

**SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Maja Logožar

**STIMULACIJA RASTA MJEŠOVITE PROBIOTIČKE ABT-5
KULTURE DODATKOM RAZLIČITIH ŠEĆERA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2009.

BIBLIOGRAFSKI PODACI

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**

Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**

Znanstvena grana: **Inženjerstvo**

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

Institucija u kojoj je rad izrađen:

Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku

Laboratorij za Tehnologiju mlijeka i mlječnih proizvoda

Mentor: **Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof.**

Broj stranica: 58

Broj slika: 52

Broj tablica: 7

Datum obrane: 16. srpnja 2009.

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Dr. sc. Vedran Slačanac, doc | predsjednik povjerenstva |
| 2. Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. | član-mentor |
| 3. Dr. sc. Hrvoje Pavlović, doc. | član |
| 4. Dr.sc. Tihomir Moslavac, doc. | zamjena člana |

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta

Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Kuhačeva 20.

Tema rada prihvaćena je na 23. sjednici Odbora za diplomske ispite
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku,
održanoj 09. 07. 2007. godine.

STIMULACIJA RASTA PROBIOTIČKE ABT-5 KULTURE DODATKOM RAZLIČITIH ŠEĆERA

Sažetak

Praćenjem parametara kinetike fermentacije istražen je utjecaj dodatka saharoze, glukoze, fruktoze i smjese glukoze i fruktoze na tijek fermentacije kravlje, kozje i sojinog mlijeka mješovitom ABT-5 kulturom. Mješovita kultura sastojala se od bakterija *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. i *Streptococcus thermophilus*, a šećeri su dodavani u udjelima od 3 i 5%.

Fermentacija je vođena na 37 °C u trajanju od 6 sati, a svaki sat utvrđene su promjene aktivne kiselosti, elektrokemijskog potencijala, titracijske kiselosti i vodljivosti.

Utvrđene su značajne razlike trajanja i tijeka procesa fermentacije između tri vrste mlijeka, te različit utjecaj dodatka šećera na tijek fermentacije svih ispitivanih uzoraka. Različite vrste šećera imale su različit utjecaj ne fermentaciju pojedine vrste mlijeka s ABT-5 kulturom, što je rezultiralo i razlikama u konzistenciji fermentiranih napitaka.

Ključne riječi: kravljie, kozje i sojino mlijeko, razne vrste šećera, fermentacija, stimulacija rasta, ABT-5 kultura

STIMULATION OF THE GROWTH OF PROBIOTIC BACTERIA FROM ABT-5 CULTURE BY ADDITION OF DIFFERENT TYPES OF SUGAR

Summary

In this work, influence of addition of sucrose, glucose, fructose, as well glucose-fructose mixture on fermentation of cow, goat and soy milk with ABT-5 culture (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Streptococcus thermophilus*) was examined. All sugars were added in contents of 3 and 5 per cent. Fermentation was conducted on 37 °C for 6 hours. Changes of pH values, titration acidity and electrochemical potential during fermentation were determined. Obtained results proved significant differences in duration and occurrence of fermentation depending on type of milk, as well as on sugar addition. Different types of sugar differently influenced on fermentation of all types of milk with ABT-5 culture. Furthermore, differences in fermentation velocity influenced on differences in consistency between produced fermented beverages.

Keywords: cow milk, goat milk, sugars, fermentation, growth stimulation, ABT-5 culture

Zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Jovici Hardiju na predloženoj temi, stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se dipl. ing. Mireli Lučan, asistentici na pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Također zahvaljujem g-đi Jasni Marković na podršci koju mi je pružala tijekom svih godina studiranja.

Hvala mojim roditeljima koji su mi najviše pomogli i koji su vjerovali u mene.

Veliko hvala mom suprugu Robertu i njegovim roditeljima,
te mojem najboljem bratu Krešimiru.

Hvala svim prijateljima, kolegama i profesorima koji su bili uz mene tijekom svih ovih godina.

SADRŽAJ

	Str.
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KRAVLJE MLJEKO	4
2.1.1. Kemijski sastav kravlje mlijeka.....	4
2.2. KOZJE MLJEKO.....	5
2.2.1. Usporedba sastava kozjeg i kravlje mlijeka	6
2.3. SOJINO MLJEKO.....	7
2.3.1. Definicija i svojstva sojinog mlijeka	7
2.3.2. Kemijski sastav sojinog mlijeka.....	8
2.3.3. Razlike u sastavu kravlje i sojinog mlijeka	8
2.4. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI	10
2.4.1. Svojstva probiotičkih bakterija.....	11
2.4.2. Laktobacili.....	12
2.4.3. Bifidobakterije	14
2.4.4. Probiotičko i terapijsko djelovanje probiotičkih bakterija	15
2.5. PREBIOTICI.....	15
2.5.1. Djelovanje prebiotika	16
3. EKPERIMENTALNI DIO	18
3.1. ZADATAK RADA	19
3.2. MATERIJAL I METODE.....	19
3.2.1. Priprava uzorka.....	19
3.2.2. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala	19
3.2.3. Određivanje vodljivosti.....	20
3.2.4. Određivanje titracijske kiselosti.....	20

4. REZULTATI	21
4.1. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE KRAVLJEG MLIJEKA INOKULIRANG ABT-5 KULTUROM	22
4.2. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE KOZJEG MLIJEKA INOKULIRANOG ABT-5 KULTUROM	30
4.3. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE SOJINOG MLIJEKA INOKULIRANOG ABT-5 KULTUROM	38
5. RASPRAVA	46
5.1. PROMJENE PH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE	47
5.2. PROMJENE VRIJEDNOSTI ELEKTROKEMIJSKOG POTENCIJALA TIJEKOM FERMENTACIJE.....	50
5.3. PROMJENE TITRACIJSKE KISELOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE	51
5.4. PROMJENE VODLJIVOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE	52
6. ZAKLJUČCI	53
7. LITERATURA	55

1. UVOD

Tijekom posljednjih desetljeća, fermentirani mliječni napitci su najpopularniji komercijalni industrijski proizvodi. Dobivaju se kontroliranim procesom mliječno-kisele fermentacije koju provode mliječno-kisele bakterije. Fermentirani mliječni proizvodi su karakterističnog osvježavajućeg okusa, arome, izgleda i konzistencije, te visoko vrijednih nutritivnih svojstava. Za potrošače, posebno su popularni i zbog terapeutskih svojstava. Ta svojstva potječu od probiotičkih mikrobioloških kultura.

Probiotički fermentirani proizvodi, osim od kravljeg mlijeka, mogu se proizvoditi i od drugih vrsta mlijeka, kozjeg ili sojinog. Ovisno o vrsti mlijeka od kojeg se proizvode, fermentirani napici mogu imati različita svojstva. Kozje mlijeko fermentacijom djelomično gubi svojstven okus i intenzivnu aromu, koja je neprihvatljiva mnogim potrošačima, pa fermentacija kozjeg mlijeka probiotičkim bakterijskim kulturama uz dodatak prebiotika može dati proizvod velike nutritivno-zdravstvene vrijednosti.

Populaciji koja ne može konzumirati mlijeko, unos probiotičkih bakterija omogućava se probiotičkim fermentiranim napitkom od sojinog mlijeka. Dodatkom aroma ili voćnih prerađevina, okus ovog proizvoda može postati prihvatljiv i širem krugu potrošača.

Probiotici su kulture živih mikroorganizama koji pozitivno djeluju na domaćina. Probiotici pomažu očuvanju mikroflore u crijevima, zaštićuju organizam od bolesti i pospješuju rad imunološkog sustava.

Fermentiranim mliječnim proizvodima dodaju se i prebiotici, da bi se osiguralo dovoljno nutrijenata probiotičkim kulturama. Većina prebiotika su ugljikohidrati bazirani na oligosaharidima. Bakterije mliječne kiseline proizvode egzopolisaharide koji mogu djelovati kao prebiotici.

Cilj ovog rada bio je ispitati na koji način različiti šećeri u niskim različitim dodanim udjelima 3% i 5%, stimuliraju rast probiotičke ABT-5 kulture u kravljem, kozjem i sojinom mlijeku. Tijekom cijelokupnog trajanja fermentacije praćene su promjene pH-vrijednost, elektrokemijskog potencijala, titracijske kiselosti i vodljivosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KRAVLJE MLJEKO

Mlijeko je biološka tekućina složena sastava, karakterističnog okusa i mirisa, žućkasto-bijele boje, koju izlučuje mliječna žljezda ženki sisavaca.

Pod pojmom mlijeko uvijek se podrazumijeva kravlje mlijeko, dok se za sve ostale vrste mlijeka, kao i za proizvode mora deklarirati na ambalaži [1].

Prema Pravilniku, sirovo mlijeko je prirodni sekret mliječne žljezde, dobiveno redovitom i neprekidnom mužnjom jedne ili više zdravih muznih životinja, pravilno hranjenih i držanih, kojem nije ništa dodano niti oduzeto i nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C [2].

2.1.1. Kemijski sastav kravljeg mlijeka

Mlijeko se može smatrati emulzijom ili suspenzijom mliječne masti u vodi, u kojoj se nalazi niz otopljenih tvari kao što su lakoza i topljive mineralne tvari u obliku soli, te tvari u koloidnom obliku, proteini.

Sastav mlijeka može biti vrlo promjenjiv, a ovisi o velikom broju čimbenika: pasmini i zdravstvenom stanju životinja, stadiju laktacije, načinu i vrsti hranidbe, sezoni, vrsti mužnje (ručna, strojna), o dobi i broju mužnje, te naposljetku o samoj jedinki (tjelesna masa, kretanje) [1].

Tablica 1 Udio glavnih sastojaka u svježem mlijeku [1]

Sastojak	Maseni udio [%]
Voda	86,0-89,0
Suha tvar	11,0-14,0
Mast	3,2-5,5
Proteini	2,6-4,2
Lakoza	4,6-4,9
Mineralne tvari	0,6-0,8

Mliječna mast je sastojak najpromjenjivijeg udjela od 2,5 do 6,0%. Utječe na okus, aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Od šećera, lakoza je prisutna u udjelu od 4,6-4,9%. Potpomaže peristaltiku crijeva, lako je probavljiva. Od ukupnih dušičnih tvari u mlijeku se nalazi oko 95% proteina i 5% neproteinskih tvari s dušikom (mali peptidi, slobodne aminokiseline, kreatin, aminošećeri, kreatinin, urea, urična kiselina, amonijak). Proteine mlijeka čine dva glavna tipa potpuno različitih proteina (kazein i proteini sirutke) u omjeru 80:20%. Koagulacija kazeina provodi se djelovanjem kiseline ili enzima, a koagulacija proteina sirutke djelovanjem topline. U mlijeku su prisutni endogeni enzimi koji potječu iz mliječne žlijezde i egzogeni koji potječu od mikroorganizama i ne smatraju se normalnim sastojkom mlijeka. Najzastupljeniji enzimi su: lipaze, fosfataze, peroksidaza, katalaza, reduktaza, proteinaza. Mineralne tvari (oko 40 različitih) dolaze u mlijeku kao mikroelementi i makroelementi. Mikroelementi (Zn, Br, Al, Se, Fe, Cu, F, Mo i dr.) su prisutni u tragovima, te imaju fiziološku, biokemijsku i hranjivu važnost. Makroelementi se nalaze u obliku organskih i anorganskih soli, najvažnije su kalcijeve i fosforne soli. Bitan je odnos mineralnih tvari u mlijeku, posebno Ca i P budući da ih ljudski organizam može dobro iskoristiti [1].

2.2. KOZJE MLJEKO

Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih, pravilno uzgojenih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog (kozjeg) mirisa [3].

Kozje mlijeko je od davnina smatrano proizvodom koji blagotvorno djeluje na zdravlje ljudi, a u novije vrijeme istraživači ukazuju i na proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka od kozjeg mlijeka koji su u usporedbi s kravljim veće nutritivne vrijednosti [4,5,6].

Kozje mlijeko pridonosi liječenju plućnih bolesti, raznih želučanih i crijevnih tegoba. Pored toga, smatra se da kozje mlijeko ima izražen utjecaj na sprječavanje nastanka karcinoma [7,8].

2.2.1. Usporedba sastava kozjeg i kravljeg mlijeka

Kozje mlijeko je probavljivije od kravljeg, stoga se preporuča u ishrani mlađih i starijih osoba, a posebno osoba koje su alergične na proteine kravljeg mlijeka [1]. Masne kapljice u kozjem mlijeku su manjeg promjera i bolje raspršene od masnih kapljica u kravljem mlijeku, što čini emulziju masti u kozjem mlijeku stabilnijom [9]. Usljed toga, veća kontaktna površina masnih kapljica kozjeg mlijeka omogućava lakši kontakt s enzimima probavnog sustava, što povećava probavljivost kozjeg u usporedbi s kravljim mlijekom [10].

Uspoređujući nutritivnu vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka, najznačajnija je razlika u sastavu masnih kiselina. Kozje mlijeko sadrži znatno više nisko i srednje lančanih masnih kiselina koje su probavljivije u usporedbi s dugo lančanima [11].

Kozje mlijeko sadrži i veći udio (20%) hlapivih masnih kiselina (kapronska, kaprilna i kaprinska), u usporedbi s 12% u kravljem mlijeku, a karakterističan "kozji okus" kozjem mlijeku daje frakcija slobodnih masnih kiselina unutar lipida.

Iako nema značajnije razlike u energijskoj vrijednosti između kozjeg i kravljeg mlijeka, kozje mlijeko je biološki vrjednije. Biološku vrijednost kozjeg mlijeka povećavaju nezasićene masne kiseline (linolna, linolenska i arahidonska) [7].

Za razliku od kravljeg mlijeka, kozje mlijeko ima znatno veći udio biološki najvrjednijih proteina sirutke (osobito albumina). Kozji α -laktoalbumin je siromašniji metioninom u odnosu na kravljii. U kozjem mlijeku κ -kazein ima dva kiselinska ostatka više (171:169) nego u kravljem. Za razliku od kravljeg, u kozjem mlijeku β -kazein je kvantitativno najzastupljeniji [10].

Kozje mlijeko sadrži veći udio esencijalnih aminokiselina (za približno 9%); Veći udio topljivog Ca, Mg, anorganskog P, kao i Fe, koji se nalazi u obliku bolje bio iskoristivosti nego u kravljem mlijeku [1]. Sadrži velik udio vitamina A, jer se u mliječnoj žljezdi koza sav β -karoten iz hrane transformira u vitamin A. U usporedbi s kravljim, kozje mlijeko sadrži više nikotinske kiseline, a nedostaje folne kiseline [11]. Pored bolje probavljivosti i nutritivne vrijednosti, kozje mlijeko ima bolje izražene i terapeutske vrijednosti u usporedbi s kravljim mlijekom [11, 12].

Tablica 2 Usporedba sastava kozjeg i kravljeg mlijeka [13]

Parametar	Kozje mlijeko	Kravljie mlijeko
Ukupna suha tvar	11,94%	12,89%
Mliječna mast	3,60%	4,10%
Proteini	3,10%	3,38%
Laktoza	4,60%	4,60%
Mineralne tvari	0,77%	0,79%
Kolesterol	10,00 mg/100 g	13,00 mg/100 g
Energijska vrijednost	293,10 kJ/100 ml	288,90 kJ/100 ml
Slobodne masne kiseline	8,10 mg/l	7,50 mg/l

2.3. SOJINO MLJEKO

2.3.1. Definicija i svojstva sojinog mlijeka

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 [14].

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, voden ekstrakt sojinog zrna. To je bjelkasta emulzija/suspenzija koja sadrži u vodi topljive proteine i ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u sojinom zrnu. Grašast, sirov okus najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka. Taj nepoželjni okus potječe od nekih aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom višenezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksiigenaza [15].

Tih sastojaka nema u neoštećenom, suhom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrnje smoči i melje [16].

2.3.2. Kemijski sastav sojinog mlijeka

Sojino mlijeko bez dodataka izvrstan je izvor visokovrijednih proteina, vitamina i minerala, izvor kalcija, vitamina D i B₁₂. Nema kolesterola niti lakoze i ima vrlo niski udio zasićenih masti (0,34%) [17].

Tablica 3 Sastav sojinog mlijeka [17]

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

2.3.3. Razlike u sastavu kravlje i sojinog mlijeka

Sojino i kravljie mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih osobina, osim velikog udjela visokovrijednih proteina. Sojino mlijeko obično sadrži više vode od kravlje mlijeka, a i ostali sastojci se znatno razlikuju [18].

Proteine kravlje mlijeka čini pretežno kazein, a proteine sojinog mlijeka čini pretežno glicinin i u manjoj mjeri neke druge proteinske frakcije. Poznata manja proteina sojinog mlijeka je nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistin.

Ugljikohidrati u kravljem mlijeku isključivo su u obliku lakoze, dok su u sojinom mlijeku oligosaharidi stahioza i rafinoza. Iako kravljie mlijeko sadrži znatno veće količine kalcija i fosfora, ono je vrlo siromašno željezom (oko 1 mg/l). Sojino mlijeko sadrži oko 10 puta veću količinu željeza u odnosu na kravljie, ali je njegova bioiskoristivost manja zbog prisutnih fitata koji vežu mineralne tvari [17].

Kravljie mlijeko sadrži kolesterol, lakozu i ne sadrži dijetalna vlakna, dok sojino mlijeko sadrži 1,3 % vlakana, a nema kolesterola niti lakoze. Oba mlijeka sadrže

puno proteina s kompletnim rasponom potrebnih aminokiselina, ali sojino mlijeko sadrži veće udjele arginina, alanina, glicina i asparaginske kiseline.

Arginin usporava rast tumornih stanica jačanjem imunološkog sustava, alanin pomaže metabolizmu šećera, asparaginska kiselina povećava izdržljivost organizma i kao antioksidans ima vitalnu ulogu u metabolizmu, a glicin je neophodan za održavanje funkcija mozga i živčanog sustava, te za proizvodnju energije u mišićima. Procesima prerade i pasterizacije uništava se gotovo sav vitamin C u kravljem mlijeku. Isto možemo reći i za sojino, ali zato ono sadrži preko četiri puta više tiamina (vitamin B₁) i skoro dva puta više niacina od kravljeg mlijeka. Sojino mlijeko, osim toga, sadrži i 12 puta više bakra te 42 puta više mangana i magnezija nego kravje mlijeko. Tako visok udio vrijednih nutrijenata daje sojinom mlijeku, u zdravstvenom smislu, neke prednosti nad kravljim mlijekom [19].

Tablica 4 Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka [19]

Nutritivna vrijednost 100 g	Kravje mlijeko		Sojino mlijeko
	punomasno	djelomično obrano	
Proteini	3,4 g	3,5 g	3,6 g
Masti	3,5 g	1,5 g	2,3 g
Ugljikohidrati	4,6 g	5,4 g	3,4 g
kJ	269	208	204
kcal	64	49	49
Kolesterol	10 mg	5 mg	0
Sastav masnih kiselina			
Zasićene	63,5%	63,5%	14,0%
Polinezasićene	3,0%	3,0%	63,5%
Mononezasićene	33,5%	33,5%	21,6%

Danas je velik broj djece alergičan na kravje mlijeko, te se sojino mlijeko prvenstveno koristi kao zamjena za kravje [17]. Smatra se da proizvodi od soje imaju potencijalnu ulogu u sprječavanju kroničnih bolesti kao što je ateroskleroza, rak, osteoporozu i poremećaji u menopauzi [20].

Zbog toga je sojino mlijeko fermentirano probiotičkim bakterijama mliječne kiseline višestruko funkcionalna hrana.

2.4. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI

Probiotici potječu uglavnom iz grupe bakterija koje se zovu bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije koje inače čine normalnu, uobičajenu intestinalnu mikrofloru ljudi [21].

Probiotičke kulture za proizvodnju fermentiranih napitaka sastavljene su od pojedinih vrsta bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium*, izoliranih iz probavnog sustava ljudi [1].

Tablica 5 Vrste rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* izolirane iz ljudskog organizma [22]

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. angulatum</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i> subs. <i>casei</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. catenulatum</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. dentium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. globosum</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. oris</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. parabuchneri</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
<i>L. paracasei</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius</i>	
<i>L. vaginalis</i>	

Probiotici su: "Živi mikroorganizmi koji konzumirani u određenom broju (najmanje 10^9 CFU po danu) uzrokuju zdravstveni boljitet iznad granica normalne prehrane" [23].

2.4.1. Svojstva probiotičkih bakterija

Kao najčešće korišteni probiotici su još uvijek *Lactobacillus acidophilus* i bakterije roda *Bifidobacterium* [24].

Probiotički mikroorganizmi moraju podnosići djelovanje želučane kiseline i žučnih soli u probavnom sustavu ljudi za razliku od "tradicionalnih" mlijekočnih starter kultura, te kolonizirati debelo crijevo [23]. Oni moraju zadovoljiti vrlo kompleksne opće, tehnološke i funkcionalne zahtjeve, prije unošenja u humani organizam.

Tablica 6 Zahtjevi za izbor probiotičkih sojeva [25]

Opći zahtjevi	Točna taksonomska identifikacija
	Humano podrijetlo za humane probiotike
	Netoksičnost i nepatogenost
	Genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)
	Otpornost prema žučnim kiselinama
	Otpornost prema niskim pH vrijednostima
Tehnološki zahtjevi	Stabilnost poželjnih karakteristika tijekom priprave kulture, skladištenja i isporuke
	Visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 ml $^{-1}$ ili g $^{-1}$), npr. 100 g proizvoda osigurava 10^8 – 10^{10} živih stanica
	Brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, zamrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa priprave probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
	Dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese
Funkcionalni zahtjevi	Sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolička aktivnost u "ciljanom" području primjene u organizmu
	Sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
	Producija antimikrobnih supstanci, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline
	Antagonistička aktivnost prema patogenim i kriogenim bakterijama

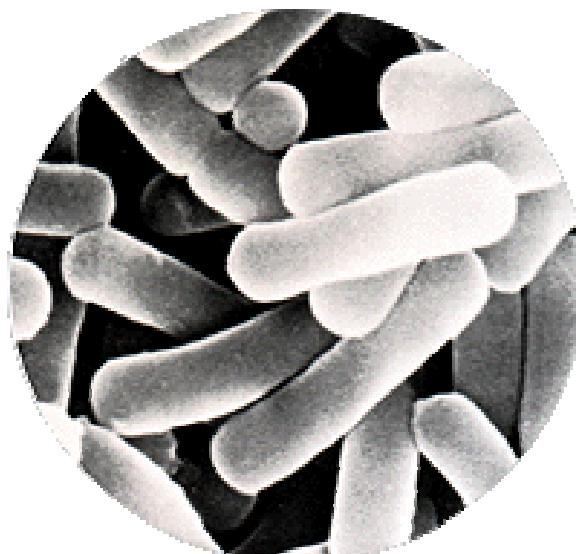
Iako je došlo do prave poplave znanstvenih studija o ljekovitoj djelotvornosti bakterija mlijecne kiseline iz fermentiranih mlijeka, sve do prve polovice prošlog stoljeća nije se znalo da *Lactobacillus acidophilus* bolje kolonizira ljudski probavni trakt i tamo se razmnožava za razliku od bakterija standardnih jogurtnih kultura *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* [23].

2.4.2. Laktobacili

Vrsta *Lactobacillus acidophilus* smatra se jednom od najznačajnijih probiotičkih bakterija roda *Lactobacillus* [22].

Lactobacillus acidophilus:

- izolirana iz probavnog trakta
- striktno homofermentativna
- mikraerofilna (niska koncentracija kisika)
- pojedinačni štapići, oblik štapića: 0,6 do 0,9 µm x 1,5 do 6,0 µm
- tvori dugačke lance
- bolje iskorištava saharozu u odnosu na laktozu
- dobro podnosi kiselu sredinu
- dobro raste kod pH > 4
- proizvodi mlijecnu kiselinu, vitamine, folnu kiselinu te antibiotike



Slika 1 Lactobacillus acidophilus [26]

Lactobacillus acidophilus i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se koriste u proizvodnji acidofilnog mlijeka, inokuliraju se u sterilno mlijeko, a fermentacija se odvija kod 37 °C i traje sve dok se mlijeko ne zgruša [27].

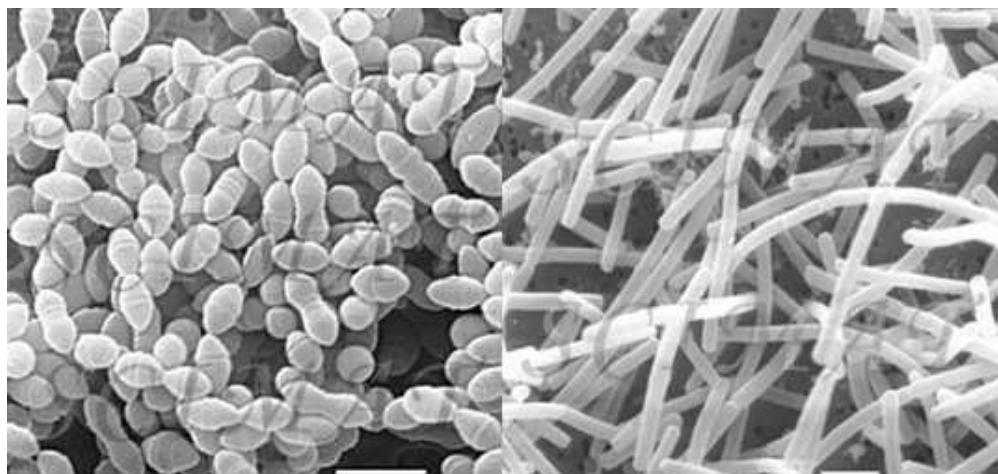
Laktobacili su G +, nesporogeni, neflagelirani štapići ili kokobacili. Mogu biti aerotoleranti ili anaerobi, sa striktnim fermentativnim metabolizmom [22]. Klasična podjela laktobacila zasniva se na njihovim fermentacijskim karakteristikama:

1. obvezno homofermentativnim
2. fakultativno heterofermentativnim
3. obvezno heterofermentativnim [28]

Iako su probiotička svojstva bakterija *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. dobro poznata zbog prilično sporog rasta tih bakterijskih kultura u mlijeku ove bakterije nisu poželjne u mljekarskoj industriji, osobito zbog nedostatka okusa nastalog proizvoda. Da bi to izbjegli, u praksi se vrlo često te probiotičke bakterije kombiniraju s tipičnim mljekarskim bakterijama, najčešće s bakterijama jogurtne kulture, kako bi se skratio vrijeme fermentacije i poboljšao okus proizvoda. Najčešće se koristi mješovita kultura s bakterijom *Streptococcus thermophilus* kao što je ABT-5 kultura [29].

Streptococcus thermophilus – homofermentativna bakterija

Najčešće se koriste vrste: *thermophilus*, *lactis*, *diacetylactis*. One uglavnom stvaraju mliječnu kiselinu. Njihovo jako kiseljenje i razlaganje proteina najčešće omogućuje rast bakterija koje tvore aromu [30].



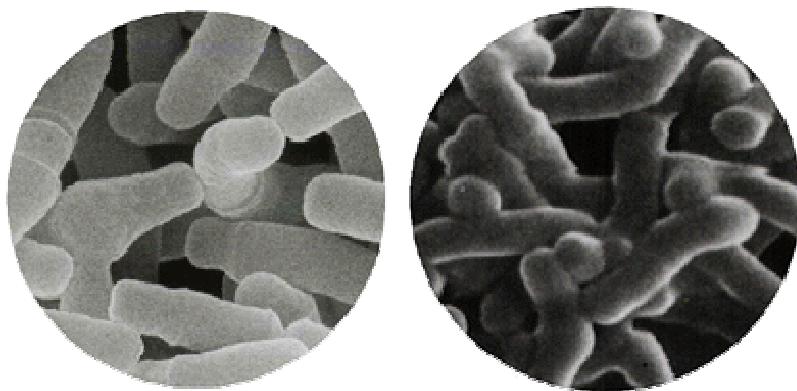
Slika 2 *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* [31]

Popularnost fermentiranih mliječnih napitaka raste, ne samo zbog njihovog mirisa i okusa, već zbog njihovog zdravstvenog učinka. On je povezan sa probiotičkim bakterijama i istraživanja na tom području pridonijela su komercijalnoj proizvodnji startera s probiotičkim bakterijama i proizvodnju široke palete različitih fermentiranih mliječnih proizvoda koji sadrže probiotičke bakterije [27].

2.4.3. Bifidobakterije

Bifidobakterije su štapićaste, fakultativno anaerobne, termofilne, G+, nepokretne, nesporogene bakterije, od kojih je iz ljudskog organizma (usne šupljine, fecesa i vagine) izolirano deset vrsta prikazanih tablicom 5 [22,1].

Bifidobakterije su osobito dominantan bakterijski rod prisutan u debelom crijevu zdravih ljudi [32].



Slika 3 *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium bifidum* [33]

Optimalno rastu pri pH 6 do 7. A 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 [22].

Zbog povoljnog učinka na crijevnu populaciju, vrste *B. longum*, *B. bifidum* i *B. lactis*, koriste se u fermentaciji mliječnih proizvoda i farmaceutskih pripravaka [34].

Potrebno je napomenuti kako svaka vrsta (ali i soj) bifidobakterija posjeduje jedinstvena tehnološka svojstva: brzinu rasta, proizvode metabolizma, proteolitičku aktivnost i aromu fermentiranog proizvoda [22].

2.4.4. Probiotičko i terapijsko djelovanje probiotičkih bakterija

Smatra se da fermentirani proizvod mora sadržavati minimalno 10^6 živih stanica u 1 ml da bi imao terapijska svojstva. Ako se dulje vrijeme unosi u ljudski organizam dovoljno velik broj živih bakterija mliječne kiseline, osobito onih izoliranih iz probavnog sustava, može se očekivati pozitivan učinak na zdravlje [1].

Tablica 7 Probiotička i terapijska svojstva fermentiranih mlijeka s bakterijama mliječne kiseline probavnog sustava [1]

Svojstva	Mehanizam djelovanja
Održavanje normalne mikroflore probavnog sustava	-proizvodnja inhibitora za nepoželjnu mikrofloru -stimulacija imunosustava
Poboljšanje probave laktoze	-smanjenje udjela laktoze u proizvodu -razgradnja laktoze pomoću bakterijske β -galaktozidaze
Antikancerogena aktivnost	-uklanjanje prokarcinogena -stimulacija imunosustava
Smanjenje količine kolesterola	-još nedovoljno istraženi uzorci
Nutritivno poboljšanje	-sinteza vitamina B-kompleksa -povećanje apsorpcije kalcija
Poboljšanje bubrežne funkcije	-uklanjanje toksičnih amina

2.5. PREBIOTICI

Za povećanje broja probiotičkih bakterija u probavnom sustavu, stimulaciju rasta i metaboličku aktivnost probiotičkih bakterija, jogurtu se dodaju i prebiotici [35,36].

Jedan od najpopularnijih prebiotika je inulin. Pomaže olakšavanju začepljenosti, boljoj apsorpciji kalcija i magnezija, stimulaciji imunosustava, sprječavanju intestinalnih infekcija, a moguća je i prevencija karcinoma. U prebiotike se još ubrajaju i fruktooligosaharidi i galaktooligosaharidi [37].

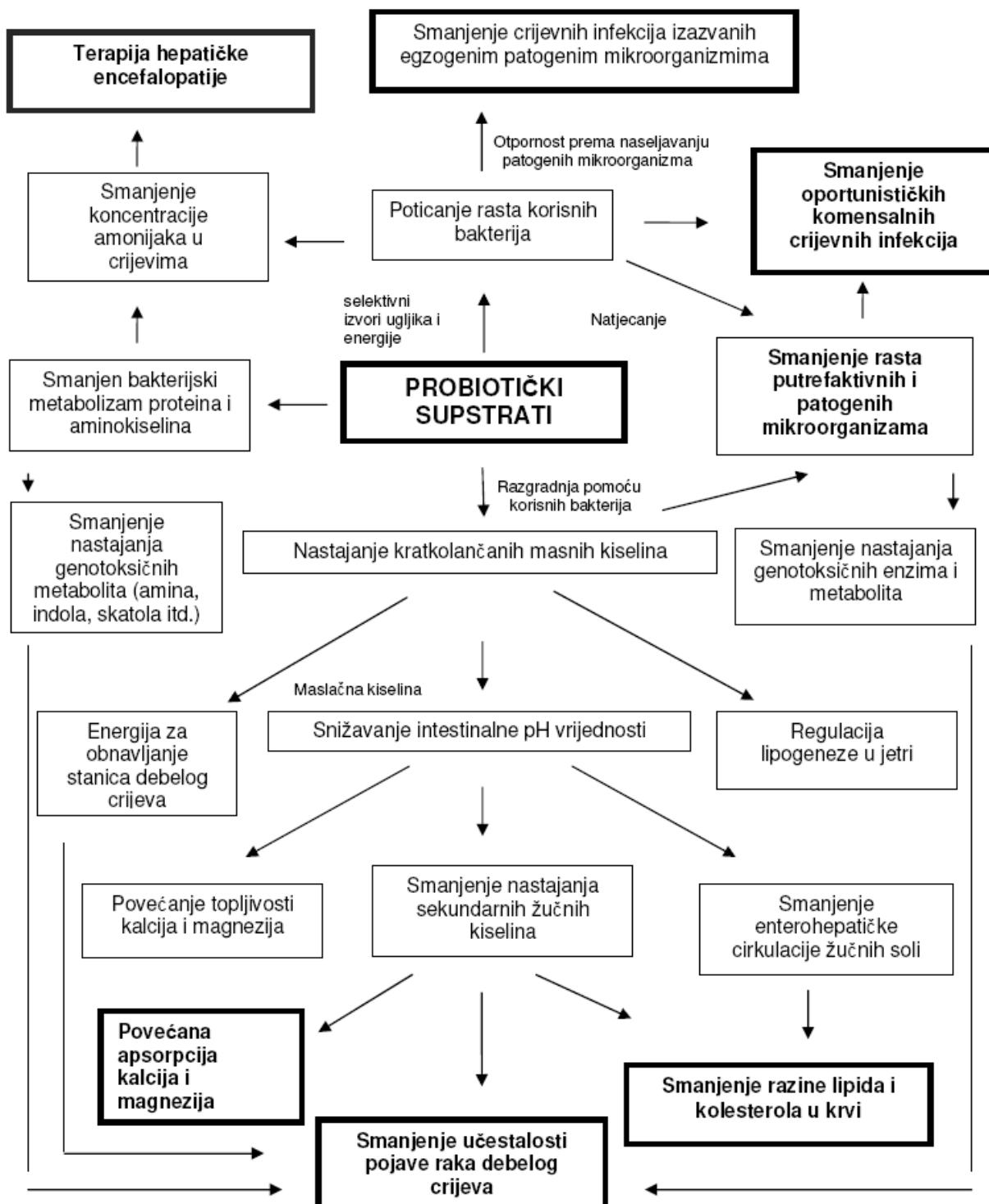
Prebiotici se definiraju kao neprobavljivi sastojci hrane, koji u nepromijenjenom obliku dospijevaju u debelo crijevo, i povoljno djeluju na rast i/ili aktivnost jedne ili više bakterijskih vrsta i time imaju povoljan zdravstveni učinak [38]. Jednostavno rečeno, oni su hrana za probiotike [39].

2.5.1. Djelovanje prebiotika

Prebiotici prolaze kroz želudac i tanko crijevo nepromijenjeni i tek u debelom crijevu podliježu potpunoj fermentaciji od strane točno određenih bakterija (bifidobakterije, laktobacili). Anaerobnom fermentacijom prebiotika nastaju kratkolančane masne kiseline (octena, propionska i maslačna) koje snižavaju pH u debelom crijevu i time onemogućuju rast nepoželjnih bakterija, a pospješuju rast svih pozitivnih bakterija, od kojih se izdvajaju bifidobakterije kao najvažnije. Osim toga kratkolančane masne kiseline imaju važnu, pozitivnu ulogu za optimalan rad epitelnih stanica kolona i apsorpciju iona kalcija, magnezija i željeza. Osim ovog jedinstvenog učinka prebiotika, prebiotici potiču rast svih pozitivnih bakterija. Bifidobakterije (dominantna mikroflora probavnog trakta u novorođenčadi) su nepobitno važne za razvoj imunološkog sustava u djece, a time i vrlo važne u prevenciji i/ili liječenju mnogih bolesti (akutni proljev u djece, crijevne infekcije) [38].

Kombinacija probiotičkih mikroorganizama i prebiotičkih sastojaka hrane poznata je pod imenom sinbiotik [23]. Ta kombinacija može stabilizirati i/ili poboljšati probiotički učinak pa su sinbiotici koristan biološki pripravak u prevenciji gastrointestinalnih bolesti ljudi ili životinja [40].

Prikladno formulirani sinbiotički pripravci su prehrabeni proizvodi visokog potencijala, koji na različite načine pozitivno utječu na zdravlje čovjeka, i temelj su funkcionalne hrane [41].



Slika 4 Predloženi mehanizmi korisnog djelovanja prebiotika na zdravlje [32]

3. EKPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak istraživanja u ovom radu bio je:

- Proizvesti fermentirani probiotički napitak od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka uz dodatak šećera: saharoze, glukoze i fruktoze i smjese glukoze i fruktoze
- Tijekom fermentacije svakih sat vremena utvrditi pH vrijednost, elektrokemijski potencijal, titracijsku kiselost i vodljivost.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprava uzoraka

Za pripremu uzoraka jogurta korišteno je tri vrste UHT steriliziranog mlijeka. Kravje mlijeko, homogenizirano i djelomično obrano s udjelom mliječne masti od 2,8% (proizvođač "Vindija", Varaždin), kozje mlijeko s 3,2% mliječne masti (proizvođač "Vindija", Varaždin) i sojino mlijeko s 2,2% mliječne masti (proizvođač "Alpro Soya", Austrija).

U čaše od 300 ml odvagano je 10,5 g i 17,5 g šećera saharoze, glukoze, fruktoze te smjesa glukoze i fruktoze u omjeru 50:50, dodano je mlijeko i zagrijano na 37 °C. Poslije zagrijavanja mlijeko je inokulirano ABT-5 kulturom (bakterije *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. i *Streptococcus thermophilus*), (CHR. HANSEN, Danska).

Inokulirani uzorci fermentirani su u termostatu na 37 °C u trajanju od 6 sati. Od svih vrsta mlijeka fermentirane su i "slijepe probe" (mlijeko bez dodataka).

3.2.2. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala

Za određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala, koristio se pH-metar (METTLER TOLEDO, MA 235 pH/Ion Analyzer), elektrodom Inlab 413 istog proizvođača. Prije mjerjenja pH metar je baždaren puferima poznate pH-vrijednosti. Nakon uranjanja elektrode u uzorak, na uređaju su očitane vrijednosti pH i elektrokemijskog potencijala. pH i elektrokemijski potencijal fermentiranih mlijeka određivan je svakih sat vremena tijekom fermentacije.

3.2.3. Određivanje vodljivosti

Za određivanje vodljivosti koristio se uređaj Seven Multi (METTLER TOLEDO), elektrodom Inlab 720 istog proizvođača. Prije mjerena uređaj je baždaren standardima. Vodljivost je određivana na početku, te svakih sat vremena tijekom fermentacije sve do završetka fermentacije.

3.2.4. Određivanje titracijske kiselosti

Za određivanje titracijske kiselosti koristila se metoda po Soxhlet–Henkelu. 10 ml uzorka fermentiranog mlijeka preneseno je u Erlenmeyerovu tikvicu i razrijeđeno sa 10 ml destilirane vode. Dodano je nekoliko kapi fenolftaleina i titrirano sa 0,1 mol/dm³ otopinom NaOH uz stalno miješanje, do pojave ružičaste boje. Iz utroška lužine izračunava se °SH.

Kiselost je prema ovoj metodi izračunata po formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times F \times 2$$

gdje je:

$^{\circ}\text{SH}$ = stupanj kiselosti po Soxhlet–Henkelu

a = ml 0,1 M otopine NaOH utrošenih za neutralizaciju 10 ml uzorka

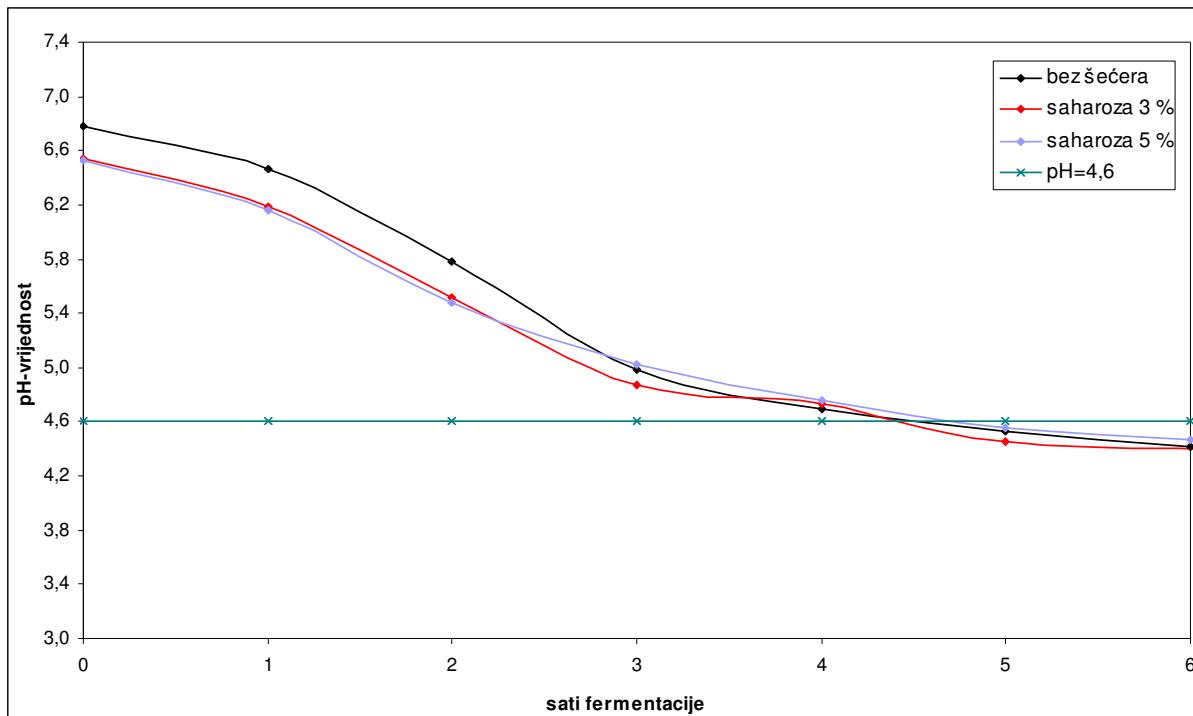
F = faktor molariteta 0,1 mol/dm³ otopine NaOH

Koncentracija mliječne kiseline (MK) određena je prema formuli:

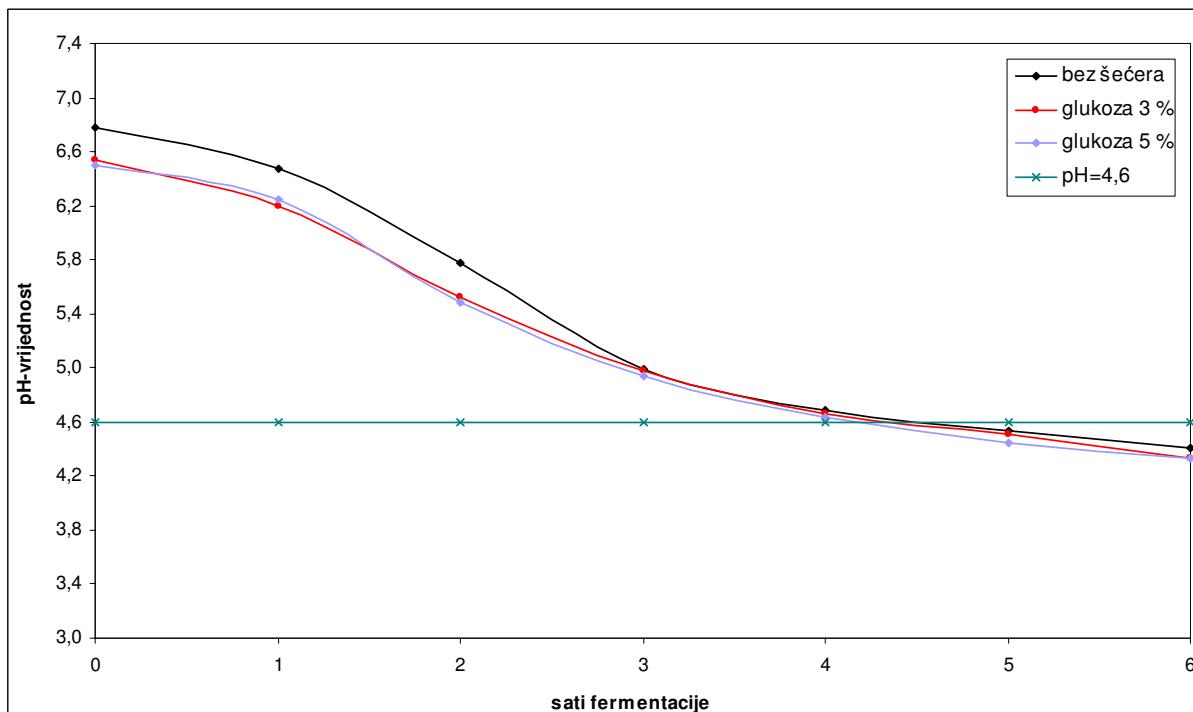
$$\% \text{MK} = 0,0225 \times ^{\circ}\text{SH}$$

4. REZULTATI

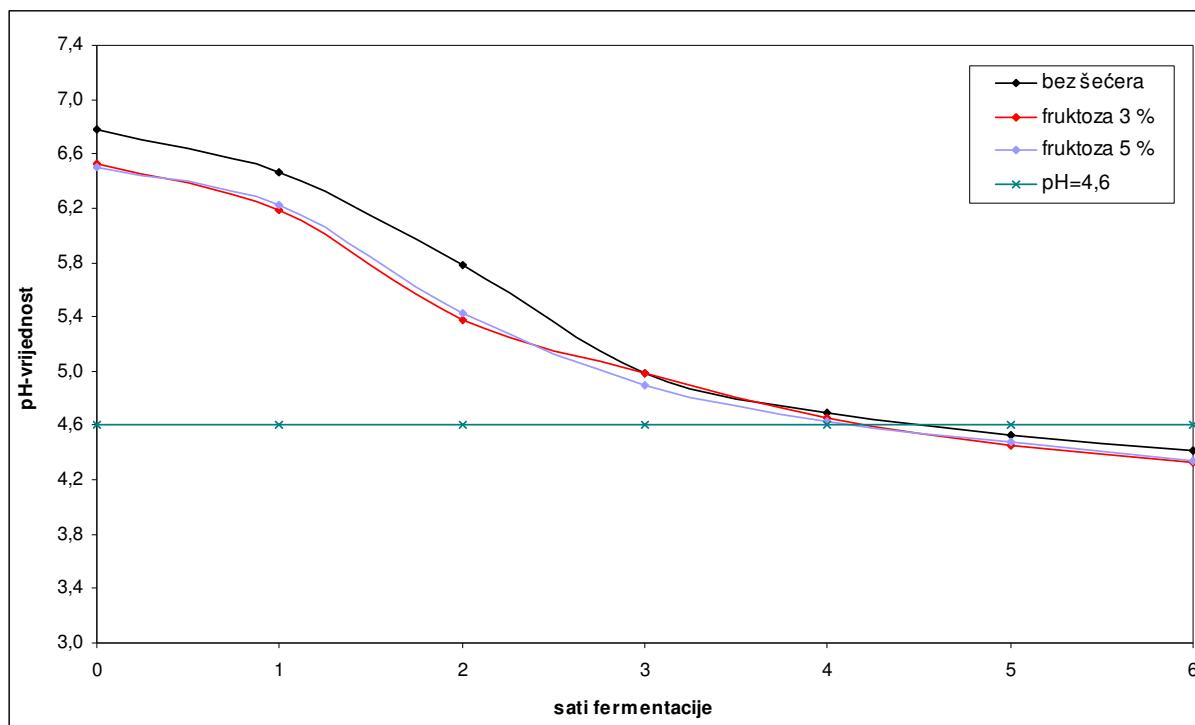
4.1. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE KRAVLJEG MLJEKA INOKULIRANG ABT-5 KULTUROM



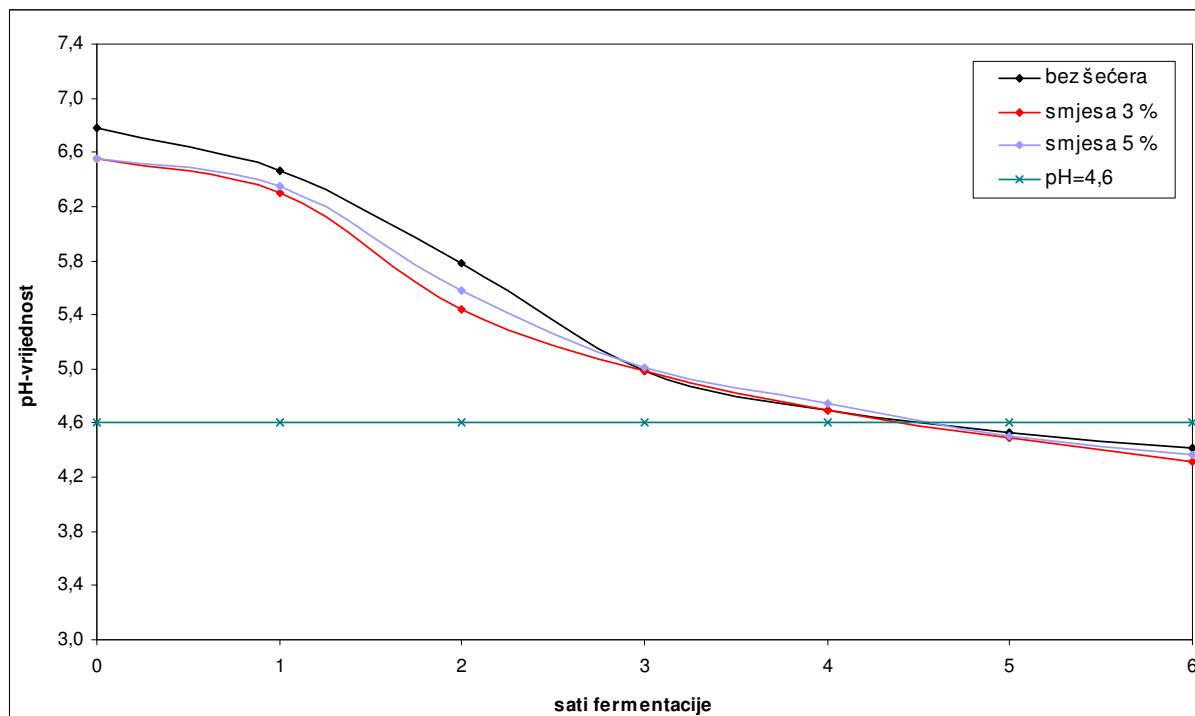
Slika 5 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



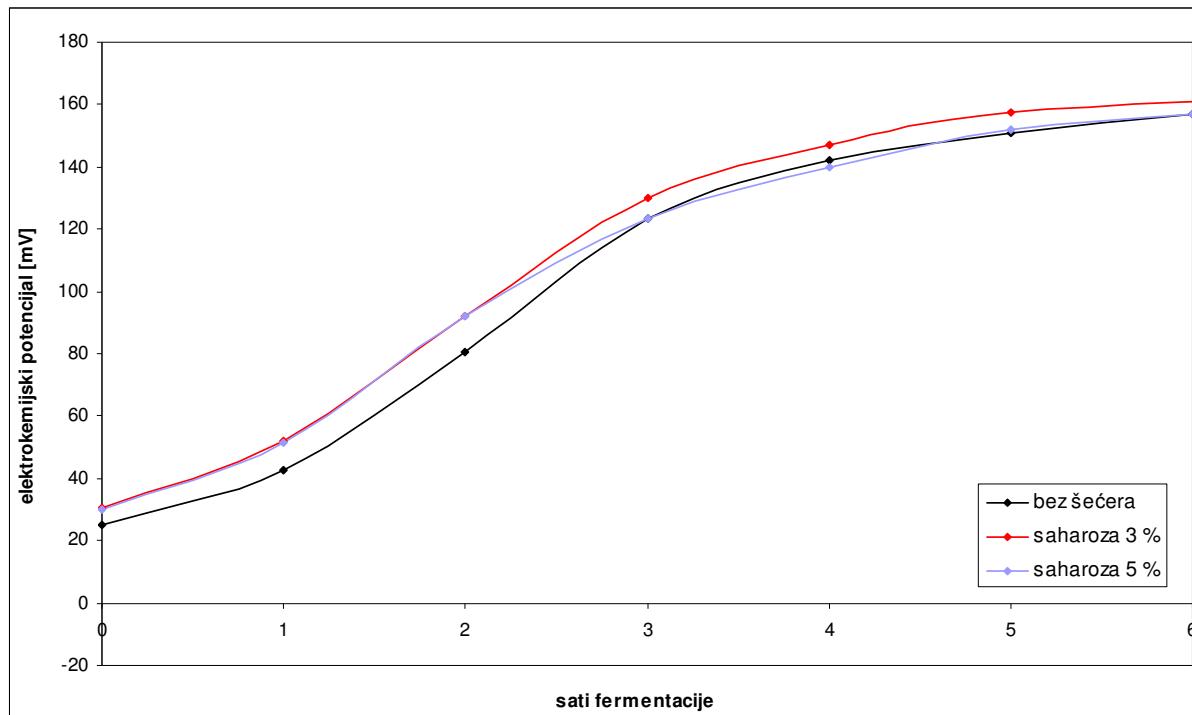
Slika 6 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



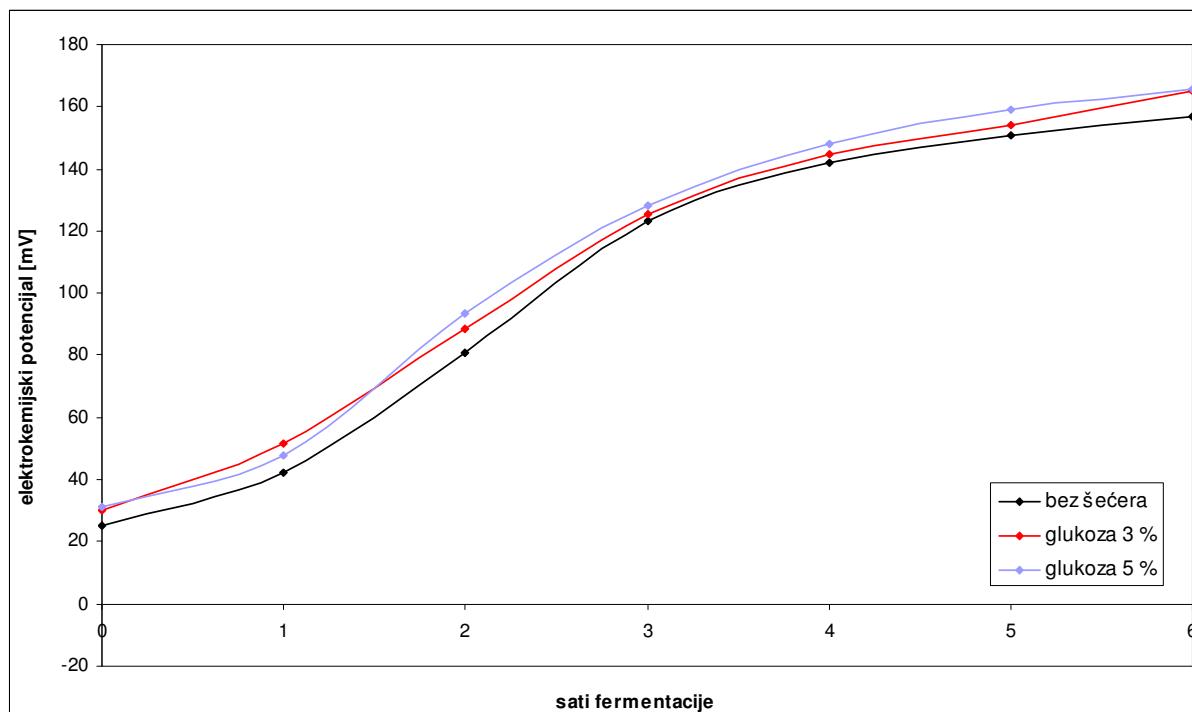
Slika 7 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



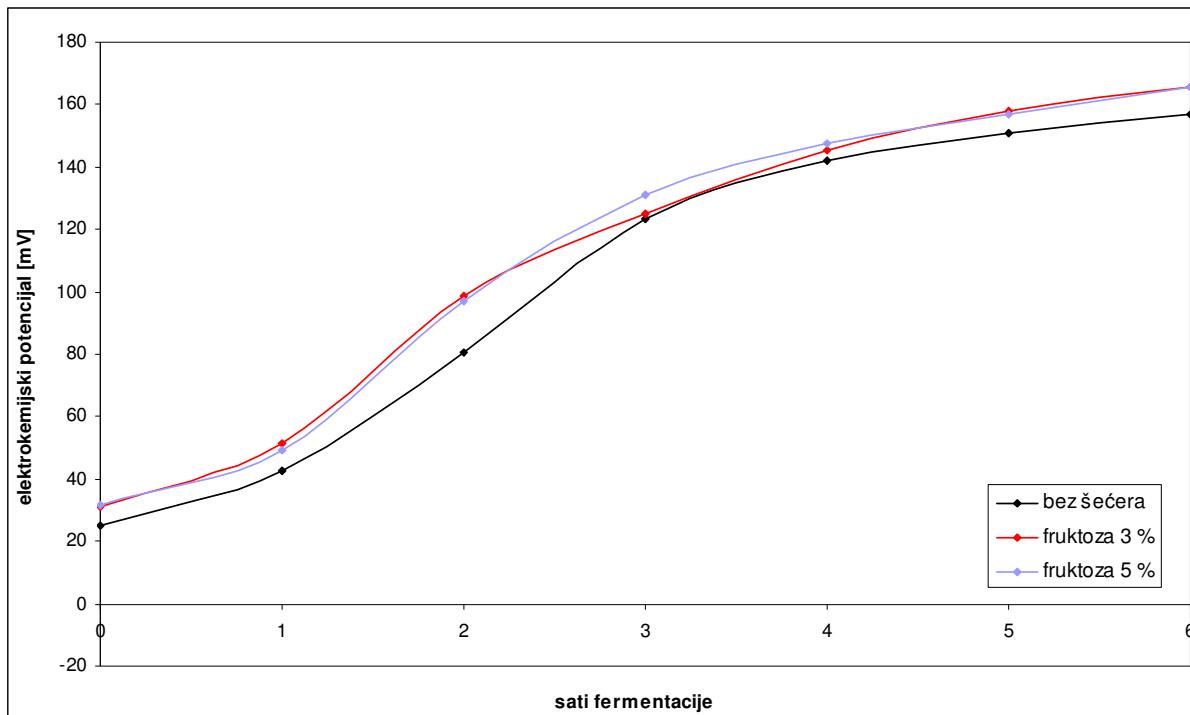
Slika 8 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



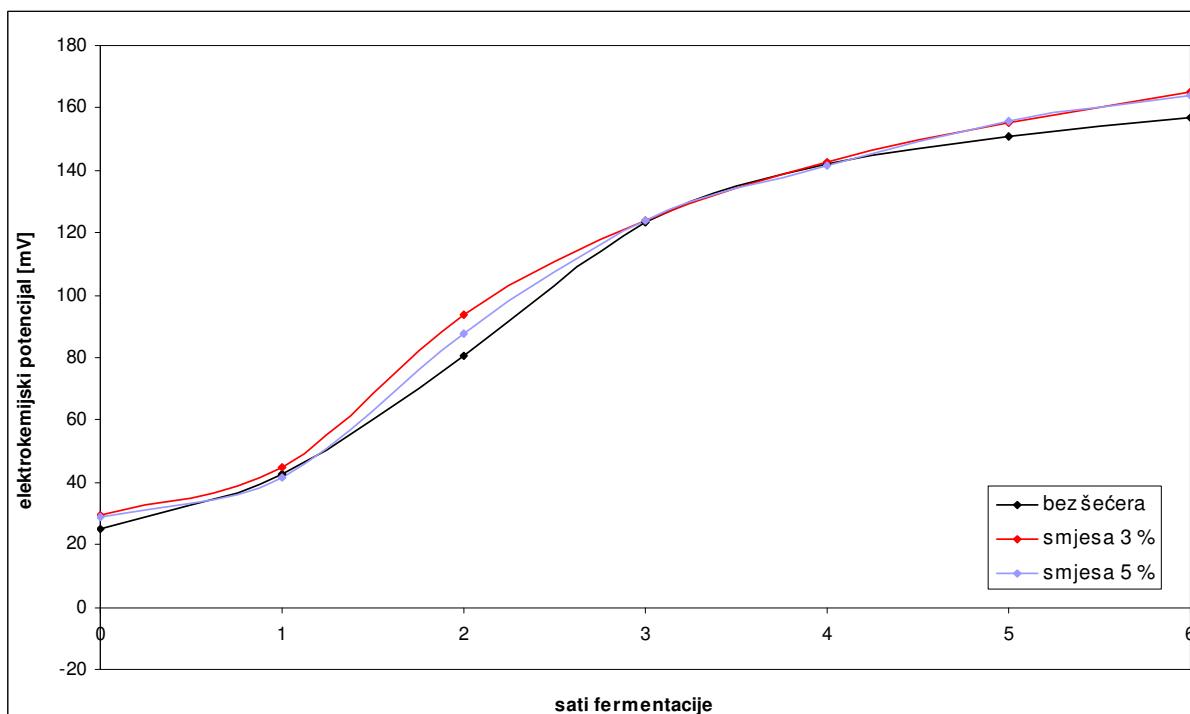
Slika 9 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



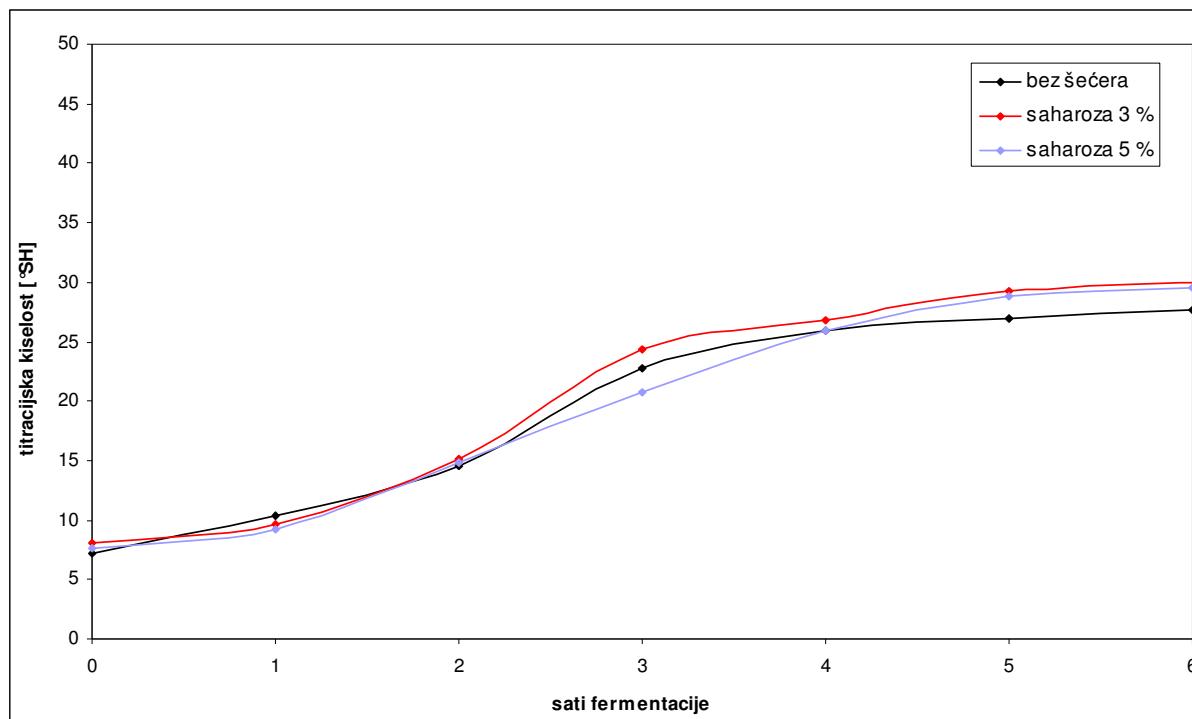
Slika 10 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



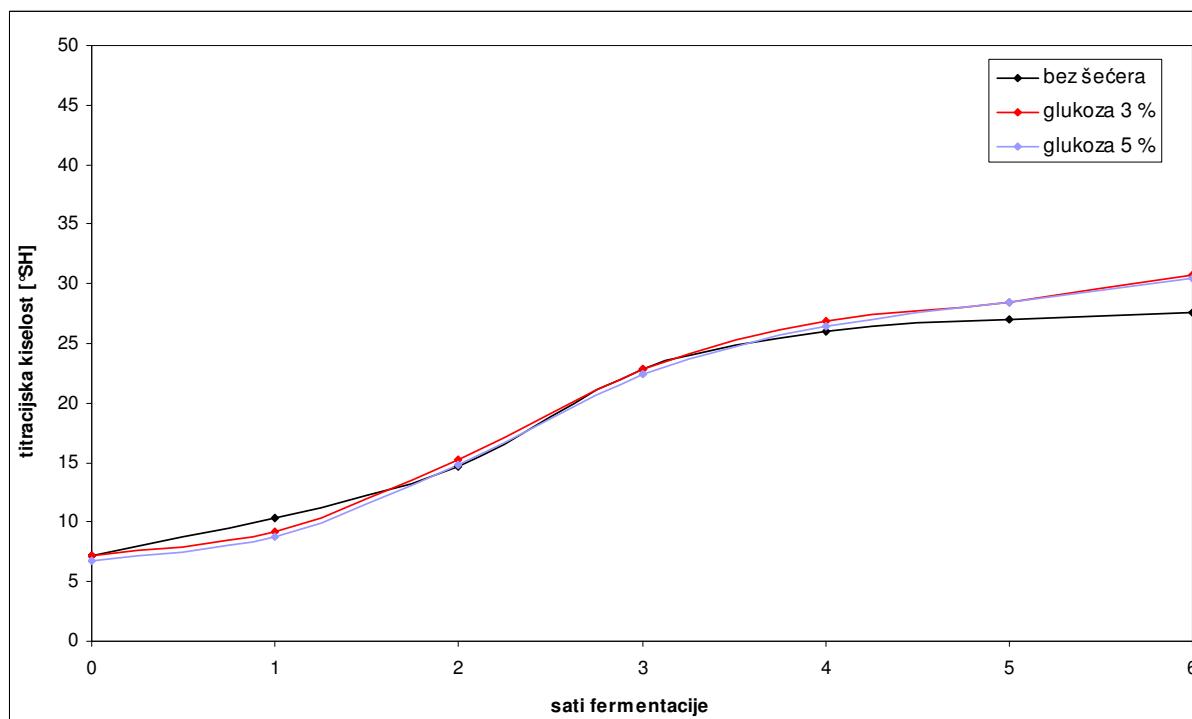
Slika 11 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



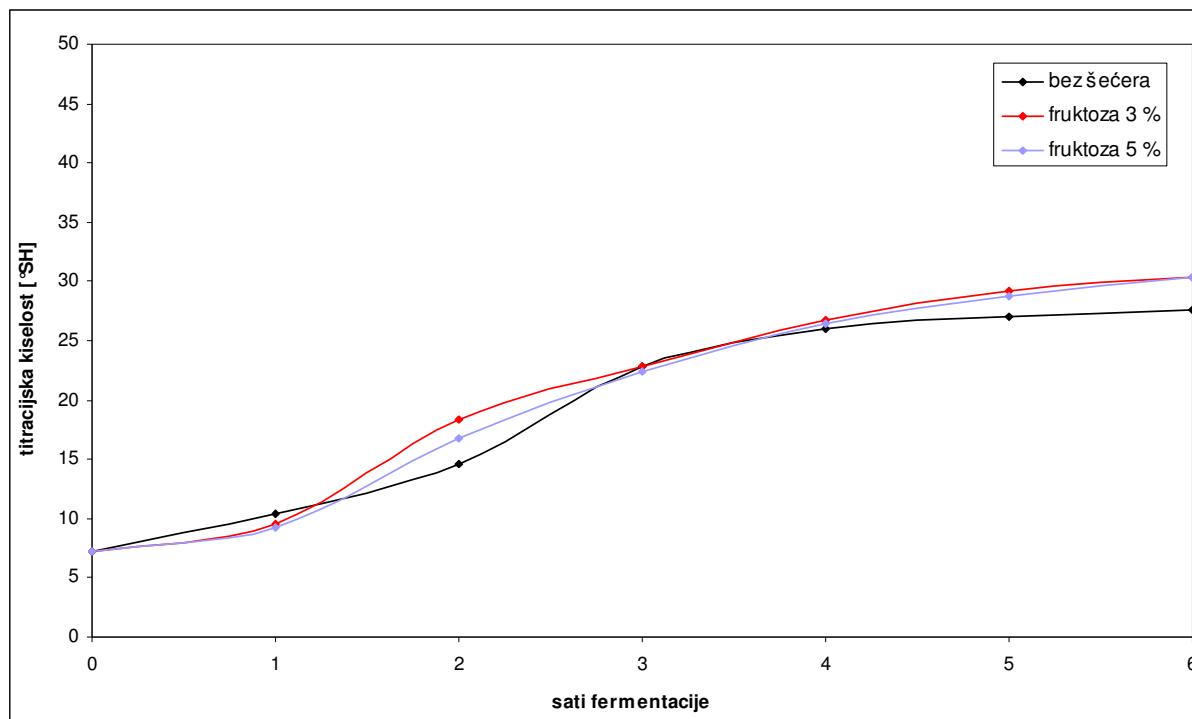
Slika 12 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



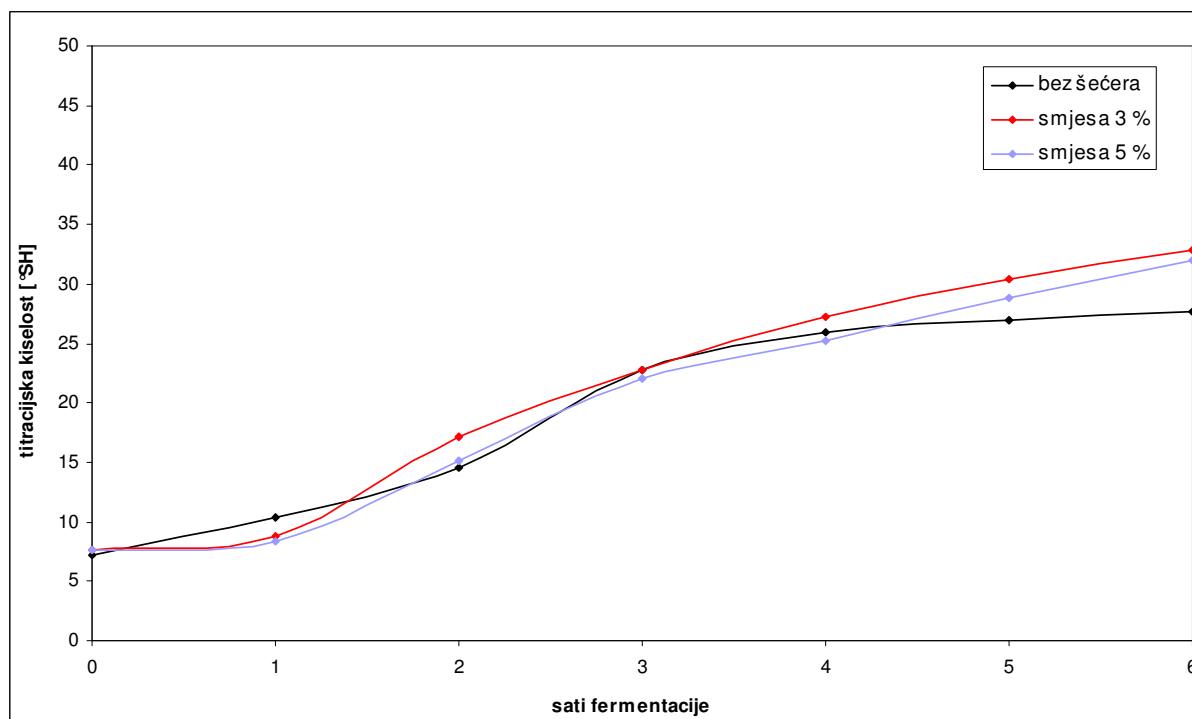
Slika 13 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



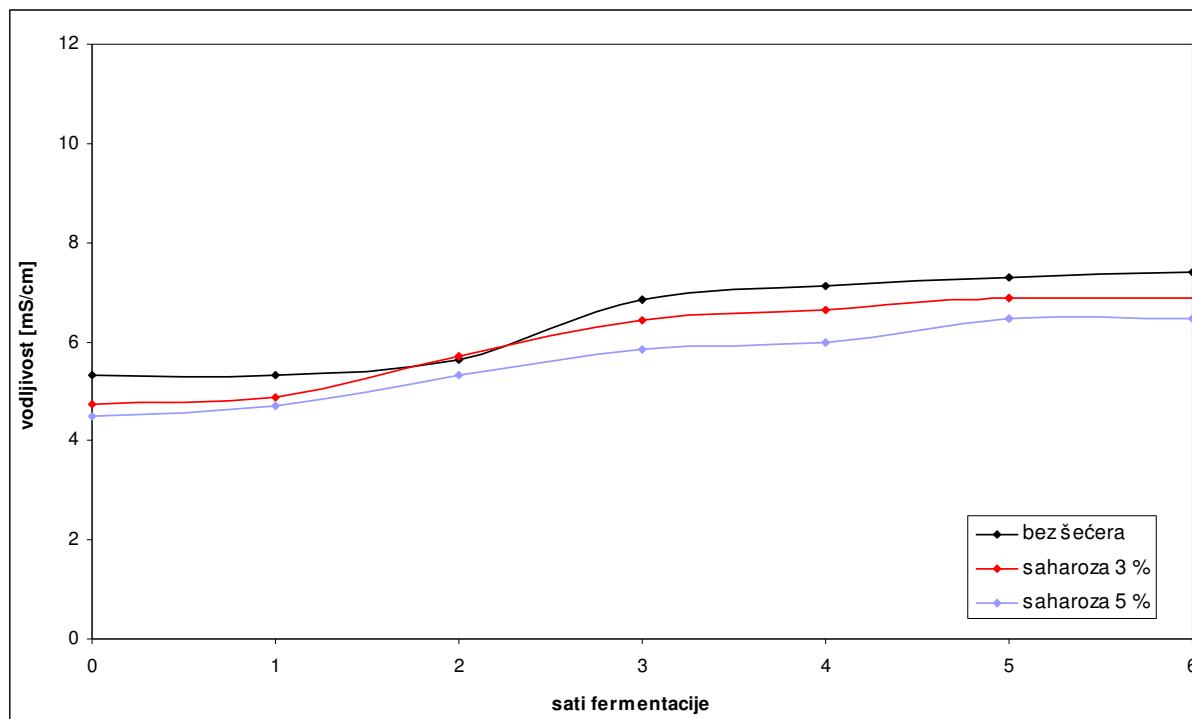
Slika 14 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



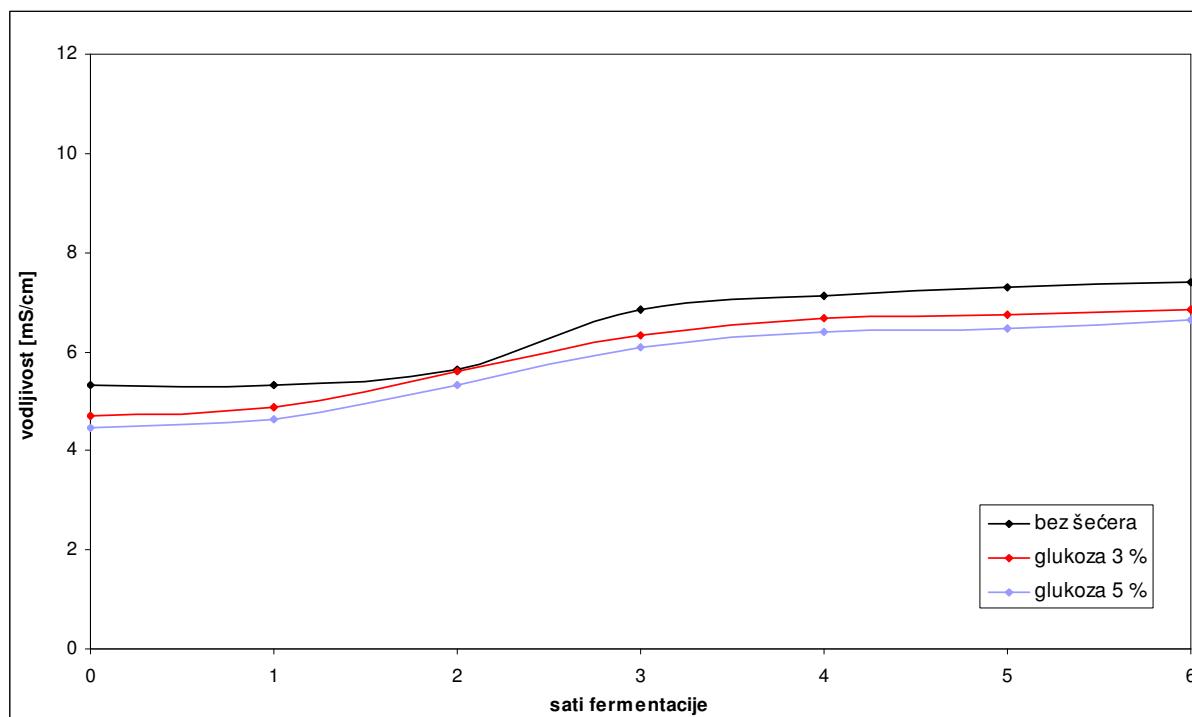
Slika 15 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



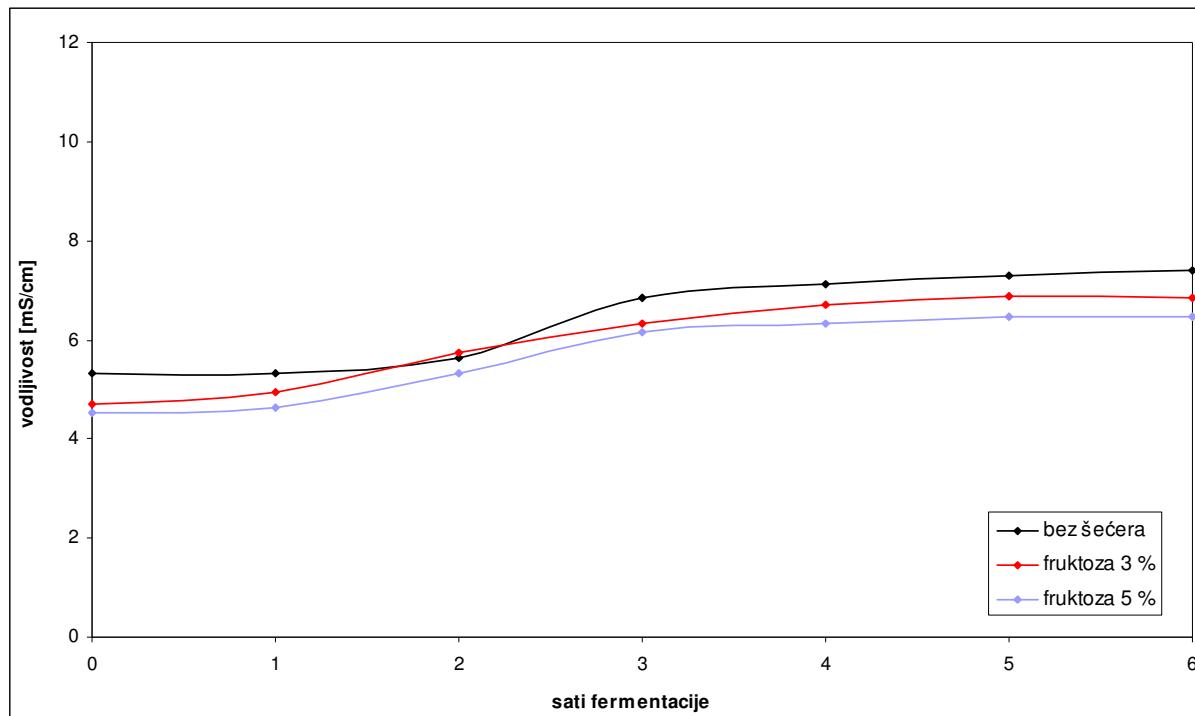
Slika 16 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjesa glukoze i fruktoze



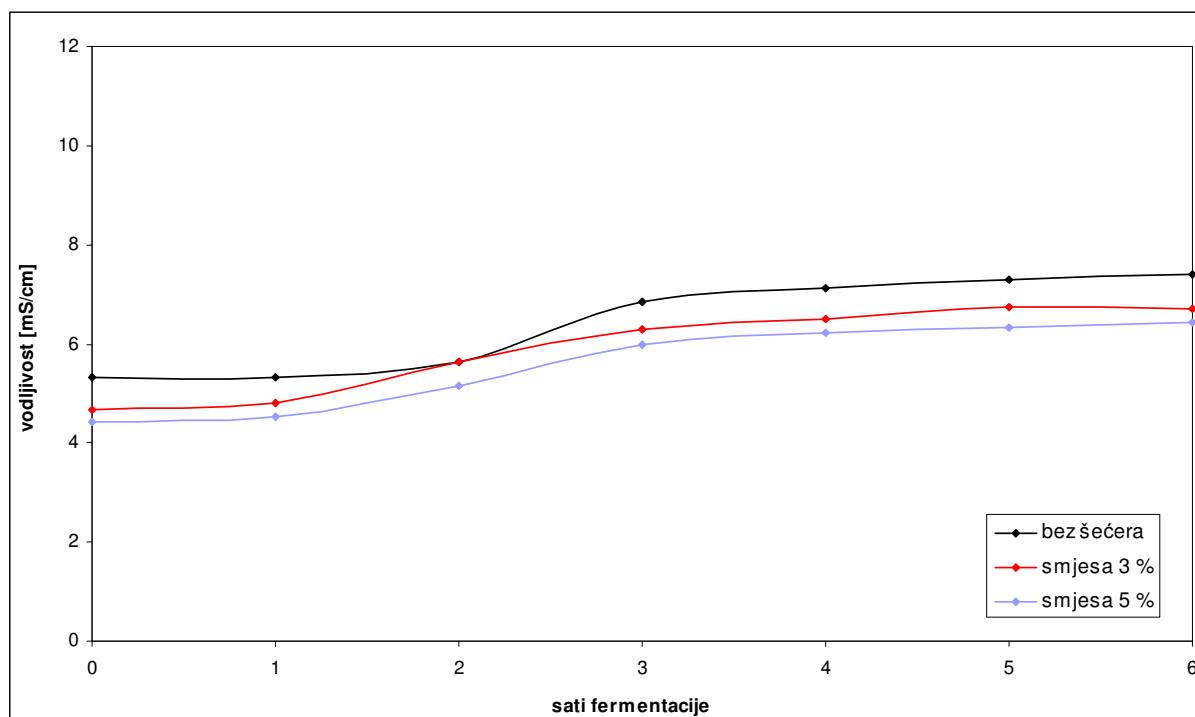
Slika 17 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



Slika 18 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze

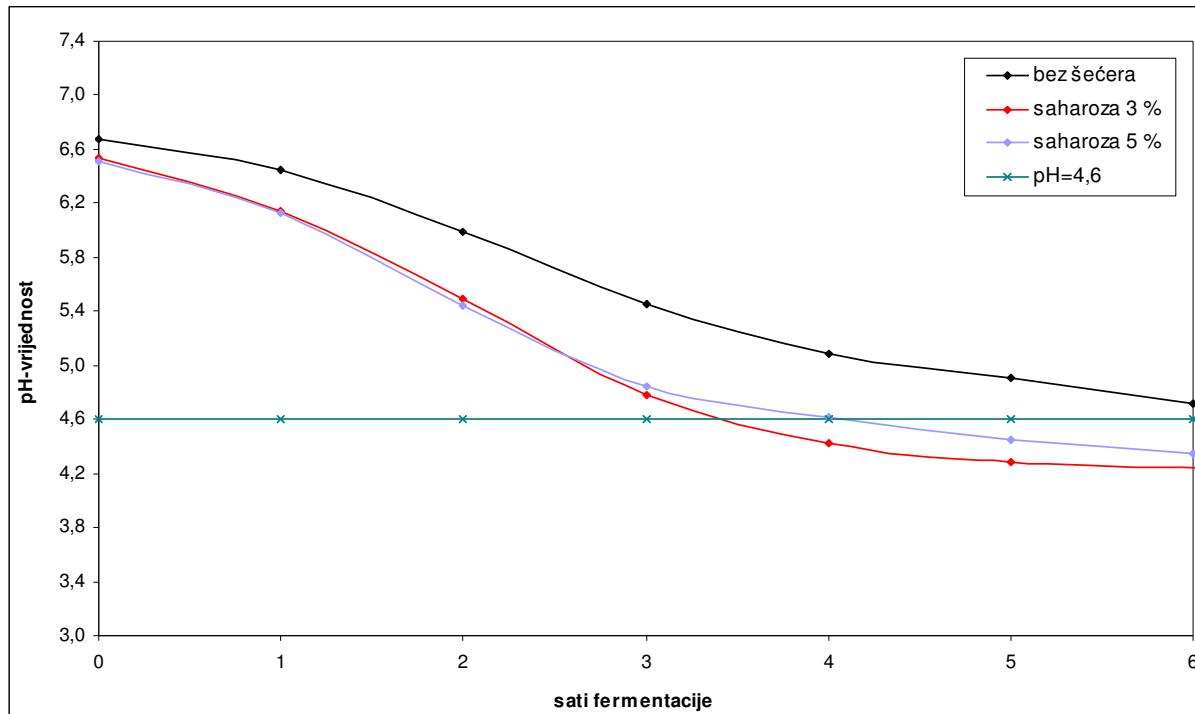


Slika 19 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze

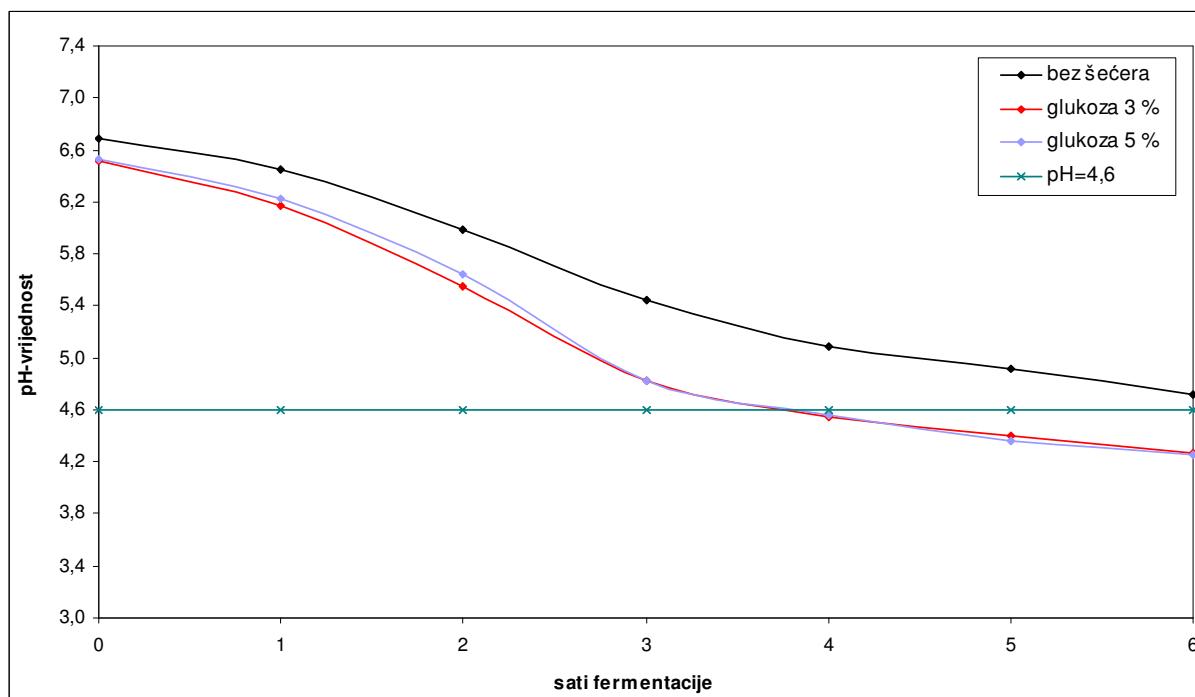


Slika 20 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze

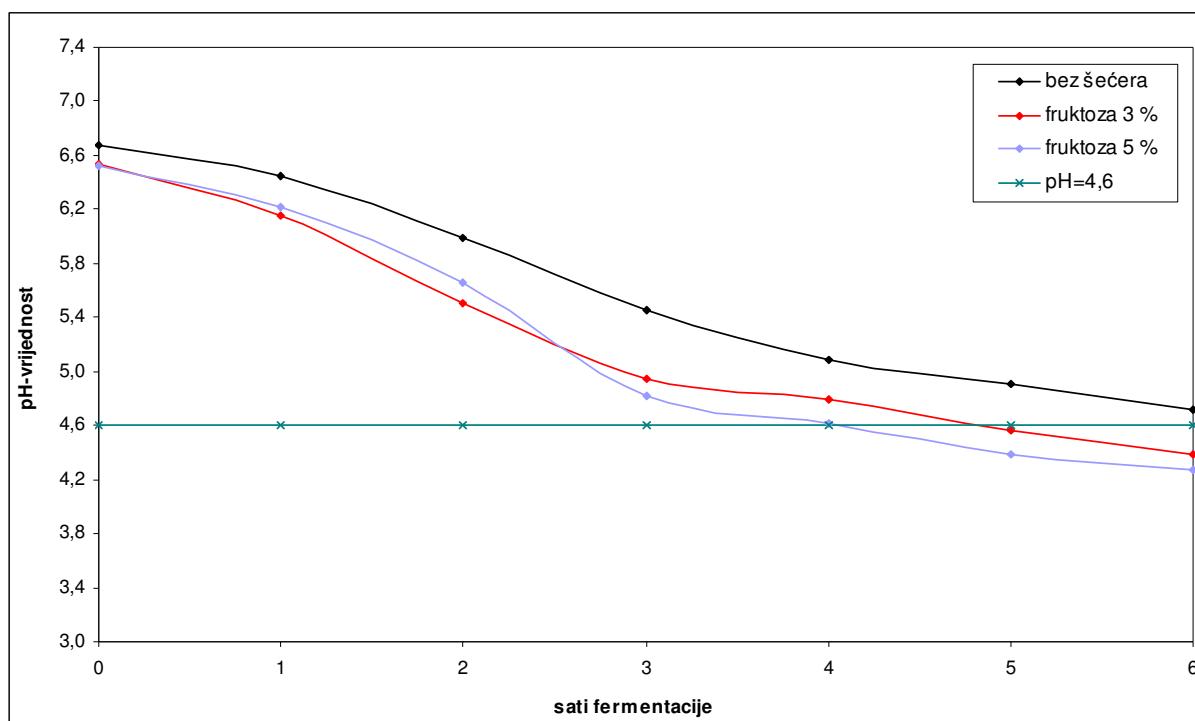
4.2. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE KOZJEG MLJEKA INOKULIRANOG ABT-5 KULTUROM



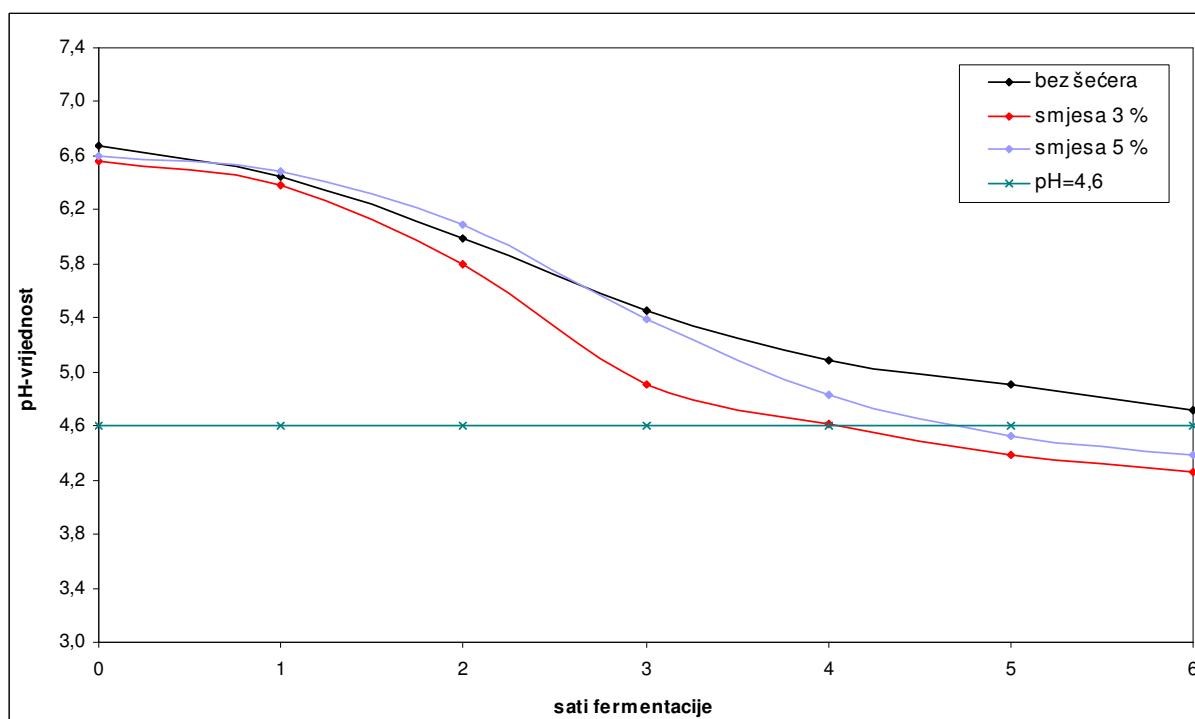
Slika 21 Promjena pH vrijednost tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



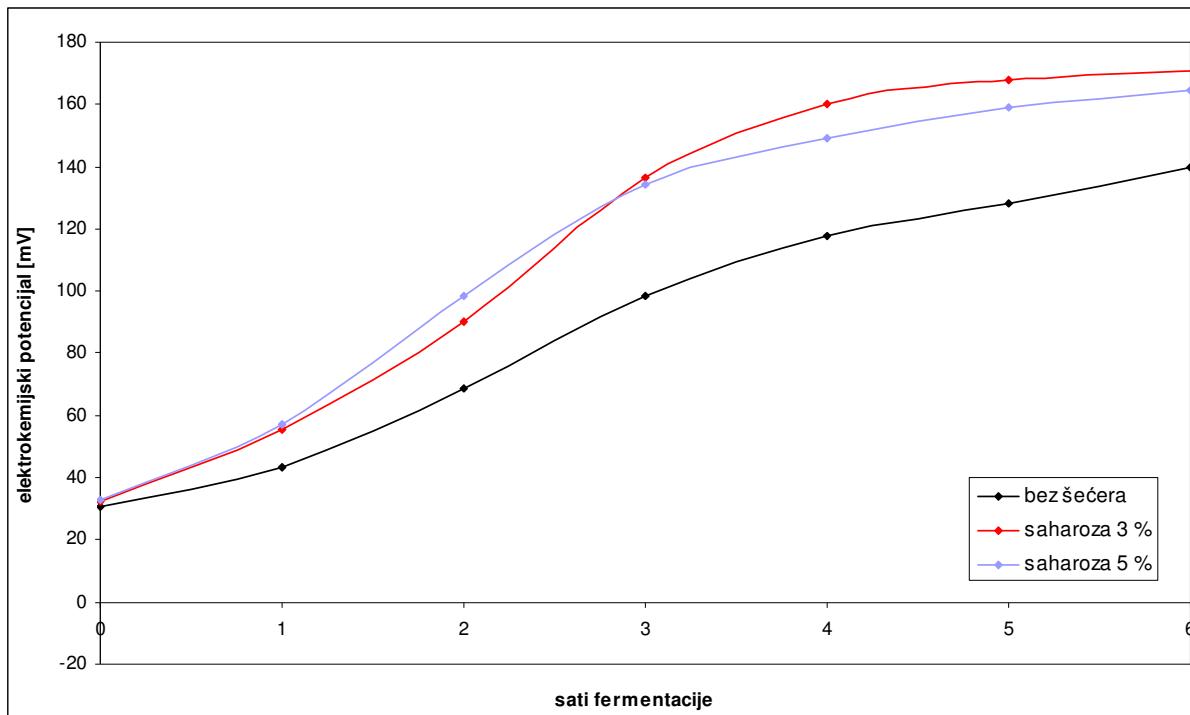
Slika 22 Promjena pH vrijednost tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



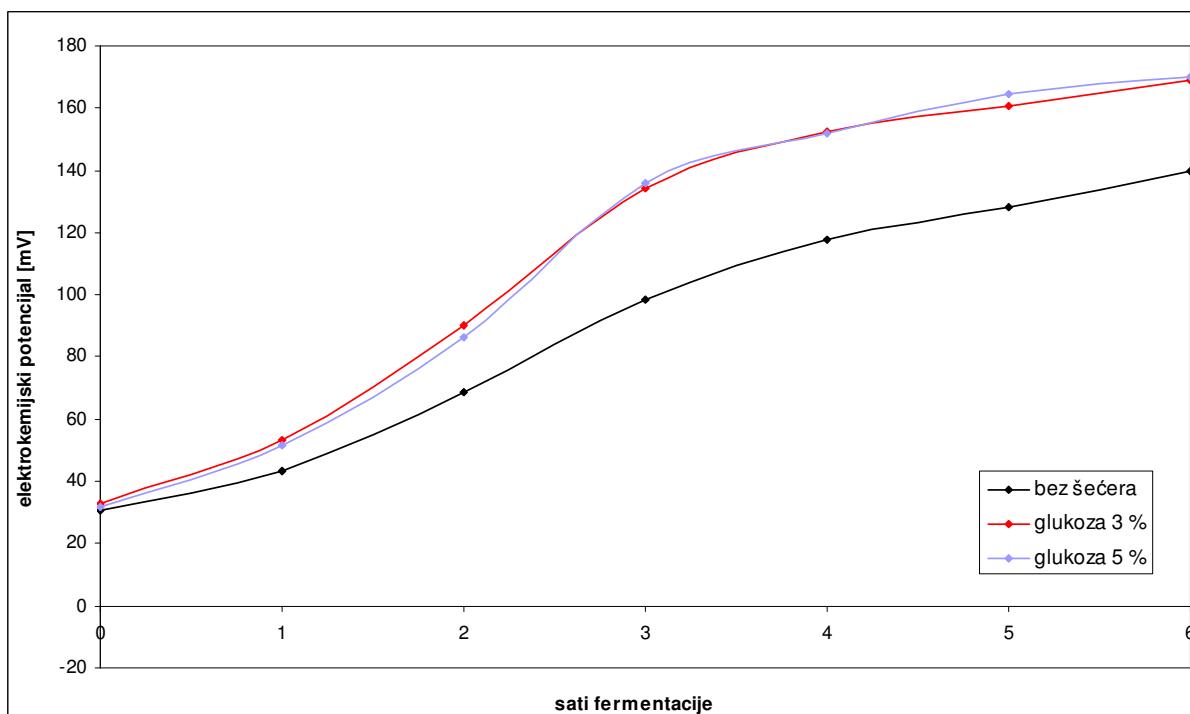
Slika 23 Promjena pH vrijednost tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



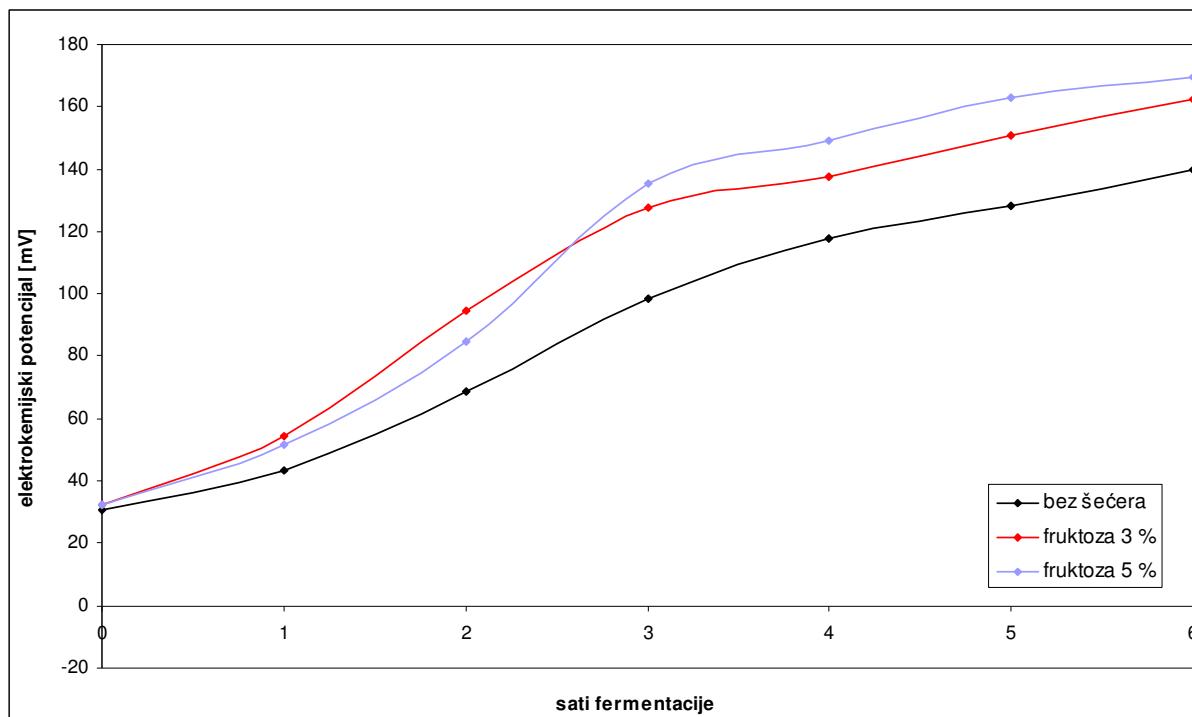
Slika 24 Promjena pH vrijednost tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



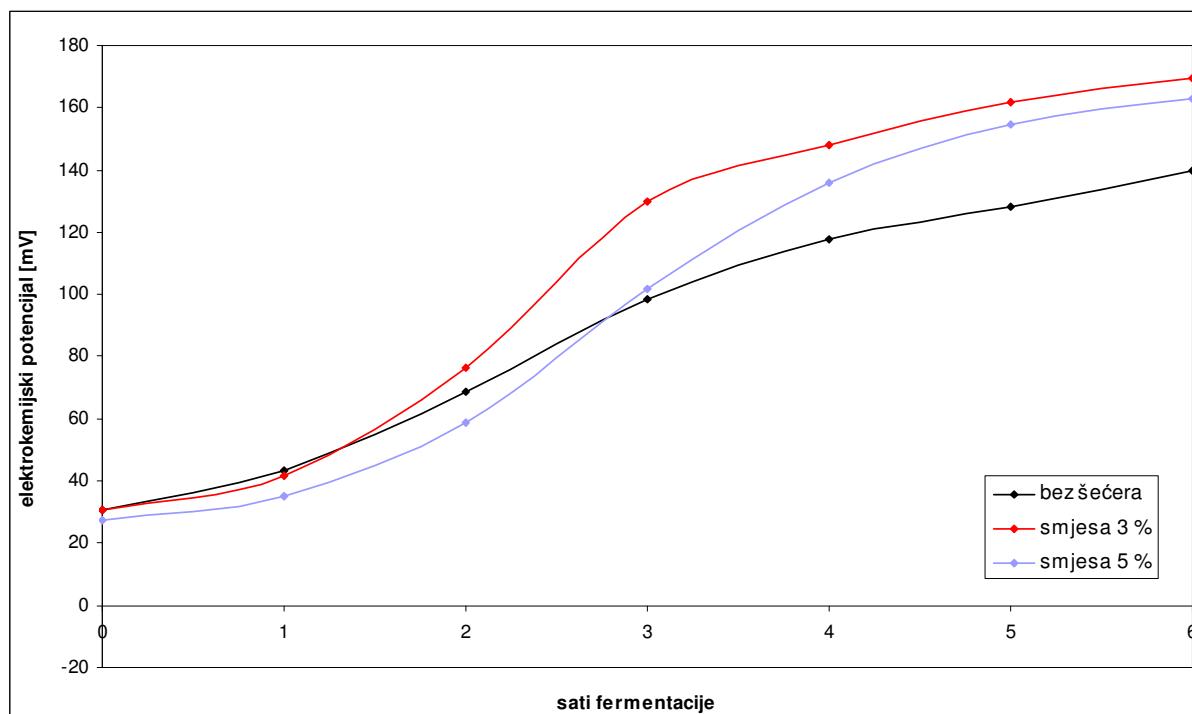
Slika 25 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



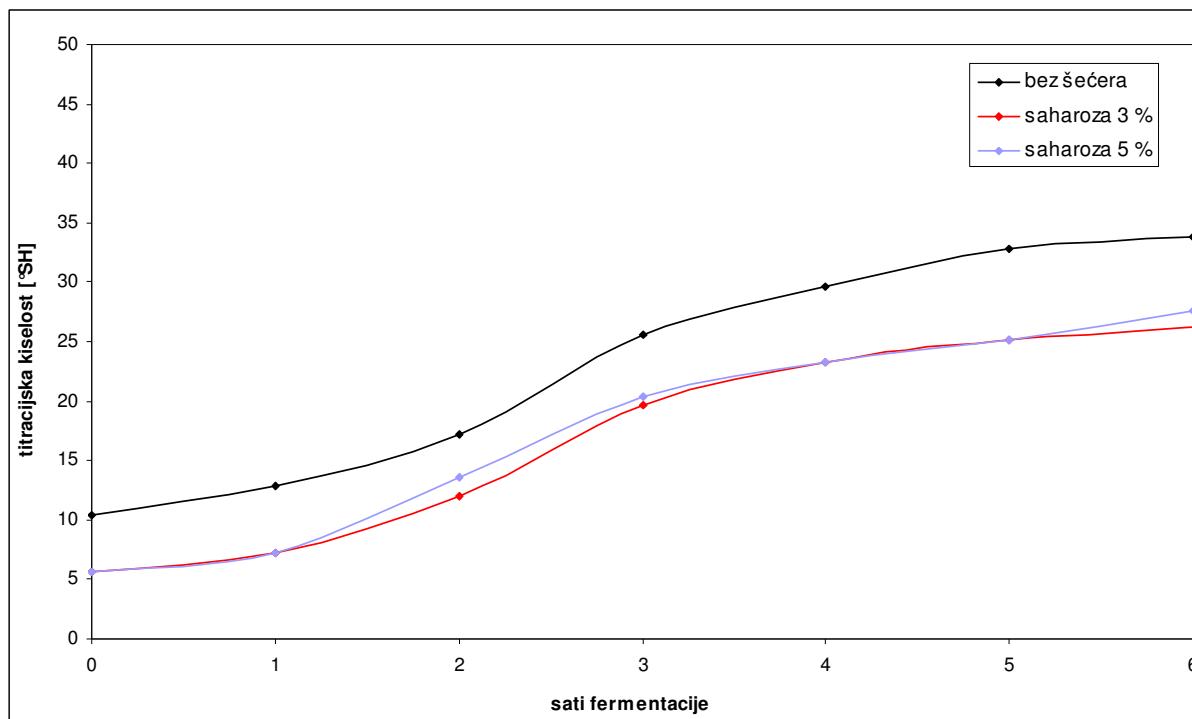
Slika 26 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



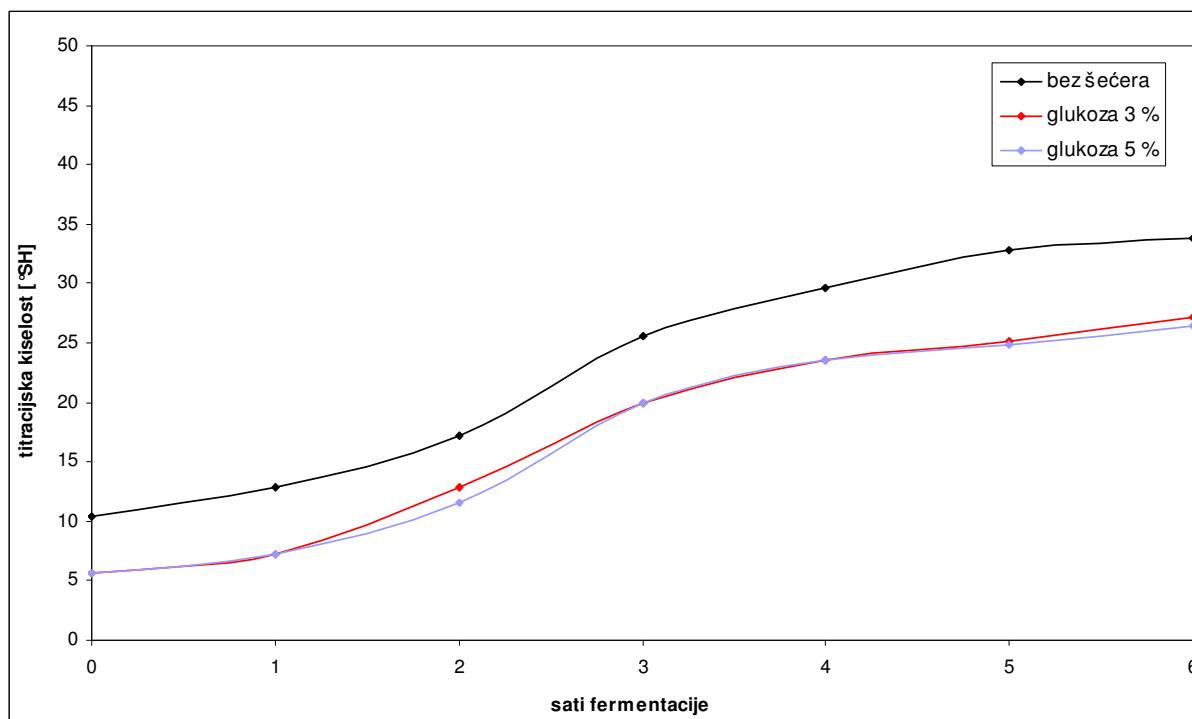
Slika 27 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



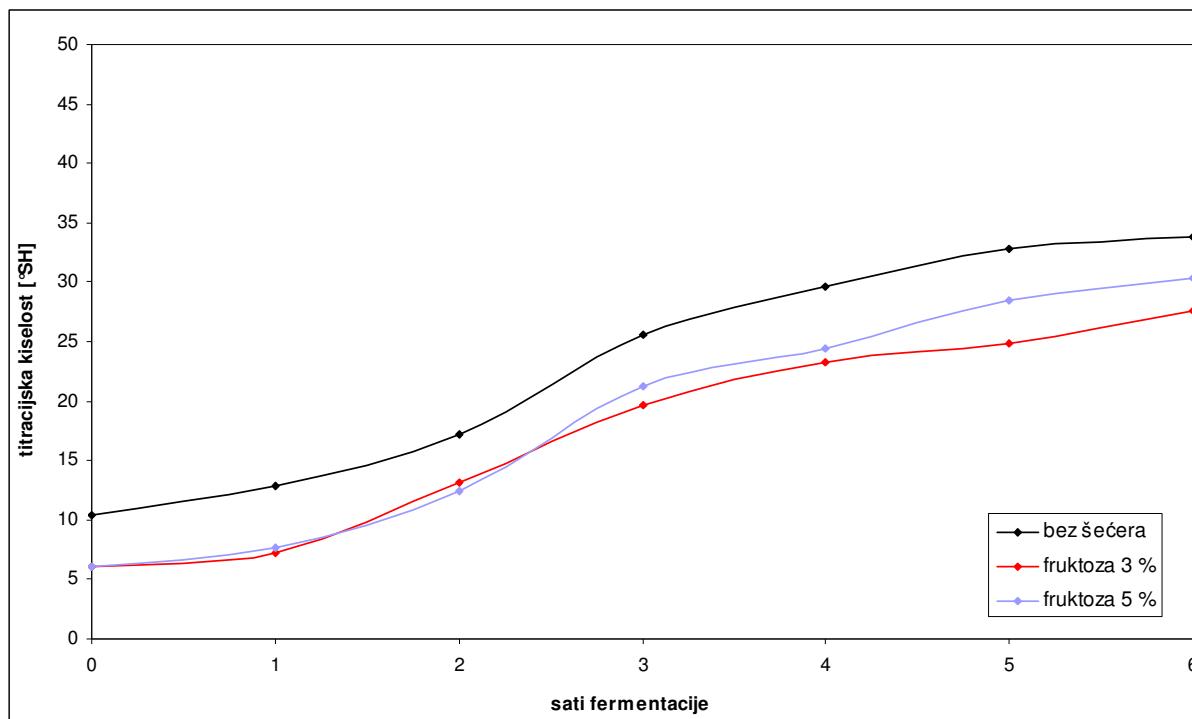
Slika 28 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



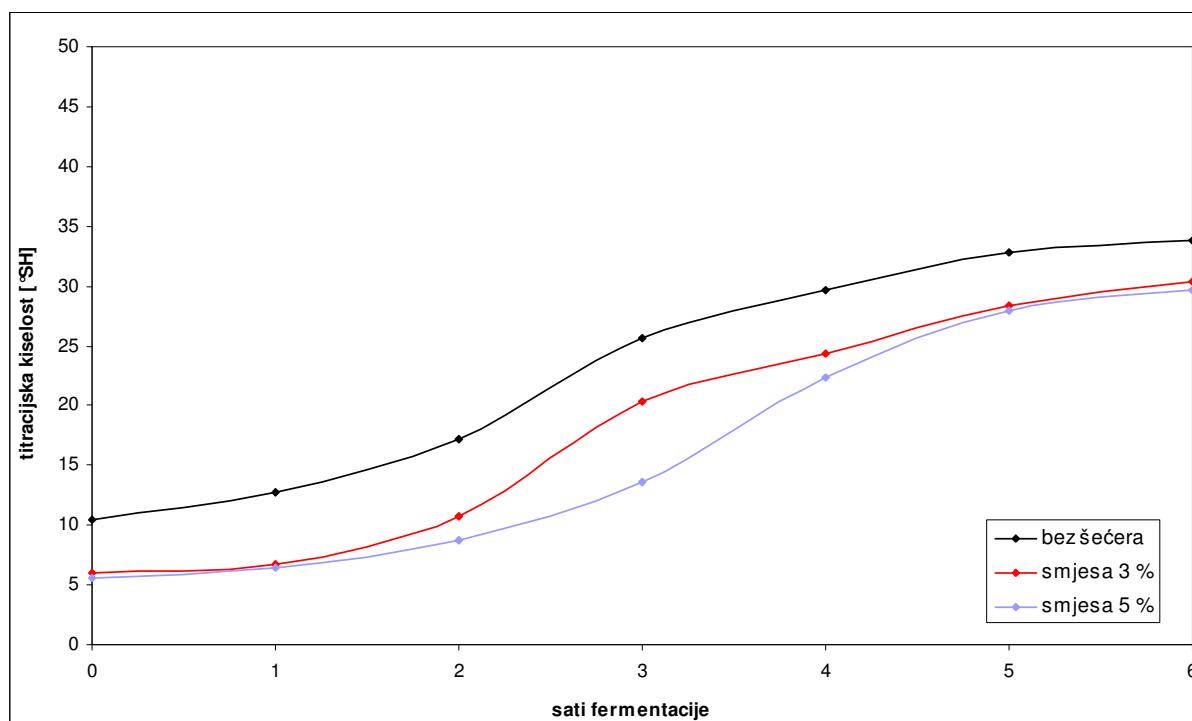
Slika 29 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



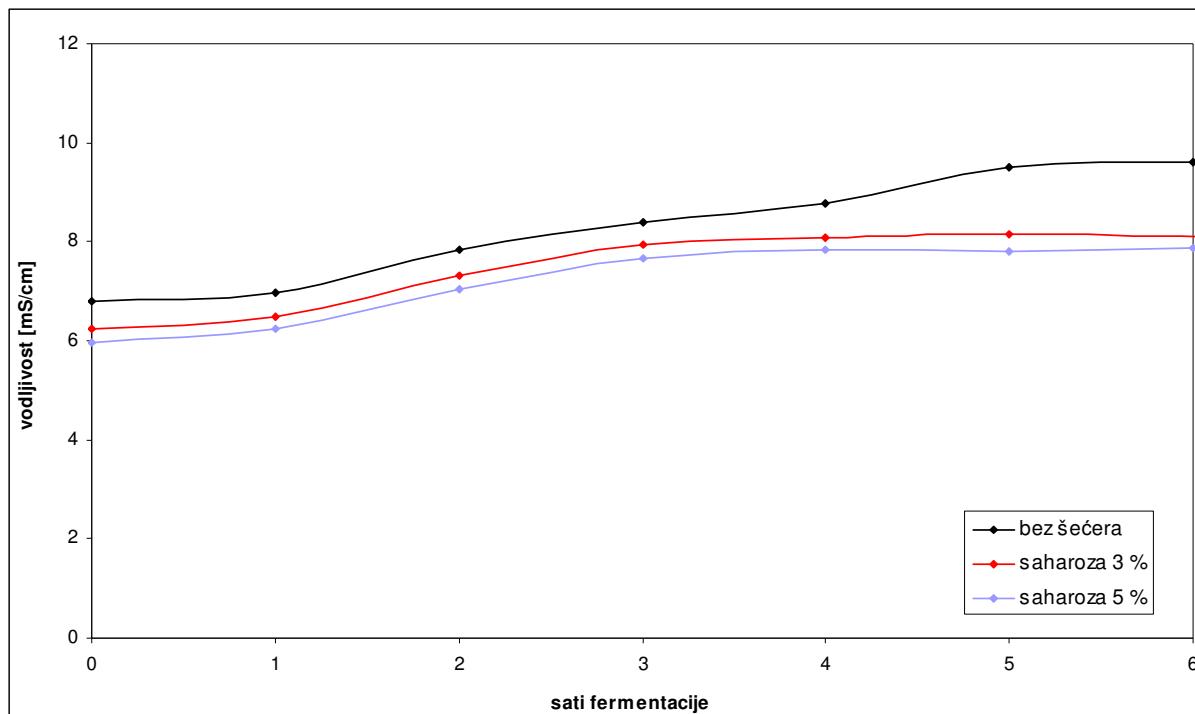
Slika 30 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



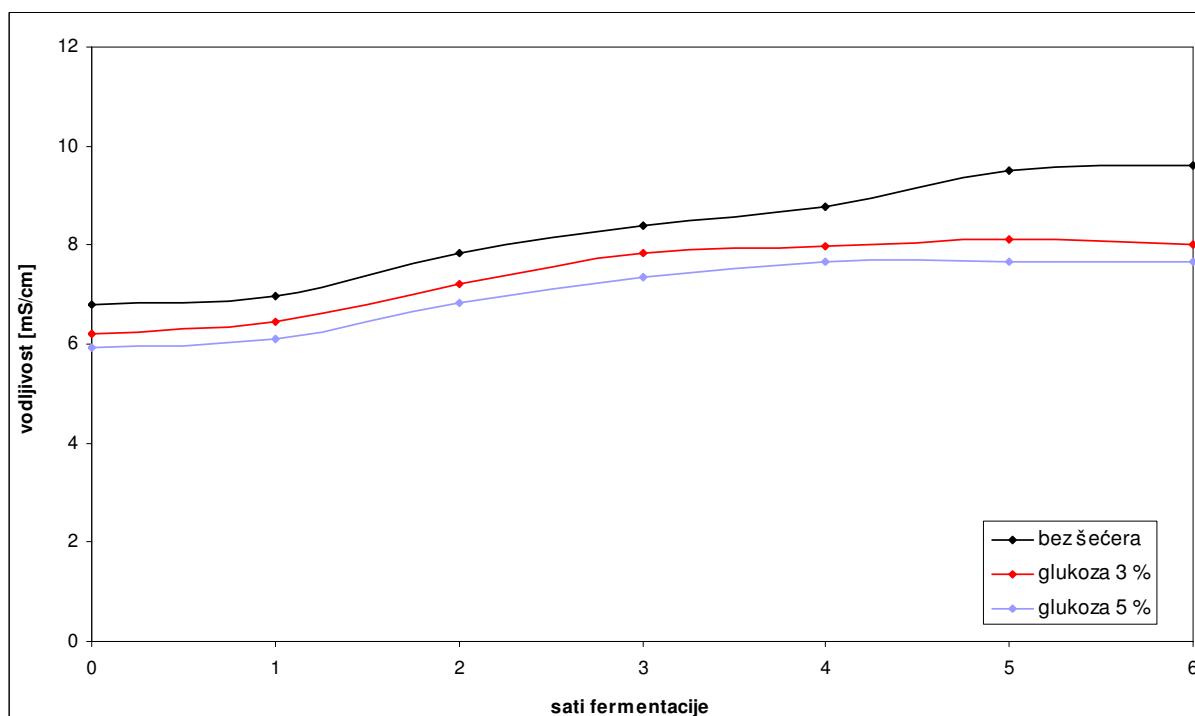
Slika 31 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



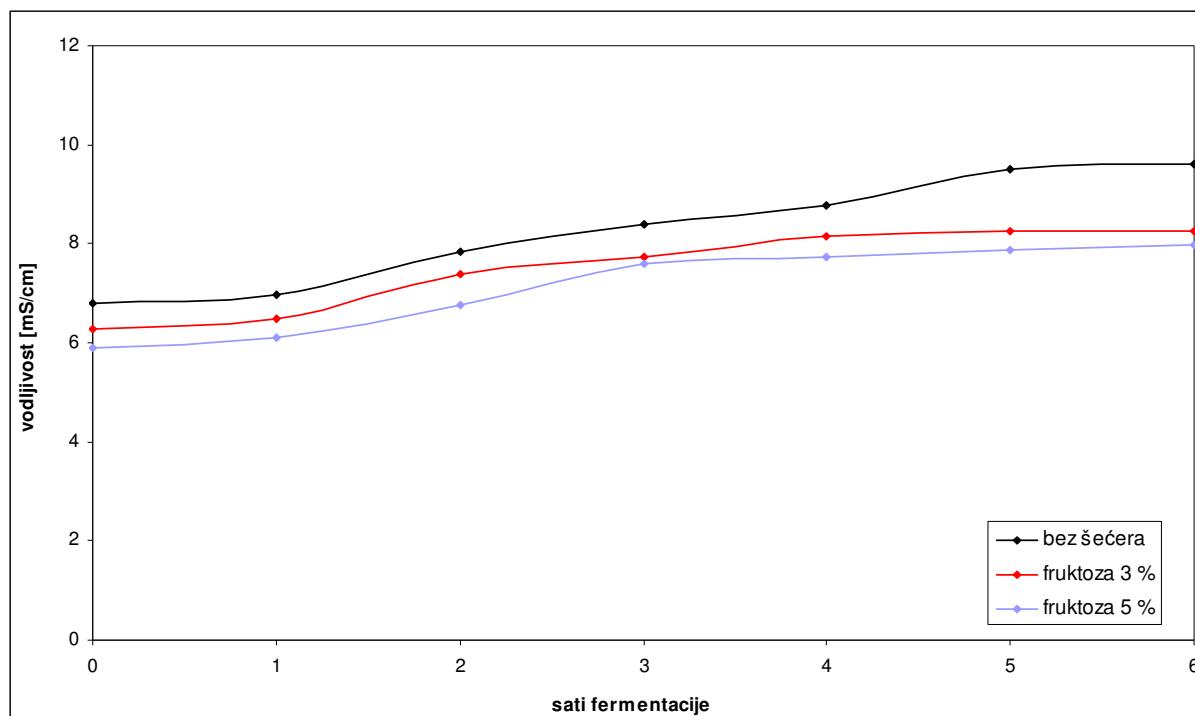
Slika 32 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



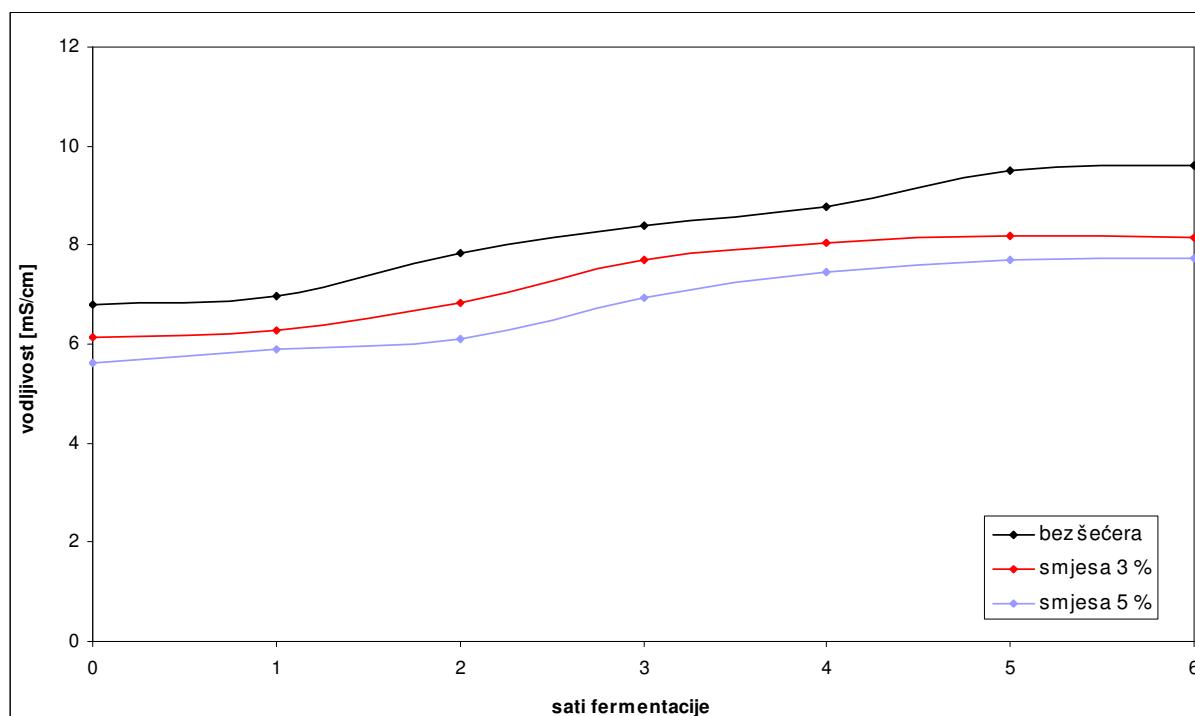
Slika 33 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



Slika 34 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze

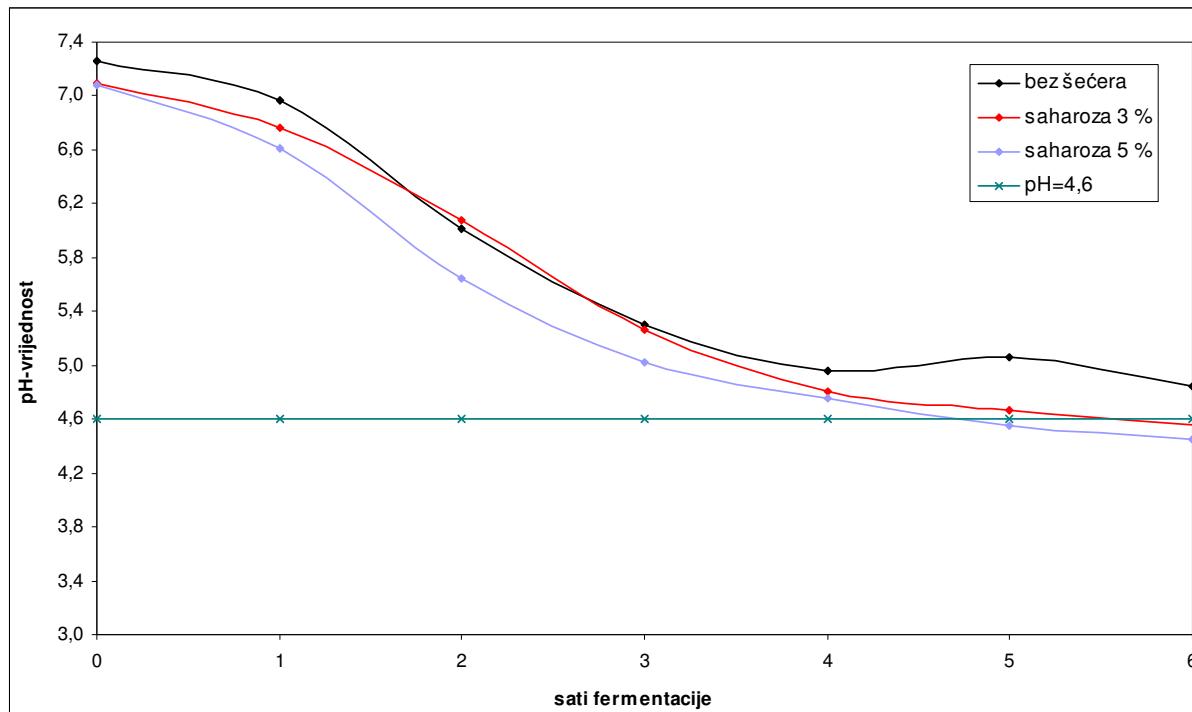


Slika 35 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze

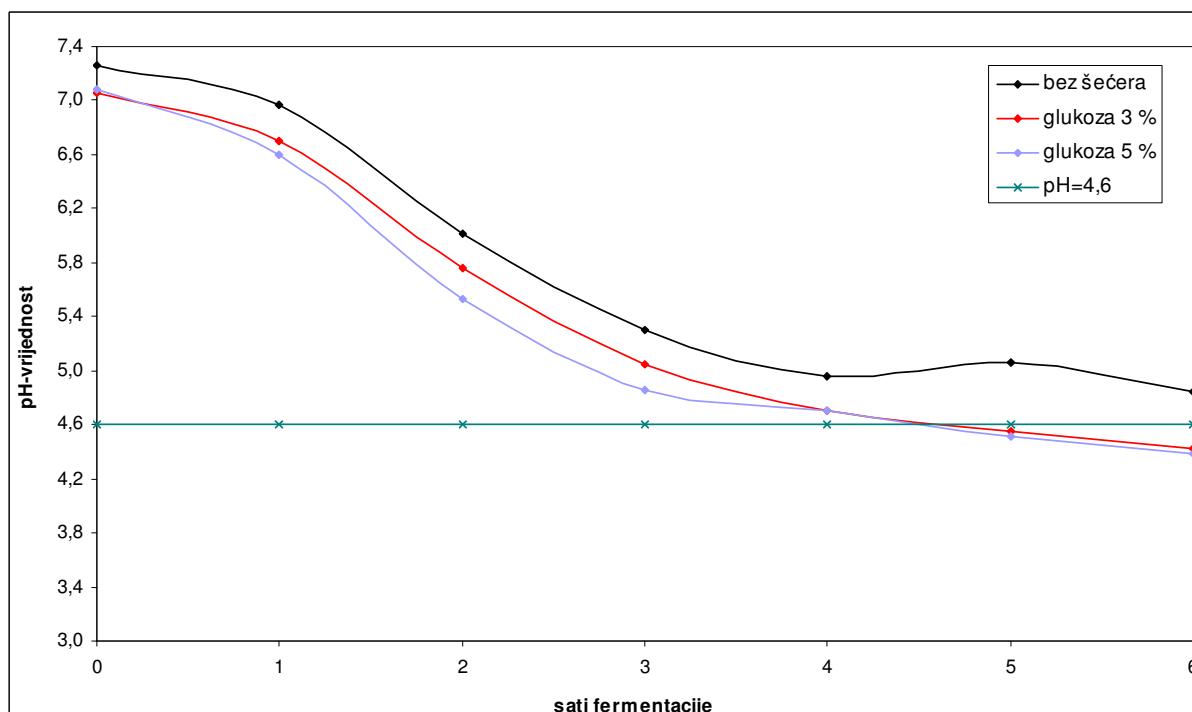


Slika 36 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze

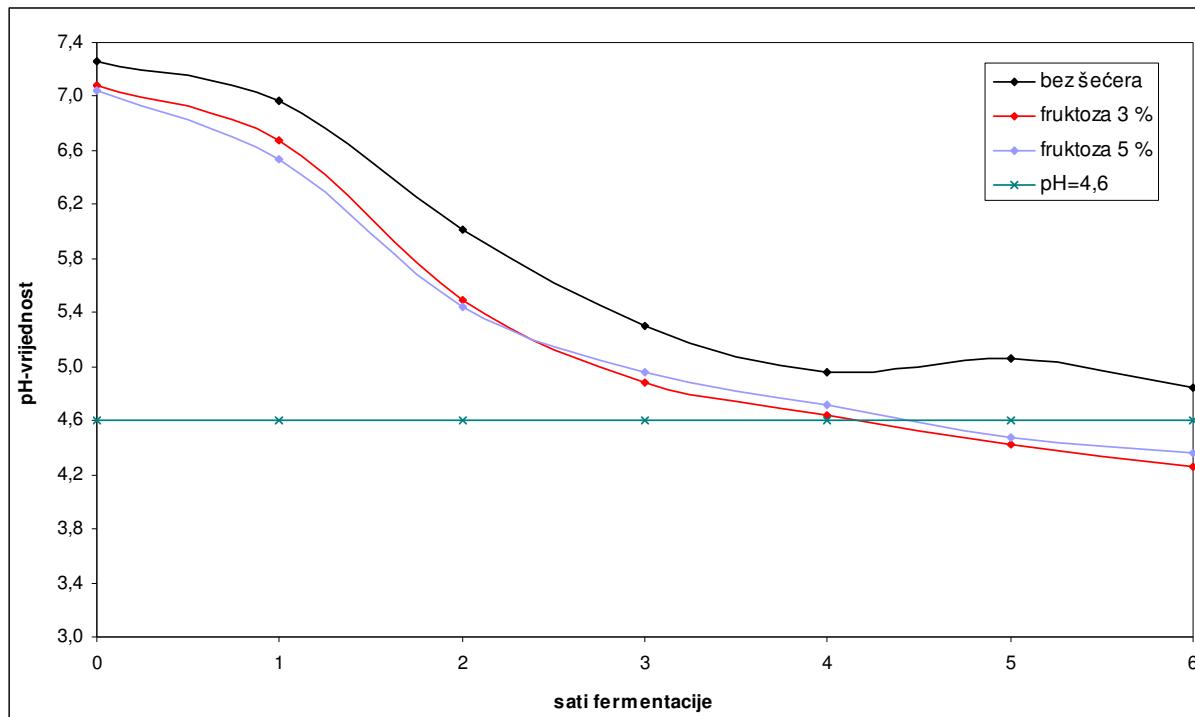
4.3. UTJECAJ DODATKA ŠEĆERA NA TIJEK FERMENTACIJE SOJINOG MLJEKA INOKULIRANOG ABT-5 KULTUROM



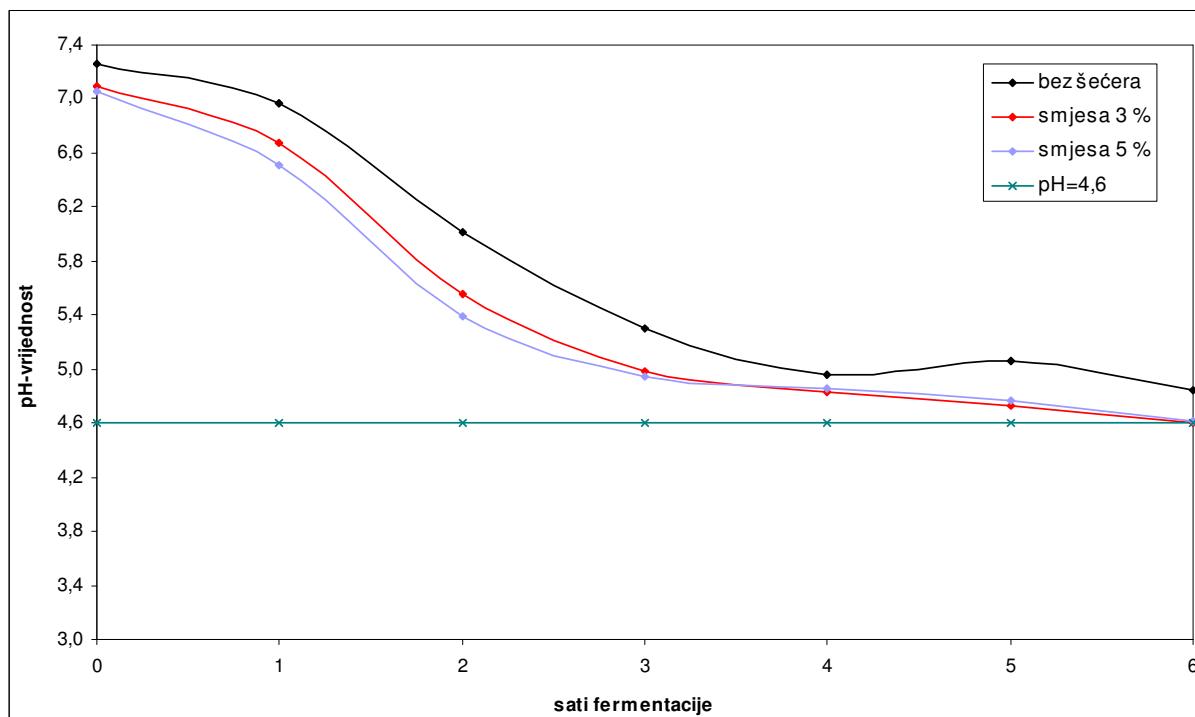
Slika 37 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



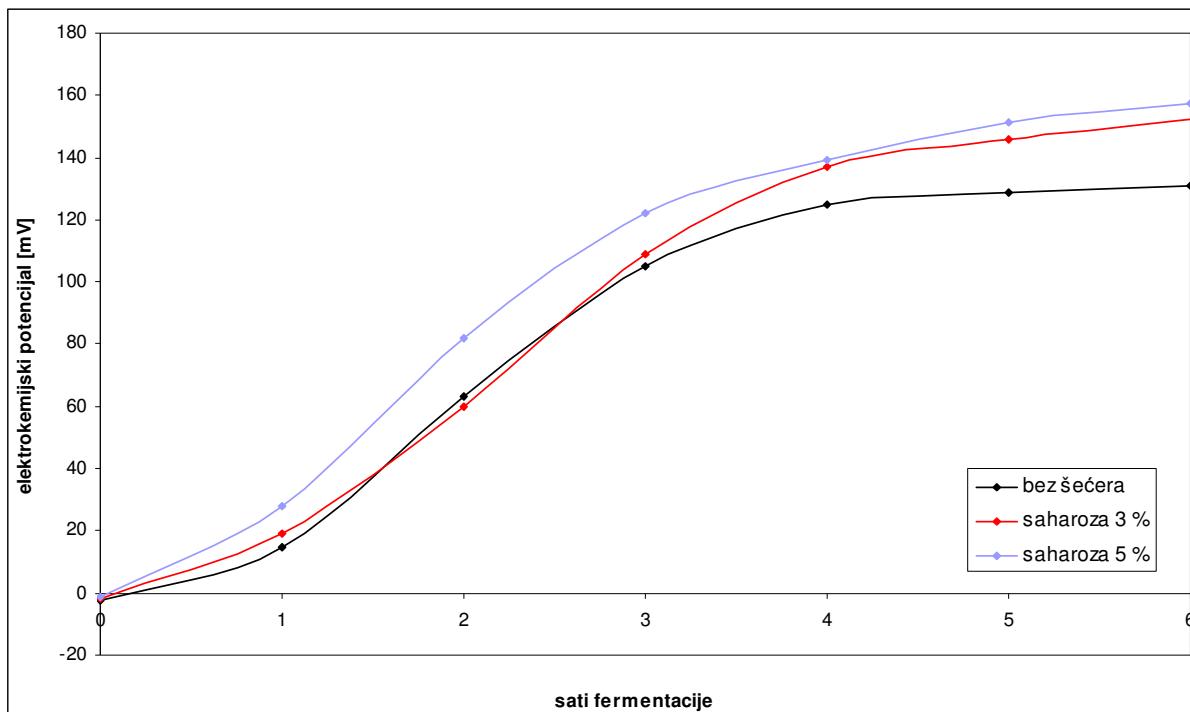
Slika 38 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



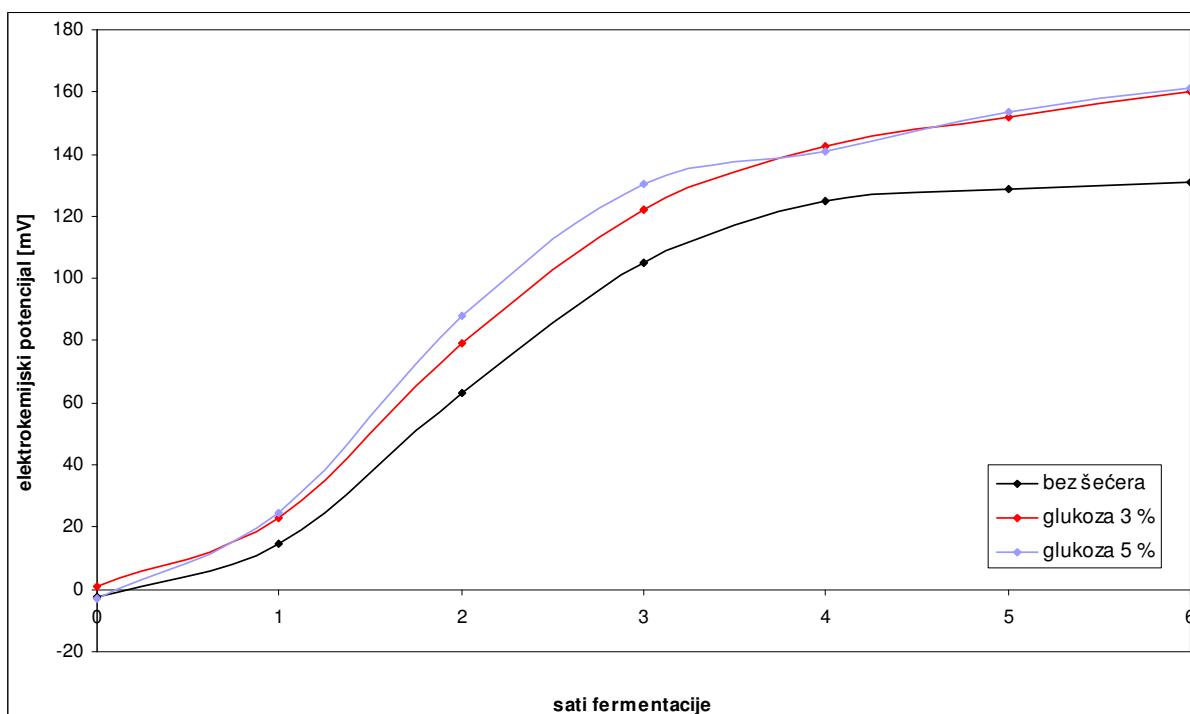
Slika 39 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



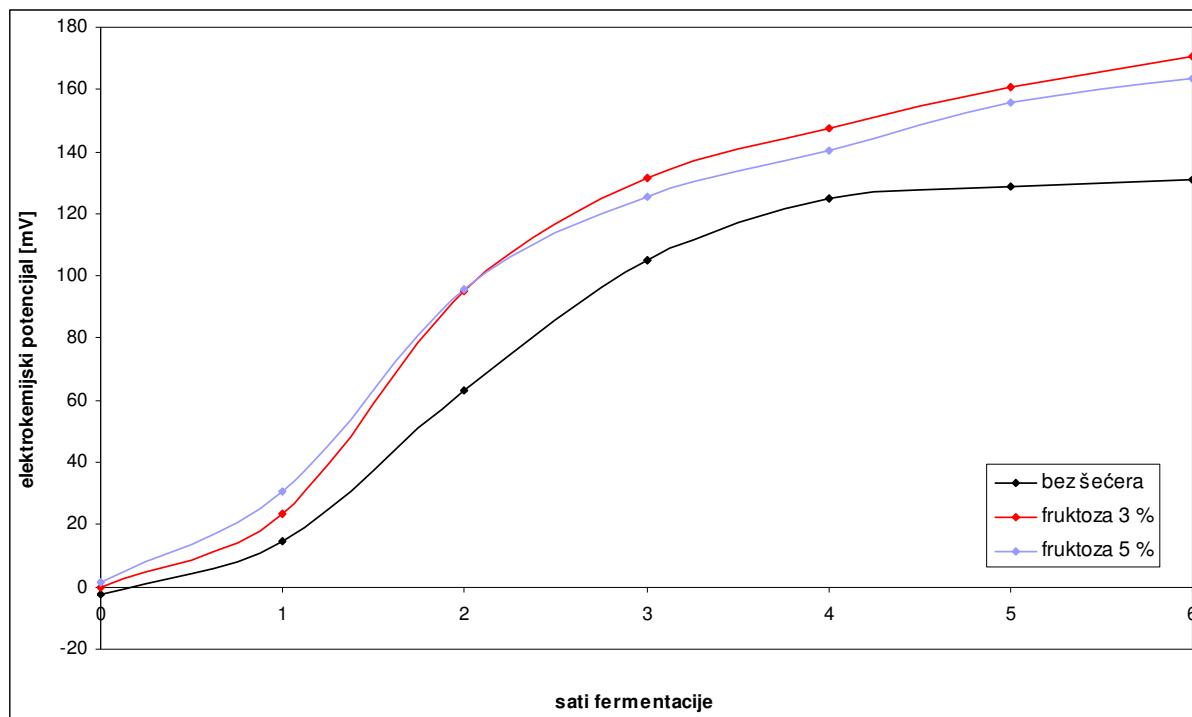
Slika 40 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



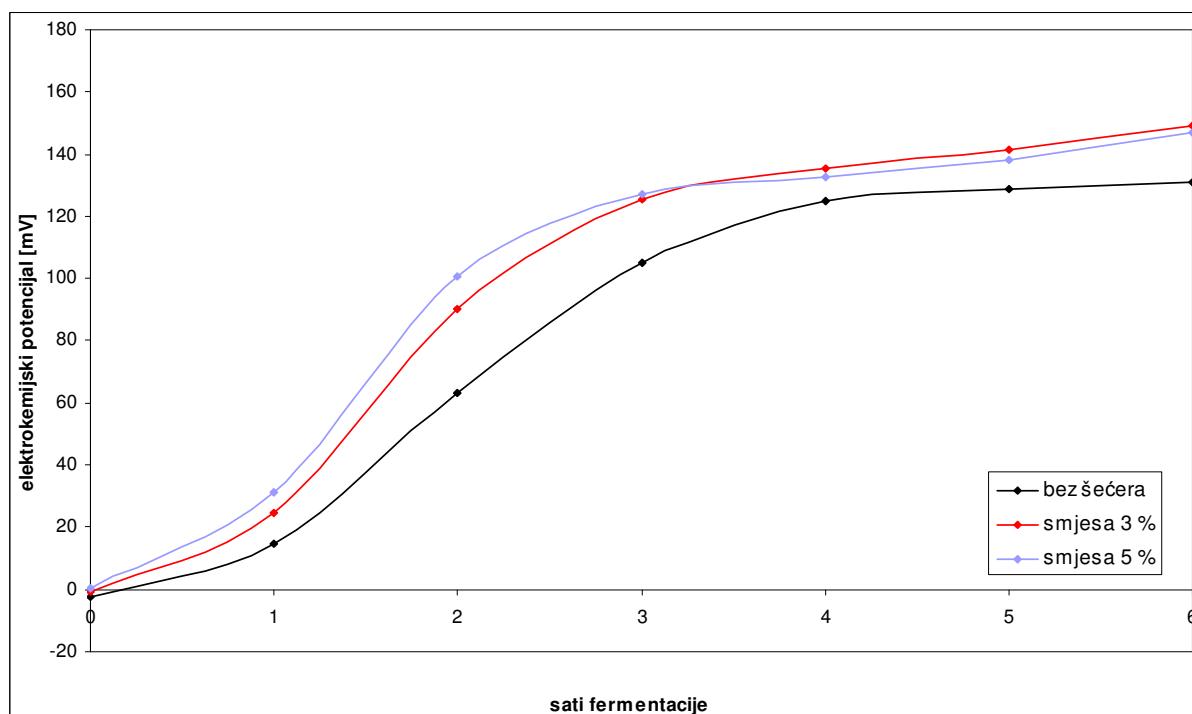
Slika 41 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



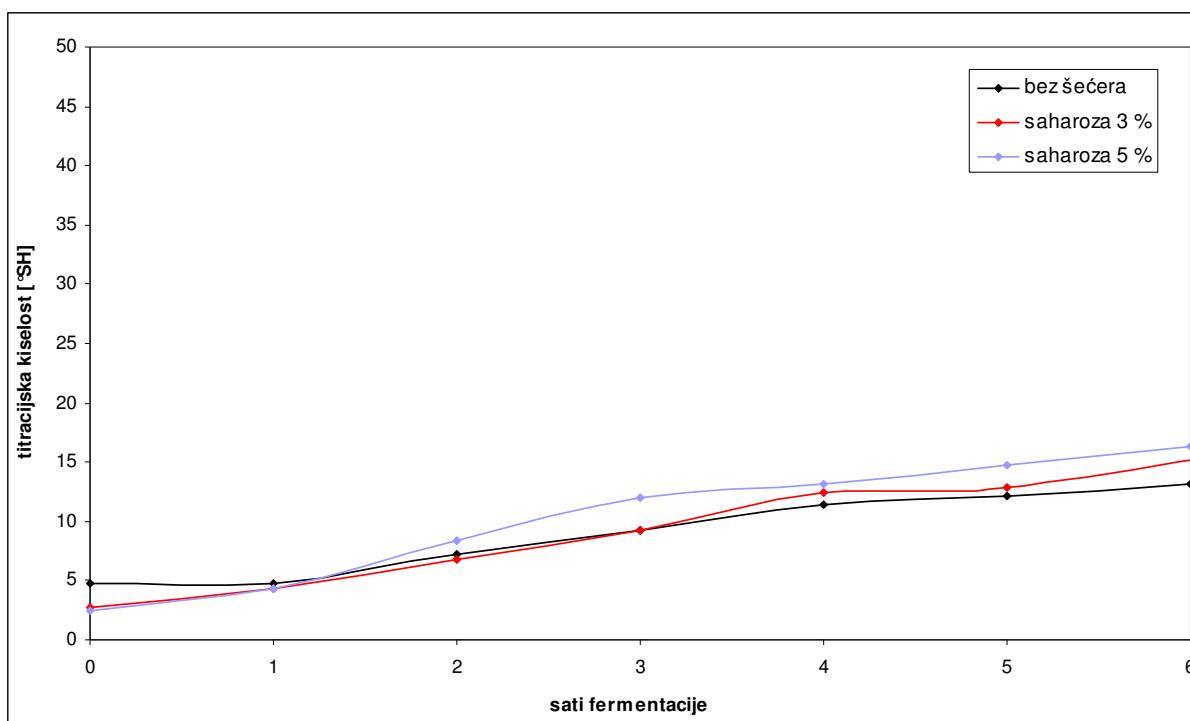
Slika 42 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



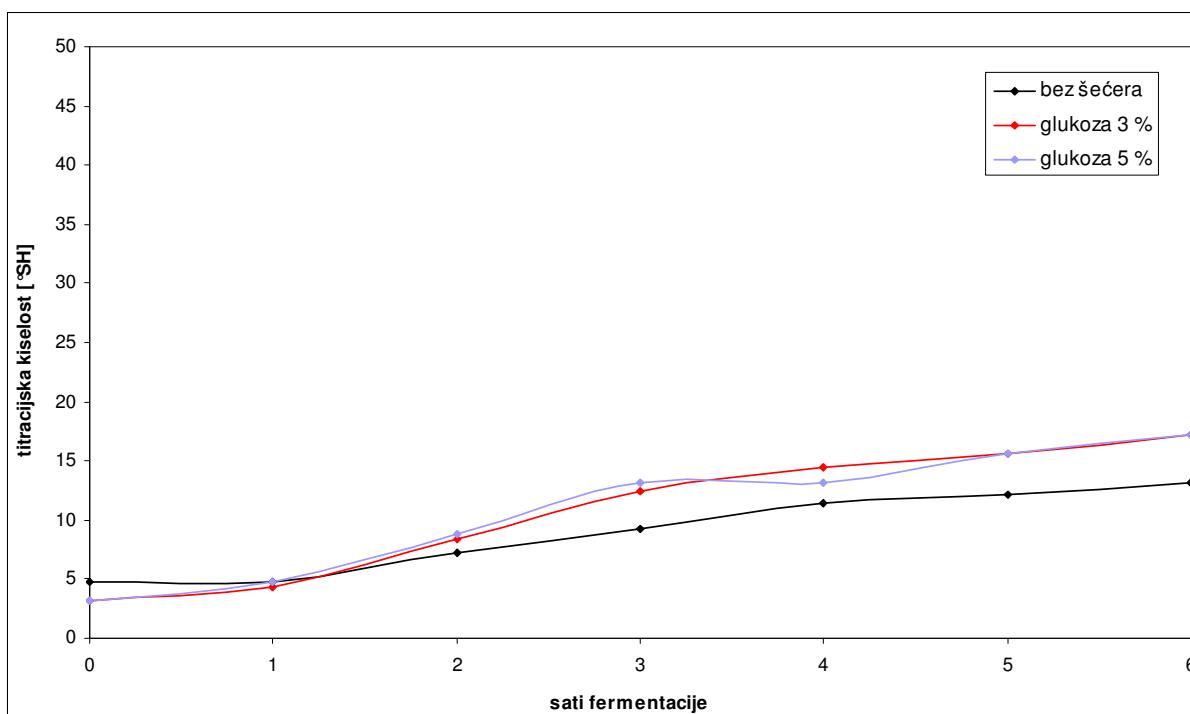
Slika 43 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



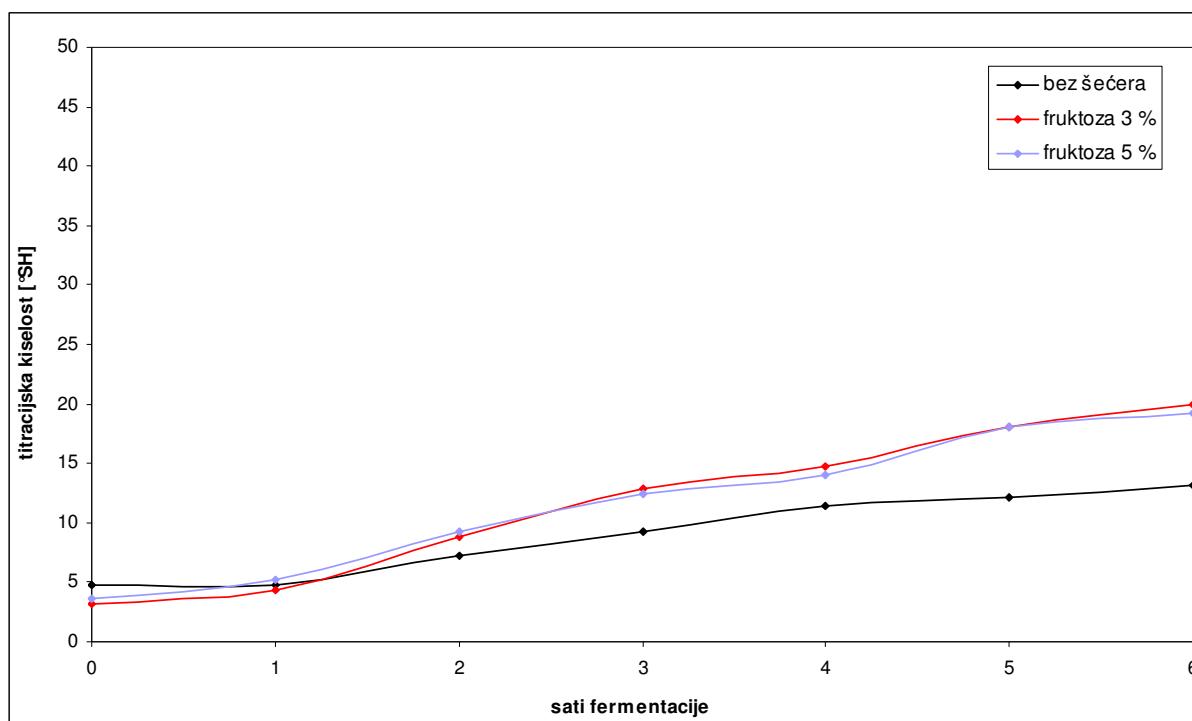
Slika 44 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze



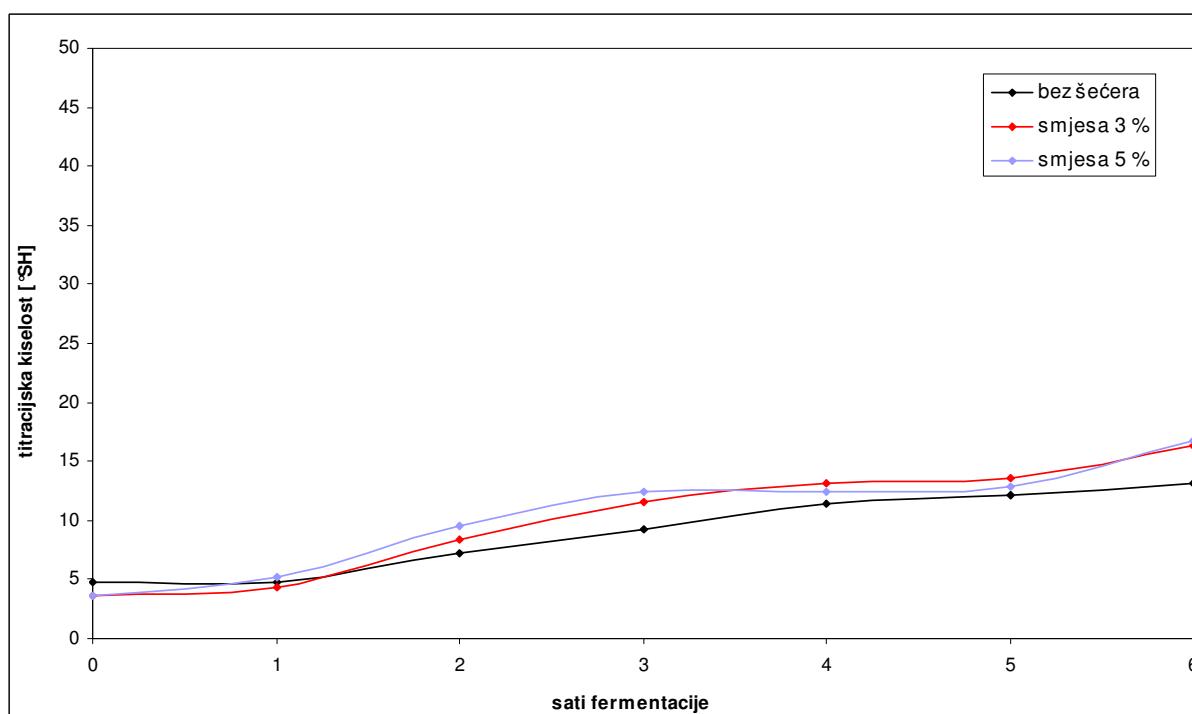
Slika 45 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



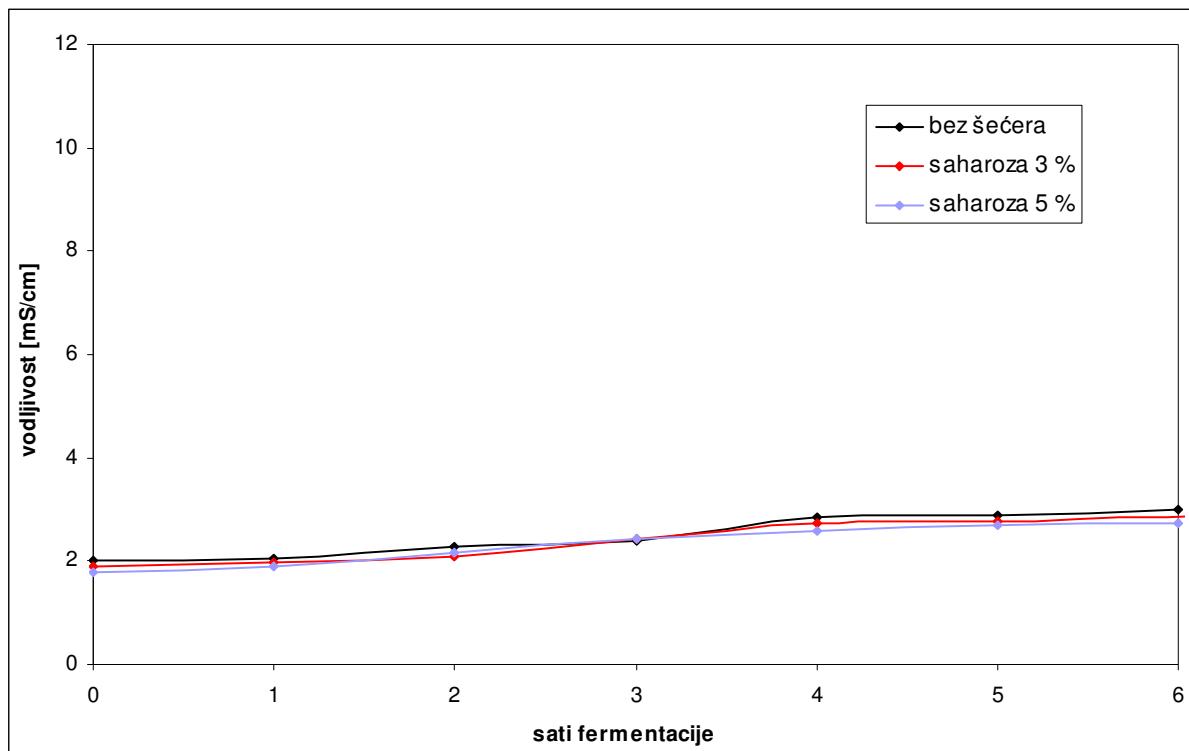
Slika 46 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



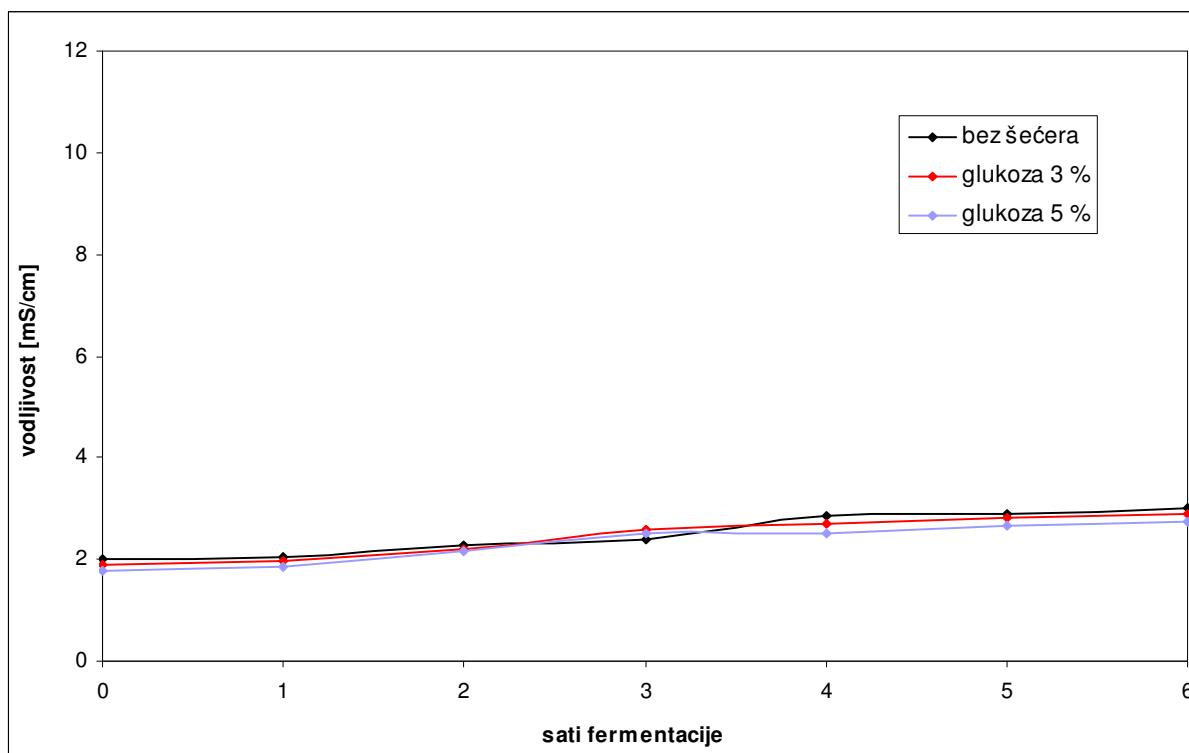
Slika 47 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



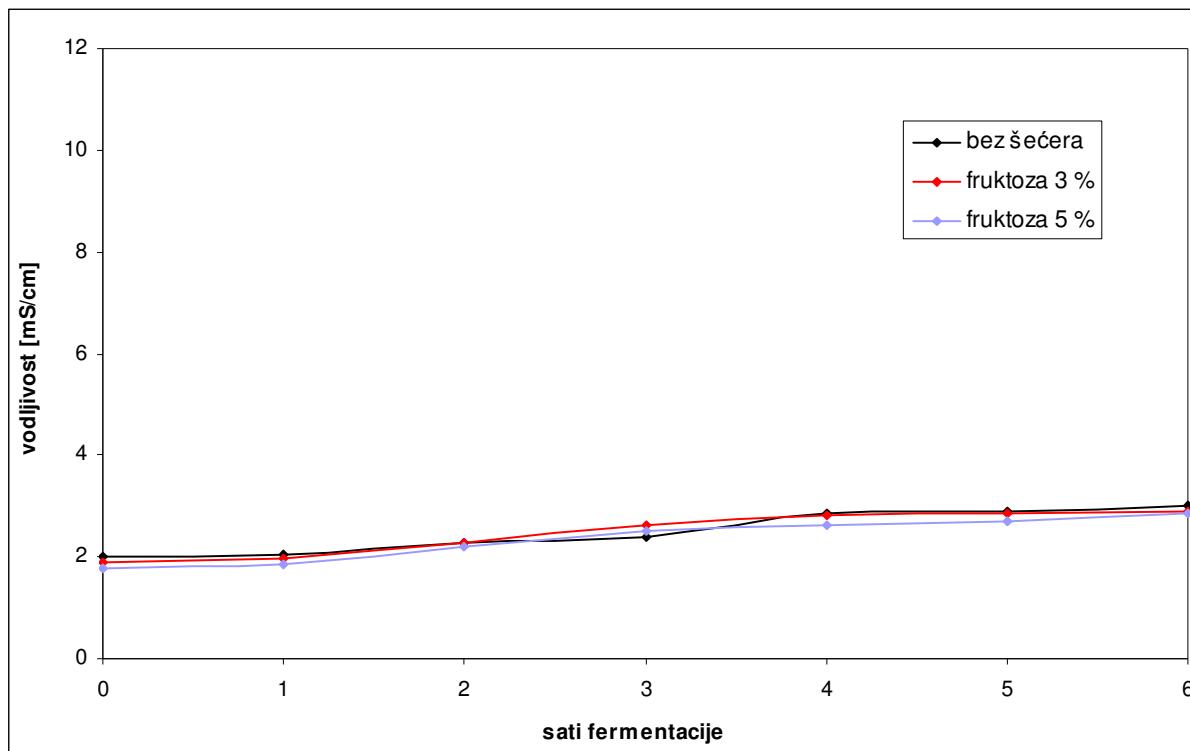
Slika 48 Promjena titracijske kiselosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjesi glukoze i fruktoze



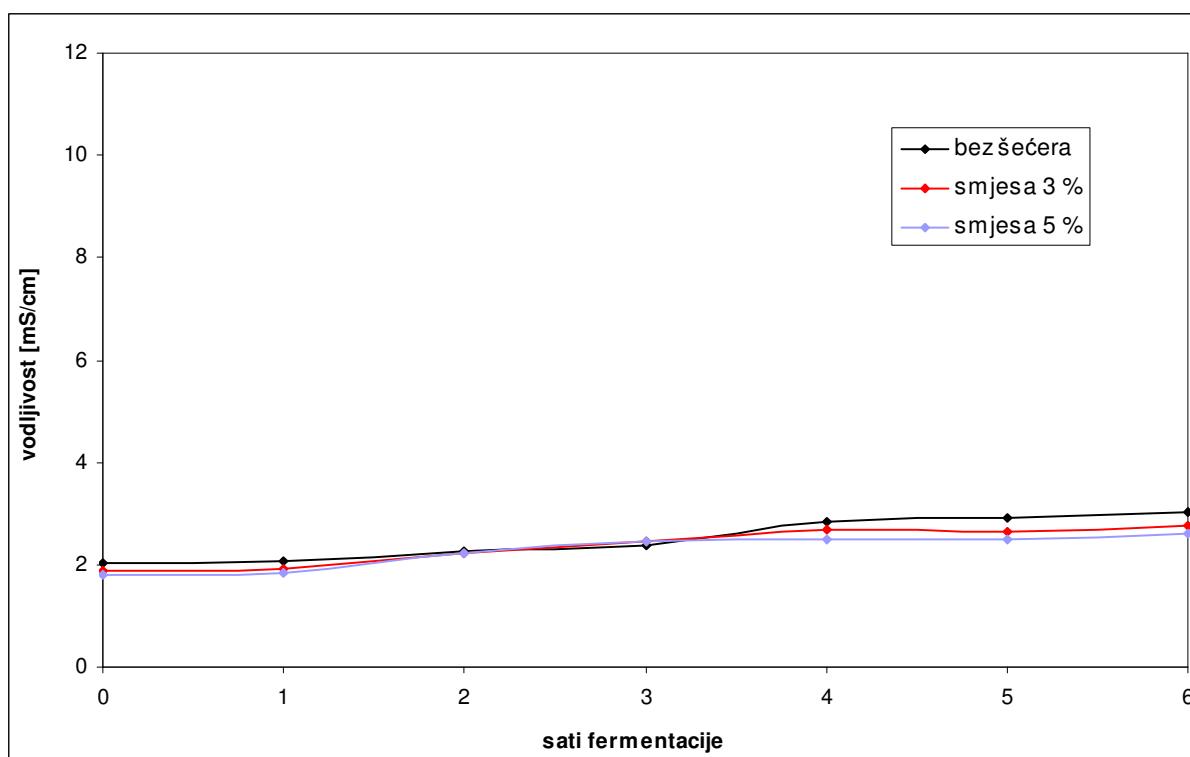
Slika 49 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak saharoze



Slika 50 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak glukoze



Slika 51 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak fruktoze



Slika 52 Promjena vodljivosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom bez i uz dodatak smjese glukoze i fruktoze

5. RASPRAVA

5.1. PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE

Praćenjem promjene pH vrijednosti tijekom šest sati fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom, uz dodatak tri vrste šećera, dobiveni su različiti rezultati.

Dodatak saharoze u **kravljie mlijeko** inokulirano ABT-5 kulturom ubrzao je pad pH vrijednosti u prvom satu fermentacije u odnosu na trend opadanja pH vrijednosti pri fermentaciji kravljeg mlijeka bez dodatka šećera (slika 5). U drugom satu fermentacije nisu utvrđene značajnije promjene. Nakon trećeg sata fermentacije pa sve do kraja, dodatak saharoze (5%) usporavao je pad pH u odnosu na nulti uzorak. Nakon trećeg sata fermentacije dodatak saharoze (3%) nije značajnije odstupao od nultog uzorka da bi naposljetku u šestom satu fermentacije fermentacija završio na istoj razini uzorka kojemu nije dodana saharozna. Očito je da saharozna u fermentaciji kravljeg mlijeka nema značajniji utjecaj na pad pH vrijednosti.

Utjecaj glukoze na brzinu opadanja pH vrijednosti ne razlikuje se značajnije od utjecaja saharoze. Do trećeg sata fermentacije dodatak glukoze je značajnije ubrzao pad pH u odnosu na nulti uzorak. Od trećeg sata fermentacije nema značajnijih promjena nultog uzorka i uzorka s dodatkom glukoze. Tijek šestosatne fermentacije uzorka kojima je dodano 3% i 5% glukoze gotovo je identičan s obzirom na trend opadanja pH vrijednosti. Iz prikaza se vidi (slika 6) da glukoza nema prebiotički učinak na ABT-5 kulturu.

Dodatak fruktoze pokazao je vrlo sličan učinak na tijek fermentacije kao i dodatak glukoze. U prva tri sata pH vrijednost uzorka sa fruktozom je padala nešto brže od kontrolnog uzorka (kravljie mlijeko sa ABT-5 kulturom). Nakon trećeg sata fermentacije u uzorcima sa 3% i 5% fruktoze sporije se snižavala pH vrijednost i to međusobno vrlo složno, te gotovo identično nultom uzorku, sve do kraja fermentacije. Nakon šest sati fermentacije uzorci s dodatkom šećera imali su jednaku pH vrijednost i nešto nižu od kontrolnog uzorka bez šećera. Prema tome, ni fruktoza se ne može preporučiti kao dobar prebiotički stimulator fermentacije kravljeg mlijeka ABT-5 kulturom.

Smjesa šećera glukoze i fruktoze ne pokazuje velika odstupanja u odnosu na prethodne šećere. Početna pH vrijednost bila je jednaka kod oba uzorka (3% i 5% smjese). Do trećeg sata fermentacije dodatak smjese šećera od 3% značajnije je snižavao pH vrijednost u odnosu na nulti uzorak i nešto manje u odnosu na dodatak smjese od 5% (slika 8). Do kraja fermentacije tijek opadanja pH vrijednosti kod dodatka smjese i bez je vrlo sličan. Kao prije spomenuti šećeri tako i smjesa glukoze i fruktoze nije pokazala poželjan prebrotički učinak na ABT-5 kulturu.

Tijekom fermentacije **kozjeg mlijeka** inokuliranog ABT-5 kulturom, uz dodatak šećera u udjelima 3% i 5% utvrđeni su potpuno drugačiji utjecaji u usporedbi s fermentacijom kravljeg mlijeka. Dodatak većeg udjela fruktoze (5%) brže je snižavao pH vrijednost od nižeg udjela dodavane fruktoze (3%). Slika 23.

Dodatak saharoze pokazao je vrlo zanimljiv učinak na tijek fermentacije kozjeg mlijeka ABT-5 kulturom. Od početka do kraja fermentacije vrlo je izražen pad pH vrijednosti uzorka sa saharozom u usporedbi s nultim uzorkom. Do trećeg sata fermentacije pad pH vrijednosti kod uzorka sa 3% i 5% saharoze bio je identično izražen (slika 21). Izoelektrična točka kod dodatka saharoze od 3% postignuta je vrlo brzo, prije četiri sata dok je 5%-tni uzorak postiže u četvrtom satu.

Uzorci kojima je dodano 3% i 5% glukoze pokazuju tijek fermentacije vrlo sličan kao kod dodatka saharoze. Krivulje promjene pH vrijednosti su gotovo jednake (slika 22). Pad pH vrijednosti u odnosu na nulti uzorak je puno brži. Izoelektrična točka kazeina ($\text{pH}=4,6$) je postignuta nešto prije četvrtog sata, kod uzorka sa dodatkom glukoze, dok kod kontrolnog uzorka se nije dostigla.

Sličan tijek promjena utvrđen je i kod uzorka sa dodatkom fruktoze, te dodatkom smjese glukoze i fruktoze. Uzorci s dodatkom fruktoze te smjese glukoze i fruktoze brže su snižavali pH vrijednost u odnosu na nulti uzorak tijekom cijele fermentacije. Može se uočiti da i nakon što su postignute izoelektrične točke, trend opadanja pH vrijednosti se nastavlja, vezano za uzorce s dodatkom (slike 23 i 24). Kontrolni uzorak ni u jednom slučaju, tijekom fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom, nije postigao vrijednost izoelektrične točke.

Prema tome, navedeni šećeri mogu se preporučiti kao dobar prebionički stimulator fermentacije kozjeg mlijeka inokuliranog ABT-5 kulturom (slike 21 do 24).

Praćenjem promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije **sojinog mlijeka** ABT-5 kulturom, utvrđeni su različiti utjecaji (slike 37 do 39) pojedinih šećera, u usporedbi s kravljim i kozjim mlijekom. Zanimljivo je da niti jedan kontrolni uzorak za šest sati fermentacije sojinog mlijeka nije postigao izoelektričnu točku kazeina. Dodatkom različitih vrsta šećera postignut je nagli pad pH vrijednosti i kod svih vrsta šećera izoelektrična točka je postignuta do šestog sata fermentacije (slike 37 do 40).

Dodatak saharoze u udjelu od 3% između drugog i trećeg sata fermentacije djeluje inhibitorno, ali se ipak u tom uzorku nakon 5,5 sati fermentacije postiže izoelektrična točka kazeina ($\text{pH}=4,6$). Kod uzorka sa 5% saharoze pH naglo opada nakon prvog sata fermentacije pa sve do četvrtog sata te postiže izoelektričnu točku prije nego uzorak s dodatkom saharoze od 3%. Iz tijeka krivulje (slika 37) se može zaključiti da dodatak saharoze od 5% može imati povoljniji promotorno prebionički učinak u odnosu na dodatak od 3%.

Dodatak glukoze u sojino mlijeko inokulirano ABT-5 kulturom intenzivno je smanjivao pH vrijednost. U četvrtom satu fermentacije dodatak glukoze od 3% imao je potpuno istu pH vrijednost kao i napitak sa 5% glukoze (slika 38).

Potpuno obrnuto od utjecaja fruktoze na fermentaciju kozjeg mlijeka, kod sojinog mlijeka udio fruktoze od 5% snižavao je pH vrijednost za 2,5 sati fermentacije ali je nakon četvrtog sata izoelektričnu točku postigao uzorak sa 3% fruktoze (slika 39).

Smjesa glukoze i fruktoze od 5% intenzivnije je snižavala pH vrijednost do trećeg sata fermentacije. Nakon trećeg sata pa do kraja fermentacije uzorci 3% i 5% smjese sporije su snižavali pH vrijednost, i to gotovo identično, sa istom pH-vrijednošću u šestom satu fermentacije (slika 40).

5.2. PROMJENE VRIJEDNOSTI ELEKTROKEMIJSKOG POTENCIJALA TIJEKOM FERMENTACIJE

Kako prema vrsti, tako i prema udjelima dodatka šećera, utvrđen je utjecaj na promjenu elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije različitih vrsta mlijeka inokulirano ABT-5 kulturom.

Najpovoljniji utjecaj na porast elektrokemijskog potencijala pri fermentaciji **kravljeg mlijeka** utvrđen je kod dodatka saharoze u udjelu od 3%. Nepovoljan utjecaj pokazala je sahariza u udjelu od 5%, koja je nakon trećeg sata pa do kraja fermentacije, snizila vrijednost elektrokemijskog potencijala do vrijednosti kontrolnog uzorka (slika 9). Glukoza i fruktoza u oba udjela (3% i 5%) pokazale su vrlo sličan učinak na promjenu elektrokemijskog potencijala tijekom fermentacije. Utvrđeno je da u šestom satu fermentacije vrijednost ovih uzoraka je u istoj točki (slika 10 i 11). U odnosu na dodatak ostalih šećera, smjesa glukoze i fruktoze pokazuje nepovoljan utjecaj na porast elektrokemijskog potencijala.

Pri fermentaciji **kozjeg mlijeka** inokuliranog ABT-5 kulturom nepovoljan utjecaj na porast elektrokemijskom potencijala imala je smjesa glukoze i fruktoze u udjelu od 5%, u nešto manjoj mjeri smjesa u udjelu od 3%. Gotovo do kraja drugog sata fermentacije, vrijednost elektrokemijskog potencijala uzorka sa 5% smjese je niža od vrijednosti uzorka bez dodatka šećera (slika 28). Uočena je zanimljivost da je do trećeg sata fermentacije rasla vrijednost elektrokemijskog potencijala uzorka sa većim udjelom saharoze (5%). Nakon trećeg sata pa do kraja fermentacije veću vrijednost postigao je uzorak sa manjim udjelom saharoze (3%). Dok je kod uzorka sa dodatkom fruktoze, obrnuto (slika 25 i 27). Dodatak glukoze u udjelima 3 i 5 % djeluje pozitivno na porast elektrokemijskog potencijala u odnosu na kontrolni uzorak, ali značajnije međusobne razlike nisu izražene (slika 26).

Praćenjem fermentacije **sojinog mlijeka** inokuliranog ABT-5 kulturom utvrđeno je da su svi šećeri u svim udjelima, tijekom cijele fermentacije, djelovali pozitivno na porast elektrokemijskog potencijala (slike 42 do 44). Izuzetak je sahariza u udjelu od 3%

koja je u početnom dijelu fermentacije sojinog mlijeka pokazala pad vrijednosti elektrokemijskog potencijala u odnosu na uzorak bez šećera (slika 41).

5.3. PROMJENE TITRACIJSKE KISELOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE

Pri fermentaciji **kravljeg mlijeka** ABT-5 kulturom titracijska kiselost kontrolnog uzorka rasla je progresivno nakon drugog sata fermentacije, te je nakon šest sati fermentacije dostigla vrijednost od 27,6 °SH. Kod uzorka sa dodatkom saharoze i glukoze u udjelima od 3% i 5% titracijska kiselost je u prvom satu fermentacije pala u odnosu na kontrolni uzorak. U trećem satu fermentacije utvrđena je ista vrijednost titracijske kiselosti kod uzorka s nižim dodatkom (3%) glukoze, fruktoze i smjese glukoze i fruktoze. Nakon četvrtog sata, pa sve do kraja fermentacije, titracijska kiselost svih vrsta šećera u oba udjela je rasla. Vrlo je izraženo titracijska kiselost rasla kod uzorka sa dodatkom smjese u udjelu od 3%, te je na kraju fermentacije porasla za 5,2 °SH u odnosu na kontrolni uzorak (slike 13 do 16). Iz toga se može zaključiti da bi se sve vrste šećera mogle koristiti kao prebiotici za stimulaciju rasta ABT-5 kulture u kravljem mlijeku.

Dodatak raznih vrsta i udjela šećera pri fermentaciji **kozjeg mlijeka** inokuliranog ABT-5 kulturom rezultirao je značajno različitim utjecajem na tijek fermentacije u odnosu na kravljie i kozje mlijeko. Kod svih uzorka sa dodatkom šećera, titracijska kiselost je od početka, pa do kraja fermentacije imala nižu vrijednost od kontrolnog uzorka. Iz dijagrama na slikama 29 do 32 vidljivo je da se ni jedan šećer ne može koristiti kao prebiotik.

Sojino mlijeko kao specifičan supstrat, u najvećoj je mjeri stimuliralo rast ABT-5 kulture dodatkom različitih šećera za razliku od kravljeg i kozjeg mlijeka. Titracijska kiselost kontrolnog uzorka rasla je do kraja fermentacije i u šestom satu fermentacije postigla je vrijednost od 13,2 °SH (slike 45 do 48). Kod uzorka sa dodatkom različitih vrsta šećera u oba udjela, u počecima fermentacije titracijska kiselost je imala nižu vrijednost u odnosu na kontrolni uzorak, te je do kraja fermentacije

titracijska kiselost značajno porasla u odnosu na uzorak bez dodatka šećera. Uzorci sa dodatkom saharoze, te smjese glukoze i fruktoze u udjelu od 5% u šestom satu fermentacije postigli su višu vrijednost titracijske kiselosti od uzorka sa nižim udjelom (3%). Kod dodatka fruktoze u udjelu od 3% titracijska kiselost je na kraju fermentacije porasla za 6,8 u odnosu na kontrolni uzorak te za 0,8 u odnosu na uzorak sa višim udjelom fruktoze dok je kod dodatka glukoze postigla istu vrijednost u udjelu od 3 i 5%. Iz toga se može zaključiti bi se sve vrste šećera mogli koristiti kao prebiotici za stimulaciju rasta ABT-5 kulture u sojinom mlijeku, te da je najpovoljniji šećer fruktoza u 3%-nom udjelu.

5.4. PROMJENE VODLJIVOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE

Dodatak svih vrsta šećera pri fermentaciji **kravlje mlijeka** ABT-5 kulturom usporavao je porast vodljivosti supstrata tijekom cijelog tijeka fermentacije (slike 17 do 20). Udjeli šećera od 5% značajnije su utjecali na smanjenje vodljivosti od udjela šećera od 3%, uspoređujući s uzorkom bez dodatka šećera.

Kod fermentacije **kozjeg mlijeka** ABT-5 kulturom, sve vrste šećera usporavale su porast vodljivosti (slike 33 do 36) nešto značajnije nego kod kravlje mlijeka. Usporavanje porasta vodljivosti bio je jače izraženo kod dodatka šećera sa udjelom od 5%.

Dodatak šećera pri fermentaciji **sojinog mlijeka** ABT-5 kulturom djelovao je na sasvim drugi način na vodljivost. Fermentacijom sojinog mlijeka vodljivost je vrlo sporo rasla svih šest sati fermentacije. Krivulje fermentacije kontrolnog uzorka i uzorka sa dodatkom šećera gotovo su paralelne svih šest sati fermentacije (slike 49 do 52). Uspoređujući fermentaciju sojinog mlijeka sa fermentacijom kravlje i kozje mlijeka, vidljivo je da su pri fermentaciji sojinog mlijeka utvrđene puno niže vrijednosti vodljivosti, te da se tijekom fermentacije samo neznatno povećava.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

- Fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka ABT-5 kulturom, uz dodatak različitih vrsta šećera u udjelima od 3 i 5%, tekle su različito.
- Kod fermentacije kravljeg mlijeka ABT-5 kulturom saharoza nije skraćivala vrijeme fermentacije pa se ne može preporučiti kao prebiotički promotor rasta ABT-5 kulture.
- Glukoza, fruktoza i smjesa glukoze i fruktoze, neznačajno su skraćivali vrijeme fermentacije kravljeg mlijeka. Ovi šećeri se ne mogu preporučiti kao stimulatori rasta ABT-5 kulture.
- Dodatkom različitih vrsta šećera u udjelima od 3 i 5% u kozje mlijeko značajno je skraćeno vrijeme fermentacije kozjeg mlijeka, pa se mogu koristiti kao prebiotički promotor rasta ABT-5 kulture.
- Dodatak većeg udjela fruktoze (5%) brže je snižavao pH vrijednost od nižeg udjela dodavane fruktoze (3%), kod fermentacije kozjeg mlijeka.
- Kod fermentacije sojinog mlijeka ABT-5 kulturom na kinetiku fermentacije pozitivno su utjecali šećeri glukoza i fruktoza, te u manjoj mjeri saharoza i smjesa glukoze i fruktoze.
- Dodatak saharoze od 5% ima povoljniji promotorno prebiotički učinak u odnosu na dodatak u udjelu od 3%.
- Na osnovi rezultata istraživanja, očito je da na ovom području ima prostora za dodatna istraživanja, kojima bi se proširile spoznaje o utjecaju šećera kao prebiotičkog dodatka.

7. LITERATURA

- [1] L.J. Tratnik: *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikobiologija*. Hrvatska mlijekarska udruga. Zagreb, 1998.
- [2] Narodne novine: 102/2000. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Dostupno na url: http://www.poslovniforum.hr/poljoprivreda/zakoni_ml/pravilnik.asp (27. 05. 2009)
- [3] B. Mioč, V. Pavić: Kozarstvo. Hrvatska mlijekarska udruga. Zagreb 2002.
- [4] C. Martin-Hernandez, M. Juarez: Retention of main and trace elements in four type of goat cheese. *J. Dairy Sci.* **72**, 1092-1109, 1989.
- [5] M. Loewenstein, S. J. Speck, H. M. Barnhart, J. F. Frank: Research on goat milk products: A review. *J. Dairy Sci.* **63**, 1631-1649, 1980
- [6] R. Božanić, Lj. Tratnik, O. Marić: Utjecaj kozjeg mlijeka na viskoznost i mikrobiološku kakvoću jogurta tijekom čuvanja. *Mlijekarstvo* **48**, 63-74, 1998.
- [7] S. Feldhofer, S. Banožić, N. Antunac: Uzgoj i hranidba koza - proizvodnja i prerada kozjeg mlijeka. Hrvatsko mlijekarsko društvo. Zagreb, 1994.
- [8] Y. W. Park: Relative buffering capacity of goat milk cow milk, soy-based infant formulas, and commercial nonprescription antacid drugs. *J. Dairy Sci.* **74**, 26-33, 1991.
- [9] M. A. Mehaia: The fat globule size distribution in camel, goat, ewe, and cow milk: Changes within milking and effects of a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* **67**, 1905-1913, 1984.
- [10] R. Jenness: Composition and characteristics of goat milk: Review. *J. Dairy Sci.* **67**, 1905-1913, 1984.
- [11] Y. W. Park, R. Attaie: Comparison of buffering capacity of goat milk with cow milk, comercial soy base infant formula. *J. Dairy Sci.* **69**, 193-203, 1986.
- [12] W. N. Sawaya, W. J. Safi, F. Al-Shalhat, M. M. Al-Mohammed: Chemical composition and nutritive value of goat milk. *J. Dairy Sci.* **67**, 1665-1672, 1984.
- [13] R. Božanić, Lj. Tratnik, I. Drgalić: Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mlijekarstvo* **52**, 207-237, 2002.
- [14] S. Kanthamani, A. I. Nelson, M. P. Steinberg: Home preparation of soymilk: a new concept. U: Whole soybean foods for home and village use. New York, 1978.

- [15] D. Tsangalis, N. P. Shah: Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acid in soymilk by probiotic bifidobacteria. **Int. J. Food Sci. Technol.** **39**, 541-554, 2004.
- [16] Z. Bark: Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Israel Institute of Technology for FAO Agricultural Services Bulletin. FAOUN. Rome, 1992.
- [17] I. Kovačević: Mogućnost proizvodnje fermentiranih napitaka na osnovi mješavine kravlje mlijeka i sojinog mlijeka. Diplomski rad. Osijek, 1990.
- [18] D. N. Yadav, G. S. Chauhan, O. P. Chauhan, P. Sharma, A. Bajpai: Quality Evaluation of Curd Prepared from Milk-Soymilk Blends. **J. Food Sci. Technol.** **40**, 403; 2003.
- [19] R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. **Mljarstvo** **56**, 233-254, 2006.
- [20] J.J.B. Anderson, M. Anthony, M. Messina, S.C. Garner: Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutr. Res. Rev.** **12**, 75-116, 1999.
- [21] J. Šušković, B. Kos, J. Frece, S. Matošić: Pozvano predavanje: Simbiotički učinak bakterija mliječne kiseline: kritički pristup. Zbornik sažetaka. 35. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka. Lovran, 11, 2002.
- [22] A. M. P. Gomes, F. X. Malcata: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Sci. Technol.** **10**, 139-157, 1999.
- [23] A. Y. Tamine, R. Božanić, I. Rogelj: Probiotički fermentirani mliječni proizvodi. **Mljarstvo** **53**, 111-134, 2003.
- [24] C. Daly, R. Davis: The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. **Agr. Food Sci. Finland.** **7**, 219-250, 1998.
- [25] H. Pavlović: Djelovanje probiotičkih bakterija iz fermentiranog kozjeg i kravlje mlijeka na *Campylobacter jejuni*, *Serratia marcenses* i *Staphylococcus aureus*. Magistarski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Zagreb, 2003.

- [26] <http://www.probiotics.com/html/ProbioticProducts/PicturesofProbiotics.htm> (28. 05. 2009.)
- [27] <http://www.vuka.hr/index.php?id=349> (28. 05. 2009.)
- [28] M. E. Stiles, W. H. Holzapfel: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. Dairy J.** **8**, 563-572, 1998.
- [29] R. Božanić, I. Rogelj, Lj. Tratnik: Fermentacija i čuvanje probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka. **Mljetkarstvo** **52**, 93-111, 2002.
- [30] <http://www.tehnologijahrane.com/mleko/dodaci/starter-kulture-u-tehnologiji-mlijeka> (29. 05. 2009.)
- [31] <http://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2008/01/streptococcus-thermophilus-i-lactobacillus-delbrueckii.jpg> (09. 06. 2009.)
- [32] R.G. Crittenden: Prebiotics. U: *Probiotics: A Critical Review*, (Tannock, G.W.,ured.), Horizon Scientific Press, 141-156, Wymondham, 1999.
- [33] <http://www.probiotics.com> (09. 06. 2009.)
- [34] K. D. Arunachalam: Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutr. Res.** **19**, 1559-1597, 1999.
- [35] Acidoverus. http://www.vals.hr/proizvodi_a.htm (12. 06. 2009.)
- [36] M. Hruškar, I. Bucak, N. Vahčić: Aroma probiotičkog jogurta sa i bez dodataka. **Mljetkarstvo** **53**, 195-210, 2003.
- [37] J. Huebner, R. L. Wehling, R. W. Hulkins: Functional activity of commercial prebiotics. **Int. Dairy J.** **17**, 770–775, 2007.
- [38] <http://www.biofarm.hr/milupa2.php?id=63> (12. 06. 2009.)
- [39] <http://www.zdravljeizivot.com/include/pdf/inumal.pdf> (12. 06. 2009.)
- [40] J. Šušković, B. Kos, J. Frece, S. Beluhan, S. Matošić: Sinbionička svojstva *Lactobacillus acidophilus* M92. **Mljetkarstvo** **53**, 83-110, 2003.
- [41] J. Šušković, B. Kos, J. Goreta, S. Matošić: Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Food Technology and Biotechnology** **39**, 227-235, 2001.