Inhibicija Listeria monocytogenes probiotičkim bakterijama Bifidobacterium longum tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka

Juras, Linda

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:669194

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Linda Juras

Inhibicija *Listeria monocytogenes* probiotičkim bakterijama *Bifidobacterium longum* tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka

DIPLOMSKI RAD

Osijek, veljača 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za mljekarstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet:	Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda
Tema rada	je prihvaćena na X. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. 09. 2013.
Mentor:	**Dr. sc. Jovica Hardi, red. prof. u trajnom zvanju**
Pomoć pri izradi:	Mirela Lučan, dipl. ing., asistent

Inhibicija *Listeria monocytogenes* probiotičkim bakterijama *Bifidobacterium longum* tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka

***Linda Juras*, 1976/99**

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 *Bifidobacterium longum*. Praćena je promjena aktivne kiselosti, titracijske kiselosti, te promjena broja probiotičkih bakterija nakon 24 sata fermentacije, 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, *Listeria monocytogenes*, *Bifidobacterium longum, med, inhibicija*
Rad sadrži:	31 stranicu
	37 slika
	7 tablica
	21 literaturnu referencu
	0 priloga
Jezik izvornika:	Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. Vinko Krstanović	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Jovica Hardi	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. Vedran Slačanac	član
4.	izv. prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić	zamjena člana

Datum obrane: 28. veljače 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

graduate thesis

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food technologies
Subdepartment of Dary technology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Department of Food technologies
Course title:	Dary products and dary technology
Thesis subject	was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no.6. held on june 19. 2012.
Mentor:	**Jovica Hardi, PhD, full prof.**
Technical assistance	Mirela Lučan, BSc. assistant

Antagonistic effect of *Bifidobacterium longum* against *Listeria monocytogenes* during storage of fermented milks, Linda Juras, 1976/99

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 *Bifidobacterium longum*. 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 acacia 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.

Key words:	cow's, goat's and soy milk, *Listeria monocytogenes,* honey, *Bifidobacterium longum*, inhibition of the pathogen growth
Thesis contains:	31 pages
	37 figures
	7 tables
	21 references
	0 supplements
Original in:	Croatian

Defense committee:

1.	PhD Vinko Krstanović, Assistant prof.	chair
2.	PhD Jovica Hardi, Full prof.	supervisor
3.	PhD Vedran Slačanac, Assistant prof.	member
4.	PhD Daliborka Koceva Komlenić, Assistant prof.	stand-in

Defense date: Februar, 28, 2014

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ

Str.

1. UVOD

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kravlje mlijeko 1

2.1.1. Prehrambena vrijednost mlijeka 1

2.1.2. Nutritivna vrijednost mlijeka 1

2.1.3. Sastojci mlijeka 2

2.1.3.1. Proteini 2

2.1.3.2. Voda 2

2.1.3.3. Mliječni šećer 3

2.1.3.4. Mliječna mast 3

2.1.3.5. Mineralne tvari 4

2.2. Kozje mlijeko 4

2.2.1. Sastojci kozjeg mlijeka 4

2.2.1.1. Mliječna mast 5

2.2.1.2. Proteini 5

2.2.1.3. Vitamini i minerali 5

2.2.1.4. Laktoza 5

2.2.2. Terapijske vrijednosti 5

2.3. Sojino mlijeko 6

2.3.1. Svojstva i nutritivna vrijednost sojinog mlijeka 6

2.3.2. Usporedba sastava kravljeg i sojinog mlijeka 6

2.4. Med 7

2.4.1. Bagremov med 7

2.4.2. Kestenov med 8

2.5. Probiotici 8

2.5.1. Bifidobakterije 9

2.5.2. *Bifidobacterium longum* 9

2.6. Bakterija *Listeria monocytogenes* 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada 11

3.2. Materijal i metode 11

3.2.1. Priprava uzoraka i dodatnog materijala 11

3.2.1.1. Priprava filtrata bez stanica 12

3.2.2. Priprema fiziološke otopine 12

3.2.3. Priprema Mùller Hinton agara 13

3.2.4. Pasterizacija meda 14

3.2.5. Određivanje pH vrijednosti 14

3.2.6. Određivanje titracijske kiselosti 15

3.2.7. Priprema suspenzije bakterijskih stanica *L. monocytogenes* 15

3.2.8. Određivanje broja probiotičkih bakterija (CFU) 17

3.2.9. Određivanje stupnja inhibicije bakterije *L. monocytogenes* 17

4.REZULTATI

4.1. Praćenje promjena fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom čuvanja fermentiranog mlijeka 20

4.1.1. Promjene pH vrijednosti 20

4.1.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala 21

4.1.3. Promjene titracijske kiselosti 23

4.1.4. Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 24

4.2. Rezultati određivanja stupnja inhibicije rasta test organizama *Listeria monocytogenes* fermentiranim proizvodima 26

5. RASPRAVA

5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom čuvanja 27

5.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom čuvanja 27

5.3. Promjene titracijske kiselosti tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka 28

5.4. Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* tijekom čuvanja 28

5.5. Usporedba inhibicijske bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kravljim, kozjim i sojinim mlijekom 29

6. ZAKLJUČCI 30

7. LITERATURA 31

1. UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi koji kao pojedinačne ili mješovite kulture imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina. Najčešće korišteni probiotici u ljudskoj prehrani su iz roda *Lactobacillus*-a i *Bifidibacterium*-a. Probiotičke kulture raznim mehanizmima inhibiraju patogene bakterije.

Listeria monocytogenes je patogena bakterija čiji se negativan utjecaj na ljudski organizam pokušava smanjiti ili spriječiti. Ova bakterija je tolerantna na ekstremne uvjete, te je od osobitog značenja što ima sposobnost preživljavanja pri niskim pH vrijednostima i može izazvati infekcije u ljudskom organizmu.

Unos probiotičkih bakterija u ljudski organizam se bazira na kravljem mlijeku, neznačajno pomoću kozjeg mlijeka, ali u zadnje vrijeme se sve više dodaje sojinom mlijeku.

Primjena različitih vrsta meda u prehrani ima pozitivan učinak na zdravlje.

Cilj rada bio je ispitati u kojoj mjeri probiotički napici od mlijeka (kravljeg, kozjeg, sojinog), uz primjenu meda kao stimulatora rasta bifidobakterija (bagrem, kesten) inhibiraju bakteriju *Listeria monocytogenes.*

Svrha rada je bila ispitati koja vrsta i koji udio dodanog meda imaju najbolji prebiotički stimulirajući učinak na rast bifidobakterije tijekom fermentacije tri vrste mlijeka. Nadalje, zadatak rada je bio istražiti inhibirajući učinak fermentiranog mlijeka na odabranu bakteriju tijekom čuvanja.

2.1. KRAVLJE MLIJEKO

Mlijeko je zbog svoje prehrambene vrijednosti nezamjenjiva namirnica,a njegova vrijednost se zasniva na kemijskom sastavu, odnosno mastima,bjelančevinama, laktozi, vitaminima i mineralima.

Mlijeko je proizvod mliječnih žlijezda sisavaca i važno je za prehranu djece (mladunčadi), jer značajno doprinosi očuvanju zdravlja tijekom cijelog života. U kravljem mlijeku utvrđeno je više od 100 različitih sastojaka. Njegova kvaliteta ovisi o hranjenju životinje, o pasmini, zdravlju i načinu mužnje i postupku s mlijekom nakon mužnje (Havranek,Rupić,2003.).

2.1.1. PREHRAMBENA VRIJEDNOST MLIJEKA

Mlijeko pruža glavni izvor prehrane mladunčadi sisavaca. Mlijeko je prirodna hrana bogata kalcijem,bjelančevinama, vitaminima i mineralima, prijeko potrebnim za rast i pravilno funkcioniranje organizma. Tablicom 1 prikazan je je prosječni kemijski sastav kravljeg mlijeka, a udjeli pojedinih sastojaka suhe tvari kravljeg mlijeka navedene su tablicom 2. (Tratnik,1998.).

Tablica 1 Prosječni kemijski sastav mlijeka (Havranek, Rupčić, 2003.)

Voda	**87,4% = oko 7/8**
Suha tvar	**12,6% = oko 1/8**

Tablica 2 Udjeli pojedinih sastojaka suhe tvari kravljeg mlijeka (Havranek, Rupčić, 2003.)

Suha tvar u mlijeku	
Laktoza	**4,7%**
Mast	**3,9%**
Bjelančevine	**3,3%**
(Kazein)*	**2,7%**
(Albumin)*	**0,6%**
(Globulin)*	**u tragovima**
Mineralne soli (pepeo)	**0,7%**
UKUPNO	**12,6%**

(*ulazi u sastav bjelančevina)

2.1.2. NUTRITIVNA VRIJEDNOST MLIJEKA

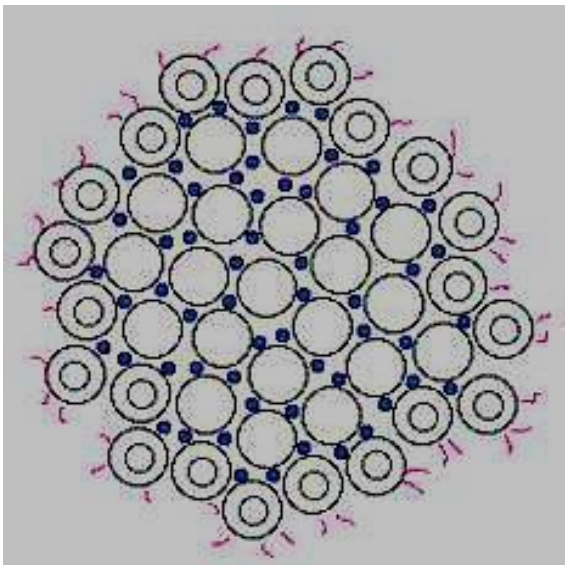
Mlijeko i mliječni proizvodi opskrbljuju organizam neophodnim hranjivim tvarima (nutrientima). Od mlijeka se proizvode razni proizvodi kao što su fermentirani mliječni napitci, sir, namazi, a sve češće dodaju se probiotički mikroorganizmi [3].

Nutritivno 100 g mlijeka s udjelom od 3,25% mliječne masti, ima energetsku vrijednost od 251 kJ/60 kcal, 4,52% ugljikohidrata, 3,22% proteina, 3,25% masti. Dobar je izvor kalcija 113 mg (11% preporučenog dnevnog unosa) i fosfora 91 mg (11,4% preporučenog

dnevnog unosa). Mlijeko je dobar izvor vitamina i to vitamina B_{12} (18% preporučenog dnevnog unosa) i riboflavina (14% preporučenog dnevnog unosa). Konzumiranjem mlijeka i mliječnih proizvoda u organizam se unosi malo kalorija, a puno drugih potrebnih tvari. Istraživanja su pokazala da dovoljno konzumiranje kalcija u djetinstvu smanjuje rizik od osteoporoze u starijoj dobi [3].

2.1.3. SASTOJCI MLIJEKA

2.1.3.1. PROTEINI



Mlijeko je izvrstan izvor visokokvalitetnih proteina,sadrži oko 95% proteina i 5% neproteinske dušične tvari. Kazein i proteini sirutke su dva glavna tipa proteina. Mliječni proteini, osobito kazein ima odgovarajući sastav aminokiselina za rast. Kazein (80%) je glavni protein mlijeka koji se sastoji od nekoliko frakcija: α_{S1}-; α_{S2}-; β-; γ- i κ-kazeina. Kazein je složena nakupina tzv. „micela“, koja se sastoji od određenog broja manjih globularnih jedinica (submicela), koje prvo nastaju povezivanjem kazeinskih frakcija (Tratnik,1998.).

Slika 1 Struktura kazeinske micele [3]

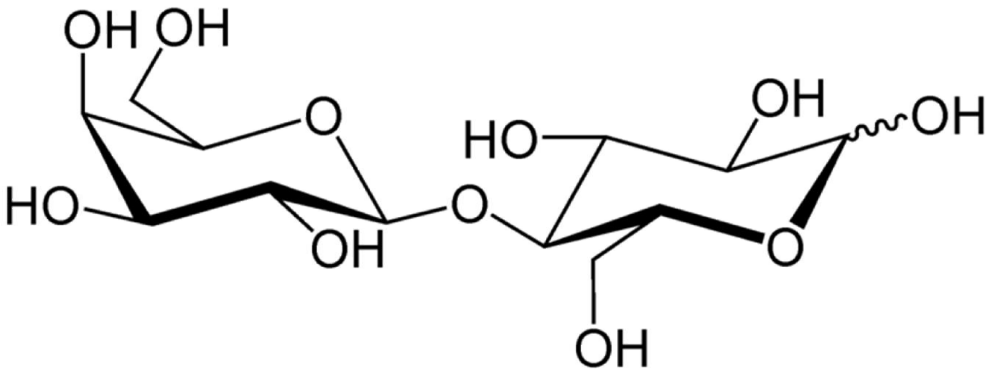
O temperaturi, kiselosti mlijeka,te količini soli ovisi stabilnost kazeina. Djelovanjem kiseline ili enzima kazein se taloži iz mlijeka, pa se tako može izdvojiti iz mlijeka. Svježe mlijeko sadrži malu količinu kazeina, dok skladištenjem mlijeko sadrži nešto više kazeina. Glavni proteini sirutke u kravljem mlijeku su α-laktoalbumini i β-laktoglobulini. Proteini sirutke su puno manji od kazeina, jednostavnije građe i hidrofilniji su. Neosjetljivi su na djelovanje kiselina ili enzima, ali su osjetljivi na djelovanje topline (Tratnik,1998.).

2.1.3.2. VODA

Voda se u mlijeku nalazi u udjelu od 86% do 89%. Voda se u mlijeku nalazi u dva oblika,uglavnom kao slobodna voda,a malim udjelom kao vezana voda (4 do 12% od ukupne). Vezana voda adsorbirana je na pojedine sastojke mlijeka: na kazein (50%), na proteine sirutke (30%), na membranu masne globule (15%), na laktozu i ostale sastojke (5%). Najveću sposobnost vezivanja vode imaju fosfolipidi mlijeka i albumini, te kazein, laktoza i ostali proteini sirutke (Tratnik,1998.).

2.1.3.3. MLIJEČNI ŠEĆER

Laktoza ili mliječni šećer je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) koji se nalazi u mlijeku sisavaca. Laktoza nastaje u mliječnim žlijezdama, a sastavljena od molekula *α-D-glukoze i* β-D-galaktoze. U mlijeku se nalazi u udjelu od 4,6 do 4,9%. Pojavljuje se u *α i* β obliku.



Slika 2 Laktoza [5]

Laktoza je manje topljiva i manje slatka u odnosu na saharozu i druge šećere. Ona je lako probavljiva, te je pogodna i za dijabetičare, olakšava razgradnju proteina i masti, te potpomaže apsorpciju Ca, P i Mg. Osobe s nedostatkom enzima β-galaktozidaze je teško podnose i kod njih uzrokuje dijareju (Tratnik,1998.).

2.1.3.4. MLIJEČNA MAST

Mliječna mast je najveći izvor energije u mlijeku. Nalazi u obliku globula obavijenih apsorpcijskim slojem ili membranom koja ju stabilizira u sredini. Sastoji se uglavnom od triacilglicerola, nešto fosfolipida i neznatno sterola. Ostali sastojci mliječne masti nalaze se u malim udjelima i značajni su za hranjivu vrijednost ili senzorska svojstva mlijeka, a to su:

- vitamini topljivi u masti (A,D,E i K)
- karotenoidni pigmenti (β-karoten)
- proteini vezani za fosfolipide (lipoproteinski kompleks)
- proteini apsorbirani na membranu masti (proteini plazme)
- enzimi
- mineralne tvari
- sastojci arome
- vezana voda (Tratnik,1998.).

2.1.3.5. MINERALNE TVARI

Mlijeko sadrži oko 40 različitih mineralnih tvari,a nalaze se u udjelu od 0,6% do 0,8%. Mikroelementi (Zn, Fe, Cu, Si, I, Al, Br i drugi) se nalaze u tragovima, dok se makroelementi nalaze u mlijeku u obliku organskih i anorganskih soli. Veći udjel mineralnih tvari se nalazi u obliku topljivih disociranih ili nedisociranih anorganskih soli, uglavnom klorida, fosfata i citrata. Mineralne tvari mogu se naći i u ionskom, molekularnom ili koloidnom obliku. Omjer Ca/P je kao u kosturu ljudskog organizma u omjeru 1,2 do 1,4 **:** 1,0 (Tratnik,1998.).

2.2. KOZJE MLIJEKO

Svježe kozje mlijeko, proizvedeno od zdravih životinja je bijele boje, karakterističnog mirisa i slatkastog okusa. Sastav kozjeg mlijeka ovisi o pasmini, laktaciji i godišnjem dobu. Kozje mlijeko je zdravije od kravljeg mlijeka [6].



Slika 3 kozje mlijeko [18]

2.2.1. SASTOJCI KOZJEG MLIJEKA

Organoleptička svojstva i sastav kozjeg i kravljeg mlijeka su u osnovi vrlo slični. Kozje mlijeko ima karakterističan okus i miris koji potječe od kapronske,kaprilne i kaprinske masne kiseline (Antunac, 2009.).

Tablica 3 Osnovni sastojci kozjeg mlijeka [8]

SASTOJAK	UDIO (%)
Voda	**86,0**
Mliječna mast	**4,5**
Mliječni šećer	**4,5**
Bjelančevine	**4,2**
Mineralne tvari	**0,8**

2.2.1.1. MLIJEČNA MAST

Mliječna mast čiji udio varira između 2,5 do 4,5%, u mlijeku se nalazi dispergirana u obliku masnih globula. Mliječna mast u kozjem mlijeku raspršena je u sitnije globule (2 do 3 mikrometra) dok su u kravljem mlijeku veće globule (3 do 8 mikrometra). Ta veličina globula određuje probavljivost mlijeka. Kozje mlijeko ima veći sadržaj kratko i srednje lančanih masnih kiselina. U sastavu masti mlijeka nalazi se i konjugirana linolna kiselina, višestruko nezasićena masna kiselina. Od ukupne količine masnih kiselina u mliječnoj masti kozjeg mlijeka, 67% su zasićene masne kiseline [9].

2.2.1.2. PROTEINI

Kozje mlijeko je prema udjelu proteina vrlo slično kravljem mlijeku,a razlike su utvrđene u aminokiselinskom sastavu i relativnom odnosu pojedinih vrsta proteina. Proteini kozjeg mlijeka probavljiviji su od proteina kravljeg mlijeka, a apsorpcija aminokiselina je učinkovitija. Kazein čini 75,6% ukupnih bjelančevina (Antunac, 2009.).

2.2.1.3. VITAMINI I MINERALNE TVARI

Sadržaj mineralnih tvari u kozjem i kravljem mlijeku je dosta sličan. Kozje mlijeko sadrži više kalcija i kalija, te više vitamina B_6, vit. A i niacina. Ono sadrži više antioksidanta selena od kravljeg mlijeka,ali zato sadrži manje folne kiseline važne u sintezi hemoglobina (Antunac, 2009.).

2.2.1.4. LAKTOZA

Kozje mlijeko sadrži manji udio laktoze u odnosu na kravlje mlijeko. Udio laktoze se koristi za izračunavanje energetske vrijednosti mlijeka. Laktoza je vrlo bitna,jer pomaže apsorpciju kalcija (Antunac, 2009.).

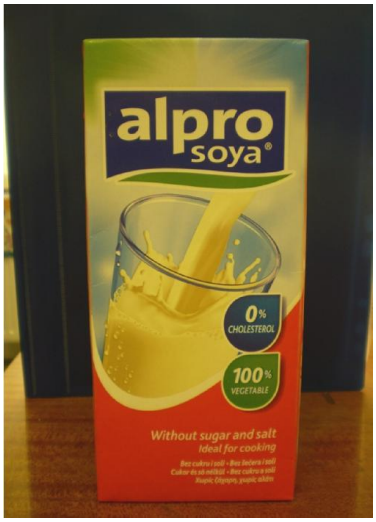
2.2.2. TERAPIJSKE VRIJEDNOSTI

Kozje mlijeko karakterizira i značajna terapeutska vrijednost za ljudsko zdravlje,a često se preporuča osobama alergičnim na protein kravljeg mlijeka (β-laktoglobulin). Terapijski probiotik u kozjem mlijeku zbog svoje bioiskoristivosti preporuča se kod plućnih bolesti, za rast kostiju i vezivnog tkiva, čira na želucu i povećanja koncentracije i količine želučane kiseline. Kozje mlijeko osigurat će adekvatan unos kalcija, prirodno će stimulirati imunitet, te popraviti opće stane organizma (Antunac, 2009.).

2.3. SOJINO MLIJEKO

2.3.1. SVOJSTVA I NUTRITIVNA VRIJEDNOST SOJINOG MLIJEKA

Sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna ili fina emulzija sojinog brašna odnosno izoliranih sojinih proteina u vodi s dodatkom vitamina, mineralnih tvari i arome. U užem smislu sojino mlijeko je vodeni ekstrakt sojinog zrna. Bjelkasta emulzija/suspenzija koja sadrži u vodi topljive proteine, ugljikohidrate i većinu ulja sadržanog u sojinom zrnu. Najveći nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka je sirov okus, koji potječe od nekih aldehida i ketona. Heksanal i heptanal nastali oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksigenaza, a tih sastojaka nema u cijelom zrnu već nastaju pri meljavi [8].



Slika 4 sojino mlijeko [19]

Sojino mlijeko je izvrstan izvor bjelančevina, ugljikohidrata i kvalitetnih masnoća. Isto tako, sojino mlijeko sadrži izoflavone, biljne hormone koji djeluju kao antioksidansi i imaju povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Sojini proteini, sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline potrebne za prehranu čovjeka. Potpuno su bez kolesterola i imaju manji udjel masti što čini sojine proteine nutritivno vrijednima i potrošaču pružaju kvalitetnu zamjenu za životinjske proteine (Božanić, 2006.).

2.3.2. USPOREDBA SASTAVA KRAVLJEG I SOJINOG MLIJEKA

Sojino mlijeko sadrži više vode od kravljeg, a i ostali sastojci se razlikuju. Proteine sojinog mlijeka pretežno čini glicin i neke druge proteinske frakcije, a proteine kravljeg mlijeka čini pretežno kazein. Ugljikohidrati u kravljem mlijeku uglavnom su u obliku laktoze,a u sojinom mlijeku su oligosaharidi rafinoza i stahioza. Kravlje mlijeko sadrži veće udjele kalcija i fosfora, ali je siromašno željezom, dok sojino mlijeko sadrži 10 puta više željeza u odnosu na kravlje mlijeko, ali je bioiskoristivost manja (Božanić, 2006.).

2.4. MED

Med je sladak i gust sok što ga pčele medarice tvore od nektara koji skupljaju na cvjetovima ili slatkim izlučevinama (medene rose) nekih kukaca. Med je najsavršeniji proizvod prirode, u njemu se nalaze gotovo svi sastojci koji grade ljudski organizam. Nektar koji pčele skupljaju iz cvijeća glavni je izvor ugljikohidrata koje pčele pretvaraju u lako probavljivi slador-glukozu i fruktozu, koji je glavni sastojak meda. Zreli med ne sadrži više od 15% vode, apčele ga u saću pokrivaju voštanim poklopcima i tako čuvaju od upijanja vlage i kvarenja. U medu se nalaze minerali, aminokiseline, visoko vrijedne organske kiseline kao što su mravlja, jabučna, limunska, octena, jantarna kiselina, pigmenti, razni derivati klorofila, vosak, inulin, te elementi kompleksa vitamina B. Radi sadržaja šećera med se svrstava u visokoenergetske namirnice, pa se njegova energetska vrijednost kreće od 12500 do 13600 kJ (2 800 do 3 200 kcal) (Bauer,1999.).

2.4.1. BAGREMOV MED

Bagremov med obično je tekući, svijetao, blagog mirisa i okusa. Jedan je od vrsti meda koji se sporo kristalizira, mjesecima ostaje u tekućem stanju zbog toga što u sastavu sadrži više fruktoze od glukoze. Med od bagrema preporučuje se kod nesanice, umiruje nadraženi živčani sustav, vrtoglavice i loš san (Bauer,1999.).



Slika 5 Bagremov med [19]

2.4.2. KESTENOV MED

Kestenov med obično je tamni i karakteristična mirisa, te gorkastog okusa. Med od kestena se preporučuje kod bolesti probavnih organa: želuca, crijeva, kod bolesti žući, a naročito jetre. Povoljno djeluje na cjelokupni probavni sustav.

Med od kestena pokazao je izvanredno dobro i pouzdano djelovanje u oporavku od žutice i poslije operacije žuči (Bauer,1999.).



Slika 6 Kestenov med [19]

2.5. PROBIOTICI

Probiotici su živi mikroorganizmi (tzv. „dobre bakterije“) koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne učinke na zdravlje domaćina. Mogu se koristiti kao pojedinačne ili kao mješovite kulture živih mikroorganizama. Primarno blagotvorno djelovanje imaju na crijevnu mikrofloru, uspostavljajući ravnotežu (između tzv. dobrih i loših bakterija). Probiotici ne mogu zamijeniti uništenu prirodnu tjelesnu floru, međutim kao privremene kolonije mogu pomoći organizmu obavljajući iste funkcije kao prirodna flora, dajući prirodnoj flori dovoljno vremena da se oporavi. Navedeno ne važi za *Lactobacillus* GG, koji je izoliran iz ljudskog organizma i vraća se u svoje prirodno stanište, te je puno učinkovitiji [13].

Najčešće korišteni probiotici su različite vrste roda ***Bifidobacterium i Lactobacillus*** poput:

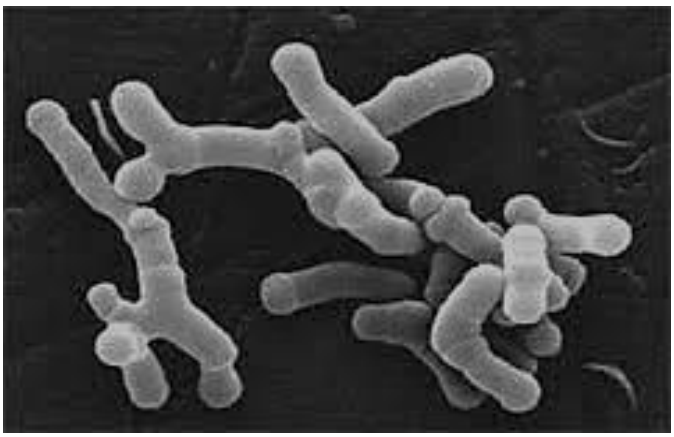
- ***Bifidobacterium bifidum***
- ***Bifidobacterium breve***
- ***Bifidobacterium infantis***
- ***Bifidobacterium longum***
- ***Lactobacillus acidophilus***
- ***Lactobacillus plantarum***
- ***Lactobacillus reuteri***
- ***Lactobacillus rhamnosus***
- ***Lactobacillus rhamnosus* soj GG**
- ***Lactobacillus fermentum***

2.5.1. BIFIDOBAKTERIJE

Bifidobakterije su G (+), anaerobne, nepokretne i nesporogeni štapići različitog morfološkog oblika. Poznate su 24 vrste bifidobakterija, koje se međusobno razlikuju po DNA-hibridizaciji, transketolaznim izoenzimima i imunokemijskim faktorima. Bifidobakterije su uobičajeni stanovniciljudskog probavnog sustava,te mogu ometati rast patogenih bakterija (Malija,1993.).

2.5.2. BIFIDOBACTERIUM LONGUM

Bifidobacterium longum je jedna od najvažnijih stanovnika u ljudskom organizmu, a nastanjuje ljudski gastrointestinalni trakt. Ova bakterija je vrlo korisna,jer održava normalnu probavu, sprječava rast štetnih bakterija i jača imunološki sustav.

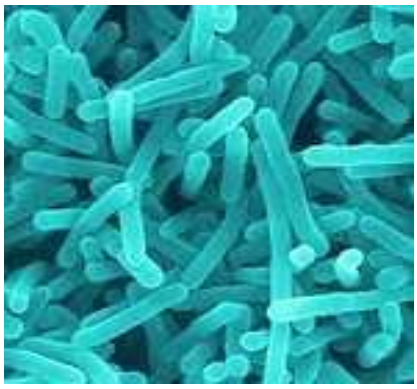


Slika 7 *Bifidobacterium longum* [15]

Bifidobacterium longum fermentira šećere u mliječnu kiselinu, a to pomaže da se snizi pH u crijevima. Ljudska prehrana se obogaćuje tim mikrobima,a takve namirnice se nazivaju probioticima. Bakterije mliječne kiseline se mogu uzimati osim u prehrani u obliku praha,tableta ili tekućeg ekstrakta, a osobito se preporučuju pacijentima koji imaju probleme s probavnim traktom ili uzimaju antibiotike (Malija, 1993.).

2.6. BAKTERIJA LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeria monocytogenes je G (+) bakterija, pokretljiv i nekapsulirajući štapić. Raste u aerobnim uvjetima,a fakultativni je anaerob, optimalna temperatura rasta je od 30 do 37 °C, a pH vrijednost između 6 do 9. Tolerantna je na ekstremne uvjete okoliša, može rasti na samo 1 pa do 45 °C, a može preživjeti uz raspon pH od 4,3 do 10 i uz prisutnost 12% NaCl.



Slika 8 Listeria monocytogenes [17]

Iz krvi zaraženih životinja prvi put je izolirana prije više od 75 godina,a može se izolirati i iz tla, silaže i drugih okolišnih izvora. Dobro podnosi toplinu s obzirom da je bakterija koja ne stvara pore, a prilično je otporna na sušenje i zamrzavanje. *Listeria monocytogenes* uzrokuje akutnu bolest listeriozu, koja se manifestira u obliku meningitisa, encefalitisa i intrauterinih infekcija ili infekcija vrata maternice trudnih žena, što može biti uzrokom pobačaja. Listeria monocytogenes može biti prisutna u različitim prehrambenim proizvodima, u rizičnoj grupi se nalaze svježe, neprerađene namirnice kao što su mlijeko, meso i meki sirevi. Ovaj patogen se najčešće prenosi konzumacijom kontaminirane hrane, ali se može prenijeti i sa osobe na osobu ili inhalacijom. Bakterija ne smije biti prisutna u hrani, a namirnica iz koje se izolira *Listeria monocytogenes* smatra se zdravstveno neispravnom, pri čemu 3 do 6 vrsta uzrokuju infekcije kod ljudi i životinja, ali samo je *Listeria monocytogenes* važna kao patogen iz hrane [16].

3.1. ZADATAK RADA

Zadatak rada bio je u pripremljenim probiotičkim napitcima od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka uz dodatak bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 2 i 5%, tijekom 21 dana skladištenja svakih 7 dana (0, 7, 14 i 21), pratiti promjene fizikalno-kemijskih parametara. Uz to, na osnovi određivanja broja probiotičkih bakterija (CFU) i stupnja inhibicije patogene *Listeria monocytogenes* utvrditi koja vrsta fermentiranog mlijeka, te vrsta i udio meda daje najbolje rezultate.

3.2. MATERIJAL I METODE

Za pripremu probiotičkih napitaka korišteno je:

- kravlje mlijeko: kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano i djelomično obrano s 2,8% mm (proizvođač Vindija Varaždin),
- kozje mlijeko: kratkotrajno sterilizirano (UHT), homogenizirano, djelomično obrano s 3,2% mm (proizvođač Vindija Varaždin),
- sojino mlijeko: 2,2% masti (proizvođač Alpro Soya, Belgija).

Za inokulaciju mlijeka korištena je liofilizirana komercijalna DVS kultura:

- *Bifidobacterium longum* Bb-46 proizvođača laboratorij Christian Hansen, Copenhagen, Danska. Za inokulaciju je korišteno: 0,03g/100 mL uzorka

Kao prebiotički dodatak stimulacije rasta kulture, u sve tri vrste mlijeka korišteni su:

- Bagremov med (proizvođač Apimel, Hrvatska) u udjelima 2 i 5%
- Kestenov med (proizvođač Apimel, Hrvatska) u udjelima 2 i 5%.

Kao patogena kultura korištena je čista kultura bakterije: ***Listeria monocytogenes*** .

3.2.1. PRIPRAVA UZORKA I DODATNOG MATERIJALA

Uzorci od mlijeka (kravljeg, kozjeg, sojinog) uz dodatak mikrobne kulture, te bagremovog i kestenovog meda su pripremljeni prema tablici 4, nakon čega su inkubirani u termostatu 21 dan na 37 °C.

Tablica 4 Priprava uzoraka

Br.	Oznaka	Mlijeko			*B. longum* (g)	Med			
		Kravlje (mL)	Kozje (mL)	Soja (mL)		Bagrem (%)		Kesten (%)	
						3	5	3	5
1	Kr-0	200			0,06				
2	Kr-2%B	200			0,06	6 g			
3	Kr-5%B	200			0,06		10 g		
4	Kr-2%K	200			0,06			6 g	
5	Kr-5%K	200			0,06				10 g
6	Ko-0		200		0,06				
7	Ko-2%B		200		0,06	6 g			
8	Ko-5%B		200		0,06		10 g		
9	Ko-2%K		200		0,06			6 g	
10	Ko-5%K		200		0,06				10 g
11	So-0			200	0,06				
12	So-2%B			200	0,06	6 g			
13	So-5%B			200	0,06		10 g		
14	So-2%K			200	0,06			6 g	
25	So-5%K			200	0,06				10 g

3.2.1. PRIPRAVA FILTRATA BEZ STANICA

Iz uzorka za određivanje, odlije se po 30 mL u označene kivete,tako što se kiveta zajedno s čepom i uzorkom važe i zabilježi se njezina masa. Sljedeće kivete nadopunjavaju se na vagi uzorkom do iste mase. Kod centrifugiranja jedna kiveta se mora nadopuniti destiliranom vodom zbog ravnoteže tijekom centrifugiranja. Nakon 15 minuta centrifugiranja na 2200 g, čisti supernatant se sterilizira membranskom filtracijom.

3.2.2. PRIPREMA FIZIOLOŠKE OTOPINE

U tikvicu od 1000 mL doda se 8,5 g NaCl i nadopuni destiliranom vodom do oznake i promućka. Fiziološku otopinu dodajemo u epruete koje se steriliziraju u autoklavu na 121 °C u trajanju od15 minuta.

3.2.3. PRIPREMA MUELLER HINTON AGARA

Mueller Hinton agar se rastopi u vodi i pripravi se 2 tikvice. Mueller Hinton agar se izvaže, prenese u boce sa čepom, rastopi dodatkom destilirane vode, te zagrijava u mikrovalnoj pećnici uz povremeno mućkanje i otvaranje čepa boce da se ispusti para i kako ne bi došlo do puknuća boce.

Dobro otopljeni agar se razlije u odgovarajući broj epruveta po 10 mL i sterilizira u autoklavu na 121 °C, 15 min. Prije upotrebe sadržaj se otopi u vodenoj kupelji (100 °C), ohladi na temperaturu od oko 45 °C i dobro se promućka. Nakon dodatka patogene kulture raspodijeli se u sterilne Petrijeve zdjelice.



Slika 9 Priprema agara



Slika 10 Zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici



Slika 11 Ulijevanje agara u epruvete



Slika 12 Sterilizacija u autoklavu agara u epruvetama i tipseva za pipetiranje



Slika 13 Zagrijavanje steriliziranog agara u vodenoj kupelji na 100 °C



Slika 14 Održavanje agara u tekućem stanju

3.2.4. PASTERIZACIJA MEDA

Provodi se u vodenoj kupelji na 70 °C / 30 min, nakon čega se ohladi i čuva u hladnjaku.

3.2.5. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI

Prije samog određivanja treba se baždariti pH metar puferima poznate vrijednosti (pH 4,00 i pH 7,00). U 7 označenih kiveta odlije se po 10 mL uzorka, a određivanje se provodi tako da se u svaku kivetu uroni elektroda, a nakon zvučnog signala očita se pH i elektrokemijski potencijal. Između mjerenja elektrodu je potrebno isprati i ako uređaj to zahtjeva, ponovno i baždariti.



Slika 15 Uzimanje uzoraka za mjerenje pH vrijednosti u sterilnim uvjetima



Slika 16 Mjerenje pH uzorka

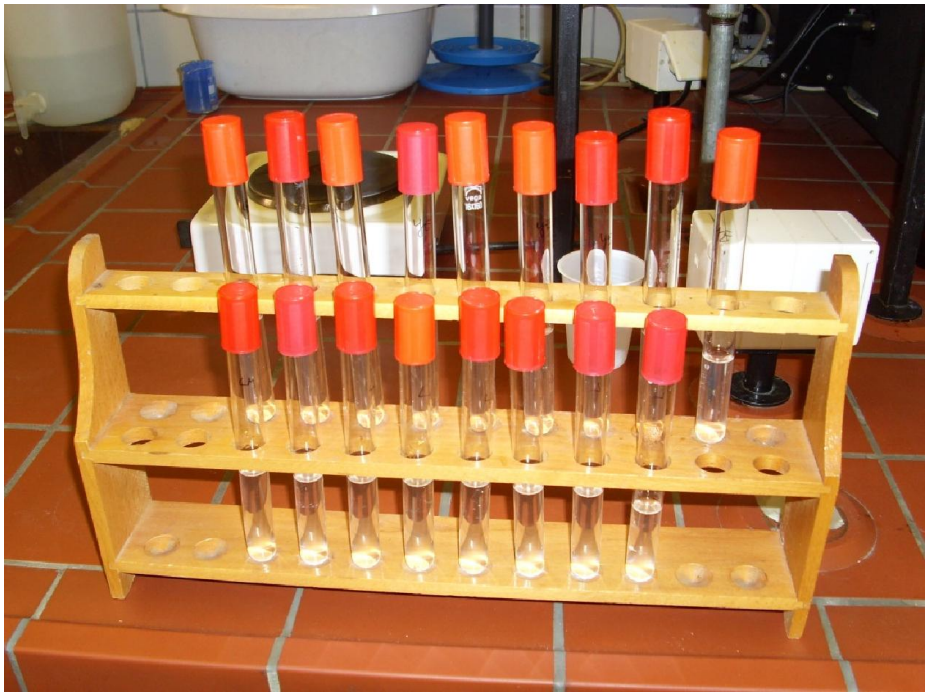
3.2.6. ODREĐIVANJE TITRACIJSKE KISELOSTI

Nakon prethodnog određivanja, uzorak se razrijedi s destiliranom vodom (10 mL). U Erlenmayerovu tikvicu se doda 2 do 3 kapi fenolftaleina i titrira se s 0,1 M NaOH do pojave boje (svijetlo ružičasta boja postojana nekoliko sekundi). Tada se očita utrošeni volumen NaOH koji se koristi u izračunu:

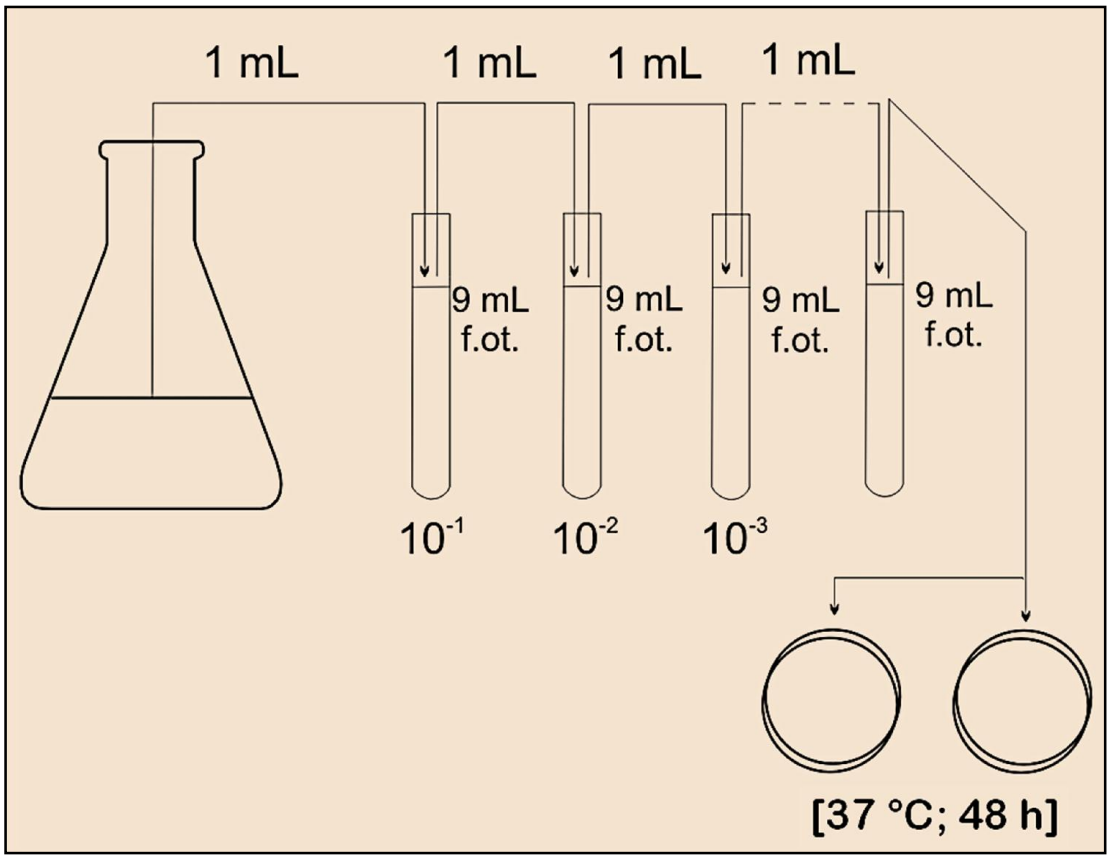
- **stupanj kiselosti po Soxhlet-Henkelu (°SH) = volumen NaOH (mL) × 2**
- **% mliječne kiseline = °SH × 0,0225**
-

3.2.7. PRIPREMA SUSPENZIJE BAKTERIJSKIH STANICA *L. monocytogenes*

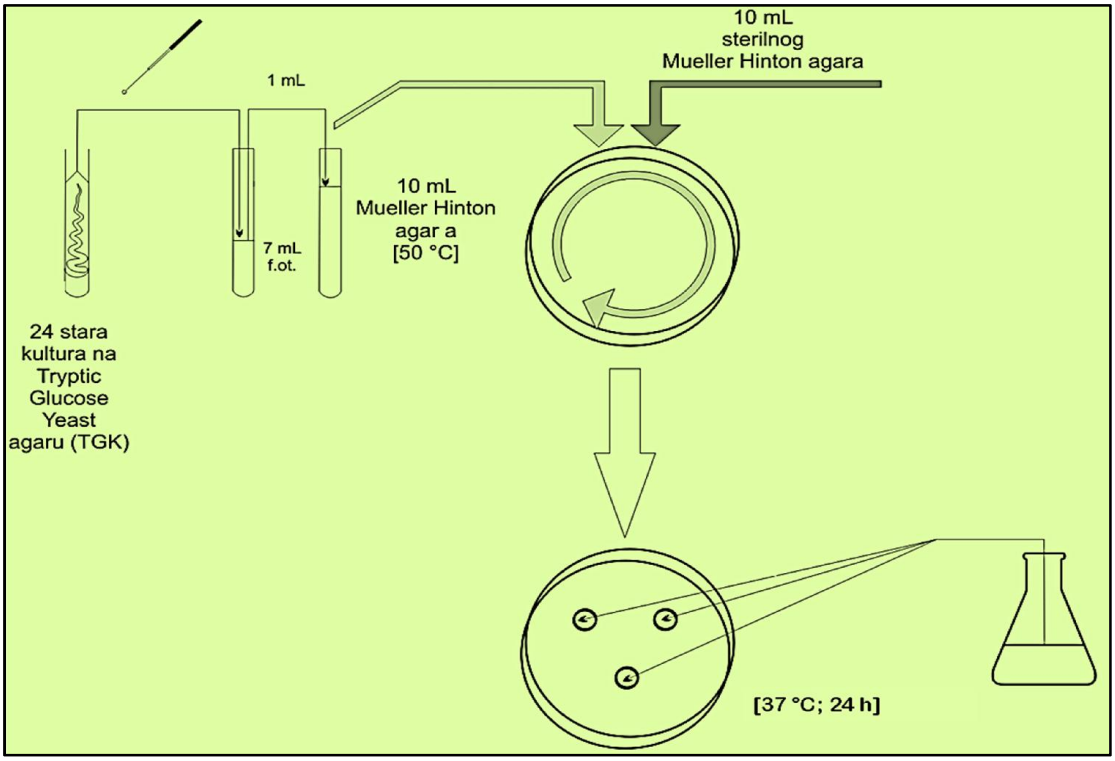
Čista kultura bakterije uzgojena je na kosom Tryptic Glucose Yeast Agaru (TGK, Biolife, Italija) tijekom 24 sata na 37 °C. Prije ispitivanja stupnja inhibicije, čista kultura je regenerirana svakodnevnim precjepljivanjem na kosi TGK agar i inkubirana 24 sata na 37 °C, te je pripremljena suspenzija bakterijskih 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).



Slika 17 Suspenzije patogene bakterije *Listeria monocytogenes*



Slika18 Shematski prikaz pripreme razrjeđenja uzoraka



Slika 19 Shematski prikaz određivanja stupnja inhibicije

3.2.8. ODREĐIVANJE BROJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA (CFU)

Prvo se Petrijeve zdjelice moraju označiti oznakama uzorka i danom u kojem se određuje CFU (Colony Forming Unit). Rade se 2 paralele. Iz uzorka se prenese odgovarajući volumen pipetom u epruvetu sa fiziološkom otopinom, homogenizira se i pipetom opet prenosi u drugu epruvetu s fiziološkom otopinom, sve dok se ne postigne željeno razrjeđenje. Uzorak se potom prenese pipetom u petrijevu zdjelicu, ulije se rastopljeni Muller Hinton agar i laganim kružnim pokretima promiješa. Postupak se ponavlja na isti način za ostale uzorke s određenim postotkom i vrstom meda. Nakon skrućivanja agara, petrijeve zdjelice sa oznakom se stave u anaerobni lonac, okrenute naopako. U lonac se doda vrećica u koju se doda zasićena otopina NaOH i 20 % otopine pirogalola u vodi, zatvori se i termostatira 48 h na 37 °C.

Broj probiotičkh 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 *Bifidobacterium longum* Bb-46 i izračunat je broj bakterija u 1 ml proizvoda, CFU (Colony Forming Units / broj živih stanica) prema formuli:

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

3.2.9. ODREĐIVANJE STUPNJA INHIBICIJE BAKTERIJE *Listeria monocytogenes*

Petrijeve zdjelice obilježimo s vrstom i postotkom meda i dana i to po 2 paralele. U svaku petrijevku se dodaje Mueller-Hinton agar: 1 nenacjepljena epruveta i 1 nacjepljena sa 1 mL suspenzije patogena. Lagano se promiješa nakon dodatka patogena, ostavi da se

podloga skrutne, te posebnim sterilnim bušačem čepova se režu i pincetom vade čepovi kako bi se u podlozi formirali otvori u koje se dodaje uzorak pipetom sljedećim slijedom:

Prvi otvor: nefermentirano mlijeko (bazni uzorak mlijeka), drugi otvor: fermentirano mlijeko (nulti uzorak), treći otvor: fermentirano mlijeko sa 2 % meda, četvrti otvor: fermentirano mlijeko sa 5 % meda.

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 u mL). Podloga je homogenizirana i ohlađena do skrutnjavanja.



Slika 20 Nacjepljivanje agara patogenom bakterijom u sterilnim uvjetima



Slika 21 Homogenizacija uzorka (agar + patogena bakterija)

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



Slika 22 Bušenje rupa u agaru



Slika 23 Uzimanje uzoraka za nacjepljivanje



Slika 24 Nacjepljivanje agara uzorkom

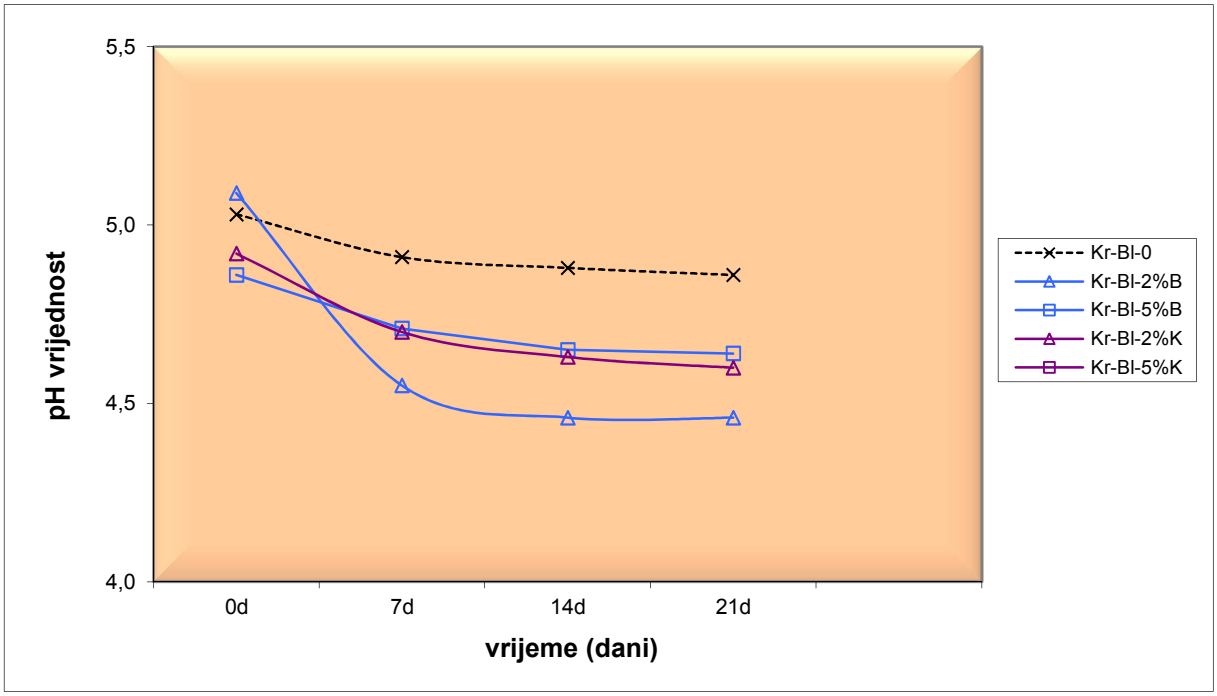


Slika 25 Inkubacija u termostatu

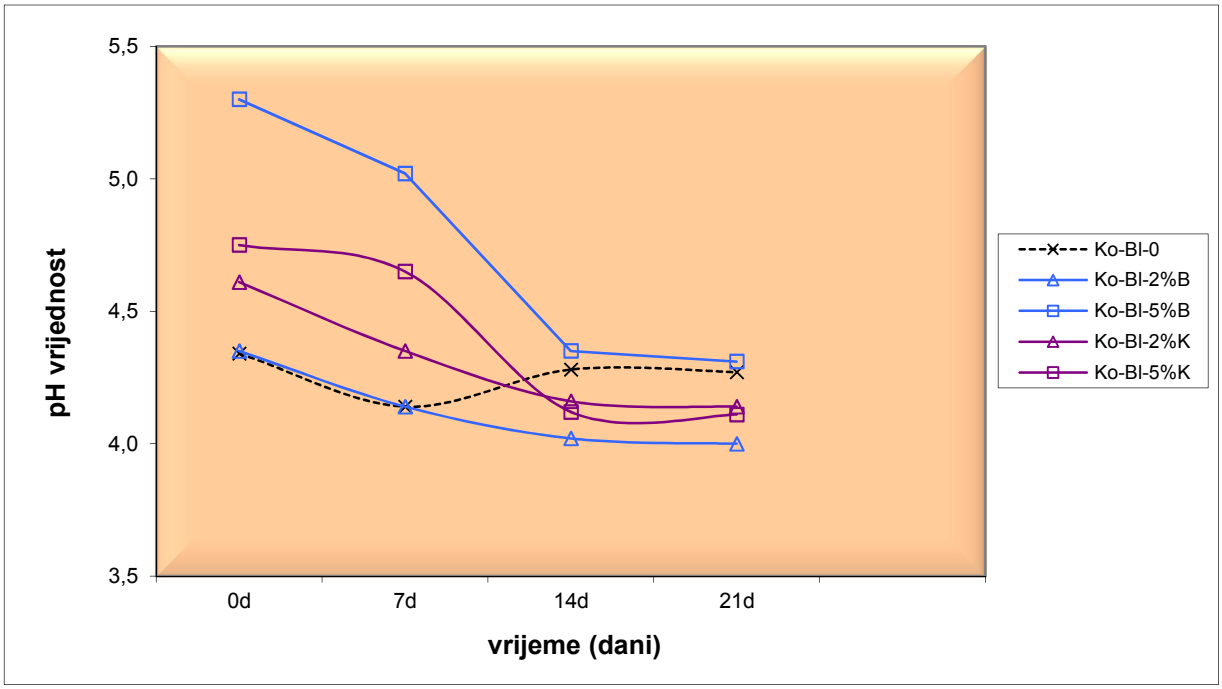
Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata na 37 °C, izmjerene su zone inhibicije kulture fermentiranim napitkom i izračunata je srednja vrijednost inhibicije. Inhibicija patogene bakterije fermentiranim napitkom ispitivana je u dva ponavljanja.

4.1. PRAĆENJE PROMJENA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM ČUVANJA FERMENTIRANOG MLIJEKA

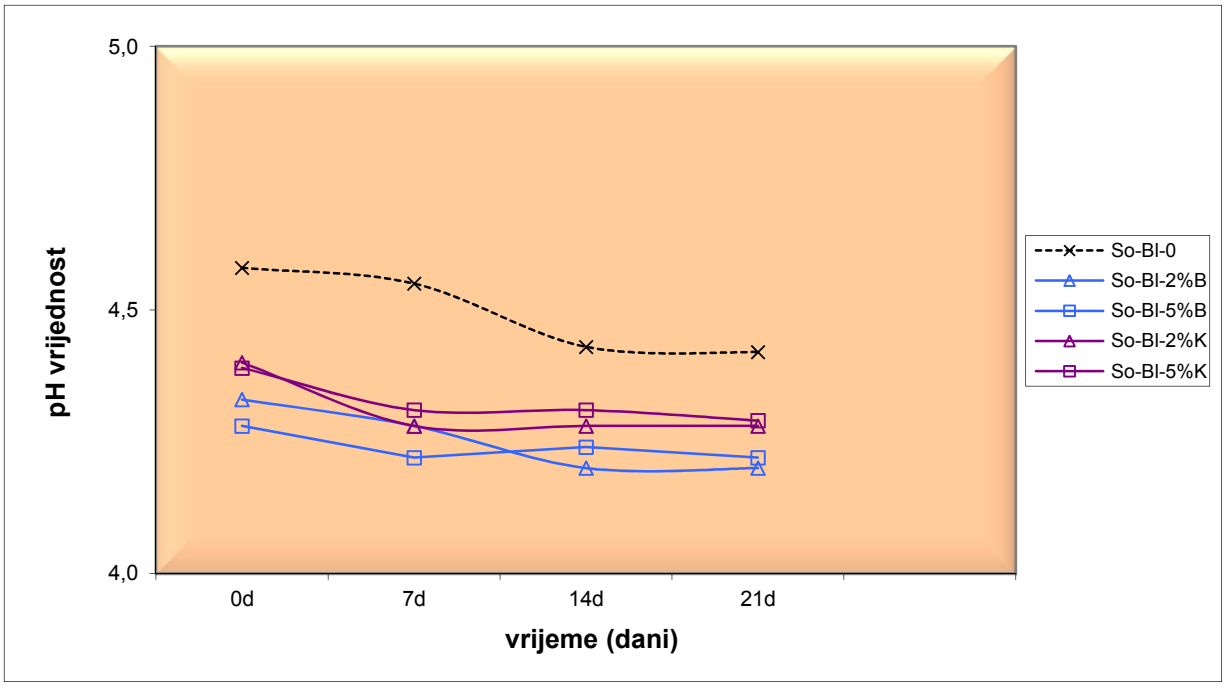
4.1.1. Promjene pH vrijednosti



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

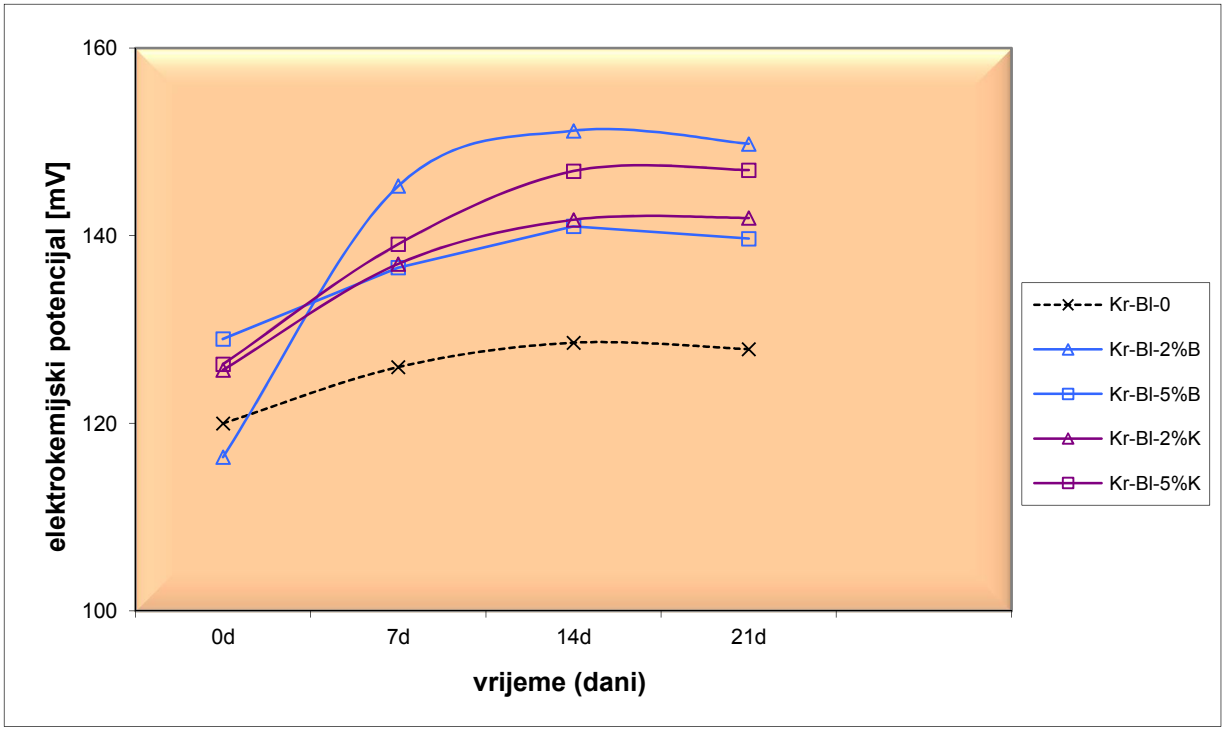


Slika 27 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

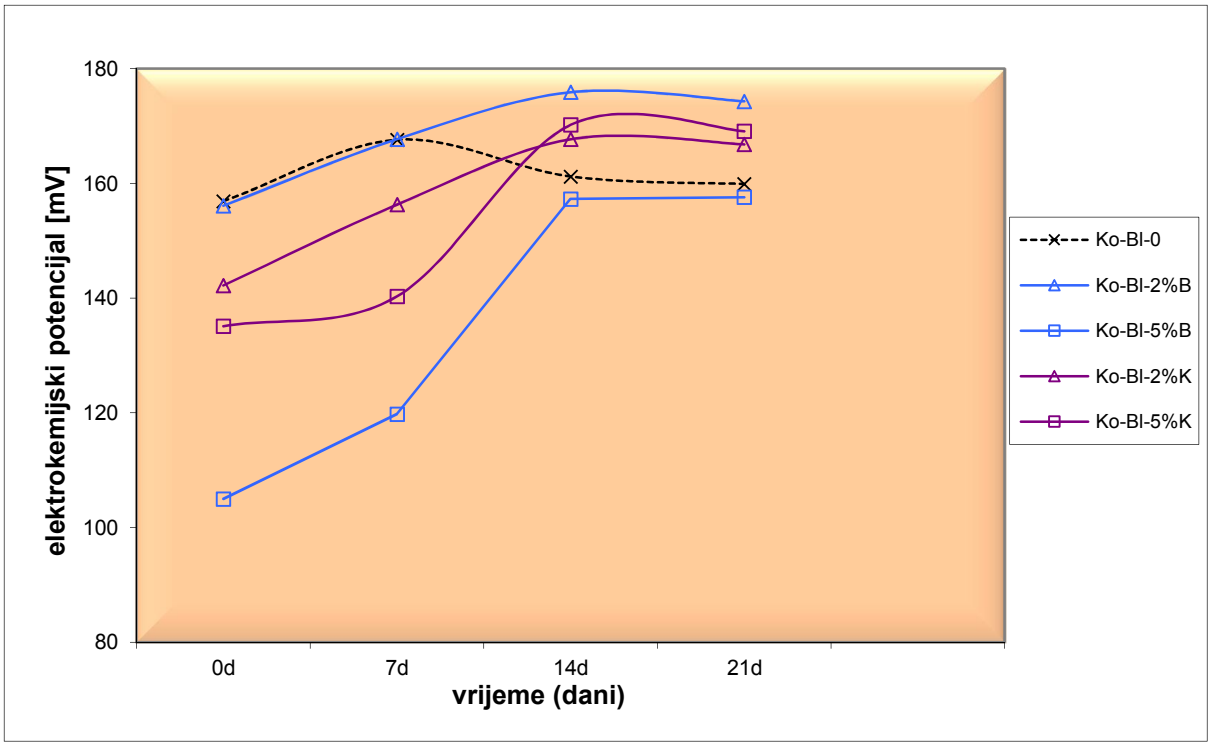


Slika 28 Promjena pH vrijednosti probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog meda tijekom čuvanja

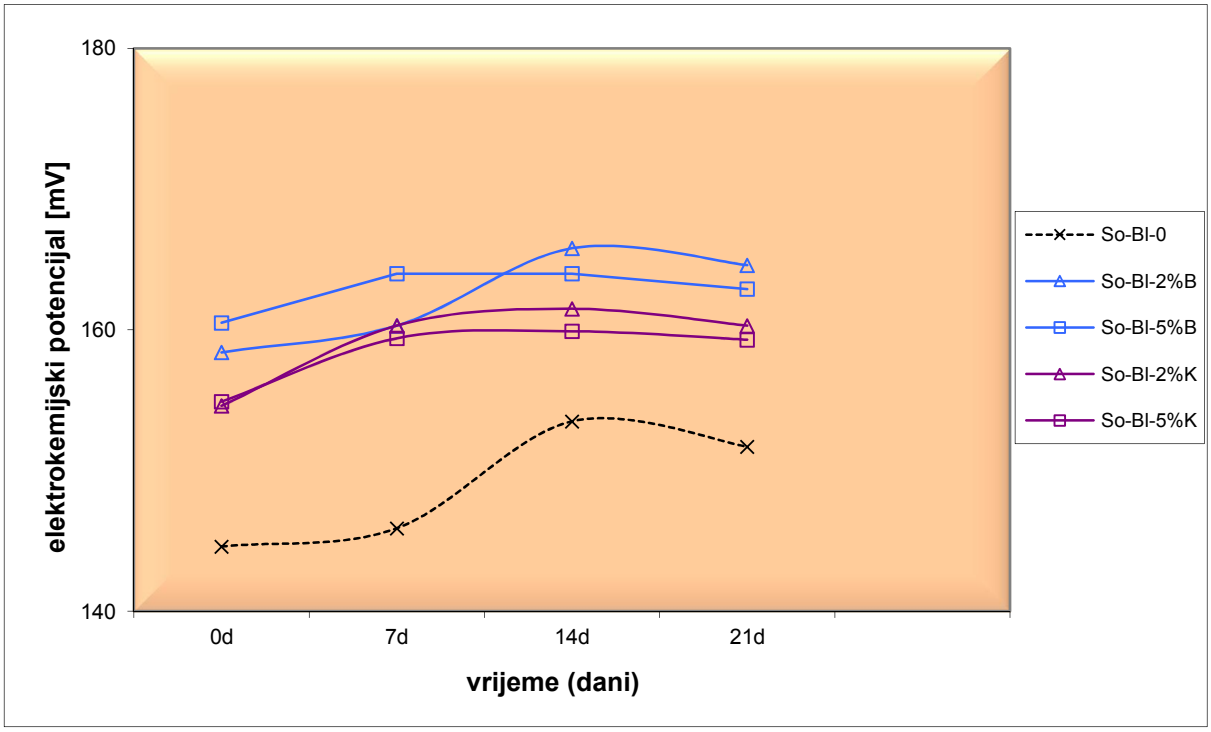
4.1.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala



Slika 29 Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

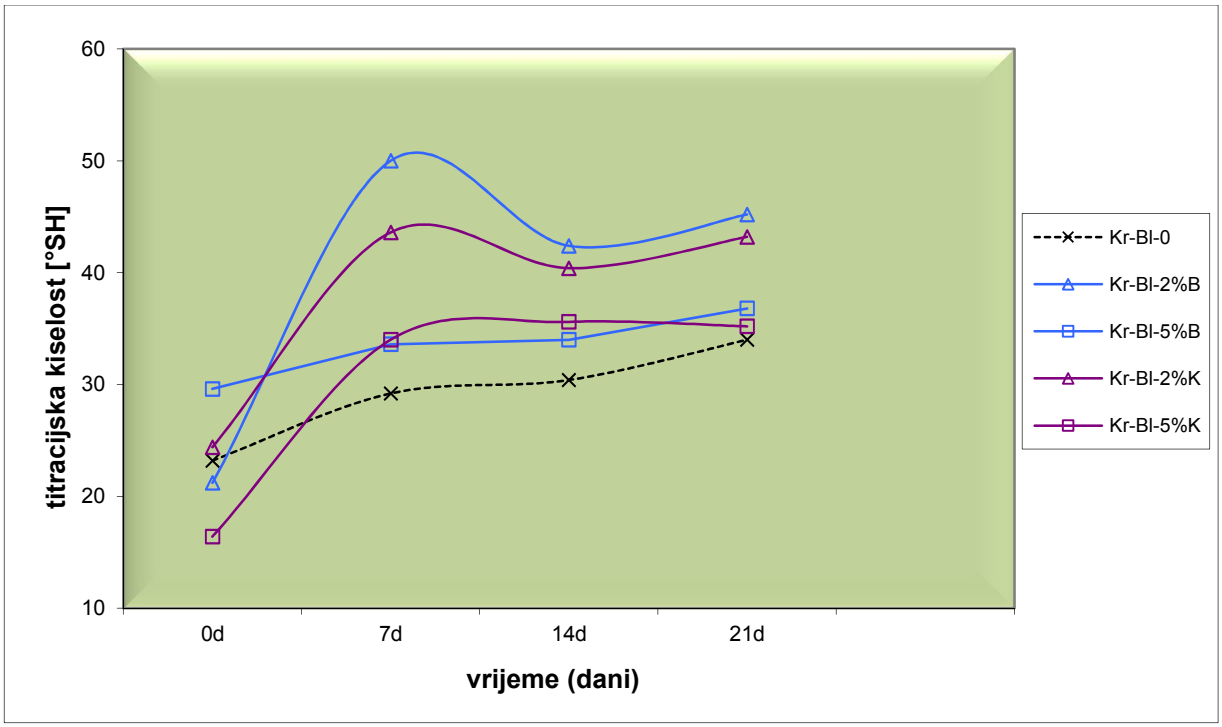


Slika 30 Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i sa dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

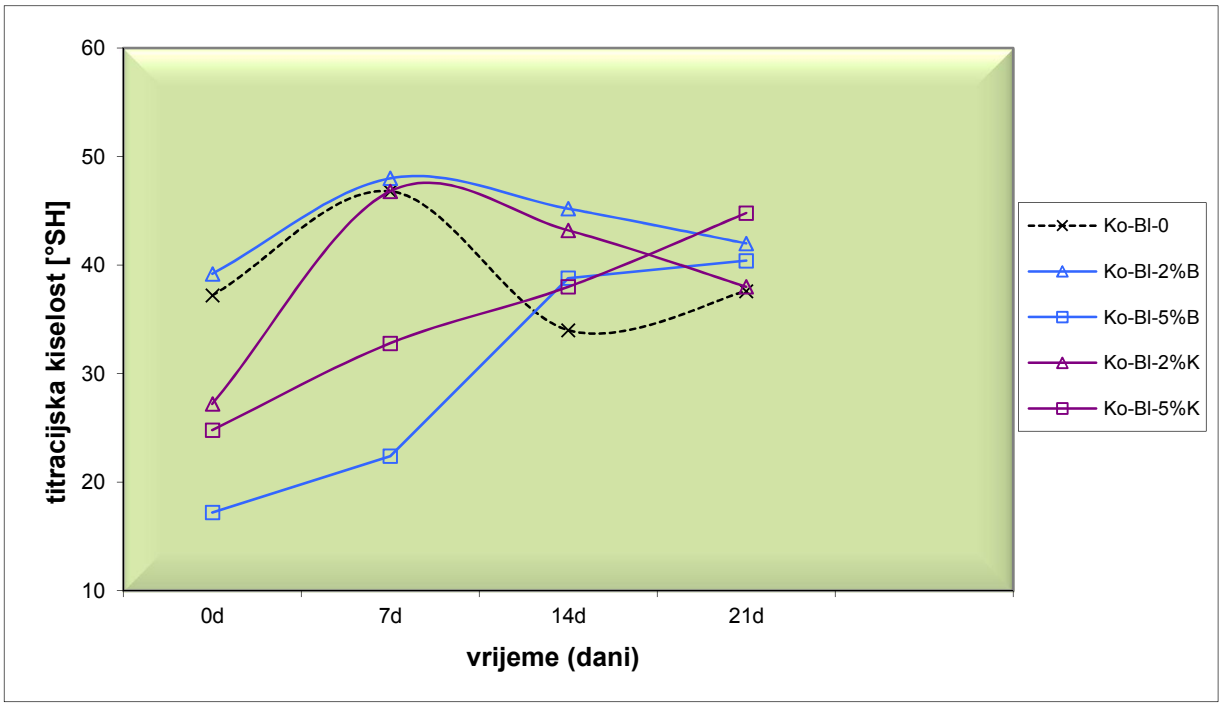


Slika 31 Promjena vrijednosti elektrokemijskog potencijala probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K)meda tijekom čuvanja

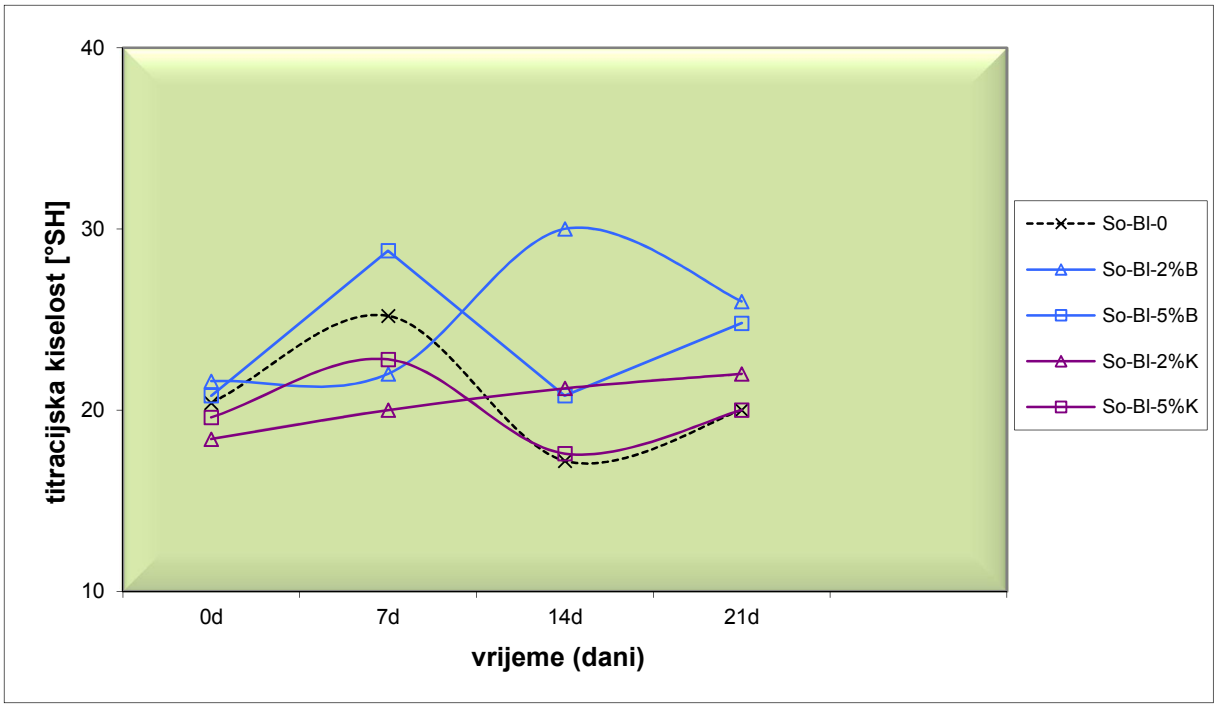
4.1.3. Promjene titracijske kiselosti



Slika 32 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

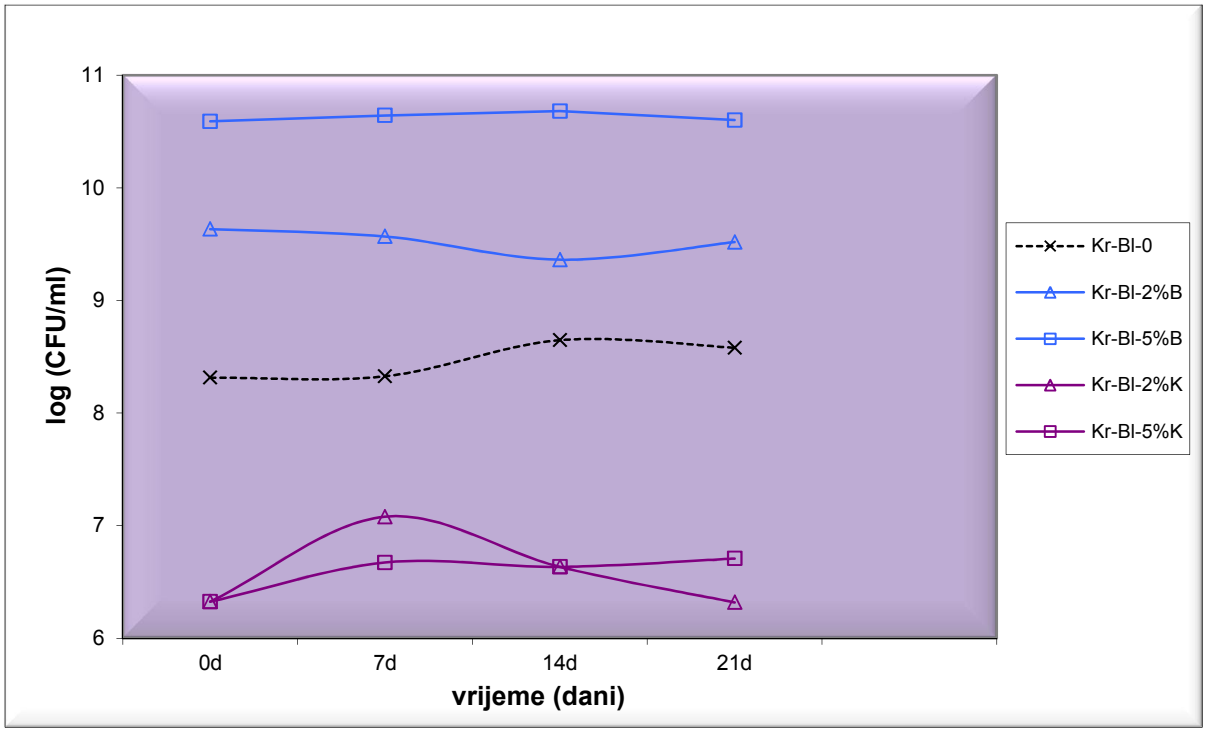


Slika 33 Promjena titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

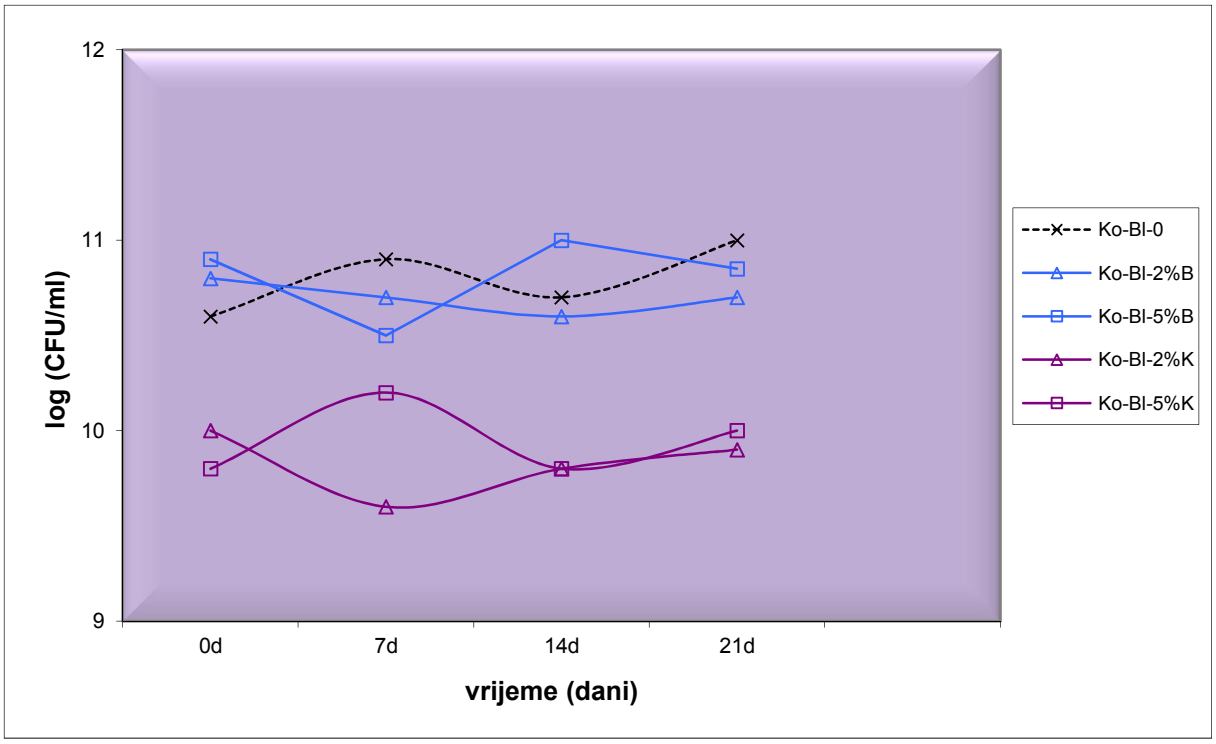


Slika 34 Promjene titracijske kiselosti (°SH) probiotičkih napitaka od sojinog mlijeka (So) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda tijekom čuvanja

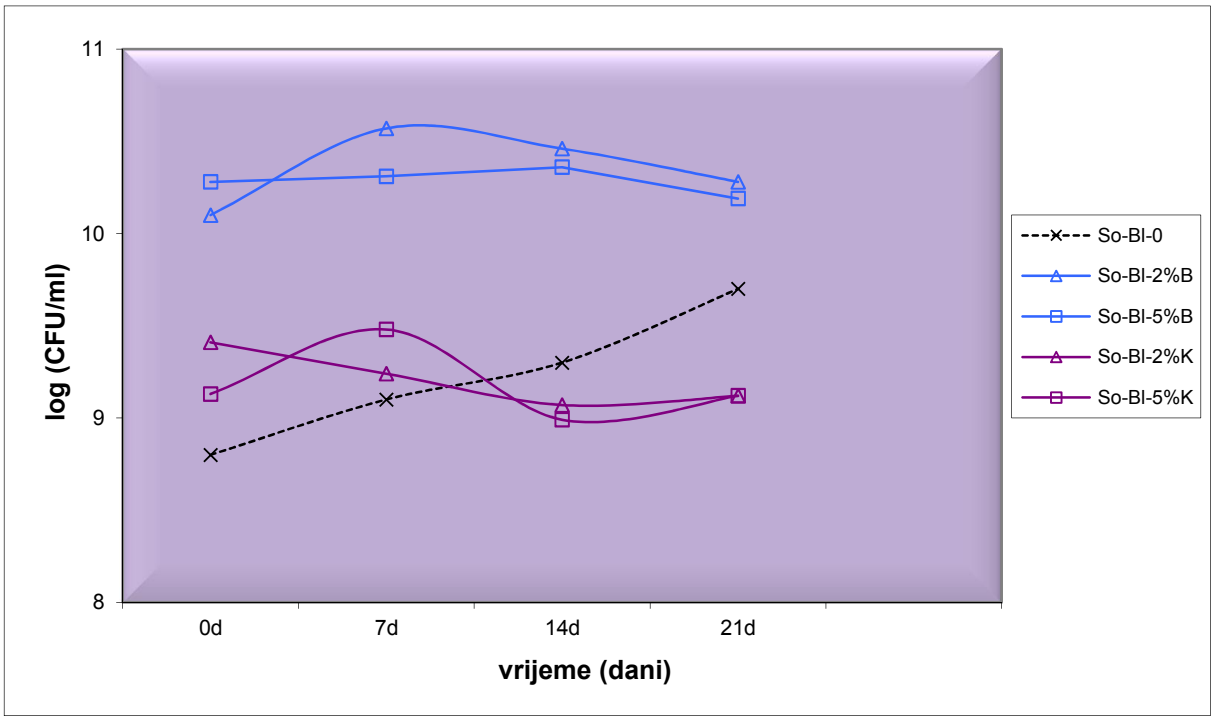
4.1.4. Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46



Slika 35 Promjene broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 tijekom čuvanja fermentiranog kravljeg mlijeka (Kr) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda



Slika 36 Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 tijekom čuvanja fermentiranog kozjeg mlijeka (Ko) bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda



Slika 37 Promjene broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 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 5 Inhibicija rasta test organizma *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom (Kr) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5%

UZORCI	Kr-0	Kr-2%B	Kr-5%B	Kr-2%K	Kr-5%K
0 dan	+	+	++	++	++
7 dan	++	+	+	++	++
14 dan	++	++	++	++	+++
21 dan	++	++	++	+++	+++

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

UZORCI	Ko-0	Ko-2%B	Ko-5%B	Ko-2%K	Ko5%K
0 dan	++	++	++	++	++
7 dan	++	++	+++	++	++
14 dan	++	++	++	++	+++
21 dan	++	++	+++	+++	+++

Tablica 7 Inhibicija rasta test organizma *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom (So) fermentiranim proizvodima bez i s dodatkom bagremovog (B) i kestenovog (K) meda u udjelima od 2 i 5%

UZORCI	So-0	So-2%B	So-5%B	So-2%K	So-5%K
0 dan	+	++	++	++	++
7dan	++	++	++	++	++
14 dan	++	++	++	++	+++
21 dan	-	+	++	+++	+++

Legenda:

− nema zone inhibicije

± djelomična inhibicija

+ vrlo slaba inhibicija (teška za mjerenje)

++ jasna zona inhibicije < 15 mm

+++ jasna zona inhibicije > 15 mm

5.1. Promjene pH vrijednosti tijekom čuvanja

Praćenje promjena pH vrijednosti tijekom tri tjedna čuvanja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih monokulturom *Bifidobacterium longum* Bb-46, uz dodatak bagremovog i kestenovog meda u udjelima od 2 i 5%, dalo je različite rezultate.

Promjene pH vrijednosti kod različitih vrsti mlijeka bez dodatka meda, bitno se razlikuju od ostalih uzoraka. pH vrijednost kravljeg mlijeka u prvih 7 dana čuvanja smanjila se sa 5,1 na 4,9; te se do kraja čuvanja smanjila do 4,8. Kod kozjeg mlijeka pH vrijednost se u početnih 7 dana čuvanja smanjila sa 4,4 na 4,2, te nakon 21 dan povećala se do 4,3. Praćenjem promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kod sojinog mlijeka utvrđen je nešto veći pad pH vrijednosti. U prvih 7 dana pH vrijednost se s 4,6 smanjila na 4,55; u idućih 7 dana na 4,4 zadržavajući tu vrijednost i 21. dan čuvanja. Uspoređujući sve tri vrste mlijeka, kozje mlijeko imalo je najnižu pH vrijednost u svim fazama čuvanja (**Slika 27**).

Dodatak dvije vrste meda, bagremovog (B) i kestenovog (K) u **kravlje mlijeko** fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46, rezultirao je padom pH vrijednosti, što je prikazano **slikom 26**. Dodatak kestenovog meda rezultirao je većim sniženjem pH vrijednosti od onoga u uzorcima s dodatkom bagremovog meda.

Dodatkom dvije vrste meda u **kozje mlijeko** fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46, utvrđeno je da se pH vrijednost se tijekom čuvanja smanjuje. Dodatak 5 % meda rezultirao je višom pH vrijednošću od uzoraka s dodatkom 2% meda, što je prikazano **slikom 27**.

Sojino mlijeko bez dodatka meda fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46, u prvih 14 dana pokazalo je značajniji pad pH vrijednosti. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan učinak. Snizili su pH sojinog mlijeka (na oko 4,3), te se ta vrijednost zadržala do kraja čuvanja (**Slika 28**).

5.2. Promjene vrijednosti elektrokemijskog potencijala tijekom čuvanja

Tijekom čuvanja sve tri vrste mlijeka fermentiranih s *Bifidobacterium longum* Bb-46, utvrđen je utjecaj na promjenu elektrokemijskog potencijala, prema vrsti i udjelima dodatka meda. Iz dijagrama promjene elektrokemijskog potencijala (**Slike 29, 30 i 31**), vidljivo je da krivulje gotovo u potpunosti obrnuto proporcionalno odgovaraju trendovima opadanja pH vrijednosti pri čuvanju tri vrste fermentiranog mlijeka.

Fermentacijom **kravljeg mlijeka** s *Bifidobacterium longum* Bb-46, dolazi do povećanja elektrokemijskog potencijala. Dodatak kestenovog meda rezultirao je većim povećanjem

elektrokemijskog potencijala od onoga u uzorcima s dodatkom bagremovog meda s 5% dodatka. Od toga značajno odstupa promjena kod uzorka s dodatkom 2% meda, kod kojega je porast izrazito veći.

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** može se uočiti potpuno ista promjena porasta elektrokemijskog potencijala za obje vrste meda u dva različita udjela kao kod kravljeg mlijeka (**Slika 30**).

Sojino mlijeko bez dodatka meda fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46 u prvih 14 dana čuvanja pokazalo je značajan porast elektrokemijskog potencijala. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan učinak. Povisili su elektrokemijski potencijal sojinog mlijeka (na oko 162), što se nije zamjetno promijenilo u posljednjih sedam dana skladištenja (**Slika 31**).

5.3. Promjene titracijske kiselosti tijekom čuvanja fermentiranih mlijeka

Intenzitet zakiseljavanja **kravljeg mlijeka** bio je veći kod uzoraka u koje je dodan kestenov med od onog s dodatkom 5% bagremovog meda, ali je kod uzorka s 2% bagremovog meda porast kiselosti bilo puno izraženije tijekom cijelog perioda čuvanja (**Slika 32**).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46, titracijska kiselost svih uzorka raste u prvih 7 dana, zatim se blago smanjuje i zadržava približno istu vrijednost do kraja čuvanja, uz manje oscilacije između 7 i 14 dana. U posljednjih 14 dana uzorak sa 2% bagremovog meda pokazao je manji pad intenziteta zakiseljavanja, a kod uzorka s 5% meda, obrnuto, intenzitet je blago rastao (**Slika 33**).

Intenzitet zakiseljavanja **sojinog mlijeka** bez dodatka meda fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46, znatno je niži od sojinog mlijeka s dodatkom bagremovog i kestenovog meda, u zadnjih 7 dana čuvanja. Tijekom čuvanja isprepliću se trendovi porasta za obje vrste meda u oba udjela (**Slika 34**).

5.4. Promjena broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 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 pojedinoj o periodu čuvanja.

Fermentacijom **kravljeg mlijeka** fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46, broj bakterija blago raste u prvih 14 dana čuvanja, a posljednjih 7 dana čuvanja broj bakterija malo opada (**Slika 35**).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46, prvih 7 dana broj bakterija raste, blago opada od 7. do 14. dana, te ponovo raste do kraja čuvanja. Broj bakterija približan je broju bakterija u uzorcima s dodatkom bagremovog meda, dok je kod dodatka kestenovog meda zabilježen manji broj bakterija tijekom cijelog perioda čuvanja (**Slika 36**).

Tijekom čuvanja **sojinog mlijeka** fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46, porast broja bakterija konstantan je i značajan od prvog do zadnjeg dana čuvanja. Kod uzoraka s dodatkom bagremovog meda broj bakterija u prvoj polovici čuvanja raste, zatim blago opada do kraja čuvanja. U prvoj polovici čuvanja oba uzorka s dodatkom kestenovog meda broj bakterija veći je od uzorka bez dodatka meda, a u drugoj polovici broj bakterija manji u uzorcima s dodatkom kestenovog meda (**Slika 37**).

5.5. Usporedba stupnja inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kravljim, kozjim i sojinim mlijekom

Osnovni zadatak rada su usporedbe karakteristika fermentacije: kravlje/kozje/sojino mlijeko, zatim pH/inhibicija, CFU probiotičkih bakterija/inhibicija, dodatak bagremovog ili kestenovog meda, te utjecaj njihovih različitih udjela.

K**ravlje mlijeko** bez dodatka meda pokazalo je porast stupnja inhibicije bakterije *Listeria monocytogenes* od prvog dana do kraja čuvanja. Dodatak bagremovog meda u udjelima od 2% i 5% također je rezultirao inbicijom u prvih 14 dana, a 21. dan identično je porasla kod oba udjela meda. Uzorak s 5% kestenovog meda imao je vrlo izraženu inhibiciju u završnim fazama čuvanja (**Tablica 5**).

Tijekom čuvanja **kozjeg mlijeka** bez dodatka meda utvrđena je inhibicija bakterije *Listeria monocytogenes* identična s uzorkom s 2% bagremovog meda. Kod uzorka s 5% bagremovog meda jasnu zonu inhibicije izražena je 7. i 21. dan. Uzorci s dodatkom kestenovog meda od 2% pokazuju porast inhibicije nakon prvih 14 dana čuvanja, dok je taj porast kod uzorka s 5% kestenovog meda vrlo izražen zadnjih 14 dana (**Tablica 6**).

Sojino mlijeko bez dodatka meda pokazuje inhibiciju bakterije *Listeria monocytogenes* sa u prvih 14 dana čuvanja, dok 21. dan nema inhibicije. Uzorci sa udjelom od 2% i 5% bagremovog meda tijekom prvih 14 dana imali su izraženu inhibiciju, dok je nakon 21 dan kod uzorka sa 2% bagremovog meda, inhibicija oslabila. Kod uzorka s 2% kestenovog meda zona inhibicije je jasno izražena 14 dana, a 21. dan bila je značajno pojačana. Kod uzorka s 5% kestenovog meda nakon 7 dana inhibicija raste do kraja perioda čuvanja, uz stalo povećanje intenziteta (**Tablica 7**).

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

● Zakiseljavanje tri vrste mlijeka fermentiranih monokulturom *Bifidobacterium longum* Bb-46 tijekom čuvanja, odvijalo se različito za dvije vrste meda, pri čemu su i različiti utjecaji meda djelovali različito.

● Dodatak kestenovog meda tijekom fermentacije kravljeg mlijeka rezultirao je većim snižavanjem pH vrijednosti, u usporedbi s bagremovim medom. Kod kozjeg fermentiranog mlijeka, pH vrijednost se tijekom čuvanja kontinuirano smanjivala, kod obje vrste meda i s oba udjela dodatka meda.

● Sojino mlijeko bez dodatka meda fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46 u prvih 14 dana čuvanja pokazalo je značajan pad pH vrijednosti. Dodatak bagremovog i kestenovog meda u oba udjela pokazali su gotovo identičan učinak na pad pH vrijednost, koja se snižavala do kraja čuvanja.

● U istraživanju je utvrđeno da se opadanje broja živih stanica (CFU) u fermentiranim proizvodima tijekom čuvanja odvija različito i ovisno o vrsti mlijeka, vrsti i udjelu meda, te periodu čuvanja.

● Kod fermentiranog kravljeg mlijeka broj bakterija raste u prvih 14 dana čuvanja, a u zadnjih 7 dana zabilježen je blago opadanje.

● Tijekom čuvanja fermentiranog **kozjeg mlijeka**, prvih 7 dana broj bakterija raste, blago opada od 7. do 14. dana, te ponovo raste do kraja čuvanja. Broj bakterija približan je broju bakterija u uzorcima s dodatkom bagremovog meda, dok je kod dodatka kestenovog meda taj broj živih bakterija tijekom cijelog perioda čuvanja manji.

● Dodatak bagremovog meda u sojino mlijeko rezultirao je porastom broja živih stanica u usporedbi s dodatkom kestenovog meda i to u oba udjela.

● Probiotički napitak od kozjeg mlijeka s dodatkom kestenovog meda je pokazao najjači inhibicijski učinak u usporedbi s probiotičkim napitcima od kravljeg i sojinog mlijeka uz dodatak kestenovog meda, a jače je bio izražen kod udjela meda od 5%.

7. LITERATURA

1. J. Havranek, V. Rupić: Mlijeko od farme do mljekare. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2003.
2. Lj. Tratnik: Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb,1998.
3. www.coolinarka.com/namirnica/mlijeko (siječanj 2009.)
4. www.tehnologijahrane.com/mleko/hemija-mleka/kazein (travanj 2009.)
5. www.chemia.dami.pl (travanj 2009.)
6. www.agroportal.hr/proizvodnja kozjeg mlijeka (svibanj 2012.)
7. www.hmu.hr/N. Antunac: zašto kozje mlijeko (ožujak 2009.)
8. B. Miočić , V. Pavić : Kozarstvo. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb, 2002.
9. www.zdravakrava.hr/članak/1014/kozje mlijeko-hit-namirnica (svibanj 2012.
10. http://hrwikipedia.org/wiki/sojino mlijeko (siječanj 2009.)
11. R. Božanić: Proizvodnja,svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. **Mljekarstvo 56**, 233-254, 2006.
12. Lj. Bauer: Med, pčelarenje i običaji. Pučko otvoreno učilište. Zagreb,1999.
13. www.plivazdravlje.hr/aktualno/članak/10929/što su probiotici (2009.)
14. htpp//hrcak.srce.hr/ M. Malija: Probiotsko djelovanje Bifidobacterium vrsta. **Mljekarstvo 43**, 123-132, 1993.
15. https://microbewiki.kenyou.edu/Bifidobacterium longum (2010.)
16. http://hr.wikipedia.org/wiki/Listerioza (srpanj 2009.)
17. http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologija/bakterije/rod-listeria (rujan 2012.)
18. histria.hgk.hr (2009.)
19. www.alpro.com/hr (2009.)
20. www.apimel.hr (2009.)
21. www.hrvatski med.com (2007.)