

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**MARIJANA KANIŽAJ**

**INHIBICIJA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* BIFIDOGENIM  
KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLIJEKOM S DODATKOM MEDA  
TIJEKOM ČUVANJA**

**DIPLOMSKI RAD**

OSIJEK, listopad 2009.

## BIBLIOGRAFSKI PODACI

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** Inženjerstvo

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

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

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

**Broj stranica:** 44

**Broj tablica:** 10

**Broj slika:** 16

**Datum obrane:** 30. listopada 2009.

**Sastav povjerenstva za obranu:**

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

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

**Tema rada je prihvaćena na XXVII. sjednici Odbora za diplomske ispite  
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku održanoj 19. 12. 2007. godine.**

**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  
štporta Republike Hrvatske.**

# **INHIBICIJA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* BIFIDOGENIM KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM MLJEKOM S DODATKOM MEDA TIJEKOM ČUVANJA**

## **Sažetak**

U radu je istražen utjecaj probiotičkih fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka sa dodatkom bagremovog i kestenovog meda prema patogenoj bakteriji *Yersinia enterocolitica*. Za inokulaciju mlijeka korištena je monokultura *Bifidobacterium bifidum* Bb-12. Za pripremu probiotičkih napitaka korišteno je UHT sterilizirano kravje mlijeko s 2,8% mlijecne masti, UHT sterilizirano kozje mlijeko s 3,2% mlijecne masti, te sojino mlijeko s 2,2% masti, a med je dodavan u udjelima od 5 i 10%.

Fermentacija je vođena na 37 °C u trajanju od 25 sati, a određivana je promjena aktivne kiselosti, titracijske kiselosti kao i promjena broja probiotičkih bakterija. Sva mjerena su se provodila nakon 25 sati fermentacije (nulti dan), 7. dan, 14. i 21. dan.

Utvrđen je povoljan utjecaj dodatka meda na brzinu fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka, pri čemu je utjecaj kestenovog meda bio izražajniji od bagremovog.

Probiotički napitak od kozjeg mlijeka s dodatkom kestenovog meda je pokazao jači inhibitorni učinak u usporedbi s probiotičkim napitkom od kravljeg i sojinog mlijeka, s dodatkom meda, a pri tome je inhibicijski učinak jače bio izražen kod udjela meda od 5%.

## **Ključne riječi:**

kravje, kozje i sojino mlijeko, *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, med, *Yersinia enterocolitica*, inhibicija, čuvanje.

# **INHIBITION BACTERIA *Yersinia enterocolitica* WITH THE COW, GOAT AND SOY BIFIDOGENIC MILK WITH THE ADDITION OF HONEY DURING STORAGE**

## **Summary**

The influence of probiotic fermented milk beverages of cow, goat and soy milk with acacia and chestnut honey addition against pathogenic *Yersinia enterocolitica* was examined in this work. For the milk inoculation was used monoculture *Bifidobacterium bifidum* Bb-12. Probiotic drink was produced from UHT sterilized cow milk with 2.8% milk fat, UHT sterilized goat milk with 3.2% milk fat and UHT sterilized soy milk with 2.2% fat and honey was added with 5 and 10 percentages.

During 25-hours of fermentation at 37 °C, pH-value, acidity and changes of number probiotic bacterium were measured. All changes were measured after 25 hours of fermentation (0<sup>th</sup> day), 7<sup>th</sup> day, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day.

Addition of honey had high influence on course and velocity of fermentation cow, goat and soy milk; chestnut honey has stronger influence in comparison with acacia honey.

Probiotic fermented milk beverages of cow milk with chestnut honey addition have shown stronger inhibitory influence in comparison with probiotic fermented milk beverages of goat and soy milk with chestnut honey addition; addition of chestnut honey with 5 percentage have stronger inhibitory influence.

## **Key words:**

cow, goat and soy milk, *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, honey, *Yersinia enterocolitica*, inhibition of growth, storage.

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

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

*Zahvaljujem se mojim roditeljima, sekij i bakij što su me podržavali u svakom trenutku, vjerovali u mene i moje rezultate, te mi s puno ljubavi i razumijevanja pomogli da dođem do kraja. Hvala što ste me uvijek s velikim optimizmom vodili kroz život...*

*Zahvaljujem se mojoj ljubavi Miroslavu, što je bio uz mene kada mi je to bilo najpotrebnije, te me pratio kroz cijelo vrijeme moga studija. Hvala ti što si tu.*

*Zahvaljujem se i mojim prijateljima Tomislavi, Ireni, Marku, Antoniji i Maji, te mojem bratiću Dariju što su mi studentske dane učinili veselijim i ljepšim.*

# SADRŽAJ

	Str.
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. KRAVLJE MLIJEKO.....	4
2.2. KOZJE MLIJEKO .....	6
2.2.1. Usporedba sastava kravljeg i kozjeg mlijeka .....	7
2.3. SOJINO MLIJEKO .....	8
2.3.1. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka .....	9
2.4. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI .....	11
2.4.1. Svojstva i terapijsko djelovanje probiotičkih bakterija .....	11
2.5. VRSTE RODA <i>Bifidobacterium</i> .....	12
2.5.1. <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	13
2.6. MED .....	14
2.6.1. Kestenov med.....	15
2.6.2. Bagremov med .....	16
2.7. BAKTERIJA <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	17
2.7.1. Osobine, infekcije i liječenje .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>19</b>
3.1. ZADATAK RADA.....	20
3.2. MATERIJAL I METODE RADA .....	20
3.2.1. Priprava uzorka .....	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.....	21

3.2.6. Određivanje inhibicije bakterije <i>Yersinia enterocolitica</i> različitim vrstama fermentiranih mlijeka .....	23
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>24</b>
4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM ČUVANJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLJEKA FERMENTIRANIH MONOKULTUROM <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb-12.....	25
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA <i>Yersinia enterocolitica</i> KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM BIFIDOGENIM MLJEKOM .....	31
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
5.1. PROMJENE PH VRIJEDNOSTI TIJEKOM ČUVANJA .....	35
5.2. PROMJENE INTENZITETA ZAKISELJAVANJA (TITRACIJSKE KISELOSTI) TIJEKOM ČUVANJA.....	36
5.3. PROMJENA BROJA BAKTERIJA <i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb-12 TIJEKOM ČUVANJA .....	37
5.4. USPOREDBA INHIBICIJE BAKTERIJE <i>Yersinia enterocolitica</i> KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM BIFIDOGENIM MLJEKOM .....	38
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>40</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>

# **1. UVOD**

Mlijeko i mliječni proizvodi oduvijek su sastavni dio svakodnevne prehrane čovjeka, a veliku važnost imaju zbog nutritivnih i zdravstvenih karakteristika. Mlijeko je bogato tvarima različitih bioloških učinaka, koji mlijeku daju epitet funkcionalne hrane.

Fermentirani mliječni proizvodi su postali tijekom posljednjih desetljeća, za potrošače iznimno važan proizvod. Dobivaju se kontroliranim procesom mliječno-kisele fermentacije, a popularni su, ne samo zbog terapijskih svojstava, nego i zbog karakteristične arome, okusa i konzistencije.

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

Fermentiranim mliječnim proizvodima se dodaju prebiotici koji su neprobavljeni sastojci hrane i selektivnom stimulacijom rasta bakterija povoljno utječu na zdravlje domaćina.

Med ima prebiotička svojstva, djeluje baktericidno i antimikotično. Organizam najbolje usvaja med otopljen u tekućini ili polako otopljen u ustima.

*Yersinia enterocolitica* je bakterija koja se nalazi na biljnem 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 rada bio je ispitati utjecaj fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 5% i 10% i s probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 na patogenu bakteriju *Yersinia enterocolitica*. Tijekom čuvanja, u svim uzorcima fermentiranog mlijeka, praćeni su odabrani parametri fermentacije: pH, titracijska kiselost i promjena broja probiotičkih stanica.

Svrha rada bila je istražiti koja vrsta mlijeka fermentirana s probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, te dodatkom dvije vrste meda u različitim udjelima, posjeduje veći inhibirajući učinak na odabranu patogenu bakteriju tijekom 21 dan čuvanja.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. KRAVLJE MLJEKO

Mlijeko je proizvod mliječne žljezde različitih vrsta sisavaca (krava, koza, ovaca), predodređen za prehranu mladog organizma, jer sadrži gotovo sve tvari potrebne za rast i razvoj. Kravlje mlijeko dobiva se od zdravih, dobro njegovanih i ispravno hranjenih krava. Kvaliteta mlijeka ovisi o pasmini krava, dobi, zdravlju i hranjenju životinja, o načinu mužnje i postupku s mlijekom nakon mužnje [1].

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

Mlijeko i mliječni proizvodi izvorom su velikog broja hranjivih tvari, osim bjelančevina i lako probavljive masti, šećera, mineralnih tvari, lipida i vitamina. Kemijski sastav mlijeka je vrlo promjenjiva veličina na koju utječe čitav niz čimbenika kao što su: pasmina, individualne osobine svake jedinke, stadij laktacije, način hranidbe, zdravstveno stanje krava, a posebno vimena. Tijekom laktacije sastav mlijeka se gotovo i ne mijenja. Tijekom 4 do 8 tjedana pred kraj laktacije udio bjelančevina, masti i mineralnih tvari postupno raste, a udio laktoze se smanjuje [2].

**Tablica 1** Udjeli glavnih sastojaka u svježem mlijeku [3]

SASTOJCI	UDIO SASTOJAKA (%)
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 (pepeo)	0,6-0,8

**Voda:** kao jedan od glavnih sastojaka u mlijeku se nalazi u udjelu od 86 do 89%. U mlijeku se voda nalazi u dva oblika, najčešće kao slobodna (u kojoj se nalaze otopljeni sastojci mlijeka) ili kao vezana (mala količina u suhoj tvari mlijeka). Vezana se voda nalazi adsorbirana u hidratačkom sloju pojedinih sastojaka suhe tvari, i to na: kazein (oko 50%), albumin i globulin (oko 30%), membrane masnih globula (oko 15%), laktuzu i ostale sastojke (oko 5%) [3].

**Mliječna mast:** u mlijeku se mliječna mast nalazi u obliku globula obavijenih adsorpcijskim slojem ili membranom koja stabilizira mliječnu mast u okolnoj sredini. U masnoj globuli najviše ima triacilglicerola. Mlijeko sadrži 3,5 do 5,0% masti. U mliječnoj masti nalazi se 10 do 12% masnih kiselina kraćeg lanca, te masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma. Mliječna mast utječe na ugodan okus mlijeka te na aromu, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda [2].

**Proteini:** od ukupnih dušičnih tvari u mlijeku, nalazi se 95% proteina i 5% neproteinskih tvari s dušikom. Proteine mlijeka čine dva glavna tipa potpuno različitih proteina, kazein i proteini sirutke, u omjeru 80:20 [4].

**Laktoza:** šećer, disaharid ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) sastavljen je od molekula  $\alpha$ -D-glukoze i  $\beta$ -D-galaktoze i u mlijeku se nalazi u udjelu od 4,6 do 4,9%. Ona je mliječni šećer i u usporedbi s ostalim vrstama šećera najmanje je topljiva u vodi [3].

**Mineralne tvari:** u mlijeku se nalaze u udjelu od 0,6 do 0,8%, a ima ih 40 različitih vrsta. Nalaze se u mlijeku kao makroelementi u obliku organskih i anorganskih soli, i mikroelementi (brojčano ih je više - Zn, Br, Ru, Se, Al, Fe, Cu, F, Sr, Mo i drugi). Utječu na fizikalne osobine mlijeka kao što su osmotski tlak, elektroprovodljivost, titracijska kiselost, pH vrijednost, gustoća, viskoznost mlijeka itd. [3].

## 2.2. KOZJE MLJEKO

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 kravljе mlijeko. Kozje mlijeko čini svega 2% ukupne svjetske proizvodnje, a u prehrani se sve više ističu njegove prednosti [5].

Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih i pravilno uzgajanih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog mirisa [6].

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 kratkolančanih masnih kiselina. Do karakterističnog 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 prirodnom različitih sastojaka mlijeka, kao i biokemijskim i enzimskim činiocima. Veliki utjecaj također imaju primjenjeni postupci obrade, koji mogu dovesti do degradacije pojedinih sastojaka mlijeka, između ostalog hladno skladištenje i homogenizacija. Hladno skladištenje potiče značajan porast udjela kaprilne ( $C_8$ ) i kaprinske ( $C_{10}$ ) 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 [5].

- **Proteini:** kozje mlijeko sadrži 4,7% proteina, koji dolaze u obliku koloidne disperzije, a najzastupljeniji su kazein i sirutkini proteini albumin i globulin.
- **Mliječna mast:** bitna je za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka zbog utjecaja na teksturu i konzistenciju proizvoda, a 96,8% sastava čine trigliceridi.
- **Šećeri:** glavni ugljikohidrat u kozjem mlijeku je laktoza koja je glavni izvor hrane za mliječno-kisele bakterije. Udio laktoze u kozjem mlijeku je sličan udjelu u kravlju.

- **Voda:** voda se može nalaziti u vezanom ili slobodnom obliku. Vezana voda se nalazi adsorbirana na kazein (oko 50%), na globulin i albumin (oko 30%), na membrane masnih globula (oko 15%), te na laktozu i ostale sastojke (5%).
- **Mineralne soli:** kozje mlijeko ima 9,8% mineralnih soli, koje se nalaze u molekularnom, ionskom i koloidnom obliku. Od makroelemenata, najzastupljeniji su Ca i P.
- **Vitamini:** u kozjem mlijeku su prisutni vitamini topljivi u mastima A, D, E i K, te vitamini topljivi u vodi C i B ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_5$ ,  $B_6$ ,  $B_8$ ,  $B_9$ ,  $B_{12}$ ) [7].

### 2.2.1. Usporedba sastava kravljeg i kozjeg mlijeka

Iako je sastav kravljeg i kozjeg mlijeka u osnovi vrlo sličan, kozje mlijeko ima znatne dijetetske i terapijske prednosti [6].

Proteini kozjeg mlijeka su probavlјiviji od proteina kravljeg mlijeka i učinkovitija je apsorpcija aminokiselina. Udio ukupnih aminokiselina podjednak je u oba mlijeka. Ipak udio histidina, arginina, cisteina, leucina i asparagina je veći u kozjem mlijeku, dok je udio serina, tirozina i glutamina manji. Od slobodnih aminokiselina kozje mlijeko sadrži najviše taurina. Količina taurina u kozjem mlijeku slična je količini taurina u humanom mlijeku i znatno veća u odnosu na kravljje mlijeko. Taurin je esencijalna aminokiselina prirodno sadržana u tekućinama i tkivima organizma. Ona je osobito važna u prehrani male djece i dojenčadi, jer sudjeluje u rastu i razvoju mozga.

Kozje mlijeko razlikuje se od kravljeg manjim udjelom koagulirajućih bjelančevina, većom varijabilnošću fizikalnih i kemijskih svojstava, nižom termostabilnošću i različitim lipolitičkim sustavom. 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“. Kozje mlijeko sadrži manje kolesterola u odnosu na kravljje. Razlika u mliječnoj masti kozjeg i kravljeg mlijeka je u zasićenosti i duljini lanca masnih kiselina [5].

Kao i u kravljem mlijeku, lakoza je osnovni ugljikohidrat kozjeg mlijeka [8]. Kozje mlijeko sadrži više: kalcija, kalija, magnezija, fosfora, klora i mangana, a manje: natrija, željeza, sumpora, cinka i molibdena u odnosu na kravljje mlijeko. Kozje mlijeko sadrži manje vitamina B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub> u odnosu na kravljje mlijeko.

Sadržaj karotenoida u kozjem mlijeku je neznatan, što je uzrok bijele boje mlijeka i mliječnih proizvoda. Sadržaj vitamina C i D u kozjem i kravljem mlijeku je nizak i podjednak [8].

**Tablica 2** Sastav i energijska vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka [6]

Kemijski sastojak%	Kozje mlijeko	Kravljje mlijeko
Voda	88,8	87,4
Suha tvar	11,3	12,6
Suha tvar bez masti	8,0	8,5
Mast	3,3	3,9
Bjelančevine	2,9	3,3
Lakoza	4,4	4,7
Mineralne tvari	0,7	0,8

### 2.3. SOJINO MLIJEKO

Soja je sve interesantnija namirnica, zbog svojih nutritivnih i zdravstvenih karakteristika. Namijenjeno je populaciji koja ne može konzumirati kravljje mlijeko, bilo zbog toga što je lakoza netolerantna, zbog alergija na proteine mlijeka ili zbog uvjerenja ne konzumiranja namirnice životinjskog podrijetla. Fermentacijom sojinog mlijeka bakterijama mlječne kiseline značajno se povećava zdravstvena vrijednost ove namirnice [5].

Sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna ili fina emulzija sojinog brašna, odnosno izoliranih sojinih proteina u vodi, a može biti s dodatkom vitamina, mineralnih tvari i arome. Graškast, sirov okus, najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka, a taj nepoželjni okus potječe od neki aldehida i ketona. Tih sastojaka nema u neoštećenom, suhom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrnje namoči i melje [10].

**Tablica 3** Sastav sojinog mlijeka [5]

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

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

Zbog povećanog interesa za sojine proizvode i njihove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, proizvođači traže sve više načina da soju kao sastojak uklope u nove, ukusne i hranjive proizvode [11].

### 2.3.1. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka

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

Sličnost kravljeg i sojinog mlijeka je što imaju sličnu boju, stajanjem se ukisele, dodavanjem kiseline, soli ili proteolitičkih enzima (pepsin) dolazi do koagulacije i stvaranja gruša, imaju sličan sadržaj glicinina i kazeina. Kravje mlijeko se u potpunosti može zamijeniti sojnim, kako u nutritivnom tako i u fiziološkom smislu. Danas je veliki broj djece alergičan na kravje mlijeko, te se sojino mlijeko prvenstveno koristi kao zamjena kravljem mlijeku [12].

Sojino mlijeko obično sadrži više vode od kravljeg mlijeka, a i udjeli ostalih sastojaka se znatno razlikuju.

Proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein, a proteine sojinog mlijeka čini pretežno glicinin i u manjoj mjeri neke druge proteinske frakcije.

Poznata manja proteina sojinog mlijeka je nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistin [5].

Ugljikohidrati u kravljem mlijeku isključivo su u obliku laktoze, dok su u sojinom mlijeku oligosaharidi stahioza i rafinoza.

Iako kravje mlijeko sadrži znatno veće udjele kalcija i fosfora, ono je vrlo siromašno željezom (oko 1 mg/L). Sojino mlijeko sadrži oko 10 puta više željeza u odnosu na kravljeg, ali je njegova bioiskoristivost manja [5].

**Tablica 4** Usporedba kravljeg i sojinog mlijeka [5]

Nutritivna vrijednost 100 g	Kravje mlijeko		Sojino mlijeko
	Punomasno	Djelomično obrano	
Proteini (g)	3,4	3,5	3,6
Masti (g)	3,5	1,5	2,3
Ugljikohidrati (g)	4,6	5,4	3,4
Energetska vrijednost	kJ Kcal	269,0 64,0	208,0 49,0
Kolesterol (mg)	10,0	5,0	0,0
Masne kiseline			
Zasićene (%)	63,5	63,5	14,0
Mononezasićene (%)	33,5	33,5	21,6
Polinezasićene (%)	3,0	3,0	63,5

Energetska vrijednost 100 g punomasnog kravljeg mlijeka je 64 kcal, a sojinog mlijeka 49 kcal. Ista masa kravljeg mlijeka sadrži oko 14 mg kolesterola, laktozu i ne sadrži dijetalna vlakna, dok sojino mlijeko sadrži 1,3 g vlakana, a nema kolesterola niti laktoze [11].

Sojino mlijeko osim toga sadrži i 12 puta više bakra te 42 puta više mangana i magnezija, nego kravje mlijeko. Tako visok udio vrijednih nutrijenata daje sojinom mlijeku u zdravstvenom smislu, neke prednosti nad kravljim mlijekom [5].

## 2.4. PROBIOTIČKI MIKROORGANIZMI

Probiotici su kulture bakterija koje su iznimno značajne za normalnu crijevnu funkciju, a sudjeluju u sprječavanju štetnih bakterija koje mogu uzrokovati različite bolesti [14].

„Korisne“ bakterije ili probiotici su živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u ljudi djeluju povoljno, mijenjajući svojstva mikroflore probavnog sustava i unutarnjeg ekosustava.

Probiotici se danas često dodaju mlijecnim proizvodima, posebice fermentiranim mlijecnim proizvodima, mlijeku i siru ili sudjeluju u fermentaciji istih. Bakterijske kulture koje se najčešće koriste u takvim proizvodima pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Zbog rastuće popularnosti, s probioticima se susrećemo u sve većem broju prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, primjerice kao dodatak hrani za dojenčad, pripravcima za bolesnike, pivu, vinu, napitcima za sportaše, a dostupni su i u liofiliziranom obliku [13].

### 2.4.1. Svojstva i terapijsko djelovanje probiotičkih bakterija

Probiotički mikroorganizmi moraju preživjeti djelovanje želučane kiseline i žučnih soli u probavnom sustavu ljudi za razliku od „tradicionalnih“ mlijecnih starter kultura, te kolonizirati debelo crijevo [15].

Probiotici moraju posjedovati nekoliko važnih svojstava, proizvodnja antimikrobnih tvari: organske kiseline, vodikov peroksid i bakteriocine, kako bi potiskivali razvoj patogenih i putrefaktivnih bakterija. Zbog tih svojstava probiotici pokazuju jaku antimikrobnu aktivnost prema G(+) bakterijama kao što su *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens*. Vodikov peroksid pokazuje u prisutnosti bakterija mlijecne kiseline jači inhibitorni učinak.

Probiotici proizvode nekoliko vrsta organskih kiselina od kojih su najvažnije octena, mlijeca i pirogrožđana. Od ukupno proizvedenih kiselina koje proizvode probiotici 90% su mlijeca i octena kiselina. Mlijeca i octena kiselina, djeluju baktericidno i bakteriostatski, te snižavaju pH vrijednost u probavnom sustavu.

Dva su tipa mliječne kiseline koje se proizvode tijekom fermentacije bakterijama mliječne kiseline : L(+) i D(-). Zapaženo je da mliječna kiselina stimulira peristaltiku crijeva, što poboljšava probavu i apsorpciju mliječnih proizvoda. Postoje podatci da bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline, potiskuju rast bakterija roda *Listeria* [16].

Uočena su vrlo važna terapijska svojstva probiotičkih fermentiranih mliječnih napitaka. Tijekom rasta i fermentacije, probiotički sojevi mliječno kiselih bakterija proizvode značajne udjele mliječne kiseline, koja djeluje inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama, snižavajući im intercelularni pH [17].

Zbog velikih zahtjeva za izbor probiotičkih sojeva, može se pretpostaviti kako nije jednostavno pronaći mikroorganizam koji će zadovoljiti baš sve zahtjeve. Upravo se zbog toga rabe mješovite kulture probiotičkih, ali i neprobioptičkih bakterija, koje svojim zajedničkim rastom osiguravaju zadovoljenje složenih tehnoloških zahtjeva [18].

## 2.5. VRSTE RODA *Bifidobacterium*

Bifidobakterije su štapićaste, anaerobne, G(+), nepokretne, asporogene bakterije od kojih je iz ljudskog organizma (usne šupljine, fecesa, vagine) izolirano 10 vrsta.

Sve do 60-ih godina prošlog stoljeća, bifidobakterije za mikrobiologe nisu predstavljale posebno značajan rod bakterija [19].

Ime roda su dobile po karakterističnom Y obliku stanica. Populacija bifidobakterija u organizmu ostaje relativno stabilna tijekom života (ovisi o prehrani, stresu, antibioticima i drugim čimbenicima), sve do uznapredovale dobi, kada im se broj smanjuje. Bifidobakterije su uobičajeni stanovnici ljudskog i životinjskog probavnog sustava, a probavni sustav novorođenčadi naseljavaju vrlo brzo nakon rođenja [20].

Iako su probavni sustav čovjeka i životinja primarna staništa ovih bakterija, one se mogu pronaći i u kanalizaciji, nalaze se i kao dio vaginalne mikroflore, u plakovima karijesa i crijevnog sustavu pčela i drugih kukaca.

Smatra se kako nisu prave bakterije mliječne kiseline, jer proizvode mliječnu i octenu kiselinu u omjeru 2:3.

Zbog povoljnog učinka na crijevnu populaciju, vrste *B. longum*, *B. bifidum* i *B. lactis* se koriste u fermentaciji mliječnih proizvoda i farmaceutskih pripravaka. Iako se rabe u fermentiranim mliječnim proizvodima, fermentacija mlijeka kao supstrata još uvijek predstavlja relativno veliki tehnološki problem [21].

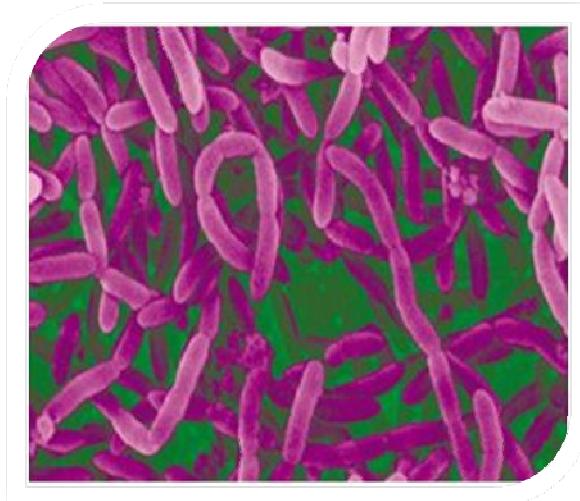
Vrste rodova *Bifidobacterium* izolirane iz ljudskog organizma [19]

- *B. adolescentis*
- *B. angulatum*
- *B. bifidum*
- *B. breve*
- *B. catenulatum*
- *B. dentinum*
- *B. globosum*
- *B. infantis*
- *B. longum*
- *B. pseudocatenulatum*.

### 2.5.1. *Bifidobacterium bifidum*

*Bifidobacterium bifidum* je termofil s optimalnom temperaturom rasta 36 do 38 °C, ne raste ispod 20 °C, a niti iznad 45 °C. Optimalno rastu pri pH 6 do 7, s gotovo nikakvim rastom pri pH 4,5 do 5 ili nižim i pri većim pH vrijednostima od 8 do 8,5. Prirodno stanište mu nije mlijeko, već debelo crijevo čovjeka. Vrlo se sporo razvija u mlijeku, gdje heterofermentativno previre laktozu u mliječnu i octenu kiselinu [21].

Bifidobakterije su vrlo spori proizvođači kiseline, mlijeko koaguliraju za 18 do 28 sati pa su im zbog toga potrebni promotori rasta [3].



**Slika 1** *Bifidobacterium bifidum* [22]

*Bifidobacterium bifidum* pokazala se vrlo otpornom na djelovanje želučane kiseline i pojedinih proteolitičkih enzima, koji se luče u želucu i dvanaesniku. Ta bakterija štiti od proljeva, održava ravnotežu crijevne mikroflore i ublažava posljedice koje nastaju tijekom liječenja antibioticima [23].

## 2.6. MED

Med je proizvod koji pčele dobivaju preradom nektara i medljike u mednom mjeđuhru. 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. Osim vode (16 do 20%), glukoze i fruktoze (75 do 80%), med sadrži i druge ugljikohidrate (saharozu, maltozu, dekstrin), flavonoide (34 do 61%), te druge organske tvari (organske kiseline, aminokiseline, proteine, više alkohole, inulin, hormone), enzime, razne derivate klorofila, mineralne tvari, i vitamine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> i B<sub>9</sub>). Med nije uvijek ujednačen proizvod, sastav mu se mijenja obzirom na sastav sirovina koje pčela prikuplja i o godišnjem dobu [24].

Med je gusta higroskopna viskozna tekućina. Okus, boja i miris najvažnija su organoleptička svojstva meda i ovise o biljnom porijeklu, uvjetima prerade i čuvanja.

Kristalizacija je prirodno svojstvo meda i zato svaki med kristalizira prije ili kasnije, neovisno o uvjetima čuvanja. Veliki udjeli šećera u medu ne dozvoljava razmnožavanje mikroorganizama. Jedino se osmofilni kvasci mogu razmnožavati u medu. Oni izazivaju njegovu fermentaciju, koja uglavnom ovisi o udjelu vode i broju kvasaca.

Med je odličan energetski izvor, jer predstavlja visokokaloričnu hranu (4 cal/g) koju organizam lako probavlja. Zbog toga je od velikog značaja za sportaše i one koji naporno rade, starije osobe i djecu, teške i kronične bolesnike, te kod malaksalosti i oporavka nakon bolesti. Zahvaljujući sadržaju fruktooligosaharida, med se ubraja u prebiotičke tvari [25].

Prebiotici su neprobavljivi ugljikohidrati koji služe kao hrana odabranim „dobrim” bakterijama u debelom crijevu. Dodaju se u mlijeko prije fermentacije kako bi pospješili preživljavanje probiotika, ali i kao blagi zaslađivači, te tvari koje poboljšavaju okus i teksturu mliječnih proizvoda s niskim udjelom masti [13].

Med pridonosi boljoj resorpciji minerala, posebno kalcija i magnezija, ublažavanju virusnih i bakterijskih infekcija, smanjenju udjela štetnih tvari koje mogu uzrokovati rak debelog crijeva, boljoj sintezi vitamina K, te snižavanju razine masnoće u krvi.

Čisti neprerađeni med zaustavlja rast mnogih mikroorganizama. Antimikrobno djelovanje meda izraženije je na gram pozitivne bakterije. Štiti želudac od oštećenja koja mogu izazvati neke toksične tvari i značajno smanjuje pojavu čira na želucu, te sprječava promjene na debelom crijevu koje mogu dovesti do razvoja tumora. Analizom krvi utvrđeno je da svakodnevno uzimanje meda poboljšava antioksidacijsku obranu i povećava razinu željeza i minerala u tragovima [25].

## 2.6.1. Kestenov med

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

Kestenov med se preporuča protiv bolesti probavnih organa: želuca, dvanaesterca, žuči i jetre. Med kestena ima izvanredno djelovanje u oporavku kod žutice, poslije operacije žuči i drugih operativnih zahvata na unutrašnjim organima [26].



**Slika 2** Kestenov med [27]

### 2.6.2. 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 ima veći udio fruktoze od glukoze. Bagremov med dobar je za umirenje, kod vrtoglavice, nesanice i sličnih smetnji [26].

Čist prirodan bagremov med je napravljen isključivo od nektara bagremovog cvijeta. Ovaj med je cijenjen zbog njegovog blagog ukusa i zlatne boje [28].



**Slika 3** Bagremov med [27]

## 2.7. BAKTERIJA *Yersinia enterocolitica*

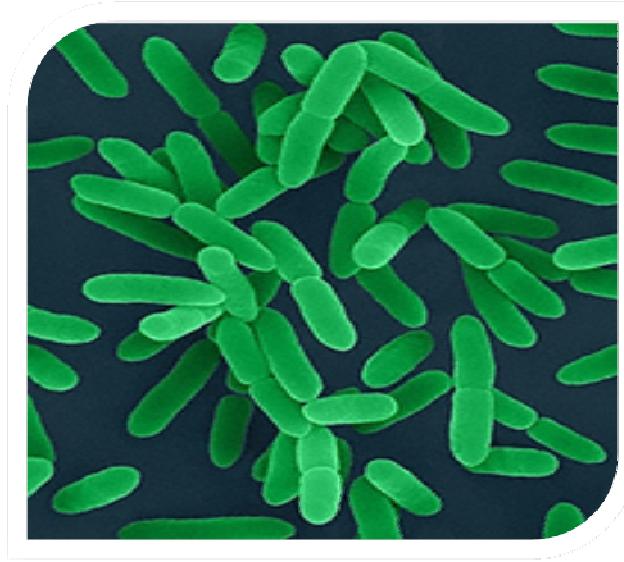
### 2.7.1. Osobine, infekcije i liječenje

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

Raširena je u prirodi, nalazi se na biljnem materijalu, u vodi, zemlji, u probavnom sustavu ljudi i životinja, sirovom mesu, mlijeku, mliječnim proizvodima, bjelanjku, šumskim gljivama [30].

Tvori enterotoksin sličan toksinu bakterije *E. coli*. Patogena je za čovjeka koji se najčešće inficira mesom i mlijekom i oboli sa znacima gastroenteritisa, rijetko septikemije [31].

Osjetljiva je na povišenu koncentraciju soli, visoku temperaturu (temperatura od 60 °C uništava ju za 4 min), na tetraciklin, kloramfenikol i dezinficijense. Otporna je na niske temperature. Značajno je da raste i razmnožava se na temperaturi hladnjaka, na kojoj se namirnice najčešće čuvaju [29].



**Slika 4** *Yersinia enterocolitica* [29]

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je pratiti promjene pH vrijednosti, odrediti titracijsku kiselost, kao i broj probiotičkih bakterija tijekom 25 sati fermentacije (nulti dan), te tijekom čuvanja 7. dan, 14. i 21. dan.

Fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka provesti monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, uz dodatak bagremovog i kestenovog meda i utvrditi inhibitorni utjecaj na bakteriju vrste *Yersinia enterocolitica*.

### 3.2. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.2.1. Priprava uzorka

Za pripremu probiotičkih napitaka (fermentiranih monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12) 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 *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 proizvođača Laboratorij Christian Hansen, Copenhagen, Danska. Za inokulaciju je korišteno 0,06 g/200 ml uzorka (0,03%).

Kao prebiotički dodatak u sve tri vrste mlijeka korišteni su kestenov i bagremov med (proizvođač Apimel) u udjelima od 5 i 10%. Odvagani med se dodavao u svaki uzorak mlijeka, te su se uzorci zagrijali na temperaturu nacepljivanja bakterija mliječne kiseline (37 °C). Nakon zagrijavanja, uzorci su nacipljeni kulturom bakterija mliječne kiseline i inkubirani u termostatu na 37 °C u trajanju od 25 sati. Od svih vrsta mlijeka fermentirane su i slijepe probe.

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

### 3.2.2 Određivanje aktivne kiselosti

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

### 3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti

Za određivanje titracijske kiselosti, korištena je metoda po Soxhlet-Henkelu. U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL dodano je 10 mL fermentiranog mlijeko napitka i razrijeđeno sa 10 mL destilirane vode. Dodano je 2 mL otopine fenolftaleina i titrirano sa 0,1 mol/L otopinom NaOH do pojave ružičaste boje. Kislost je prema ovoj metodi izračunata prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = \mathbf{a} \times \mathbf{F} \times \mathbf{4} \quad \text{gdje je:}$$

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

$\mathbf{a}$  – broj ml 0,1 mol/L otopine NaOH utrošenih za neutralizaciju 10 mL uzorka

$\mathbf{F}$  – faktor molariteta 0,1 mol/L otopine NaOH

### 3.2.4. Priprava suspenzije bakterijskih stanica *Yersinia enterocolitica*

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

### 3.2.5. Određivanje broja probiotičkih bakterija

Broj probiotičkih bakterija u 1 mL fermentiranog mlijeka, određen je posrednom metodom, metodom razrjeđenja u sterilnoj fiziološkoj otopini, te nakon prebrojavanja poraslih kolonija na podlozi nakon inkubacije.

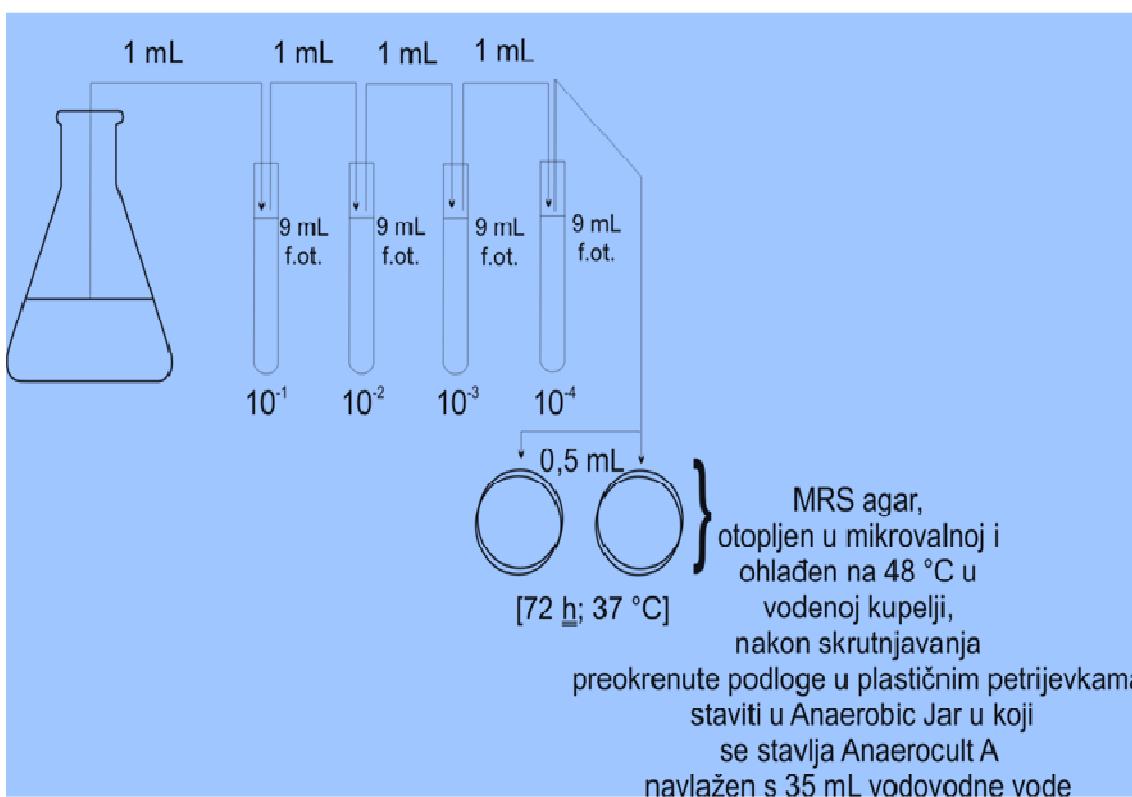
Pripravljeno je decimalno razrjeđenje uzorka fermentiranog mlijeka u sterilnoj fiziološkoj otopini iz kojega je prenesen dio inokuluma u Petrijevu zdjelicu u koju je uliven, rastopljen i na 48 °C ohlađen MRS agar (Merck, Njemačka).

Nakon homogenizacije inokuluma i podloge, petrijeve zdjelice su inkubirane 3 dana na 37 °C u anaerobnim uvjetima, u posudama za uzgoj anaeroba (Anaerobic jar, Merck) uz Anaerocult A (Merck, Njemačka) navlažen sa 35 mL vodovodne vode.

Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije bakterije *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 i izračunat je broj bakterija u 1 mL proizvoda (CFU) prema formuli [32]:

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

**CFU** (Colony Forming Units / broj živih stanica)

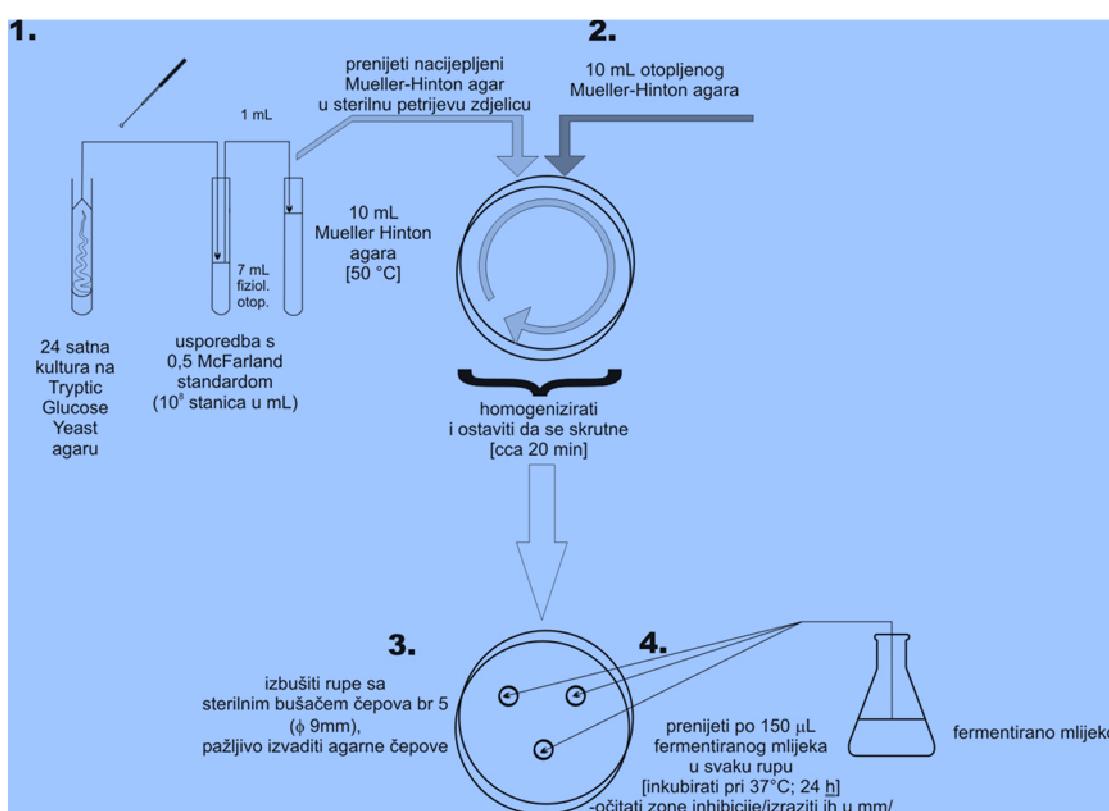


**Slika 5** Shematski prikaz određivanja broja probiotičkih bakterija (CFU)

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

Za određivanje utjecaja fermentiranih mlijeka na *Yersinia enterocolitica* pripremljena je 24 sata stara kultura na Tryptic Glucose Yeast agaru (TGK; Biolife, Italija), te sterilnom mikrobiološkom ušicom prenesena u epruvetu sa 9 mL fiziološke otopine. Pripremljena suspenzija je sadržavala  $1 \times 10^8$  stanica u 1 mL. 1 mL suspenzije je preneseno u epruvetu sa 10 mL Mueller-Hinton agarom (Biolife, Italija) otopljenim i ohlađenim na 50 °C, te dobro homogeniziranim.

Nacijspljeni Mueller-Hinton agar je prenesen u sterilnu petrijevu zdjelicu, te je dodano 10 mL sterilnog Mueller-Hinton agara (koncentracija stanica  $1 \times 10^6$ /mL). Nakon dobre homogenizacije ostavljeno je da se podloga skrutne oko 20 minuta. Sterilnim bušačem čepova broj 5 ( $\Phi 9\text{mm}$ ) su izrezane rupe, te su sterilnom pincetom tankih vrhova vrlo pažljivo izvađeni agarni čepovi. U svaku izbušenu rupu je preneseno 150  $\mu\text{L}$  fermentiranog mlijeka, i inkubirano 24 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije očitane su zone inhibicije i izražene u mm.

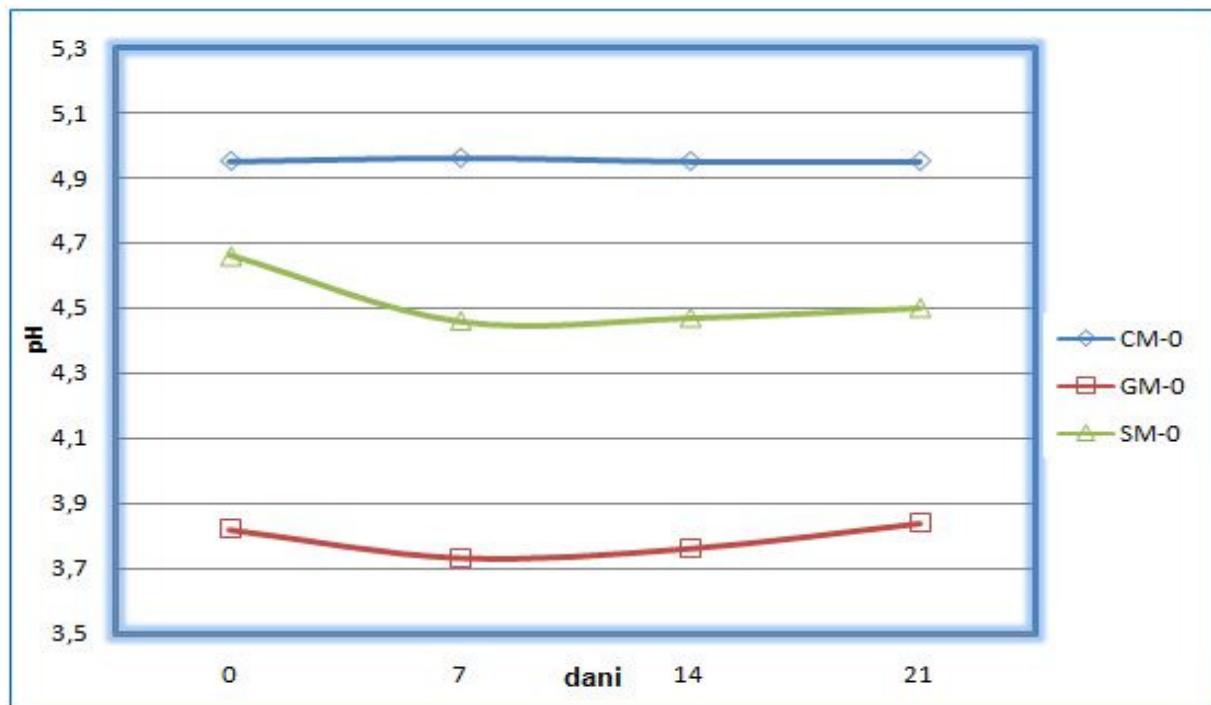


Slika 6 Shematski prikaz određivanja stupnja inhibicije

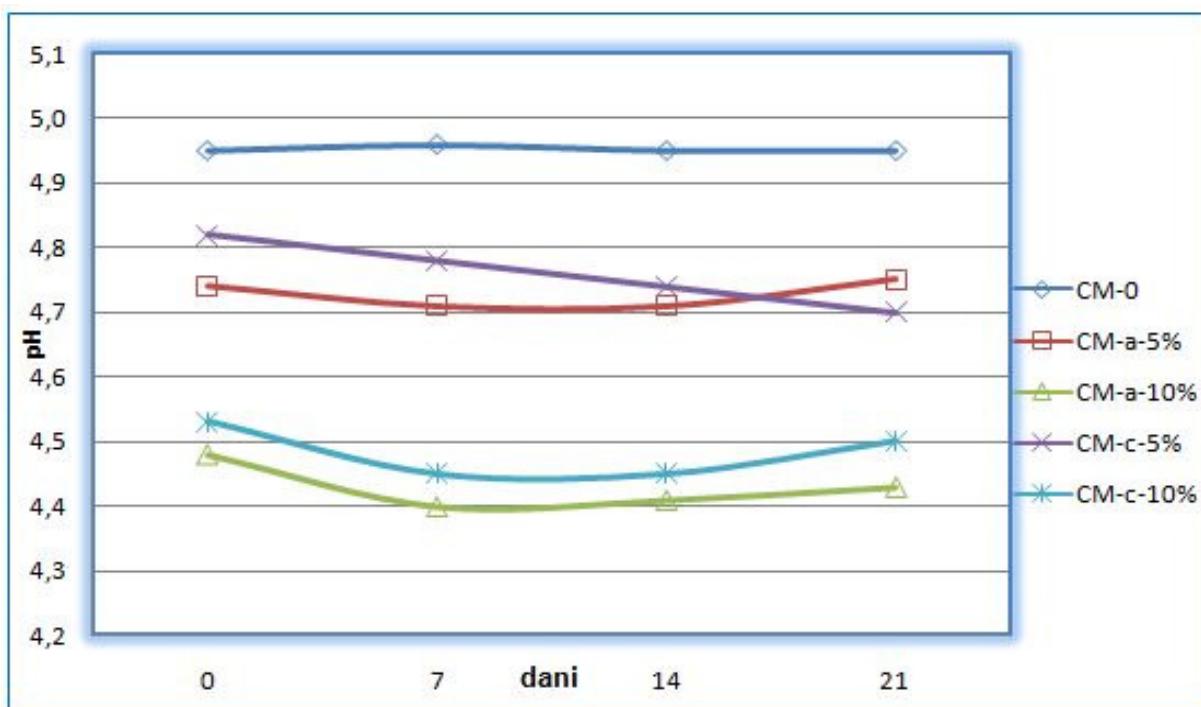
## **4. REZULTATI**

#### 4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM ČUVANJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLJEKA FERMENTIRANIH MONOKULTUROM *Bifidobacterium bifidum* Bb-12

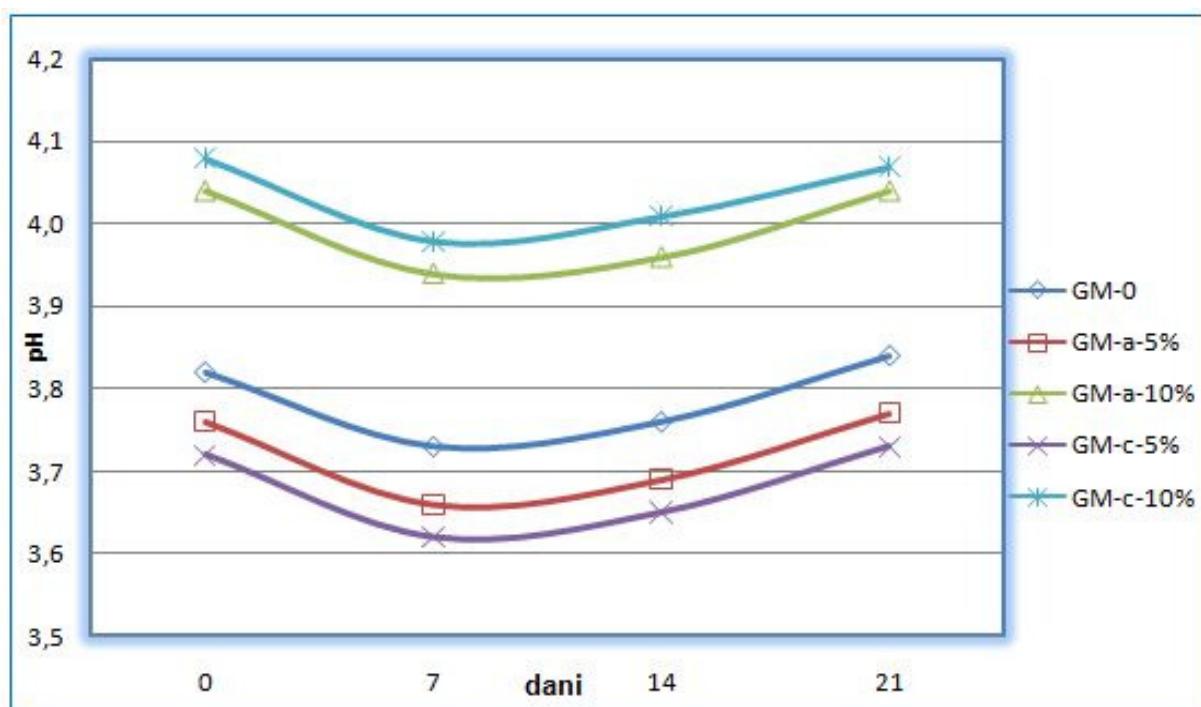
Rezultati određivanih parametara tijekom čuvanja kravlje, kozje i sojinog mlijeka fermentiranih monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 prikazani su slikama 7 -16.



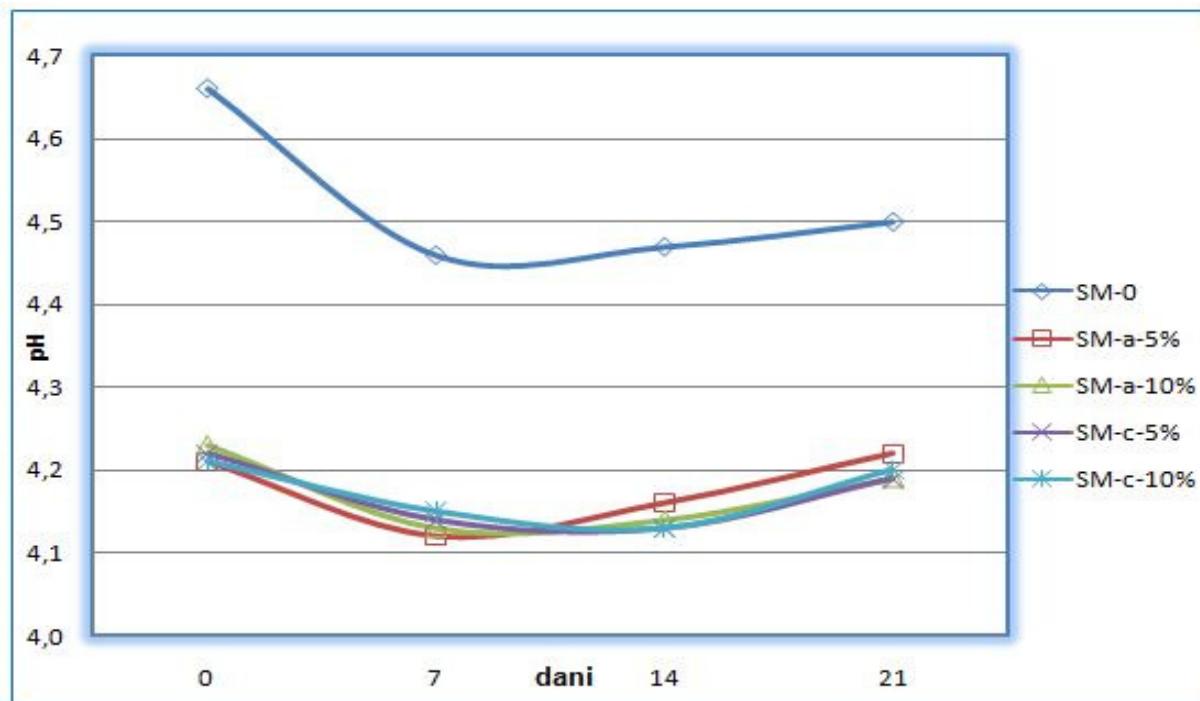
**Slika 7** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravlje (CM), kozje (GM) i sojino (SM) mlijeka bez dodatka meda tijekom čuvanja



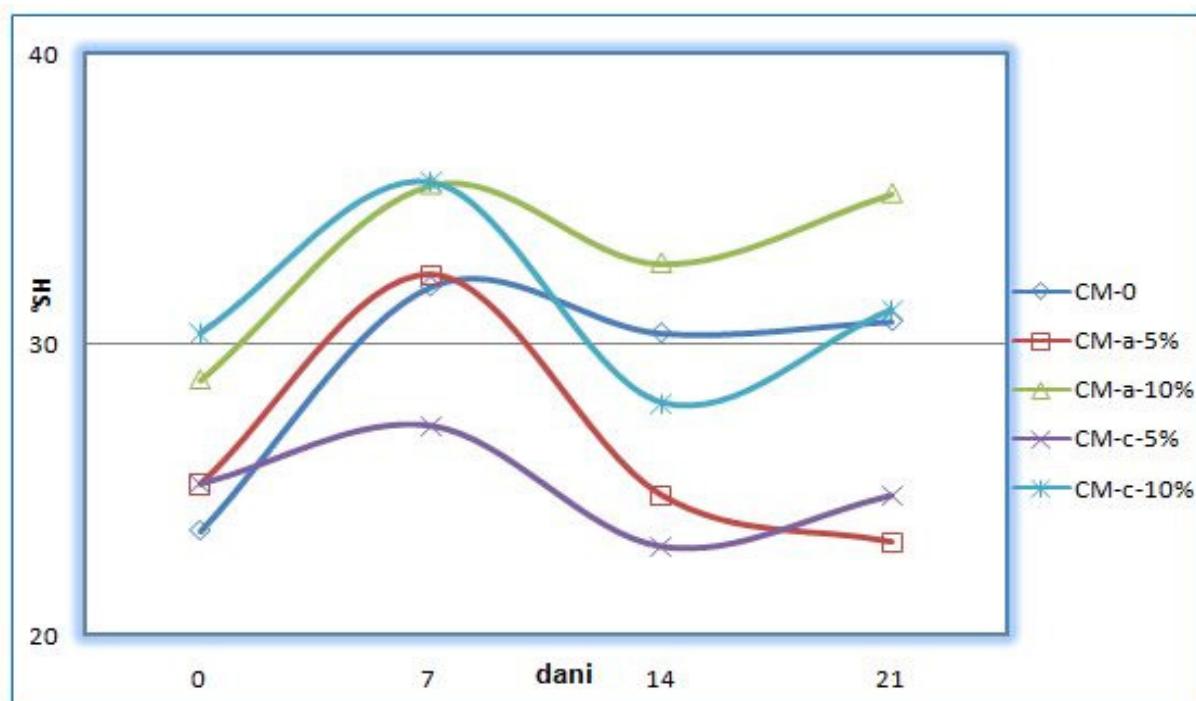
**Slika 8** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (CM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**                                   **c = kestenov med**



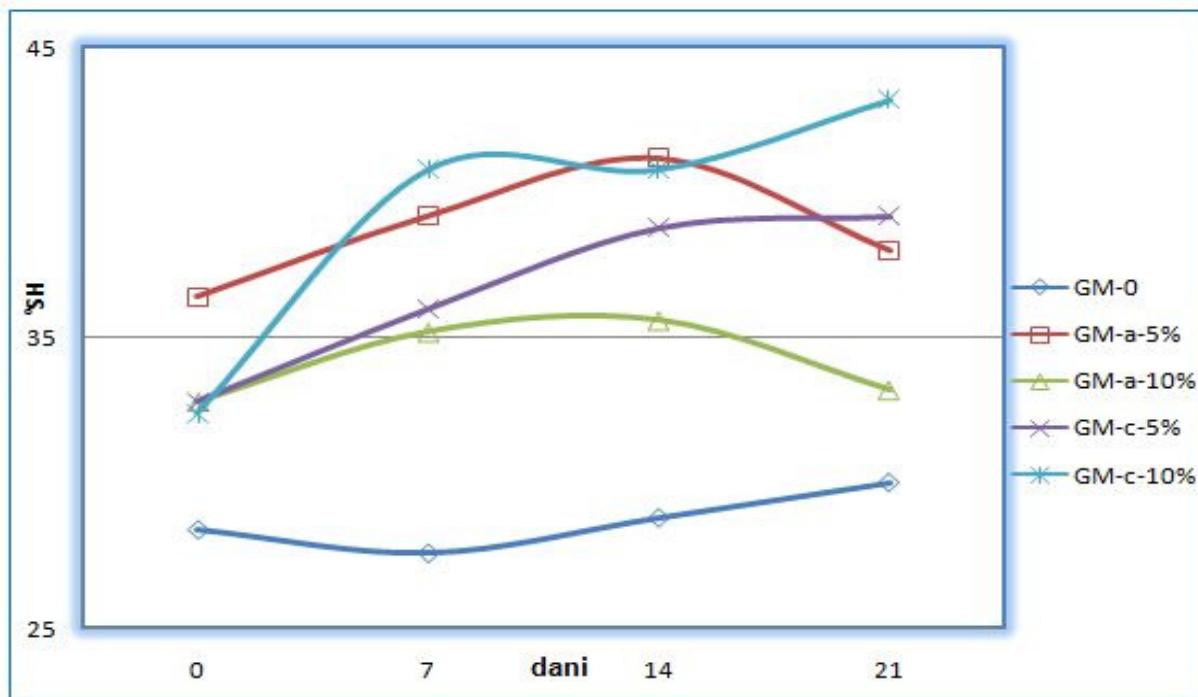
**Slika 9** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (GM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**                                   **c = kestenov med**



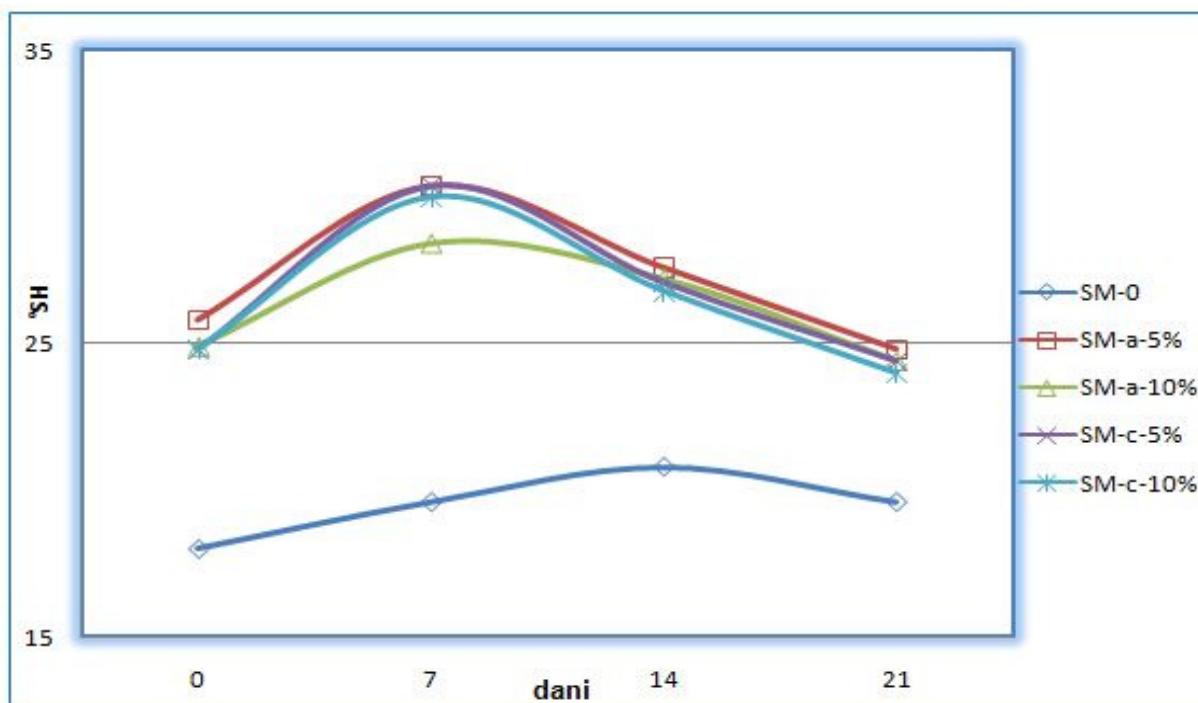
**Slika 10** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (SM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**                                    **c = kestenov med**



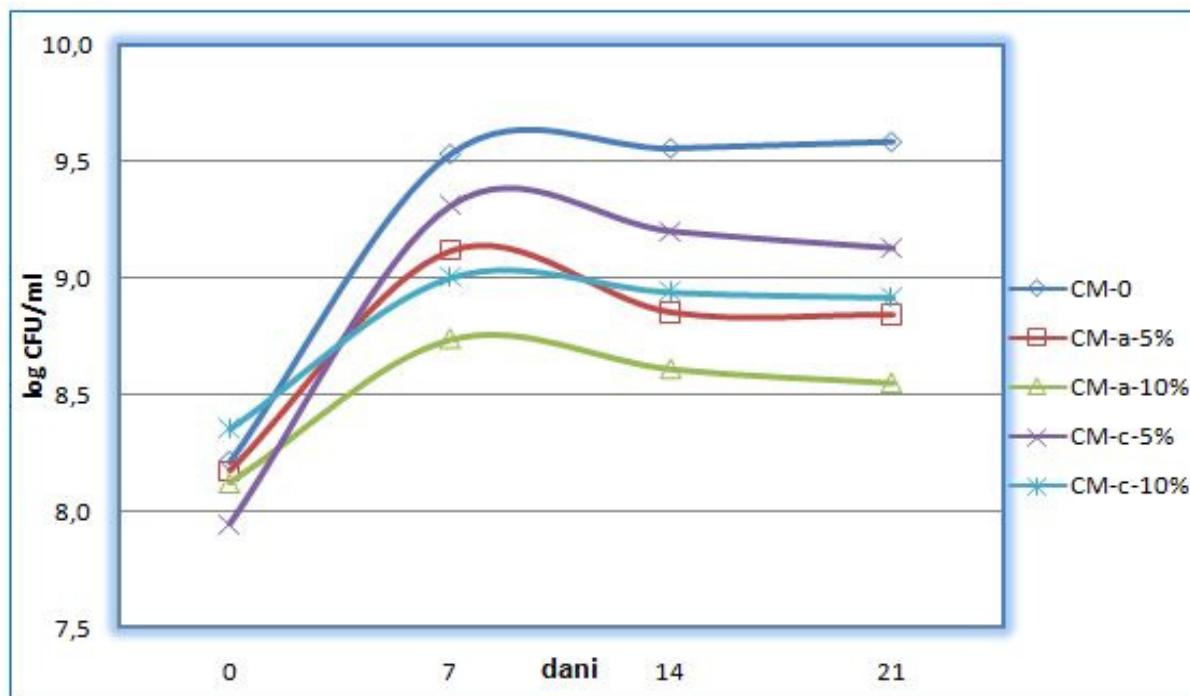
**Slika 11** Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (CM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**                                    **c = kestenov med**



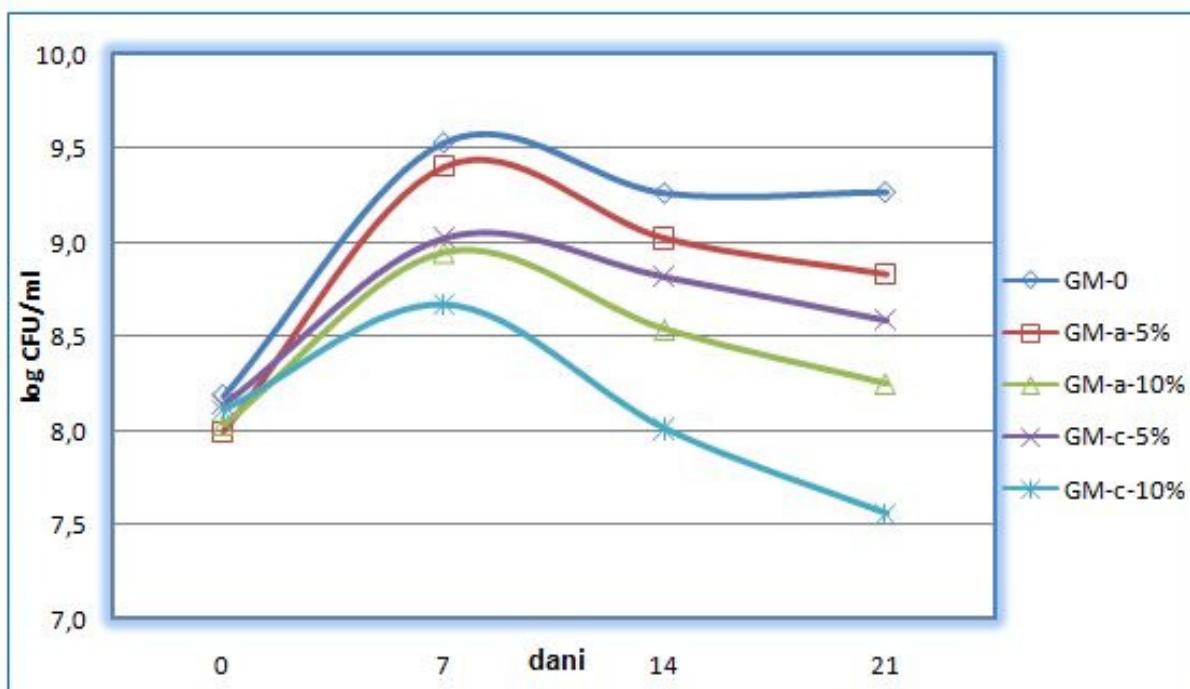
**Slika 12** Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (GM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**      **c = kestenov med**



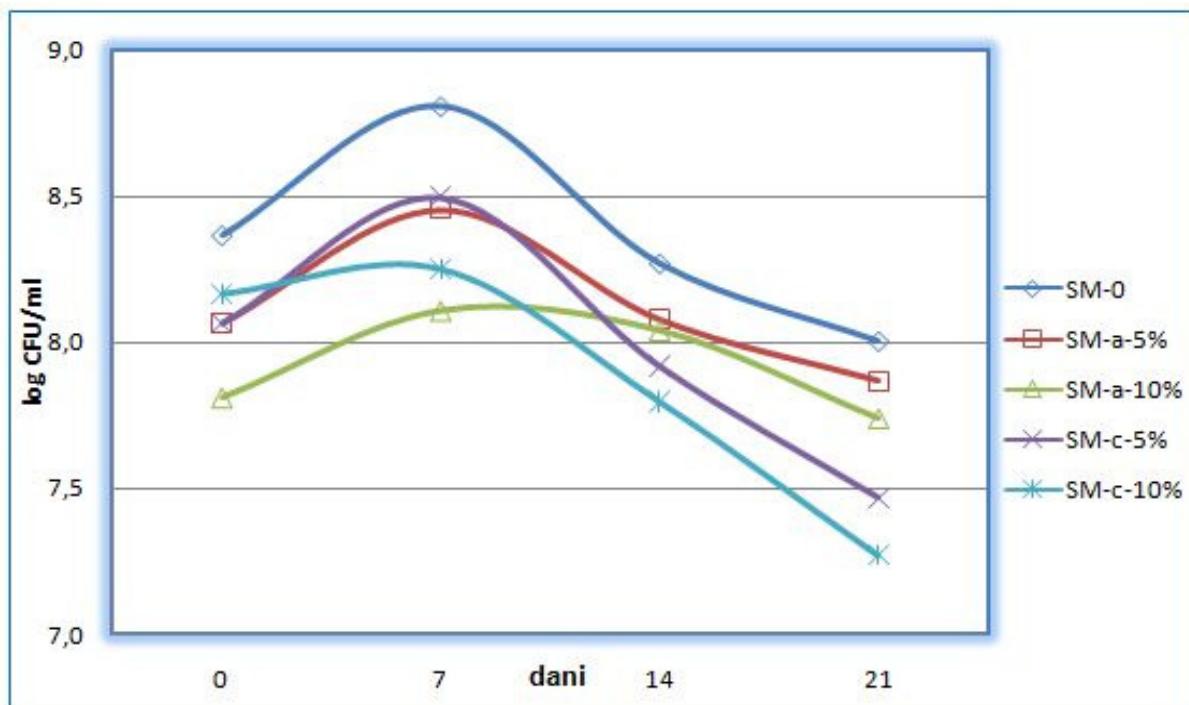
**Slika 13** Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (SM) bez i s dodatkom meda tijekom čuvanja  
**a = bagremov med**      **c = kestenov med**



**Slika 14** Promjena broja bakterija *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 tijekom čuvanja fermentiranog kravljeg mlijeka (CM) bez i s dodatkom meda  
**a = bagremov med**                           **c = kestenov med**



**Slika 15** Promjena broja bakterija *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 tijekom čuvanja fermentiranog kozjeg mlijeka (GM) bez i s dodatkom meda  
**a = bagremov med**                           **c = kestenov med**



**Slika 16** Promjena broja bakterija *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 tijekom čuvanja fermentiranog sojinog mlijeka (SM) bez i s dodatkom meda

a = bagremov med

c = kestenov med

## 4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA STUPNJA INHIBICIJE RASTA TEST ORGANIZMA *Yersinia enterocolitica* KRAVLJIM, KOZJIM I SOJINIM BIFIDOGENIM MLJEKOM

**Tablica 5** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kravlјim mlijekom (CM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 dodatkom bagremovog meda (a) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
CM-0	+++	++	++	+++
CM-a-5	++	+++	+	±
CM-a-10	++	++	++	++

± Djelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

**Tablica 6** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kravlјim mlijekom (CM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 dodatkom kestenovog meda (c) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
CM-0	+++	++	++	+++
CM-c-5	++	++	±	+
CM-c-10	++	++	±	±

± Djelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

**Tablica 7** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom (GM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 dodatkom bagremovog meda (a) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
GM-0	++	++	++	++
GM-a-5	++	++	+++	++
GM-a-10	++	++	++	++

± Ddjelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

**Tablica 8** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom (GM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 dodatkom kestenovog meda (c) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
GM-0	++	++	++	++
GM-c-5	++	++	++	++
GM-c-10	++	++	++	++

± Ddjelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

**Tablica 9** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom (SM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 s dodatkom bagremovog meda (a) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
SM-0	++	+	+	+
SM-a-5	++	+	++	+
SM-a-10	++	++	++	++

± Djelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

**Tablica 10** Inhibicija rasta test organizma *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom (SM) fermentiranim probiotičkom kulturom Bb-12 s dodatkom kestenovog meda (c) u udjelima od 5 i 10%

dani	0	7	14	21
SM-0	++	+	+	+
SM-c-5	++	++	++	++
SM-c-10	++	++	+	++

± Djelomična inhibicija  
 + Vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)  
 ++ Jasna zona inhibicije < 15 mm  
 +++ Jasna zona inhibicije 15-20 mm

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM ČUVANJA

Praćenje promjene pH vrijednosti tijekom 21 dan čuvanja tri vrste mlijeka fermentirane monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, uz dodatak dvije vrste meda, dalo je vrlo zanimljive i prilično različite rezultate.

Promjene pH vrijednosti kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka bez dodatka meda se značajno razlikuju od ostalih uzoraka. pH vrijednost kravljeg mlijeka tijekom 21 dan čuvanja, bila je gotovo konstantna i iznosila je 4,95. Za razliku od kravljeg mlijeka, kozje i sojino mlijeko su imali nešto nižu vrijednost pH. pH vrijednost sojinog mlijeka se u prvih 7 dana smanjila sa 4,6 na 4,4 zadržavajući tu vrijednost do kraja čuvanja. Kozje mlijeko je imalo najnižu pH vrijednost, uspoređujući je s ostale dvije, koja se kretala oko 3,8 (prikazano slikom 7).

Dodatak dvije vrste meda, kestenovog (oznaka c) i bagremovog (oznaka a), u **kravljem mlijeku** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, pokazao je zanimljiv učinak na pH vrijednost, što je prikazano slikom 8. Kravlje mlijeko bez dodatka meda je imalo znatno višu pH vrijednost (4,95), u odnosu na ono sa dodatkom meda. Dodatak obje vrste meda u udjelu od 5% u kravljem mlijeku rezultiralo je sniženjem pH vrijednosti, te iznosilo oko 4,7. Dodatak obje vrste meda u udjelu od 10% još više je snizilo pH vrijednost, koja se cijelo vrijeme čuvanja kretala oko 4,45. Iz tijeka krivulja opadanja pH vrijednosti, vidljivo je da veći udio meda dodan u kravlje mlijeko više snižava pH vrijednost.

Dodatak bagremovog i kestenovog meda u **kozje mlijeko** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 pokazalo je znatnu razliku uspoređujući sa dodatkom meda istih udjela u kravlje mlijeko. U ovom slučaju (slika 9) dodatak bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 10% rezultiralo je većom pH vrijednosti od nultog uzorka (uzorak bez dodatka meda) koji je iznosio oko 4,0, dok je nulti uzorak imao pH vrijednost oko 3,75. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u udjelu od 5% doprinio je nešto nižoj pH vrijednosti u odnosu na nulti uzorak, te je iznosio oko 3,65. Ovdje je značajno napomenuti da su bagremov i kestenov med u istim udjelima različito djelovali u kravljem i kozjem mlijeku.

U kravljem mlijeku, povećanjem udjela meda se snižavala pH vrijednosti, dok se u kozjem mlijeku povećanjem udjela meda povećavala pH vrijednost.

**Sojino mlijeko** bez dodatka meda inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 pokazalo je, u prvih 7 dana čuvanja, značajan pad pH vrijednosti (sa oko 4,7 na 4,45), te se na razini od pH 4,5 zadržao do kraja čuvanja. Dodatak kestenovog i bagremovog meda pokazao je vrlo zanimljiv učinak na pH vrijednost, pri čemu su obje vrste meda u oba udjela pokazala identičan učinak. Snizili su pH vrijednost sojinog mlijeka (na oko 4,15), te se ta vrijednost zadržala do kraja čuvanja, vidljivo iz prikaza (slika 10).

## 5.2. PROMJENE INTENZITETA ZAKISELJAVANJA (TITRACIJSKE KISELOSTI) TIJEKOM ČUVANJA

Pri čuvanju **kravljeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 titracijska kiselost nultog uzorka porasla je u prvih 7 dana sa početnih 23 °SH na 32 °SH. U sljedećih 7 dana (14. dan) došlo je do vrlo malog smanjenja intenziteta zakiseljavanja, te je do kraja čuvanja zadržalo približno konstantnu vrijednost. Dodatkom kestenovog i bagremovog meda u udjelu od 10%, titracijska kiselost je bila znatno viša, a u udjelu od 5% nešto niža. Svaki od uzoraka kravlje mlijeka sa 2 vrste meda u udjelima od 5 i 10% je pokazao porast titracijske kiselosti u prvih 7 dana, nakon toga lagani pad sljedećih 7 dana, te ponovni rast do kraja čuvanja (slika 11).

Pri čuvanju **kozjeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, titracijska kiselost uzorka bez dodatka meda imala je najnižu vrijednost (oko 28), koja se nije značajnije mijenjala tijekom čuvanja. Dodatkom kestenovog meda dolazi do znatnog povećanja titracijske kiselosti. Uzorak s kestenovim medom u udjelu od 5% imao je nešto nižu vrijednost titracijske kiselosti od uzorka s 10% meda. Oba udjela kestenovog meda pokazuju sličnost u tome što tijekom čuvanja dolazi do kontinuiranog povećanja titracijske kiselosti. Uzorak s bagremovim medom imao je nešto niže vrijednosti titracijske kiselosti u odnosu na uzorak s kestenovim medom, no znatno višu titracijsku kiselost od nultog uzorka.

Uzorci s bagremovim medom u udjelu od 5% imali su znatno višu titracijsku kiselost od uzoraka s 10% dodatka, a pokazuju sličnost u porastu titracijske kiselosti u prvih 14 dana, te lagani pad do kraja skladištenja (slika 12).

Titracijska kiselost **sojinog mlijeka** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, bez dodatka meda bila je znatno niža od sojinog mlijeka s dodatkom 2 vrste meda (slika 13).

I bagremov i kestenov med, u oba udjela, su djelovali gotovo identično, odnosno, uzorci su imali približno istu vrijednost titracijske kiselosti. Ona se u prvih 7 dana povećala, sa 25 na 30 °SH, nakon čega je uslijedio lagani pad, koji se održao sve do kraja čuvanja te na kraju iznosio 24 °SH.

### 5.3. PROMJENA BROJA BAKTERIJA *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 TIJEKOM ČUVANJA

U istraživanju je utvrđeno da se opadanje broja živih stanica fermentiranim proizvodima tijekom čuvanja, odvija različito i ovisno o vrsti mlijeka, vrsti meda, udjelu meda, te različito do polovine i od polovine do kraja praćenog vremenskog intervala čuvanja. Promjene ukupnog broja živih stanica u mililitru proizvoda tijekom čuvanja od 21 dan, utvrđivanih u intervalima od svakih 7 dana, prikazani su slikama 14, 15 i 16.

Tijekom čuvanja **kravljeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Bifidobacterium bifidum* Bb-12, utvrđen je nagli porast broja bakterija kod svih uzoraka u prvih 7 dana (slika 14). Uzorak od kravljeg mlijeka bez dodatka meda imao je najveći broj bakterija tijekom cijelog čuvanja. Nešto niži broj bakterija utvrđen je kod uzorka od kravljeg mlijeka s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 5%, a još niži broj bakterija u udjelu od 10%. Slijedi uzorak od kravljeg mlijeka sa dodatkom bagremovog meda u udjelu od 5%, a najmanji broj utvrđen je kod uzorka s 10% dodatka bagremovog meda.

Broj bakterija *Bifidobacterium bifidum* u **kozjem mlijeku** je sličan broju bakterija u kravljem mlijeku. Nulti uzorak kozjeg mlijeka je također imao najveći broj bakterija tijekom čuvanja. Dodatak meda u udjelu od 5% (kestenovog i bagremovog) rezultirao je većim brojem bakterija u odnosu na udio od 10%.

U prvih 7 dana, kod svih uzoraka je došlo do naglog povećanja broja bakterija, te je uslijedilo lagano smanjenje do kraja čuvanja.

**Sojino mlijeko** je pokazalo veliku sličnost sa kozjim mlijekom u trendu opadanja broja bakterija. Broj bakterija je bio znatno niži u odnosu na kravljie i kozje mlijeko, a trend opadanja broja bakterija tijekom čuvanja sojinog mlijeka, bio je najizraženiji od svih vrsta mlijeka. Nakon porasta broja bakterija do 7. dana čuvanja, kod obje vrste meda i oba primijenjena udjela, uslijedilo je konstantno opadanje broja bakterija do kraja intervala čuvanja.

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

U radu je proučavan inhibički potencijal bakterije *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 prema bakteriji *Yersinia enterocolitica* tijekom 21 dana čuvanja fermentiranih mlijeka. Osnovna postavka rada je usporedba kravljie/kozje/sojino mlijeko, pH/inhibicija, CFU probiotičkih bakterija/inhibicija, dodatak bagremovog/kestenovog meda, te utjecaj njihovog različitog udjela.

**Kravljie mlijeko** bez dodatka meda nakon fermentacije pokazuje inhibički učinak i to jasnom zonom inhibicije na početku i na kraju čuvanja, dok 7. i 14. dan nešto manjeg intenziteta inhibicije (tablice 5 i 6). Dodatak 5% bagremovog meda u fermentirano kravljie mlijeko, nakon 7. dana čuvanja, slabi inhibiciju test organizma na vrlo slabu, do djelomičnu (tablica 5). Dodatak bagremovog meda u većem udjelu (10%), povoljno utječe na inhibiciju *Y. enterocolitica* (tablica 5), kao i dodatak kestenovog meda ali samo do 7. dana čuvanja fermentiranog kravljeg mlijeka, dok nakon 7. dana, slabi inhibički učinak od vrlo slabog do djelomičnog.

**Kozje mlijeko** za razliku od kravljeg gotovo da ne pokazuje promjene u inhibiciji test organizma, prije i nakon dodatka obje vrste meda. To je zbog toga što je kod fermentiranog kozjeg mlijeka bez dodatka meda utvrđen visok stupanj inhibicije na odabrane patogene bakterije (tablice 7 i 8).

**Sojino mlijeko** bez dodatka meda na samom početku fermentacije inhibira rast test organizma *Y. enterocolitica*. Nakon 7.dana pa sve do kraja čuvanja, dolazi do smanjivanja stupnja inhibicije, što se može objasniti smanjivanjem broja probiotičkih bakterija *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 (tablice 9 i 10).

Dodatkom 5% bagremovog meda varira inhibicija test organizma tako da je 0. i 14. dan zona inhibicije manja od 15 mm, dok je 7. i 21. dan čuvanja zona inhibicije vrlo slaba. Dodatak 10% bagremovog meda, stabilizira inhibiciju, te je jednaka na početku i na kraju čuvanja (tablica 9). Kestenov med ima jači utjecaj na inhibiciju organizma *Y. enterocolitica* od bagremovog meda, jer ga konstantno inhibira manje od 15 mm.

Može se pretpostaviti da, iako dolazi do smanjenja broja bakterija tijekom čuvanja, dodatak meda ipak pospešuje inhibicijsko djelovanje.

Bakterije, pored mlijecne kiseline mogu proizvoditi i druge tvari tijekom fermentacije (octenu kiselinu i druge niže masne kiseline, vodikov peroksid i dr.), ali i bakteriocine – proteinske tvari koje djeluju inhibitorno prema producentu srodnim bakterijama.

Potrebno je napomenuti kako je istraživanje provedeno u *in vitro* uvjetima i za očekivati je drugačije rezultate u ljudskom organizmu, uslijed aktiviranja imunološkog sustava.

Ovaj rad može poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja, u kojima je potrebno detaljnije istražiti pojedine međufaze procesa fermentacije, kao i pojedine metabolite, osim mlijecne kiseline.

## **6. ZAKLJUČCI**

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

- Tijekom cijelog perioda čuvanja, fermentirano kozje mlijeko je imalo najnižu pH vrijednost, nešto višu sojino, a najvišu pH vrijednost fermentirano kravlje mlijeko.
- U kravljem mlijeku, povećanjem udjela meda se snižavala pH vrijednost, dok se u kozjem mlijeku povećanjem udjela meda, proporcionalno tome povećavala pH vrijednost. Kod sojinog mlijeka dodatak meda u oba slučaja je snizio pH fermentiranog mlijeka.
- Titracijska kiselost kod kravljeg mlijeka pokazala je znatno veće vrijednosti, dodatkom većeg udjela obje vrste meda. Kod kozjeg mlijeka udjeli kestenovog meda pokazali su povećanje kiselosti u većoj mjeri nego što je pokazao dodatak bagremovog meda, dok su kod sojinog mlijeka i bagremov i kestenov med djelovali gotovo identično i utjecali na povećanje kiselosti.
- Kravlje mlijeko, kao i kozje, je pokazalo slične vrijednosti u trendu opadanja broja bakterija. Na početku čuvanja broj bakterija je bio najveći, dok je dodatkom meda broj bakterija počeo opadati i to u većem omjeru dodatkom bagremovog meda nego kestenovog meda. Broj bakterija u sojinom mlijeku bio je znatno niži, nakon dodatka obje vrste meda, nego u kravljem i kozjem mlijeku.
- Kod kravljeg mlijeka dodatak bagremovog meda je inhibirao test mikroorganizam, dok ga je dodatak kestenovog meda slabije inhibirao. Na kozje mlijeko dodatak meda gotovo da nije utjecao, pošto je ono i bez dodatka meda pokazalo jako inhibitorno djelovanje na odabranu patogenu bakteriju. Sojino mlijeko dodatkom meda povećalo je stupanj inhibicije na patogenu bakteriju *Yersinia enterocolitica* i to u većoj mjeri dodatkom kestenovog meda.

## **7. LITERATURA**

1. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Med> (2009-08-15)
2. J. Havranek, V. Rupić : Mlijeko od farme do mljekare. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2003.
3. Lj. Tratnik: Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
4. Narodne Novine : 102/2000. Pravilnik o kakvoći svježeg i sirovog mlijeka [http://www.poslovniforum.hr/poljoprivreda/zakoni\\_ml\\_pravilnik.asp](http://www.poslovniforum.hr/poljoprivreda/zakoni_ml_pravilnik.asp) (2009-08-15).
5. R. Božanić, Lj. Tratnik, I. Drgalić: Kozje mlijeko - karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* **52**, 207-237, 2002.
6. B. Mioč, V. Pavić : Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
7. M. A. Mehaia: The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk: Changes within milking and effects of a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* **67**, 1905-1913, 1984.
8. N. Antunac, D. Samardžija : Proizvodnja, sastav i osobine kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **50**, 53-66, 2002.
9. R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56**, 233-254, 2006.
10. I. Kovačević: Mogućnost proizvodnje fermentiranih napitaka na osnovi mješavine kravlje mlijeka i sojinog mlijeka. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet. Osijek, 1990.
11. <http://hrcak.srce.hr> (2009-08-16)
12. [http://www.Adventd.o.o.Proces\\_izrade\\_sojinog\\_mijeka.htm](http://www.Adventd.o.o.Proces_izrade_sojinog_mijeka.htm) (2009-08-17)
13. <http://www.prehrana-kretanje.hr/clanci/Probiotici%20i%20prebiotici.htm> (2009-08-16)
14. <http://www.nutricionizam.com/ARH/m460104.htm> (2009-08-15)
15. A. Y. Tamime, R. Božanić, I. Rogelj: Probiotički fermentirani mlječni proizvodi. *Mljekarstvo* **53**, 111-134, 2003.
16. Lj. Gregurek: Antimikrobnو и antimutagenno djelovanje probiotika. *Mljekarstvo* **49**, 255 – 260, 1999.
17. J. Šušković, B. Brkić, S. Matošić: Mechanizam probiotičkog djelovanja bakterija mlječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57 – 73, 1997.

18. J. Šušković, B. Kos, J. Frece, S. Matošić: Pozvano predavanje: Simbolički učinak bakterija mlijecne kiseline: Kritički pristup. Zbornik sažetaka. 35. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka. Lovran, 2002.
19. A. M. P. Gomes, F. X. Malcata: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Sci. Technol.* **10**, 139-157, 1999.
20. <http://www.plivazdravlje.hr> (2009-08-15)
21. K. D. Arunachalam: Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.* **19**, 1559-1597, 1999.
22. <http://www.enzymeindia.com/probiotic/bifidobacterium.asp> (2009-08-19)
23. [www.coolinarka.com/clanak/probiotici-dobre-bakterije](http://www.coolinarka.com/clanak/probiotici-dobre-bakterije) (2009-08-16)
24. <http://pdz.hr/viewtopic.php?t=336> (2009-08-16)
25. <http://www.pcelinjak.com/content/view/161/211/> (2009-08-17)
26. <http://proizvodi-pcelarstvo.hr/index.php/vrste-medica/18-kestenov-med.html> (2009-08-17)
27. <http://www.nytimes.com/2006/06/14/dining/14hone.html?fta=y> (2009-08-17)
28. <http://medicomnet.biz/> (2009-08-18)
29. <http://www.ehagroup.com/epidemiology/illnesses/images/> (2009-08-18)
30. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/> (2009-08-20)
31. [http://www.vef.hr/org/mbio/nastava/specijalna\\_mikrobiologija/ENTEROBAKT](http://www.vef.hr/org/mbio/nastava/specijalna_mikrobiologija/ENTEROBAKT) (2009-08-20)
32. S. Duraković: Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjeriing. Zagreb, 1996.