

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

**SENKA PRESEČAN**

**PREBIOTIČKI UČINAK MEDA I ANTAGONIZAM PROBIOTIČKE  
BAKTERIJE *Lactobacillus casei* PREMA *Listeria monocytogenes* TIJEKOM  
ČUVANJA FERMENTIRANIH MLJEKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, listopad 2010.**

## 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 mlječnih proizvoda

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

**Broj stranica:** 52

**Broj tablica:** 8

**Broj slika:** 37

**Broj literaturnih referenci:** 27

**Broj priloga:** 18

**Datum obrane:** 06. listopada 2010.

**Sastav povjerenstva za obranu:**

- |                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Dr. sc. Vinko Krstanović, doc.   | predsjednik Povjerenstva |
| 2. Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. | mentor – član            |
| 3. Dr sc. Vedran Slačanac, doc.     | komentor – član          |
| 4. Dr. sc. Jurislav Babić, doc.     | zamjena člana            |

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

**Predlagatelj teme dr. sc. Jovica Hardi, red, prof. imenovan je mentorom izrade diplomskog rada na III. Sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta, održanoj 26. svibnja 2008. godine, temeljem članka 62. Pravilnika o studiranju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.**

**Prof. dr. sc. Jovica Hardi, zbog iznimnog zalaganja i pomoći u osmišljavanju plana eksperimenta, te provedbi praktičnog dijela istraživanja dodijelio je docentu dr. sc. Vedranu Slačancu komentorstvo nad ovim radom.**

**PREBIOTIČKI UČINAK MEDA I ANTAGONIZAM PROBIOTIČKE BAKTERIJE  
*Lactobacillus casei* PREMA *Listeria monocytogenes* TIJEKOM ČUVANJA  
FERMENTIRANIH MLJEKA**

**Sažetak**

U radu je istražen utjecaj probiotičkih fermentiranih napitaka od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka sa dodatkom bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 2% i 5% prema patogenoj bakteriji *Listeria monocytogenes*. Za inokulaciju mlijeka korištena je monokultura *Lactobacillus casei*.

Praćena je promjena aktivne kiselosti, titracijske kiselosti, te promjena broja probiotičkih bakterija nakon 25 sati fermentacije (nulti dan), te tijekom 21 dana čuvanja. Utvrđen je povoljan utjecaj dodatka meda na brzinu fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka. Pri tome je utjecaj kestenovog meda bio izražajniji od bagremovog meda. 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 kestenovog meda, a pri tome je inhibicijski učinak jače bio izražen kod udjela meda od 5%.

Ključne riječi: kravlje, kozje i sojino mlijeko, *Lactobacillus casei*, med, *Listeria monocytogenes*, inhibicija

## PREBIOTIC EFFECT OF HONEY AND ANTAGONISTIC EFFECT OF *Lactobacillus casei* AGAINST *Listeria monocytogenes* DURING STORAGE OF FERMENTED MILKS

### **Summary**

Antagonistic effect of fermented cow's, goat's and soy milk with addition of acacia and chestnut honey (2 and 5%) against pathogen *Listeria monocytogenes* was examined. Milk was fermented by the use of *Lactobacillus casei*. Changes in pH values, titrable acidity and viable cells number were measured after 25 hours of fermentation, as well as during 21 days of storage. Addition of honey positively influenced on fermentation rate in cow's, goat's and soy milk. Chestnut honey stronger influenced to enhance of fermentation rate than chestnut honey. Probiotic beverage produced from goat's milk with acacia honey strongly inhibited the growth of *Listeria monocytogenes* compared with these of cow's and soy milk. Inhibitory potential was better expressed in the case of 5% of chestnut honey addition.

Keywords: cow's, goat's and soy milk, *Lactobacillus casei*, acacia and chestnut honey, *Listeria monocytogenes*, inhibition of the pathogen growth

*Zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji, posebno majci, na bezuvjetnoj potpori koju su mi pružali sve ove godine. Također želim zahvaliti svim prijateljima koji su vjerovali u mene, kroz sve moje uspone i padove.*

*Posebna zahvala mentoru, prof. dr. sc. Jovici Hardiju na predloženoj temi i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada, posvećenom vremenu i povjerenju.*

*Ovaj diplomski rad posvećujem pokojnom ocu.*

# SADRŽAJ

	Str.
<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	3
2.1. Kravljе mlijeko	4
2.1.1. Kemijski sastav kravljeg mlijeka	4
2.1.2. Fizikalna svojstva kravljeg mlijeka	5
2.1.3. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka	5
2.1.4. Prehrambena vrijednost kravljeg mlijeka	6
2.2. Kozje mlijeko	6
2.2.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka	7
2.2.2. Fizikalna svojstva kozjeg mlijeka	7
2.2.3. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka	8
2.2.4. Prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka	8
2.2.2. Usporedba sastava kozjeg i kravljeg mlijeka	8
2.3. Sojino mlijeko	9
2.3.1. Kemijski sastav sojinog mlijeka	10
2.3.2. Prehrambena vrijednost sojinog mlijeka	10
2.3.3. Razlike u sastavu kravljeg i sojinog mlijeka	10
2.4. Bakterije mliječne kiseline	12
2.4.1. Probiotici	12
2.4.2. Svojstva probiotičkih bakterija	13
2.5. Bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	14
2.5.1. <i>Lactobacillus casei</i>	14
2.6. Prebiotici	15
2.6.1. Med	15
2.6.2. Bagremov med	16
2.6.3. Kestenov med	17
2.7. Bakterije roda <i>Listeria</i>	18
2.7.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	18

<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	20
3.1. Zadatak rada	21
3.2. Materijal i metode rada	21
3.2.1. Priprava uzorka	21
3.2.2. Priprava Mueller Hinton agara	22
3.2.3. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala	23
3.2.4. Određivanje titracijske kiselosti	24
3.2.5. Priprava suspenzije bakterijskih stanica <i>Listeria Monocytogenes</i>	24
3.2.6. Određivanje broja probiotičkih bakterija	25
3.2.7. Određivanje inhibicije bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> različitim vrstama fermentiranih mlijeka	25
<b>4. REZULTATI</b>	27
4.1. Praćenje promjena fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom Čuvanja fermentiranog mlijeka	28
4.1.1. Promjene pH vrijednosti	28
4.1.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala	30
4.1.3. Promjene titracijske kiselosti	32
4.1.4. Promjena broja bakterija <i>Lactobacillus casei</i>	33
4.2. Rezultati određivanja stupnja inhibicije rasta test organizama <i>Listeria monocytogenes</i> fermentiranim proizvodima	35
<b>5. RASPRAVA</b>	38
5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom čuvanja	39
5.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom čuvanja	39
5.3. Promjene intenziteta zakiseljavanja (titracijske kiselosti) tijekom čuvanja	40
5.4. Promjena broja bakterija <i>Lactobacillus casei</i> tijekom čuvanja	41
5.5. Usporedba inhibicijske bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> fermentiranim kravljim, kozjim i sojinim mlijekom	42
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	43
<b>7. LITERATURA</b>	45
<b>8. PRILOZI</b>	47

# **1. UVOD**

Mlijeko i mliječni proizvodi zbog svoje iznimne nutritivne vrijednosti sastavni su dio svakodnevne ljudske prehrane. Širokom uporabom mlijeka, kao jedne od osnovnih namirnica, raste i potražnja za fermentiranim mliječnim napitcima. Oni svojim probiotičkim učinkom pozitivno utječe na nepravilnu prehranu, kronične bolesti, te izloženost prevelikom stresu. Osim terapijskih svojstava koji potječe od probiotičkih mikrobioloških kultura dobivenih kontroliranim procesom mliječno-kisele fermentacije, fermentirani mliječni proizvodi imaju karakterističan osvježavajući okus.

Probiotici kao kulture živih mikroorganizama, koji poboljšavaju svojstva autohtonih kultura, zaustavljaju množenje patogenih bakterija i sprječavaju njihovo djelovanje, te imaju pozitivno djelovanje na domaćina mijenjajući svojstva mikroflore probavnog sustava.

Prebiotici su neprobavljeni ugljikohidrati koji selektivnom stimulacijom rasta bakterija povoljno utječe na zdravlje domaćina. Dodaju se fermentiranim mliječnim proizvodima, kako bi se osiguralo dovoljno nutrijenata probiotičkim kulturama, ali i kao zaslađivači, te poboljšavaju okus i teksturu proizvoda. Dobra probiotička svojstva ima med koji djeluje baktericidno i antimikotično.

Sve veću pažnju prehrambenih tehnologa i mikrobiologa zaokuplja *Listeria monocytogenes*, zbog sposobnosti preživljavanja u okolišu s niskom pH vrijednosti, te uzrokovanja infekcija u ljudskom organizmu.

Cilj istraživanja u ovom radu je bio utvrditi prebiotički učinak bagremovog meda u udjelima od 2% i 5% i antagonizam probiotičke bakterije *Lactobacillus casei* prema razvoju *Listerije monocytogenes* tijekom četiri tjedna čuvanja fermentiranog kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.

Svrha rada bila je istražiti koja vrsta mlijeka fermentirana probiotičkim bakterijama uz dodatak meda ostvaruje veći inhibirajući učinak na odabranoj patogenu bakteriju tijekom 21 dan čuvanja.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. KRAVLJE MLJEKO**

Pod pojmom mlijeko podrazumijeva se kravlje mlijeko, dok se za sve ostale vrste mlijeka, kao i za proizvode, mora vrsta mlijeka deklarirati na ambalaži. Mlijeko je biološka tekućina složena sastava, karakterističnog okusa i mirisa, žućkasto bijele boje [1].

Sirovo mlijeko je prirodni sekret mlijecne žljezde, dobiveno redovitom i neprekidnom mužnjom jedne ili više zdravih muznih životinja, pravilno hranjenih i držanih, kojem nije ništa dodano niti oduzeto i nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C. Mora potjecati od muznih životinja najmanje 30 dana prije i više od 8 dana nakon poroda [2].

### **2.1.1. Kemijski sastav kravlje mlijeka**

Na kemijski sastav mlijeka utječu pasmina, individualne osobine svake jedinke, stadij laktacije, način hranidbe, zdravstveno stanje krave (posebice vimena). Sastav mlijeka tijekom laktacije gotovo se i ne mijenja, dok se tijekom 4 do 8 tjedana pred kraj laktacije postupno povećava udio masti, bjelančevina i mineralnih tvari, a udio laktoze se smanjuje [3].

Mlijeko se može smatrati emulzijom ili suspenzijom mlijecne masti u vodi u kojoj se nalazi niz otopljenih tvari (laktoza i topljive mineralne tvari u obliku soli), te tvari u koloidnom obliku [1].

Nutritivno gledano, mlijeko je najkompletnija i najizbalansiranija prehrambena namirnica. Po udjelu na tržištu najviše ima kravlje mlijeka, pa se ono uglavnom koristi u proizvodnji svih mlijecnih proizvoda. Iz tih razloga podrazumijeva se da je konzumno mlijeko kravlje [4].

**Tablica 1** Udio glavnih sastojala u svježem mlijeku [1]

<b>SASTOJAK</b>	<b>MASENI UDIO [%]</b>
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

**Proteini:** U mlijeku se od ukupnih dušičnih tvari nalazi 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 [1].

**Mliječna mast:** Sastojak nepromijenjenog udjela od 2,5 do 6,0%. Utječe na aromu, okus, konzistenciju i teksturu mliječnih proizvoda [1].

**Šećeri:** Laktoza, disaharid građen od  $\alpha$ -D-glukoze i  $\beta$ -D-galaktoze, prisutna je u udjelu 4,6 do 4,9%. Lako je probavljiva i potpomaže apsorpciju kalcija.

**Enzimi:** Prisutni enzimi u mlijeku su endogeni, potječu iz mliječne žljezde, te egzogeni, koji potječu iz mikroorganizama (ne smatraju se normalnim sastojcima mlijeka). Najzastupljeniji enzimi u mlijeku su: lipaza, fosfataza, peroksidaza, katalaza i proteinaza.

**Mineralne tvari:** U mlijeku se nalazi oko 40 različitih mineralnih tvari. Mikroelementi (Zn, Br, Al, Se, Fe, Mo, F i dr.) su prisutni u tragovima, a nalaze se u obliku anorganskih ili organskih soli od kojih su najvažnije kalcijeve i fosforne soli pošto ih ljudski organizam može dobro iskoristiti. Imaju fiziološku, biokemijsku i hranjivu važnost.

**Vitamini:** Od vitamina topljivih u mastima, u mlijeku se nalaze vitamini A, D, E i K, te vitamini B i C koji su topljni u vodi. Mlijeko je bogato vitaminima C, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> te vitaminom A koji može biti u obliku vitamina i njegova provitamina  $\beta$ -karotena koji daje žutu boju mlijeku [1].

### 2.1.2. Fizikalna svojstva kravlje mlijeka

Titracijska kiselost svježeg mlijeka: 6,5 do 7,5 °SH

Aktivna kiselost: 6,3 do 6,9 pH

Gustoća: 1,026 do 1,034 g/cm<sup>3</sup> pri 15 ili 20 °C

Viskoznost: 1,3 do  $2,2 \times 10^{-3}$  Pas pri 20 °C

Vrelište: oko 100,16 °C

Ledište: ovisi o koncentraciji otopljenih tvari, a kreće se od -0,520 do -0,535 °C [1].

### 2.1.3. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog kravlje mlijeka

Prema hrvatskim propisima mlijeko mora zadovoljiti sljedeće uvijete:

- da je pomuženo najmanje 30 dana prije i ne manje od 10 dana nakon teljenja;
- da ima karakterističan mliječni okus, miris i boju;

- da nema ostataka lijekova ili drugih štetnih tvari u udjelima koji mogu naškoditi zdravlju ljudi;
- da točka ledišta nije viša od  $-0,517\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a da je refrakcijski broj niži od 39 (da nema dodane vode);
- da sadrži najmanje 3,5% mlijecne masti;
- da sadrži najmanje 3,0% bjelančevina u suhoj tvari;
- da sadrži najmanje 8,5% suhe tvari bez masti;
- da mu je kiselinski stupanj od 6,6 do  $6,8\text{ }^{\circ}\text{SH}$ , a pH vrijednost od 6,5 do 6,7;
- da mu je rezultat alkoholne probe sa 7,2% etilnim alkoholom negativan [2].

#### **2.1.4. Prehrambena vrijednost kravlјeg mlijeka**

Svakodnevno konzumiranje mlijeka i mlijecnih proizvoda djeci osigurava dovoljno energije za rast i razvoj, te postizanje željene tjelesne mase, dok osobe starije dobi dobivaju esencijalne tvari potrebne za održavanje bazalnog metabolizma i zaštitu od kroničnih bolesti. Mlijeko u starosti smanjuje rizik od osteoporoze, visokog krvnog tlaka i karcinoma debelog crijeva.

Jedna litra svježeg mlijeka (u RH sa 3,9% mlijecne masti) sadrži jednaku količinu bjelančevina kao i 16 kriški kruha, 113 g sira, 176 g ribe ili 163 g mesa, dok joj je energetska vrijednost jednaka energetskoj vrijednosti 4 jaja, 18,5 g ječmenih pahuljica, 167 g šećera ili 660 g mesa [3].

## **2.2. KOZJE MLIJEKO**

Koze se u većini zemalja smatraju mlijecnim životinjama jer je njihov glavni proizvod mlijeko. Od davnina je smatrano proizvodom koji blagotvorno djeluje na zdravlje ljudi, a u novije vrijeme istraživači ukazuju na proizvodnju fermentiranih mlijecnih napitaka od kozjeg mlijeka koji su u usporedbi s kravlјim, veće nutritivne vrijednosti [4].

Postoje razlike u mlijecnosti među pojedinim pasminama, a unutar pasmine postoje razlike kako u količini proizvedenog mlijeka, tako i u njegovom kemijskom sastavu. Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih, pravilno uzgajanih i hranjenih životinja, tekućina je bijele boje, slatkastog okusa i karakterističnog mirisa (kozjeg) [5].

## **2.2.1. Kemijski sastav kozjeg mlijeka**

Hranjivu vrijednost mlijeka, kao i prikladnost za proizvodnju različitih mliječnih proizvoda određuju kemijski sastav i fizikalna svojstva.

**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 izgrađena je od 96,8% triglicerida. Promjer čestica u kozjem mlijeku je 3 do 4  $\mu\text{m}$  što daje veću stabilnost emulzije mliječne masti u mlijeku i osigurava bolju probavljivost, zbog veće dodirne površine s enzimima.

**Šećeri:** Glavni ugljikohidrat u kozjem mlijeku je laktoza, koja je glavni izvor hrane za mliječno-kisele bakterije. Udio laktoze u kozjem mlijeku je sličan kao onaj u kravljem.

**Mineralne soli:** Kozje mlijeko ima 9,8% mineralnih soli, koje se nalaze u molekularnom, ionskom i koloidnom obliku, a mogu biti topljive ili netopljive u mlijeku. Od makroelemenata najzastupljeniji su Ca i P. U mlijeku se javlja i 26 mikroelemenata koji imaju nutricionistički, biokemijski i fiziološki značaj. Mikroelementi se nalaze uglavnom u tragovima (Zn, Br, Se, Al, Fe, Cu, F, Sr, Mo, Ti, Li, Co).

**Vitamini:** U kozjem mlijeku su prisutni vitamini B skupine ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_5$ ,  $B_6$ ,  $B_8$ ,  $B_9$ ,  $B_{12}$ ) i C koji su topljni u vodi, te vitamine A, D, E i K koji su topljni u mastima. Prisutna je nikotinska kiselina i tiamin. Količina vitamina u mlijeku ovisi o mnogim čimbenicima.

**Voda:** Može se nalaziti u vezanom ili slobodnom obliku. Vezana voda je adsorbirana na kazein (oko 50%), na globulin i albumin (oko 30%), na membrane masnih globula (oko 15%), te na laktozu i ostale sastojke (5%) [6].

## **2.2.2. Fizikalna svojstva kozjeg mlijeka**

**Prirodna kiselost:** Uvjetuje ju kazein, kiseli fosfati, citrati, albumin, globulin i  $\text{CO}_2$ .

**Titracijska kiselost:** Ukupna prirodna kiselost i naknadno nastala kiselost izražena u  $^\circ\text{SH}$ .

**Aktualna kiselost:** Kod kozjeg mlijeka kreće se od 6,3 do 6,7 pH.

**Viskoznost:** Na viskoznost utječe stanje bjelančevina, masti, temperature itd. Povećanje udjela ukupne suhe tvari utječe na povećanje viskoznosti. Viskoznost kozjeg mlijeka iznosi od 1,8 do 2,2 cP.

**Specifična masa:** Ovisi o udjelu vode, masti, proteina, lakoze i soli, a iznosi  $1,032 \text{ g cm}^{-3}$  [1].

### **2.2.3. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog kozjeg mlijeka**

Prema hrvatskim propisima kozje mlijeko mora uđovoljavati sljedećim zahtjevima kakvoće:

- da točka ledišta nije viša od -0,540 °C;
- da sadrži najmanje 2,8% mlijecne masti;
- da mu je gustoća 1,024 do 1,040 g cm<sup>-3</sup> na temperaturi od 20 °C;
- da sadrži najmanje 2,5% bjelančevina;
- da sadrži najmanje 7,5% suhe tvari bez masti;
- da mu je kiselinski stupanj od 6,5 do 8,0 °SH, a pH vrijednost od 6,4 do 6,7 [2].

### **2.2.4. Prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka**

Obzirom na sastav, mogućnost resorpcije i iskorištenja u ljudskom organizmu, prehrambene, biološke i terapeutske vrijednosti kozjeg mlijeka kao namirnice, iznimno su značajne. Prehrambena vrijednost kozjeg mlijeka određena je njegovim kemijskim sastavom i fizikalnim svojstvima.

Litra kozjeg mlijeka sadrži oko 32 g bjelančevina, što je 70% od ukupnih dnevnih potreba (46 g) trudnice ili majke doilje, a potpuno zadovoljava potrebe djeteta do 11 godina. Količina kalcija u jednoj litri kozjeg mlijeka dostatna je za podmirenje dnevnih potreba odraslog čovjeka [5].

### **2.2.5. Usporedba sastava kravlјeg i kozjeg mlijeka**

Fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva mlijeka određuje njegov sastav, kao i njegovu prehrambenu vrijednost i prikladnost za preradu u mlijecne proizvode. Kravlje i kozje mlijeko slični su po kemijskom sastavu, iako kozje mlijeko obiluje većim udjelom bjelančevina te većom varijabilnošću fizikalnih svojstava i kemijskog sastava. Uspoređujući nutritivnu vrijednost, najznačajnija razlika kravlјeg i kozjeg mlijeka je u sastavu masnih kiselina. Kozje mlijeko sadrži znatno više nisko i srednjelančanih masnih kiselina (C<sub>4:0</sub>; C<sub>10:0</sub>) koje su probavljivije u usporedbi s dugolančanim [7,8]. U kozjem mlijeku su masne kapljice manjeg promjera i bolje raspršene od masnih kapljica u kravljem mlijeku, što čini emulziju masti u kozjem mlijeku stabilnijom. Veća kontaktna površina masnih kapljica kod kozjeg mlijeka omogućava lakši kontakt s enzimima probavnog sustava, što povećava probavljivost kozjeg, u usporedbi s kravlјim mlijekom. Smatra se da je kozje mlijeko 2,5 puta probavljivije od kravlјeg jer uz manji promjer masnih kapljica ima i veći udio esencijalnih aminokiselina, vitamina A i D, nikotinske kiseline, topljivog Ca, Mg,

Anorganskog P i Fe, lakše probavljivih frakcija proteina, neproteinskog dušika, te manji udio kazeina i manji promjer micela [1].

**Tablica 2** Sastav, svojstva i energijska vrijednost kravljeg i kozjeg mlijeka [4]

HRANJIVE TVARI	KRAVLJE MLIJEKO	KOZJE MLIJEKO
Suha tvar (%)	12,89	11,94
Mliječna mast (%)	4,10	3,60
Proteini (%)	3,38	3,10
Laktoza (%)	4,60	4,60
Mineralne tvari (%)	0,79	0,77
Gustoća ( $\text{gL}^{-1}$ )	1029,40	1030,10
pH vrijednost	6,68	6,72
Titracijska kiselost ( $^{\circ}\text{SH}$ )	6,70	6,80
Slobodne masne kiseline ( $\text{mgL}^{-1}$ )	7,50	8,10
Energijska vrijednost (kJ/100 mL)	288,90	293,10

Kozje mlijeko sadrži i znatno veći udio (20%) hlapljivih masnih kiselina (kapronska, kaprilna, kaprinska) u usporedbi s 12% u kravljem mlijeku [9], a karakterističan okus kozjem mlijeku daje frakcija slobodnih masnih kiselina unutar lipida (kapronska, izokapronska, kaprilna, kaprinska).

### 2.3. SOJINO MLIJEKO

Zbog svojih izvanrednih nutritivnih i zdravstvenih karakteristika, soja je sve interesantnija namirnica populaciji koja ne može konzumirati kravljje mlijeko zbog alergija na proteine mlijeka, laktoze ili zbog uvjerenja ne konzumiranja namirnica životinjskog porijekla. Fermentacijom sojinog mlijeka bakterijama mliječne kiseline znatno se povećava zdravstvena vrijednost namirnice [10]. 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. Sirov, graškast okus, najveći je nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka, a taj nepoželjni okus potječe od nepoželjnih aldehida i ketona. Tih sastojaka nema u neoštećenom sojinom zrnu, ali nastaju trenutačno kad se zrno namače i melje [11].

### **2.3.1. Kemijski sastav sojinog mlijeka**

Bez dodataka, sojino mlijeko je izvrstan izvor visokovrijednih proteina, vitamina i minerala, izvor kalcija, vitamina D i B<sub>12</sub>. Nema kolesterola niti laktoze i ima vrlo niski sadržaj zasićenih masti (0,34%) [11].

**Tablica 3** Sastav sojinog mlijeka [11]

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

### **2.3.2. Prehrambena vrijednost sojinog mlijeka**

Proteini, koji se nalaze u sojinom mlijeku, sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za zdravu prehranu čovjeka, prikladno za gotovo svačiju prehranu s obzirom da ne sadrži kolesterol niti laktozu. Uz smanjenje kolesterola u krvi, sojino mlijeko ublažava simptome menopauze, umanjuje rizik oboljenja od raznih bolesti (karcinoma, osteoporoze, žučnog kamenca), a čak se istražuje mogućnost poboljšavanja stanja bolesnika oboljelih od Alzheimerove bolesti i AIDS-a [11].

### **2.3.3. Razlike u sastavu kravljeg i sojinog mlijeka**

Osim visokog udjela visokovrijednih proteina, sojino i kravljje mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih svojstava. Sojino mlijeko obično sadrži više vode od kravljeg mlijeka, a i ostali sastojci se znatno razlikuju. Proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein, dok proteine sojinog mlijeka čini pretežno glicinin i u manjoj mjeri neke druge proteinske frakcije. Poznata manja sojinog mlijeka je nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor, kao što su cistin i metionin. Ugljikohidrati u kravljem mlijeku su isključivo u obliku laktoze, dok su u sojinom mlijeku oligosaharidi stahioza i rafinoza. Iako kravljje mlijeko sadrži znatno više kalcija i fosfora, ono je vrlo siromašno željezom (oko 1 mgL<sup>-1</sup>). Sojino mlijeko sadrži oko deset puta veću količinu

željeza s obzirom na kravlje, ali je njegova bioiskoristivost manja zbog prisutnih fitata koji vežu mineralne tvari [11].

**Tablica 4** Usporedba sastava sojinog i kravljeg mlijeka [11]

SASTOJAK	KRAVLJE MLIJEKO	SOJINO MLIJEKO
Proteini (%)	3,4	3,6
Masti (%)	3,5	2,3
Ugljikohidrati (%)	4,6	3,4
kJ/100 g	269,0	204,0
kcal/100 g	64,0	49,0
Kolesterol (mg/L)	10,0	0,0

Oba mlijeka sadrže veliki udio proteina s kompletnim rasponom potrebnih aminokiselina, ali sojino mlijeko sadrži veće količine arginina, alanina, glicina i asparaginske kiseline. Procesima prerade i pasterizacije uništava se gotovo sav vitamin C u kravljem mlijeku. Isto se može reći i za sojino, ali ono sadrži preko četiri puta više tiamina (vitamin B<sub>1</sub>) i skoro dva puta više niacina od kravljeg mlijeka. Tako visok sadržaj vrijednih nutrijenata daje sojinom mlijeku, u zdravstvenom smislu, neke prednosti nad kravljim mlijekom.

**Tablica 5** Hranjiva vrijednost sojinog i kravljeg mlijeka [11]

PARAMETAR	SOJINO MLIJEKO	KRAVLJE MLIJEKO
Biološka vrijednost (%)	80	87
Probavljivost (%)	95	91
Neto proteinsko iskorištenje (%)	76	79

Sličnost sojinog i kravljeg mlijeko je u tome 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. Potpuno je uspješna zamjena kravljeg mlijeka sojinim kako u nutritivnom, tako i u fiziološkom smislu. Velik broj ljudi, posebice djece, u današnje vrijeme alergično je na kravje mlijeko, te se sojino mlijeko prvenstveno koristi kao zamjena za kravje.

## **2.4. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE**

U mljekarstvu se mikrobne starter kulture mogu koristiti kao pojedinačne (monokulture) i kao mješovite kulture, a mogu biti u različitom obliku:

- tekuće kulture;
- duboko zamrznute, koncentrirane kulture;
- zamrznute, osušene, koncentrirane kulture u obliku praha (liofilizirane);
- duboko zamrznute, vrlo koncentrirane kulture u lakotopljivom obliku.

Obzirom na optimalnu temperaturu rasta, bakterije mliječne kiseline možemo podijeliti na mezoofilne (20 do 30 °C) i termofilne (37 do 45 °C). Posebnu skupinu predstavljaju terapijske bakterije mliječne kiseline (37 do 40 °C) izolirane iz probavnog sustava ljudi i životinja. Probiotičke kulture za proizvodnju fermentiranih napitaka sastavljene su od pojedinih vrsta bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium*, izoliranih iz probavnog sustava ljudi [1].

U sastavu mikrobnih kultura za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka nalaze se odabrane vrste i sojevi bakterija mliječne kiseline. Njihova svojstva utječu na svojstva pojedinog fermentiranog napitka. Parametri fermentacije (temperatura i trajanje) određuju se prema vrsti primjenjene starter kulture, moraju biti optimalni sa ciljem postizanja željenih svojstava fermentiranog mliječnog napitka: povoljna sezonska i što bolja prehrambena, dijetetska i terapeutska svojstva. Provedbom kontrolirane fermentacije potrebno je osigurati pravilno odvijanje biokemijskih procesa [12].

### **2.4.1. Probiotici**

Probiotik se može definirati kao jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koji primjenjeni kod ljudi i životinja djeluju vrlo korisno, poboljšavajući svojstva autohtonih kultura crijevne mikroflore domaćina. Izraz probiotik odnosi se na proizvode koji sadrže žive mikroorganizme, poboljšavaju zdravstveno stanje ljudi i životinja, te mogu djelovati u ustima ili u probavnom sustavu (u hrani ili u obliku kapsula), u gornjem respiratornom sustavu (aerosol) ili u urogenitalnom sustavu (lokalna primjena).

Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama, promjena mikrobnog metabolizma u probavnom sustavu i stimulacija imuno-sustava su načini na koje probiotik može djelovati. Najčešći probiotici su bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije [13].

Smatra se da fermentirani mliječni proizvod mora sadržavati minimalno  $10^6$  živih stanica u 1 mL da bi imao terapijska svojstva. Duljim unosom većeg broja živih bakterija mliječne kiseline u ljudski organizam, osobito onih bakterija izoliranih iz probavnog sustava, može se očekivati pozitivan učinak na zdravlje [1].

#### **2.4.2. Svojstva probiotičkih bakterija**

Probiotičko djelovanje mliječno kiselih bakterija može se iskazati različitim mehanizmima djelovanja prema patogenim mikroorganizmima u intestinalnom traktu:

1. Smanjenjem broja živih bakterija: proizvodnjom antibakterijskih supstanci (bakteriocina); natjecanjem za hranjiva; natjecanjem za mjesta vezanja na crijevnoj epitelnoj površini.
2. Izmjenom metabolizma mikroorganizama: povećanjem ili smanjenjem enzimske aktivnosti.
3. Stimuliranjem imunološkog sustava: povećanjem razine antitijela; povećanjem mikrofagne aktivnosti.

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 intracelularni pH.

Pri vezivanju na crijevne stanice, probiotičke bakterije djeluju pozitivno u dva smjera: natječu se i oduzimaju ugljikohidratno hranjivo, te oduzimaju mjesto vezivanja patogenim mokroorganizmima.

Bitno svojstvo mliječno-kiselih bakterija je proizvodnja specifičnih inhibicijskih supstanci, kao što su bakteriocini. Bakteriocini su ekstracelularni spojevi, djelotvorni prema sojevima iste ili srodne vrste. Na pojedine patogene mikroorganizme, ovi spojevi djeluju inhibitorno na različite načine [14].

## 2.5. BAKTERIJE RODA *Lactobacillus*

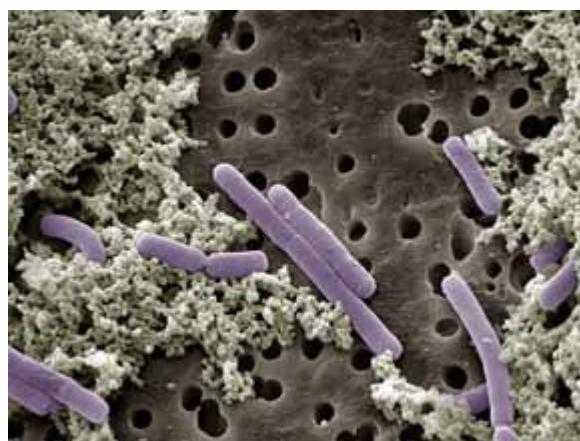
*Lactobacillus* su Gram pozitivne, asporogene, mikroaerofilne do fakultativno anaerobne, pokretne ili nepokretne, štapićaste bakterije. Ovisno od same vrste, mogu rasti u temperaturnom rasponu od 2 do 53 °C, dok je optimalna temperatura rasta od 30 do 40 °C, pri pH vrijednosti od 3 do 7. Fermentirajući šećere stvaraju znatne količine mliječne kiseline pa se zbog toga koriste u proizvodnji mljekarskih proizvoda. Vrste roda *Lactobacillus* koriste se kao starter kulture za proizvodnju mliječno fermentiranih napitaka (L. acidophilus, L. lactis, L. casei, L. debrueckii) [15].

Laktobacili se obzirom na metabolizam mogu podijeliti u tri skupine:

1. skupina: obligatni homofermentativi (L. acidophilus, L. debrueckii, L. helveticus, L. sailvarius);
2. supina: fakultativni heterofermentativi (L. casei, L. curvatus, L. plantarum, L. sakei);
3. skupina: obligatni heterofermentativi (L. brevis, L. buchneri, L. fermentum, L. reuteri) [16].

### 2.5.1. *Lactobacillus casei*

*Lactobacillus casei* su gram pozitivne, fakultativno anaerobne, nepokretne i nesporogene štapićaste bakterije. Industrijski su važne mliječno kisele bakterije, otporne su na kiselinu, ne mogu sintetizirati porfirine i posjeduju strogo fermentativan metabolizam s mliječnom kiselinom kao glavnim metaboličkim proizvodom.



Slika 1 *Lactobacillus casei* [17]

*L. casei* čini dio fakultativno fermentativnog ogranka koji proizvodi mlijecnu kiselinu preko Embden-Mayerhof-ovog puta i od pentoza preko fosfoketolaznog puta.

Rastu na temperaturi od 15 °C, ali ne i na 45 °C. Kao činioci rasta potrebna im je folna kiselina i niacin. Prilično su prilagodljiva vrsta, mogu se izolirati iz sirovih i fermentiranih proizvoda, svježih i fermentiranih biljnih proizvoda, te reproduktivnog i intestinalnog trakta ljudi i životinja. *L. casei* se primjenjuje kao probiotik, kao starter kultura kod proizvodnje mlijecne kiseline, te kao specijalne kulture za pojačanje i ubrzanje razvoja okusa pri zrenju nekih sireva [16].

## 2.6. PREBIOTICI

Prebiotike možemo definirati kao neprobavljive sastojke hrane koji povoljno utječu na domaćina selektivnom stimulacijom rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu, što poboljšava zdravlje domaćina [14].

Ljudsko debelo crijevo sadrži veliku koncentraciju bakterija ( $10^{12}$  bakterija/g suhe tvari sadržaja debelog crijeva), a bifidobakterije i laktobacili su najbrojnije uobičajene anaerobne bakterije u mikroflori ljudskog debelog crijeva [4].

Da bi spoj bio klasificiran kao prebiotik mora zadovoljavati sljedeće uvijete:

- da se ne hidrolizira, ni apsorbira u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava;
- da selektivno stimulira rast potencijalno korisnih bakterija u debelom crijevu;
- da sprječava rast patogena i virulenciju (zaravnost), inducirajući sistemske učinke koji mogu koristiti zdravlju [4].

Prebiotici stižu u debelo crijevo nepromijenjeni i tamo podliježu potpunoj fermentaciji djelovanjem bakterija. Anaerobnom fermentacijom prebiotika dolazi do sniženja pH vrijednosti u debelom crijevu. Proizvodi anaerobne fermentacije su bakterijska biomasa, plinovi te kratkolančane masne kiseline (octena, maslačna, propionska i mlijecna) koje imaju brojne pozitivne utjecaje na zdravlje čovjeka [18].

### 2.6.1. Med

Med je izvanredna namirnica izuzetne hranjive vrijednosti, namirnica koja je prirodna i još se uvek nikakvim industrijskim putem ne može stvoriti niti dotjerivati. Svako i najmanje dodavanje nekog sredstva medu narušava njegova svojstva.

U kemijskom pogledu med predstavlja složenu smjesu raznih djelotvornih tvari, koje se u ljudskom organizmu vrlo dobro i brzo probave te se gotovo u potpunosti iskorištavaju. Bogat je raznim ljekovitim tvarima, a ima svojstva koja mu daju prednost pred svim ostalim namirnicama. Med je sastavljen od raznih šećera (do 76%), vode (oko 18%), i drugih tvari (oko 6%), koje su uzrok različitosti između pojedinih vrsta meda, a daju medu specifičnu boju, miris i okus. Te se tvari u medu nalaze u malim udjelima, a to su: minerali (Ca, Fe, Mg, Mn, K, Na, P, Cu, Co,...) vitamini, enzimi, hormoni, inhibini, organske kiseline (mravlja, jabučna, limunska, jantarna i dr.), bjelančevine i flavonoidi.

Med ima mnogobrojna ljekovita svojstva: jača imunološki sustav, ima antibakterijsko i fungicidno djelovanje, protuupalno i antialergijsko djelovanje, poboljšava rad metaboličkog sustava, potiče umnu i fizičku aktivnost, ima diuretsko djelovanje, pomaže kod slabokrvnosti, stimulira rad srca, djeluje antiseptički pa se koristi kod zacjeljivanja rana, u liječenju akni i opeketina. Poboljšava apsorpciju pojedinih tvari u organizmu (vitamini, minerali, lijekovi..), ima sedativno djelovanje, upotrebljava se kod ginekoloških problema, PMS-a i jutarnjih mučnina, bolesti respiratornog sustava (kronični bronhitis, bronhialna astma, rinitis, alergijski rinitis, sinusitis, laringitis). Preporuča se sportašima zbog brzog izvora energije i stimulacije rada srca, kod umora, iscrpljenosti, anoreksije ili gubitka apetita. Normalizira peristaltiku crijeva, uklanja opstipaciju i liječi hemeroide. Koristi se i kod liječenja gastritisa, čira na želucu, dvanaesniku i crijevnih infekcija, smanjuje lučenje želučane kiseline, za liječenje i detoksifikaciju jetre [19].

Boja, okus i miris meda osnovna su organoleptička svojstva koja ovise o biljnom podrijetlu meda, uvjetima čuvanja i prerade, a potječe od sastojaka koje je nektar dobio od biljaka sa kojih je sakupljen. Pretjeranim grijanjem meda, on gubi svoja organoleptička svojstva, boja potamni, okus se pogorša, a fina aroma nestaje, stoga pčelari moraju jako paziti kod zagrijavanja meda, bilo kod sprječavanja kristalizacije ili otapanja već kristaliziranog meda, da ga ne zagriju na temperaturu višu od 55 °C [19].

## 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 najcenjenije vrste meda. Pomaže kod nesanice, umiruje previše nadraženi živčani sustav i otklanja posljedice nagomilanog stresa.



Slika 2 Bagremov med [20]

Mjesecima ostaje u tekućem stanju i jedan je od vrsti meda koji vrlo sporo kristalizira zbog toga što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Same pčele dobro i uspješno prezimljuju ukoliko im se osigura zimovanje na bagremovom medu.

Obilnih bagremovih paša za pčele nalazimo gotovo u svim kopnenim krajevima Hrvatske u kojima je nekad sađen ili se proširio prirodnim putem kao vrlo prilagodljiva biljka [20].

### 2.6.3. Kestenov med

Med kestena je taman, crvenkasto smeđe do smeđe boje, boja mu varira ovisno o podneblju i godini, prepoznatljivog mirisa i izrazito karakterističnog pomalo gorkog okusa, ali vrlo ljekovit. Snagom svojih osebujnih svojstava 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 sl. [21].



Slika 3 Kestenov med [22]

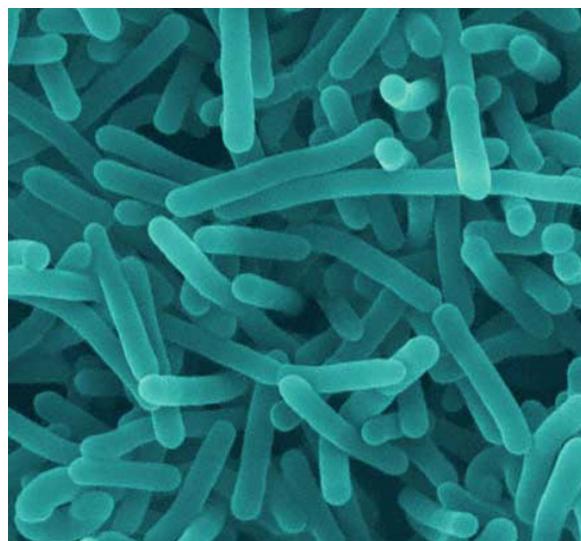
## 2.7. BAKTERIJE RODA *Listeria*

Bakterije roda *Listeria* pripadaju skupini nesporogenih, Gram pozitivnih štapića, koje su podijeljene u sedam vrsta: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi* i *Listeria murray* [23].

### 2.7.1. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* su G (+), mikroaerofilni do aerobni, asporogeni, pokretni štapići. Ne sadrži kapsulu i ima tendenciju formiranja lanaca. Raste na temperaturama od 1 do 45 °C. Optimalna temperatura rasta je između 30 i 37 °C, a pH vrijednost između 6 do 9. Pripada skupini halofila, dobro podnosi niski pH te mlijeko-kisele starter kulture [23]. Od svih vrsta roda *Listeria*, *L. monocytogenes* se najčešće veže uz infekcije ljudi.

U posljednjih 40-ak godina izolirana je iz mnogih izvora, te je njena prisutnost ustanovljena u probavnom sustavu od 5% do 10% ljudi, kod kojih ne uzrokuje nikakve simptome bolesti. Osim što je može izolirati iz tla, trule vegetacije, silaže, vode i kanalizacije, pronađena je u sirovoj i obrađenoj hrani: mlijeku i mlijecnim proizvodima, mesu, povrću i morskoj hrani [24].



**Slika 4** *Listeria monocytogenes* [25]

Ova bakterija primarno uzrokuje infekcije maternice, meningitis i septikemiju. Kod trudnica listerioza se očituje kao teška sistemska infekcija ploda ili novorođenčeta, dok su kod žene simptomi blagi poput gripe. Infekcija trudnica može se dogoditi u bilo kojem stadiju trudnoće. Kod odraslih i starije djece, listerioza se uglavnom očituje kao sistemska infekcija središnjeg

živčanog sustava i/ili septikemija. Ukoliko se dijagnosticira u ranoj fazi, antibiotici u trudnica i imunokompromitiranih osoba mogu spriječiti pojavu ozbiljnih posljedica bolesti. Kontaminirana hrana smatra se glavnim putem prijenosa ove bakterije u ljudski organizam. Oslabljen imuniloški sustav smatra se glavnim uzrokom ove bolesti, ali također i starija životna dob je značajan čimbenik u pojavi infekcije.

Tijekom posljednjih desetljeća, razvijen je koncept minimalno procesiranih namirnica, čija se održivost oslanja na hlađenje i sastojke same namirnice kao zapreke u zaštiti od kontaminacije i razmnožavanja nepoželjnih mikroorganizama. Pošto *Listeria monocytogenes* može rasti i pri temperaturi hladnjaka, potrebna je iznimna pozornost u sprječavanju unošenja ove bakterije u namirnice koje se konzerviraju minimalnim procesiranjem.

Po nekim istraživanjima, nakon salmoneloze i kampilobakterioze, ovo je treći bakterijski uzročnik infekcije patogenim i propatogenim bakterijama iz namirnica.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. ZADATAK RADA**

Zadatak rada bio je pratiti promjene tijekom fermentacije kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, te utvrditi inhibitorni utjecaj na bakteriju vrste *Listeria Monocytogenes*.

U fermentiranom mlijeku odrediti potencijalnu i aktivnu kiselost, te promjenu broja probiotičkih bakterija tijekom fermentacije. Analize i mjerjenja provesti nakon 25 sati fermentacije (nulti dan), te tijekom čuvanja 7. dan, 14. i 21. dan.

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

#### **3.2.1. Priprava uzorka**

Za pripremu probiotičkih napitaka (fermentiranih monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01) korišteno je kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano kravje mlijeko s 2,8 % mlječne masti (proizvođač: Vindija Varaždin), kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano kozje mlijeko s 3,2 % mlječne masti (proizvođač: Vindija Varaždin), te sojino mlijeko s 2,2 % masti, bez šećera i soli (proizvođač: Alpro Soya, Belgija).

Za inokulaciju mlijeka korištena je liofilizirana komercijalna DVS kultura *Lactobacillus casei* Lc-01 proizvođača Laboratorij Christian Hansen, Copenhagen, Danska. Za inokulaciju je korišteno 0,6 g/200 ml uzorka (0,3% inokuluma).

Kao probiotički dodatak u sve tri vrste mlijeka korišteni su kestenov i bagremov med (proizvođač Apimel, Osijek) u udjelima od 2 % (4 g/200 ml) i 5 % (10 g/200 ml). Odvagani med se dodavao

u svaki uzorak mlijeka, te su se uzorci zagrijali na temperaturu nacjepljivanja bakterija mlječne kiseline ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Nakon zagrijavanja, uzorci su nacjepljeni kulturom bakterija mlječne kiseline i inkubirani u termostatu na  $37^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 25 sati. Od svih vrsta mlijeka fermentirane su i slijepe probe (mlijeko bez dodatka meda).



**Slika 5** Vaganje meda u sterilnim uvjetima

### 3.2.2. Priprava Mueller Hinton agar-a

Mueller Hinton agar se izvaže, prenese u boce sa čepom, rastopi dodatkom destilirane vode, te zagrijava u mikrovalnoj pećnici uz povremeno mučkanje i otvaranje čepa boce da se ispusti para i kako ne bi došlo do puknuća boce.



Slika 6 Priprema agar-a

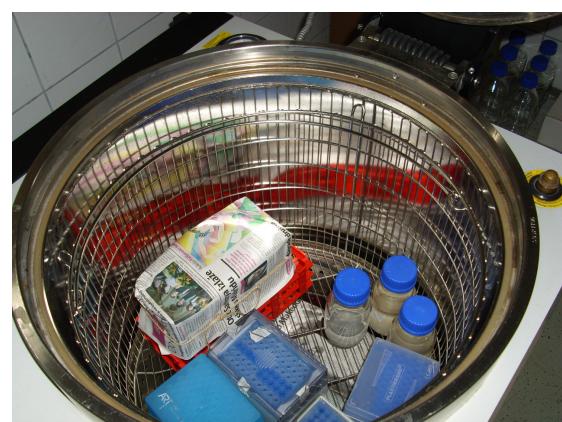


Slika 7 Zagrijavanje agar-a u mikrovalnoj pećnici

Nakon što se agar dobro rastopio razlije se u odgovarajući broj epruveta po 10 ml, zatim se sterilizira u autoklavu na 121 °C, 15 minuta.



Slika 8 Ulijevanje agar-a u epruvete



Slika 9 Sterilizacija u autoklavu agar-a u epruvetama i tipseva za pipetiranje

Prije upotrebe agar se otopi u vodenoj kupelji (100 °C), ohladi na 45 °C do 50 °C, dobro promučka te se nakon dodatka patogene kulture raspodjele u sterilne Petrijeve zdjelice.



**Slika 10** Zagrijavanje steriliziranog agaru u vodenoj kupelji na 100 °C



**Slika 11** Održavanje agar u tekućem stanju

### 3.2.3. Određivanje aktivne kiselosti i elektrokemijskog potencijala

Kiselost uzorka je određivana kao aktivna i titracijska kiselost. Aktivna kiselost mjerena je pH-metrom Mettler Toledo, MA 235, pH/Ion Analyzer. Uranjanjem elektrode pH-metra u ispitivani uzorak nastaje elektrolitski most koji omogućava mjerjenje. Prije mjerjenja pH-metar je baždaren puferima poznate pH vrijednosti. Nakon uranjanja elektrode u uzorak, na uređaju su očitane vrijednosti pH i elektrokemijskog potencijala (mV).



**Slika 12** Uzimanje uzorka za mjerjenje pH vrijednosti u sterilnim uvjetima



**Slika 13** Mjerjenje pH uzorka

### 3.2.4. Određivanje titracijske kiselosti

Za određivanje tutraacijske kiselosti korištena je metoda po Soxhlet-Henkelu. U Erlenmayerovu tivku od 100 ml dodano je 10 ml fermentiranog mlijecnog napitka i razrijeđeno dodatkom 10 ml destilirane vode. Dodano je 2 ml otopine fenoftaleina i titrirano s  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  otopinom NaOH do pojave ružičaste boje.

Kiselost je prema ovoj metodi izračunata prema formuli:  ${}^{\circ}\text{SH} = a \cdot F \cdot 4$

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

**a** – broj ml  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  otopine NaOH utrošenih na neutralizaciju 10 g uzorka

**F** – faktor molariteta  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  otopine NaOH.

### 3.2.5. Priprava suspenzije bakterijskih stanica *Listeria Monocytogenes*

Za ispitivanje inhibitornog učinka fermentiranog mlijeka odabrana je bakterija vrste *Listeria monocytogenes*. Čista kultura bakterije uzgojena je na kosom Tryptic Glucose Yeast Agaru (TGK, Biolife, Italija) tijekom 24 sata na  $37^{\circ}\text{C}$ . Prije ispitivanja stupnja inhibicije, čista kultura je regenerirana svakodnevnim precjepljivanjem na kosi TGK agar i inkubirana 24 sata na  $37^{\circ}\text{C}$ , te je pripremljena suspenzija bakterijskih stanica. Mikrobiološkom ušicom prenesen je uzgoj bakterije u epruvetu sa sterilnom fiziološkom otopinom i homogeniziran. Usporedbom s McFarlandovim standardom 0,5 kontroliran je broj stanica, a pored toga, suspenzija je kontrolirana i fotometrijski (625 nm) [26].



**Slika 14** Dodavanje fiziološke otopine za razrjeđenje suspenzije



**Slika 15** Suspenzije patogene bakterije *Listeria monocytogenes*

### 3.2.6. 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 inokulum u Petrijevu zdjelicu u koju je uliven rastopljen i na 45 °C ohlađen Mueller Hinton agar (Merck, Njemačka). Nakon homogenizacije inokuluma i podloge, Petrijeve zdjelice su inkubirane tri dana u termostatu na 37 °C.

Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije bakterije *Lactobacillus casei* i izračunat je broj bakterija u 1 ml proizvoda, CFU (Colony Forming Units / broj živih stanica) prema formuli [26]:

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

### 3.2.7. Određivanje inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* različitim vrstama fermentiranih mlijeka

Za određivanje stupnja inhibicije korišten je Mueller Hinton agar (MH agar, Merck, Njemačka). MH agar je standardni agar za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. U sterilnu Petrijevu zdjelicu preneseno je 10 ml sterilnog MH agara u koji je potom uliveno 10 ml MH agara (nacjepljenog s 1 ml suspenzije  $10^8$  stanica / ml). Podloga je homogenizirana i ohlađena do skrutnjavanja.



Slika 16 Nacjepljivanje agara patogenom bakterijom u sterilnim uvjetima



Slika 17 Homogenizacija uzorka (agar + patogena bakterija)

Nakon skrutnjavanja, u agaru su sterilnim bušačem čepova izbušene tri rupe promjera 9 mm koje su, nakon vađenja agara sterilnom pincetom, ispunjene sa 150 µl fermentiranog napitka.



**Slika 18** Bušenje rupa u agaru za nacjepljivanje uzorka



**Slika 19** Uzimanje uzoraka (pipetom) za nacjepljivanje



**Slika 20** Nacjepljivanje agara uzorkom



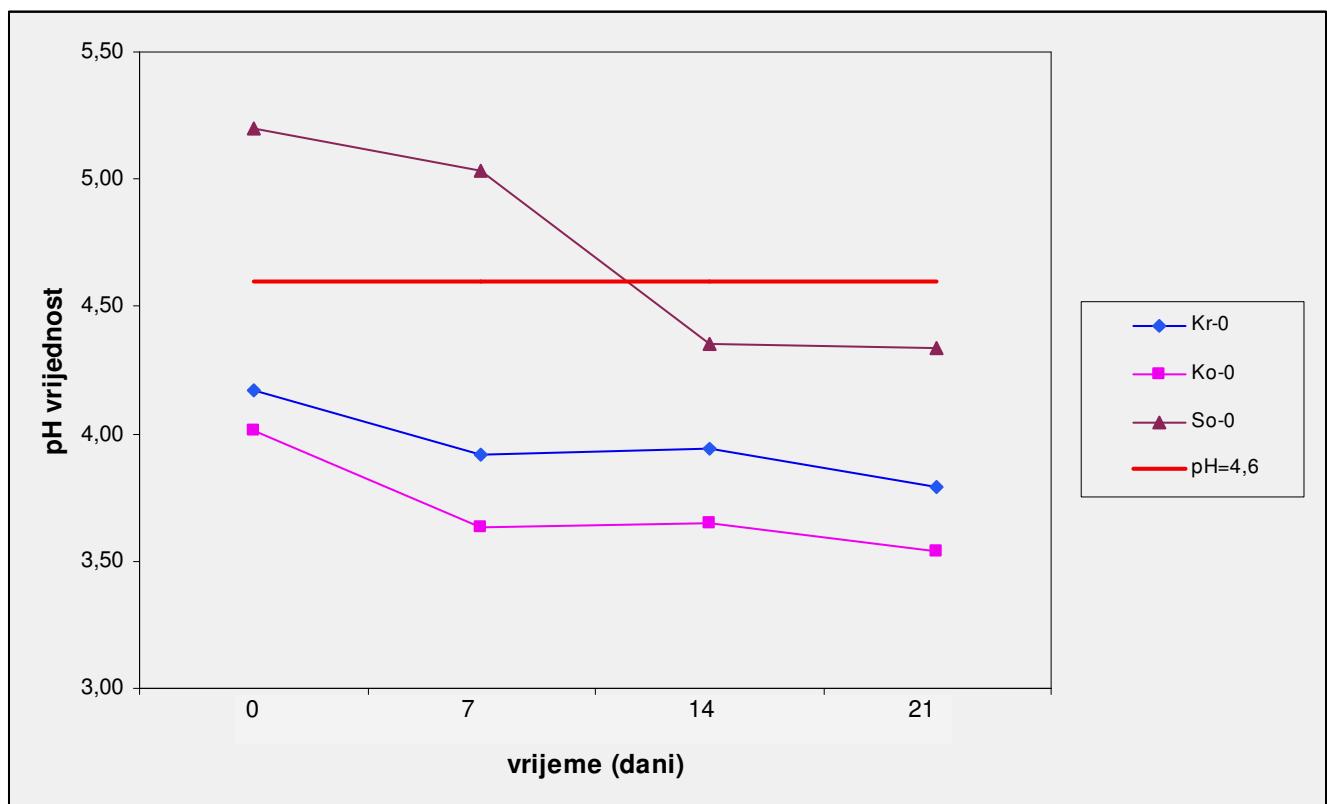
**Slika 21** Inkubacija u termostatu

Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata na 37 °C, izmjerene su zone inhibicije kulture fermentiranim napitkom i izračunata je srednja vrijednost inhibicije. Inhibicija patogene bakterije fermentiranim napitkom ispitivana je u dva ponavljanja [27].

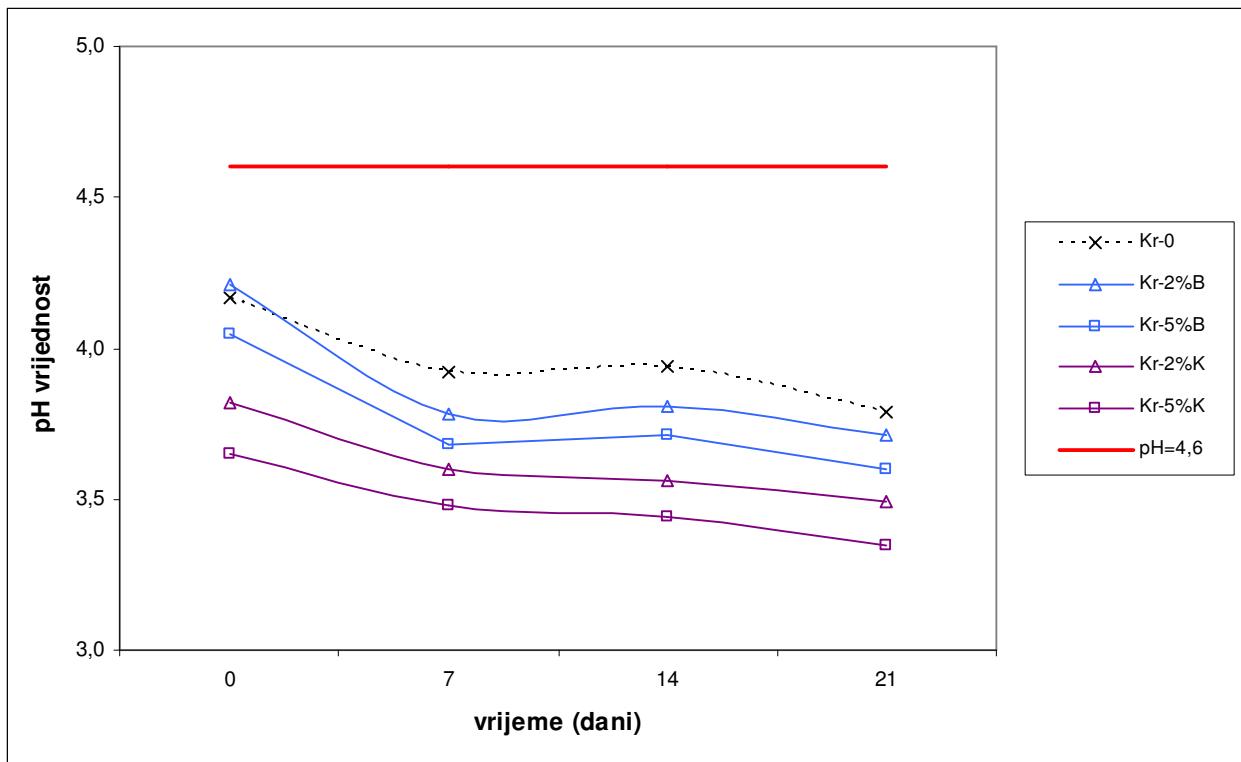
## **4. REZULTATI**

## 4.1. Praćenje promjena fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom čuvanja fermentiranog mlijeka

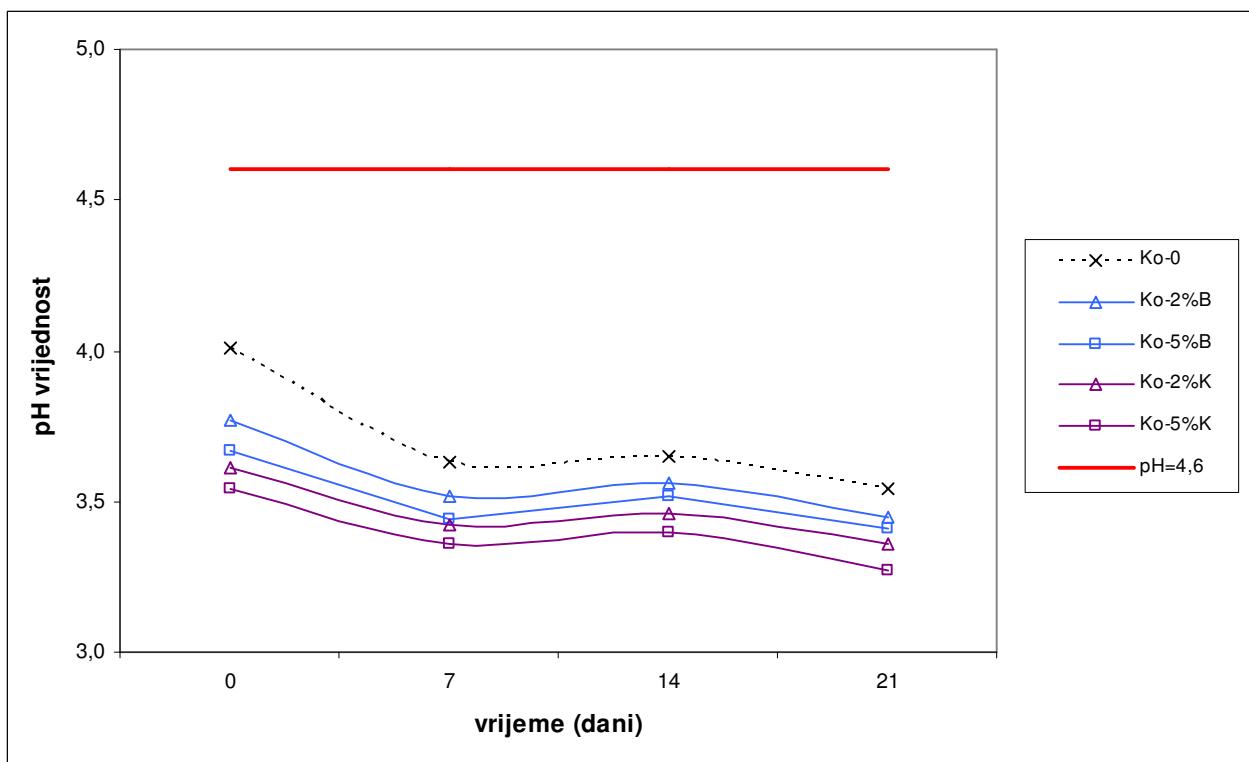
### 4.1.1. Promjene pH vrijednosti



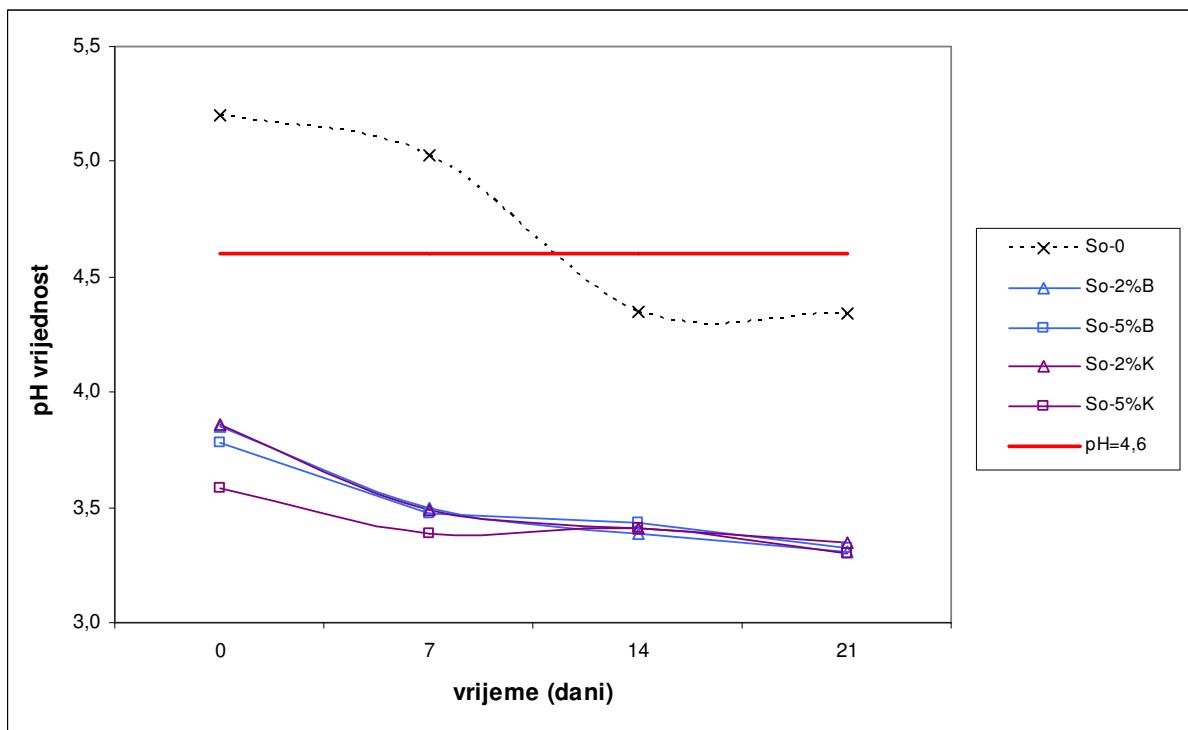
**Slika 22** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg (Kr), kozjeg (Ko) i sojinog (So) mlijeka bez dodataka meda tijekom čuvanja



**Slika 23** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

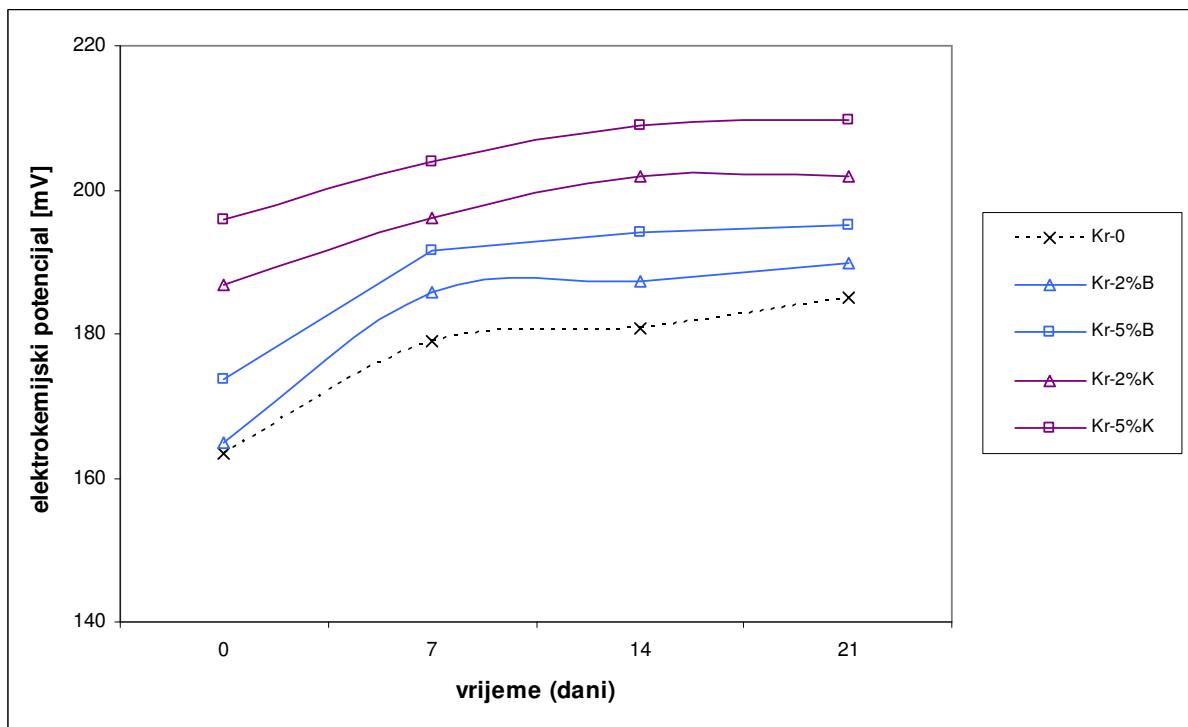


**Slika 24** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

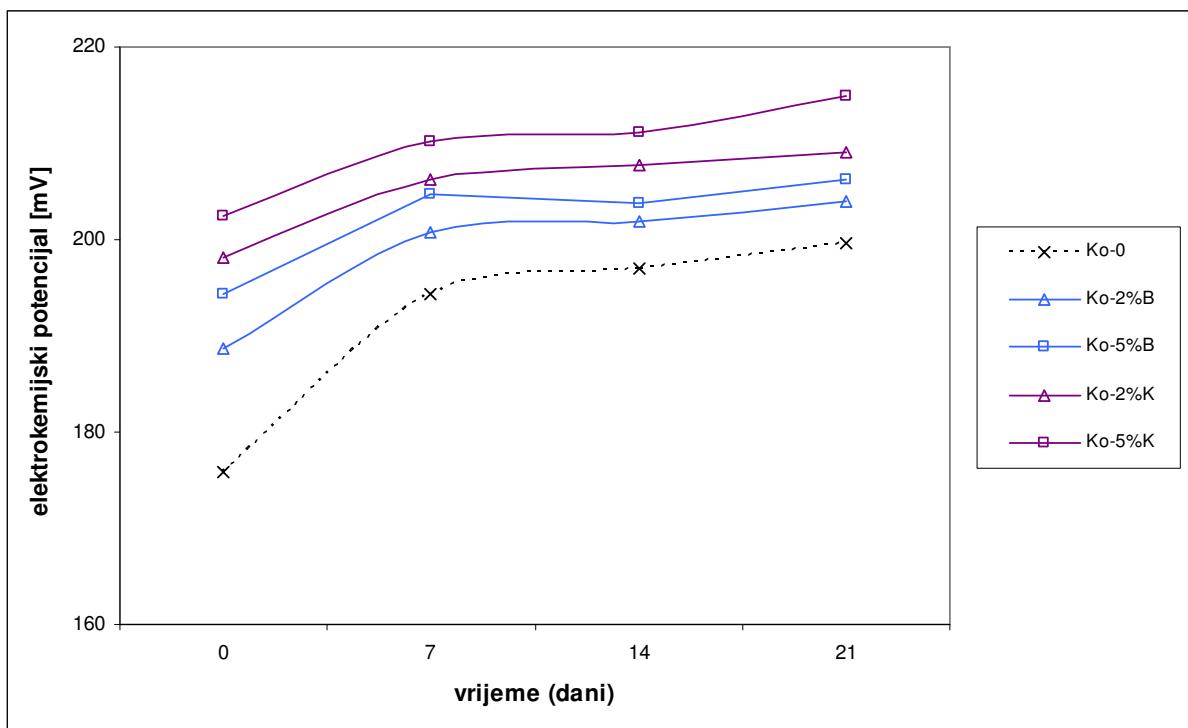


**Slika 25** Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

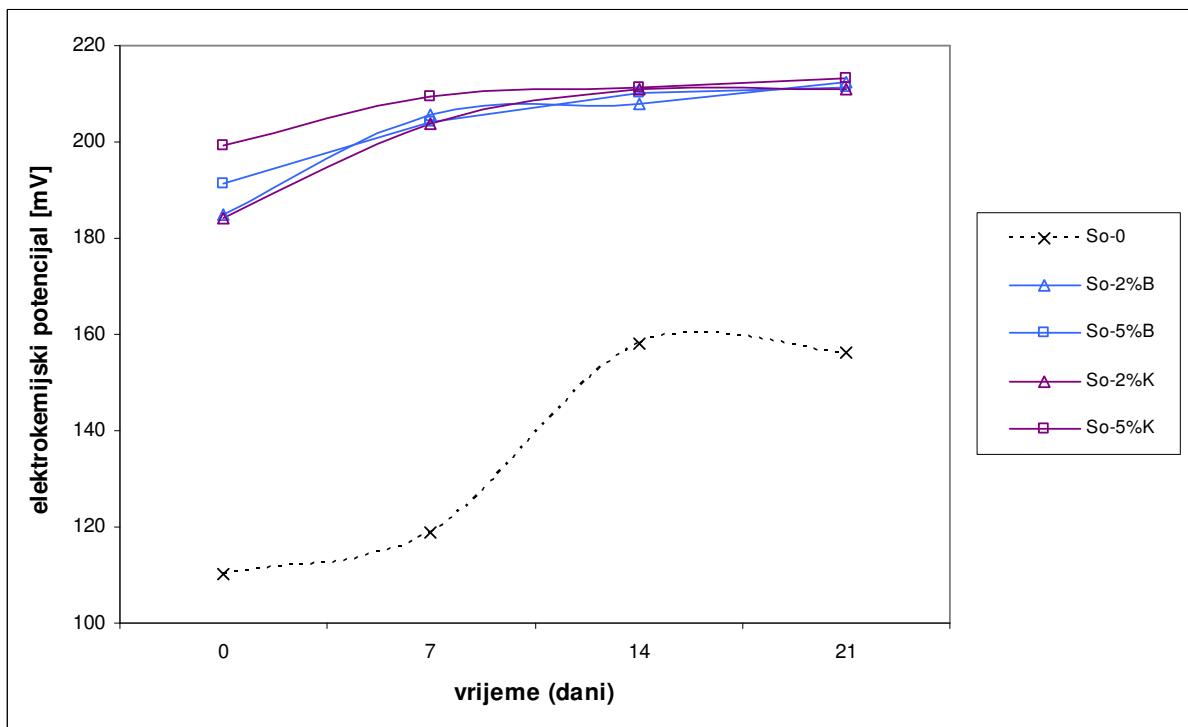
#### 4.1.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala



**Slika 26** Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

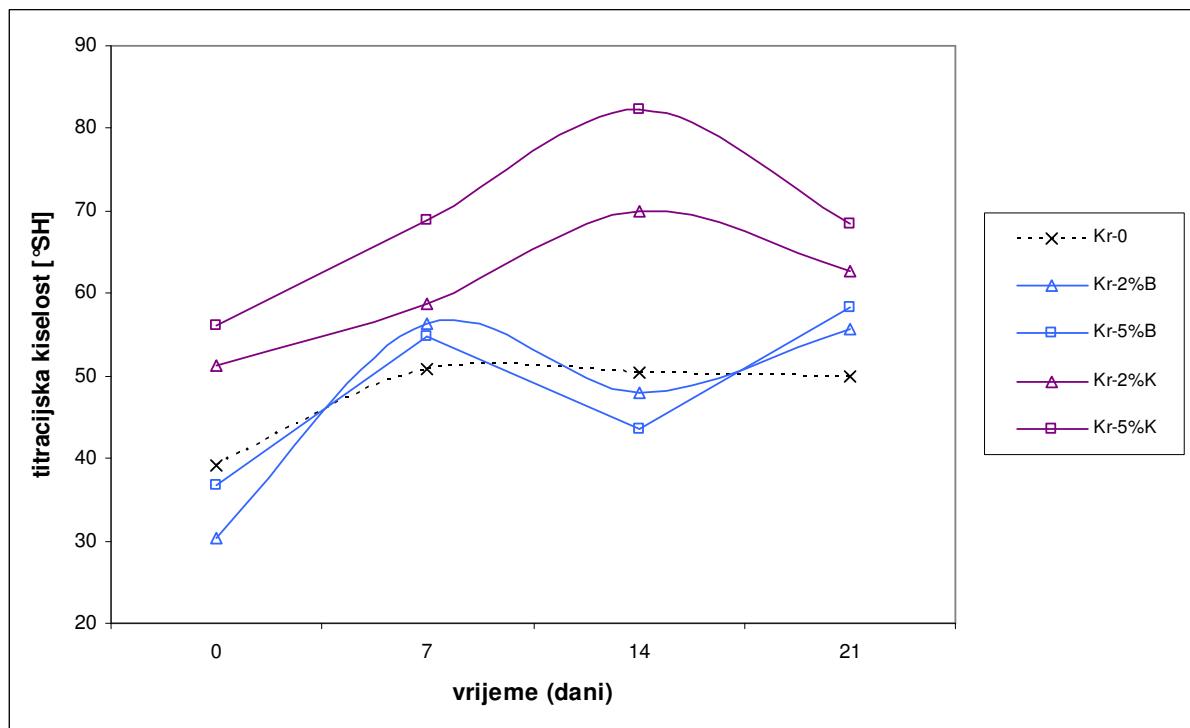


**Slika 27** Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

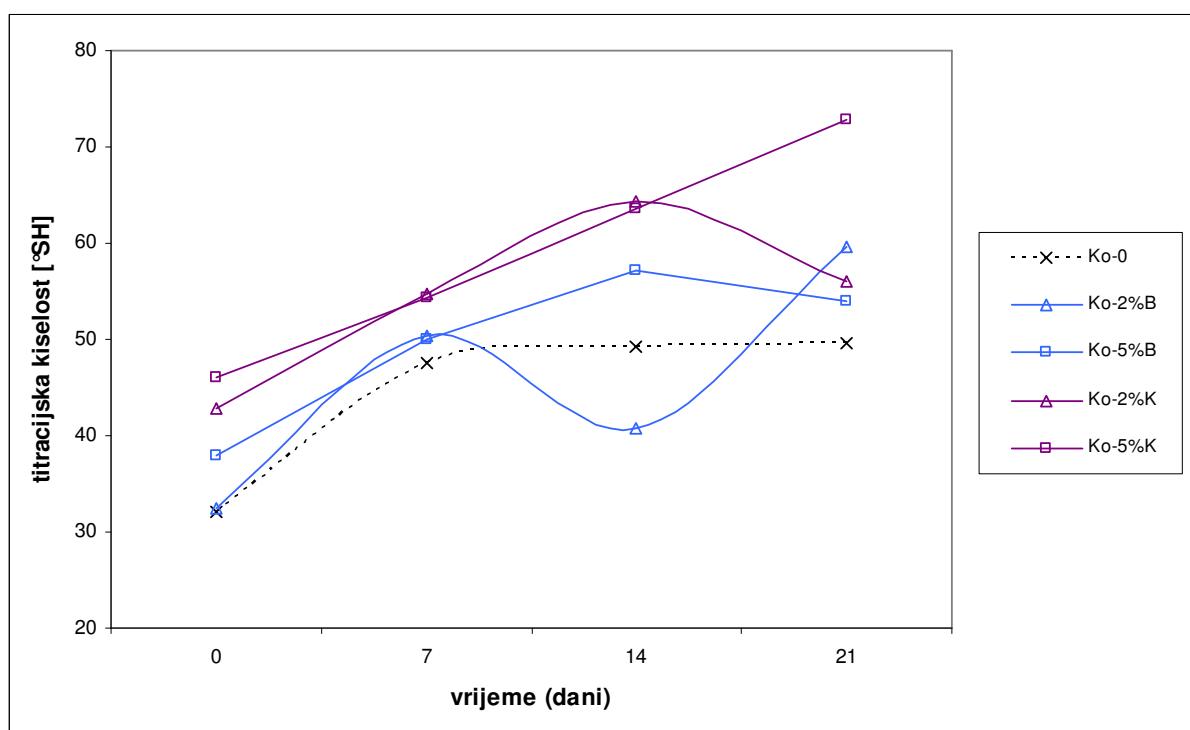


**Slika 28** Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

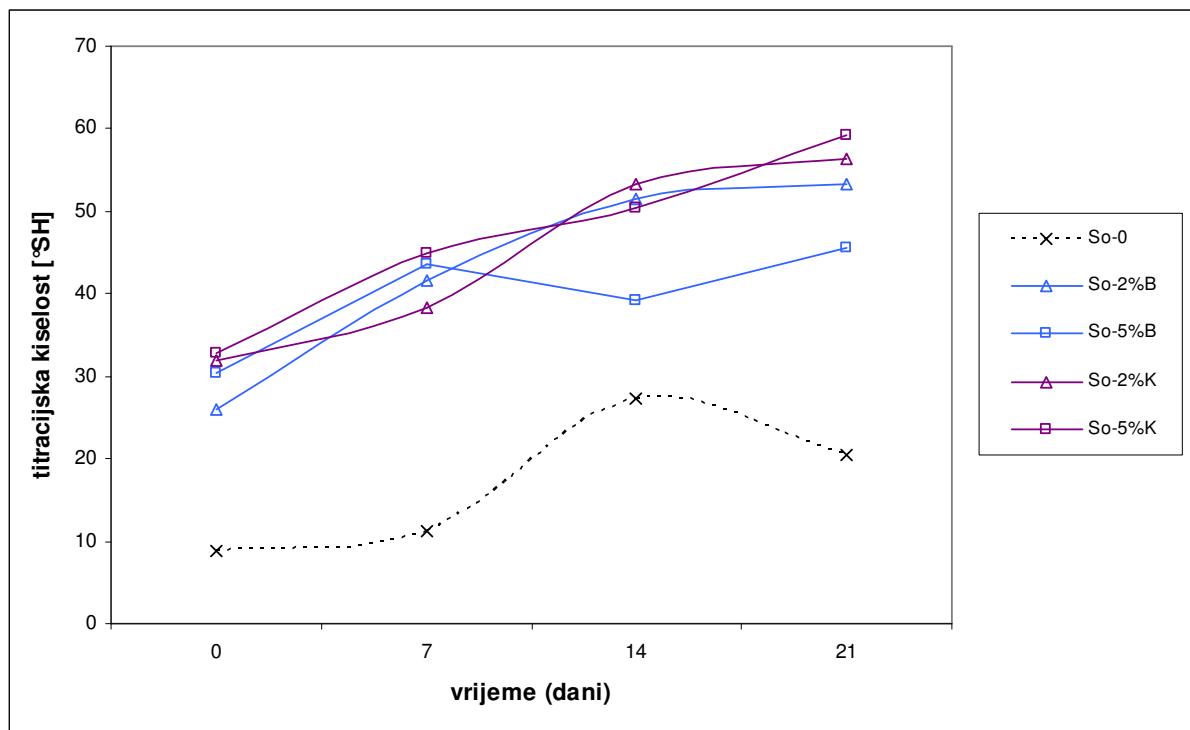
#### 4.1.3. Promjene titracijske kiselosti



Slika 29 Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

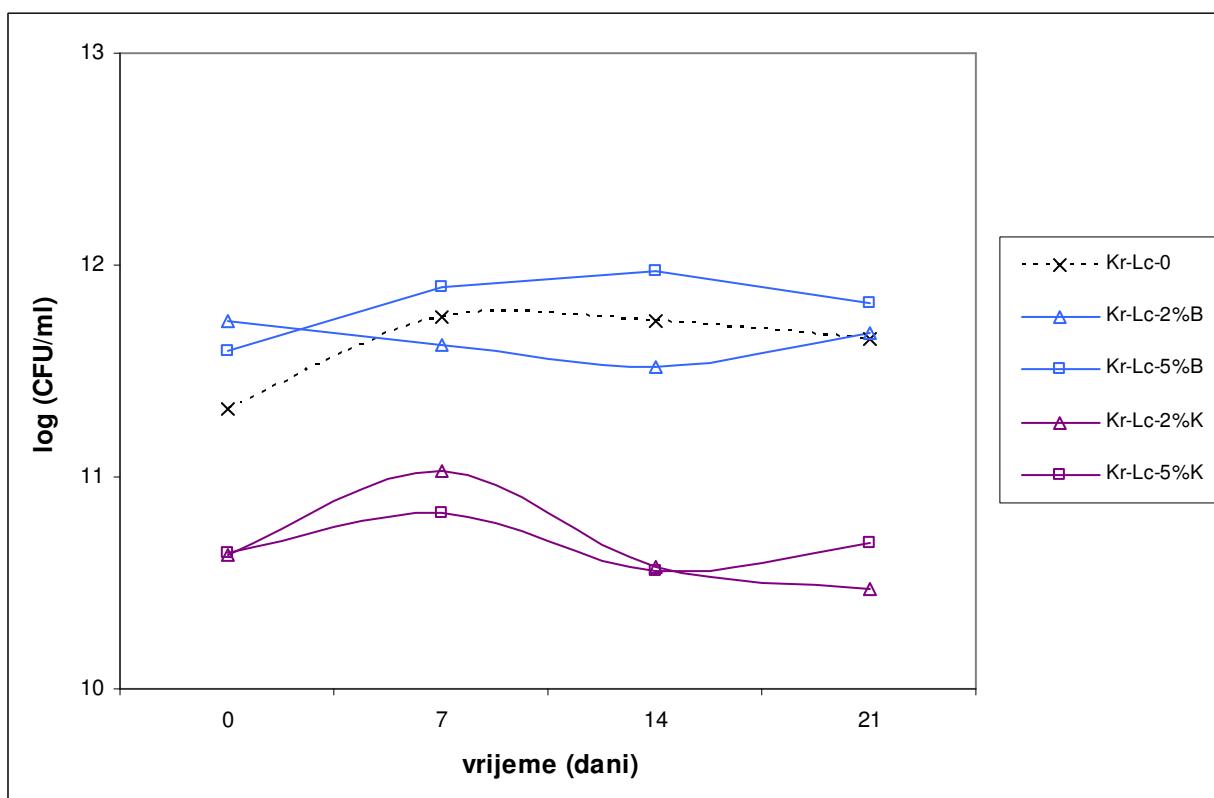


Slika 30 Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

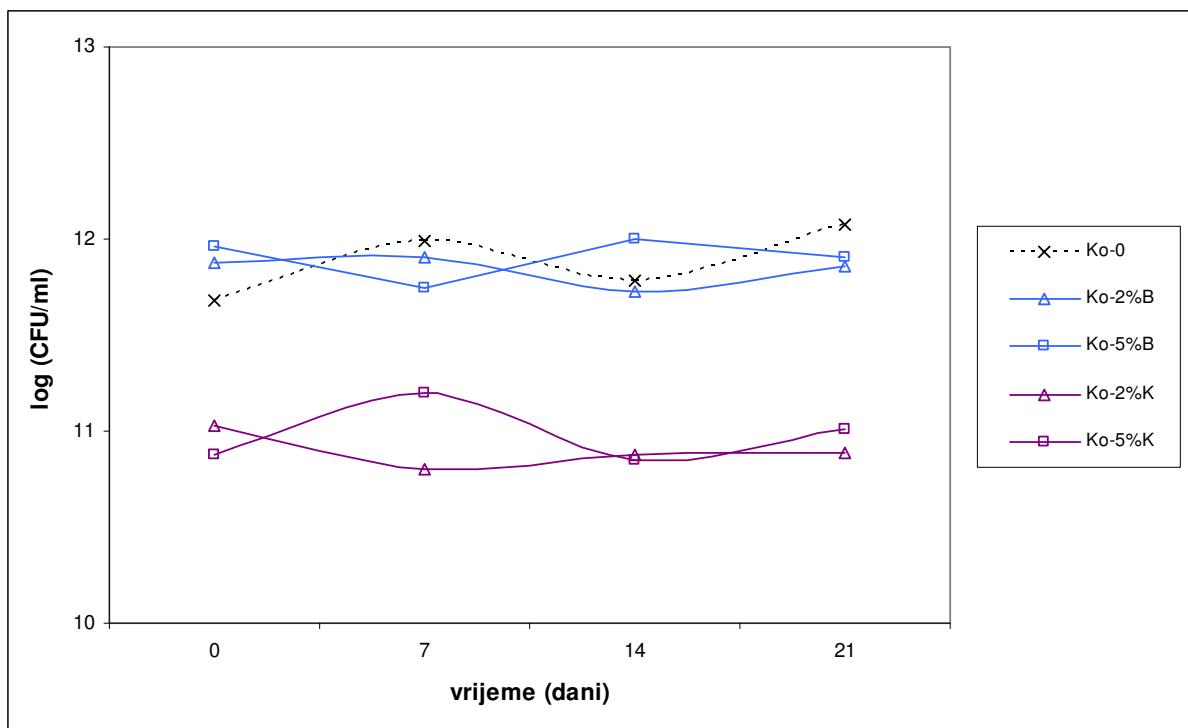


**Slika 31** Promjena titracijske kiselosti ( $^{\circ}$ SH) probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

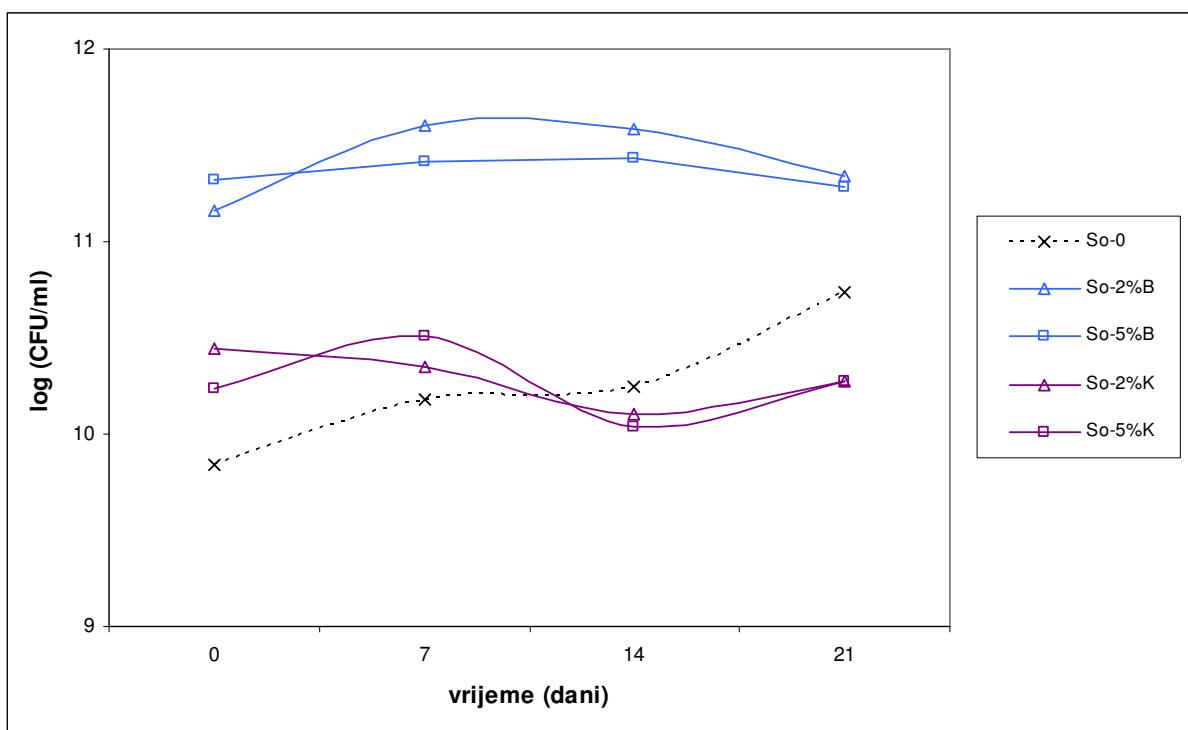
#### 4.1.4. Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc-01



**Slika 32** Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc-01 tijekom čuvanja fermentiranog kravljeđ mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda



**Slika 33** Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc-01 tijekom čuvanja fermentiranog kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda



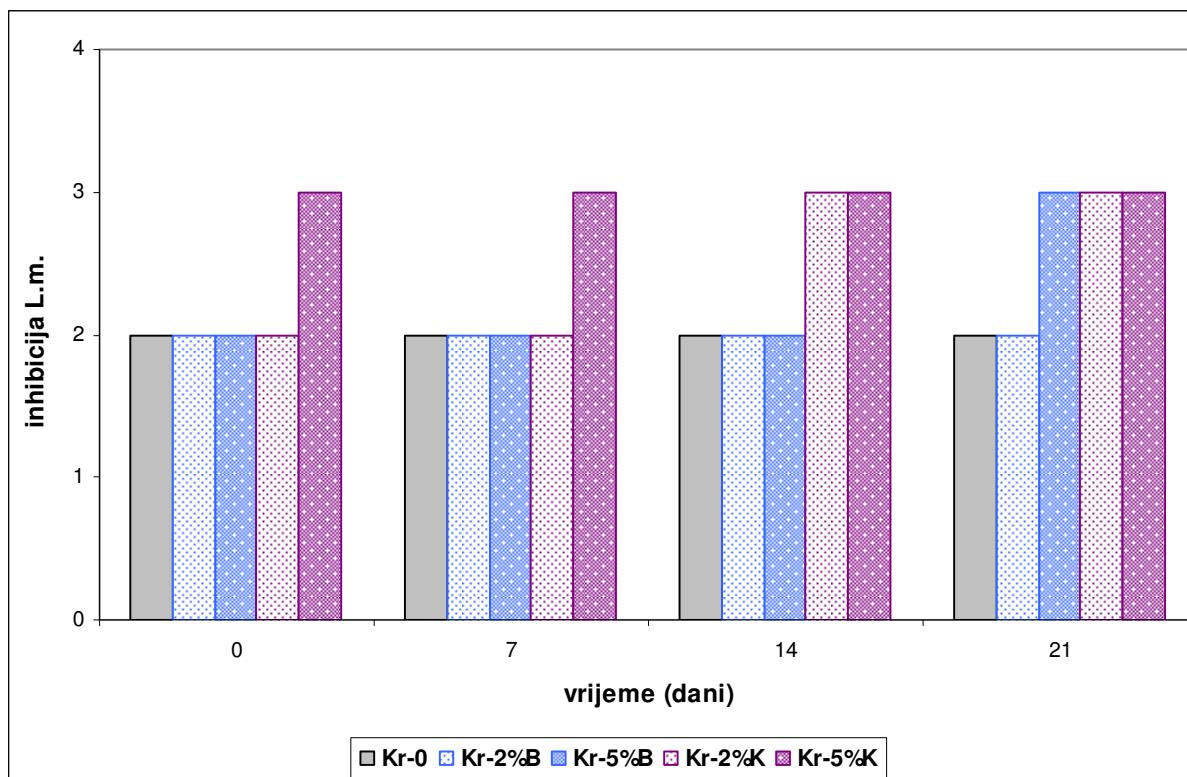
**Slika 34** Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* Lc-01 tijekom čuvanja fermentiranog sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda

#### 4.2. Rezultati određivanja stupnja inhibicije rasta test organizama *Listeria monocytogenes* fermentiranim proizvodima

**Tablica 6** Inhibicija rasta test organizama *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom (Kr) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

dani	0	7	14	21
<b>Kr-0</b>	++	++	++	++
<b>Kr-2% B</b>	++	++	++	++
<b>Kr-5% B</b>	++	++	++	+++
<b>Kr-2% K</b>	++	++	+++	+++
<b>Kr-5% K</b>	+++	+++	+++	+++

- nema zone inhibicije
- + vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije 15 do 20 mm

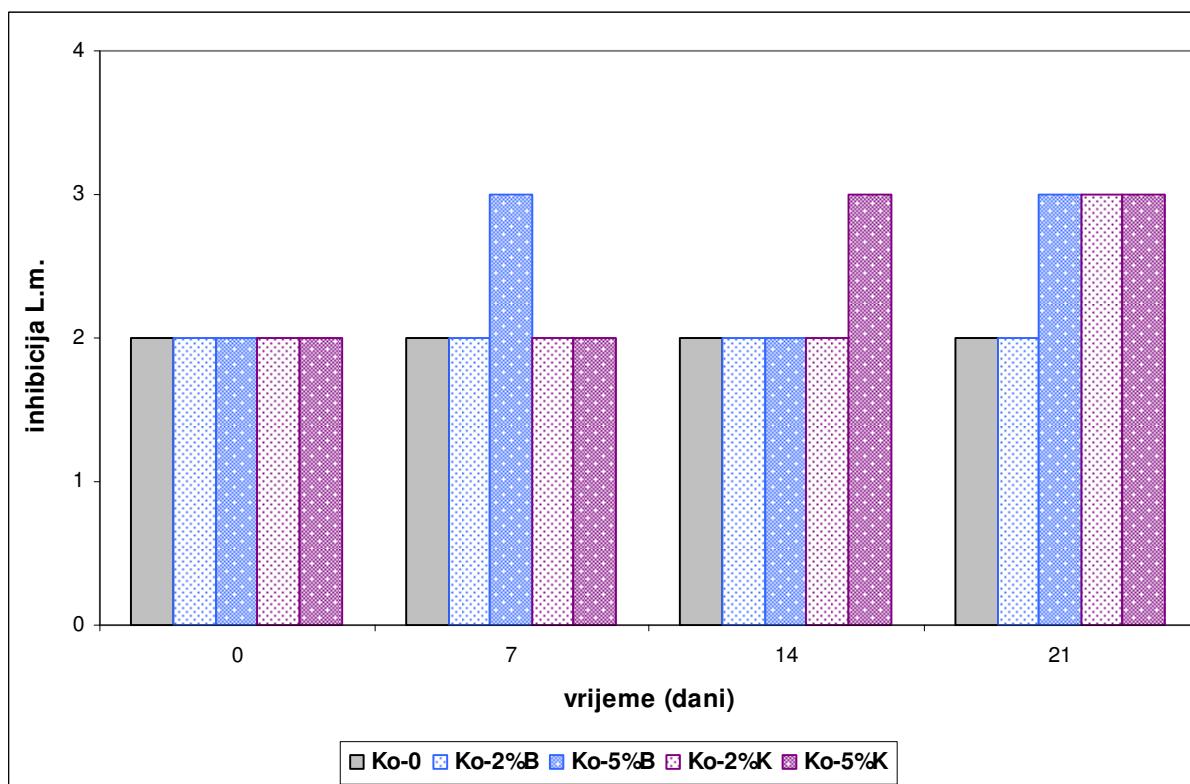


**Slika 35** Inhibicija rasta test organizama *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom (Kr) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

**Tablica 7** Inhibicija rasta test organizama *Listerija monocytogenes* kozjim mlijekom (Ko) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

dani	0	7	14	21
<b>Ko-0</b>	++	++	++	++
<b>Ko-2% B</b>	++	++	++	++
<b>Ko-5% B</b>	++	+++	++	+++
<b>Ko-2% K</b>	++	++	++	+++
<b>Ko-5% K</b>	++	++	+++	+++

- nema zone inhibicije
- ± vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije 15 – 20 mm

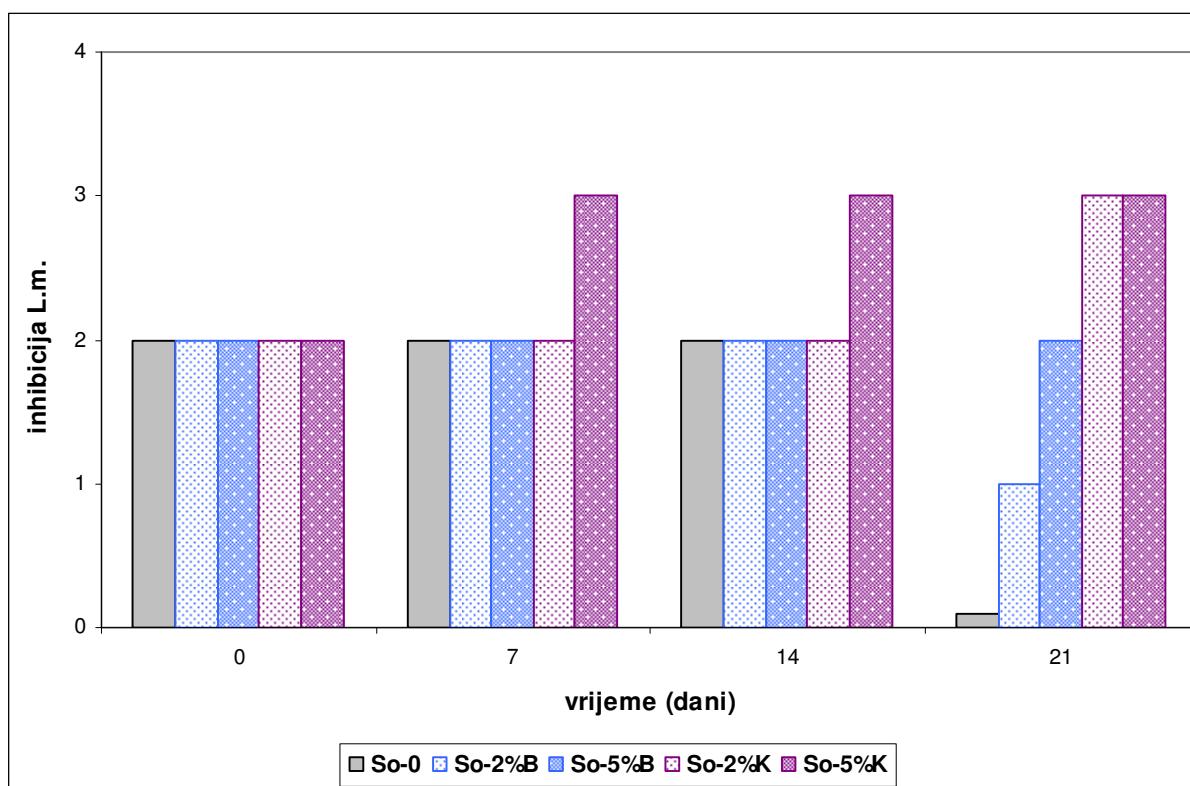


**Slika 36** Inhibicija rasta test organizama *Listerija monocytogenes* kozjim mlijekom (Ko) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

**Tablica 8** Inhibicija rasta test organizama *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom (So) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

dani	0	7	14	21
<b>So-0</b>	++	++	++	-
<b>So-%B</b>	++	++	++	+
<b>So-5% B</b>	++	++	++	++
<b>So-2% K</b>	++	++	++	+++
<b>So-5% K</b>	++	+++	+++	+++

- nema zone inhibicije
- ++ vrlo slaba inhibicija (teška za mjerjenje)
- ++ jasna zona inhibicije < 15 mm
- +++ jasna zona inhibicije 15 – 20 mm



**Slika 37** Inhibicija rasta test organizama *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom (So) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5 %

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom čuvanja

Praćenje promjena pH vrijednosti tijekom tri tjedna čuvanja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 uz dodatak bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 2 i 5 %, dalo je različite rezultate.

Promjene pH vrijednosti kod tri vrste mlijeka bez dodatka meda bitno se razlikuju od ostalih uzoraka. pH vrijednost kravljeg mlijeka u prvih 7 dana čuvanja smanjila se sa 4,17 na 3,92, te se do kraja čuvanja smanjila na 3,79. Kod kozjeg mlijeka pH vrijednost se u početnih 7 dana čuvanja smanjila sa 4,01 na 3,63, te nakon 21 dan na 3,54. Praćenjem promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kod sojinog mlijeka utvrđen je nešto veći pad pH vrijednosti, u prvih 7 dana čuvanja pH vrijednost se s 5,20 smanjila na 5,03, u idućih 7 dana na 4,35 zadržavajući tu vrijednost do kraja. Uspoređujući sve tri vrste mlijeka, kozje mlijeko imalo je najnižu pH vrijednost u svim fazama čuvanja (slika 22).

Dodatak dvije vrste meda, bagremovog (B) i kestenovog (K) u **kravje mlijeko** inokulirano monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, pokazalo je sniženje pH vrijednosti, što je prikazano slikom 23. Dodatak kestenovog meda rezultirao je većim sniženjem pH vrijednosti od onoga u uzorcima s dodatkom bagremovog meda. Kod obje vrste meda uočljivo je da se povećanjem udjela meda snižava pH vrijednost.

Dodatakom dvije vrste meda u **kozje mlijeko** inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, pH vrijednost se tijekom čuvanja smanjuje. Dodatak 5 % meda rezultirao je nižom pH vrijednošću od uzoraka s dodatkom 2% meda, dok je kestenov med utjecao na nižu pH vrijednost od bagremovog, što je prikazano slikom 24.

**Sojino mlijeko** bez dodatka meda inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 u prvih 14 dana čuvanja pokazalo je znatan pad pH vrijednosti. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan učinak. Snizili su pH vrijednost sojinog mlijeka (na oko 3,4), te se ta vrijednost do kraja snizila na oko 3,35; što je prikazano slikom 25.

## 5.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom čuvanja

Tijekom čuvanja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka inokuliranih monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, utvrđen je utjecaj na promjenu elektrokemijskog potencijala, kako prema vrsti, tako i prema udjelima dodatka meda. Iz dijagrama promjene elektrokemijskog potencijala (prikazanih slikama 26, 27 i 28), vidljivo je da krivulje gotovo u potpunosti obrnuto proporcionalno

odgovaraju trendovima opadanja pH vrijednosti pri čuvanju tri ispitivane vrste mlijeka inokuliranog Lc-01 kulturom.

Fermentacijom **kravljeg mlijeka** inokuliranog monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, dolazi do povećanja elektrokemijskog potencijala. Dodatak kestenovog meda rezultirao je većim povećanjem elektrokemijskog potencijala od onoga u uzorcima s dodatkom bagremovog meda. Kod obje vrste meda uočljivo je da se povećanjem udjela meda povećava elektrokemijski potencijal, što je prikazano slikom 26.

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, elektrokemijski potencijal raste, najviše u prvih 7 dana. Kestenov med utjecao je na veći elektrokemijski potencijal od bagremovog meda, dok je elektrokemijski potencijal u uzorcima s 5% meda bio veći od onih s udjelom meda 2% (slika 27).

**Sojino mlijeko** bez dodatka meda inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 u prvih 14 dana čuvanja pokazalo je znatan rast elektrokemijskog potencijala. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan učinak. Povisili su elektrokemijski potencijal sojinog mlijeka (na oko 210), te se ta vrijednost nije znatno mijenjala u posljednjih sedam dana skladištenja, što je prikazano slikom 28.

### 5.3. Promjene intenziteta zakiseljavanja (titracijske kiselosti) tijekom čuvanja

Intenzitet zakiseljavanja veći je kod uzoraka u koje je dodan kestenov med od onih s dodatkom bagremovog meda.

Tijekom čuvanja **kravljeg mlijeka** inokuliranog monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, titracijska kiselost uzorka raste u prvih 7 dana, nakon čega dolazi do vrlo malog smanjenja vrijednosti intenziteta zakiseljavanja. Do kraja čuvanja zadržava približno konstantnu vrijednost. Dodatkom kestenovog meda u udjelima od 2% i 5% titracijska kiselost rasla je tijekom prvih 14 dana čuvanja, nakon čega se smanjuje. Uz dodatak bagremovog meda u udjelima od 2% i 5% intenzitet zakiseljavanja raste u prvih 7 dana čuvanja, zatim se smanjuje te u posljednjih 7 dana čuvanja ponovno raste (slika 29).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** inokuliranog monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, titracijska kiselost uzorka raste u prvih 7 dana, zatim se blago smanjuje i zadržava približno istu vrijednost do kraja čuvanja. Dodatkom bagremovog meda intenzitet zakiseljavanja povećava se u prvih 7 dana, nakon čega kod uzorka sa 2% meda intenzitet zakiseljavanja opada dok se kod uzorka sa 5% meda nastavlja povećavati. U posljednjih 14 dana uzorak sa 2% bagremovog meda pokazuje znatan porast intenziteta zakiseljavanja, a kod uzorka s 5% meda intenzitet se blago smanjuje.

Uzorci s dodatkom kestenovog meda bilježe porast intenziteta zakiseljavanja u prvih 14 dana koji se nastavlja za uzorak s 5% kestenovog meda dok se kod uzorka sa 2% meda nakon 14 dana čuvanja vrijednost smanjuje (slika 30).

Intenzitet zakiseljavanja **sojinog mlijeka** bez dodatka meda inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 znatno je niža od sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog i kestenovog meda. Dodatkom meda u udjelima od 2% i 5% intenzitet zakiseljavanja tijekom čuvanja raste, osim kod uzorka s dodatkom od 5% bagremovog meda kod kojeg intenzitet zakiseljavanja pada u razdoblju od 7 do 14 dana nakon čega nastavlja rasti (slika 31).

#### **5.4. Promjena broja bakterija *Lactobacillus casei* tijekom čuvanja**

U istraživanju je utvrđeno da se opadanje broja živih stanica u fermentiranim proizvodima tijekom čuvanja, odvija različito i ovisno o vrsti mlijeka, vrsti i udjelu meda, te o periodu čuvanja. Fermentacijom **kravljeg mlijeka** inokuliranog monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01, broj bakterija blago raste u prvih 7 dana čuvanja, u narednih 7 dana zabilježen je blagi porast broja bakterija, te posljednjih 7 dana čuvanja broj bakterija pada na vrijednost približnu izmjerenoj nakon 7 dana. Dodatkom bagremovog meda utvrđen je veći broj bakterija od uzorka u koje je dodan kestenov med (slika 32).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** inokuliranog monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, pri 7 dana broj bakterija raste, blago opada od 7. do 14. dana, te nastavlja rasti do kraja čuvanja. Broj bakterija približan je broju bakterija u uzorcima s dodatkom bagremovog meda, dok uzorci s dodatkom kestenovog meda bilježe manji broj bakterija tijekom čuvanja (slika 33).

Tijekom čuvanja **sojinog mlijeka** inokuliranog monoulturom *Lactibacillus casei* Lc-01, porast boja bakterija raste do prvog do zadnjeg dana čuvanja. Kod uzorka s dodatkom bagremovog meda broj bakterija u prvoj polovici čuvanja raste zatim blago opada do kraja čuvanja i znatno je veći od nultog uzorka (bez dodatka meda). U prvoj polovici čuvanja uzorka s dodatkom kestenovog meda broj bakterija veći je od uzorka bez dodatka meda, dok je u drugoj polovici broj bakterija manji u uzorcima s dodatkom kestenovog meda (slika 34).

## **5.5. Usporedba inhibicijske bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kravljim, kozjim i sojinim mlijekom**

U radu je proučavan inhibicijski potencijal bakterije *Lactobacillus casei* prema bakteriji *Listeria monocytogenes* tijekom 21 dan čuvanja fermentiranih mlijeka. Osnovne postavke rada su usporedbe: kravlje/kozje/sojino mlijeko, pH/inhibicija, CFU probiotičkih bakterija/inhibicija, dodatak bagremovog/kestenovog meda, te utjecaj njihovog različitog udjela.

**Kravlje mlijeko** bez dodatka meda pokazalo je inhibiciju bakterije *Listeria monocytogenes* s jasnom zonom inhibicije do 15 mm, od prvog dana do kraja čuvanja. Dodatak bagremovog meda u udjelima od 2% i 5% također je rezultirao inhibicijom do 15 mm u prvih 14 dana, a 21. dan bilježimo jasnu zonu inhibicije od 15 mm do 20 mm u uzorku s 5% bagremovog meda. Uzorak s 2% kestenovog meda bilježi inhibiciju do 15 mm prvih 7 dana, nakon čega bilježimo jasnu zonu inhibicije (15 – 20 mm). Uzorak s 5% kestenovog meda ima izraženu jasnu zonu inhibicije od 15 mm do 20 mm u svim fazama mjerenja (slika 35).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** bez dodatka meda bilježimo inhibiciju bakterije *Listeria monocytogenes* sa zonom inhibicije do 15 mm, kao kod uzorka s 2% bagremovog meda. Kod uzorka s 5% bagremovog meda jasnu zonu inhibicije od 15 mm do 20 mm bilježimo 7 i 21 dan. Uzorci s dodatkom kestenovog meda u udjelu od 2% pokazuju porast inhibicije, sa zone inhibicije do 15 mm na jasnu zonu inhibicije, nakon 21. dana, dok je taj porast kod uzorka s 5% kestenovog meda vidljiv nakon 14 dana (slika 36).

**Sojino mlijeko** bez dodatka meda pokazuje inhibiciju bakterije *Listeria monocytogenes* sa zonom inhibicije do 15 mm u prvih 14 dana čuvanja, dok 21. dan nema inhibicije. Uzorak sa udjelom od 2% i 5% bagremovog meda tijekom prvih 14 dana ima izraženu zonu inhibicije do 15 mm, dok nakon 21 dan kod uzorka sa 2% bagremovog meda bilježimo djelomičnu inhibiciju (vrlo slaba, teška za mjerenje). Kod uzorka s 2% kestenovog meda zona inhibicije je do 15 mm prvih 14 dana, a 21. dan bilježimo jasnu zonu inhibicije od 15 mm do 20 mm. Uzorak s 5% kestenovog meda sa zone inhibicije do 15 mm nakon 7 dana inhibicija raste na jasnu zonu inhibicije do kraja čuvanja, što je prikazano slikom 37.

## **6. ZAKLJUČCI**

**Na osnovi rezultata dobivenih u opsežnom istraživanju provedenom u ovom diplomskom radu, mogu se izvesti slijedeći zaključci:**

- Zakiseljavanje tri vrste mlijeka inokuliranih monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 tijekom čuvanja, odvijalo se različito uz dodatak dvije vrste meda, a različiti utjecaji utvrđeni su i za različite udjele meda.
- Dodatak kestenovog meda rezultirao je većim sniženjem pH vrijednosti kod fermentiranog kravlјeg mlijeka u usporedbi s bagremovim medom. Kod kozjeg fermentiranog mlijeka, pH vrijednost se tijekom čuvanja kontinuirano smanjuje, izraženije kod udjela od 5%, te kod dodatka kestenovog meda.
- Sojino mlijeko bez dodatka meda inokulirano monokulturom *Lactobacillus casei* Lc-01 u prvih 14 dana čuvanja pokazalo je značajan pad pH vrijednosti. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan pozitivan učinak na pad pH vrijednost, koja se snižavala do kraja čuvanja.
- U istraživanju je utvrđeno da se opadanje broja živih stanica u fermentiranim proizvodima tijekom čuvanja odvija različito i ovisno o vrsti mlijeka, vrsti i udjelu meda, te periodu čuvanja.
- Kod fermentiranog kravlјeg mlijeka broj bakterija raste u prvih 7 dana čuvanja, u narednih 7 dana zabilježen je blagi porast, a posljednjih 7 dana broj bakterija pada na vrijednost približnu onoj utvrđenoj nakon 7 dana.
- Tijekom čuvanja fermentiranog kozjeg mlijeka s dodatkom bagremovog meda utvrđen je veći porast broja živih stanica u odnosu na fermentirano mlijeko s dodatkom kestenovog meda.
- Dodatak bagremovog meda u sojino mlijeko također je rezultirao porastom broja živih stanica u usporedbi s dodatkom kestenovog meda.
- Probiotički napitak od kozjeg mlijeka s dodatkom kestenovog meda je pokazao jači inhibitorni učinak u usporedbi s probiotičkim napitkom od kravalјeg i sojinog mlijeka s dodatkom kestenovog meda, pri čemu je inhibitorni učinak jače bio izražen kod udjela meda od 5%.

## **7. LITERATURA**

1. Lj. Tratnik: Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 1998.
2. Narodne novine: 102/2000. Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Dostupno na [http://www.poslovniforum.hr/poljoprivreda/zakoni\\_ml\\_pravilnik.asp](http://www.poslovniforum.hr/poljoprivreda/zakoni_ml_pravilnik.asp) (kolovoz 2009.)
3. J. Havranek, V. Rupić: Mlijeko od farme do mlijekare. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2003.
4. R. Božanić, Lj. Tratnik, I. Dragalić: Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* **52**, 207-237, 2002.
5. B. Mioč, V. Pavić: Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb 2002.
6. A. Petrićić: Konzumno i fermentirano mlijeko. Udruženje mljekarskih radnika Hrvatske. Zagreb 1984.
7. W. N. Sawaya, W. J. Safi, F. Al-Shalhat, M. M. Al-Mohamed: Chemical composition and nutritive value of goat milk. *J. Dairy Sci.* **67**, 1665-1672, 1984.
8. S. Feldhofer, S. Banožić, N. Antunac: Uzgoj i hranidba koza – proizvodnja i prerada kozjeg mlijeka. Hrvatsko mljekarsko društvo. Zagreb, 1994.
9. Y. W. Park, R. Attaie: Comparison of buffering capacity of goat milk with cow milk, comercial soy base infant formula. *J. Dairy Sci.* **69**, 193-203, 1986.
10. R. Božanić: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56**, 233-254, 2006.
11. I. Kovačević: Mogućnost proizvodnje fermentiranih napitaka na osnovi mješavine kravljeg mlijeka i sojinog mlijeka. Diplomski rad. Osijek 1990.
12. A.Y. Tamime, R. Božanić, I. Rogelj: Probiotički fermentirani mliječni proizvodi. *Mljekarstvo* **53**, 111-134, 2003.
13. J. Šušković, B. Kos, J. Frece, S. Matošić: Pozvano predavanje: Simbolički učinak bakterija mliječne kiseline: kritički pristup. Zbornik sažetaka. 35. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka. Lovran, studeni, 11, 2002.
14. J. Šušković, B. Brkić, S. Matošić: Mehanizam probiotičkog djelovanja BMK. *Mljekarstvo* **47**, 57-73, 1997.
15. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-lactobacillus> (rujan 2009.)
16. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus> (rujan 2009.)
17. <http://bioweb.usu.edu/microscopy/lactobacillus%20casei.jpg> (rujan 2009.)
18. <http://www.vitamini.hr/4872.aspx> (rujan 2009.)
19. [http://www.bio-terra.net/content/view/25/42/lang.\\_hr/](http://www.bio-terra.net/content/view/25/42/lang._hr/) (rujan 2009.)
20. <http://proizvodi.pcelarstvo.hr/index.php/vrste-medica/12-bagremov-med.html> (rujan 2009.)
21. <http://proizvodi.pcelarstvo.hr/index.php/vrste-medica/18-kestenov-med.html> (rujan 2009.)
22. <http://www.apimel.hr/proizvod4.html> (rujan 2009.)
23. <http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-listeria> (rujan 2009.)
24. I. Žele-Starčević: Korine bakterije. Listeria. Erizipelotriks. Gardnerela. Legionela. Laktobacili. U *medicinska bakteriologija i mikologija*. S. Kalenić, E. Mlinarić-Missoni (ur.), Prehrambeno tehnološki inženjering. Zagreb, 283-285, 1995.
25. <http://www.topnews.in/files/Listeria-monocytogenes.jpg> (rujan 2009.)
26. S. Duraković: Primjenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering. Zagreb, 1996.
27. J. Šušković, B. Kos: Mikrobiološke metode i antibiotici. U "Metode u molekularnoj biologiji". Institut Ruđer Bošković. Zagreb, 2007.

## **8. PRILOZI**

**Prilog 1** Priprava uzorka

BROJ	OZNAKA	MLIJEKO			KULTURA	MED					
		kravljе	kozje	sojino		L.casei	bez	bagrem		kesten	
							0%	2%	5%	2%	5%
<b>1.</b>	CM-Lc-0	200 ml			0,06 g	0 g					
<b>2.</b>	CM-Lc-2%	200 ml			0,06 g		4 g				
<b>3.</b>	CM-Lc-5%	200 ml			0,06 g			10 g			
<b>4.</b>	CM-Lc-2%	200 ml			0,06 g				4 g		
<b>5.</b>	CM-Lc-5%	200 ml			0,06 g					10 g	
<b>6.</b>	GM-Lc-0		200 ml		0,06 g	0 g					
<b>7.</b>	GM-Lc-2%		200 ml		0,06 g		4 g				
<b>8.</b>	GM-Lc-5%		200 ml		0,06 g			10 g			
<b>9.</b>	GM-Lc-2%		200 ml		0,06 g				4 g		
<b>10.</b>	GM-Lc-5%		200 ml		0,06 g					10 g	
<b>11.</b>	SM-Lc-0			200 ml	0,06 g	0 g					
<b>12.</b>	SM-Lc-2% B			200 ml	0,06 g		4 g				
<b>13.</b>	SM-Lc-5% B			200 ml	0,06 g			10 g			
<b>14.</b>	SM-Lc-2% K			200 ml	0,06 g				4 g		
<b>15.</b>	SM-Lc-5% K			200 ml	0,06 g					10 g	
<b>UKUPNO</b>		1 L	1 L	1 L	0,9		12 g	30 g	12 g	30 g	
							42 g		42 g		

**Prilog 2** Zone inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranom kulturom *Lacitobacillus casei*

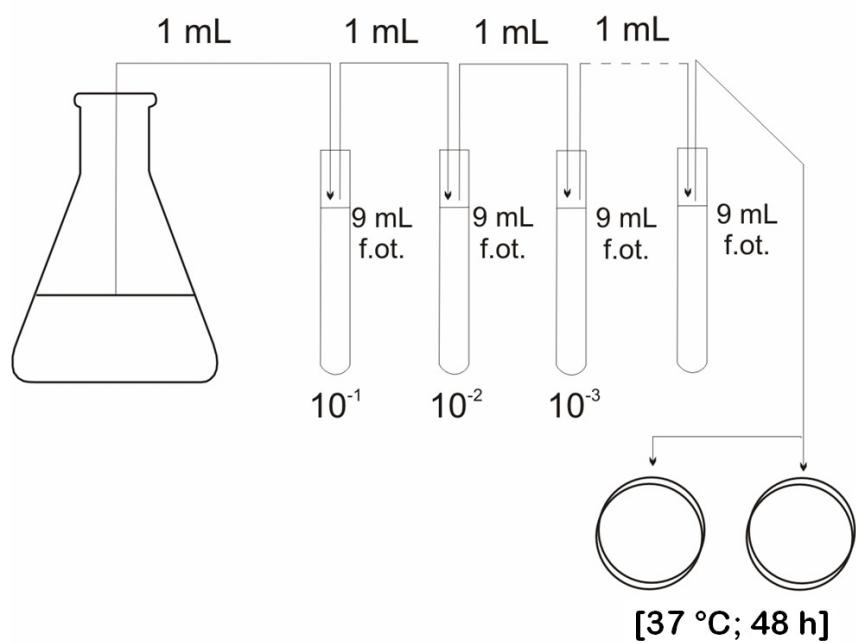
dan	CM-Lc-0	CM-Lc-2% B	CM-Lc-5% B	CM-Lc-2% K	CM-Lc-5% K
<b>0</b>	11,8	11,4	12,9	12,5	15,1
<b>7</b>	12,2	12,8	14,9	14,8	18,2
<b>14</b>	12,2	12,7	14,5	15,4	16,7
<b>21</b>	12,9	14,3	15,8	17,2	18,3

**Prilog 3** Zone inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranom kulturom *Lacitobacillus casei*

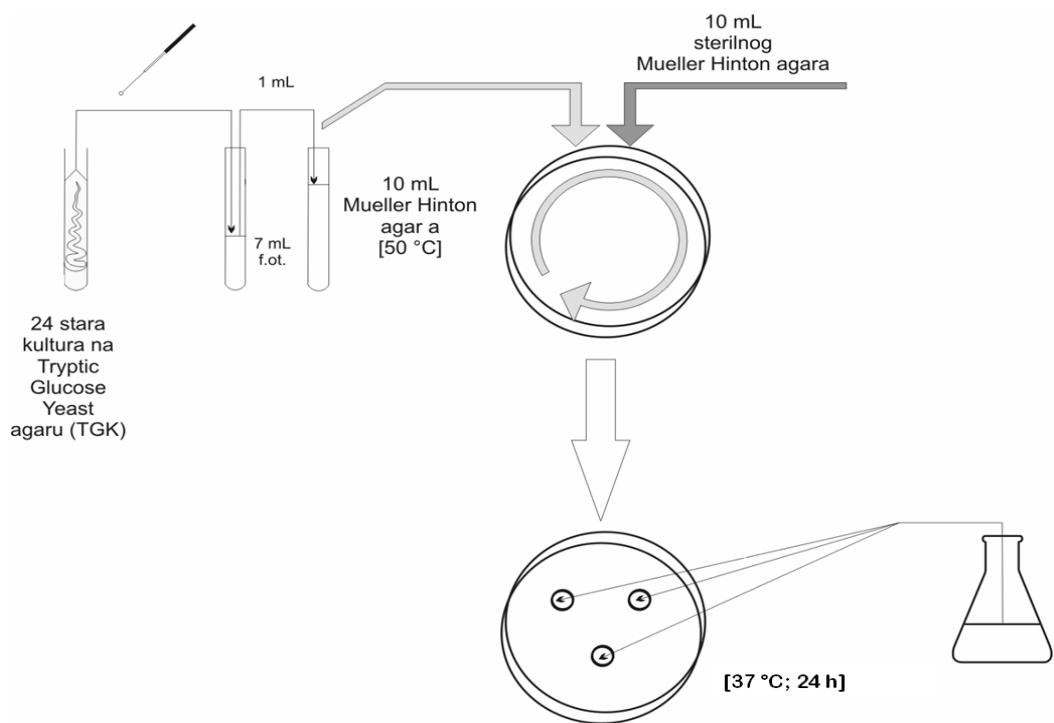
dan	GM-Lc-0	GM-Lc-2% B	GM-Lc-5% B	GM-Lc-2% K	GM-Lc-5% K
<b>0</b>	12,0	13,1	14,0	14,3	11,5
<b>7</b>	12,0	12,5	14,9	13,7	15,0
<b>14</b>	11,8	13,3	16,5	14,3	13,8
<b>21</b>	13,2	14,0	17,5	15,7	15,7

**Prilog 4** Zone inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranom kulturom *Lacitobacillus casei*

dan	SM-Lc-0	SM-Lc-2% B	SM-Lc-5% B	SM-Lc-2% K	SM-Lc-5% K
<b>0</b>	11,3	11,9	12,2	13,1	13,7
<b>7</b>	11,9	12,4	12,7	14,5	15,5
<b>14</b>	12,0	12,8	13,3	14,3	17,4
<b>21</b>	0	min	14,0	17,2	17,9



**Prilog 5** Shematski prikaz pripreme razrjeđenja uzorka



**Prilog 6** Shematski prikaz određivanja stupnja inhibicije



**Prilog 7** Erlenmayer tikvice spremne za sterilizaciju



**Prilog 8** Čiste epruvete spremne za ulijevanje agara



**Prilog 9** Agar u epruvetama prije sterilizacije



**Prilog 10** Sterilne kivete za uzorke



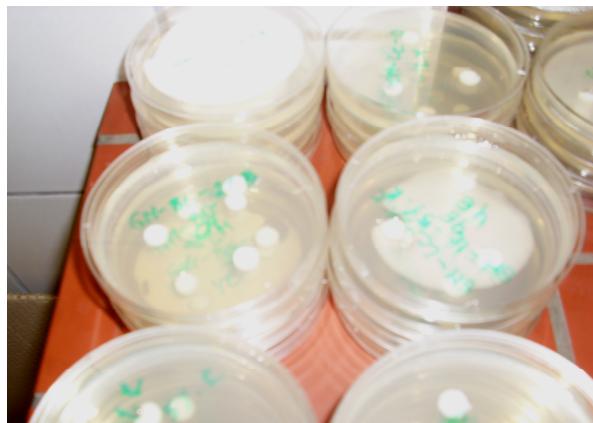
**Prilog 11** Označavanje Petrijevih zdjelica



**Prilog 12** Priprema preparata za nalijevanje u Petrijeve zdjelice



**Prilog 13** Rad u sterilnim uvjetima



**Prilog 14** Nacijepljeni uzorci u Petrijevim zdjelicama



**Prilog 15** Čuvanje uzorka u hladnjaku



**Prilog 16** Inkubacija uzorka u termostatu



**Prilog 17** Sterilizirani tipsevi za pipetiranje



**Prilog 18** Autoklav