

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

**MONIKA BABIĆ**

**UTJECAJ DODATKA MEDA NA FERMENTACIJU KRAVLJEG, KOZJEG I  
SOJINOG MLJEKA BAKTERIJOM *Lactobacillus casei* – 01**

**Diplomski rad**

**Osijek, prosinac 2009.**

## BIBLIOGRAFSKI PODACI

Znanstveno područje:                   **biotehničke znanosti**  
Znanstveno polje:                       **prehrambena tehnologija**  
Znanstvena grana:                       **inženjerstvo**  
Institucija u kojoj je rad izrađen:  
  **Prehrambeno tehnoški fakultet, Osijek**  
  **Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda**

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

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

Broj stranica:                         **37**  
Broj slika:                               **13**  
Broj tablica:                           **9**  
Broj literaturnih referenci:        **15**

**Datum obrane:** \_\_\_\_\_ **2009.**

Povjerenstvo 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 – tehnoškog fakulteta  
u Osijeku, Franje Kuhača 20.**

# *Zahvala*

*Na prvom mjestu se zahvaljujem roditeljima, sestrama i braći na dugogodišnjoj potpori tijekom studiranja. Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Jovici Hardi na predloženoj temi i stručnoj pomoći pri pisanju rada, te Mireli Lučan, dipl. ing. na stručnoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

	Str.
<b>1. UVOD.....</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	
2.1. Kravlje mlijeko.....	2
2.1.1. Kemijski sastav kravljeg mlijeka.....	3
2.1.2. Fizikalna svojstva kravljeg mlijeka.....	6
2.2. Kozje mlijeko.....	7
2.2.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka.....	8
2.2.2. Fizikalna svojstva kozjeg mlijeka.....	10
2.3. Sojino mlijeko.....	10
2.3.1. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost sojinog mlijeka.....	12
2.4. Sličnosti i razlike kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.....	14
2.5. Probiotičke bakterije.....	15
2.5.1. Definicija probiotika.....	15
2.5.2. Bakterija <i>Lactobacillus casei</i> .....	17
2.6. Definicija, kemijski sastav i vrste meda.....	17
2.7. Fermentacija.....	20
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	
3.1. Zadatak rada.....	23
3.2. Materijal i metode.....	23
3.2.1. Priprema uzorka.....	23
3.2.2. Fermentacija kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.....	23
3.2.3. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala.....	23
3.2.4. Određivanje električne vodljivosti.....	23
<b>4. REZULTATI.....</b>	26
<b>5. RASPRAVA.....</b>	32
5.1. Usporedba parametara fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka...	32
5.2. Usporedba električne vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.....	32
5.3. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravljeg mlijeka.....	33
5.4. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kozjeg mlijeka.....	33
5.5. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju sojinog mlijeka.....	34
5.6. Utjecaj dodatka meda na električnu vodljivost.....	35
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	36
<b>7. LITERATURA.....</b>	37

Predlagatelj teme imenovan je za mentora izrade diplomskog rada na **12.** sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku održanoj **03. 06. 2009.** godine, a temeljem članka 62. Pravilnika o studiranju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

**Diplomski rad izrađen je 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.**

## **UTJECAJ DODATKA MEDA NA FERMENTACIJU KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIKEKA BAKTERIJOM *Lactobacillus casei* - 01**

### **SAŽETAK**

U radu je istražen utjecaj dodatka bagremovog meda na brzinu fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka probiotičkom monokulturom *Lactobacillus casei* – 01. Med je dodavan u udjelima 3, 5 i 7%, a kao kontrola je korišten uzorak bez dodatka meda. Praćene su promjene pH vrijednosti i električne vodljivosti tijekom 24 sata fermentacije na temperaturi od 37 °C. Najsporije odvijanje fermentacijskih procesa je zamjećeno u uzorcima kravljeg mlijeka, dok je fermentacija najbrže tekla u kozjem mlijeku. Najveći utjecaj na ubrzanje fermentacije imao je dodatak meda u sojino mlijeko. Dodatak meda uzrokovao je smanjenje vrijednosti električne vodljivosti uzorka. Optimalni udio dodatka meda za ubrzanje fermentacije bakterijom *Lactobacillus casei* – 01 u kravljem i sojinom mlijeku bio je na razini 5% dodatka, a za kozje mlijeko utvrđena je optimalna razina od 7% dodatka meda.

**Ključne riječi:** kravljje mlijeko, kozje mlijeko, sojino mlijeko, bagremov med,  
*Lactobacillus casei* – 01, brzina fermentacije

## **INFLUENCE OF HONEY ADDITION TO FERMENTATION OF COW'S GOAT'S AND SOY MILK WITH *Lactobacillus casei* Lc- 01**

### **Summary**

Influence of acacia honey addition on fermentation activity of *Lactobacillus casei* Lc-01 in cow's, goat's and soy milk was investigated. Honey was added in contents of 3, 5 and 7 per cent. The control samples were prepared without honey addition. Changes of pH values and conductivity during 24<sup>th</sup> hours of fermentation at 37 °C were determined. High rate of fermentation was noted in cow milk, and the slow fermentation rate was in cow milk samples. Addition of acacia honey had the most influence on fermentation activity of *Lactobacillus casei* Lc-01 in soy milk. Furthermore, addition of honey influenced considerably to the decrease of conductivity in all of analyzed samples. According to obtained results, 5% of honey addition was selected as an optimal content for cow's and soy milk. In goat milk, optimal content of honey addition which had the highest influence on the fermentation rate promotion was 7 per cent.

**Keywords:** cow's milk, goat's milk, soymilk, acacia honey, *Lactobacillus casei* Lc-01, fermentation rate

## 1. UVOD

U suvremenom svijetu u novonastalim uvjetima života i rada trend je vođenje zdravog života, što bi podrazumijevalo zdravu prehranu. Zbog svojih ljekovitih svojstava kozje mlijeko zauzima visoko mjesto na ljestvici zdravih namirnica, no značajni su i kravlje i sojino mlijeko (mlijeko proizvedeno od sojinih zrna), koje također imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Posljednjih godina raste proizvodnja i potrošnja fermentiranih mliječnih proizvoda, povećane nutritivne i terapijske vrijednosti. Fermentirani proizvodi se dobivaju procesom mliječno-kisele fermentacije. To je niz vrlo složenih fizikalno-kemijskih i biokemijskih procesa koji ovise o mnogim čimbenicima, a jedan od važnijih je izbor kulture za fermentaciju.

Osamdesetih godina prošlog stoljeća počinju se u prehranu uvoditi i probiotici, mikroorganizmi čija je glavna karakteristika da su matične kulture izolirane iz zdravog ljudskog organizma. Imaju povoljno djelovanje na ljudsko zdravlje, koje se očituje u liječenju probavnih poremećaja, u prevenciji raka debelog crijeva, vraćanju ravnoteže crijevne mikroflore, stimuliranju imunološkog sustava.

Pojavom probiotika u prehrani se paralelno pojavila i soja, a između ostalih proizvoda od soje i sojino mlijeko. Sojino mlijeko sadrži isto (ili više) proteina od kravljeg, ali ne sadrži laktozu. Poznato je da postoje ljudi koji su preosjetljivi na laktozu i/ili proteine mlijeka pa im je sojino mlijeko potpuna, izvanredna zamjena.

Kozje se mlijeko ne koristi često u svakodnevnoj prehrani kao kravlje. Najčešće ga koriste starije osobe, te bolesnici koji boluju od kroničnih bolesti ili alergija, upravo zbog dokazanog pozitivnog učinka na zdravlje. Najčešći oblik konzumiranja kozjeg mlijeka je u obliku sira, ali u novije vrijeme u hrvatskoj i kao steriliziranog trajnog mlijeka (najznačajniji proizvođač VINDIJA, Varaždin).

Med je namirnica poznata po svojim hranjivim svojstvima, bogat je izvor šećera. Med ima potencijalno dobra prebiotička svojstva, ali djeluje i baktericidno i antimikotično.

Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji selektivnom stimulacijom rasta bakterija povoljno utječu na zdravlje domaćina. Med je u potpunosti iskoristiva namirnica, bogat je raznim ljekovitim i hranjivim tvarima, te ima svojstva koja mu daju prednost pred mnogim namirnicama.

Cilj istraživanja u ovom radu bio je utvrditi u kojim udjelima med najpovoljnije djeluje na brzinu fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka pomoću kulture *Lactobacillus casei*-01.

## 2.1. KRAVLJE MLIJEKO

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složena sastava, žućkasto bijele boje, karakteristična okusa i mirisa, koju izlučuje mliječna žljezda ženki sisavaca, određeno vrijeme nakon poroda. Pod pojmom mlijeko uvijek se podrazumijeva kravlje mlijeko, dok se ostale vrste mlijeka moraju vidljivo označiti na ambalaži mlijeka ili mliječnog proizvoda. Kakvoća mlijeka mora odgovarati zakonskim propisima koji mlijeko definiraju kao normalni sekret mliječne žljezde, koji dobivamo redovitom i neprekidnom mužnjom jedne ili više zdravih muznih životinja, ispravno hranjenih, ispravno držanih, kojem nije ništa oduzeto niti dodano.

Kravlje mlijeka po količina ima najviše, te se ono koristi u proizvodnji većine mliječnih proizvoda, pa je i konzumno mlijeko najčešće kravlje mlijeko. U prehrani se sve više ističu prednosti kozjeg mlijeka, osobito u osoba alergičnih na proteine kravljeg mlijeka. Osim toga, kozje se mlijeko preporučuje u prehrani mlađih i starijih osoba, jer je probavljivije od kravljeg mlijeka [1].

**Tablica 1** Zahtjevi na kakvoću sirovog svježeg mlijeka [1]

Mliječne masti	<b>najmanje 3,5%</b>
Bjelančevine	<b>najmanje 3,0%</b>
Suhe tvari bez masti	<b>najmanje 8,5%</b>
Gustoća na temp. 20°C	<b>od 1,028 do 1,034 g/mL</b>
Kiselinski stupanj	<b>od 6,6 do 6,8 °SH</b>
pH vrijednost	<b>6,5 do 6,7</b>
Točka ledišta	<b>nije viša od -0,517 °C</b>
Rezultat alk. probe sa 72% etilnim alkoholom	<b>negativan</b>

Sastav mlijeka može biti vrlo promjenjiv, a ovisi o bezbroj čimbenika: pasmini i zdravstvenom stanju životinja, stadiju laktacije, načinu i vrsti hranidbe, sezoni, vrsti mužnje, o dobi i broju mužnji, te o samoj individui [1].

***Prema našim propisima mlijeko mora zadovoljavati ove uvjete:***

- 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 i drugih štetnih tvari u udjelima koje mogu štetiti zdravlju ljudi;
- da točka ledišta nije viša od -0,517 °C, a refrakcijski boj niži od 39 (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].

### 2.1.1. KEMIJSKI SASTAV KRAVLJEG MLJEKA

Mlijeko je sekret mlijecne žljezde koji sadržava nekoliko stotina kemijskih sastojaka od kojih je više od 90 potpuno različitih vrlo značajnih gradivnih tvari. Mlijeko kao polidisperzni sustav se može smatrati emulzijom ili suspenzijom mlijecne masti u vodi, u kojoj se nalazi niz uklopljenih tvari kao laktoza i topljive mineralne tvari u obliku soli, te vitamini topljni u vodi.

**Tablica 2** Udjeli glavnih sastojaka u svježem mlijeku [1]

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

Voda se u mlijeku nalazi u dva oblika:

1. kao slobodna voda u kojoj se nalaze otopljeni sastojci mlijeka
2. kao vezana voda (mala količina u suhoj tvari mlijeka)

**Vezana voda** se nalazi adsorbirana u hidratacijskom sloju pojedinih sastojaka suhe tvari i to na kazein, albumin i globulin, membranu masne globule, laktozu i ostale sastojke. Pojedini sastojci suhe tvari mlijeka imaju različitu sposobnost vezivanja vode, zbog različitih udjela hidrofilnih skupina na koje se vežu bipolarne molekule vode.

Najveću sposobnost vezivanja vode imaju fosfolipidi mlijeka i albumini, a potom ostali proteini sirutke, kazein, adsorpcijski sloj membrana masnih globula, laktoza te ostali sastojci suhe tvari mlijeka. Hidratacijski sloj vezane vode utječe na stabilnost sastojaka mlijeka jer smanjuje površinsku energiju koloidne čestice, čime se značajno smanjuje mogućnost njihova spajanja [1].

**Mliječna mast** utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Udio mliječne masti u mlijeku od svih sastojaka može biti najviše promjenjiv. Od sastojaka mlijeka mliječna mast ima najveću energijsku vrijednost. U mlijeku se nalazi u obliku globula obavijenih adsorpcijskim slojem ili membranom koja stabilizira mliječnu mast u okolnoj sredini mlijeka.

Neposredno nakon mužnje mlijeko je toplo (oko 37 °C) pa se mliječna mast nalazi u tekućem stanju kao emulzija u obliku sitnih kapljica. Hlađenjem mlijeka masne se kapljice skrućuju te postaju kuglice (kristalizacija glicerida), a emulzija postaje suspenzija. Tako mliječna mast u mlijeku istodobno može biti u stanju emulzije ili suspenzije, što ovisi o uvjetima koji utječu na fizikalno stanje mliječne masti. Mliječna mast u mlijeku može istodobno biti u stanju emulzije ili suspenzije, što ovisi o uvjetima koji utječu na fizičko stanje mliječne masti [1].

**Laktoza** je disaharid sastavljen od molekula  $\alpha$ -D-glukoze i  $\beta$ -d-glukoze, a Laktoza naziva se i mliječni šećer. Prisutna je u mlijeku većine sisavaca, te u majčinom mlijeku, je udio različit ovisno o vrsti mlijeka. U svježem kravljem mlijeku, laktoze ima najviše (4,7%). Topljivost laktoze utječe na koncentrirane i zamrznute mliječne proizvode, u kojima je ponekada potrebno namjerno izazvati kristalizaciju laktoze, kako bi nastao veliki broj sitnih kristala i na taj način izbjegla pjeskovitost tih proizvoda.

Laktoza iz mlijeka, te u hrani potpomaže adsorpciju kalcija i peristaltiku crijeva, lako je probavljiva (99,7%) i pogodna za dijabetičare. Laktoza povećava energijsku vrijednost hrane (ugljikohidrati iznose 3,75 kcal/g ili 16 kJ/g), ali osobe s nedostatkom enzima laktaze ( $\beta$ -galaktozidaze) teško ju podnose jer potrošnja mlijeka u njih uzrokuju dijareju. Za osobe netolerantne na laktozu razvijen je komercijalni proces razgradnje laktoze u mlijeku ili mliječnim proizvodima koji omogućuje rješenje tog problema. Najveće promjene laktoze u mlijeku se događaju pod utjecajem mikroorganizama, uzročnika vrenja laktoze. Stoga se mlijeko mora proizvesti u higijenskim uvjetima i spriječiti naknadno onečišćenje mikroorganizmima. Važno je pomuzeno mlijeko ohladi i što prije preradi u odgovarajući proizvod.

**Proteini** u mlijeku se nalaze u obliku dušičnih spojeva, od kojih je većina u vrlo malim koncentracijama. Od ukupnih dušičnih tvari u mlijeku se nalazi oko 95% proteina i 5% neproteinskih dušičnih tvari. U neproteinske dušične tvari se ubrajaju mali peptidi, slobodne aminokiseline, aminošećeri, kreatin, kreatinin urea, ureinska kiselina i amonijak. Zbog različitog kemijskog sastava, proteini mlijeka se značajno razlikuju i po svojstvima i po stabilnosti, osobito

po načinu koagulacije. U proteinima mlijeka nalaze se dva glavna tipa potpuno različitih proteina: kazein i proteini sirutke. Po udjelu je najzastupljeniji kazein, a od proteina sirutke najviše su zastupljeni  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktoglobulin. Pri određivanju ukupnog udjela dušika u mlijeku, Kjeldahlovom metodom udio ukupnih proteina obično se izračunava koristeći faktor pretvorbe 6,38 ili (6,35). Dobivena je vrijednost (ukupni N x 6,38) za 4 do 8% veća od stvarnog udjela proteina, jer ta vrijednost obuhvaća i neproteinski dušik mlijeka [1].

**Mineralne tvari** se prema njihovom udjelu dijele na mikroelemente i makroelemente. Mikroelemenata u mlijeku ima brojčano puno više nego makroelemenata, ali je većina od nađenih prisutna samo u tragovima ili je kvalitativno dokazana (Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Cu, F, Sr i dr.). Velika količina mineralnih tvari jedan je od glavnih negativnih utjecaja kravljeg mlijeka na osjetljivu prehranu djece u najranijoj dobi i ne preporuča se dojenčadi do navršene godine dana. Mineralne tvari u mlijeku neposredno utječu na osmotski tlak, elektrovodljivost, točku zamrzavanja i ključanja mlijeka, titracijsku kiselost, pH-vrijednost, puferski kapacitet mlijeka, disperznost kazeina, gustoću i viskoznost mlijeka.

Udio mineralnih tvari u mlijeku najčešće se izražava količinom pepela koja se dobije kao ostatak spaljivanja mlijeka (pri 550 °C). Spaljivanjem mlijeka gubi se dio mineralnih tvari, a pritom mogu nastati drugi spojevi. Organski se spojevi pritom potpuno razgrađuju, pa mogu nastati karbonati i sulfati. Dio Na i K u mlijeku također se gubi spaljivanjem. Stoga je količina pepela, određenog u mlijeku (oko 7%), nešto niža nego što je stvarni udjel mineralnih tvari u mlijeku (oko 9%) [1].

U mlijeku su prisutni skoro svi poznati **vitamini**. Udio vitamina topljivih u masti ovisi o njihovom udjelu u hrani za prehranu krava i uglavnom o udjelu prisutne masti u mlijeku. Vitamini topljni u vodi potječu uglavnom od mikroflore buraga koji ih sintetiziraju. Mlijeko je bogato vitaminima B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub>, tako da litra mlijeka može zadovoljiti dnevnu potrebu ljudskog organizma za tim vitaminima, dok su količine drugih vitamina u mlijeku nedostatne za dnevne potrebe ljudskog organizma [1].

**Vitamin A** se u mlijeku nalazi u obliku vitamina i njegova provitamina  $\beta$ -karotena, te o njegovoj količini ovisi žuta boja mlijeka.

**Vitamina C** po udjelu ima najviše u svježem pomuzenom mlijeku, vrlo je termolabilan i osjetljiv na svjetlost, iako se i u mraku razgrađuje, te pri niskim temperaturama. Mlijeko je vrlo siromašno **vitaminom D**, dok je količina **vitamina K i E** vrlo mala [1].

## 2.1.2. FIZIKALNA SVOJSTVA KRAVLJEG MLIJEKA

**Prirodna kiselost** svježeg mlijeka potječe od kiselih svojstava proteina (kazeina), a najviše od kiselih soli u mlijeku, askorbinske kiseline i slobodnih aminokiselina. Kislost se može odrediti kao titracijska kiselost ili aktivnost kiselosti mlijeka, odnosno pH-vrijednost mlijeka.

**Titracijska kiselost** određuje se filtracijom mlijeka sa otpino NaOH određene molarnosti na fenolftalein kao indikator. Titracijska kiselost je ukupna prirodna kiselost i naknadno nastala kiselost izražena u stupnjevima °SH. Titracijska kiselost svježeg mlijeka je najčešće između 6,5-7,5 °SH, ali u pojedinim uzorcima interval titracijske kiselosti može biti značajno širi, što ovisi o puferskom kapacitetu svake šarže mlijeka.

**Aktivna kiselost** mlijeka izražava se kao negativan logaritam koncentracije vodikovih iona ili pH vrijednošću. Aktivna kiselost svježeg mlijeka je zbog puferskih svojstava mlijeka u užim granicama, i to od 6,5 do 6,7, a mjerjenje pH-vrijednosti se provodi pomoću pH-metra.

**Puferski kapacitet** mlijeka je broj molova kiseline ili lužine potreban da se pH-vrijednost mlijeka promijeni za jedinicu. Najveći puferski kapacitet mlijeka veći je od puferskog kapaciteta seruma mlijeka.

**Gustoća mlijeka** se izražava u g/mL, a zbog ovisnosti o temperaturi, navodi se i referentna temperatura. Gustoća se izražava kao omjer mase tvari i volumena. Gustoća mlijeka pojedinih krava može biti u granicama od 1,015 g/mL do 1,045 g/mL, ali se gustoća ukupnog mlijeka nalazi u granicama 1,028 g/mL do 1,034 g/mL. **Viskoznost** mlijeka je rezultat unutrašnjeg trenja molekula, odnosno otpora tekućine pri tečenju. Ovisi o temperaturi, te o koncentraciji, fizikalnom stanju i disperziji sastojaka suhe tvari. Na 20 °C može biti 1,3 do 2,2 x 10<sup>-3</sup> Pas.

**Vrelište** mlijeka zbog otopljenih tvari je nešto veća od temperature vrenja vode i iznosi 100,6 °C.

**Ledište** mlijeka, ovisi o koncentraciji otopljenih tvari i najstabilnija je konstanta koja ipak samostalno i isključivo, ne može poslužiti za ocjenu ispravnost mlijeka, a kreće se od - 0,510 do - 0,520 °C [1].

## 2.2. KOZJE MLIJEKO

Kozjem mlijeku se danas pridaje sve veći značaj. U odnosu na ostale vrste mlijeka, proizvodnja kozjeg mlijeka je u najvećem porastu. Iako je sastav kozjeg i kravlje mlijeka u osnovi vrlo sličan, kozje mlijeko ima znatne dijetetske i terapijske prednosti. Nažalost, ono je puno slabije izraženo. Iako kozje mlijeko čini svega 2% ukupne svjetske proizvodnje, u prehrani se sve više ističu njegove prednosti. U posljednjih 20 godina proizvodnja kozjeg mlijeka u svijetu bilježi sve veći porast [3].

***Kozje mlijeko prema hrvatskim normama [2] mora udovoljavati sljedećim zahtjevima kakvoće:***

- da sadrži najmanje 2,8% mlijecne masti;
- da sadrži najmanje 2,5% bjelančevina;
- da sadrži najmanje 7,5% suhe tvari bez masti;
- da mu je gustoća 1,024 do 1,040 g/mL na temperaturi od 20 °C;
- da mu je kiselinski stupanj 6,5 do 8,0 °SH, a pH vrijednost od 6,4 do 6,7;
- da mu točka ledišta nije viša od - 0,54 °C.

**Tablica 3** Klase kozjeg mlijeka zavisno od prosječnog broja mikroorganizama prema Pravilniku [2]

Klasa	Broj mikroorganizama
I	≤1,000,00
II	1,001,000 – 1,500,000
III	> 1,500,000

Kozje mlijeko je značajno probavljivije u odnosu na kravlje, što se pripisuje nizu fizikalno-kemijskih svojstava većine sastojaka: manji promjer masnih kapljica, veći udio kratko i srednje lančanih masnih kiselina, veći udjel lakše probavljivih frakcija proteina (sirutkini proteini) i veći udjel neproteinskog dušika, a manje kazeina uz manji promjer micela, veći udjel vitamina A, te vitamina D i nikotinske kiseline, veći udjel topljivog Ca, Mg, anorganskog P, kao i Fe, koji se nalaze u obliku bolje bioiskoristivosti nego u kravljem mlijeku.

Osim toga, kozje mlijeko ima jače izražene baktericidna i imunološka svojstva, te je i pogodno u prehrani osoba mlađe ili starije dobi, za osobe pod raznim stresovima i blokadama. Stoga se kozje mlijeko sve češće spominje kao vrlo „zdravo mlijeko“ [2].

## 2.2.1. KEMIJSKI SASTAV KOZJEG MLJEKA

Suježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih, pravilno uzbajanih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog (kozjeg) mirisa.

Prehrambena, biološka i terapeutска vrijednost kozjeg mlijeka kao namirnice izuzetno je značajna obzirom na sastav, mogućnost resorpcije i iskorištenja u ljudskom organizmu. Kozje mlijeko ima veliku važnost u ljudskoj prehrani, osobito kao izvor bjelančevina visoke kakvoće, vitamina i mineralnih tvari.

Prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka određena je njegovim kemijskim sastavom i fizičkim svojstvima.

Kemijski sastav kozjeg mlijeka dosta je kompleksan i određen brojnim čimbenicima, od kojih su najvažniji pasmina i hranidba, zatim redoslijed i stadij laktacije, te dob životinja, zdravstveno stanje i dr. Kozje mlijeko, iako je po sastavu slično kravljem, ipak ima određenih specifičnosti koje ga čine drugačijim od mlijeka drugih vrsta životinja. Kozje mlijeko u kemijskom sastavu sadrži znatno manje suhe tvari i mineralnih tvari u odnosu na kravljе [4].

**Tablica 4** Sastav kozjeg mlijeka [3]

SASTOJAK	UDIO%
Voda	88,7
Suha tvar	11,3
Suha tvar bez masti	8,0
Mlječna mast	3,3
Proteini	3,1
Laktoza	4,4
Mineralne tvari	0,7

**Mlječna mast** utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda. Najpromjenjiviji sastojak kozjeg mlijeka je mlječna mast (2,0 do 8,0%). Mlječna mast je smjesa velikog broja različitih lipidnih tvari i sadrži više od 200 različitih masnih kiselina. Većina njih javlja se samo u tragovima. Samo 15 masnih kiselina mlječne masti, zastupljeno je u udjelu većem od 1%.

Kratki lanci masnih kiselina osiguravaju mlječnoj masti izvanrednu probavljivost, brzu apsorpciju, a mlječna mast opskrbljuje organizam esencijalnim masnim kiselinama i u masti topljivim vitaminima (A, D, E i K).

Kozje mlijeko sadrži manje kolesterola u odnosu na kravlje. Razlika u mlijecnoj masti kozjeg i kravljeg mlijeka je u zasićenosti i duljini lanaca masnih kiselina, što ima veliku nutritivnu i zdravstvenu važnost. Kozje mlijeko je probavljivije od kravljeg mlijeka, jer je njegova mast sastavljena od sitnijih globula. Ukupna dodirna površina je veća, te ih lipaze u crijevima lakše razgrađuju. Za probavu kozjeg mlijeka potrebno je oko 40 minuta dok je za probavu kravljeg mlijeka potrebno oko 2,5 sata.

**Proteini** sudjeluju u gotovo svim procesima u organizmu od građe do reprodukcije. Oni kataliziraju važne reakcije u ljudskom organizmu, vežu mineralne tvari i vitamine, te stabiliziraju okus mlijeka i mlijecnih proizvoda. Najvažniji protein kozjeg mlijeka su  $\alpha$ s1-kazein,  $\alpha$ s2-kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein, te čine do 80% ukupnih proteina. Kazein koji je u mlijeku u obliku većih koloidnih čestica, sadrži značajne količine kalcija i fosfata, a manje magnezija i citrata. Proteini sirutke su biološki najvrjedniji proteini [3].

**Nutritivna vrijednost** proteina ovisi o udjelu različitih aminokiselina, koje se apsorbiraju nakon probave. Proteini kozjeg mlijeka su probavljiviji od proteina kravljeg mlijeka, uz značajno učinkovitiju apsorpciju aminokiselina. Udio ukupnih aminokiselina podjednak je u oba mlijeka. Ipak, udjeli histidina, arginina, cisteina, valina, leucina i asparagina su veći u kozjem mlijeku, dok je udjel serina, tirozina i glutamina manji. Udio esencijalnih aminokiselina također je podjednak u obje vrste mlijeka.

Iako je **biološka vrijednost** ova dva mlijeka približno jednaka, ipak analiza udjela aminokiselina pokazuje nešto veći udio slobodnih aminokiselina u kozjem mlijeku, a osobito slobodnih esencijalnih aminokiselina. Kazeinske micele kozjeg mlijeka su manje u odnosu na kazeinske micele kravljeg mlijeka, a udjel proteina sirutke (albumina i globulina) u kozjem mlijeku je veći. Dok je u kravljem mlijeku  $\alpha$ s1-kazein glavna frakcija kazeina, u kozjem mlijeku to je  $\beta$ -kazein. Može se reći da je  $\beta$ -kazein glavni protein kozjeg mlijeka.

Kozje mlijeko sadrži veću količinu mineralnih tvari od kravljeg mlijeka, osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan.

Krajem laktacije mlijeko sadrži više mineralnih tvari, pa je ta slanost izraženija. Kozje mlijeko je izvrstan izvor biorazgradivog kalcija, fosfora i magnezija, jer sadrži veće količine tih tvari u topljivom obliku u odnosu na kravlje [3].

## 2.2.2. FIZIKALNA SVOJSTVA KOZJEG MLIJEKA

Fizikalna svojstva kozjeg mlijeka određena su njegovim sastojcima i međusobnim odnosima. Stoga se sve promjene u kemijskom sastavu mlijeka odražavaju na njegova fizikalna svojstva. **Gustoća** kozjeg mlijeka je različita i oscilira u uskim granicama od 1,026 do 1,042 ili prosječno oko 1,030 g/mL po čemu je kozje mlijeko slično kravljem.

**Kiselost** kozjeg mlijeka nešto je niža od kiselosti kravlјeg mlijeka i prosječno iznosi 6,64 °SH, a kreće se između 6,5 i 7,5 °SH. Kiselost mlijeka potječe od kiselih svojstva kazeina, citrata, fosfata, te manje od albumina, globulina. Razlikuje se prirodna kiselost, koja potječe od prirodnih sastojaka mlijeka i naknadna kiselost, koja je rezultat djelovanja mikroorganizama u mlijeku. **Aktivna kiselost (pH)** kozjeg mlijeka, također je niža od kiselosti kravlјeg mlijeka i najčešće se kreće između pH 6,4 i 6,8.

**Točka ledišta** jedan je od pokazatelja kakvoće mlijeka i koristi se za utvrđivanje patvorenja mlijeka vodom. Ledište kozjeg mlijeka nešto je niže od ledišta kravlјeg mlijeka i većina autora navodi da iznosi - 0,58 °C.

**Viskoznost** kozjeg mlijeka iznosi 1,186 cP i nešto je niža od viskoznosti kravlјeg mlijeka. Viskoznost je zapravo otpor tekućine na promjenu položaja, odnosno tečenja, a zavisi o udjelu masti i bjelančevina. **Površinska napetost** kozjeg mlijeka prosječno iznosi 52,0 din/cm i slična je površinskoj napetosti kravlјeg mlijeka. **Indeks refrakcije** kozjeg mlijeka iznosi 1,342 do 1,348. **Energetska vrijednost** 100 g kozjeg mlijeka iznosi oko 69 kcal ili 288 kJ, što je znatno više od energentske vrijednosti kravlјeg mlijeka [3, 4].

## 2.3. SOJINO MLIJEKO

Soja je sve interesantnija namirnica zbog svojih nutritivnih i zdravstvenih karakteristika. U zemljama zapadne Europe i Amerike, sojino mlijeko je namijenjeno populaciji koja ne može konzumirati kravlje mlijeko, bilo zbog toga što je laktoza netolerantna, zbog alergija na proteine mlijeka ili zbog uvjerenja ne konzumiranja namirnica životinjskog porijekla (i daleki istok).

Budući da se probiotičke bakterije u organizmu najčešće unose putem fermentiranih mliječnih proizvoda, ovoj je populaciji to djelomično uskraćeno [5].

Fermentacijom sojinog mlijeka probiotičkim bakterijama mliječne kiseline, uz eventualni dodatak prebiotika, značajno se povećava zdravstvena vrijednost ove namirnice i

omogućava unos probiotičkih bakterija populaciji koja ne može/ne želi konzumirati mlijeko. Dodatkom arome i šećera, okus ovog proizvoda može se učiniti prihvativim i širem krugu potrošača.

Sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna ili fina emulzija sojinog brašna, odnosno izoliranih sojinih proteina u vodi s ili bez dodatka vitamina, mineralnih tvari i arome. To je bjelkasta emulzija/suspenzija koja sadrži u vodi topljive proteine i ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u sojinom zrnu. Graškast, sirov okus najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka. Taj nepoželjni okus potječe od nekih aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksiigenaza. Tih sastojaka nema u neoštećenom, suhom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrnje namoći i melje [5].

Postoji nekoliko pristupa rješavanju problema nepoželjnog okusa u sojinom mlijeku:

- inaktivacija lipoksiigenaze toplinom u cjelovitom suhom zrnju ili tijekom procesa mokrog mljevenja
- upotreba odmašćenih početnih sirovina
- odstranjivanje tvari arome evaporacijom
- prikrivanje gorčine i nepoželjnih okusa zaslđivanjem i aromatiziranjem
- razvoj genetički modificiranih sorti soje bez lipoksiigenaze

Komercijalizirana sojina mlijeka i srodni proizvodi mogu se prema sastavu podijeliti u sljedeće skupine:

- obično sojino mlijeko: dobiveno ekstrakcijom cjelovitog sojinog zrna vodom, gdje je odnos zrna i vode 1:5, a sadrži oko 4% proteina
- sojino mlijeko – zamjena za kravlje: proizvedeno tako da mu sastav ugrubo odgovara kravljem mlijeku, odnos zrna i vode 1:7, udio proteina 3,5% blago zaslđeno, dodaje se ulje i sol, a može mu se dodati i mlječna aroma
- sojin napitak; zaslđeno i aromatizirano piće na bazi sojinog mlijeka, odnos zrna i vode 1:20, sadrži oko 1% proteina
- fermentirani proizvodi: bilo koji od gore navedenih proizvoda nakon fermentacije bakterijama mlječne kiseline ili zakiseljavanja mlječnom kiselinom
- mješavine: sojino mlijeko u kombinaciji s nekom drugom vrstom biljnog ili životinjskog mlijeka [5].

### 2.3.1. KEMIJSKI SASTAV I NUTRITIVNA VRIJEDNOST SOJINOG MLIJEKA

Sojini proteini, koji se nalaze i u sojinom mlijeku sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za zdravu prehranu čovjeka. Prikladni su za gotovo svačiju prehranu.

Nutritivna vrijednost sojnih proteina je u tome što potrošaču pružaju zamjenu za životinjske proteine uz istovremeni manji udjel masti. Sojino mlijeko je (kao i sve namirnice biljnog porijekla) u potpunosti bez kolesterola stoga ga mogu konzumirati populacije potrošača koji ga moraju izbjegavati.

Sojini proteini pomažu smanjivanju razine kolesterola u krvi, ublažavaju simptome menopauze, umanjuju rizik oboljenja od raznih bolesti, kao što su karcinomi, osteoporozu, žučni kamenac, a čak se istražuje mogućnost poboljšavanja stanja bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti i AIDS-a. Novim otkrićima soja ulazi na popis funkcionalne hrane, a može se reći da se trenutno nalazi između hrane i lijeka.

#### Sastav sojinog zrna:

Sojino zrno sadrži oko 60% ulja i proteina u suhoj tvari, 30% ugljikohidrata i 5% mineralnih tvari. Većina sojinih proteina je termostabilna, što omogućuje proizvodnju namirnica koje zahtijevaju visoku temperaturu kuhanja, kao što su tofu, sojino mlijeko i teksturirani proteini.

Glavni ugljikohidrati zrelog sojinog zrna su: disaharid saharoza 2,5 do 8,2% trisaharid rafinoza 0,1 do 1,0% i tetrasaharid stahioza 1,4 do 4,1%. Ovi oligosaharidi osiguravaju stanicama sjemena preživljavanje u uvjetima suše, tako što se vežu na proteine i sprječavaju njihovo isušivanje. Netopljivi ugljikohidrati soje su složeni polisaharidi: celuloza, hemiceluloza i kiseli polisaharid tipa pektina. Većina ugljikohidrata sojina zrna može se svrstati u dijetalna vlakna.

**Proteini soje** i izolati sojinih proteina primjenjuju se u prehrambenoj industriji, u proizvodnji mnogih namirnica, pa i hrane za dojenčad, te druge hrane. Razlog tome su brojne bioaktivne komponente sojina zrna, od kojih su proteini i izoflavoni posebno važni zbog svoje estrogen aktivnosti. Soja sadrži 40 do 45% proteina na suhu tvar, a oni doprinose nutritivnoj vrijednosti hrane i krmiva te koriste i za postizanje određenih funkcionalnih karakteristika raznih prehrambenih proizvoda.

Obzirom na sedimentacijski koeficijent, sojini se proteini mogu podijeliti u četiri glavne frakcije: 2, 7, 11, 15S. Najzastupljenije su 7S i 11S frakcije koje čine 70% proteina [5].

Frakcija 2S prevladava u ranom stadiju razvoja sjemena i tvori oko 20% ukupnih proteina, sadržava i tripsin inhibitore. 7S frakciju čine  $\beta$ -konglicinin te  $\gamma$ -konglicinin, bazni 7S globulin, hemaglutinin (lektin) i  $\beta$ -amilaze.

Oko 35% ukupnih proteina čini frakcija 11S, sastoji se od samo jednog proteina-glicinina. Glicinin je jedini biljni protein koji sadrži sve esencijalne aminokiseline potrebne za rast i razvoj organizma. Po aminokiselinskom sastavu, vezivanju mineralnih tvari i koloidnom stanju u koje se može prevesti s obzirom na svoju djelomičnu topljivost u vodi, sličan je kazeinu mlijeka. 15S frakcija čini samo desetinu ukupnih proteina soje.

Svi proteini pohranjeni unutar proteinskih tijela, tzv. aleuronskih zrna koja čine 60 do 70% mase zrna. U proteinima soje zastupljene su sve aminokiseline potrebne za ljudsku prehranu, osim aminokiselina sa sumporom, od kojih je najdeficitarniji metionin. Većina sojinih proteina su globulini, topljivi pri svojoj izoelektričnoj točki, čak i uz dodatak soli. Izoelektrična točka sojinih proteina je pri pH 4,2 do 4,6. Da bi se postigla maksimalna nutritivna vrijednost, potrebna je toplinska obrada kako bi se modificirala funkcionalna svojstva sojinih proteina.

**Lipidi soje** građeni su pretežno od triacilglerola, estera trovalentnog alkohola glicerola i tri masne kiseline. Najzastupljenija je linolna, a zatim oleinska, palmitinska, linolenska, laurinska, miristinska i stearinska kiselina. Linolna i oleinska čine oko 75% ukupnih lipida soje.

**Ugljikohidrati soje:** Soja sadrži oko 30% ugljikohidrata, oko 20% netopljivih (vlakana) i oko 10% topljivih (u prvom redu disaharida saharoze i oligosaharida rafinoze i stahioze). Rafinoza je trisaharid koji se sastoji od jedne molekule saharoze povezane s jednom melekulom galaktoze, a stahioza je tetrasaharid građen od jedne molekule saharoze i dvije molekule galaktoze.

Ljudski probavni sustav nema enzima  $\alpha$ -galaktozidaze potrebnog u sluznici tankog crijeva za razgradnju oligosaharida. Tako oni nerazgrađeni dođu u debelo crijevo i podliježu mikrobnoj razgradnji, prilikom čega nastaju plinovi koji stvaraju nadutost i uzrokuju vrlo neugodnu bol u trbuhi. Fermentirani proizvodi, kao što su tofu, umak od soje i sojin jogurt, te koncentrati i izolati sojinih proteina, nemaju takvo djelovanje jer svi topljivi ugljikohidrati prelaze u sirutku ili se razgrađuju tijekom fermentacije. S druge strane postoji i prednost uzimanja oligosaharida kao što su stahioza i rafinoza, jer oni potiču rast autohtonih bifidobakterija u debelom crijevu na račun putrefaktivnih bakterija. Ugljikohidrati soje, i oni topljivi i oni netopljivi, spadaju u kategoriju dijetalnih vlakana [5].

Konsumiranje namirnica bogatih vlaknima usko je povezano s održavanjem optimalnog zdravlja jer pomaže u stvaranju otpornosti na bolesti. Topljiva vlakna, dokazano snižavaju količinu lipoproteina male gustoće u krvnom serumu, a ne topljiva imaju sveukupni zaštitni utjecaj, te smanjuju i rizik od pojave karcinoma [5].

## 2.4. SLIČNOSTI I RAZLIKE KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLJEKA

Osnovna razlika između kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka je u tome da se sojino mlijeko dobiva tehnološkim postupkom prerade soje, a kozje i kravljje su sekreti mliječnih žljezdi ženki sisavaca. Pod pojmom mlijeko se podrazumijeva samo kravljje mlijeko dok se na ostalima mora deklarirati porijeklo (sojino, kozje, ovčje).

Mlijeko je visokovrijedna namirnica, ali su udjeli i međusobni odnosi sastojaka različiti, pa se vrste mlijeka razlikuju po prehrambenim, fizikalno-kemijskim i tehnološkim svojstvima.

Sojino i kravljje mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih svojstava osim velikog udjela visokovrijednog proteina, s tim da proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein, 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 su isključivo u obliku laktoze, dok su u sojinom mlijeku ugljikohidrati u obliku oligosaharida stahioze i rafinoze. Iako kravljje mlijeko sadrži znatno veće udjele kalcija i fosfora, ono je vrlo siromašno željezom, dok sojino mlijeko sadrži i do 10 puta veću količinu željeza, iako je njegova bioiskoristivost manja [5].

Sastav kozjeg mlijeka znatno više varira u ovisnosti o pasmini i klimatu uzgoja, a koze uzgajane u toplijim krajevima daju mlijeko s više masti, proteina, ali i mineralnih tvari i laktoze, od koza kontinentalnih europskih mliječnih pasmina. Prosječni je udio mliječne masti u kozjem mlijeku veći nego u kravljem, ali su kapljice mliječne masti manjeg promjera i bolje raspršene, pa je stoga obiranje kozjeg mlijeka teže. Veća kontaktna površina masnih kapljica kozjeg mlijeka omogućuje lakši kontakt enzima probavnog trakta, što kozjem mlijeku povećava probavlјivost u odnosu na kravljje [1].

**Tablica 5** Usporedba sastava i svojstava kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka [5,6]

Svojstvo/sastojak	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko	Sojino mlijeko
<b>Ukupna suha tvar</b>	11,3-15,1%	12,5-13%	11,97%
<b>Ukupni lipidi</b>	3,0-5,5%	3,5-4,0%	1,92%
<b>Ukupni proteini</b>	2,9-4,6%	3,1-4,0%	4,48%
<b>Ugljikohidrati</b>	3,8-5,1%	4,1-5,0%	4,93%
<b>Energija</b>	293-360 J/100 ml	272-335 J/100 ml	216 kJ/100 ml
<b>Ukupni minerali</b>	0,55-0,95 g/100 ml	0,7 g/100 ml	0,64 g/100 ml
<b>Kalcij</b>	114-163 mg/100 ml	125 mg/100 ml	38 mg/100 ml
<b>Natrij</b>	35-42 mg/100 ml	52 mg/100 ml	55 mg/100 ml
<b>Kalij</b>	165-228 mg/100 ml	150 mg/100 ml	124 mg/100 ml
<b>Magnezij</b>	13-36 mg/100 ml	12 mg/100 ml	25 mg/100 ml
<b>Fosfor</b>	84-122 mg/100 ml	95 mg/100 ml	55 mg/100 ml
<b>Željezo</b>	0,01-0,07 mg/100 ml	0,05-0,01 mg/100 ml	1,1 mg/100 ml
<b>Bakar</b>	0,02-0,06 mg/100 ml	0,02-0,06 mg/100 ml	0,141 mg/100 ml

## 2.5. PROBIOTIČKE BAKTERIJE

### 2.5.1. DEFINICIJA PROBIOTIKA

Spoznaja da se konzumacijom hrane u čijem su sastavu uklopljeni živi mikroorganizmi, nazvani probiotici, može pozitivno djelovati na ljudsko zdravje, izazvala je u zadnjih petnaestak godina znanstvenu revoluciju na mnogim poljima fermentativne prehrambene industrije. Probiotici su definirani kao mono ili mješovita kultura mikroorganizama, koja unesena hranom povoljno djeluje na zdravlje ljudi i životinja, poboljšavajući svojstva mikroflore domaćina.

Velikim brojem znanstvenih studija utvrđeni su potencijalni pravci djelovanja probiotika u ljudskom organizmu: vezanje na površinu crijeva i metaboliziranje u crjevima, antagonističko djelovanje prema štetnim mikroorganizmima, modulacija imunološkog sustava i antimutageno djelovanje. Osim pozitivnog djelovanju u probavnom sustavu sve se više ističe pozitivno djelovanje probiotika u urogenitalnom traktu. Gotovo svi probiotički mikroorganizmi su mlječno kisele bakterije koje se uobičajeno koriste u mljekarskoj fermentativnoj industriji. Probiotici su sastavni i funkcionalni dio fermentiranih mlječnih proizvoda [6,7].

Od bakterija mlijecne kiseline u fermentiranim mlijecnim proizvodima najčešće dolaze i laktobacili i bifidobakterije. Da bi se deklarirale kao probiotici, mlijecno kisele bakterije moraju udovoljavati određenim uvjetima:

- moraju imati dobra tehnološka svojstva: sposobnost preživljavanja u fermentiranoj mlijecnoj hrani, zadržavanje svih funkcionalnih svojstava, da ne utječu negativno na okus, aromu i teksturu fermentiranog proizvoda
- moraju preživjeti režim gornjeg probavnog trakta i živi stići na mjesto funkcionalnog djelovanja, gdje trebaju imati sposobnost vezivanja
- moraju biti sposobni pozitivno biološki djelovati nakon vezivanja u probavnom traktu

Temeljni kriteriji za definiciju probiotika su sigurnosni i funkcionalni.

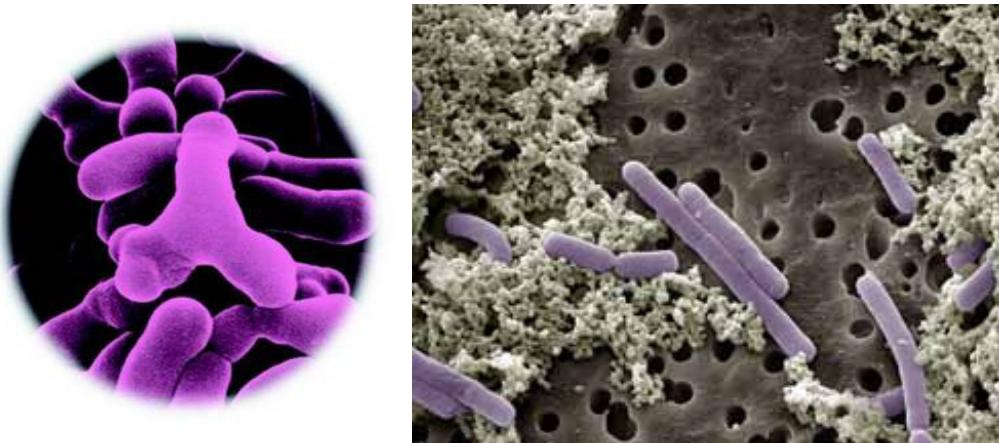
Sigurnosni kriteriji svrstani su u kategorije:

1. izvorno porijeklo iz ljudskog probavnog trakta
2. točna taksonomska identifikacija
3. izolacija iz probavnog trakta
4. nepatogenost i netoksičnost
5. dokumentirana nepovezanost s oboljenjima kao što su infektivni endokarditis i poremećaji rada probavnog trakta
6. ne izazivaju dekonjugaciju žučnih soli
7. nisu nosioci gena rezistencije na antibiotike

Funkcionalni kriteriji :

1. otpornost na kiseline i otpornost na želučani sok
2. otpornost na žuč i produkte žuči
3. sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti u „ciljanom“ području primjene u organizmu
4. adhezija na epitelnu površinu i opstanak u ljudskom probavnom traktu
5. mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore
6. otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim spojevima koje proizvodi autohtona mikroflora
7. stimulacija imunološkog sustava, ali bez protupalnih učinaka
8. antimutagena i antikancerogena svojstva [6,7].

### 2.5.2. BAKTERIJA *Lactobacillus casei*



Slika 1 *Lactobacillus casei* [9]

*Lactobacillus casei* su gram pozitivne fakultativno anaerobne, nepokretne i nesporogene, štapićasti pripadnici industrijski važnih mlijeko-kiselih bakterija. Poput ostalih mlijeko kiselih bakterija *L. casei* su otporne na kiselinu, ne mogu sintetizirati porfirine i posjeduju strogo fermentativan metabolizam s mlijeko kiselinom kao glavnim metaboličkim proizvodom. U rodu *Lactobacillus*, *L. casei* čini dio fakultativno heterofermentativnog ogranka koji proizvodi mlijeko kiselinu od heksoza preko Embden–Mayerhof-ovog puta, od pentoza preko fosfoketolaznog puta. *L. casei* rastu na 15 °C, ali ne i na 45 °C i potrebna im je folna kiselina i niacin kao faktori rasta. *L. casei* je prilagodljiva vrsta i može ih se izolirati iz sirovih i fermentiranih mlijekočnih proizvoda, svježih i fermentiranih biljnih proizvoda i reproduktivnog i intestinalnog trakta ljudi i životinja. Industrijski *L. casei* se primjenjuju kao probiotici, kao startne kulture kod proizvodnje mlijekočne kiseline, i kao specijalne kulture za pojačanje okusa i ubrzavanje zrenja nekih vrsta sireva [8,9,10].

### 2.6. DEFINICIJA, KEMIJSKI SASTAV I VRSTE MEDA

Med je slatka, gusta tekućina što ju pčele medarice tvore od nektara koji skupljaju na cvjetovima ili slatkim izlučevinama (medene rose) nekih kukaca. Med je i najsvršeniji proizvod prirode, u njemu se nalaze gotovo svi sastojci koji grade ljudski organizam [11,12].

Nektar koji pčele skupljaju iz cvijeća glavni je izvor ugljikohidrata koje pčele pretvaraju u lako probavljeni slador-glukozu i fruktozu, koji je glavni sastojak meda.

Zreli med ne sadrži više od 15% vode, a pčele ga u saću pokrivaju voštanim poklopcima i tako čuvaju od upijanja vlage i kvarenja. U medu se nalaze minerali, aminokiseline, visokovrijedne organske kiseline kao što su mravlja, jabučna, limunska, octena, jantarna, pigmenti, razni derivati klorofila, vosak, inulin, te kompleksi vitamina B. Med sadrži različite oligosaharide sa promjenjivim stupnjem polimerizacije. Jedinstven sastav meda pogoduje poboljšanju rasta, aktivnosti i održivosti probiotičkih bakterija u mlijeku i stoga i u fermentiranim proizvodima [13]. Med medljikovac sadrži 13 puta više mineralnih tvari od cvjetnog meda, a osobito željeza.

Glavni sastojci meda su ugljikohidrati i oni čine 95-99% suhe tvari, ovisno o vrsti. U medu se još nalaze bjelančevine, vitamini, enzimi i razni minerali. Od šećera u medu se nalaze monosaharidi (fruktoza i glukoza), disaharidi (maltoza, izomaltoza, saharoza, izomaltuloza i dr.), oligosaharidi (maltotriosa, kestoza, izomaltobioza). Voda je nakon ugljikohidrata drugi značajan sastojak meda, zakonski omjer vode u medu ovisi o vrsti i iznosi 15-20%. Količina vode u medu utječe na njegovu viskoznost, specifičnu masu i kristaliziranje. Tako se med u kojem je prisutna veća količina vode kasnije kristalizira. Količina vode u medu nije konstantna zbog njegove hidroskopnosti.

Vitamini su između ostalog sastavni dio meda, međutim njih nalazimo u malim količinama nedovoljnim za potrebe ljudskog organizma. U medu su prisutni vitamin C, B kompleks, niacin, biotin, pantotenska kiselina, folna kiselina. Od mineralnih tvari med sadrži silicij, aluminij, željezo, kalcij, magnezij, natrij, kalij, mangan, bakar, krom, nikal, cink, kobalt, olovo i fosfor. Količina mineralnih tvari ovisi o vrsti i podrijetlu meda. Prehrambena vrijednost meda; jedna žlica meda (oko 21 g) ima energetsku vrijednost 64 kcal, 0,06 g proteina, 17,3 g ugljikohidrata, ukupnih masti 0 g, prehrambenih vlakana 0,042 g.

### Vrste meda:

1. **Bagremov med** – izrazito je svijetlo žute boje, blaga ugodna mirisa i okusa, lagan i ukusan, preporučuje se djeci i rekonvalescentima. Zbog svojih svojstava ubraja se u najcjenjenije vrste meda. Pomaže kod nesanice, umiruje previše nadražen živčani sustav i otklanja posljedice nagomilanog stresa.

Mjesecima ostaje u tekućem stanju i jedan je od vrsta meda koji sporo kristalizira zato što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze [11].

2. **Heljdin med** – najtamniji je među cvjetnim vrstama vrlo oštra mirisa i okusa. Heljdina meda ima u vrlo malim količinama i specifičan je za područje Hrvatskog zagorja i Međimurja
3. **Kaduljin med** – rabi se protiv prehlada jer omogućuje lakše izbacivanje sluzi iz dušnika i bronhija pa i iz želuca i jednjaka. Hrvatski kaduljin med svjetski je priznat zbog svoje izuzetne kvalitete što možemo zahvaliti još uvijek očuvanoj prirodi.
4. **Kestenov med** – taman je, a boja mu varira ovisno o podneblju i godini, prepoznatljivog je mirisa i karakterističnog pomalo gorkog okusa.
5. **Livadni med** – snagom raznovrsnih sastojaka povoljno utječe na djecu u razvoju, starije osobe, kao i sve one kojima je potreban oporavak i dodatna energija.
6. **Lavandin med** – bogata i ugodna okusa, može biti tamniji ili svjetlijiji. Ovaj se med dobiva cvjetova livadnog i grmolikog bilja, a dominira lavanda

S obzirom na postupak dobivanja razlikuje se vrcani (dobiva se vađenjem meda iz saća koje su sagradile pčele centrifugalnom silom), topljeni (dobiva se zagrijavanjem topljenog saća) i muljani (dobiva se hladnim gnječenjem saća u kojima je smješten i spada među najzdravije vrste meda).

Med treba čuvati u čistim, suhim i tamnim prostorijama s dobrim provjetravanjem. Prostorija ne smije biti vlažna jer med lako upija vlagu te stoga lako prihvata druge mirise. Relativna vlažnost zraka trebala bi biti između 60% do najviše 80%. Med ne treba čuvati na niskim temperaturama, a do temperature od 15 °C kristalizacija mu je mnogo brža. Najpovoljnija mu je temperatura za čuvanje u skladištima oko 17 do 19 °C. U medu koji je proizveden prema pravilima struke vлага ne smije prelaziti 20% vlage što između ostalog ovisi o vrsti meda. U tim uvjetima opstanak bakterija i pljesni gotovo je nemoguć. Med ne treba držati u prostorijama s lukom, kiselim kupusom, naftom, benzinom, plinom i ostalim proizvodima intenzivnog mirisa, kao ni u vlažnim prostorijama.

Kvantitativnim istraživanjima utvrđeno je da se med može svrstati u 5 kategorija prema omjeru biljnih čestica:

- I. kategoriju čine peludom siromašan med. U ovu vrstu spadaju npr. lavandin med, lipov med, narančin med i lucerkin med [11].
- II. kategoriju predstavlja srednja količina biljnih čestica. Ta kategorija obuhvaća većinu na higijenski način dobivenih vrsti vrcanog meda raznih cvjetnih pčelinjih paša, ali i

većina meda od medljike. U ovoj kategoriji med ima 20.000 do 100.000 biljnih čestica na 10 grama meda.

- III. kategoriju predstavljaju vrste ekstremno bogate biljnim česticama na 10 grama od 100.000 do 500.000
- IV. kategoriju predstavljaju vrste sa 500.000 do 1.000.000 biljnih čestica na 10 grama meda. To je na primjer kestenov med, neke voćne vrste šumskog meda i sl. U njima je količina peludnih zrnaca određene vrste i preko 90%.
- V. kategoriju predstavljaju ekstremno bogati medovi koji se dobivaju postupkom prešanja [11].

## 2.7. FERMENTACIJA

Mlijeko je vrlo dobra podloga za rast mikroorganizama.

U povoljnim uvjetima mikroorganizmi kompleksne sastojke mlijeka razgrađuju na jednostavnije.

Pri optimalnoj je temperaturi mlijeka razmnožavanje mikroorganizama vrlo brzo, jer je generacijsko vrijeme većine bakterija u mlijeku svega pola sata.

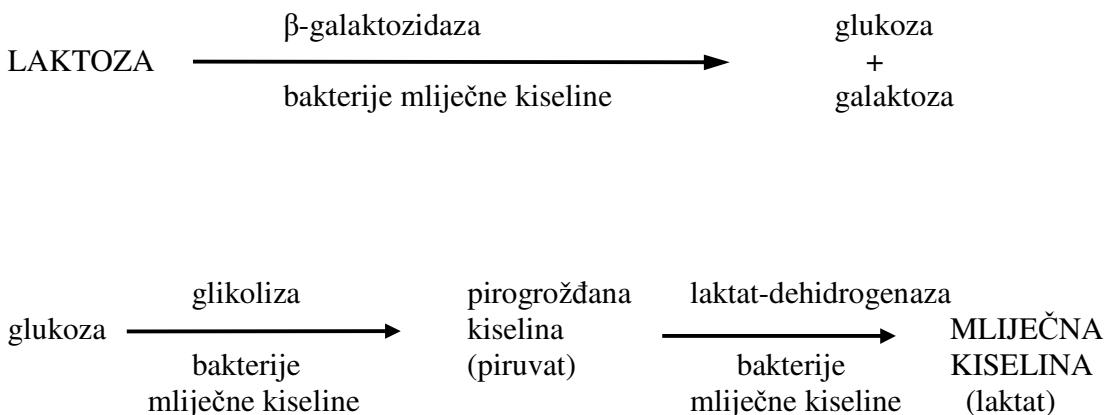
Fermentacija se može definirati kao proces koji dovodi do biokemijskih promjena organskih sastojaka djelovanjem enzima mikroorganizama, oksidacijsko-reduksijske reakcije, najčešće bez kisika, uz oslobođanje energije.

Proces mliječno kiselog vrenja laktoze mlijeka u mliječnu kiselinu djelovanjem enzima bakterija mliječne kiseline, vrlo je složen i odvija se postupnom razgradnjom laktoze, pri čemu nastaju brojni međuproizvodi i energija.

Bakterije mliječne kiseline ne koriste izravno laktozu već ju pomoću enzima lakoza-permeaze prevode u svoju stanicu gdje pomoću enzima  $\beta$ -galaktozidaze (laktaza) cijepaju laktozu u glukozu i galaktozu.

Neke bakterije mliječne kiseline koriste fosfotransferazni sustav prijenosa laktoze, koja tada ulazi u stanicu u obliku lakoza-fosfata, gdje se cijepa pomoću enzima fosfor- $\beta$ -D-galaktozidaze na glukozu i glukoza-6-fosfat.

Glukoza se dalje postupno razgrađuje putem glikolize, gdje se preko brojnih međuproductata prevodi u piruvat. Redukcijom piruvata uz djelovanje laktat-dehidrogenaze nastaje mliječna kiselina (laktat). Ovaj se put fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu naziva homofermentativni put, a provodi se pod utjecajem homofermentativnih bakterija mliječne kiseline [1].



\*Pa = anorganski fosfat

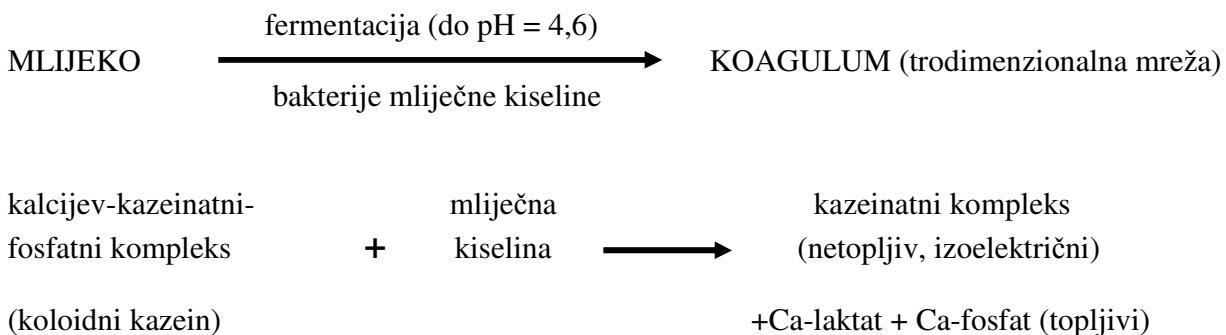
**Slika 2** Homofermentativni put mliječno kisele fermentacije [1]

Homofermentativne bakterije mliječne kiseline proizvode uglavnom mliječnu kiselinu (oko 90%) i vrlo male udjele ostalih međuproductata: diacetila, acetona, acetaldehida, etanola, octene, maslačne, propionske i mravlje kiseline, te druge tvari koje utječu na svojstvenu aromu proizvoda.

U homofermentativne bakterije mliječne kiseline ubrajaju se vrste roda *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, te homofermentativne i fakultativne heterofermentativne vrste *Lactobacillus* za razliku od homofermentativnog puta heterofermentativne bakterije mliječne kiseline razgrađuju glukozu koristeći pentozna-fosfatni put prije glikolize, te zbog toga proizvode manje mliječne kiseline (oko 50%) i veće udjele hlapivih kiselina, uglavnom octene, te nehlapljive kiseline, karbonilne spojeve, etanol i CO<sub>2</sub>.

U heterofermentativne bakterije mliječne kiseline ubrajaju se vrste roda *Leuconostoc*, te vrste roda *Bifidobacterium*. Mliječna kiselina nastala fermentacijom laktoze fermentiranim mliječnim proizvodima daje svjež kiseli okus, uvjetuje kiselu reakciju sredine, te potpomaže rast acidofilnih mikroorganizama.

Djelovanjem mliječne kiseline nastaju fizikalno kemijske promjene micela kazeina koje dovode do koagulacije kazeina, te oblikovanja koagulum mlijeka [1].



**Slika 3** Koagulacija kazeina

### **3.1. ZADATAK RADA**

Cilj ovog rada bio je odrediti optimalni udio meda za proizvodnju fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka pomoću probiotičke kulture *Lactobacillus casei* - 01.

### **3.2. MATERIJAL I METODE**

#### **3.2.1. Priprema uzorka**

Za pripremu probiotičkih kiselo mlijecnih napitaka korišteno je kravje mlijeko (UHT, 2,8% m.m., Vindija), kozje mlijeko (UHT, 3,2% m.m, Vindija) te sojino mlijeko (UHT, 2,2% masti, bez šećera i masti, Alpro Soya Belgija). U radu je korišten bagremov med (Apimel, Višnjevac) u udjelima od 3,5 i 7%.

#### **3.2.2. Fermentacija kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka**

Za fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka korištena je kultura *Lactobacillus casei* – 01. Fermentacija je provedena na temperaturi od 37°C u trajanju od 24 sata, tijekom kojih su svaka dva sata mjerene vrijednosti pH i električne vodljivosti.

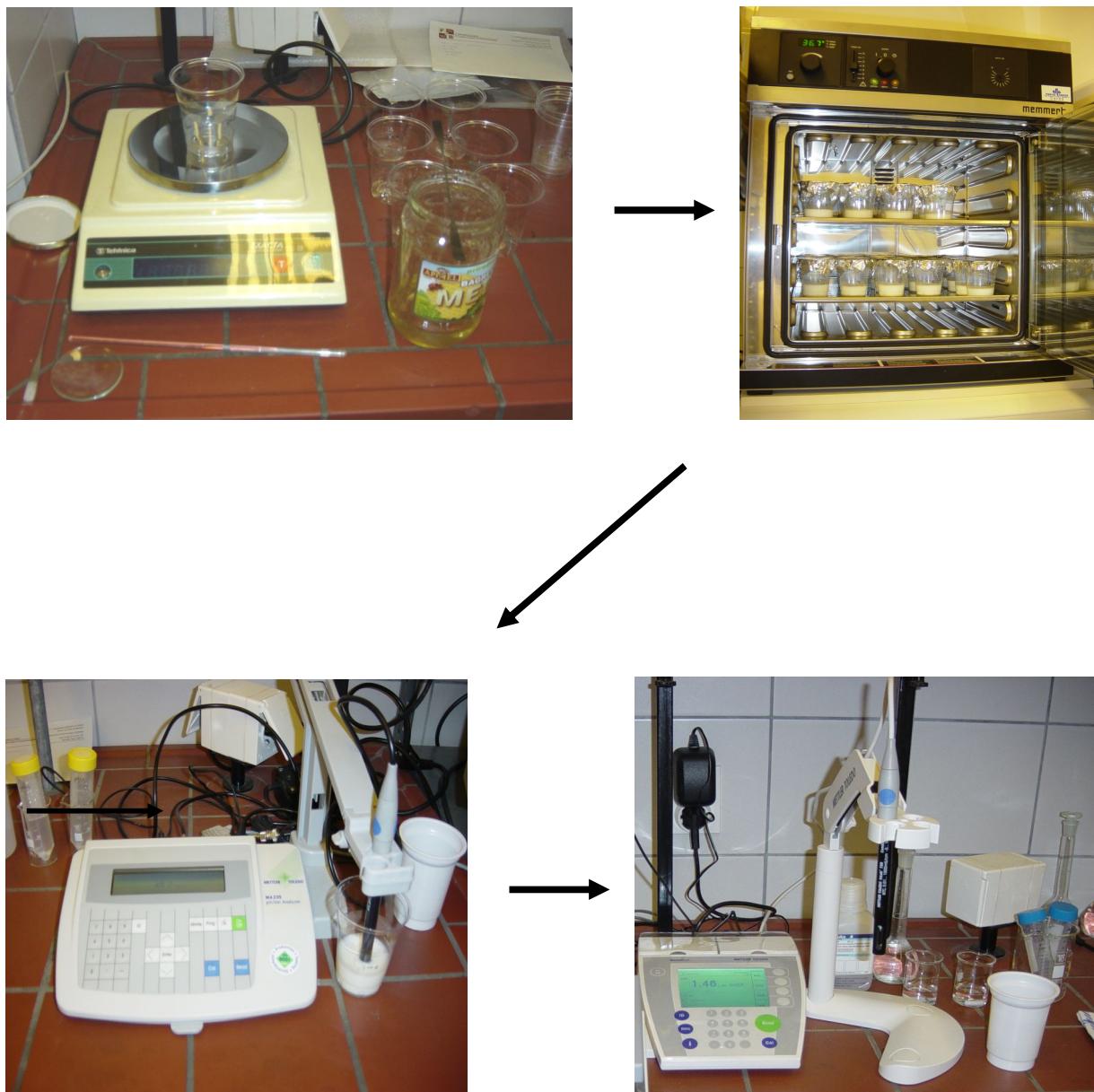
#### **3.2.3. Ispitivanje aktivne kiselosti**

Aktivna kiselost (pH vrijednost) određena je na uređaju MA 235, pH/Ion Analyzer (METTLER TOLEDO), elektrodom Inlab 413 od istog proizvođača. Prije samog određivanja elektrode su baždarene puferima poznate pH vrijednosti, odnosno standardnim otopinama.

#### **3.2.4. Ispitivanje električne vodljivosti**

Električna vodljivost mlijeka tijekom fermentacije je mjerena pomoću Seven Multi (METTLER TOLEDO) uređaja, elektrodom Inlab 730 istog proizvođača.

Prije početka očitavanja električne vodljivosti uređaj je baždaren standardom poznate vodljivosti. Mjerenje je provedeno tako da se u uzorak stavila magnetska mješalica koja je miješala uzorak, te se uronila elektroda, a vrijednosti su očitavane nakon približno 5 minuta miješanja. Sva mjerenja su provedena svaka dva sata tijekom fermentacije koja je trajala 24 sata.



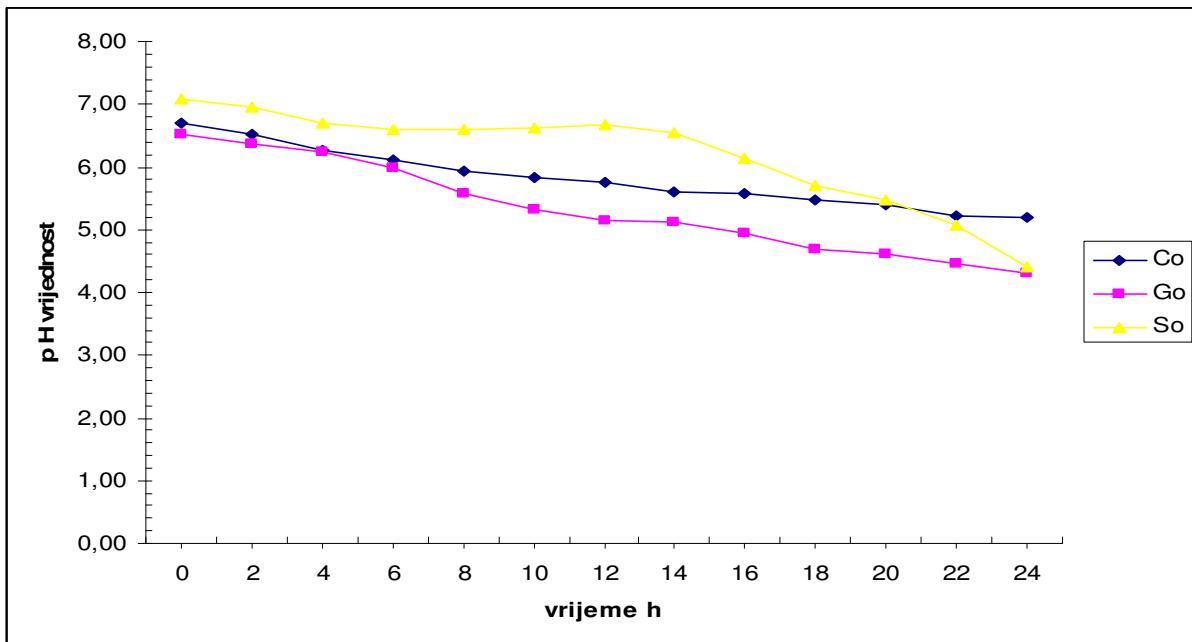
**Slika 4** Tijek pripreme uzorka i analize tijekom istraživanja



**Slika 5** Vrste mlijeka i bagremov med korišten tijekom istraživanja

## 4. REZULTATI

### 4.1. Usporedba parametara fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom *Lactobacillus casei* - 01



**Slika 6** Promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg (Co), kozjeg (Go) i sojinog (So) mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01

**Tablica 6** Analiza varijance podataka prikazanih slikom 6  
(ANOVA – dvostruka analiza bez ponavljanja)

Izvor Varijacija	F izračunato	P vrijednost	F kritično
A	17,56838	8,9E-06	2,686637
B	36,00009	6,22E-05	4,747225
C	6,65589	0,001271	2,686637
D	8,47475	0,013053	4,747225
E	12,34282	5,88E-05	2,686637
F	54,35674	8,59E-06	4,747225

A-pojedinačne razlike po satima fermentacije (kravljje i kozje mlijeko)

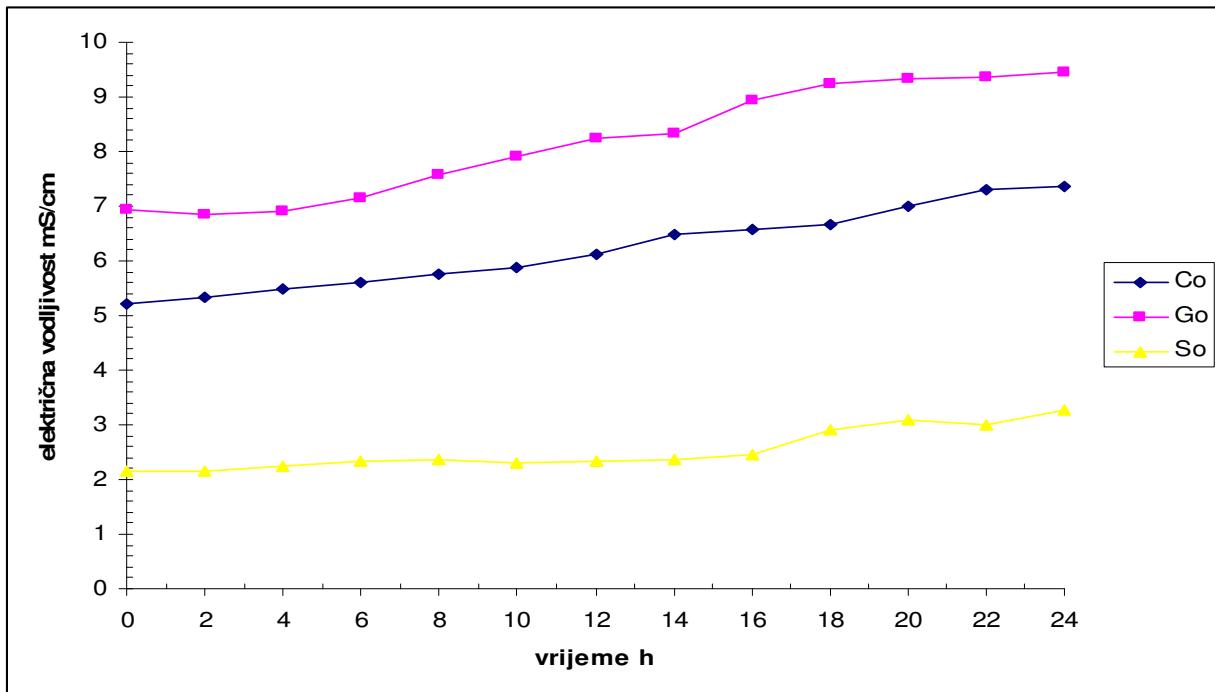
B-ukupna razlika između kravljeg i kozjeg mlijeka tijekom fermentacije

C-pojedinačne razlike po satima fermentacije (kravljje i sojino mlijeko)

D-ukupna razlika između kravljeg i sojinog mlijeka tijekom fermentacije

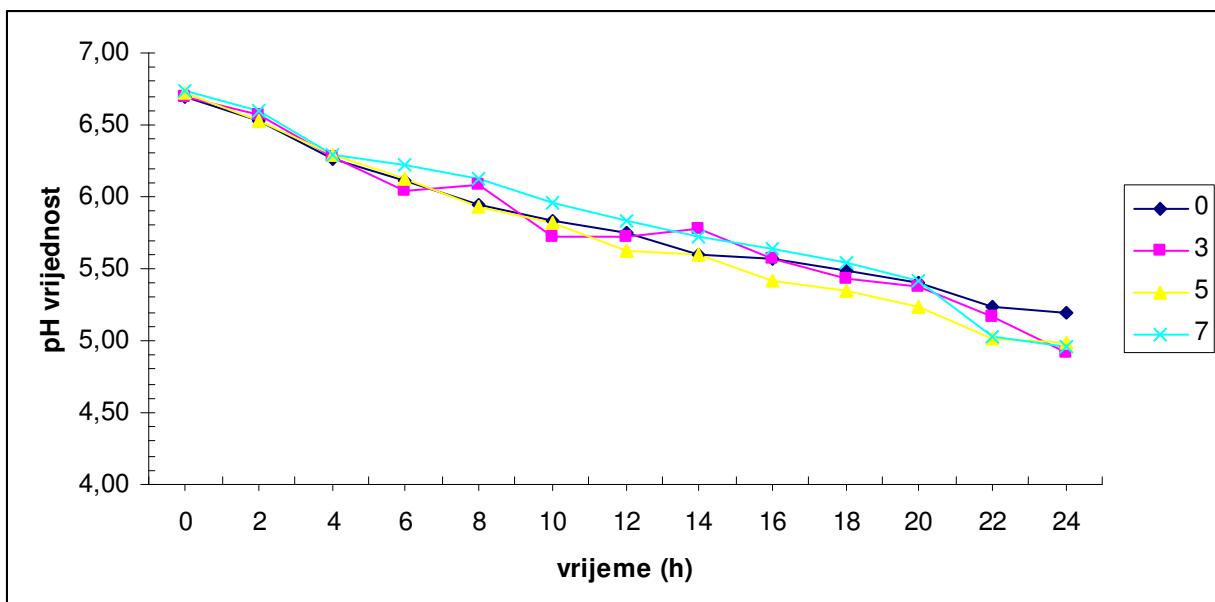
E-pojedinačne razlike po satima fermentacije (kozje i sojino mlijeko)

F-ukupne razlike između kozjeg i sojinog mlijeka



Slika 7 Promjene električne vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg (Co), kozjeg (Go) i sojinog (So) mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01

#### 4.2. Rezultati određivanja tijeka fermentacije kravljeg mlijeka s dodatkom meda

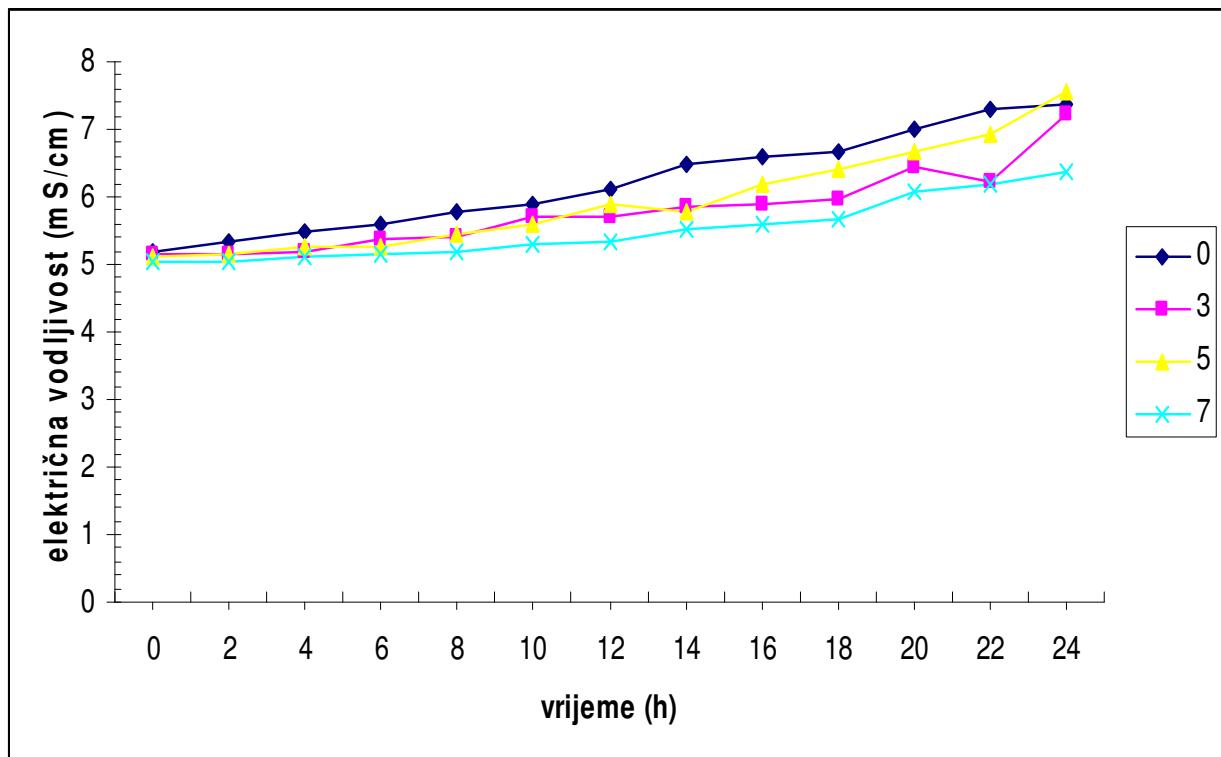


Slika 8 Promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

**Tablica 7** Analiza varijance podataka prikazanih slikom 8  
(ANOVA-dvostruka analiza bez ponavljanja)

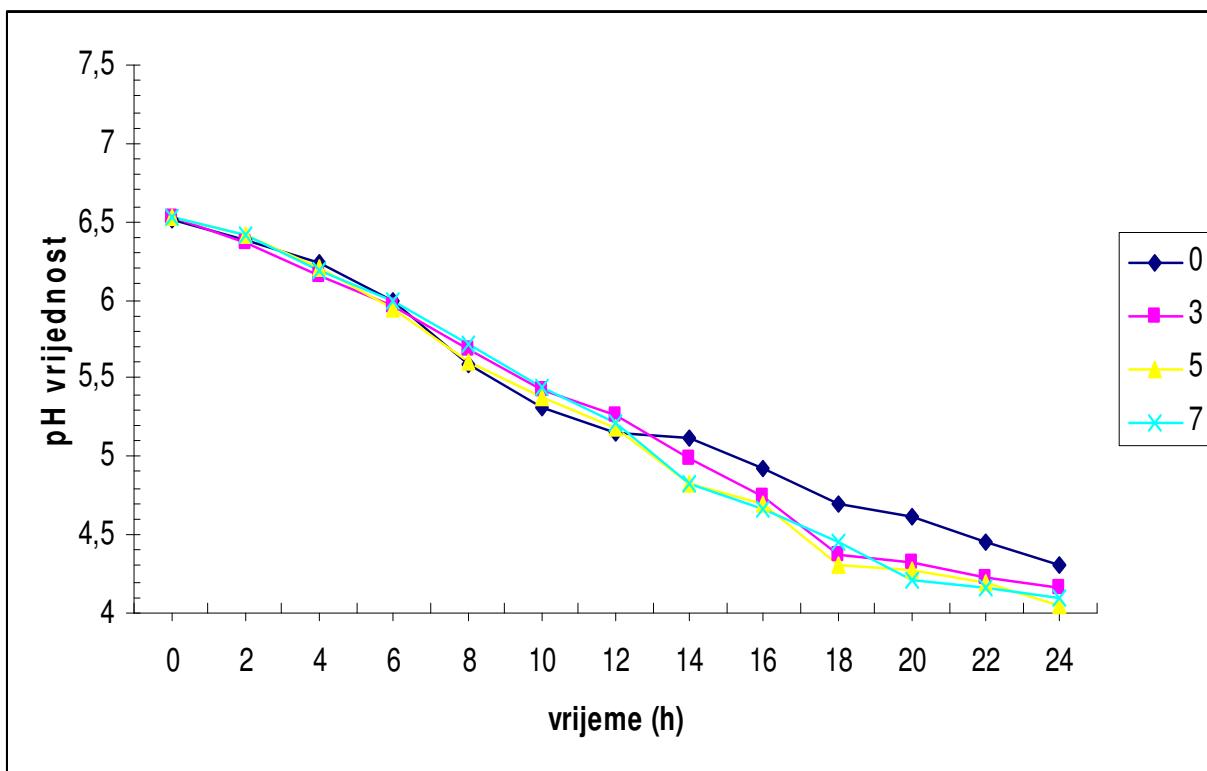
Izvor Varijacija	F izračunato	P vrijednost	F kritično
A	77,94673	1,81E-09	2,686637
B	0,471863	0,50519	4,747225
C	117,4103	1,62E-10	2,686637
D	8,478169	0,013039	4,747225
E	68,15467	3,97E-09	2,686637
F	1,02523	0,331263	4,747225

- A-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 3%)
- B-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 3% meda tijekom fermentacije
- C-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 5%)
- D-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 5% meda tijekom fermentacije
- E-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 7%)
- F-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 7% meda tijekom fermentacije



**Slika 9** Promjene vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

#### 4.3. Praćenje tijeka fermentacije kozjeg mlijeka s dodatkom bagremovog meda

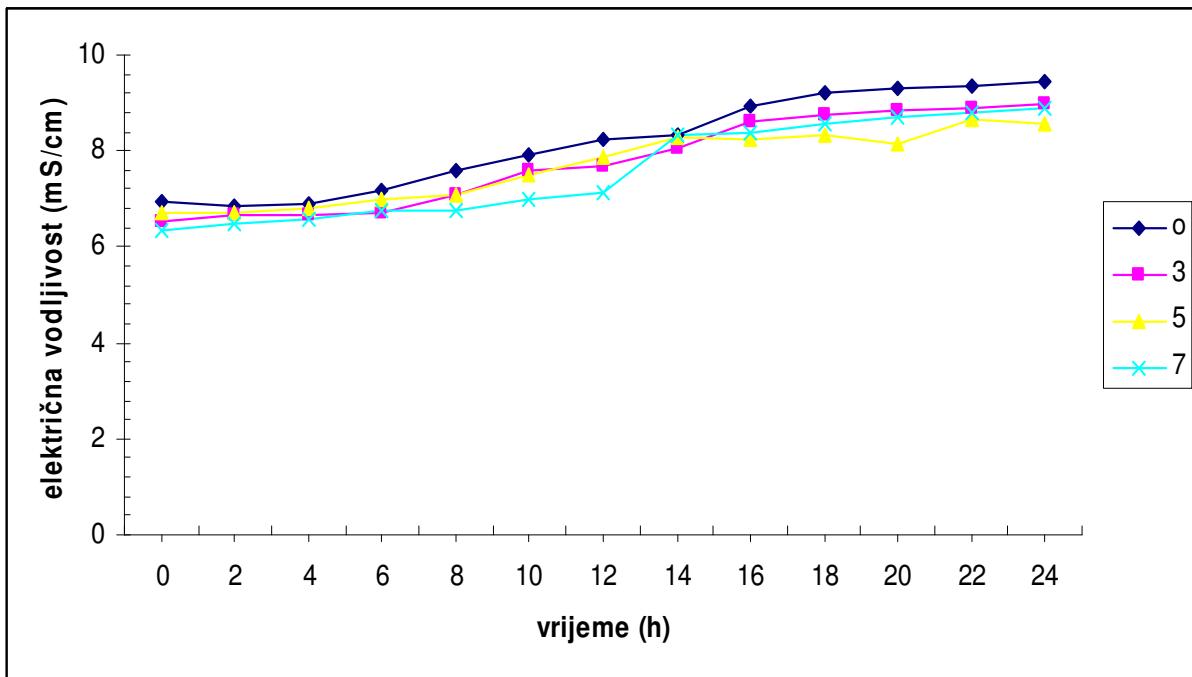


**Slika 10** Promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

**Tablica 8** Analiza varijance podataka prikazanih slikom 10  
(ANOVA – dvostruka analiza bez ponavljanja)

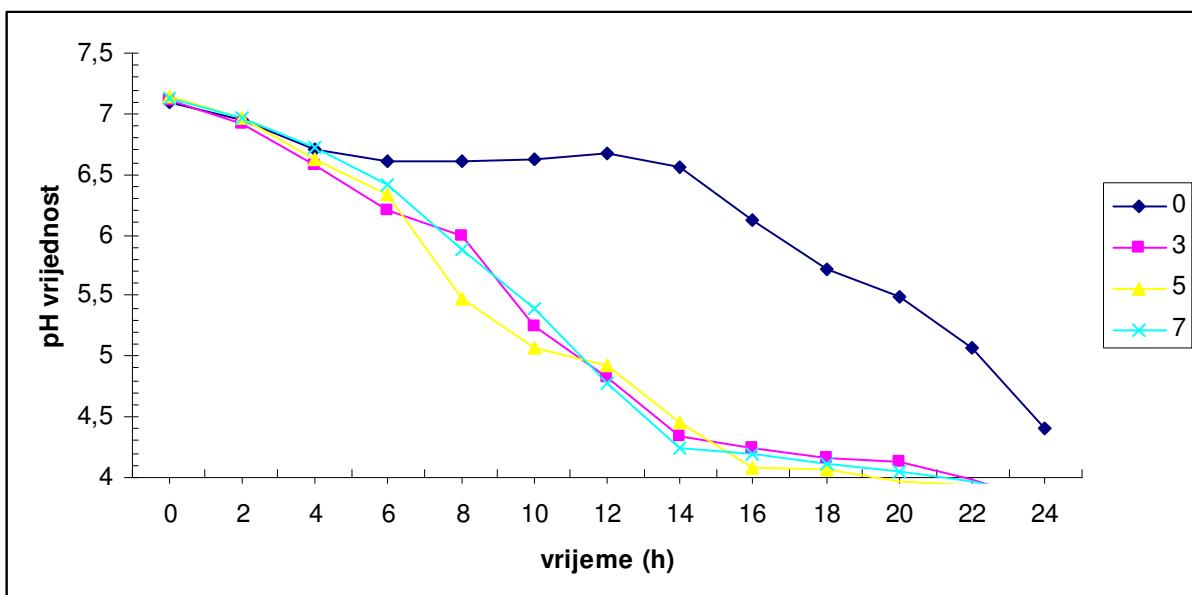
Izvor Varijacija	F izračunato	P vrijednost	F kritično
A	113,4434	1,98E-10	2,686637
B	4,325269	0,059652	4,747225
C	93,40736	6,23E-10	2,686637
D	7,874596	0,015862	4,747225
E	80,15418	1,53E-09	2,686637
F	4,538613	0,054516	4,747225

- A-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 3%)
- B-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 3% meda tijekom fermentacije
- C-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 5%)
- D-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 5% meda tijekom fermentacije
- E-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 7%)
- F-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 7% meda tijekom fermentacije



Slika 11 Promjene vodljivosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

#### 4.4. Praćenje tijeka fermentacije sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog meda

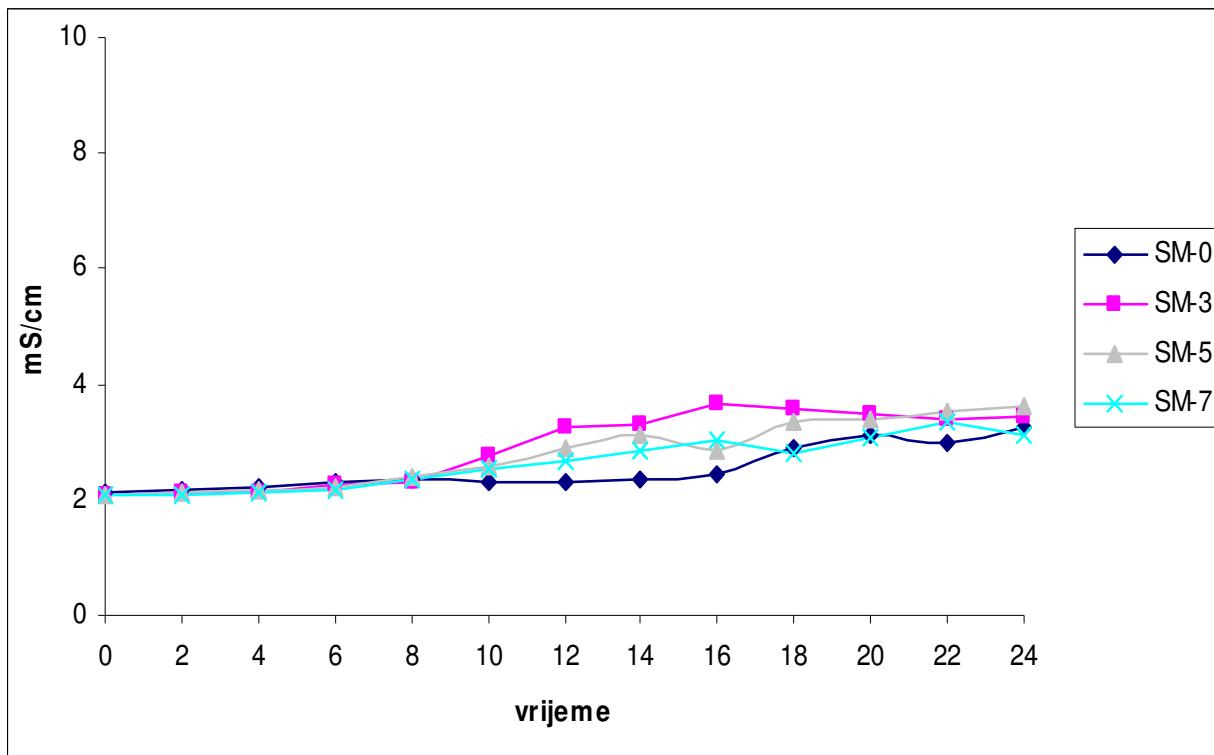


Slika 12 Promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

**Tablica 9** Analiza varijance podataka prikazanih slikom 12  
(ANOVA – dvostruka analiza bez ponavljanja)

Izvor Varijacija	F izračunato	P vrijednost	F kritično
A	6,289211	0,001654	2,686637
B	22,71778	0,000459	4,747225
C	5,8072	0,00238	2,686637
D	22,55927	0,000472	4,747225
E	5,670008	0,00265	2,686637
F	19,13404	0,000905	4,747225

- A**-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 3%)
- B**-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 3% meda tijekom fermentacije
- C**-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 5%)
- D**-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 5% meda tijekom fermentacije
- E**-pojedinačne razlike po satima fermentacije (0 i 7%)
- F**-ukupna razlika između kontrole i uzorka s 7% meda tijekom fermentacije



**Slika 13** Promjene vodljivosti tijekom fermentacije sojinog mljeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 bez dodatka (0) i s dodatkom 3, 5 i 7% bagremovog meda

**5. RASPRAVA stranice 32 do 35 nisu korigirane. OK su zaključci i LITERAT****ALI U DIPL. RADU JE SVE OK I KORIGIRANO, POTPUNO UREĐENO ZA PRINT****5.1. Usporedba parametara fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka**

Usporedbom rezultata praćenja promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kulturom *Lactobacillus casei*-01 (slika 6), može se uočiti da je fermentacija bila najbrža u kozjem mlijeku kod kojeg je završena nakon 22 sata, a najsporija u kravljem mlijeku, gdje se ni nakon 24 sata pH vrijednost nije spustila do pH=4,6.

Iako fermentacija kravljeg i kozjeg mlijeka započinje s približno istom pH vrijednošću (kravljie 6,70; kozje 6,51), nakon 6. sata fermentacije, pH vrijednost u kozjem mlijeku pada brže, i ova razlika ostaje u najvećoj mjeri konstantna sve do kraja fermentacije. Fermentacija u kozjem mlijeku završava s nižim pH (4,31) što je posljedica većeg udjela nastale mlječne kiseline.

Bakterija *L. casei*-01 je trebala duže vrijeme za prilagodbu na sojino mlijeko, što je vidljivo iz vrlo malog pada vrijednosti pH tijekom 12 sati fermentacije. Međutim, nakon 24 sata postiže sličnu pH vrijednost kao i kozje mlijeko, unatoč znatno višoj početnoj vrijednosti pH (7,09).

Rezultati dobiveni ANOVA-om prikazani tablicom 6 pokazuju da je razlika u fermentaciji navedenih vrsta mlijeka bila i statistički visoko značajna sveukupno, kao i pojedinačno po satima fermentacije.

Na osnovi ovih rezultata može se zaključiti da je kozje mlijeko, u usporedbi s kravljim, bolji supstrat za rast bakterije *L. casei*-01, jer pH brže pada što govori da nastaje veća količina produkata fermentacije, prije svega mlječne kiseline. Također je vidljivo da je sojino mlijeko vrlo dobra podloga za aktivnost ove bakterije, nakon nešto duže prilagodbe startera na sastojke sojinog mlijeka, a fermentacija traje kraće nego u kravljem mlijeku.

**5.2. Usporedba električne vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka**

Rezultati određivanja električne vodljivosti tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka starter kulturom *Lactobacillus casei*-01 (slika 7), pokazuju da je početna vodljivost različitih vrsta mlijeka bila vrlo različita. Najveća vrijednost električne vodljivosti utvrđena je kod kozjeg mlijeka (6,94 mS/cm), a najmanja kod sojinog (2,14 mS/cm).

Električna vodljivost mlijeka je uglavnom posljedica topljivih soli u mlijeku; lakoza ne provodi struju, a masti smanjuju vodljivost. Doprinos proteina i peptida je od malog značaja. Nadalje, smanjenje pH uzrokuje hidrogenaciju monohidrogen-fosfatnih iona u dihidrogen-fosfatne ione, koji imaju nižu molarnu vodljivost. Tako, veća koncentracija mlječne kiseline u otopini fosfatnog pufera (mlijeko) smanjuje vodljivost.

Međutim, tijekom fermentacije laktoze u mlječnu kiselinu dolazi do naglog povećanja vodljivosti. Također zakiseljavanje mlijeka mijenja ravnotežu pufer-sustava i otapa kazeinske veze kalcijevih i fosfornih soli. Ova pojava dovodi do povećanja vodljivosti tijekom fermentacije, kao što prikazuje slika 7.

### 5.3. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravlje mlijeka

Slika 8 opisuje promjene pH vrijednosti kravlje mlijeka tijekom fermentacije starterom *Lactobacillus casei*-01, bez dodatka i s dodatkom begremovog meda u različitim udjelima (3,5 i 7%). Kod svih uzoraka s dodatkom meda dolazi do linearog pada pH vrijednosti do 20. sata fermentacije. Sličan pad vrijednosti pH je zabilježen kod mlijeka bez dodatka tijekom prvih 8 sati fermentacije, nakon čega pH vrijednost znatno slabije opada.

Vidljivo je da mlijeko bez dodatka bagremovog meda nije postiglo pH vrijednost izoelektrične točke kazeina ( $\text{pH}=4,6$ ) nakon 24 sata fermentacije, dok su svi uzorci s dodatkom bagremovog meda tijekom fermentacije postigli tu vrijednost. Stoga se može reći da med djeluje kao prebiotik na ovaj starter.

Dodatak meda skratio je vrijeme fermentacije, a najbrži pad pH vrijednosti pokazuju uzorci s dodatkom 5 i 7% meda, kod kojih je fermentacija završena nakon 18 sati. Rezultati prikazani tablicom 7 pokazuju da je razlika između kontrolnog uzorka i uzorka s dodatkom 5 i 7% meda statistički značajna.

### 5.4. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kozjeg mlijeka

Za razliku od kravlje mlijeka, kod svih uzoraka kozjeg mlijeka je tijekom fermentacije postignuta izoelektrična točka kazeina (slika 10). Kozje mlijeko je fermentiralo za 20 sati, dok je uzorcima s dodatkom meda za postizanje pH vrijednosti trebalo oko 16 sati. Najbrži pad pH

vrijednosti je utvrđen kod uzorka s 7% bagremovog meda. To potvrđuje pretpostavku da med ima prebrotička svojstva. Kao i kod kravljeg mlijeka, zabilježena je statistički značajna razlika u kretanju pH vrijednosti tijekom fermentacije između uzoraka bez dodatka meda i uzoraka s medom dodanim u koncentraciji od 5 i 7% (tablica 8). Uspoređujući uzorce s kravljim i kozjim mlijekom (slike 8 i 10) može se uočiti kako je fermentacija u kozjem mlijeku bila brža nego u kravljem, bez obzira na udio dodanog meda. Optimalni 7%-tni dodatak meda je skratio vrijeme fermentacije na 15 sati u kozjem mlijeku, dok je u kravljem mlijeku sa 7% meda fermentacija završena nakon 18 sati. Međutim, samo kozje mlijeko je bolji supstrat za rast bakterije *L. casei*-01 i kod njega je trajanje fermentacije kraće, pa se može zaključiti da dodatak meda ima veći utjecaj na aktivnost probiotičke bakterije (a time i na ubrzanje fermentacije) u kravljem mlijeku u usporedbi s kozjim.

### 5.5. Utjecaj dodatka meda na fermentaciju sojinog mlijeka

Iz rezultata prikazanih slikama 12 i 13 je vidljivo da sojino mlijeko fermentira za manje od 24 sata bez obzira na relativno visoku vrijednost pH (iznad 7), ali je potrebno određeno vrijeme prilagodbe kulture *L. casei* na sojino mlijeko. Kod uzoraka s dodatkom meda ta faza prilagodbe traje kraće, a nakon 8. sata fermentacije dolazi do velike aktivnosti ove probiotičke kulture, što se može vidjeti iz naglog pada pH vrijednosti. Najveća aktivnost kulture je zabilježena između 8. i 14. sata fermentacije kod svih uzoraka s medom, kada pH vrijednost pada za oko 1,5 jedinicu. Najbrža fermentacija je primjećena kod uzorka s dodatkom 5% meda, što navodi na zaključak da nije potrebno daljnje povećanje udjela dodatka meda za ubrzavanje fermentacije sojinog mlijeka ovim probiotikom. Razlike u kretanju pH vrijednosti tijekom fermentacije između sojinog mlijeka i svih uzoraka s dodanim medom (3, 5, 7%) su statistički značajne (tablica 9).

Usporedbom rezultata ispitivanja tijeka fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog meda probiotičkom kulturom *L. casei*-01 (slike 8, 10 i 12) može se zaključiti da je optimalni udio meda za ubrzavanje ove fermentacije u kravljem i sojinom mlijeku 5%, dok je za kozje mlijeko optimalni udio 7%. Med je na fermentacije različitih vrsta mlijeka djelovao različito. Najveće ubrzanje fermentacije djelovanjem meda je uočeno kod sojinog mlijeka, gdje optimalni dodatak meda skratio vrijeme fermentacije za 11 sati.

Kod kozjeg i kravljeg mlijeka su potrebni veći udjeli dodatka meda za značajnije ubrzanje fermentacije, za razliku od sojinog, kod kojeg svaki dodatak meda statistički značajno ubrzava fermentaciju.

### **5.6. Utjecaj dodatka meda na električnu vodljivost**

Električna vodljivost tijekom fermentacije svih uzoraka progresivno raste kao što prikazuju slike 9, 11 i 13. Med ima nekoliko puta manju vrijednost električne vodljivosti od mlijeka i što je veći udio meda u uzorku manja je električna vodljivost, jer smanjuje početnu vodljivost uzorka.

Sojino mlijeko ima najniže vrijednosti vodljivosti (oko 2,14 mS/cm) i dodatkom meda se najmanje mijenjaju njene vrijednosti. Tijekom fermentacije dolazi do najmanjeg porasta vodljivosti (za oko 1 mS/cm) i taj je porast manji što je veći udio dodatka meda. Kravlje i kozje mlijeko imaju veću vrijednost električne vodljivost (5,2 mS/cm, odnosno 6,94 mS/cm) te tijekom fermentacije dolazi do većeg porasta njene vrijednosti, za približno 2 jedinice.

Općenito, što je veći udio dodanog meda manji je porast vodljivosti tijekom fermentacije. Može se pretpostaviti da vrijednost električne vodljivosti smanjuje veća koncentracija mliječne kiseline nastale u uzorcima s većim udjelima bagremovog meda, kao rezultat prebiotičkog djelovanja meda na probiotički starter *L. casei*-01.

## 6. ZAKLJUČCI

**Na osnovi rezultata dobivenih ovim istraživanjem mogu se izvesti sljedeći zaključci:**

- Odabrana probiotička bakterija je uspoređujući tri vrste mlijeka najbrže rasla u kozjem mlijeku, uz brži pad pH vrijednosti, a sama fermentacija je završila za 20 sati.
- Kod sojinog mlijeka je zamijećeno brže odvijanje fermentacijskih procesa u usporedbi s kravljim, pa ono može poslužiti kao dobra osnova za razvoj novog fermentiranog napitka ovim probiotikom.
- Bagremov med je vrlo značajno skratio vrijeme fermentacije u sva tri mlijeka, što ukazuje na njegov prebiotički učinak na bakteriju *Lactobacillus casei*-01.
- Za značajnije ubrzanje fermentacije kravljeg i kozjeg mlijeka bili su potrebni veći udjeli dodatka meda (5 i 7%), dok je kod sojinog mlijeka svaki udio meda značajno ubrzao fermentaciju.
- Optimalni udio meda za ubrzavanje fermentacije u kravlјem i sojinom mlijeku je 5%, a u kozjem 7%.
- Tijekom fermentacije je došlo do porasta električne vodljivosti, uslijed kompleksnih fizikalno-kemijskih procesa koji se odvijaju tijekom pretvorbe laktoze u mlijecnu kiselinu.
- Dodatak meda je na skraćivanje vremena fermentacije različitih vrsta mlijeka djelovao različito i ne uvijek proporcionalno udjelu dodatka, ali izrazito pozitivno i učinkovito.
- Na kraju ipak treba naglasiti da je najvažnije postignuće ovog istraživanja potvrđeno značajno skraćivanje trajanja fermentacije dodatkom meda i to: u kravlјem mlijeku za 6 sati, u kozjem za 8 do 9 sati, te u sojinom mlijeku čak za 11 sati.

## 7. LITERATURA

1. Lj. Tratnik: Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
2. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Narodne novine:102/2000.  
<http://www.nn.hr/sluzbeni-list/sluzbeni/index.asp> [24.06.2009.]
3. R. Božanić, Lj. Tratnik, I. Drgalić: Kozje mlijeko. *Mljekarstvo* **52** (3), 207-237, 2002.
4. B. Mioč, V. Pavić: Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
5. R. Božanić: Priozvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56** (3), 233-254, 2006.
6. R. Božanić i Lj. Tratnik: Prebacički supstrati i bakterije mlječne kiseline. *Mljekarstvo* **49** (1), 27-46, 1999.
7. <http://www.probiohealth.com/probiotics.html> [26.8.2009.]
8. *Lactobacillus casei*: [http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus\\_casei](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_casei) [22.8.2009.]
9. *Lactobacillus casei*: [http://genome.jgi-sf.org/draft\\_microbes/lacca/lacca.home.html](http://genome.jgi-sf.org/draft_microbes/lacca/lacca.home.html) [22.8.2009.]
10. *Lactobacillus casei*: <http://www.answers.com/topic/lactobacillus-casei> [22.8.2009.]
11. V. Gregurić: Med – nektar bogova.  
<http://www.plivazdravlje.hr/?section=arhiva&acat=t&cat=t&id=3192&show=1> [22.8.2009.]
12. M. Kalaib: Studij strukture mlečnih proizvoda: Praktički aspekti *Mljekarstvo* **40**, (9), 235-250, 1990.
13. R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56**, (3), 233-254, 2006.
14. Ivana Dodek: Utvrđivanje stupnja inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* tijekom fermentacije mlijeka s dodatkom meda pomoću *Lactobacillus casei*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet. Osijek, 2008.
15. [http://www.alibaba.com/product/imkesz-104878719-0/Hungarian\\_Acacia\\_honey.html](http://www.alibaba.com/product/imkesz-104878719-0/Hungarian_Acacia_honey.html) [25.4.2009.]