporavku kod žutice i sl [16].



Slika 6 Kestenov med [16]

2.7. BAKTERIJA *Yersinia enterocolitica*

Rod *Yersinia* pripada skupini Gram (-), fakultativno anaerobnim, kratkim štapićima (kokoidni oblici) veličina od (0,4 do 0,8) do (1 do 4) μm . *Yersinia enterocolitica* je veličine od oko 3 μm , može rasti na temperaturi od 4 do 42 °C. Optimalna temperatura rasta je od 28 do 29 °C, a optimalna pH vrijednost 4,8.



Slika 7 *Yersinia enterocolitica* [17]

Raširena je u prirodi, nalazi se na biljnom materijalu, u vodi, zemlji, u probavnom sustavu ljudi i životinja, sirovom mesu, mlijeku, mliječnim proizvodima, bjelanjku, šumskim gljivama. Tvori enterotoksin sličan toksinu bakterije *E. coli*. Patogena je za čovjeka koji se najčešće inficira mesom i mlijekom i oboli sa znacima gastroenteritisa, rijetko septikemije.

Osjetljiva je na koncentraciju soli, visoku temperaturu (temperatura od 60 °C uništava ju za 4 min), na tetraciklin, kloramfenikol i dezinficijense, a otporna je na niske temperature [18].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada je bio pratiti promjene pH vrijednosti, potencijalne i aktivne kiselosti, kao i broj probiotičkih bakterija tijekom 25 sati fermentacije svakih 5 sati (0., 5., 10., 15., 20., 25.) kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih bakterijom *Bifidobacterium longum* uz dodatak bagremovog i kestenovog meda i utvrditi inhibitorni utjecaj na bakteriju vrste *Yersinia enterocolitica*.

3.2. MATERIJAL I METODE RADA

3.2.1. PRIPRAVA UZORAKA

Za pripremu probiotičkih napitaka korišteno je kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano kravje mlijeko s 2,8% mliječne masti (proizvođač Vindija Varaždin), kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano kozje mlijeko s 3,2% mliječne masti (proizvođač Vindija Varaždin), te sojino mlijeko s 2,2% masti, bez šećera i soli (proizvođač Alpro Soya, Belgija). Kao prebiotički dodatak u sve tri vrste mlijeka korišteni su kestenov i bagremov med (proizvođač Apimel, Hrvatska) u udjelima od 3%, 5% i 10%.

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.

U aseptičkim uvjetima preneseno je po 200 mL kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka u sterilnu Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL. Mlijeko je zagrijano u termostatu na temperaturu nacjepljivanja bakterija mliječne kiseline (37 °C), zatim je dodan med (6 g/200 mL, 10 g/200 mL i 20 g/200 mL). Poslije zagrijavanja, uzorci se nacijepe probiotičkom bakterijom i inkubiraju na 37 °C u trajanju od 25 sati.

Kao patogena kultura u radu je korištena bakterija *Yersinia enterocolitica*.

3.2.1.1. PRIPREMA FIZIOLOŠKE OTOPINE

U tikvicu od 1000 mL se doda 8,5 g NaCl i nadopuni do oznake destiliranom vodom i promiješa. Tako pripremljena fiziološka otopina se razdjeli u potrebnii broj epruveta na koje se stave čepovi i takve odlaze na sterilizaciju u autoklav na 121 °C , 15 minuta.

3.2.1.2. PRIPREMA MUELLER-HINTON AGARA

U 2 tikvice, u svaku po 12,25 g Mueller-Hinton agara se rastopi u 350 mL vode (35 g agar u 1 L vode). Tada se zagrijava u mikrovalnoj pećnici do vrenja uz povremeno mučkanje i otvaranje čepa boce da se ispusti para i da ne dođe do puknuća tikvice. Nakon što se agar dobro rastopio i izbistrio, razlige se u odgovarajući broj epruveta po 10 mL i takve odlaze na sterilizaciju u autoklav na 121 °C ,15 minuta.

3.2.1.3. PRIPREMA MRS AGARA

Priredi se 5 tikvica u kojima se rastopi 21,06 g agar u 300 mL hladne destilirane vode (70,2 g MRS u 1 L vode), te se autoklavira 15 minuta na 118 °C.

3.2.1.4. PRIPRAVA FILTRATA BEZ STANICA

Filtrat bez stanica priprema se samo za 25. sat fermentacije. Iz uzoraka se odlije po 30 mL u 7 označenih kiveta i to 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. Centrifugiranje se provodi na 2200 g kroz 15 min na 4 °C. Čisti supernatant se izvuče sterilnom špricom i sterilizira membranskom filtracijom (nylon Ø 30 mm, pore 0,45 µm).

3.2.2. ODREĐIVANJE AKTIVNE KISELOSTI

Za određivanje aktivne kiselosti koristio se pH metar (METTLER TOLEDO, MA 235 pH / Ion Analyzer). Prije samog određivanja, ukoliko je potrebno, pH metar se baždari puferima poznate vrijednosti (pH 4,00 i pH 7,00) i očitaju se vrijednosti. 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. Između svakog mjerjenja potrebno je elektrodu isprati i ako uređaj to zahtjeva, ponovno izvršiti baždarenje.

3.2.3. ODREĐIVANJE TITRACIJSKE KISELOSTI

Nakon određivanja pH i elektrokemijskog potencijala, 20mL uzorka se prelije u Erlenmayerovu tikvicu od 100mL i ispere sa 10 mL destilirane vode. U tikvicu se doda 2 do 3 kapi fenolftaleina (10% u etanolu) i titrira se sa 0,1 M NaOH do pojave svjetlo ružičaste boje koja je postojana nekoliko sekundi. Tada se očita utrošeni volumen NaOH i iz utroška izračunava se kiselost uzorka izraženu u stupnjevima po Soxhlet – Henkelu ($^{\circ}$ SH).

$$\text{stupanj po Soxhlet-Henkelu } (^{\circ}\text{SH}) = \text{volumen NaOH (u ml)} \times 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$$

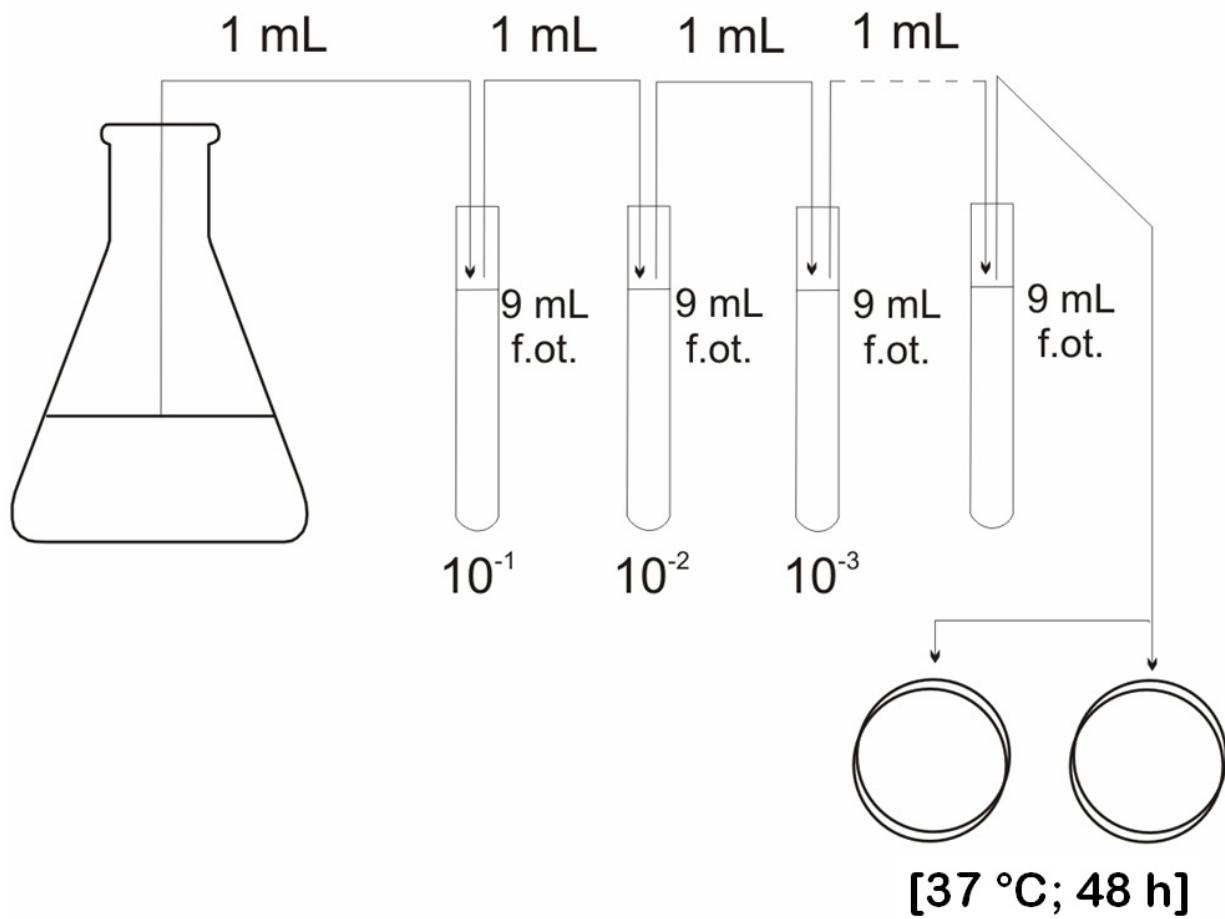
3.2.4. PRIPRAVA SUSPENZIJE BAKTERIJSKIH STANICA *Yersinia enterocolitica*

U epruvetu s 24 sata starom kulturom dodaje se 1 mL fiziološke otopine. Ušicom se povlači lagano po uzgoju i prenosi po 1 mL pipetom u epruvetu s 9 mL fiziološke otopine i potom se homogenizira na vibromixu. Uspoređuje se dobivena suspenzija stanica s 0,5 McFarlandovim standardom (10^8 stanica u mL) i ako je potrebno prilagođava se.

3.2.5. ODREĐIVANJE BROJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA

Prije samog određivanja, označe se petrijeve zdjelice oznakama uzoraka i satom u kojem se određuje CFU. Rade se 2 paralele. Iz uzorka se prenese odgovarajući volumen pipetom u epruvetu sa 9 mL fiziološke otopine, promješa se na Vibromixu i pipetom opet prenosi u drugu epruvetu sa fiziološkom otopinom i sve tako dok se ne postigne potrebno razrjeđenje.

MRS agar se otopi u mikrovalnoj pećnici i ohladi na 48 °C u vodenoj kupelji. Iz potrebnog razrjeđenja uzorka pipetom se prenese potreban volumen inokuluma u plastične Petrijeve zdjelice (Slika 8). Ulije se pripremljeni MRS agar (oko 20 mL) i homogenizira se miješanjem. Postupak se ponavlja na isti način za svaki ostali uzorak s određenim postotkom i vrstom meda. Nakon skrutnjavanja, Petrijeve zdjelice sa oznakama istoga sata se stave u Anaerobic Jar (anaerobni lonac), okrenute naopako. U lonac se dodaje vrećica Anaeroculta (12 mL zasićene otopine NaOH + 12 mL 20 % otopine pirogalola u vodi), zatvori se i stavi u termostat. Nakon 48 sati inkubacije u termostatu na 37 °C prebroje se porasle kolonije.

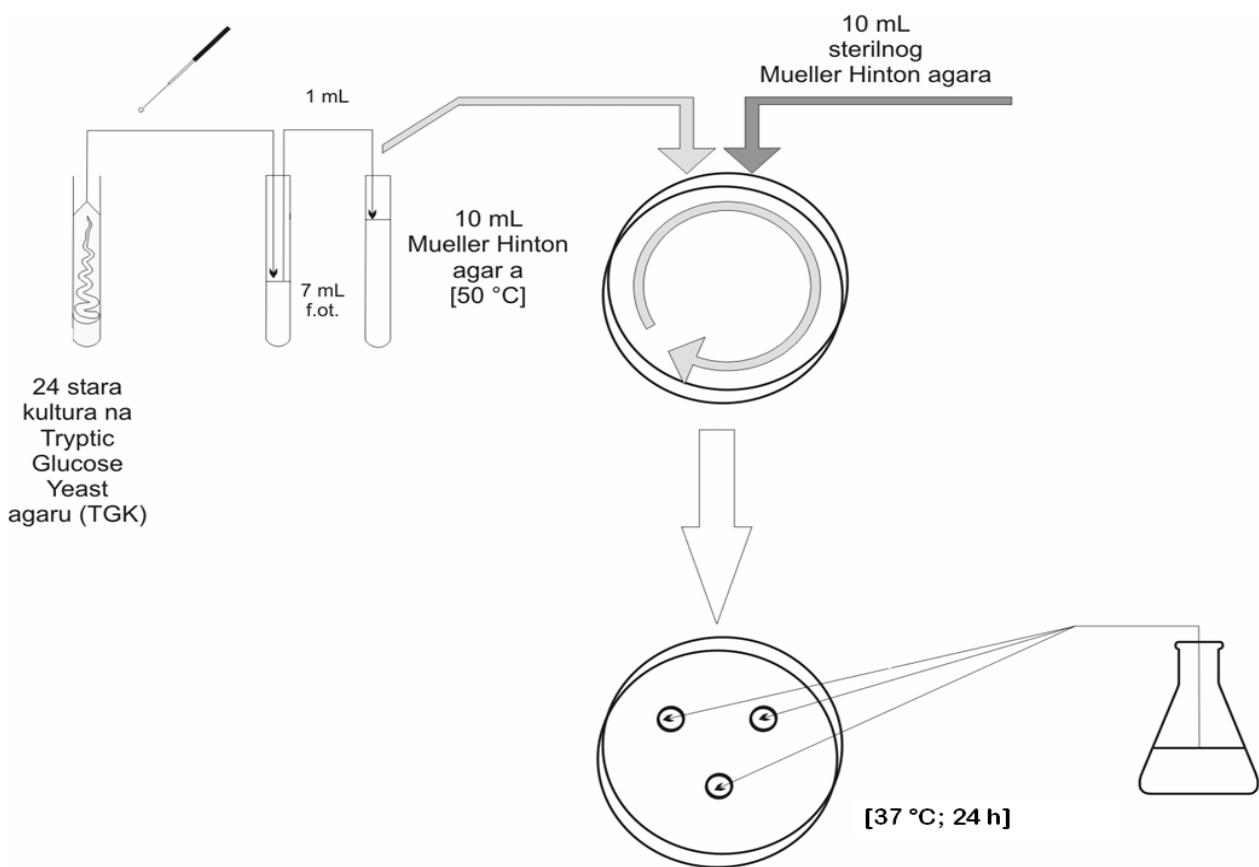


Slika 8 Određivanje broja probiotičkih bakterija (CFU)

3.2.6. ODREĐIVANJE STUPNJA INHIBICIJE BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* RAZLIČITIM VRSTAMA FERMENTIRANIH MLJEKA

Petrijeve zdjelice se obilježe oznakama vrste i postotka meda te sata i to po 2 paralele. 1 mL suspenzije stanicu prenese se u epruvetu s 10 mL Mueller-Hinton agara i homogenizira na vibromixu. U sterilnu Petrijevu zdjelicu ulije se jedna epruveta s nacijepljenim Mueller-Hinton agarom i jedna s 10 mL sterilnim Mueller-Hinton agarom, te se dobro promiješa. Nakon skrutnjavanja (oko 20 min), sterilnim bušačem čepova br.5 (promjera 9 mm) se izbuše rupe i sterilnom pincetom tankih vrhova vade agarni čepovi. U svaku rupu prenese se digitalnom pipetom po 150 µL uzorka pipetom i to redom: 1. otvor: ne fermentirano 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.

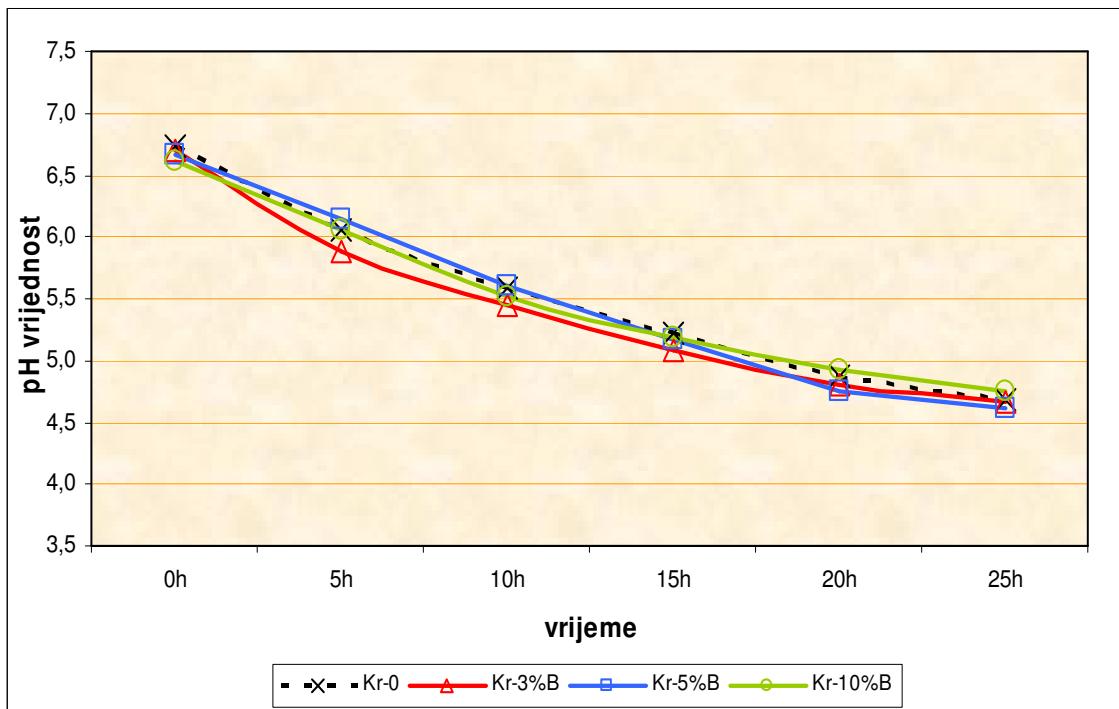
Nakon dodatka mlijeka, Petrijeve zdjelice ulože se u termostat na inkubaciju na 37 °C, u trajanju od 24 sata nakon čega se očitaju zone inhibicije mjerenjem promjera (u mm) za svaki sat fermentacije, te udio i vrstu meda. Treba odrediti da li je inhibicija djelomična ili potpuna.



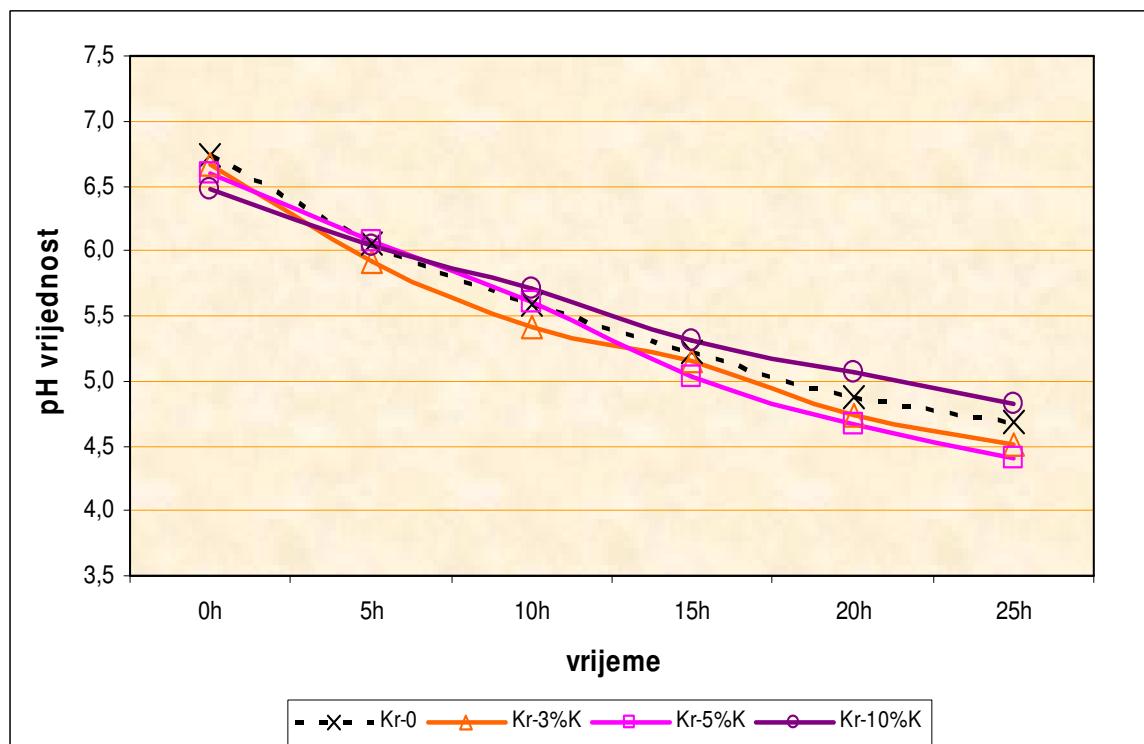
Slika 9 Određivanje stupnja inhibicije

4. REZULTATI

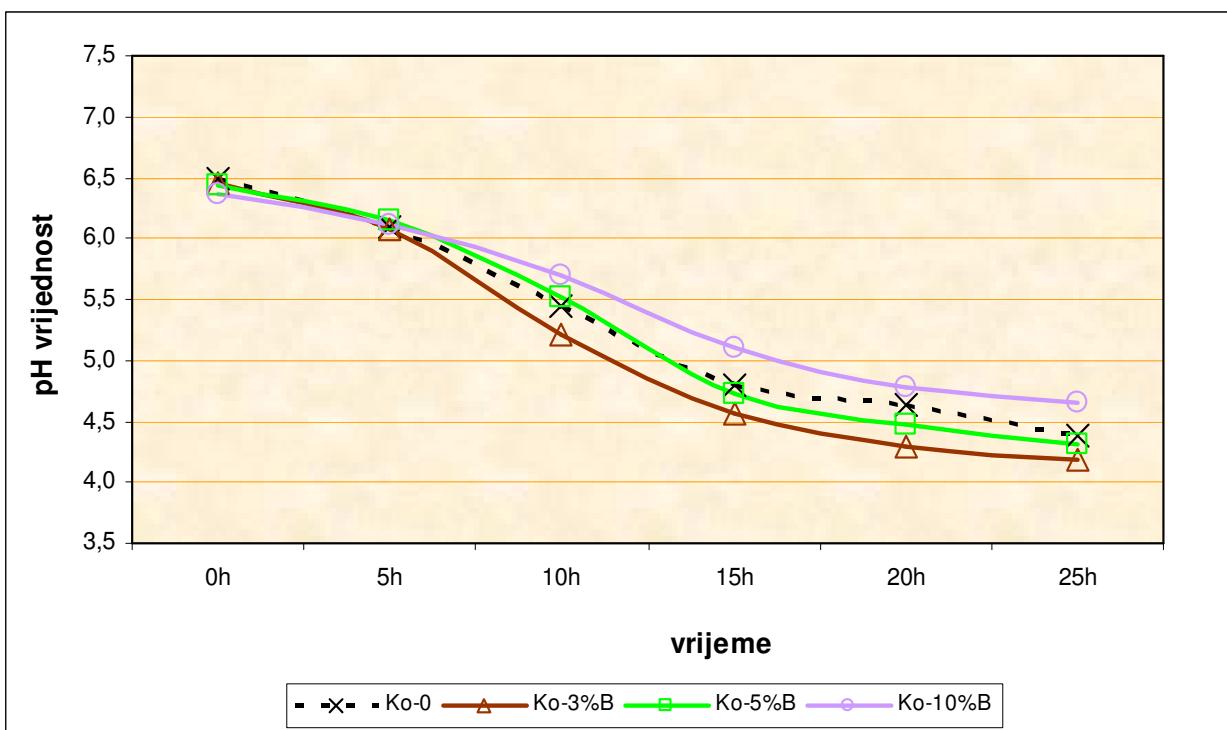
4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO - KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLJEKA S MONOKULTUROM *Bifidobacterium longum* (Bb-46)



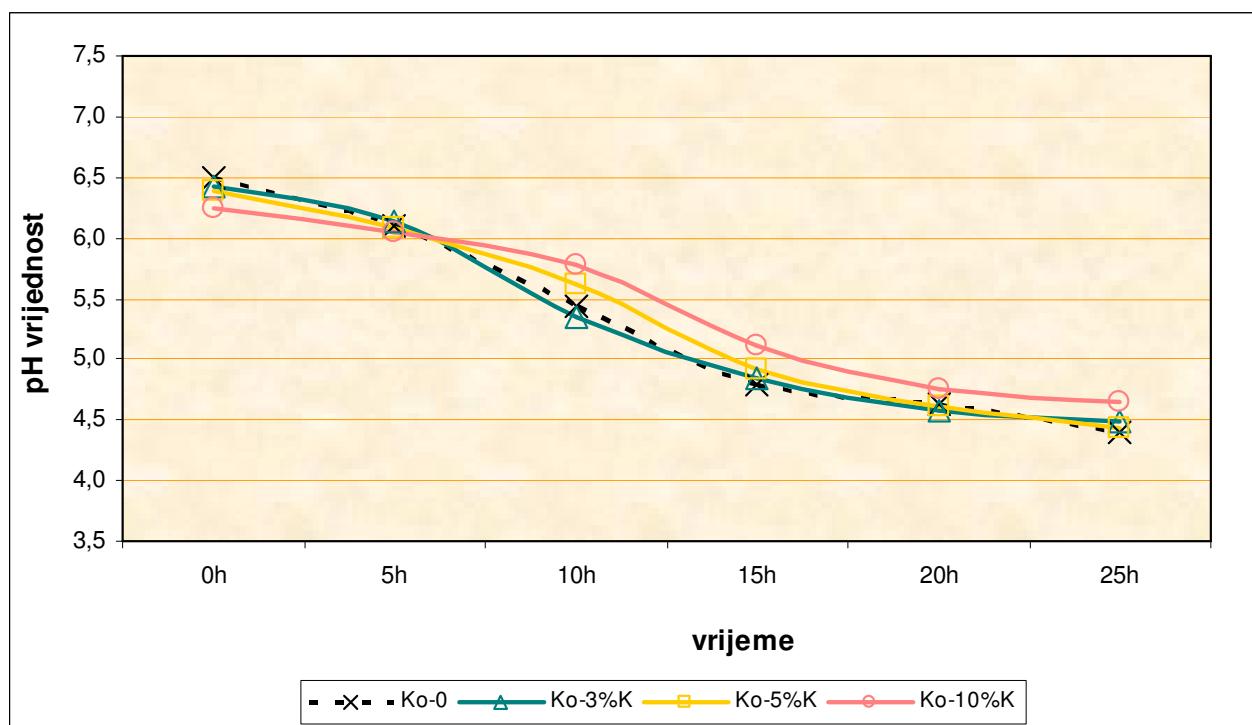
Slika 10 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



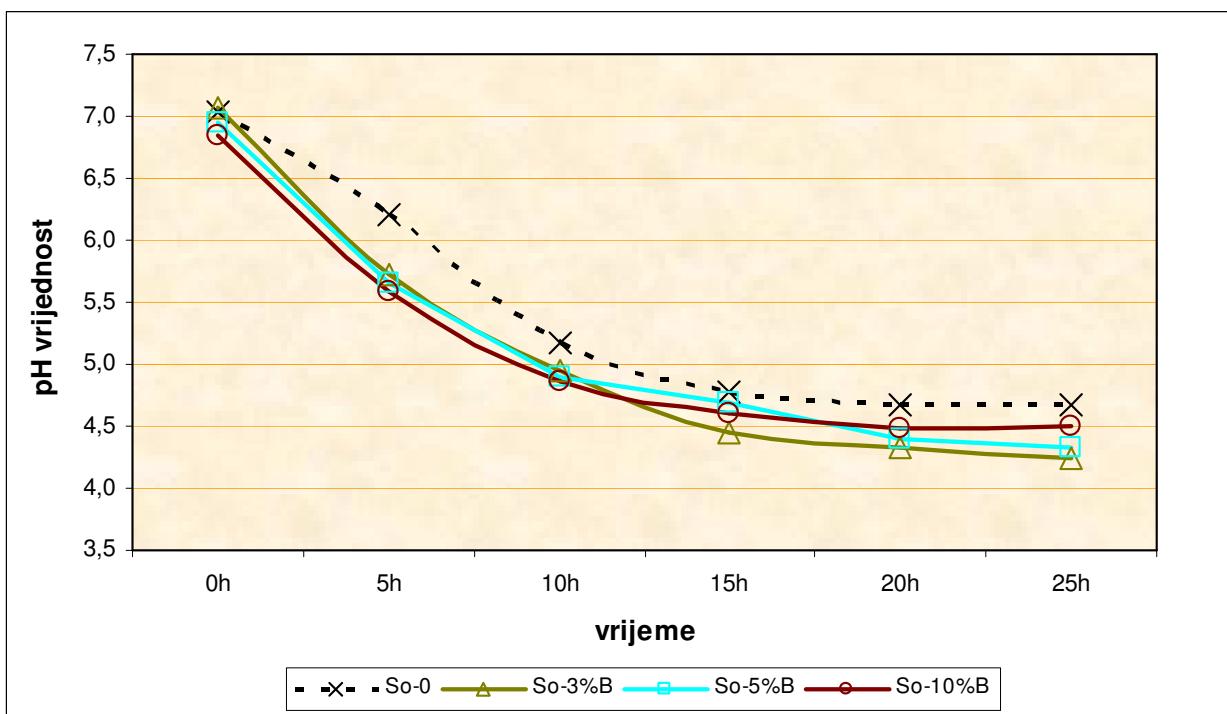
Slika 11 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



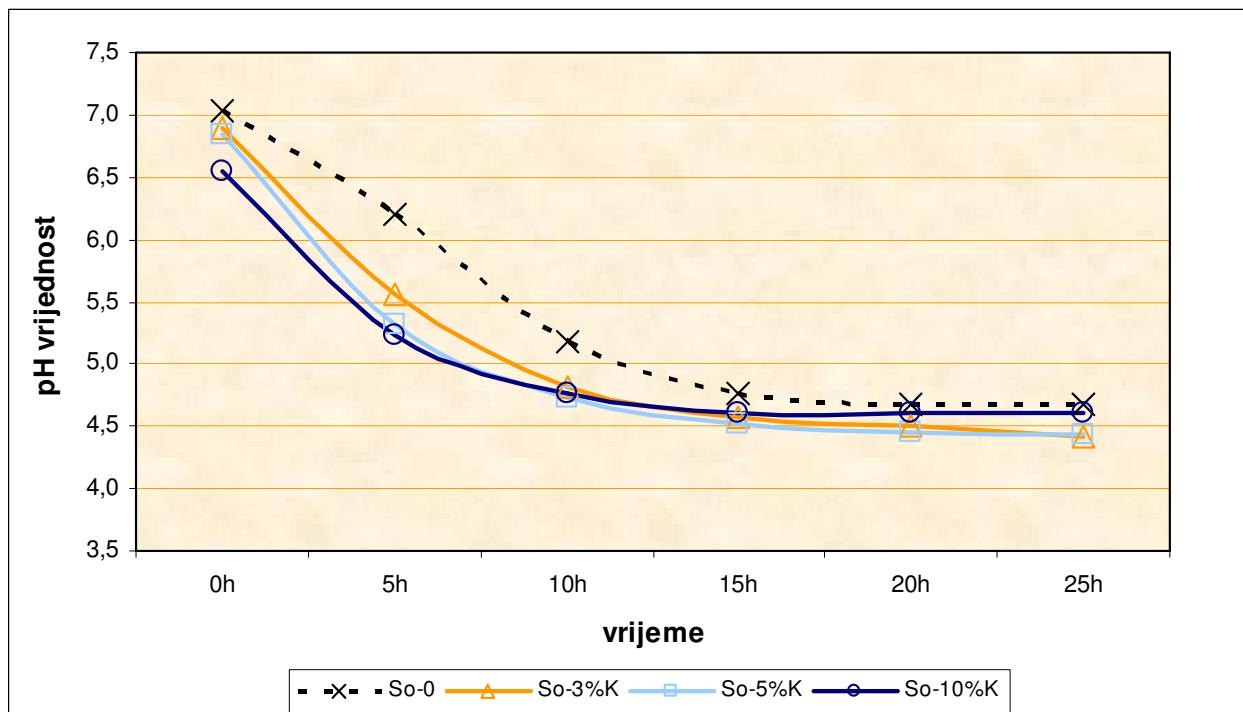
Slika 12 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



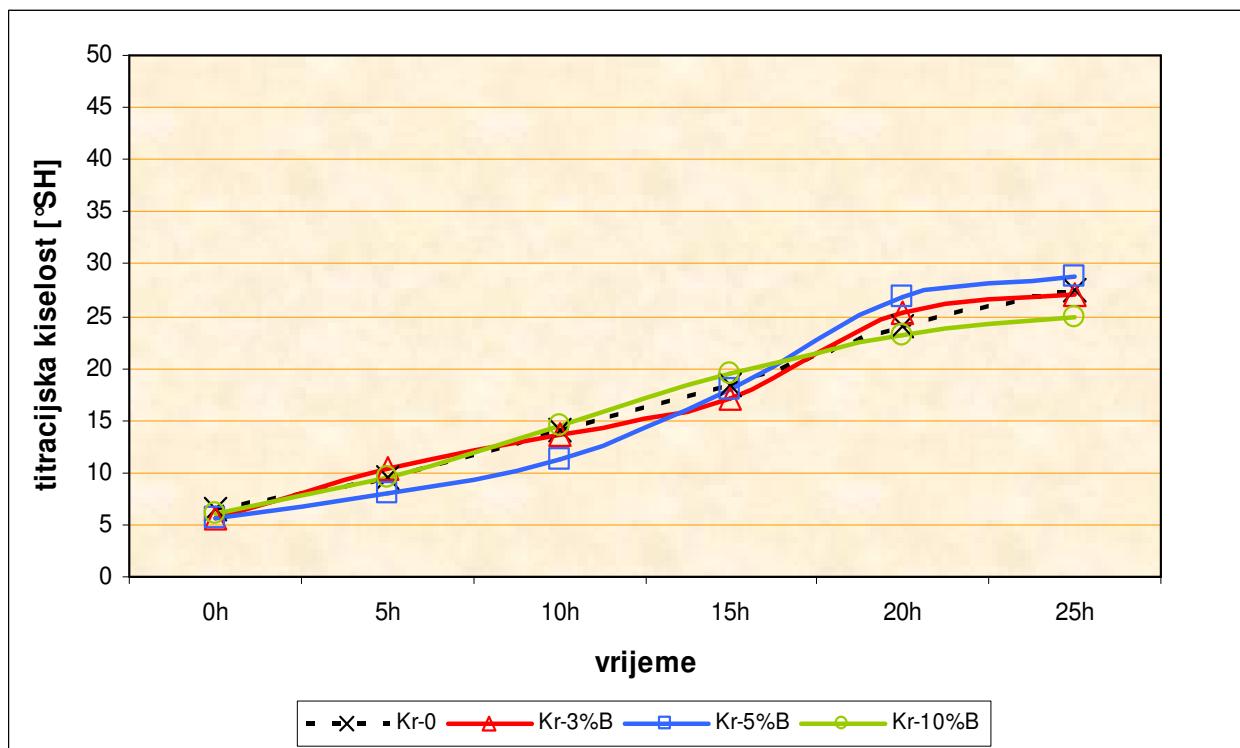
Slika 13 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



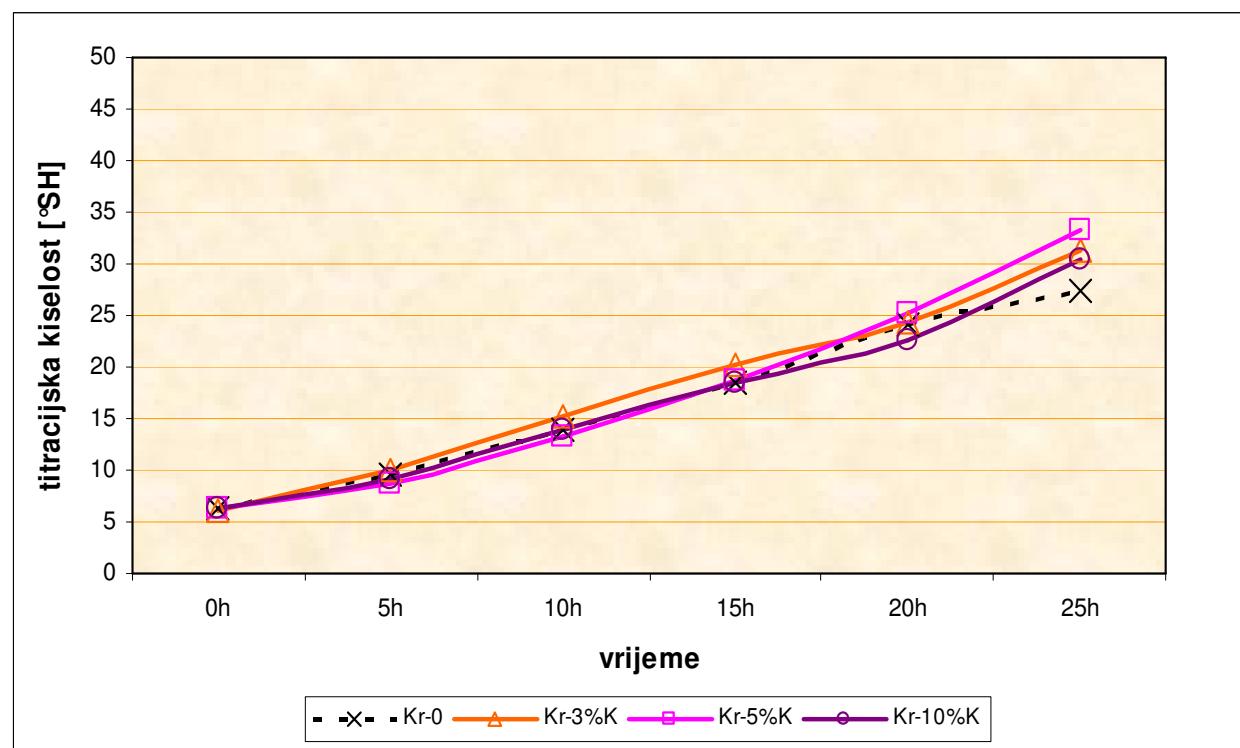
Slika 14 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



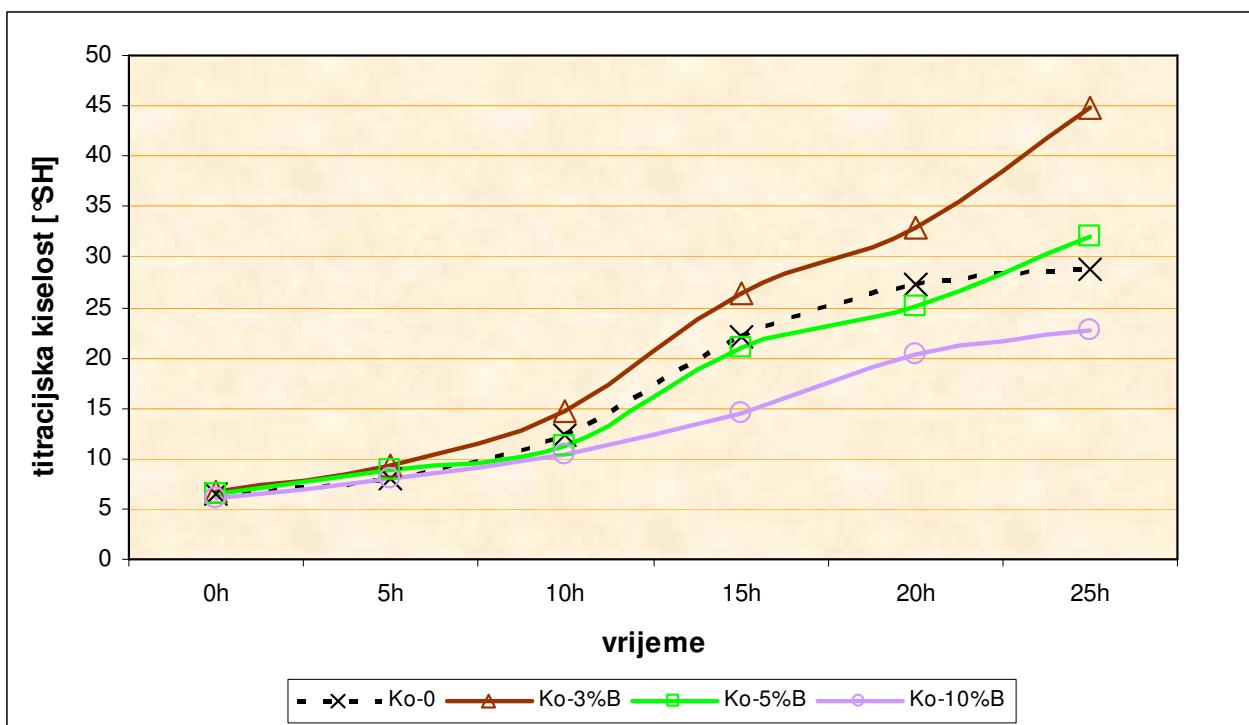
Slika 15 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



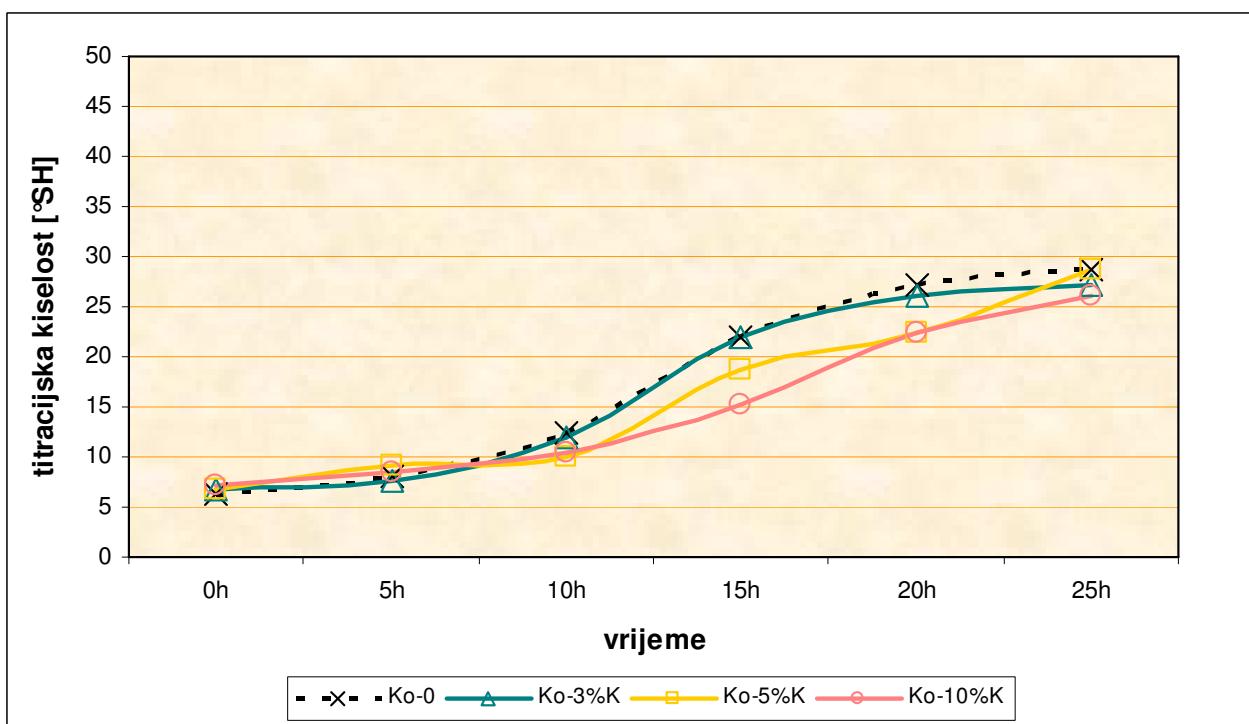
Slika 16 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



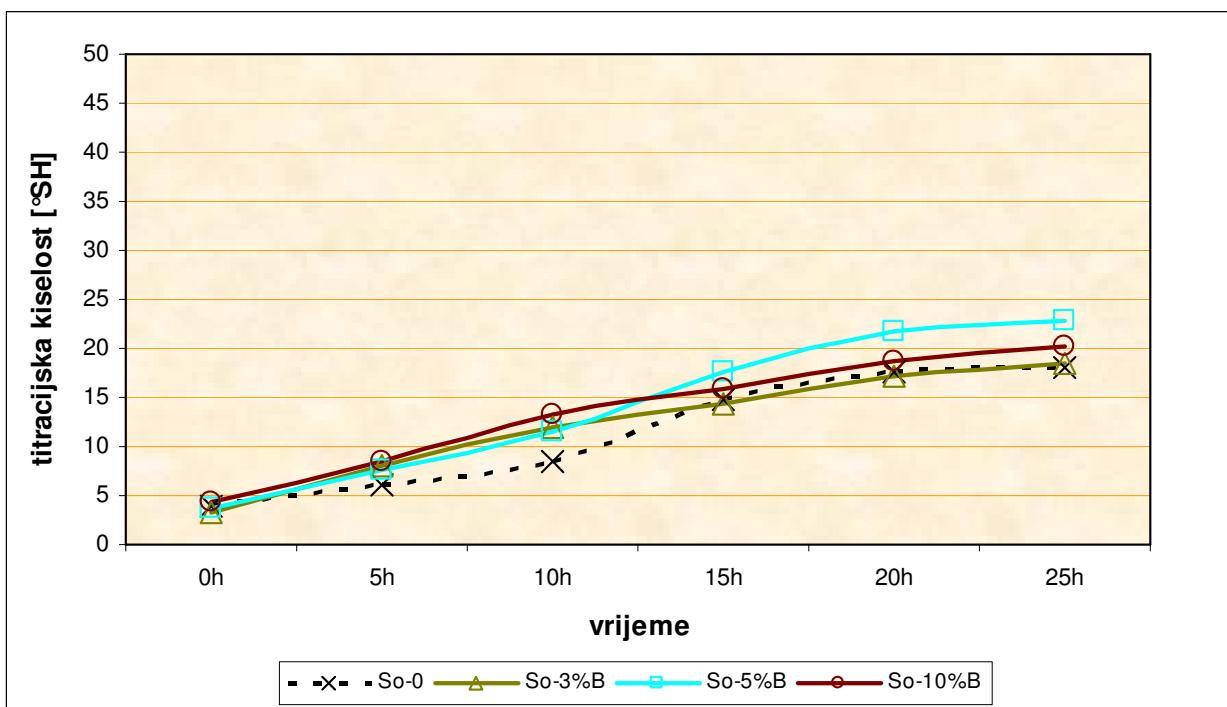
Slika 17 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



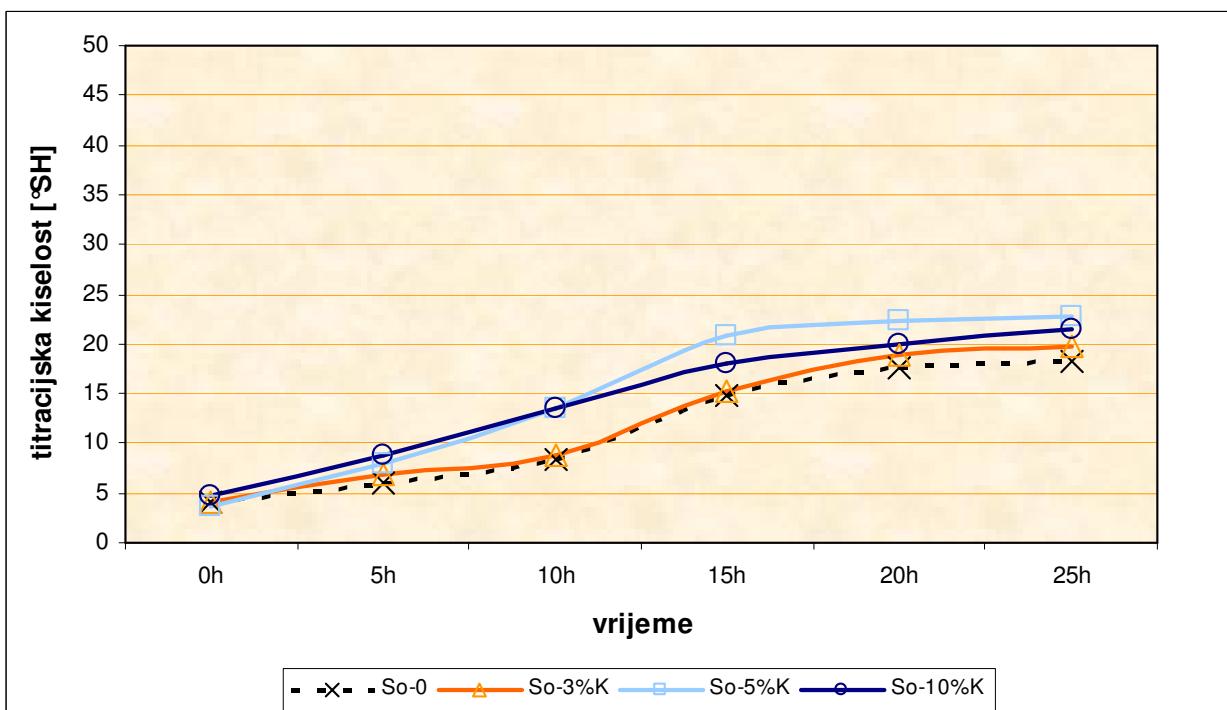
Slika 18 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



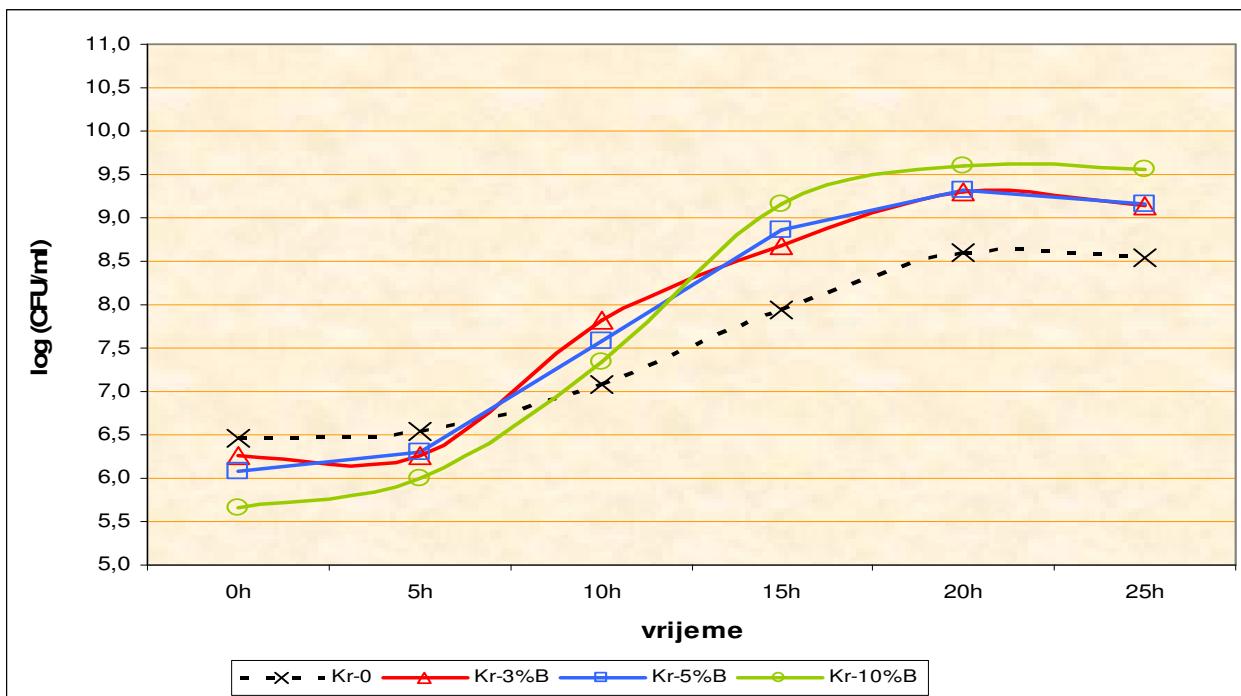
Slika 19 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



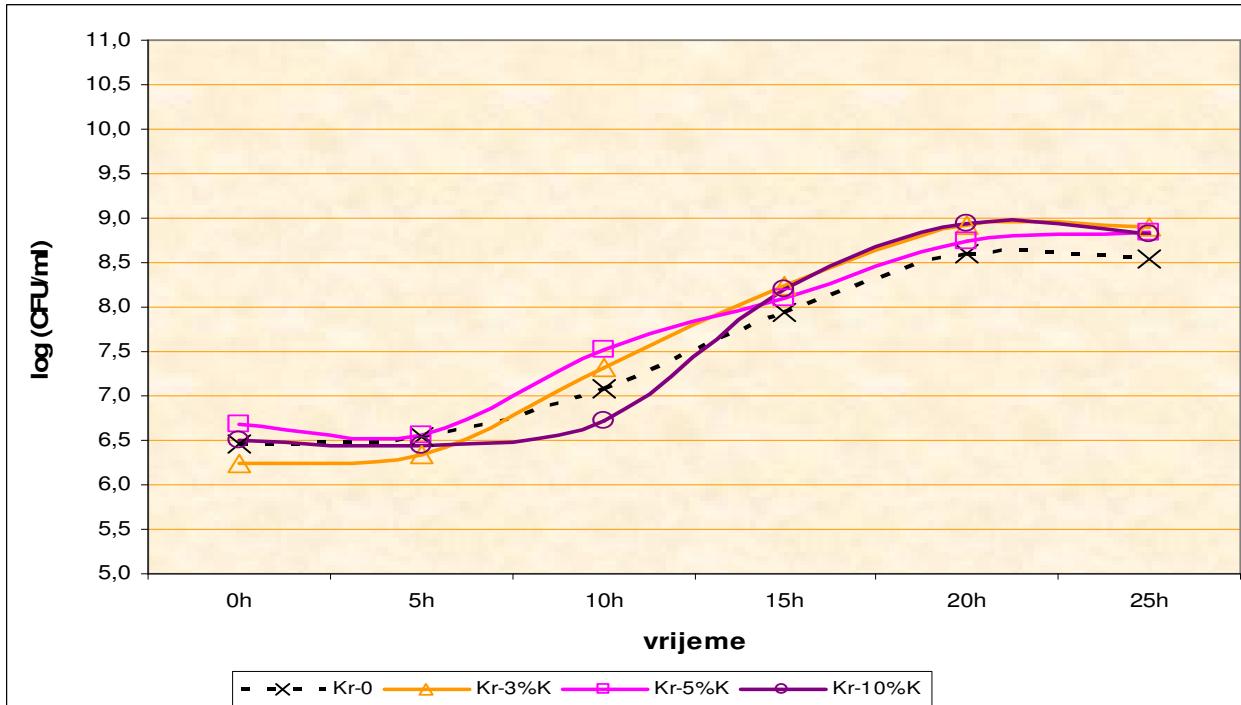
Slika 20 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



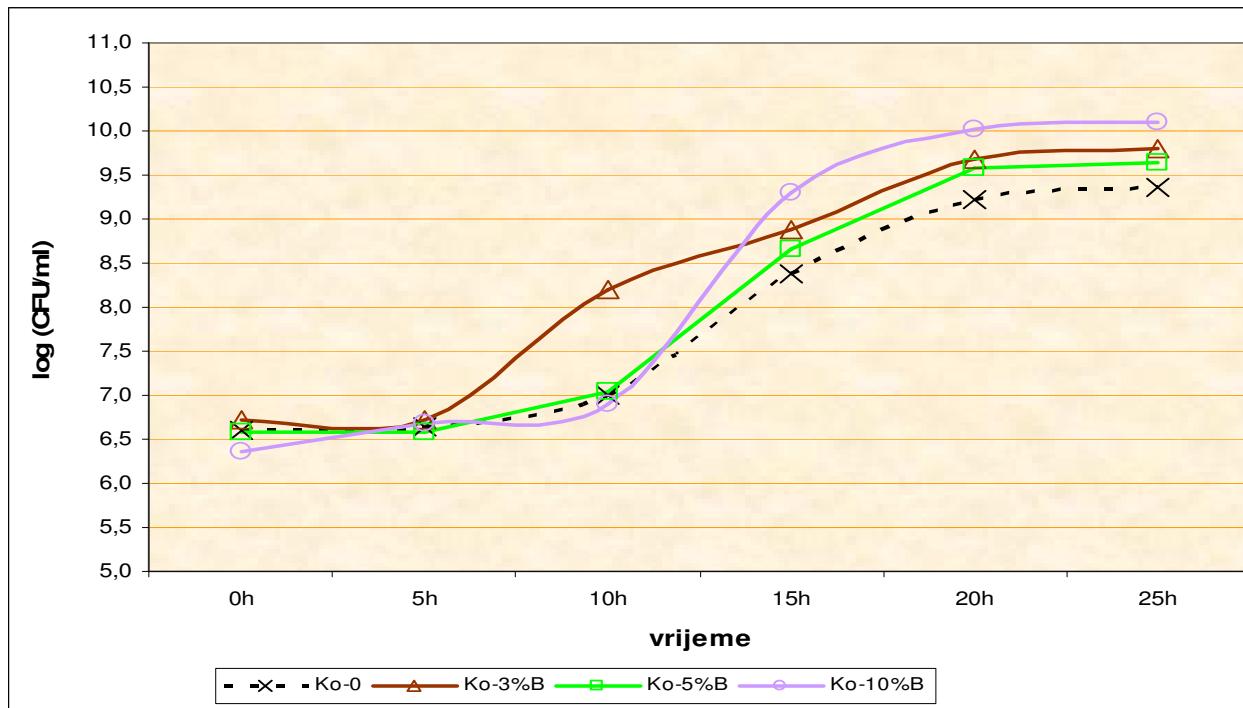
Slika 21 Promjena titracijske kiselosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



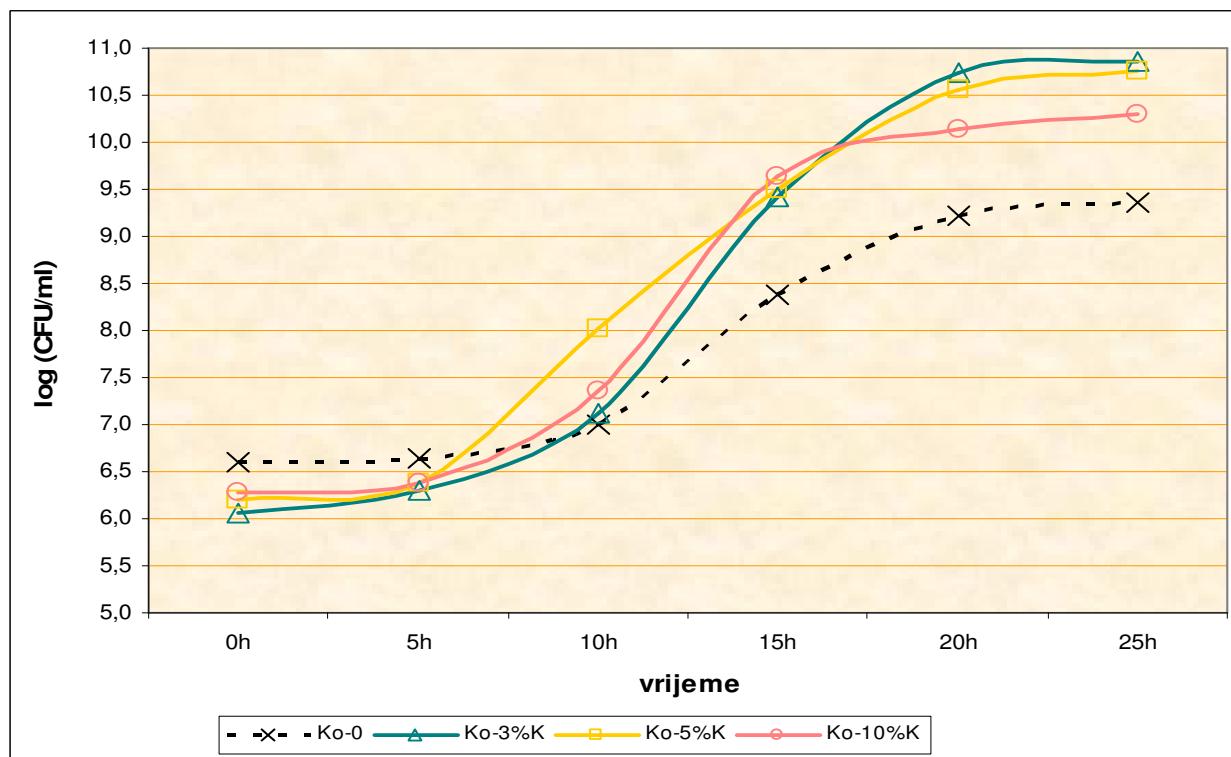
Slika 22 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



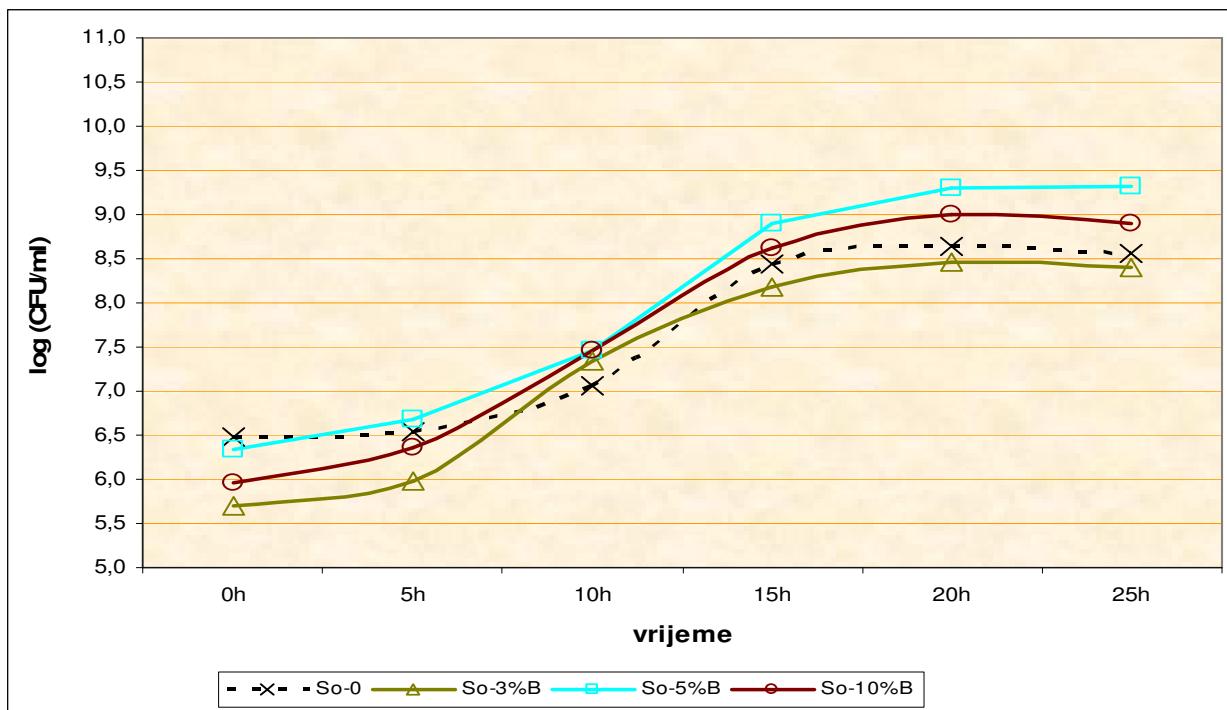
Slika 23 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



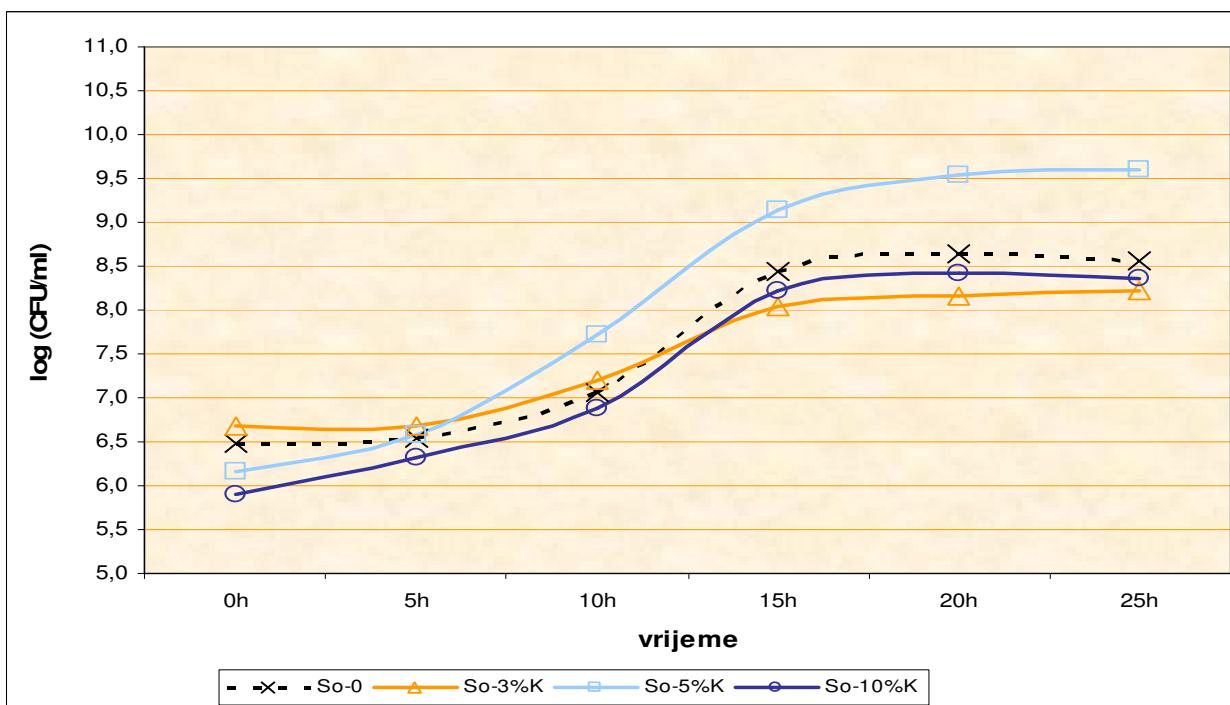
Slika 24 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



Slika 25 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije



Slika 26 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom fermentacije



Slika 27 Promjena log CFU vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom fermentacije

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA *Yersinia enterocolitica* FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM S MONOKULTUROM *Bifidobacterium longum* (Bb-46)

Tablica 8 Inhibicija rasta *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom bagremovog meda

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

Tablica 9 Inhibicija rasta *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom kestenovog meda

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

Tablica 10 Inhibicija rasta *Yersini .enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom bagremovog meda

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

Legenda

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

Tablica 11 Inhibicija rasta *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom kestenovog meda

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

Tablica 12 Inhibicija rasta *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom bagremovog meda

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

Tablica 13 Inhibicija rasta *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-46 bez i s dodatkom 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 mjerjenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije > 15 mm

5. RASPRAVA

5.1. PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE

Tijekom fermentacije kod kozjeg i kravljeg mlijeka dolazi do kontinuiranog pada pH vrijednosti, dok kod sojinog mlijeka do naglog pada pH vrijednosti došlo je u intervalu od 0. do 10. sata fermentacije (slika 10 do 15).

Dodatak bagremovog meda u **kravlje mlijeko** u udjelu od 5% i 10% nije značajno promijenio pH vrijednost u odnosu na mlijeko bez dodatka meda. Bagremov med u udjelu od 3% daje nižu pH vrijednost od početnog uzorka, dok najveći pad pH vrijednosti uzrokuje kestenov med u udjelima od 3% i 5%. Kestenov med u udjelu od 10% daje višu pH vrijednost od početnog uzorka (slika 10 i 11).

Tijekom fermentacije **kozjeg mlijeka** dodatkom bagremovog meda u udjelima od 5%, te dodatkom kestenovog meda u udjelu od 3% i 5% daju vrijednosti slične onima u mlijeku bez dodatka meda. Bagremov med u udjelu od 3% uzrokuje veći pad pH vrijednosti, dok bagremov med u udjelu od 10% i kestenov med u udjelu od 10% daje višu pH vrijednost u odnosu na mlijeko bez dodatka meda (slika 12 i 13).

Kod **sojinog mlijeka** tokom fermentacije i bagremov i kestenov med u sva tri udjela (3%, 5% i 10%) uzrokuju značajan pad pH vrijednosti u odnosu na mlijeko bez dodatka meda (slika 14 i 15).

5.2. PROMJENE INTENZITETA ZAKISELJAVANJA (TITRACIJSKE KISELOSTI) TIJEKOM FERMENTACIJE

Tijekom fermentacije **kravljeg mlijeka**, dodatak bagremovog meda u udjelu od 3% i 10%, kao i dodatak kestenovog meda u udjelu od 10%, pokazao je vrijednost sličnu vrijednosti mlijeka bez dodatka meda. Bagremov med u udjelu od 5%, kao i kestenov med u udjelu od 3% i 5%, daje nešto više vrijednosti od uzorka bez dodatka meda (slika 16 i 17).

U **kozjem mlijeku** tijekom fermentacije bagremov med u udjelu od 5%, kao i kestenov med u udjelu od 3%, razvija kiselost sličnu uzorku bez dodatka meda. Bagremov med u udjelu od 3% razvija višu vrijednost titracijske kiselosti, dok bagremov med u udjelu od 10%, kao i kestenov med u udjelu od 5% i 10% daje niže vrijednosti u odnosu na mlijeko bez dodatka meda (slika 18 i 19).

U **sojinom mlijeku** porast titracijske kiselosti uzrokuju i bagremov i kestenov med u udjelu od 5% i 10%, dok i bagremov i kestenov med u udjelu od 3% daju vrlo slične vrijednosti u odnosu na mlijeko bez dodatka meda (slika 20 i 21).

5.3. PROMJENA BROJA BAKTERIJA *Bifidobacterium longum* TIJEKOM FERMENTACIJE

Tijekom fermentacije **kravljeg mlijeka** monokulturom *B. longum* utvrđen je porast bakterija kod svih uzoraka. Uzorak kravljeg mlijeka sa dodatkom bagremvog meda u sva tri udjela 3%, 5% i 10%, dovelo je do većeg porasta bakterija u odnosu na uzorak bez dodatka meda, dok kod kestenovog meda u sva tri udjela 3%, 5% i 10% broj poraslih bakterija kreće se oko vrijednosti uzorka bez dodatka meda (slika 22 i 23).

Tijekom fermentacije **kozjeg mlijeka** uzorak bez dodatka meda ima najmanji broj bakterija, dok u uzorcima sa kestenovim medom u sva tri udjela 3%, 5% i 10% dolazi do porasta broja bakterija. Dodatkom bagremovog meda u sva tri udjela 3%, 5% i 10% dolazi do neznatnog povećanja broja bakterija u odnosu na uzorak bez dodatka meda (slika 24 i 25).

Tijekom fermentacije **sojinog mlijeka** uzorak s dodatkom bagremovog meda u udjelu od 3%, kao i kestenov med u udjelu od 3% i 10%, utvrđen je manji broj bakterija u odnosu na uzorak bez meda. Dodatak bagremovog meda u udjelu od 5% i 10% uzrokuje veći porast broja bakterija, dok dodatak kestenovog meda u udjelu od 5% uzrokuje znatno veći porast broja bakterija u odnosu na uzorak bez dodatka meda (slika 26 i 27).

5.4. USPOREDBA INHIBICIJE BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM S MONOKULTUROM *Bifidobacterium longum*

Osnovna postavka rada je proučavanje inhibicijskog potencijala *Bifidobacterium longum* prema patogenoj bakteriji *Yersinia enterocolitica*, te usporedba kozje/kravljje/sojino mlijeko, pH vrijednosti, CFU probiotičkih bakterija, dodatak bagremovog / kestenovog meda i utjecaj njihovih različitih udjela.

Kravje mlijeko bez dodatka meda pokazuje djelomičnu inhibiciju nakon 15. i 25. sata fermentacije. Dodatkom bagremovog meda u udjelu od 3% (kod 15. sata fermentacije) i 5% (kod 15. i 25. sata fermentacije) postiže se inhibicijski učinak uz zonu inhibicije 15 do 20 mm, dok se u udjelu od 3% i 10% postiže značajniji učinak kod 25. sata fermentacije (zona inhibicije od 20 do 25 mm). Dodatkom kestenovog meda u udjelu od 3%, 5% i 10% (kod 25. sata fermentacije) postiže se inhibicijski učinak uz zonu inhibicije 15 do 20 mm, dok se u udjelu od 3% i 5% postiže značajniji učinak kod 15. sata fermentacije (zona inhibicije od 20 do 25 mm) (tablica 8 i 9).

Kozje mlijeko bez dodatka meda pokazuje djelomičnu inhibiciju nakn 15. i 25. sta fermentacije. Dodatkom bagremovog meda u udjelu od 3% i 5% (kod 25. sata fermentacije) postiže se inhibicijski učinak uz zonu inhibicije 15 do 20 mm, dok se u udjelu od 3% i 10% postiže značajniji učinak kod 15. sata fermentacije (zona inhibicije od 20 do 25 mm).

Dodatkom kestenovog meda u udjelu od 5 i 10% (kod 15. sata fermentacije) i udjelu od 3%, 5% i 10% (kod 25. sata fermentacije) postiže se inhibicijski učinak uz zonu inhibicije 15 do 20 mm (tablica 10 i 11).

Sojino mlijeko bez dodatka meda pokazuje djelomični inhibicijski učinak na rast patogenu *Yersinia enterocolitica*. Bagremov i kestenov med u udjelu od 5% (kod 15. sata fermentacije) imali su vrlo sličan inhibicijski učinak (zona inhibicije od 20 do 25 mm), dok bagremov med u udjelu od 10% (kod 15. sata fermentacije) imao je značajno veći inhibicijski učinak od kestenovog meda istog udjela. Dodatkom bagremovog meda u udjelu od 10%, te kestenovog meda u udjelu od 3%, 5% i 10% (kod 25. sata fermentacije) postiže se inhibicijski učinak uz zonu inhibicije 15 do 20 mm (tablica 12 i 13).

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Tijekom fermentacije kod kravljeg i kozjeg mlijeka dolazi do kontinuiranog pada pH vrijednosti, dok je kod sojinog mlijeka do naglog pada pH vrijednosti došlo u intervalu od 0. do 10. sata fermentacije.
- Dodatak kestenovog meda uzrokuje niže pH vrijednosti kod kravljeg mlijeka, dok su kod kozjeg i sojinog mlijeka niže pH vrijednosti pri dodatku bagremovog meda
- Najveći broj stanica bakterije *Bifidobacterium longum* utvrđen je u kozjem mlijeku s dodatkom obje vrste meda, a najmanji broj u sojinom mlijeku
- Kravlje mlijeko fermentirano Bb-46 kulturom najjače je inhibiralo rast *Y. enterocolitica* s dodatkom bagremovog meda u udjelima od 3% i 10% u 25. satu fermentacije, te s dodatkom kestenovog meda u udjelima od 3% i 5% u 15. satu fermentacije
- Kozje mlijeko fermentirano Bb-46 kulturom najjači inhibirajući učinak na *Y. enterocolitica* je pokazalo s dodatkom bagremovog meda u udjelu od 3% i 10% tijekom 15. sata fermentacije, te s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 5% i 10% tijekom 0. sata fermentacije
- Sojino mlijeko fermentirano Bb-46 kulturom najjače je inhibiralo rast *Y. enterocolitica* sa 5% bagremovog i 5% kestenovog meda u 15. satu fermentacije, dok dodatkom bagremovog meda u udjelu od 10% je pokazalo veći inhibicijski učinak u odnosu na kestenov med u istom udjelu i vremenu fermentacije
- Kestenov med značajno je slabije inhibirao rast patogene bakterije *Y. enterocolitica* u odnosu na bagremov med

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- [1] LJ. TRATNIK: Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
- [2] http://www.coolinarika.com/namirnica/mljeko#entity_nutrition_analysis (11.02.2009.)
- [3] J. HAVRANEK, V. RUPIĆ: Mlijeko od farme do mljekare. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2003.
- [4] B. MIOČ, V. PAVIĆ: Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
- [5] <http://hrcak.srce.hr/file/2725> (11.02.2009.)
- [6] R. BOŽANIĆ i sur.: Kozje mlijeko. Karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo 52* 224-228, 2003.
- [7] http://hr.wikipedia.org/wiki/Sojino_mlijeko (11.02.2009.)
- [8] R. BOŽANIĆ: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo 56*, 233- 254, 2006.
- [9] M. VRATARIĆ: Proizvodnja soje. Niro Zadrugar. Sarajevo, 1986.
- [10] http://www.Adventd.o.o.Proces_izrade_sojinog_mijeka.htm (11.02.2009.)
- [11] H. PAVLOVIĆ: Inhibitorni učin kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranih probiotičkim starterima na rast in vitro enteropatogenog soja. Festival znanosti. Osijek 2005.
- [12] <http://www.pliva.zdravlje.hr> (11.02.2009.)
- [13] <http://www.tehnologijahrane.com/mljeko/dodaci/probiotici-u-industriji-mlijeka> (11.02.2009.)
- [14] J. ŠUŠKOVIĆ, B. KOS, S. MATOŠIĆ: Probiotici: Znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo 48* 165-176, 1998.
- [15] <http://images.google.hr/images/bifidobacterium+longum> (11.02.2009.)
- [16] <http://hr.wikipedia.org/wiki/Med> (11.02.2009.)
- [17] <http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/images/yersinia-enterocolitica-C.jpg> (20.04.2009.)
- [18] <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-yersinia> (20.04. 2009.)