

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

PETRA HANJŠ

**INHIBICIJA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* TIJEKOM
ČUVANJA FERMENTIRANIH MLIJEKA S DODATKOM
MEDA POMOĆU *Lactobacillus casei***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2009.

BIBLIOGRAFSKI PODACI

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Institucija u kojoj je rad izrađen: Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku

Nastavni predmet: Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

Mentor: Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. , komentor: dr. sc. Vedran Slačanac, doc.

Broj stranica: 47

Broj tablica: 11

Broj slika: 26

Broj literaturnih referenci: 28

Broj priloga: 5

Datum obrane: 18. rujna 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. Jurislav Babić, doc.	zamjena člana

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Kuhačeva 20.

Predlagatelj teme **dr. sc. Jovica Hardi, red. prof.** imenovan je mentorom izrade diplomskog rada na 7. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta održanoj 21. siječnja 2009. godine, a temeljem članka 62. Pravilnika o studiranju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Zbog iznimnog doprinosa u postavljanju plana istraživanja, te učešća u svim fazama istraživanja i pripreme rada za javnu obranu, **prof. Hardi dodijelio je komentorstvo** dr. sc. Vedranu Slačancu, docentu PTF Osijek.

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

INHIBICIJA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* TIJEKOM ČUVANJA FERMENTIRANIH MLIJEKA S DODATKOM MEDA POMOĆU *Lactobacillus casei*

Sažetak

U radu je istražen utjecaj fermentiranih probiotičkih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog i kestenovog meda prema patogenoj bakteriji *Yersinia enterocolitica*. Za pripravu napitaka korištena je monokultura *Lactobacillus casei* Lc-01, a fermentirano je UHT kravlje mlijeko s 2,8% mliječne masti, UHT kozje mlijeko s 3,2% mliječne masti, te sojino mlijeko s 2,2% masti. Dvije vrste meda dodavane su u mlijeko prije fermentacije u udjelima od 2 i 5%. Fermentacija je provedena na 37 °C u trajanju od 25 sati, a nakon toga proizvodi su čuvani na 4 °C. Titracijska kiselost, pH-vrijednost i broj probiotičkih bakterija utvrđeni su nakon 25 sati fermentacije, te nakon 7, 14 i 21 dan čuvanja. Kravlje mlijeko fermentirano s Lc-1 najjače je inhibiralo rast bakterije *Yersinia enterocolitica* s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 2% 21. dan čuvanja. Kozje fermentirano mlijeko najjače je inhibiralo rast bakterije *Yersinia enterocolitica* s dodatkom bagremovog i kestenovog meda u udjelu od 5% u 21. danu čuvanja. Sojino mlijeko fermentirano s Lc-01, najjače je inhibiralo *Yersinia enterocolitica* uz dodatak kestenovog meda u udjelu od 5% u 21. danu čuvanja. Bagremov med je u svim proizvodima u svim fazama čuvanja slabije inhibirao rast *Yersinia enterocolitica* u odnosu na kestenov med.

Ključne riječi: kravlje, kozje i sojino mlijeko, *Lactobacillus casei* Lc-01, med, *Yersinia enterocolitica*, inhibicija

INHIBITION OF *Yersinia Enterocolitica* GROWTH DURING COLD STORAGE OF HONEY-SWEETENED MILKS FERMENTED BY THE USE OF *Lactobacillus casei* Lc-01

Summary

Influence of honey sweetened fermented goat's, cow's and soy milk on the growth of *Yersinia enterocolitica* was determined. Long life cow (2.8% of milk fat), goat (3.2% of milk fat) and soy (2.2% of fat) were fermented with monoculture *Lactobacillus casei* Lc-01. Acacia and chestnut honey were added before fermentation in contents of 2 and 5% w/w. Fermentation was conducted at 37 °C for 25 hours; well the cold storage was conducted at 4 °C for 21 days. During fermentation, as well as during cold storage physico-chemical and microbiological parameter were determined as follows: titration acidity, pH values and viable cells number of *Lactobacillus casei* Lc-01. The strongest inhibitory action against *Yersinia enterocolitica* had fermented cow milk stored 21 days, with 2% of chestnut honey addition. Goat fermented milk and stored 21 day, with addition of acacia and chestnut honey of 5%, also strongly inhibited *Yersinia enterocolitica* growth. Soy milk, fermented for 25 hours and cold stored 21 days, inhibited the growth of *Yersinia enterocolitica* in case when 5% of chestnut honey was added. In all cases, without regard to the type of milk, chestnut honey expressed higher antagonistic potential against *Yersinia enterocolitica* than acacia honey.

Keywords: cow's milk, goat's milk, soymilk, *Lactobacillus casei* Lc-01, honey, *Yersinia enterocolitica*, inhibition

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. sc. Jovici Hardiju i komentoru docentu Vedranu Slačancu na predloženoj temi i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem dipl. ing. Mireli Lučan i dr. sc. Hrvoju Pavloviću na pomoći kod izrade eksperimentalnog rada i u obradi rezultata.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, braći i sestrama što su vjerovali u mene i moje rezultate, podržavali me u svakom trenutku i što su se odrekli svega kako bi mi omogućili da završim ovaj studij. Hvala što ste me uvijek s velikim optimizmom vodili kroz život...

Zahvaljujem Marku na velikoj podršci. Hvala ti što si bio uz mene kada mi je to bilo najpotrebnije.

HVALA VAM!

SADRŽAJ

Str.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KRAVLJE MLIJEKO	4
2.2. KOZJE MLIJEKO	6
2.2.1. Usporedba sastava kravljeg i kozjeg mlijeka	8
2.3. SOJINO MLIJEKO	10
2.3.1. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka	12
2.4. SVOJSTVA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA	13
2.5. VRSTE RODA <i>Lactobacillus</i>	14
2.5.1. <i>Lactobacillus casei</i>	15
2.6. MED	16
2.6.1. Bagremov med	17
2.6.2. Kestenov med	17
2.7. <i>Yersinia enterocolitica</i>	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK RADA	20
3.2. MATERIJALI I METODE	20
3.2.1. Priprava uzoraka	20
3.2.1.1. Priprava filtrata bez stanica	20
3.2.2. Određivanje aktivne kiselosti	21
3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti	21
3.2.4. Priprava suspenzije bakterijskih stanica <i>Yersinia enterocolitica</i>	21
3.2.5. Određivanje broja probiotičkih bakterija	22
3.2.6. Određivanje inhibicije bakterije <i>Yersinia enterocolitica</i> različitim vrstama fermentiranih mlijeka	22

4. REZULTATI	23
4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO – KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM ČUVANJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLJEKA S MONOKULTUROM <i>Lactobacillus casei</i>	24
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA <i>Yersinia enterocolitica</i> FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM S MONOKULTUROM <i>Lactobacillus casei</i>	34
5. RASPRAVA	36
5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom čuvanja	37
5.2. Promjene intenziteta zakiseljavanja (titracijske kiselosti) tijekom čuvanja	37
5.3. Promjene broja bakterija <i>Lactobacillus casei</i> tijekom čuvanja	38
5.4. Usporedba inhibicije bakterije <i>Yersinia enterocolitica</i> fermentiranim kravljim, kozjim i sojinim mlijekom	39
6. ZAKLJUČCI	40
7. LITERATURA	42
8. PRILOZI	45

Posljednjih desetljeća, probiotički fermentirani napici, postali su, za potrošače, iznimno važan proizvod. Nepravilna prehrana, kronične bolesti, te vrijeme izloženosti stresu, utječu na povećanu potrošnju probiotičkih proizvoda.

Zbog unosa probiotičkih mikroorganizama u ljudski probavni sustav probiotički fermentirani napici su najpopularniji komercijalni i industrijski mliječni proizvodi. Dobivaju se kontroliranim procesom mliječno-kisele fermentacije, a popularni su, ne samo zbog terapijskih svojstava, nego i zbog karakteristične arome, izgleda, okusa i konzistencije.

Probiotici su kulture živih mikroorganizama koji uneseni u ljudski organizam, pozitivno djeluju na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtonih kultura. Oni zaustavljaju umnažanje patogenih bakterija i sprječavaju njihovo djelovanje, što pomaže očuvanju mikroflore u crijevima, pospješuje rad imunološkog sustava i čuva organizam od bolesti.

U fermentirane mliječne proizvode se dodaju i prebiotici koji su neprobavljivi ugljikohidrati i selektivnom stimulacijom rasta bakterija povoljno utječu na zdravlje domaćina. Pospješuju preživljavanje probiotika, ali služe i kao blagi zaslađivači, te poboljšavaju okus i teksturu proizvoda. Med ima dobra prebiotička svojstva, djeluje baktericidno i antifungalno. Organizam najbolje usvaja med otopljen u tekućini (voda, čaj, mlijeko) ili u ustima.

Yersinia enterocolitica je bakterija koja se nalazi na biljnom materijalu, vodi, zemlji, mesu, mlijeku, mliječnim proizvodima. U čovjeka uzrokuje alimentarne toksikoinfekcije, a također producira toksin koji je termorezistentan, zbog čega je proučavanje njezinih osobina od velike važnosti.

Cilj ovog rada bio je utvrditi prebiotički učinak dvije vrste meda na fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, te utjecaj istih fermentiranih napitaka na odabranu bakteriju *Yersinia enterocolitica* tijekom 21 dan čuvanja. Za stimulaciju rasta kulture korištene su obje vrste meda u udjelima od 2% i 5%. Tijekom rada, u uzorcima fermentiranog mlijeka, praćeni su odabrani parametri fermentacije: pH, udio mliječne kiseline i promjena broja probiotičkih stanica u fermentiranom mlijeku.

Svrha ovog rada bila je istražiti koja vrsta mlijeka fermentirana probiotičkim bakterijama mliječne kiseline, te dodatkom dvije vrste meda u različitim udjelima, posjeduje veći inhibirajući učinak na odabranu patogenu bakteriju tijekom 21 dan čuvanja.

2.1. KRAVLJE MLIJEKO

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složena sastava, žućkasto bijele boje, karakteristična okusa i mirisa, koju izlučuje mliječna žlijezda ženki sisavaca. 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), te dobi i broju mužnje, a naročito o samom individuumu (dob, tjelesna masa, kretanje i slično).

Pod pojmom „mlijeko“ uvijek se podrazumijeva „kravlje mlijeko“, dok se ostale vrste mlijeka moraju istaknuti oznakom: „ovčje“, „kozje“, „bivoljično“, „kobilje“, „devino“, „majčino“ itd. Mlijeko je normalni sekret mliječne žlijezde, koji dobivamo redovitom i neprekidnom mužnjom, jedne ili više zdravih krava, ispravno hranjenih, ispravno držanih, kojem nije ništa oduzeto niti dodano [1].

Prema našim propisima mlijeko mora zadovoljiti ove uvijete:

- da je pomuzeno najmanje 30 dana prije i ne manje od 10 dana nakon teljenja;
- da ima karakterističan mliječni okus, miris i boju;
- da nema ostataka lijekova ili drugih štetnih tvari u količinama koje mogu narušiti zdravlje ljudi;
- da točka leđišta nije viša od $-0,517^{\circ}\text{C}$, a refrakcijski broj niži od 39 (da nema dodane vode);
- da u 1 mL mlijeka nema više od 400.000 somatskih stanica (epitelne stanice vimena i stanice krvi), jer veći broj upućuje na upalu vimena (mastitis) [1].



Slika 1 Kravlje mlijeko [2]

Najčešće su udijeli glavnih sastojaka u svježem mlijeku u sljedećem rasponu [1]:

- udio vode 86-89%
- udio suhe tvari 11-14%
 - mast 3,2-5,5%
 - proteini 2,6-4,2%
 - laktoza 4,6-4,9%
 - mineralne tvari (pepeo) 0,6-0,8%

Tablica 1 Prosječni kemijski sastav kravljeg mlijeka [1]

<i>SASTOJCI</i>	<i>UDIO (%)</i>	<i>UDIO U SUHOJ TVARI (%)</i>
Laktoza	4,80	37,50
Mast	3,70	28,90
Proteini	3,70	26,60
Mineralne tvari	0,70	5,50
NPN*	0,19	1,50

NPN* -neproteinski dušik (mali peptidi, slobodne aminokiseline, aminošećeri, kreatin, kreatinin, urea, ureinska kiselina i druge)

Voda se u mlijeku nalazi u dva oblika:

- uglavnom kao slobodna voda (u kojoj se nalaze otopljeni sastojci mlijeka)
- ili kao vezana voda (mali udio 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%)
- membrane masnih globula (oko 15%)
- laktozu i ostale sastojke (oko 5%)

Najveću sposobnost vezanja vode imaju fosfolipidi mlijeka i albumini, a potom ostali proteini sirutke, kazein, adsorpcijski sloj membrana masnih globula, laktoza, te ostali sastojci suhe tvari mlijeka.

Mliječna mast: utječe na ugodan okus mlijeka, te aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Ona ima najveću energijsku vrijednost (9 kcal/g ili 37 kJ/g). Udio mliječne masti može biti najviše promjenjiv (od 2,5 do 6,0%).

Šećer: laktoza je sastavljena od α -D-glukoze i β -D-galaktoze. U mlijeku je prisutna u udjelu od 4,5 do 4,8%.

Proteini: u proteinima mlijeka nalaze se dva glavna tipa potpuno različitih proteina: kazein i proteini sirutke (u omjeru 80 : 20 %). Kazeini se lako talože iz mlijeka (djelovanjem kiseline ili enzima), dok su proteini sirutke neosjetljivi na djelovanje kiseline ili enzima, pa obično zaostaju u otopini (sirutka) po kojoj su i dobili naziv.

Enzimi: u mlijeku dvojakog su podrijetla. Endogeni enzimi mlijeka potječu iz mliječne žlijezde, a egzogeni enzimi od mikroorganizama i ne smatraju se normalnim sastojkom mlijeka.

Mineralne tvari: u mlijeku je identificirano 40 različitih mineralnih tvari, a prema njihovu udjelu ubrajaju se u makro elemente i mikro elemente. Mikroelemenata u mlijeku ima brojčano puno više nego makroelemenata, ali je većina od pronađenih (Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Cu, F, Sr, Mo i drugi) prisutna samo u tragovima. Makroelementi u mlijeku nalaze se uglavnom u obliku anorganskih ili organskih soli.

Vitamini: u mlijeku su prisutni kao topljivi u mastima (A, D, E, K), te vitamini topljivi u vodi (B, C) [1].

2.2. KOZJE MLJEKO

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

Kozje mlijeko je od davnina smatrano proizvodom koji djeluje blagotvorno 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 [3].

Sastav kozjeg mlijeka značajno se mijenja, ovisno o genotipu koza i pasmini, redoslijedu i stadiju laktacije, te godišnjem dobu. Kozje mlijeko ima karakterističan „kozji“ okus, koji potječe od slobodnih kratko lančanih masnih kiselina. Do razvoja nepoželjnog okusa može doći tijekom lošeg postupanja s mlijekom, od trenutka mužnje do predaje ili proizvodnje određenih proizvoda. Nastajanje specifičnog okusa kozjeg mlijeka usko je povezano s prirodom različitih sastojaka mlijeka, kao i biokemijskim i enzimskim činiocima. Veliki utjecaj također imaju primijenjeni postupci obrade, koji mogu dovesti do degradacije pojedinih sastojaka mlijeka, između ostalog hladno skladištenje i homogenizacija. Hladno skladištenje potiče značajan porast udjela kaprilne (C₈) i kaprinske (C₁₀) kiseline, dok homogenizacija vodi do porasta

koncentracije laurinske (C_{12}) i palmitinske (C_{16}) kiseline. Utvrđeno je da u nastanku karakterističnog okusa kozjeg mlijeka ključnu ulogu ima lipazna aktivnost i spontana lipoliza, te utjecaj slobodnih masnih kiselina [4].

Kozje mlijeko sadrži više otopljenog kalcija, pa je osjetljivo na djelovanje proteolitičkih enzima. Kozje mlijeko je vrlo osjetljivo na zagrijavanje i pojedini autori navode da ono ne može podnijeti UHT postupak toplinske obrade. Djelovanjem topline tijekom toplinske obrade mlijeka može doći do koagulacije zbog niske stabilnosti, što rezultira sedimentacijom u UHT mlijeku. Ovaj se problem može riješiti reguliranjem pH mlijeka iznad 7,0 i smanjenjem razine ionskog kalcija dodatkom EDTA. Zagrijavanje kozjeg mlijeka na temperaturu iznad 60 °C, uzrokuje destabilizaciju sirutkinih bjelančevina. Na temperaturi 100 °C, oko 76% ukupnih sirutkinih bjelančevina je destabilizirano, što rezultira povećanjem udjela neproteinskog dušika [5].

Kozjem mlijeku se danas pridaje sve veći značaj. U odnosu na ostale vrste mlijeka, proizvodnja kozjeg mlijeka je u najvećem porastu. Kozje mlijeko ima znatne terapijske i dijetetske prednosti, ali je, nažalost, puno slabije istraženo u odnosu na kravlje mlijeko. Kozje mlijeko čini svega 2% ukupne svjetske proizvodnje, a u prehrani se sve više ističu njegove prednosti [4].



Slika 2 Kozje mlijeko [6]

Mliječna mast: utječe na ugodan okus mlijeka, te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Kratkolančane masne kiseline daju mliječnoj masti izvanrednu probavljivost, brzo oksidiraju, a mliječna mast opskrbljuje organizam esencijalnim masnim kiselinama i u masti topljivim vitaminima (A, D, E, K). Mliječnu mast kozjeg mlijeka uglavnom čine trigliceridi (96 do 99 %), dok ostatak otpada na fosfolipide, mono i digliceride, slobodne masne kiseline i sterole. Od ukupne količine masnih kiselina u mliječnoj masti kozjeg mlijeka, 67 % su zasićene masne kiseline. Najpromjenjiviji sastojak kozjeg mlijeka je mliječna mast (2 do 8 %) [3].

Šećeri: laktoza je glavni ugljikohidrat koji je prisutan u kozjem mlijeku. Sastoji se od glukoze i galaktoze. Slatka je i daje blago slatkast okus mlijeku. Udio laktoze iznosi od 4,3 do 4,6 %. Značajan je izvor energije, pospješuje djelovanje probavnog sustava i povećava sposobnost organizma za vezanje fosfora i kalcija [4]. Udio laktoze u mlijeku koristi se za izračunavanje energetske vrijednosti mlijeka [3].

Proteini: kozje mlijeko sadrži 4,7 % proteina, koji dolaze u obliku koloidne disperzije. Najzastupljeniji su kazein i protein sirutke (albumin i globulin). Oni kataliziraju važne reakcije u ljudskom organizmu, vežu mineralne tvari i vitamine, te stabiliziraju okus mlijeka i mliječnih proizvoda [4].

Vitamini: u kozjem mlijeku se nalaze vitamini A, D, E i K koji su topljivi u mastima, te vitamini topljivi u vodi (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂ i C). Karoten je u kozjem mlijeku prisutan u obliku provitamina koji je bezbojan, te je stoga kozje mlijeko bijele boje, kao i proizvodi od kozjeg mlijeka [4]. Udio pojedinih vitamina sadržan u litri mlijeka gotovo je dovoljan za podmirenje dnevnih potreba čovjeka za određenim vitaminom [5].

Mineralne soli: kozje mlijeko ima 9,8 % mineralnih soli, koje se nalaze u molekularnom, ionskom i koloidnom obliku. Izvrstan je izvor bio raspoloživog kalcija, fosfora i magnezija, jer sadrži veće udjele tih tvari u topljivom obliku [4].

2.2.1. Usporedba sastava kravljeg i kozjeg mlijeka

Kozje mlijeko ima određene prednosti nad kravljim mlijekom, iako su sve količine glavnih sastojaka u oba mlijeka vrlo slične [1]. Kozje mlijeko razlikuje se od kravljeg višim udjelom neproteinskog dušika, manjim udjelom koagulirajućih bjelančevina, većom varijabilnošću fizikalnih i kemijskih svojstava, nižom toplinskom stabilnošću i različitim lipolitičkim sustavom [5].

Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka i učinkovitija je apsorpcija aminokiselina. Udio ukupnih aminokiselina podjednak je u oba mlijeka [3]. Na kazein otpada 75 % od ukupnog udjela bjelančevina, a sastoji se od α_{s1} , α_{s2} , β_1 , β_2 i κ -kazeina. Ostalih od 25 % otpada na bjelančevine mliječnog seruma α -laktoalbumin i β -laktoglobulin [5].

Mast kozjeg mlijeka sastavljena je od triglicerida (98 do 99 %), a sastav masti karakterizira visok udio (20 %) nižih masnih kiselina, u odnosu na mast kravljeg mlijeka (12 %). Od nižih masnih kiselina najznačajnije su kapronska, kaprilna i kaprinska, koje mlijeku daju karakterističan „kozji miris“ [5]. Kozje mlijeko sadrži manje kolesterola u odnosu na kravlje. Razlika u mliječnoj masti kozjeg i kravljeg mlijeka je u zasićenosti i duljini lanca masnih kiselina. Mast kozjeg mlijeka je probavljivija od masti kravljeg mlijeka, jer su masne globule kozjeg mlijeka manje i ima ih više, ukupna masna površina im je veća, te ih lipaze u crijevima lakše razgrađuju. Manje globule masti bolje su raspršene u mlijeku, pa osiguravaju puno bolju homogenost kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje [4].

Kozje mlijeko sadrži više: kalcija, kalija, magnezija, fosfora, klora i mangana, a manje: natrija, željeza, sumpora, cinka i molibdena u odnosu na kravlje mlijeko. Kozje mlijeko sadrži manje vitamina B₂ i B₁₂ u odnosu na kravlje mlijeko, a sadržaj vitamina C i D je nizak i podjednak u oba mlijeka. Udio karotenoida je neznatan, što je uzrok bijele boje kozjeg mlijeka i mliječnih proizvoda [5].

Tablica 2 Kemijski sastav kozjeg i kravljeg mlijeka (%) [5]

<i>KEMIJSKI SASTOJAK</i>	<i>KOZJE MLIJEKO</i>	<i>KRAVLJE MLIJEKO</i>
<i>Voda</i>	88,8	87,4
<i>Suha tvar</i>	11,3	12,6
<i>Suha tvar bez masti</i>	8,0	8,5
<i>Mast</i>	3,3	3,9
<i>Bjelančevine</i>	2,9	3,3
<i>Laktoza</i>	4,4	4,7
<i>Mineralne tvari</i>	0,7	0,8

2.3. SOJINO MLIJEKO

Sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna ili fina emulzija sojinog brašna, odnosno izoliranih sojinih proteina u vodi s dodatkom vitamina, mineralnih tvari i arome. U užem smislu, sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna. To je bjelkasta emulzija/suspencija koja sadrži u vodi topljive proteine i ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u sojinom zrnju.

Sojino je mlijeko namijenjeno populaciji koja ne može konzumirati kravlje mlijeko, bilo zbog toga što ne razgrađuju laktozu, zbog alergija na proteine mlijeka ili zbog uvjerenja ne konzumiraju namirnice životinjskog podrijetla.

Soja je sve interesantnija namirnica, zbog svojih važnih nutritivnih i zdravstvenih svojstava.

Graškast, sirov okus najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka. Taj nepoželjan okus potječe od aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksigenaza. Tih sastojaka nema u suhom, neoštećenom sojinom zrnju, ali nastaju trenutačno kad se zrnje smoči i melje [7].

Postoji nekoliko pristupa rješavanju problema nepoželjnog okusa u sojinom mlijeku:

- Inaktivacija lipoksigenaze toplinom u cjelovitom suhom zrnju ili tijekom procesa mokrog mljevenja;
- Upotreba odmašćenih početnih sirovina;
- Odstranjivanje tvari arome evaporacijom (deodorizacija);
- Prikrivanje gorčine i nepoželjnih okusa zaslađivanjem i aromatiziranjem;
- Razvoj genetički modificiranih sorti soje bez lipoksigenaze.

Lipidni sastojci sojinog zrna građeni su pretežno od triacilglicerola; estera trovalentnog alkohola glicerola i tri masne kiseline. Većina masnih kiselina sojina ulja su nezasićene masne kiseline. Najzastupljenija je linolna kiselina približno 52 %, zatim oleinska, palmitinska, linolenska, laurinska, miristinska, te stearinska kiselina. Mononezasićene (oleinska) i polinezasićene (linolna i linolenska) masne kiseline važan su dio zdravog dnevnog obroka, zato što smanjuju rizik obolijevanja od krvožilnih bolesti, snižavaju ukupni kolesterol u krvi, te poboljšavaju omjer kolesterola i lipoproteina [7].

Šećeri: soja sadrži oko 30 % ugljikohidrata od toga oko 20 % netopljivih (vlakana) i oko 10 % topljivih. Od ukupnih topljivih ugljikohidrata saharoze ima 41 do 67 %, rafinoze 5 do 16 %, a stahioze 12 do 35 %.

Proteini: soja sadrži 40 do 45 % proteina na suhu tvar, koji doprinose nutritivnoj vrijednosti hrane i krmiva, te se koriste i za postizanje određenih funkcionalnih karakteristika raznih prehrambenih proizvoda. Sojini 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 životinjske proteine uz manji udio masti, a potpuno su bez kolesterola, ublažavaju simptome menopauze, umanjuju rizik oboljenja od raznih bolesti, kao što su karcinomi, osteoporoza, žučni kamenac, a čak se istražuje mogućnost poboljšanja stanja bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti i AIDS-a.

Vitamini: soja je dobar izvor vitamina E (tokoferola). Tokoferoli su fenolni antioksidansi koji su prirodno prisutni u biljnim uljima, a najvažnija im je značajka da vežu slobodne radikale [7].



Slika 3 Sojino mlijeko [6]

Tablica 3 Sastav sojinog mlijeka [7]

SASTOJAK	UDIO (%)
<i>Voda</i>	90,00-93,81
<i>Proteini</i>	2,86-3,12
<i>Masti</i>	1,53-2,00
<i>Ugljikohidrati</i>	1,53-3,90
<i>Mineralne tvari</i>	0,27-0,48

2.3.1. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka

Sojino i kravlje mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih svojstava, osim velikog udjela visokovrijednih proteina. Sojini proteini sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za zdravu prehranu čovjeka. Proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein, dok proteine sojinog mlijeka čini pretežno glicinin i u manjoj mjeri neke druge proteinske frakcije. Mana proteina sojinog mlijeka jest nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistin.

Ugljikohidrati u kravljem mlijeku su isključivo u obliku laktoze, dok su u sojinom mlijeku oligosaharidi stahioza i rafinoza. Kravlje mlijeko sadrži znatno veće udjele kalcija i fosfora, ali je vrlo siromašno željezom (oko 1 mg/L). Sojino mlijeko sadrži 10 puta više željeza u odnosu na kravlje, ali je njegova bioiskoristivost manja zbog prisutnih fitata koji vežu više mineralnih tvari. Oba mlijeka sadrže mnogo proteina s kompletnim rasponom potrebnih aminokiselina, ali sojino mlijeko ima više udjele arginina, alanina, glicina i asparaginske kiseline.

Sojino mlijeko sadrži preko četiri puta više tiamina (B₁) i skoro dva puta više niacina od kravljeg mlijeka. Osim toga sadrži i 12 puta više bakra, te 42 puta više mangana i magnezija nego kravlje mlijeko. Visok sadržaj vrijednih nutrijenata daje sojinom mlijeku, u zdravstvenom smislu neke prednosti nad kravljim mlijekom [7].

Tablica 4 Usporedba sastava sojinog i kravljeg mlijeka [7]

Nutritivna vrijednost	Kravlje mlijeko		Sojino mlijeko
	Punomasno mlijeko	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 mg
Sastav masnih kiselina			
Zasićene	63,5%	63,5%	14,0%
Polinezasićene	3,0%	3,0%	63,5%
Monozasićene	33,5%	33,5%	21,6%

2.4. SVOJSTVA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA

„Korisne” bakterije ili probiotici su živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u ljudi, djeluju povoljno na domaćina mijenjajući svojstva mikroflore probavnog sustava i unutarnjeg ekosustava. Bakterijske kulture koje se najčešće koriste u takvim proizvodima su one iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Selekcija probiotičkih bakterija vrši se prema nekoliko kriterija, a osnovni su: sigurnost, mogućnost razmnožavanja i preživljavanja u hrani i tijekom prolaska kroz gastrointestinalni sustav, te potencijalni terapijski i/ili preventivni učinak na određene bolesti. Znanstveno je dokazano da se konzumacijom proizvoda s probioticima može djelovati preventivno na sprječavanje dijareje, ublažiti tegobe dijareje, ali i uspješno terapijski tretirati oboljela djeca [8].

Probiotici moraju posjedovati nekoliko važnih svojstava kao što je proizvodnja antimikrobnih tvari: organske kiseline (mliječna i octena kiselina), vodikov peroksid i bakteriocine, kako potiskuju razvoj patogenih i truležnih bakterija. Zbog tih svojstava probiotici pokazuju jaku antimikrobnu aktivnost prema G (+) bakterijama kao što su *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens* [9]. Antimikrobno djelovanje može biti zbog diacetila, koji nastaje u prisutnosti organskih kiselina, a one se preko acetilkoenzima A konvertiraju u diacetil [10]. Njegovo inhibicijsko djelovanje je naročito izraženo prema gram negativnim bakterijama. Osobama koje ne podnose laktozu, poželjno je unošenjem probiotičkog pripravka ili probiotičkog soja povećati razinu

β -galaktozidaze, te tako nadomjestiti nisku fiziološku razinu tog enzima. Probiotički sojevi sprječavaju rast nekih nepoželjnih vrsta mikrobne populacije probavnog sustava koji su odgovorni za biosintezu enzima: β -glikozidaza, β -glukuronidaza, nitroreduktaza, azoreduktaza i steroid-7 α -dehidroksilaza, jer ti enzimi potiču razvoj kancerogenih procesa [10]. Probiotici umanjuju i udio štetnih enzima, kao što je β -glukozidaza i β -glukuronidaza, koji kataliziraju konverziju štetnih amina u nitrozoamine [9].

Probiotici proizvode nekoliko vrsta organskih kiselina od kojih su najvažnije octena, mliječna i pirogroždana. Djelovanjem mliječne i octene kiseline, koje djeluju baktericidno i bakteriostatski, snižava se pH vrijednost u probavnom sustavu.

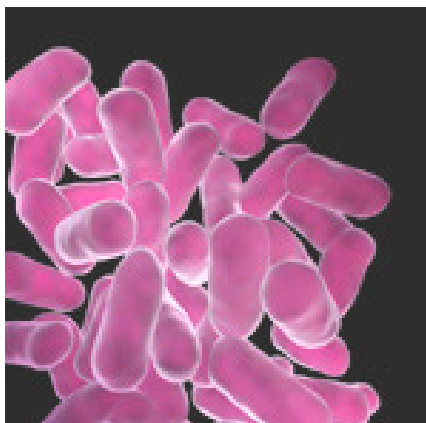
Dva su tipa mliječne kiseline koje se proizvode tijekom fermentacije bakterijama mliječne kiseline: L (+) i D (-). D (-) izomer se u organizmu ne metabolizira do pirogroždane zbog nedovoljne količine dehidrogenaze. Bifidobakterije proizvode L(+) mliječnu kiselinu koja se lako metabolizira i osigurava antimikrobni učinak u probavnom sustavu domaćina [9].

2.5. VRSTE RODA *Lactobacillus*

Bakterije roda *Lactobacillus* su Gram (+), asporogeni, mikroaerofilni do fakultativno anaerobni, pokretni ili nepokretni štapići. U sredinama sa niskim pH vrijednostima postaju Gram (-). Mogu rasti u temperaturnom rasponu od 2 do 53 °C, ovisno od same vrste. Optimalna temperatura rasta je između 30 do 40 °C, a pH vrijednost od 3,0 do 7,0. Podnose 10 % NaCl [11].

Glavna su skupina bakterija mliječne kiseline i nazvane su tako, jer većina pripadnika te skupine konvertira laktozu i ostale šećere u mliječnu kiselinu [13].

Zbog svoje termorezistentnosti mogu preživjeti proces pasterizacije mlijeka i kasnije nepovoljno utječu na proizvodnju sireva. Nisu štetni za ljudsko zdravlje. Koriste se kao starter kulture za proizvodnju kobasica (*L. plantarum* i *L. brevis*), mliječno fermentiranim proizvodima (*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*) [11]. Prisutne su u različitim vrstama namirnica, zemljištu (pogotovo kiselo), vodi, u crijevima ljudi i domaćih životinja, vodama i otpadnim vodama, svježem voću, voćnim sokovima, svježem povrću, konzerviranom povrću, mliječnim proizvodima, vinu, pivu, mesu i mesnim proizvodima [11].



Slika 4 *Lactobacillus* [12]

Tablica 5 Predstavnici osnovnih skupina roda *Lactobacillus* [13]

<i>obligatni homofermentativi</i>	<i>fakultativni heterofermentativi</i>	<i>obligatni heterofermentativi</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. reuteri</i>

2.5.1. BAKTERIJA *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei je gram pozitivni G (+), fakultativno anarobni, nepokretni i nesporogeni štapičast pripadnik industrijski važnih mliječno - kiselih bakterija. Otporne su na kiselinu, ne mogu sintetizirati porfirine i posjeduju strogo fermentativan metabolizam s mliječnom kiselinom kao glavnim metaboličkim proizvodom. *L. casei* čini dio fakultativno fermentativnog ogranka koji proizvodi mliječnu kiselinu preko Embden-Mayerhof-ovog puta i od pentoza preko fosfoketolaznog puta. Rastu na temperaturi od 15 °C, ali ne i na 45 °C. Kao činioc rasta potrebna im je folna kiselina i niacin. Prilično su prilagodljiva vrsta, a mogu se izolirati iz sirovih i fermentiranih proizvoda, svježih i fermentiranih biljnih proizvoda, te reproduktivnog i intestinalnog trakta ljudi i životinja. *Lactobacillus casei* se primjenjuje kao probiotik, kao starter kultura kod proizvodnje mliječne kiseline i kao specijalna kultura za pojačanje i ubrzanje razvoja okusa pri zrenju nekih sireva [14].



Slika 5 *Lactobacillus casei* [15]

2.6. MED

Med je slatka, aromatična, gusta tekućina koju proizvode medonosne pčele iz cvjetnog nektara ili iz sekreta slatkog soka, koji potječe sa živih dijelova biljaka. Pčele ga prikupljaju, prerađuju, kombiniraju sa specifičnim tvarima i izlučevinama njihova tijela, skladište u saću, te ostavljaju da zrije.

Nektar je sladak sok koji u cvjetovima luče žlijezde nektarije, a sastoji se uglavnom od vode i šećera. U njemu ima u malim količinama minerala, eteričnih ulja, organskih kiselina i zrnaca polena.

Medljika je slatka tekućina koju neki kukci izbacuju iz svog tijela kao višak hrane, hraneći se sokom biljke na kojoj se nalaze. Tu tekućinu pčele skupljaju i spremaju u saće, ili samu ili zajedno s medom koji potječe od nektara [16].

Pčela pomoću enzima pretvara saharozu iz nektara ili medljike u glukozu i fruktozu, dok se suvišak vode uklanja višekratnim prenošenjem iz stanica saća, te prozračivanjem košnice [17]. Osim vode (16 do 20 %) u medu se nalaze minerali, aminokiseline, organske kiseline (mravlja, jabučna, octena, jantarna), razni derivati klorofila, vosak, inulin, te elementi kompleksa vitamina B [18].

Ovisno o udjelu pojedinih tvari, razlikovat će se i pojedina fizikalno-kemijska svojstva meda (konzistencija, boja, okus). Na takva svojstva ponajviše utječu dekstrini, koji medu daju posebna svojstva (ljepljivost i gustoću), pa je upravo zbog toga med svjetlije boje obično rjeđi od meda tamnije vrste, koji obično imaju veće udjele ovih ugljikohidrata. Pčele upravo zbog ovog sastojka ne koriste med za prehranu, jer ne mogu probaviti dekstrine i melocitozu [19].

Za proizvodnju 1 kg meda potrebno je da pčele u košnicu donesu 120 do 150 tisuća svojih tovara nektara.

Da bi sakupile tu količinu moraju posjetiti oko 10 milijuna cvjetova i prijeći put dug oko 360 do 450 tisuća kilometara [16].

2.6.1. Bagremov med

Bagremov med je gust, izrazito svijetao, gotovo proziran, ugodnog mirisa i blagog okusa, koji podsjeća na okus soka od bagrema. Ubraja se u najcjenjenije vrste meda. Pomaže kod nesanice, umiruje previše nadraženi živčani sustav i otklanja posljedice nagomilanog stresa. Mjesecima ostaje u tekućem stanju i jedan je od vrsti meda koji vrlo sporo kristalizira zbog toga što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Same pčele dobro i uspješno prezimljuju ukoliko im se osigura zimovanje na bagremovom medu [20].

Preporučuje se za smirenje nesanice, za umirenje prenadraženog živčanog sustava (vrtočlavlava, loš san, klimakterične smetnje itd.). Preporučuje se uzimati s čajem od kamilice, matičnjaka ili gospine trave, jer se tako pojačava djelovanje djelotvornih tvari iz čajeva, a i onih tvari koje su u samom medu [21].



Slika 6 Bagremov med [21]



Slika 7 Kestenov med [22]

2.6.2. Kestenov med

Kestenov med je taman, a tamna boja mu varira ovisno o podneblju i godini, prepoznatljivog mirisa i izrazito karakterističnog pomalo gorkog okusa. Povoljno djeluje na cjelokupni probavni sustav. Potiče rad crijeva, olakšava rad preopterećenih jetara i žuči, te štiti želučanu i crijevnu sluznicu [22].

Preporuča se s čajnim smjesama protiv bolesti probavnih organa (želuca i dvanaesterca), te protiv bolesti žuči i jetara. Med od kestena ima izvanredno dobro djelovanje u oporavku poslije preboljele žutice, kao i u akutnome oboljenju, nadalje, poslije operacije žuči i sl., naročito u čajnim smjesama (stolisnik, kamilica, šipak, majčina dušica) [21].

2.7. *Yersinia enterocolitica*

Rod *Yersinia* pripada skupini Gram (-), fakultativno anaerobnim, kratkim štapićima (kokoidni oblici) veličine od (0,4 do 0,8) do (1 do 4) μm [23].

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. 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 [23].

Osjetljiva je na koncentraciju soli, visoku temperaturu (temperatura od 60 °C uništava ju za 4 min), na tetraciklin, kloramfenikol i dezinficijense. Otporna je na niske temperature [24].

Tvori enterotoksin sličan toksinu bakterije *E. coli*. Patogena je za čovjeka koji se najčešće inficira mesom i mlijekom i oboli sa simptomima gastroenteritisa, rijetko septikemije [25].



Slika 8 *Yersinia enterocolitica* [26]

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je pratiti promjene tijekom skladištenja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 i utvrditi inhibitorni utjecaj na bakteriju vrste *Yersinia enterocolitica*.

U fermentiranom mlijeku određena je potencijalna i aktivna kiselost, kao i promjena broja probiotičkih bakterija tijekom fermentacije. Sva mjerenja su se provodila nakon 25 sati fermentacije (nulti dan), te tijekom skladištenja 7. dan, 14. i 21. dan.

3.2. MATERIJAL I METODE RADA

3.2.1. Priprava uzoraka

Za pripremu probiotičkih napitaka (fermentiranih monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01) korišteno je kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano kravlje 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).

Za inokulaciju mlijeka korištena je liofilizirana komercijalna DVS kultura *Lactobacillus casei* Lc-01 proizvođača Laboratorij Christian Hansen, Copenhagen, Danska. Za inokulaciju je korišteno 0,02 g/50 mL uzorka.

Kao prebiotički dodatak u sve tri vrste mlijeka korišteni su kestenov i bagremov med (proizvođač Apimel Osijek) u udjelima od 2 i 5 %. Odvagani med se dodavao u svaki uzorak mlijeka, te su se uzorci zagrijali na temperaturu naciepljivanja bakterija mliječne kiseline (37 °C). Nakon zagrijavanja, uzorci su naciepljeni kulturom bakterija mliječne kiseline i inkubirani u termostatu na 37 °C u trajanju od 25 sati. Od svih vrsta mlijeka fermentirani su i kontrolni uzorci bez meda (slijepa proba).

3.2.1.1. Priprava filtrata bez stanica

Uzorak se nakon 25 sati fermentacije centrifugirao na 2200 g, 15 minuta uz kontroliranu temperaturu od 4 °C. Nakon centrifugiranja se čisti supernatant sterilizirao membranskim filtrom promjera 25 mm (pore 0,45 µm), (CHROMAFIL AO-45/25). Čisti filtrat bez stanica koristio se za inhibiciju bakterije *Yersinia enterocolitica*.

3.2.2. Određivanje aktivne kiselosti

Za određivanje aktivne kiselosti koristio se pH-metar (METLER TOLEDO, MA 235 pH/Ion Analyzer). Uranjanjem elektrode pH-metra u ispitivanu otopinu nastaje elektrolitski most koji omogućuje mjerenje. Prije mjerenja pH-metar je baždaren puferima poznate pH vrijednosti (4,0 i 7,0). Nakon uranjanja elektrode u uzorak, na uređaju su očitane vrijednosti pH.

3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti

Za određivanje titracijske kiselosti, korištena je metoda po Soxhlet-Henkelu. U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL dodano je 20 mL fermentiranog mliječnog napitka. Dodano je 2 kapi fenolftaleina i titrano sa 0,1 mol/L otopinom NaOH do pojave ružičaste boje. Kiselost je prema ovoj metodi izračunata prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times F \times 2 \quad \text{gdje je:}$$

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

a – broj ml 0,1 mol/L otopine NaOH utrošenih za neutralizaciju 20 mL uzorka

F – faktor molariteta 0,1 mol/L otopine NaOH

3.2.4. Priprava suspenzije bakterijskih stanica *Yersinia enterocolitica*

Za ispitivanje inhibitornog učinka fermentiranog mlijeka odabrana je bakterija vrste *Yersinia enterocolitica*, iz kolekcije mikroorganizama Zavoda za Javno Zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek. Čista kultura bakterije uzgojena je na kosom Tryptic Glucose Yeast Agar (TGK, Biolife, Italija) tijekom 24 h na 37 °C. Prije ispitivanja stupnja inhibicije, čista kultura je regenerirana svakodnevnim precjepljivanjem na kosi TGK agar i inkubirana 24 h na 37 °C.

Od 24 satne kulture, pripremljena je suspenzija bakterijskih stanica. Mikrobiološkom ušicom prenesen je uzgoj bakterije u epruvetu sa sterilnom fiziološkom otopinom i homogeniziran. Usporedbom s Mc Farlandovim standardom 0,5 kontroliran je broj stanica (Mc Farlandov standard predstavlja denzitometrijski ekvivalent od približno 10^8 stanica/mL). Pored toga, suspenzija je kontrolirana i fotometrijski (pri 625 nm) [27].

3.2.5. Određivanje broja probiotičkih bakterija

Broj probiotičkih bakterija u 1 mL fermentiranog mlijeka, određen je posrednom metodom, razrjeđivanjem uzorka u sterilnoj fiziološkoj otopini, te nakon prebrojavanja poraslih kolonija na podlozi nakon inkubacije. Pripravljeno je decimalno razrjeđenje uzorka fermentiranog mlijeka u sterilnoj fiziološkoj otopini iz kojega je prenesen inokulum u Petrijevu zdjelicu u koju je uliven, rastopljen i na 37 °C ohlađen MRS agar (Merck, Njemačka). Poslije hlađenja prvog sloja u Petrijevu zdjelicu uliven je još jedan tanki sloj MRS agara stoga što *Lactobacillus casei* raste u fakultativno anaerobnim uvjetima. Nakon homogenizacije inokuluma i podloge Petrijeve zdjelice su inkubirane 72 sata u termostatu na 37 °C. Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije bakterije *Lactobacillus casei* i izračunat je broj bakterija u 1 mL proizvoda (CFU) prema formuli: [28]

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja}}{\text{volumen istraživanog uzorka inokuluma}}$$

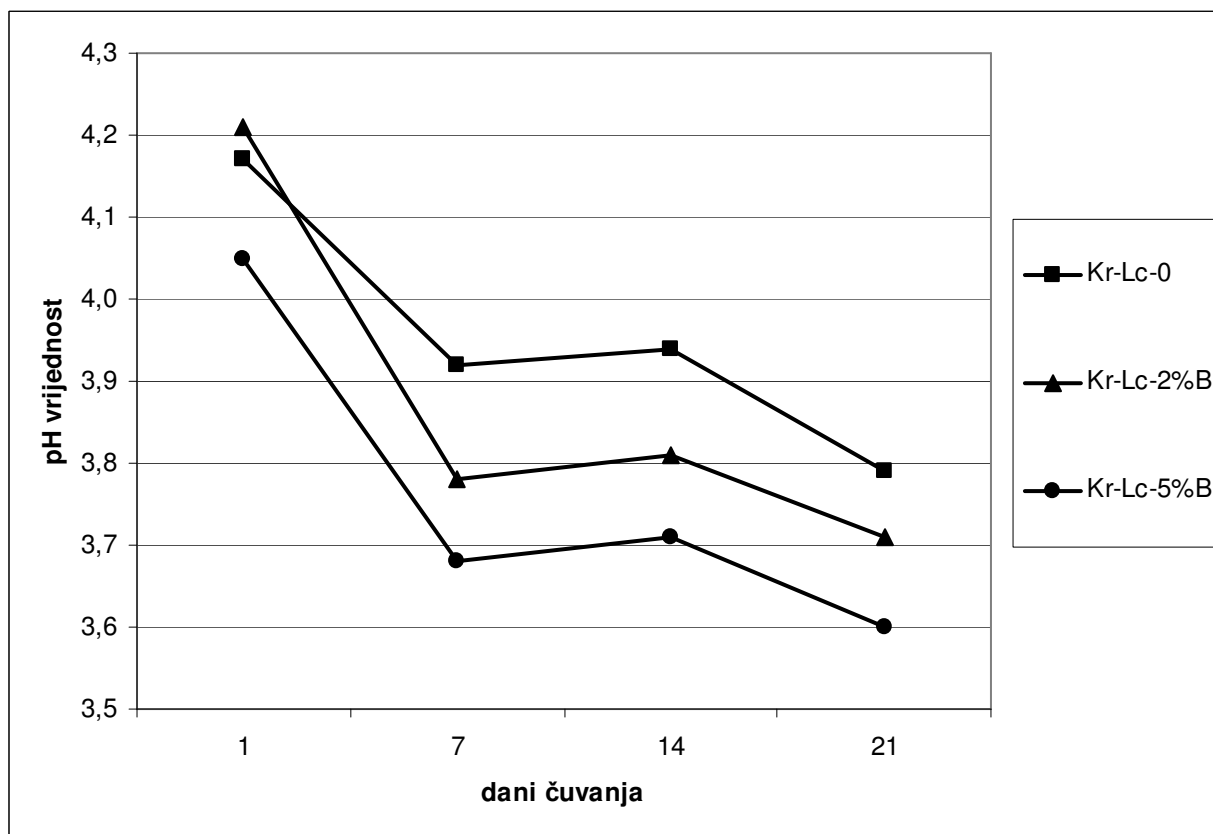
CFU (Colony Forming Units / broj živih stanica)

3.2.6. Određivanje inhibicije bakterije *Yersinia enterocolitica* različitim vrstama fermentiranih mlijeka

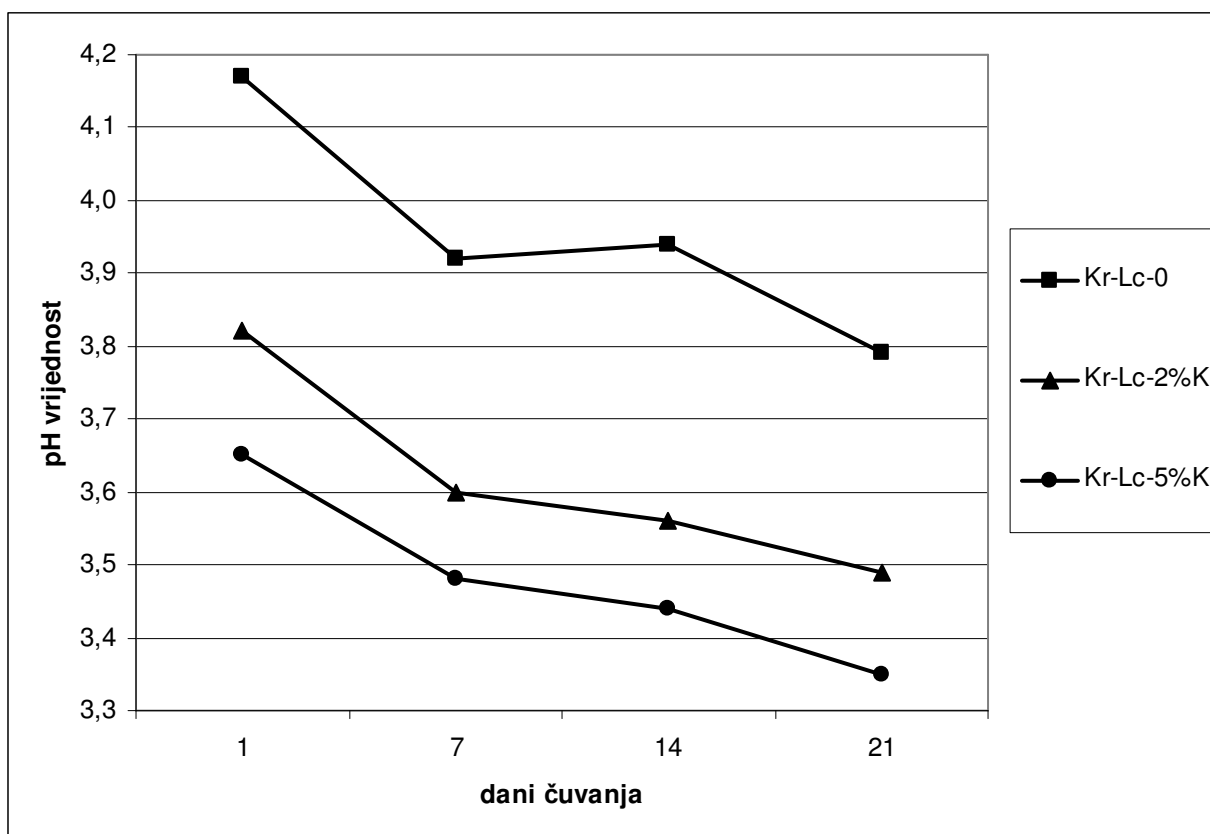
Za ispitivanje stupnja inhibicije korišten je Mueller-Hintonov agar (MH agar, Merck, Njemačka). MH agar je standardni agar za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. U sterilnu Petrijevu zdjelicu preneseno je 10 mL sterilnog MH agara u koji je potom uliveno 10 mL MH agara (nacijepljenog s 1 mL suspenzije 10^8 stanica/mL). Obje podloge su homogenizirane i ohlađene do skrutnjavanja. Nakon skrutnjavanja, u agaru su sterilnim bušačem čepova izbušene 3 rupice promjera 9 mm koje su, nakon vađenja agara sterilnom pincetom, ispunjene sa 150 µL fermentiranog napitka. Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C, izmjerene su zone inhibicije kulture fermentiranim napitkom i izračunata je srednja vrijednost inhibicije. Inhibicija patogene bakterije fermentiranim napitkom ispitana je u dva ponavljanja [27].

4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO – KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM ČUVANJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIJEKA S MONOKULTUROM *Lactobacillus casei*

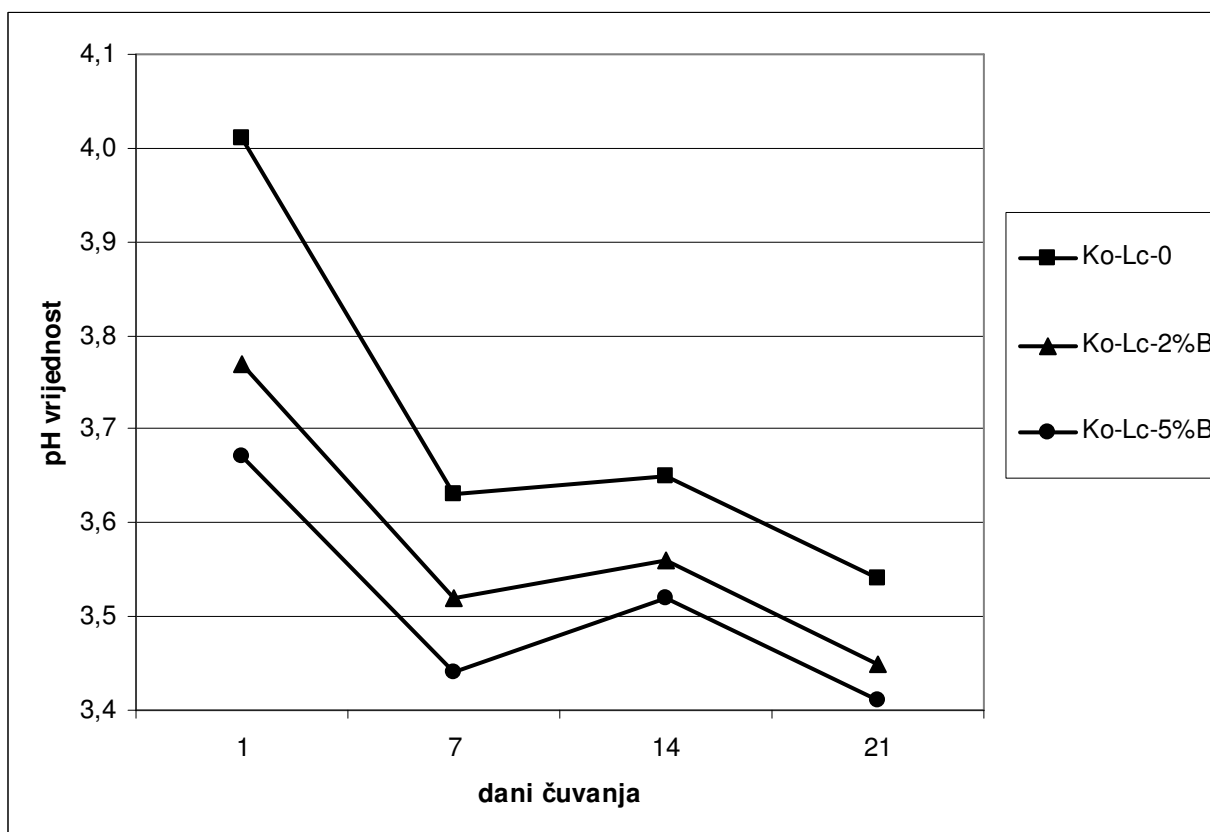
Rezultati promjena praćenih parametara tijekom čuvanja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih s *Lactobacillus casei* (Lc) prikazani su slikama od 9 do 26.



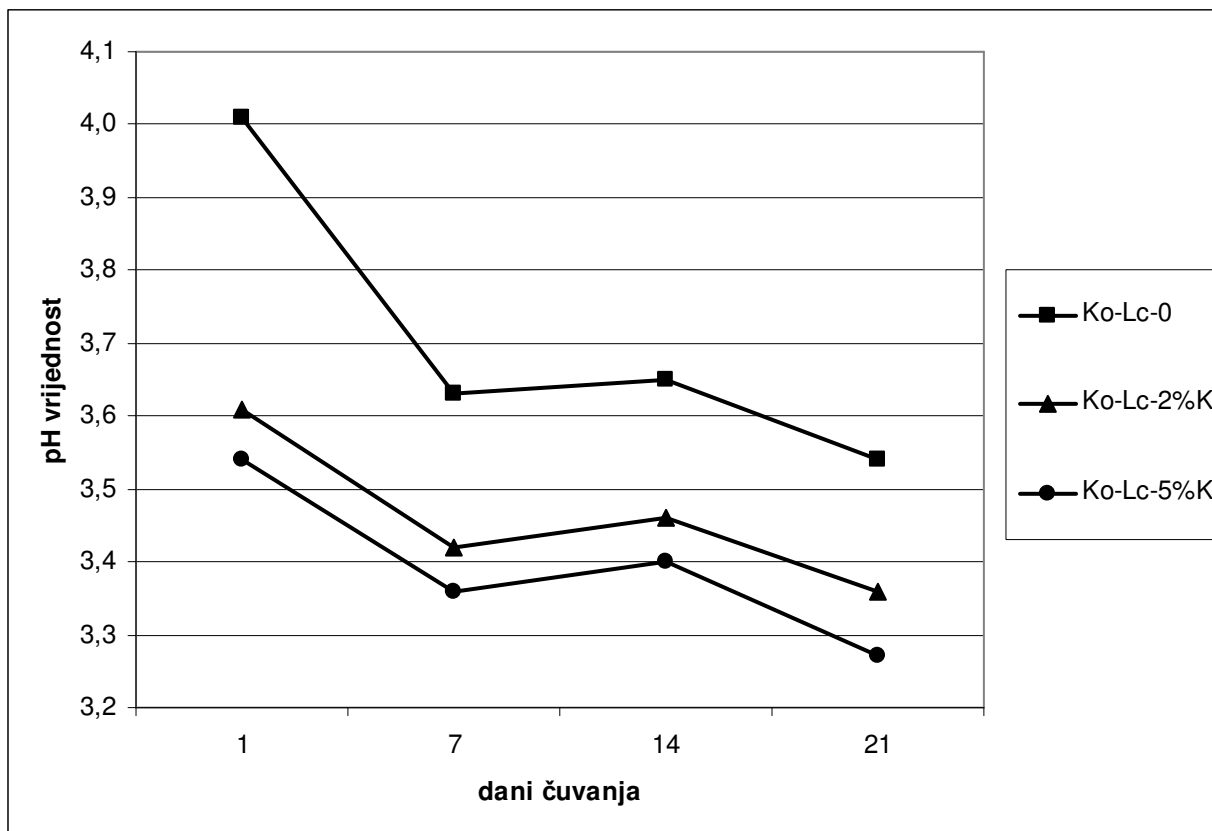
Slika 9 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



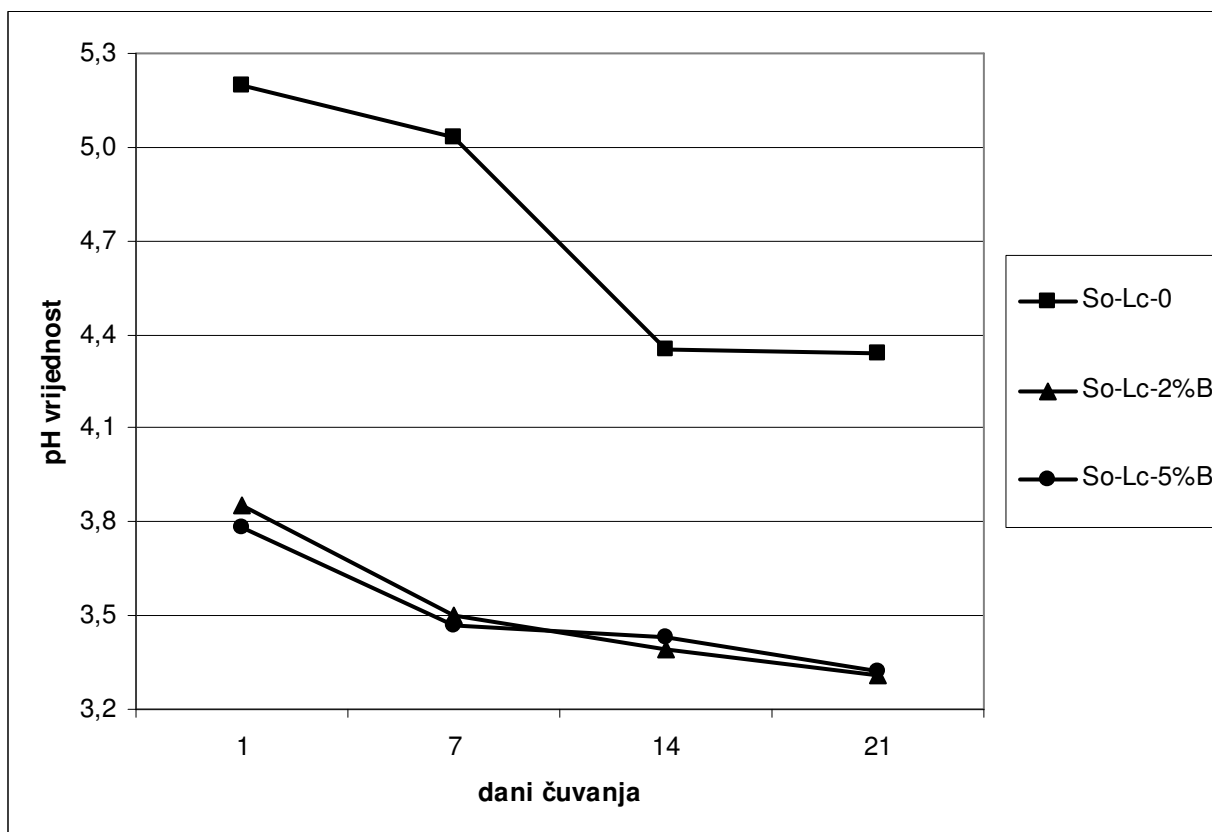
Slika 10 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



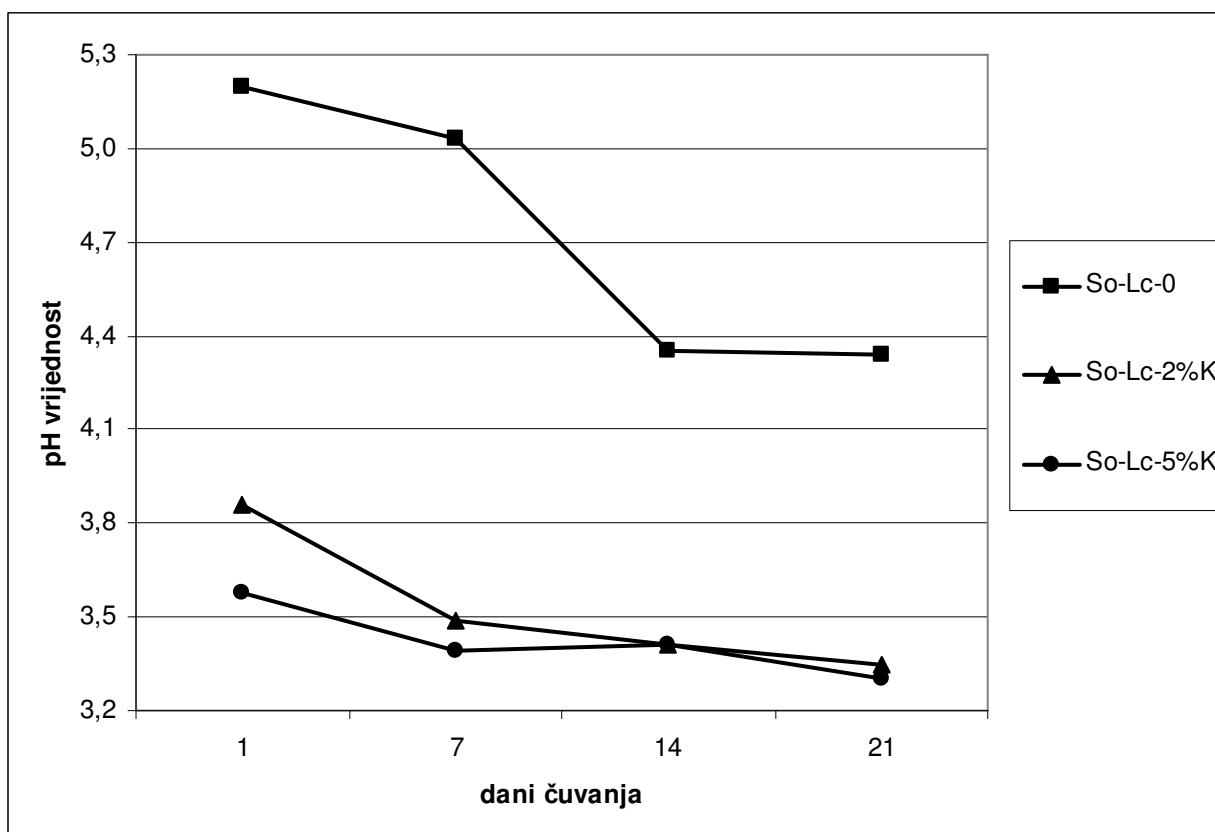
Slika 11 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



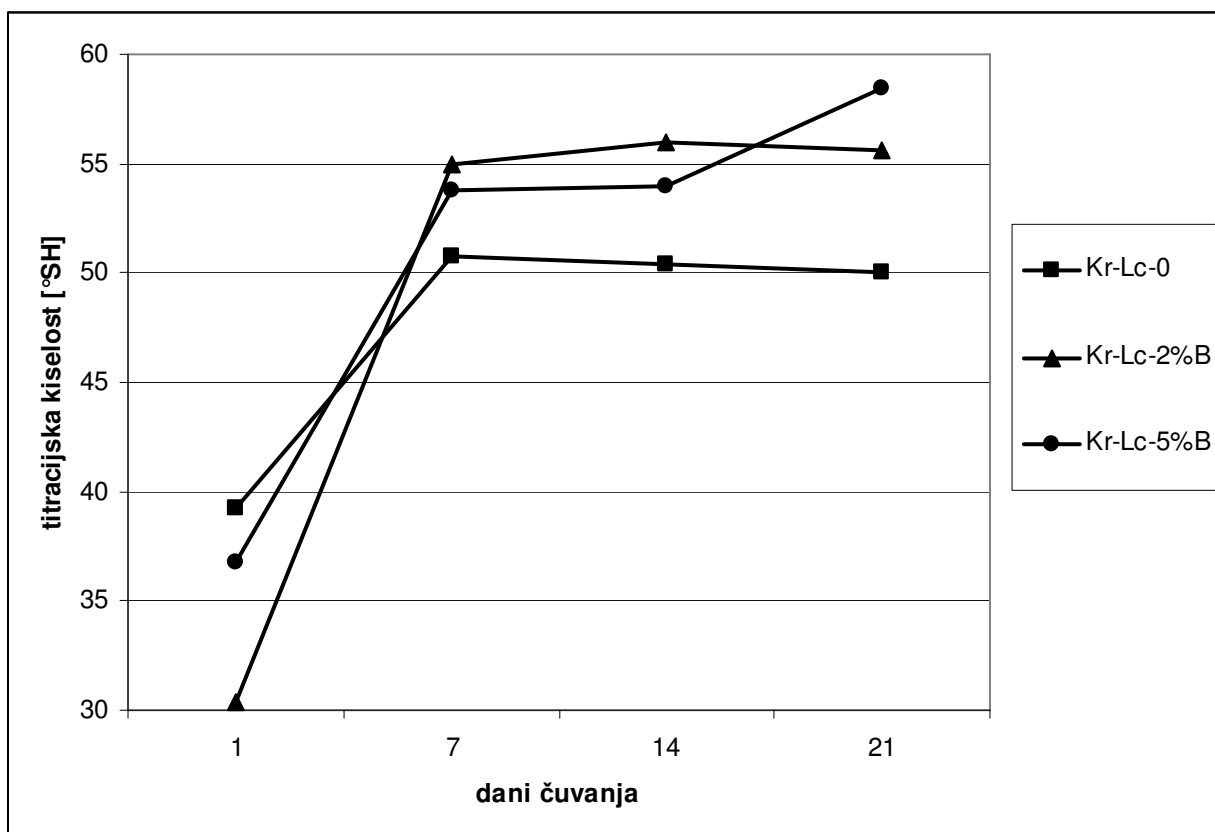
Slika 12 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



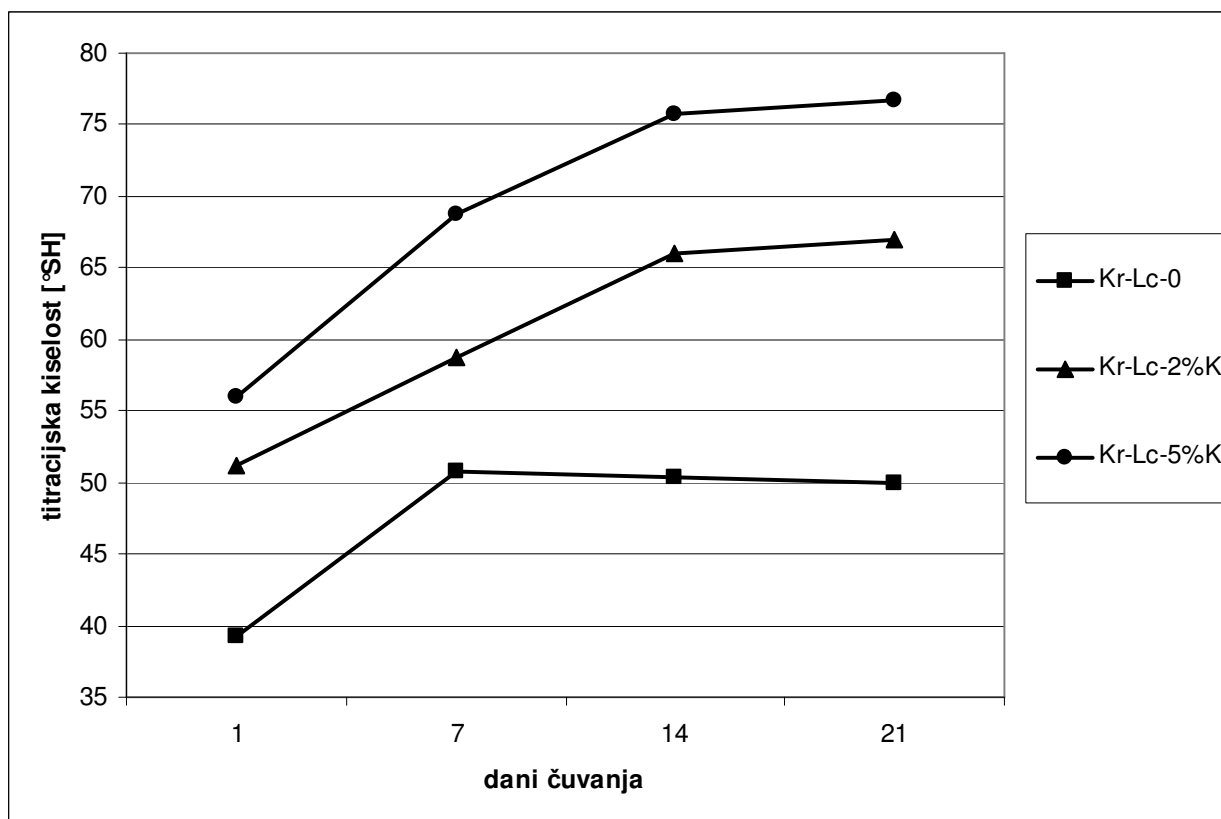
Slika 13 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



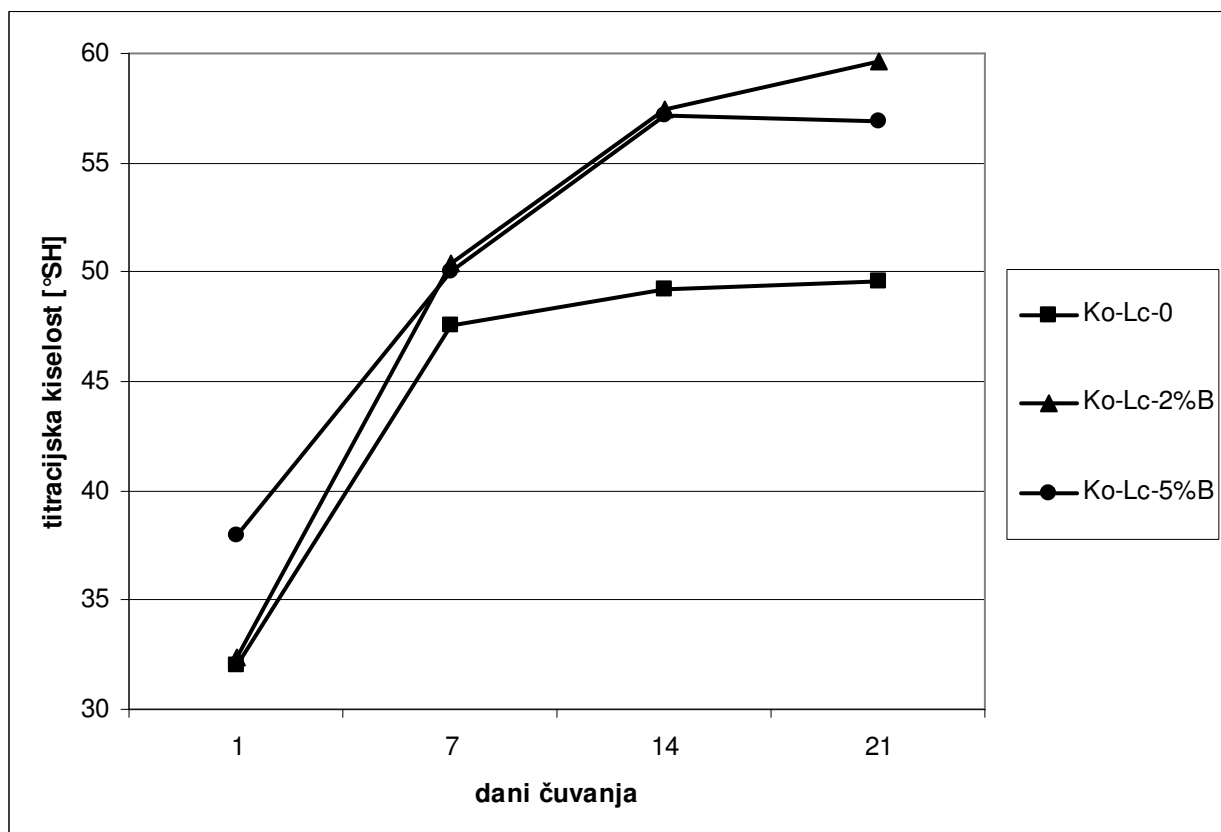
Slika 14 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



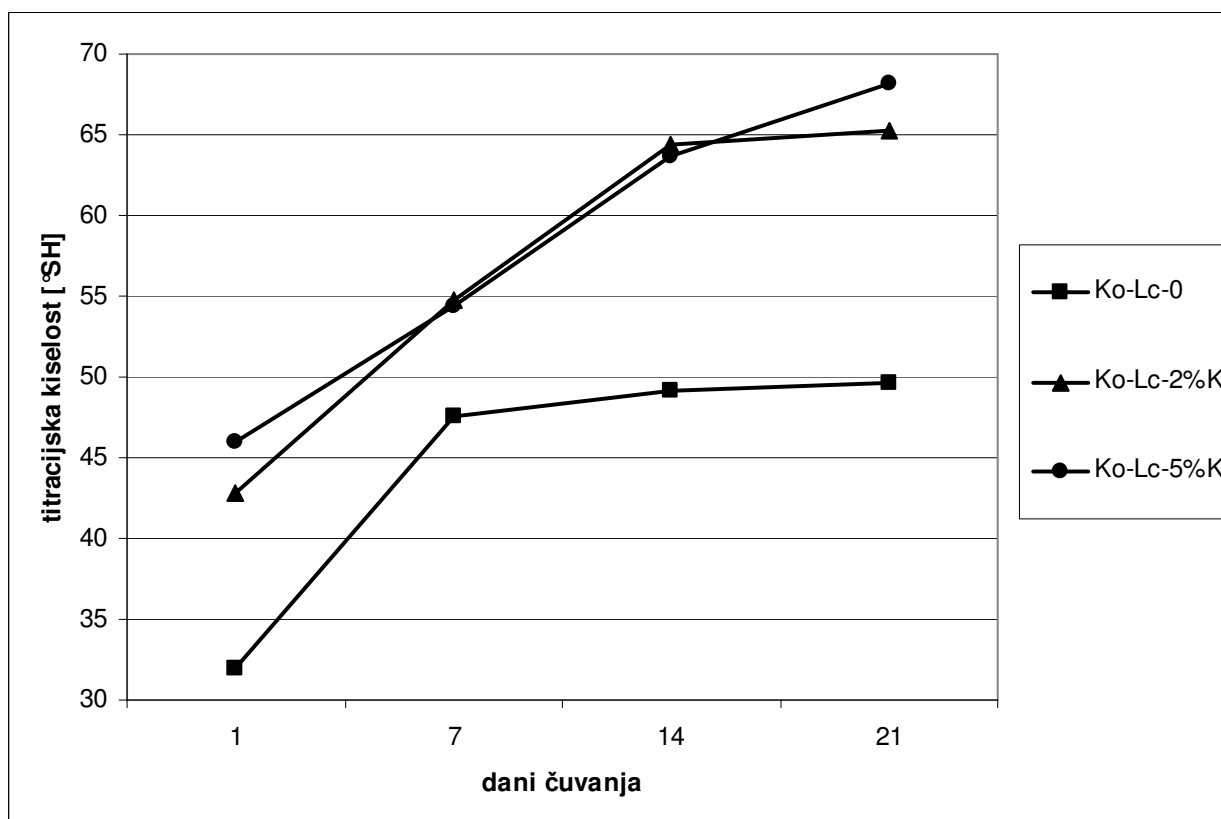
Slika 15 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



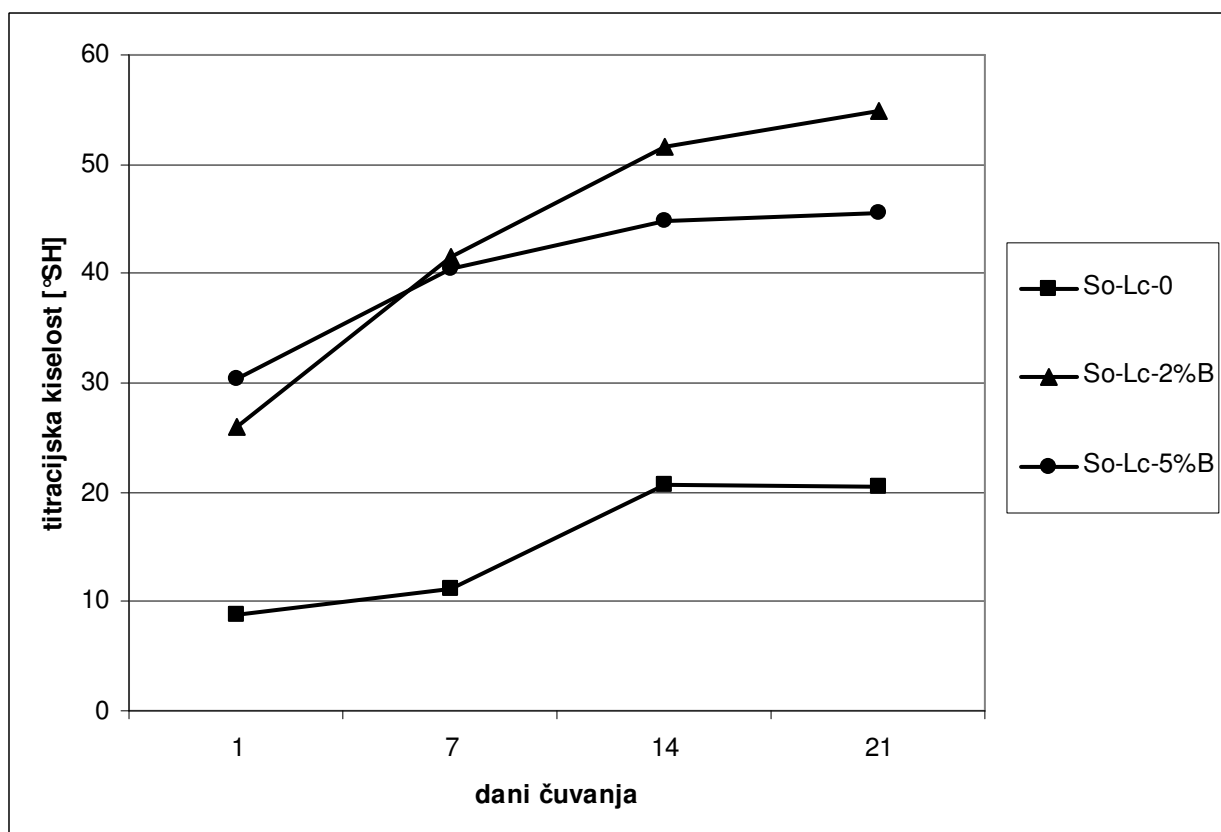
Slika 16 Promjena titracijske kislosti (°SH) probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



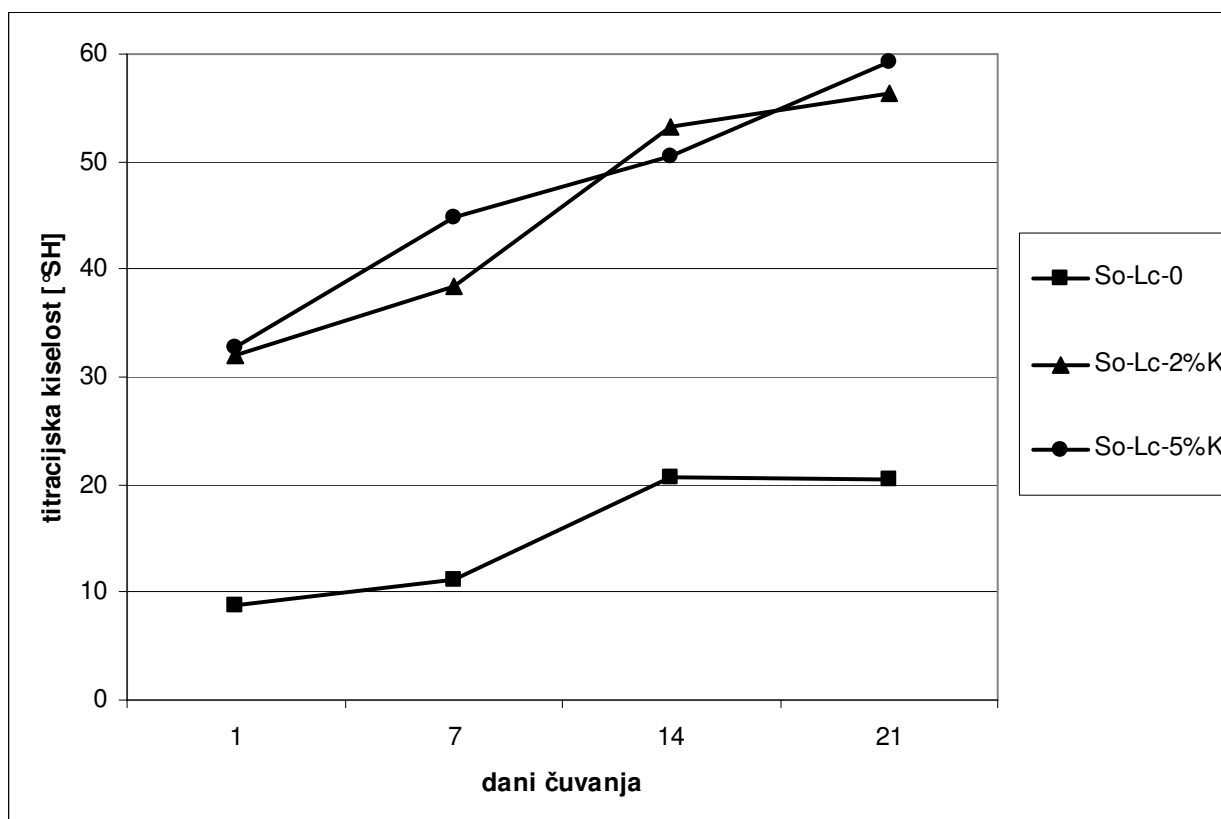
Slika 17 Promjena titracijske kislosti (°SH) probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



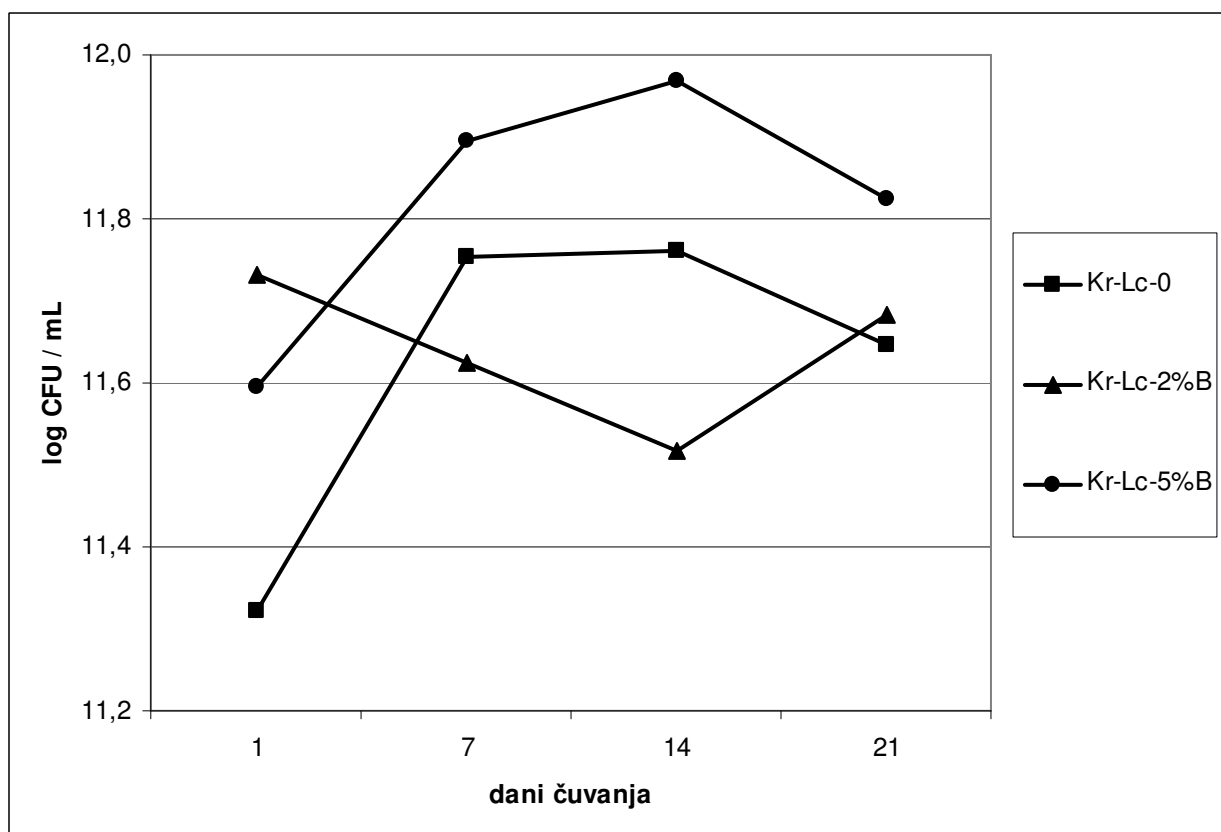
Slika 18 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



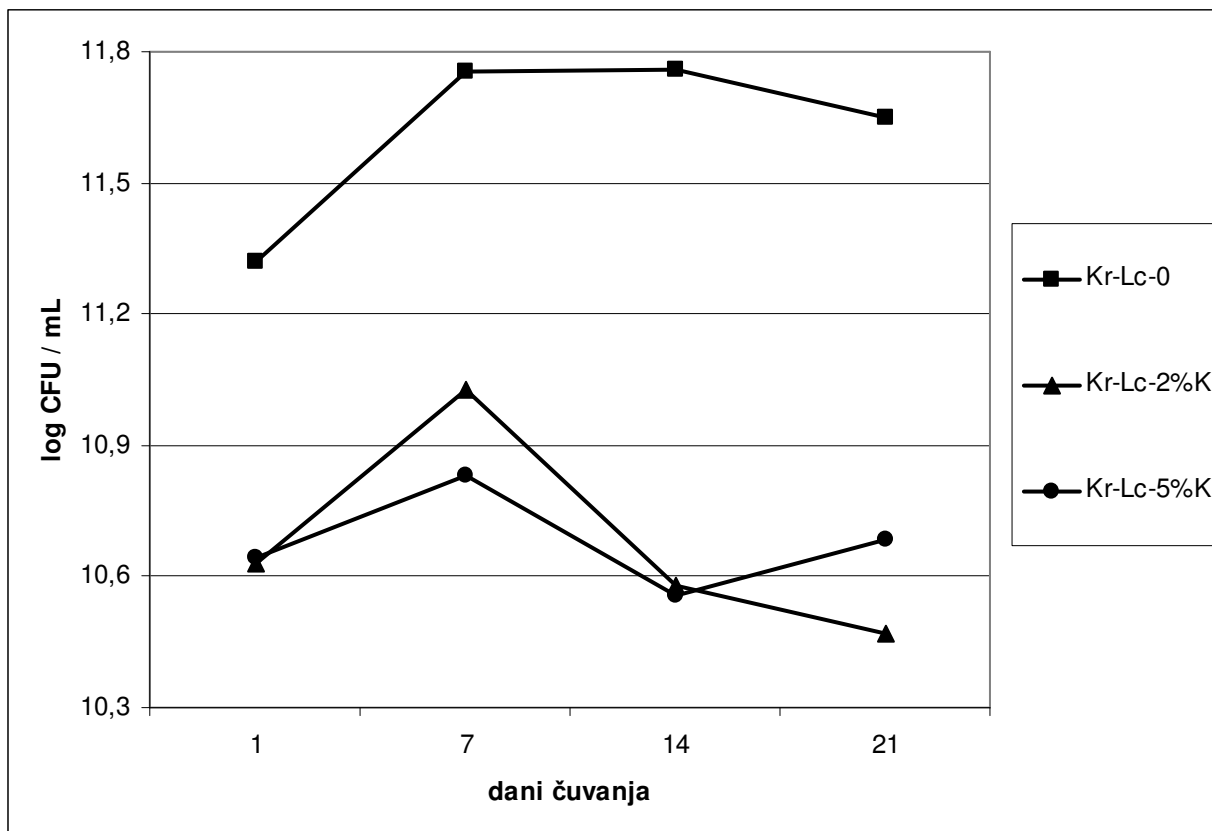
Slika 19 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B) tijekom čuvanja



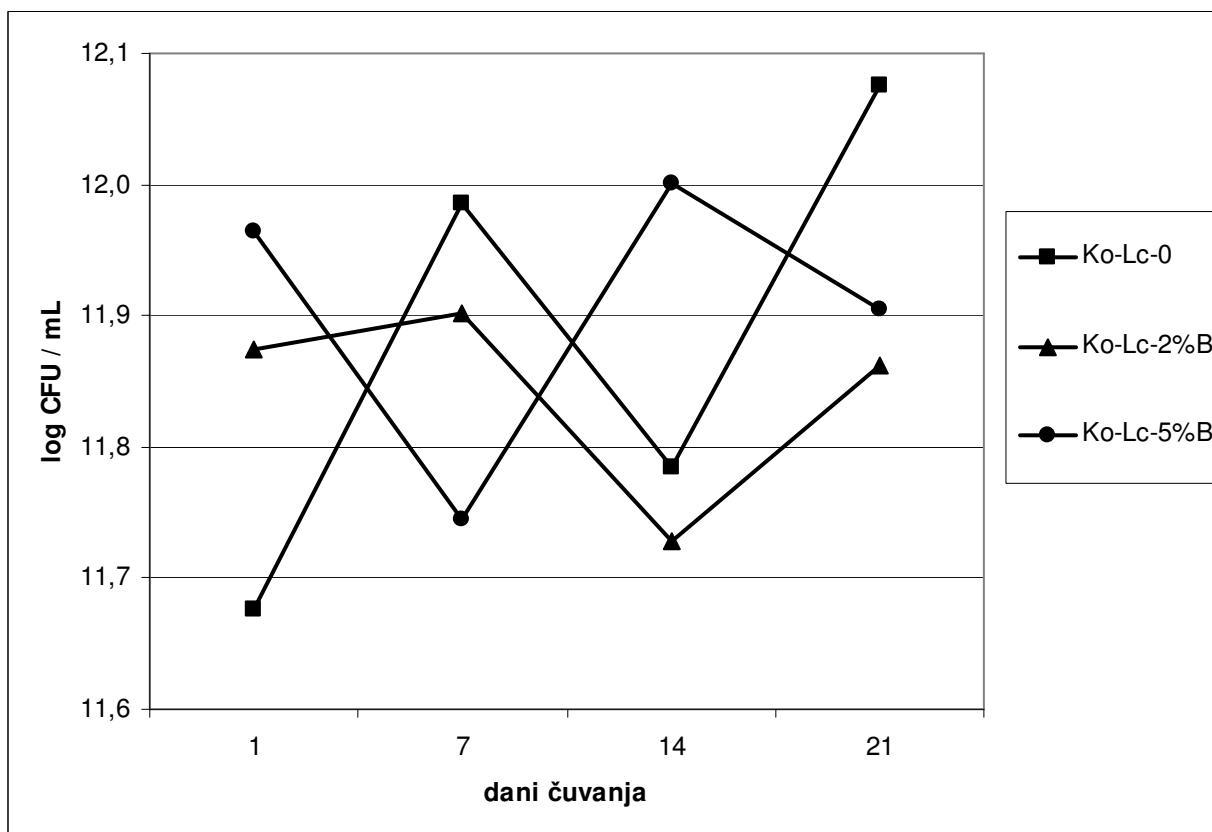
Slika 20 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K) tijekom čuvanja



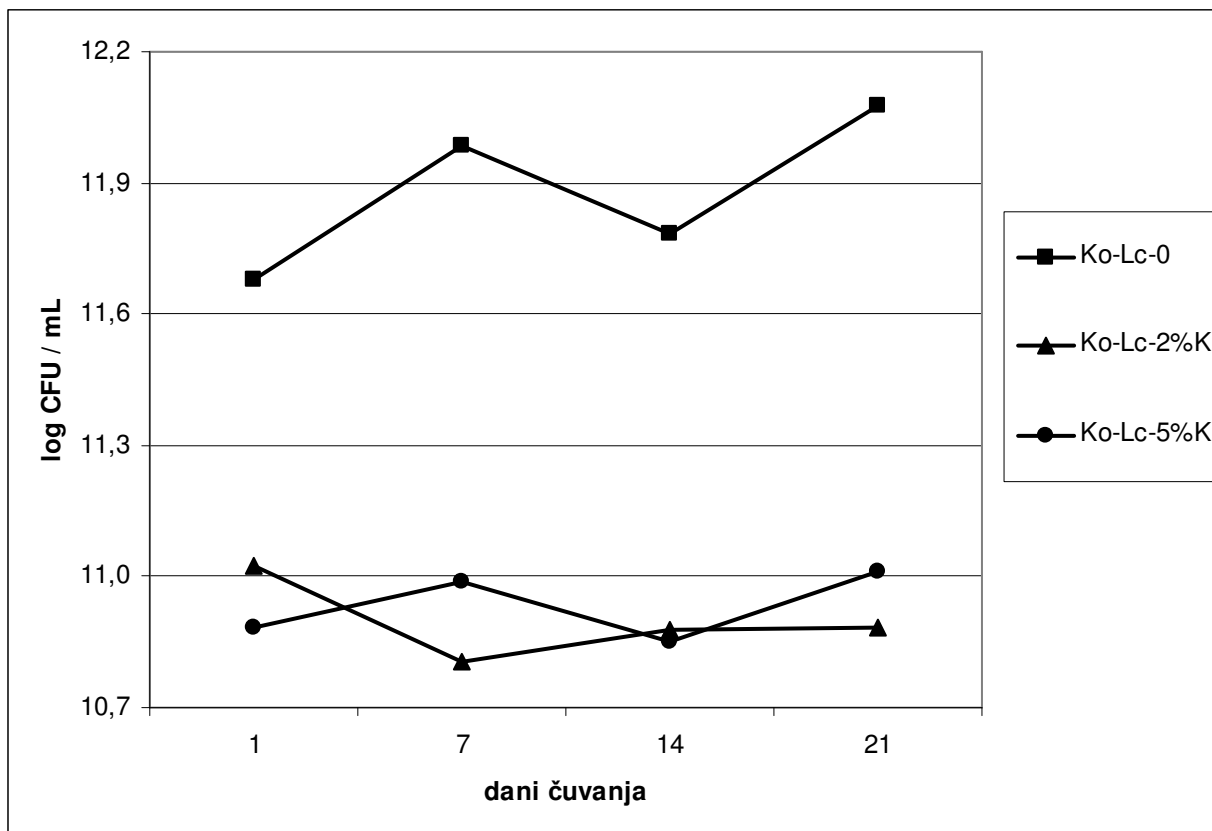
Slika 21 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog meda (B)



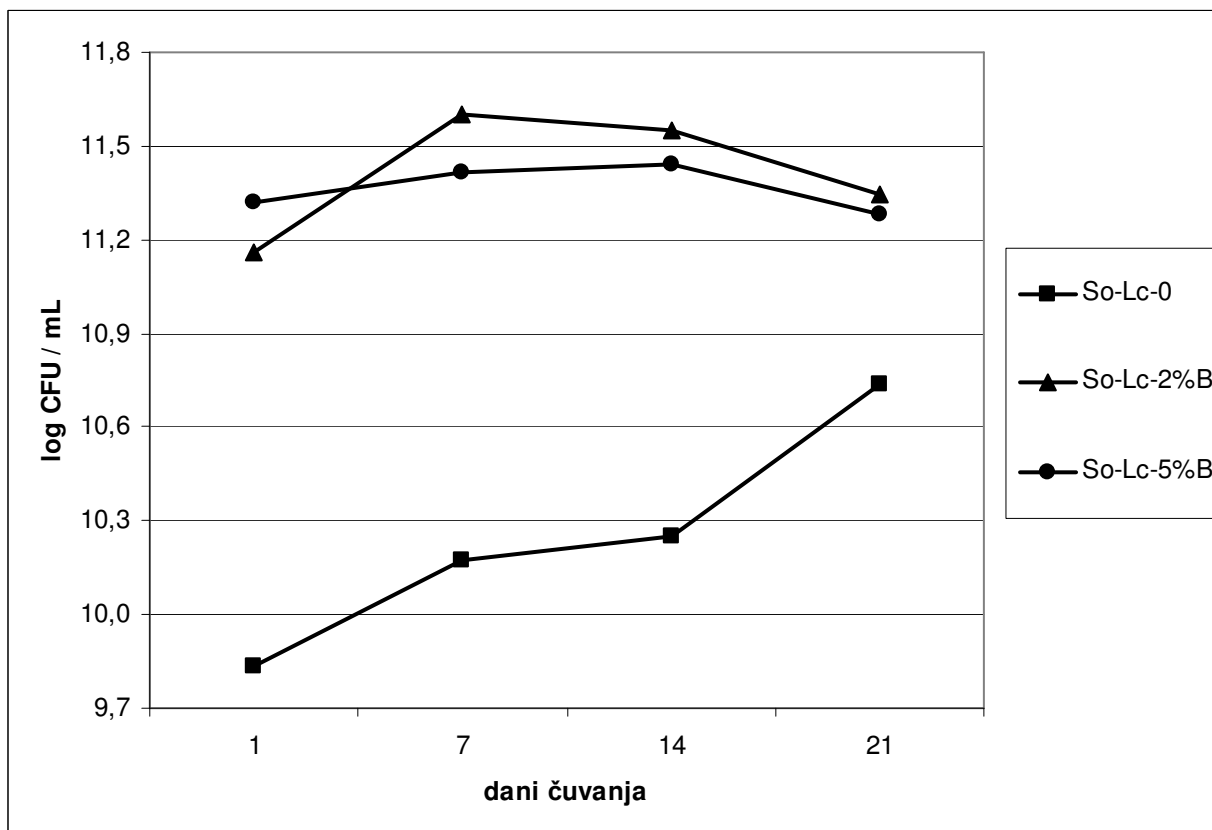
Slika 22 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom kestenovog med (K)



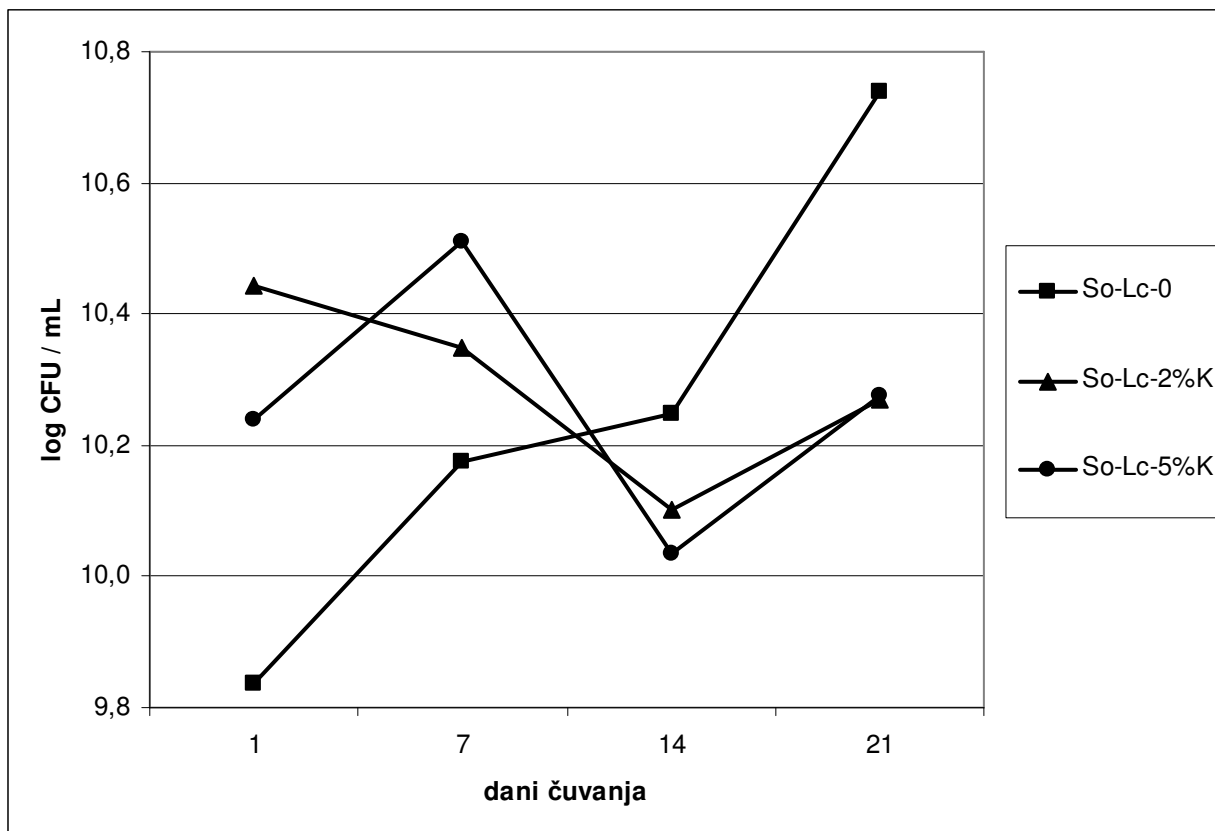
Slika 23 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog meda (B)



Slika 24 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom kestenovog meda (K)



Slika 25 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog meda (B)



Slika 26 Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc -01 tijekom čuvanja sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom kestenovog meda (K)

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA *Y. enterocolitica* FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM S MONOKULTUROM *Lactobacillus casei* Lc-01

Tablica 6 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom (Kr) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom bagremovog (B) meda u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>Kr-Lc-0</i>	++	±	++	++
<i>Kr-Lc-2%B</i>	++	++	++	++
<i>Kr-Lc-5%B</i>	±	+++	++	++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije **< 15 mm**

+++ jasna zona inhibicije **od 15 do 20 mm**

Tablica 7 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom (Kr) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom kestenovog meda (K) u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>Kr-Lc-0</i>	++	±	++	++
<i>Kr-Lc-2%K</i>	++	++	++	+++
<i>Kr-Lc-5%K</i>	++	+++	++	+++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije **< 15 mm**

+++ jasna zona inhibicije **od 15 do 20 mm**

Tablica 8 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom (Ko) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom bagremovog meda (B) u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>Ko-Lc-0</i>	++	++	++	++
<i>Ko-Lc-2%B</i>	++	++	++	+++
<i>Ko-Lc-5%B</i>	++	+++	++	+++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije **< 15 mm**

+++ jasna zona inhibicije **od 15 do 20 mm**

Tablica 9 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom (Ko) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom kestenovog meda (K) u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>Ko-Lc-0</i>	++	++	++	++
<i>Ko-Lc-2%K</i>	++	++	++	+++
<i>Ko-Lc-5%K</i>	++	+++	++	+++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije < 15 mm

+++ jasna zona inhibicije od 15 do 20 mm

Tablica 10 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom (So) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom bagremovog meda (B) u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>So-Lc-0</i>	+	+	++	++
<i>So-Lc-2%B</i>	++	++	++	++
<i>So-Lc-5%B</i>	++	++	++	+++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije < 15 mm

+++ jasna zona inhibicije od 15 do 20 mm

Tablica 11 Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom (So) fermentiranim probiotičkom kulturom Lc-01 i dodatkom kestenovog meda (K) u udjelima od 2 i 5%

<i>dani</i>	0	7	14	21
<i>So-Lc-0</i>	+	+	++	++
<i>So-Lc-2%K</i>	++	++	++	+++
<i>So-Lc-5%K</i>	+++	++	++	++

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba zona inhibicije (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije < 15 mm

+++ jasna zona inhibicije od 15 do 20 mm

5.1. PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM ČUVANJA

Praćenje promjene pH vrijednosti tijekom 21 dana čuvanja tri vrste mlijeka fermentirane monokulturom *Lactobacillus casei*, uz dodatak dvije vrste meda dalo je sljedeće rezultate.

Promjene pH vrijednosti sojinog mlijeka bez dodatka meda su se značajno razlikovale od pH vrijednosti kravljeg i kozjeg mlijeka bez dodatka meda. pH vrijednost kravljeg i kozjeg mlijeka tijekom 21. dana čuvanja malo se mijenjala, dok je sojino mlijeko na početku imalo znatno višu pH vrijednost i ona se lagano snižavala. Kozje mlijeko je imalo najnižu pH vrijednost uspoređujući ga s ostale dvije vrste mlijeka, što je prikazano slikama od 9 do 14.

Dodatak dvije vrste meda, bagremovog i kestenovog u **kravlje mlijeko** inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, nije pokazivalo znatniju promjenu pH vrijednosti u odnosu na ono bez dodatka meda (slika 9 i 10). Dodatak bagremovog meda u oba udjela od 2 i 5 % u kravljem mlijeku rezultiralo je sniženjem pH vrijednosti, s time da je u kravljem mlijeku s udjelom od 2 % bagremovog meda na početku pH vrijednost bila viša od kravljeg mlijeka bez dodatka meda (slika 9).

Iz tijeka krivulje opadanja pH vrijednosti, vidljivo je da kestenov med dodan u kravlje mlijeko više snižava pH vrijednost od bagremovog meda (slika 10).

Dodatak bagremovog i kestenovog meda u **kozje mlijeko** inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 nije pokazalo znatniju promjenu pH vrijednosti uspoređujući ga s kravljim mlijekom s dodatkom meda u udjelima od 2 i 5 %, (slika 11 i 12).

Sojino mlijeko bez dodatka meda inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 pokazalo je u prvih 7 dana neznatnu promjenu pH vrijednosti, dok je između 7 i 14 dana čuvanja došlo do značajnijeg pada pH vrijednosti.

Dodatak bagremovog i kestenovog meda pokazalo je vrlo zanimljiv učinak na pH vrijednost. I bagremov i kestenov med u oba udjela 2 i 5 % pokazali su identičan učinak; snizili su pH vrijednost sojinog mlijeka (na oko 3,35), te se ta vrijednost zadržala do kraja čuvanja (slika 13 i 14).

5.2. PROMJENE INTENZITETA ZAKISELJAVANJA (TITRACIJSKE KISELOSTI) TIJEKOM ČUVANJA

Pri čuvanju **kravljeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 titracijska kiselost nultog uzorka (0. dan) porasla je u prvih 7 dana sa početnih 39,2 °SH na 50,8 °SH. U sljedećih 7 dana (14. dan) došlo je do neznatnog smanjenja intenziteta zakiseljavanja, te se do kraja čuvanja zadržala približno konstantna vrijednost. Uzorak

kravljeg mlijeka s dodatkom bagremovog meda u oba udjela s 2 i 5 % je pokazao porast titracijske kiselosti u prvih 7 dana, pri čemu je 0. dan vrijednost titracijske kiselosti bila niža od uzorka mlijeka bez dodatka meda. Slijedećih 7 dana došlo je do pada intenziteta zakiseljavanja, zatim je u uzorku s 5 % bagremovog meda došlo do porasta titracijske kiselosti, a kod uzorka s 2 % bagremovog meda zadržala se konstantna vrijednost (slika 15). Dodatkom kestenovog meda u oba udjela od 2 i 5 % došlo je do porasta titracijske kiselosti. Dodatak meda u udjelu od 5 % pokazao je veću vrijednost titracijske kiselosti (slika 16).

Pri čuvanju **kozjeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, titracijska kiselost uzorka bez dodatka meda, kao i uzorak s 2 % bagremovog meda, pokazuju najnižu vrijednost oko 32 °SH. Zatim 7. i 14. dan titracijska kiselost, u oba uzorka s 2 i 5 % bagremovog meda pokazuju istu vrijednost, a nakon toga titracijska kiselost u uzorku s 5 % bagremovog meda pada, a s 2 % raste (slika 17). Dodatkom kestenovog meda u oba udjela od 2 i 5 %, vrijednost titracijske kiselosti je nešto viša od uzorka s bagremovim medom. Vrijednost titracijske kiselosti u uzorku s 5 % kestenovog meda raste do kraja čuvanja dok u uzorku s 2 % kestenovog meda 14. dan pada (slika 18).

Titracijska kiselost **sojinog mlijeka** inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, bez dodatka meda bila je znatno niža od sojinog mlijeka s dodatkom obje vrste meda u udjelima od 2 i 5 %. Dodatkom bagremovog meda u udjelima od 2 i 5 % došlo je do porasta intenziteta zakiseljavanja. Nakon 7. dan čuvanja, vrijednost titracijske kiselosti je oko 40 °SH. Uzorak s 2 % bagremovog meda imao je višu vrijednosti titracijske kiselosti od uzorka s 5 % bagremovog meda (slika 19). Dodatkom kestenovog meda u oba udjela od 2 i 5 % početna vrijednost titracijske kiselosti iznosila je oko 32 °SH za oba uzorka, zatim je vrijednost titracijske kiselosti rasla do 14. dana gdje je uzorak s 5 % kestenovog meda imao nižu vrijednost od uzorka s 2 % kestenovog meda, a potom je ponovo rasla do kraja čuvanja (slika 20).

5.3. PROMJENA BROJA BAKTERIJA *Lactobacillus casei* Lc-01 TIJEKOM ČUVANJA

Tijekom čuvanja **kravljeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 utvrđen je porast broja bakterija u uzorku bez dodatka meda, kao i u uzorku s dodatkom bagremovog meda u udjelu od 5 % do 14. dana nakon čega je došlo do smanjenja broja bakterija, a u uzorku s 2 % bagremovog meda prvo je došlo do smanjenja, a zatim do povećanja broja bakterija (slika 21). Dodatkom kestenovog meda

smanjio se broj bakterija u odnosu na uzorak bez dodatka meda (slika 22). Najveći broj bakterija imao je uzorak s dodatkom 5% bagremovog meda.

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** u uzorku s dodatkom bagremovog meda u oba udjela od 2 i 5 %, broj poraslih bakterija kretao se oko vrijednosti uzorka bez dodatka meda, dok je uzorak s dodatkom kestenovog meda u oba udjela (2 i 5 %) imao manji broj bakterija (slike 23 i 24).

Tijekom čuvanja **sojinog mlijeka** broj bakterija bio je značajno veći u uzorku s dodatkom meda u oba udjela od 2 i 5 %, nego u uzorku bez dodatka meda (slika 25). Dodatkom kestenovog meda u oba udjela od 2 i 5 % u prvih 7 dana došlo je do porasta broja bakterija u odnosu na uzorak bez dodatka meda, a zatim do smanjenja broja bakterija (slika 26).

5.4. USPOREDBA INHIBICIJE BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* FERMENTIRANIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM

U radu je proučavan inhibicijski potencijal bakterije *Lactobacillus casei* prema bakteriji *Yersinia enterocolitica* tijekom 21. dana čuvanja fermentiranih mlijeka. Osnovna postavka rada je usporedba kozje/kravlje/sojino mlijeko, pH vrijednost, CFU probiotičkih bakterija, dodatak bagremovog/kestenovog meda, te utjecaj njihovog različitog udjela.

Kravlje mlijeko bez dodatka meda pokazalo je jasnu zonu inhibicije, a samo 7. dan djelomičnu inhibiciju. Dodatak bagremovog meda u udjelu od 5 % nulti dan pokazalo je djelomičnu inhibiciju, dok je 7. dan zabilježena zona inhibicije 17,1 mm (tablica 6). Kestenov med je bolje djelovao od bagremovog meda 21. dan, te je zabilježena jasna zona inhibicije od 15 do 20 mm (tablica 7).

Kozje mlijeko bez dodatka meda tijekom 21. dana čuvanja pokazalo je zonu inhibicije do 15 mm. Dodatak bagremovog i kestenovog meda pokazao je isti učinak. Bagremov i kestenov med u udjelu od 2 % pokazao je najveći učinak 21. dan uz zonu inhibicije od 15 do 20 mm, dok je kestenov med u udjelu od 5 % najveći inhibicijski učin pokazao 7. i 21. dan čuvanja (zona inhibicije od 15 do 20 mm) (tablice 8 i 9).

Sojino mlijeko bez dodatka meda pokazalo je slabiju inhibiciju bakterije *Yersinia enterocolitica*. Dodatak bagremovog meda u udjelu od 5 %, 21. dan pokazalo je zonu inhibicije 15,7 mm (tablica 10). Dodatak kestenovog meda u udjelu od 5 % pokazalo je jasnu zonu inhibicije od 15 do 20 mm nulti i 21. dan čuvanja, a udio od 2 % imao isti učin 21. dan (tablica 11).

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

- ❖ Tijekom cijelog perioda čuvanja fermentirano kozje mlijeko je imalo najnižu pH vrijednost, nešto višu kravlje, a najvišu pH vrijednost fermentirano sojino mlijeko.
- ❖ Najveći broj stanica bakterije *L. casei* utvrđen je u fermentiranom kozjem mlijeku bez dodatka meda 21. dan čuvanja, a najmanji broj u fermentiranom sojinom mlijeku bez dodatka meda.
- ❖ Kravlje mlijeko fermentirano Lc-01 kulturom, najjače je inhibiralo *Y. enterocolitica* s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 2 % u 21. danu čuvanja.
- ❖ Kozje mlijeko fermentirano Lc-01 kulturom najjače je inhibiralo *Y. enterocolitica* s dodatkom bagremovog i kestenovog meda u udjelu od 2 % u 21. danu čuvanja.
- ❖ Sojino mlijeko fermentirano Lc-01 kulturom najjače je inhibiralo *Y. enterocolitica* s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 5 % u 21. danu čuvanja.
- ❖ Bagremov med je slabije inhibirao rast *Y. enterocolitica* u odnosu na kestenov med.
- ❖ Probiotički napitak od kozijeg mlijeka s dodatkom kestenovog meda je pokazao jači inhibitorni učinak u usporedbi sa probiotičkim napitkom od kravljeg i sojinog mlijeka s dodatkom kestenovog meda.

1. Lj. Tratnik: Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
2. http://www.vindija.hr/default.asp?Top_FlashListID=658FlashID=1526
(lipanj 2009.)
3. B. Mioč, V. Pavić: Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
4. R. Božanić, Lj. Tratnik, I. Drgalić: Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* **52**, 207-237, 2002.
5. N. Antunovac, D. Samaržija: Proizvodnja, sastav i osobine kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **50**, 53-66, 2002.
6. <http://www.soya.be/reviews/soy-milk-cooking.php> (lipanj 2009.)
7. R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56**, 233-254, 2006.
8. <http://www.prehrana-kretanje.hr/clanci/Probiotici%20i%20probiotici.htm>
(lipanj 2009.)
9. Lj. Gregurek: Antimikrobno i antimutageno djelovanje probiotika. *Mljekarstvo* **49**, 255 – 260, 1999.
10. J. Šušković, B. Kos, i S. Matošić: Probiotici: Znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo* **48**, 165-176, 1998.
11. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-lactobacillus>
(lipanj 2009.)
12. http://nccam.nih.gov/news/newsletter/2006_summer/bacteria.htm (lipanj 2009.)
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus> (lipanj 2009.)
14. <http://www.answers.com/topic/lactobacillus-casei> (lipanj 2009.)
15. <http://www.nutritionnews.com/.../> (lipanj 2009.)
16. J. Hardi: Poznavanje sirovina animalnog porijekla. Interna skripta. Prehrambeno – tehnološki fakultet. Osijek, 29. lipnja 2005.
17. <http://pdz.hr/viewtopic.php?t=336> (lipanj 2009.)
18. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Med> (lipanj 2009.)
19. <http://www.plivazdravlje.hr> (lipanj 2009.)
20. http://www.pcelarstvo.hr/bagremov_med-29.htm (lipanj 2009.)
21. <http://www.apimel.hr/proizvod4.html> (lipanj 2009.)
22. http://www.pcelarstvo.hr/kestenov_med-29.htm (lipanj 2009.)
23. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-yersinia>
(lipanj 2009.)

24. <http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/images/yersinia-enterocolitica-C.jpg> (lipanj 2009.)
25. http://www.vef.hr/org/mbio/nastava/specijalna_mikrobiologija/ENTEROBAKT (lipanj 2009.)
26. <http://www.kimicontrol.com/edu-e.html> (lipanj 2009.)
27. J. Šušković, B. Kos: Mikrobiološke metode i antibiotici. U „Metode u molekularnoj biologiji“. Institut Ruđer Bošković. Zagreb, 2007.
28. S. Duraković: Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering. Zagreb, 1996.

Prilog 1 Zone inhibicije (izražene u mm) bakterije *Y. enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim kulturom *Lactobacillus casei*

dan	Kr-Lc-0	Kr-Lc-2%B	Kr-Lc-5%B	Kr-Lc-2%K	Kr-Lc-5%K
0	12,40	11,20	djel	12,00	14,00
7	djel	12,20	17,10	12,90	17,00
14	12,30	11,90	12,90	13,20	14,90
21	11,50	13,70	14,70	17,40	15,80

djel = djelomična inhibicija

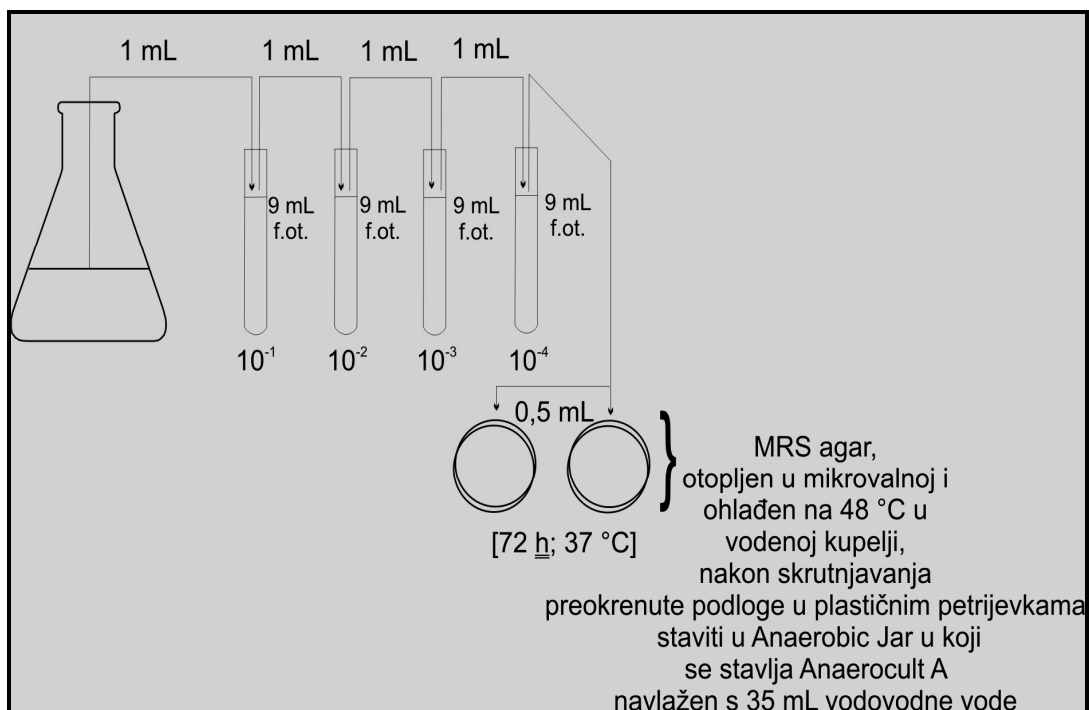
Prilog 2 Zone inhibicije (izražene u mm) bakterije *Y. enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim kulturom *Lactobacillus casei*

dan	Ko-Lc-0	Ko-Lc-2%B	Ko-Lc-5%B	Ko-Lc-2%K	Ko-Lc-5%K
0	11,20	11,00	11,80	14,60	11,70
7	12,00	12,00	15,50	13,00	15,20
14	11,90	12,00	12,70	13,20	15,40
21	14,70	17,50	16,30	17,50	16,50

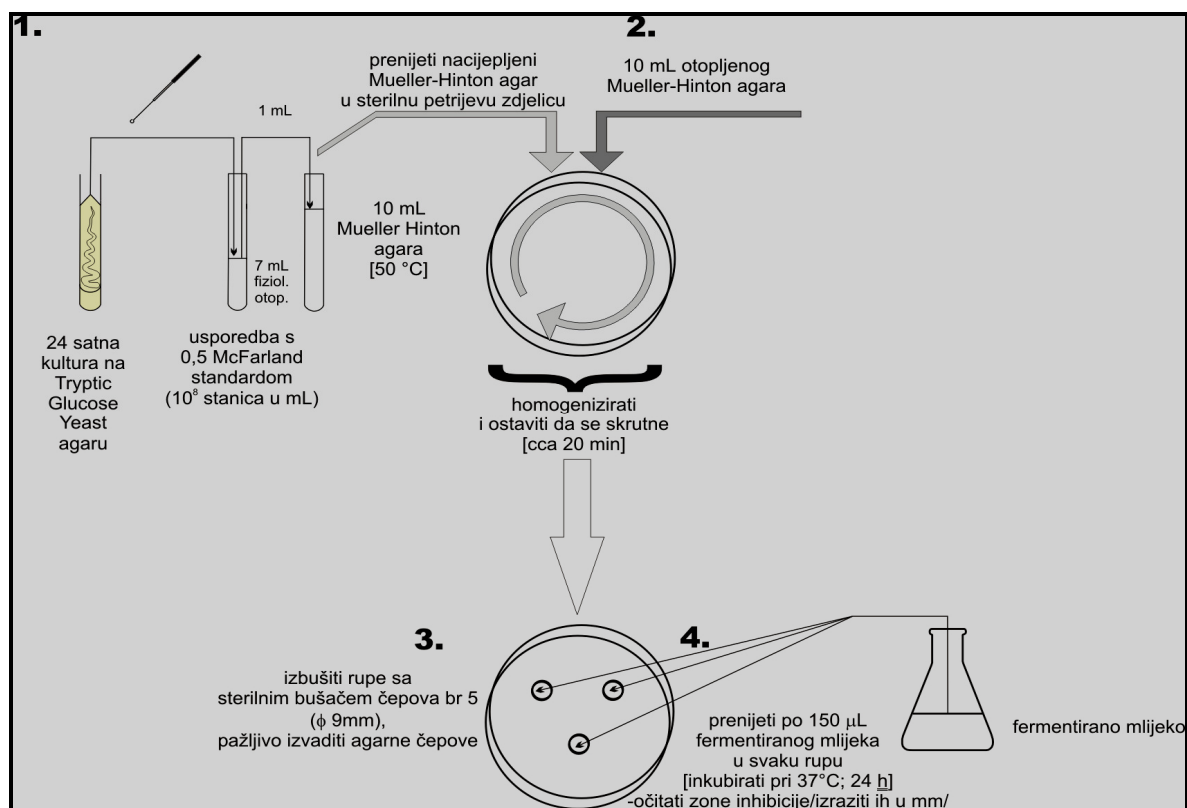
min = vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)

Prilog 3 Zone inhibicije (izražene u mm) bakterije *Y. enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim kulturom *Lactobacillus casei*

dan	So-Lc-0	So-Lc-2%B	So-Lc-5%B	So-Lc-2%K	So-Lc-5%K
0	min	11,10	12,80	11,45	15,80
7	min	12,00	13,10	12,00	13,50
14	11,20	11,80	12,10	11,90	12,50
21	11,20	12,60	15,70	15,50	16,40



Prilog 4 Shematski prikaz pripreme razrjeđenja uzoraka



Prilog 5 Shematski prikaz određivanja stupnja inhibicije