Utjecaj dodatka meda na kinetiku fermentacije i antibakterijska svojstva probiotičkih fermentiranih mlijeka

Lučan, Mirela

Doctoral thesis / Disertacija

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:109:592948

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Mirela Lučan

UTJECAJ DODATKA MEDA NA KINETIKU FERMENTACIJE I ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA PROBIOTIČKIH FERMENTIRANIH MLIJEKA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, lipanj 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za mljekarstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK:

Znanstveno područje: biotehničke znanosti
Znanstveno polje: prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na IX. (devetoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek akademske godine 2008./2009. održanoj 30. lipnja 2009.
Mentor: dr. sc. *Jovica Hardi*, red. prof.
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Vedran Slačanac*, izv. prof.

UTJECAJ DODATKA MEDA NA KINETIKU FERMENTACIJE I ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA PROBIOTIČKIH FERMENTIRANIH MLIJEKA

Mirela Lučan, 4/04.

Sažetak:
Cilj istraživanja bio je ispitivanje utjecaja dodatka bagremovog i kestenovog meda na fermentacijsku aktivnost i rast bakterija *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium lactis* subs. *animalis* Bb12 u kravljem, kozjem I sojinom mlijeku. Također je ispitan i utjecaj dodatka meda na senzorsku kakvoću fermentiranih mlijeka, preživljavanje probiotičkih bakterija i naknadno zakiseljavanje tijekom čuvanja. Osim toga, ispitan je inhibicijski potencijal fermentiranog mlijeka s medom prema bakterijama *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. pH vrijednosti su mjerene pomoću pH metra, a broj živih stanica je određivan standardnom mikrobiološkom metodom na MRS agaru. Nelinearna procjena kinetičkih parametara je provedena pomoću modificiranog Gompertzovog modela bakterijskog rasta. Inhibicijski potencijal fermentiranih mlijeka na test mikroorganizme je ispitan metodom izbušenih rupica u agaru. Senzorska svojstva fermentiranih napitaka je ocijenila panel skupina od 5 senzorskih analitičara metodom bodovanja. Dobiveni rezultati pokazuju da su obje vrste meda utjecale na fermentacijsku aktivnost i broj probiotičkih bakterija tijekom fermentacije sve tri vrte mlijeka. U usporedbi s kravljim mlijekom, u kozjem i sojinom mlijeku je zabilježena veća kiselost i veći broj bakterija u svim fazama fermentacije. Nastanak zona inhibicije rasta je ovisio o vrsti i koncentraciji meda, kao i o tipu mlijeka. Kestenov med je općenito imao veći inhibicijski učinak od bagremovog meda. Dodatak meda je poboljšao senzorska svojstva svih fermentiranih proizvoda.

Ključne riječi: probiotičke bakterije; kravlje, kozje i sojino mlijeko; bagremov i kestenov med; kinetika fermentacije; inhibicijski učinak; senzorska ocjena
Rad sadrži: 179 stranica
74 slika
74 tablica
5 priloga
173 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. *Rajka Božanić*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb — predsjednica
2. prof. dr. sc. *Jovica Hardi*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek — voditelj
3. izv. prof. dr. sc. *Vedran Slačanac,* Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek — član
4. izv. prof. dr. sc. *Vinko Krstanović*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek — zamjena člana

Datum obrane: 27. lipnja 2014.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Kuhačeva 20, Osijek; Rektoratu sveučilišta u Osijeku; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Postgraduate University Study-Food Engineering

Department of Food Technologies
Subdepartment of Dairy Technology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
UDC:

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food technology
Course title:	Technology of milk and dairy products
Thesis subject	was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. 9 held on July 30, 2009.
Mentor:	*Jovica Hardi*, PhD, prof.
Technical assistance:	*Vedran Slačanac*, PhD, associate prof.

EFFECT OF HONEY ADDITION ON FERMENTATION KINETICS AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PROBIOTIC FERMENTED MILK

Mirela Lučan, 4/04.

Summary:
The aim of this research was to determine the stimulatory effect of acacia and chestnut honey addition on fermentation activity and growth of *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 and *Bifidobacterium lactis* subs. *animalis* Bb12 in cow, goat and soy milk. Effect of honey addition on the sensory quality of fermented milk, viability of probiotic bacteria and post-acidification during storage was also determined. Additionally, inhibitory potential of honey-sweetened fermented milk against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* strains was examined. In this study, the pH values were determined using a pH-meter, and viable count was determined by the standard microbiological methods on MRS agar. Nonlinear estimation of kinetics parameters was carried out according modified Gompertz model of bacterial growth. The inhibitory effects of fermented milk on indicator organisms were carried by agar well diffusion assay. The sensory properties of fermented beverages were evaluated by the panel group of 5 sensory analysts, using 20 points scoring system. Obtained results show that the both type of honey influenced on fermentation activity and number of the probiotic bacteria in all types of milk during fermentation. Compared to cow milk, higher acidity and CFU of probiotic bacteria were noted in the fermented goat and soy milk in all phases of the fermentation process. Development of zones of inhibition of growth depends on the type and concentration of honey, as well as on the type of milk. The chestnut honey had generally higher inhibitory effect than acacia honey. Addition of honey improved the sensory characteristics of all fermented products.

Key words:	probiotic bacteria; cow's, goat and soy milk; acacia and chestnut honey; fermentation kinetic; inhibitory effect; sensory evaluation
Thesis contains:	179 pages 74 figures 74 tables 5 supplements 173 references
Original in:	in Croatian

Defense committee:

1.	*Rajka Božanić*, PhD, prof., Faculty of Food Technology and Biotechnology Zagreb	chair person
2.	*Jovica Hardi*, PhD, prof., Faculty of Food Technology Osijek	supervisor
3.	*Vedran Slačanac*, PhD, associate prof., Faculty of Food Technology Osijek	member
4.	*Vinko Krstanović*, PhD, associate prof., Faculty of Food Technology Osijek	stand-in

Defense date: June 27, 2014.
Thesis is printed and electronic (pdf format) version is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Kuhačeva 20, Osijek; University of Osijek, President's office; University Library in Osijek; University Library in Zagreb.

Doktorska disertacija je izrađena u okviru istraživanja na znanstvenom projektu br. 113 1130475-0336 „Funkcionalna svojstva raznih vrsta mlijeka i sirutke fermentiranih probioticima“ glavnog istraživača prof. dr. sc. Jovice Hardija, financiranom od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Veliko hvala mojoj obitelji na ljubavi i podršci tijekom svih ovih godina!

Ovaj rad posvećujem svojim sinovima, Mateju i Šimunu,
koji daju smisao svemu što radim...

Sadržaj

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 5

2.1. ANTIMIKROBNI I BIOLOŠKI AKTIVNI SASTOJCI MLIJEKA I FERMENTIRANIH MLIJEČNIH PROIZVODA 6
2.1.1. PREGLED BIOAKTIVNIH SASTOJAKA KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA 7
2.1.1.1 Bioaktivni proteini i peptidi 9
2.1.1.2 Bioaktivni lipidni sastojci 18
2.1.1.3 Bioaktivni ugljikohidratni sastojci 22
2.1.1.4 Bioaktivni minerali i vitamini 24
2.1.2. SPECIFIČNI BIOAKTIVNI SASTOJCI SOJE I FERMENTIRANOG SOJINOG MLIJEKA 25
2.1.2.1 Proteini i peptidi 28
2.1.2.2 Lipidi 30
2.1.2.3 Ugljikohidrati 31
2.1.2.4 Izoflavoni 31
2.1.2.5 Vitamini i minerali 34
2.1.2.6 Ostali sastojci soje 34
2.1.2.7 Biofunkcionalna svojstva fermentiranog sojinog mlijeka 34

2.2. FERMENTACIJA MLIJEKA PROBIOTIČKIM BAKTERIJAMA 35
2.2.1. PROBIOTIČKE BAKTERIJE 35
2.2.1.1 Karakteristike bakterija mliječne kiseline 35
2.2.1.2 Utjecaj probiotika na ljudsko zdravlje i predloženi mehanizmi djelovanja 38
2.2.2. METABOLIZAM PROBIOTIČKIH MIKROORGANIZAMA TIJEKOM FERMENTACIJE MLIJEKA 51
2.2.2.1 Metabolizam ugljikohidrata 52
2.2.2.2 Razgradnja specifičnih sastojaka sojinog mlijeka 54
2.2.2.3 Nastanak bioaktivnih peptida tijekom fermentacije 55
2.2.2.4 Proizvodnja antimikrobnih tvari 55
2.2.3. RAST I PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA U FERMENTIRANOM MLIJEKU 60
2.2.4. PREBIOTICI I SINBIOTICI 62

2.3. PREBIOTIČKA I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA MEDA 65
2.3.1. GLAVNI SASTOJCI MEDA 65
2.3.2. PREBIOTIČKA SVOJSTVA 66
2.3.3. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA 66

3. EKSPERIMENTALNI DIO 69

3.1. ZADATAK 70

3.2. MATERIJAL 70

3.3. METODE 71
3.3.1. ISPITIVANJE SIROVINA UPOTRIJEBLJENIH ZA PROIZVODNJU FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH PROIZVODA 72
3.3.2. PRIPRAVA UZORAKA 73
3.3.3. ODREĐIVANJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA 75
3.3.4. ODREĐIVANJE KISELOSTI I NAKNADNOG ZAKISELJAVANJA 79
3.3.5. OCJENA PREBIOTIČKOG DJELOVANJA MEDA 80
3.3.6. ODREĐIVANJE ANTIBIOTIČKE AKTIVNOSTI UZORAKA METODOM IZBUŠENIH RUPICA U AGARU 81
3.3.7. SENZORSKA PROCJENA 83
3.3.8. STATISTIČKA ANALIZA 83

4. REZULTATI 84

4.1. REZULTATI ANALIZE UZORAKA MLIJEKA I MEDA KORIŠTENIH ZA FERMENTACIJU 85

4.2. REZULTATI ISPITIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE 87
4.2.1. PRAĆENJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE 87
4.2.1.1 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije kravljeg mlijeka 87
4.2.1.2 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije kozjeg mlijeka 90
4.2.1.3 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije sojinog mlijeka 93
4.2.2. PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE 96
4.2.2.1 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije kravljeg mlijeka 96
4.2.2.2 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije kozjeg mlijeka 99
4.2.2.3 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije sojinog mlijeka 102
4.2.3. USPOREDBA UTJECAJA DODATKA MEDA NA PORAST BROJA BAKTERIJA U FERMENTIRANOM MLIJEKU 105

4.3. REZULTATI ISPITIVANJA INHIBICIJSKOG DJELOVANJA FERMENTIRANOG MLIJEKA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE AGAR DIFUZIJSKIM TESTOM 106
4.3.1. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* 106
4.3.1.1 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kravljim mlijekom 106
4.3.1.2 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kozjim mlijekom 107
4.3.1.3 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim sojinim mlijekom 108
4.3.2. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* 109
4.3.2.1 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim kravljim mlijekom 109
4.3.2.2 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim kozjim mlijekom 110
4.3.2.3 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim sojinim mlijekom 111

4.4. REZULTATI ISPITIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA 112
4.4.1. PRAĆENJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA 112
4.4.1.1 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja kravljeg mlijeka 112
4.4.1.2 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja kozjeg mlijeka 114
4.4.1.3 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja sojinog mlijeka 115
4.4.2. PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA 117
4.4.2.1 Promjena broja bakterija tijekom skladištenja kravljeg mlijeka 117
4.4.2.2 Praćenje mikrobioloških parametara tijekom skladištenja kozjeg mlijeka 120
4.4.2.3 Promjena broja bakterija tijekom skladištenja sojinog mlijeka 123

4.5. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE 127

5. RASPRAVA 131

5.1. ANALIZE UZORAKA MLIJEKA I MEDA KORIŠTENIH ZA FERMENTACIJU 132

5.2. ANALIZA TIJEKA FERMENTACIJE KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIJEKA PROBIOTIČKIM SOJEVIMA *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 133
5.2.1. DINAMIKA PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE 133
5.2.2. DINAMIKA PROMJENE BROJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA TIJEKOM FERMENTACIJE 137

5.3. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA TEST-BAKTERIJA 141
***5.3.1.* INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes* 141**
5.3.2. INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica* 146

5.4. ANALIZA TIJEKA SKLADIŠTENJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIJEKA FERMENTIRANOG PROBIOTIČKIM SOJEVIMA *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ..149
5.4.1. NAKNADNO ZAKISELJAVANJE TIJEKOM SKLADIŠTENJA 149
5.4.2. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA TIJEKOM SKLADIŠTENJA 151

5.5. SENZORSKA ANALIZA UZORAKA 154

6. ZAKLJUČCI 157

7. LITERATURA 161

8. PRILOZI 174

1. UVOD

Posljednjih desetljeća, usporedno s porastom svijesti o značaju pravilne prehrane za ljudsko zdravlje, raste i zanimanje za funkcionalnu hranu. Funkcionalna hrana pored uobičajenog prehrambenog učinka, povoljno utječe na jednu ili više funkcija u organizmu, poboljšavajući zdravlje i dobrobit i/ili smanjujući rizik od bolesti. Fermentirani mliječni proizvodi važna su skupina funkcionalne hrane (Fondén i sur. 2003.; Grajek i Olejnik 2005.).

Probiotičke bakterije u funkcionalnim mliječnim proizvodima najčešće pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. U velikom broju istraživanja utvrđeno je njihovo povoljno djelovanje na zdravlje ljudi. Terapijsko djelovanje probiotika uključuje snižavanje pH vrijednosti sredine, proizvodnju probavnih enzima i vitamina, proizvodnju antibakterijskih tvari, obnovu normalne crijevne mikroflore nakon poremećaja uzrokovanih dijarejom, antibiotičkom terapijom i radioterapijom, smanjenje razine kolesterola u krvi, stimulaciju imuno sustava, suzbijanje bakterijskih infekcija, uklanjanje karcinogena, poboljšanje apsorpcije kalcija kao i smanjenje aktivnosti fekalnih enzima. Zbog svog povoljnog djelovanja na ljudsko zdravlje, ovi mikroorganizmi se sve više primjenjuju u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda (Fondén i sur. 2003.; Shah 2007.).

Fermentirani mliječni proizvodi se u pravilu proizvode od kravljeg mlijeka. Mnogi autori u posljednje vrijeme ističu terapijsku vrijednost kozjeg mlijeka. U usporedbi s kravljim mlijekom, kozje mlijeko ima veću probavljivost, jači antimikrobni potencijal te jače izražene imunološke karakteristike, a fermentacijom se djelomično gubi specifičan okus kozjeg mlijeka neprihvatljiv mnogim potrošačima (Haenlein 2004.). Zbog sve većeg zanimanja za sojine proizvode i njihove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, danas postaju sve važniji i fermentirani sojini proizvodi. Fermentacijom sojinog mlijeka se uklanja nepoželjan specifičan okus sirovog zrna te se znatno povećava nutritivna vrijednost (Omoni i Aluko 2005.).

Da bi proizvod imao terapijska svojstva mora sadržavati minimalno 10^6 živih stanica u mililitru proizvoda (Omoni i Aluko 2005.). Rezultati nekih istraživanja pokazuju da probiotičke bakterije mogu rasti u kravljem, kozjem i sojinom mlijeku, međutim zbog sporog rasta i slabog preživljavanja u proizvodu, često im se dodaju promotori rasta (Behrens i sur. 2004., Martín-Diana i sur. 2003., Østlie i sur. 2003., Saarela i sur. 2000.). Rast i održivost probiotičkih startera, posebice bifidobakterija, u fermentiranom mlijeku može se značajno povećati dodatkom fruktooligosaharida i galaktooligosaharida u mlijeko prije fermentacije (Qiang i sur. 2009.). Budući da med prirodno sadrži različite oligosaharide s različitim stupnjem polimerizacije (Weston 1999.)., pretpostavlja se da bi dodatak meda mogao povećati rast, aktivnost i preživljavanje probiotika u

mlijeku, odnosno fermentiranom mliječnom proizvodu. U nekim ranijim istraživanjima, med je prepoznat kao promotor rasta laktobacila i bifidobakterija (Shin i Ustunol 2005.). Međutim, nema jasnih znanstvenih dokaza o djelovanju meda na rast probiotika tijekom mliječno kisele fermentacije u različitim vrstama mlijeka.

S ciljem da se u što većoj mjeri očuvaju izvorna organoleptička i nutritivna svojstva sirovina, posljednjih godina je razvijen trend minimalno obrađene hrane, koji se zasniva na primjeni znatno blažih uvjeta konzerviranja, bez uporabe topline, najčešće primjenom niskih temperatura. Tako *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*, kao važni psihrotrofni patogeni postaju sve više predmetom zanimanja prehrambene mikrobiologije. Obilježja poput razmnožavanja unutar velikoga raspona pH i temperature te izrazita otpornost visokim koncentracijama NaCl omogućuju ovim bakterijama preživljavanje različitih postupaka koji se koriste tijekom obrade namirnica (Bubonja i Vučković 2007.).

Navedena svojstva, uz sposobnost razmnožavanja na temperaturama hladnog skladištenja, uzrokuju velik problem prehrambenoj industriji, te predstavljaju potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje (Bizani i sur. 2008.; Kushal i Anand 2006.; Orndorff i sur. 2006.). U rješavanju problema zaštite zdravlja potrošača od štetnih mikroorganizama poseban značaj se daje primjeni zaštitnih kultura mikroorganizama i njihovih antimikrobnih metabolita. Antimikrobno svojstvo jedno je od osnovnih funkcionalnih svojstava probiotika. Bakterijama mliječne kiseline i bifidobakterijama svojstvena je tvorba različitih organskih spojeva, kratkolančanih i srednjelančanih masnih kiselina, vodikovog peroksida, diacetila, CO_2, te bakteriocina koje izlučuju u okolinu u kojoj rastu. Neovisno o tome radi li se o hrani ili probavnom traktu, ti spojevi prvenstveno inhibitorno djeluju na rast za čovjeka nepoželjne mikrobne populacije (Samaržija i sur. 2009.). Dobro su poznata i antimikrobna svojstva meda (Mundo i sur. 2004.), ali nedostaju informacije o sinergističkom djelovanju probiotičkih proizvoda obogaćenih medom na štetne mikroorganizme.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bit će ispitivanje utjecaja dodatka bagremovog i kestenovog meda na funkcionalna i senzorska svojstva kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih probiotičkim bakterijama *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* i *Lactobacillus casei* te ispitivanje djelovanja fermentiranih proizvoda na patogene bakterije *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*.

Korištenjem različitih metoda pokušao se pojasniti utjecaj dodatka meda na tijek fermentacije mlijeka, kakvoću fermentiranog proizvoda te na stupanj inhibicije rasta odabranih patogena. Kinetika fermentacije pratila se određivanjem broja bakterija standardnom mikrobiološkom

metodom agarnih ploča i praćenjem promjena pH vrijednosti. Kakvoća proizvedenih fermentiranih mlijeka se ocjenjivala senzorskom metodom ponderiranih bodova te praćenjem preživljavanja probiotičkih bakterija tijekom skladištenja, dok se stupanj inhibicije određivao modificiranom metodom izbušenih rupica u agaru.

Budući da med prirodno sadrži različite oligosaharide s različitim stupnjem polimerizacije, osnovna hipoteza ovog rada je da bi med mogao povećati rast, aktivnost i preživljavanje probiotika u mlijeku, odnosno fermentiranom mliječnom proizvodu. Kako med pokazuje inhibicijski učinak na različite mikroorganizme, također je pretpostavljeno da dodatak meda u mlijeko povećava inhibicijski potencijal tako dobivenog sinbiotičkog proizvoda.

2. OPĆI DIO

2.1. ANTIMIKROBNI I BIOLOŠKI AKTIVNI SASTOJCI MLIJEKA I FERMENTIRANIH MLIJEČNIH PROIZVODA

Funkcionalna hrana nudi novi pristup u poboljšanju ljudskog zdravlja u današnje vrijeme kada su bolesti uzrokovane suvremenim načinom života i starenje populacije u porastu. Nove znanstvene spoznaje o metaboličkim i genomskim utjecajima prehrane i specifičnih hranjivih sastojaka na ljudsko zdravlje omogućile su pojavu ove nove kategorije hrane. Shodno tome, povećana je proizvodnja prehrambenih artikala koji osim svoje osnovne hranjive vrijednosti pokazuju i specifična blagotvorna djelovanja na ljudsko zdravlje (Park 2009.).

Za potencijalni terapijski učinak, probiotički organizmi moraju biti unijeti u aktivnom obliku. Mliječni i sojini proizvodi mogu služiti kao idealan medij za unos probiotičkih bakterija u ljudski gastrointestinalni trakt (GIT), budući da osiguravaju pogodnu sredinu koja potiče rast i povećava preživljavanje ovih mikroorganizama (Lourens-Hattingh i Viljoen 2001.). Dok su različiti učinci na zdravlje povezani s konzumacijom probiotičkih organizama, oni u određenim slučajevima mogu biti povezani i sa sastavom medija u kojem se nalaze. U kombinaciji s mlijekom i sojom, probiotički organizmi se unose s različitim fermentiranim mliječnim i sojinom proizvodima, među kojima su najčešći jogurt i sojin jogurt. Nutritivna vrijednost konačnog proizvoda je uvjetovana i procesnim faktorima, uključujući temperaturu, trajanje izlaganja toplini, izlaganju svjetlosti i uvjetima skladištenja (Fox 2003.). Nadalje, neki od ovih sastojaka mlijeka i soje mogu modificirati se tijekom fermentacije, što može utjecati na nutritivna i fiziološku vrijednost konačnog proizvoda. Dodatno, bakterijski sojevi koji se primjenjuju u fermentaciji zajedno s različitim dodanim sastojcima i uvjetima fermentacije također imaju važnu ulogu u određivanju konačnog nutritivnog sastava probiotičkog proizvoda.

Tijekom fermentacije, glavne sastojke uključujući laktozu i mliječne proteine, sojine proteine, rafinozu, stahiozu i druge sojine ugljikohidrate, bakterije koriste za svoj rast, što rezultira konverzijom fermentabilnih materijala u čitav niz proizvoda kao što su mliječna, octena kiselina, peptidi, aminokiseline i različiti vitamini. Pored svoje izuzetne nutritivne vrijednosti, mliječni i sojini proizvodi sadrže sastojke koji pokazuju veliki broj različitih bioaktivnosti. Neki od ovih bioaktivnih sastojaka se smatraju funkcionalnim, čineći mliječne i sojine proizvode važnim dijelom funkcionalne hrane i nutraceutika (Donkor 2007.).

2.1.1. PREGLED BIOAKTIVNIH SASTOJAKA KRAVLJEG I KOZJEG MLIJEKA

Mlijeko je poznato kao najpotpunija prirodna hrana. Prosječan sastav glavnih sastojaka u kravljem, kozjem i majčinom mlijeku prikazuje **Tablica 1**.

Tablica 1 Prosječan sastav različitih vrsta mlijeka (Tratnik 1998.)

sastojak (%) / vrsta mlijeka	ukupni proteini	kazein	proteini sirutke	mast	ugljikohidrati	pepeo
majčino	1,2	0,5	0,7	3,8	7,0	0,2
kobilje	2,2	1,3	0,9	1,7	6,2	0,5
kravlje	3,5	2,8	0,7	3,7	4,8	0,7
bivolje	4,0	3,5	0,5	7,5	4,8	0,7
kozje	3,6	2,7	0,9	4,1	4,7	0,8
ovčje	5,8	4,9	0,9	7,9	4,5	0,8

Mlijeko je više od izvora hranjivih tvari potrebnih za razvoj bilo kojeg novorođenčeta sisavca, te za rast djece i prehrana osoba odrasle dobi. Osim nutritivne vrijednosti mlijeka, biološki aktivni sastojci mlijeka kao što su kazein i proteini sirutke, dobivaju sve veću važnost zbog bioloških i biokemijskih uloga koje imaju ključni utjecaj na ljudski metabolizam i zdravlje, (Gobbetti i sur. 2007.; Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.; Schanbacher i sur. 1998.).



Slika 1 Shematski prikaz glavnih bioaktivnih sastojaka iz mlijeka (Park, 2009)

Tablica 2 Glavni biološki aktivni sastojci mlijeka i njihova funkcija (Park, 2009)

prekursor ili sastojak mlijeka	bioaktivni sastojak	bioaktivnost
α- i β-kazeini	kazomorfini	opioidni agonist (smanjenje pokretljivosti crijeva, brzine želučanog pražnjenja; povećanje unosa aminokiselina i elektrolita)
	kazokinini	ACE inhibitor (povećanje protoka krvi u intestinalni epitel)
	fosfopeptidi	vezanje minerala (vezanje Ca povećanje apsorpcije minerala, npr. Ca, P, Zn)
	imunopeptidi kazomorfini kazokinini	imunomodulacija (povećanje imunog odgovora i fagocitne aktivnosti)
αs1-kazein	izracidin	antimikrobno djelovanje
αs2-kazein	kazocidin	
κ-kazein	kazoksini	opiodini antagonist
	kazoplatelini	antimikrobno djelovanje
	κ-kazein-gliko-makropeptid	prebiotičko djelovanje (rast bifidobakterija u GIT)
α-laktalbumin i β-laktoglobulin	laktorfini	opiodini agonist
serum albumin	serorfini	opiodini agonist
α-laktalbumin, β-laktoglobulin i serum albumin	laktokinini	ACE inhibitor
imunoglobulini	IgG i IgA	imunomodulacija (pasivni imunitet)
laktoferin	laktoferin	imunomodulacija (povećanje aktivnosti urođenih stanica ubojica, humoralnog imunog odgovora, razvoja imunološkog protoka timocita i interleukina-6; smanjenje tumorskog nekroznog faktora-α)
		antimikrobno djelovanje (povećanje bakteriostatske inhibicije Fe-ovisnih bakterija; smanjenje virusnog vezanja i infekcije stanica)
		prebiotičko djelovanje (povećanje broja bifidobakterija u GIT)
	laktoferoksini	opiodni antagonist
oligosaharidi	oligosaharidi	prebiotičko djelovanje (povećanje broja bifidobakterija u GIT)
glikolipidi i oligosaharidi	glikolipidi i oligosaharidi	antimikrobno djelovanje (smanjenje bakterijskog i virusnog vezanja na intestinalne stanice epitela)
prolaktin	prolaktin	imunomodulacija (povećanje transporta limfocita i timocita, i razvoj imuniteta)
citokini	inteleukini-1,2,6 i 10 tumorski nekrozni faktor-α interferon-γ transformirani faktor rasta-α; leukotrien B4 prostaglandin E2, Fn	imunomodulacija (limfocitni transport, razvoj imuniteta)
faktori rasta	IGF-1, TGF-α, EGF, TGF-β	razvoj i funkcije organa
paratromon-P	PTHrP	povećanje metabolizma i unosa Ca+2

Nedavna istraživanja su pokazala da mlijeko posjeduje veliki broj biološki aktivnih spojeva koje štite novorođenče i odrasle od patogena i bolesti, kao što su imunoglobulini, antibakterijski peptidi, antimikrobni proteini, oligosaharidi i lipidi, pored ostalih sastojaka prisutnih u niskim koncentracijama – minornih sastojaka, ali sa značajnim potencijalom dobrobiti na zdravlje. Slika 1 prikazuje pojednostavljeni shematski prikaz osnovnih bioaktivnih funkcionalnih sastojaka dobivenih iz mlijeka. Glavne biološki aktivne sastojke mlijeka prikazuje Tablica 2 (Park, 2009).

Kravlje mlijeko i kolostrum se smatraju najvažnijim izvorom prirodnih bioaktivnih sastojaka. Posljednja dva desetljeća je učinjen veliki iskorak u znanosti, tehnologiji i komercijalnim primjenama bioaktivnih sastojaka koji se prirodno nalaze u kravljem mlijeku i kolostrumu.

Kozje mlijeko se preporuča kao idealna zamjena za kravlje, posebno za one koji pate od alergija na kravlje mlijeko. U usporedbi s kravljim i majčinim, kozje mlijeko ima jedinstvena biološki aktivna svojstva, poput visoke probavljivosti, visokog puferskog kapaciteta i određenih terapijskih vrijednosti u medicini i ljudskoj prehrani. Unatoč velikom broju istraživanja provedenim na biološki aktivnim peptidima i/ili sastojcima majčinog i kravljeg mlijeka i/ili proizvoda, istraživanja na kozjem mlijeku su još uvijek nedostatna (Park 1994., 2006.).

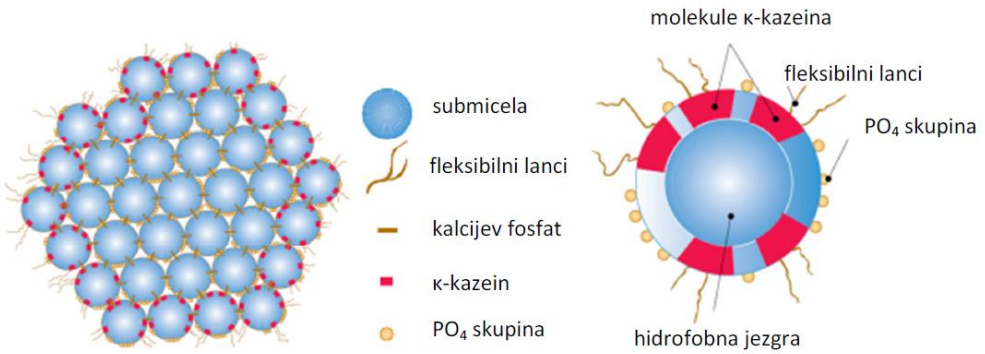
2.1.1.1 Bioaktivni proteini i peptidi

Visoka nutritivna vrijednost mliječnih proteina je dobro poznata, te u mnogim zemljama mliječni proizvodi značajno doprinose dnevnom unosu proteina. Višestruka funkcionalna svojstva glavnih mliječnih proteina su danas detaljno objašnjena. Biološka svojstva mliječnih proteina privlače sve veću pozornost znanstvenika i potrošača. Same proteinske molekule dvije glavne skupine mliječnih proteina, kazeina i proteina sirutke, pokazuju različite fiziološke funkcije *in vivo* (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004., Shah 2000.a., Zimecki i Kruzel 2007.). Mnogi od bioaktivnih proteina sirutke, ponajprije imunoglobulini, laktoferin i faktori rasta, nalaze se u kolostrumu u znatno većoj koncentraciji nego u mlijeku, što odražava njihovu važnost za novorođeno tele (Scammell 2001.). Nadalje, mliječni proteini posjeduju dodatnu fiziološku funkciju uslijed velikog broja bioaktivnih peptida koji su uklopljeni u same proteine.

Proteini koji se nalaze u kolostrumu i mlijeku pokazuju veliki raspon nutritivnih, funkcionalnih i bioloških aktivnosti (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004., Zimecki i Kruzel 2007.). Osim što služe kao uravnotežen izvor visokovrijednih aminokiselina, mliječni proteini utječu na strukturu i senzorska svojstva različitih mliječnih proizvoda.

KAZEIN

Kazein (**Slika 2**) čini oko 80% ukupnih proteinskih frakcija mlijeka. Kazein i elektroforetske kazeinske frakcije imaju različite biološke funkcije, poput imunomodulacije. Novija *in vitro* istraživanja sugeriraju da peptidi koji potječu iz kazeina imaju ne samo hranjivu vrijednost, nego su i izvor peptida niske molekularne mase koji imaju biološku aktivnost, poput antihipertenzivnih, antimikrobnih, antioksidativnih i opioidnih peptida. Ovi peptidi postaju aktivni nakon probave proteolitičkim enzimima ili tijekom fermentacije i procesa zrenja sira i jogurta (Korhonen i Pihlanto 2007.). Ova novija istraživanja sugeriraju da kazeinski hidrolizati osiguravaju potencijalni izvor visoko funkcionalnih sastojaka primjenjiv u različitim prehrambenim proizvodima.



Slika 2 Struktura kazeinske micele i submicele (Bylund 1995.)

Antihipertenzivni i imunostimulacijski peptidi potječu od kozjeg, kao i od kravljeg β-kazeina. Peptidni fragmenti i sljedovi bioaktivnih peptida iz kozjeg mlijeka koji pokazuju različitu bioaktivnost prikazuje (Park 2009.).

PROTEINI SIRUTKE

Zahvaljujući svojim terapijskim i dokumentiranim kliničkim svojstvima, proteini sirutke kravljeg mlijeka dobivaju sve veći komercijalni značaj. Kompleks proteina sirutke i nekoliko pojedinačnih proteina su uključeni u velik broje fizioloških blagotvornih učinaka, kao što su:

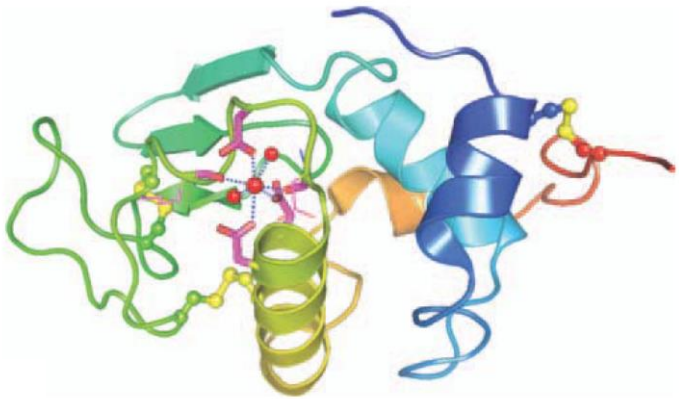
- poboljšanje fizičkog stanja, oporavak nakon vježbanja i sprječavanje mišićne atrofije;
- održavanje tjelesne težine;
- kardiovaskularno zdravlje;
- antikancerogeni učinak;
- zacjeljivanje rana;
- upravljanje mikrobnim infekcijama i upalama sluznice;
- hipoalergena prehrana dojenčadi;
- „zdravo“ starenje (Park 2009.).

Imunoglobulini

Imunoglobulini su glikoproteini koje izlučuju plazma stanice u mlijeko sisavaca. Djeluju kao antitijela u imunom odgovoru vezanjem specifičnih antigena, zbog čega se smatraju bioaktivnim sastojcima mlijeka. Imunoglobulini su nositelji biološke funkcije antitijela; nalaze se u kolostrumu svih mliječnih vrsta omogućujući pasivni imunološki odgovor na napad patogena. Glavni kravlji i ljudski imunoglobulini su IgG, IgM i IgA. Imunoglobulini čine 70-80% ukupnog proteinskog sadržaja u kolostrumu, dok je u mlijeku njihova koncentracija svega 1-2% od ukupnih proteina (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.). Važnost kolostralnog imunoglobulina u zaštiti novorođenog teleta protiv mikrobnih infekcija je dobro dokumentirana. Imunoglobulini povezuju različite dijelove staničnog i hormonskog imunološkog sustava. Sprječavaju adheziju mikroba, inhibiraju bakterijski metabolizam, aglutinaciju bakterija, povećavaju fagocitozu bakterija, uništavaju bakterije aktivacijom bakteriolitičkih reakcija i neutraliziraju toksine i viruse. Kozje mlijeko sadrži sličan udio imunoglobulina kao kravlje i ovčje mlijeko (**Tablica 3**) (Park 2009.).

α-laktalbumin

α-laktalbumin (**Slika 3**) je najzastupljeniji protein sirutke u majčinom mlijeku, dok u kravljem mlijeku čini oko 20% proteina sirutke. Nastaje u mliječnoj žlijezdi djelujući kao koenzim u biosintezi laktoze.



Slika 3 Struktura kravljeg α-laktalbumina (Thompson i sur. 2009.)

Zdravstveni učinak α-laktalbumina je dugo bio nejasan, ali novija istraživanja sugeriraju da ovaj protein doprinosi zdravlju kao sama molekula, preko peptida djelomično hidroliziranog proteina, te putem aminokiselina potpuno probavljenog proteina. Hidrolizati kravljeg α-laktalbumina i specifični peptidi nastali iz hidrolizata su povezani s mnogim biološkim funkcijama, npr. antihipertenzivno, antimikrobno, antikancerogeno, imunomodulacijsko, opiodino i prebiotičko djelovanje (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.).

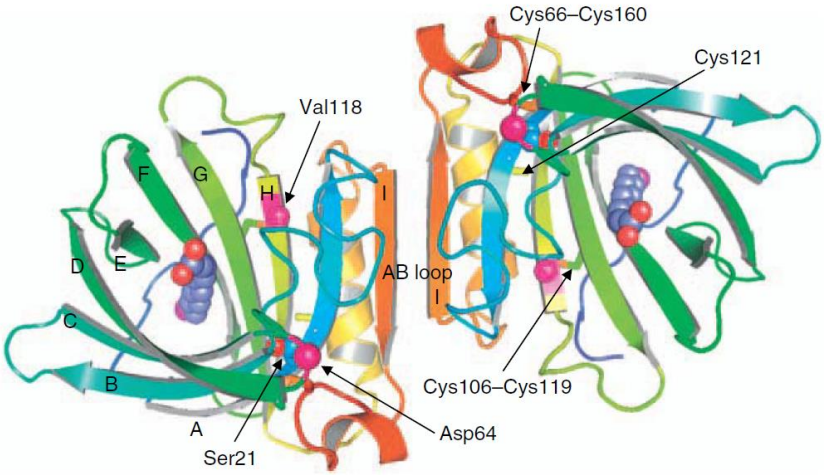
Tablica 3 Neki minorni proteini kozjeg, kravljeg i majčinog mlijeka (Park, 2009)

proteini (µg/ml)			kozje mlijeko	kravlje mlijeko	majčino mlijeko
laktoferin			20-200	20-200	<2.000
transferin			20-200	20-200	>50
prolaktin			44	50	40-160
protein koji veže folnu kiselinu			12	8	-
imunoglobulini	IgA	mlijeko	30-80	140	1.000
		kolostrum	900-2.400	3.900	17.350
	IgM	mlijeko	10-40	50	100
		kolostrum	1.600-5.200	4.200	1.590
	IgG	mlijeko	100-400	590	40
		kolostrum	50.000-60.000	47.600	430
neproteinski dušik*			0,4	0,2	0,5

* (%)

β-laktoglobulin

β-laktoglobulin (**Slika 4**) je glavni protein sirutke kravljeg mlijeka, gdje čini oko 50% proteina sirutke, dok nije pronađen u majčinom mlijeku.



Slika 4 Struktura kravljeg β-laktoglobulina (Thompson i sur. 2009.)

Sam protein i peptidi koji od njega potječu imaju širok spektar bioaktivnosti, poput antihipertenzivnog, antimikrobnog, antioksidativnog, antikancerogenog, imunomodulacijskog, opiodinog, hipokolesterolemijskog i drugih metaboličkih učinka (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.). Peptidi dobiveni iz β-laktoglobulina imaju veliki biološki potencijal, ali za njihovu potvrdu su neophodna daljnja in vivo istraživanja.

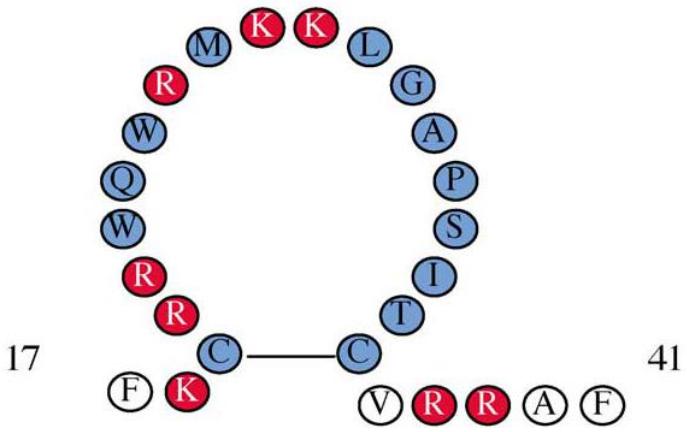
Laktoferin

Transferini (laktoferin u mlijeku i transferin u serumu) su skupina homolognih glikoproteina su prisutni kod svih vrsta kralježaka. Laktoferin (**Slika 5**) je glavni protein sirutke koji veže željezo u mlijeku mnogih vrsta uključujući majčino, kobilje i kozje. Njegova se koncentracija u mliječnoj žlijezdi znatno povećava tijekom infekcije.



Slika 5 Struktura kravljeg laktoferina (Thompson i sur. 2009.)

Laktoferin je glikoprotein koji veže željezo. Nalazi se u kolostrumu, mlijeku i drugim tjelesnim izlučevinama i stanicama većine sisavaca. Laktoferin se smatra važnom molekulom u obrani organizma, pokazujući mnoge biološke aktivnosti kao što su antimikrobna, antioksidativna, protuupalna, antikancerogena i imunoregulacijska svojstva (Zimecki i Kruzel 2007.). Nadalje, cijepanjem laktoferina probavnim enzimom pepsinom, može nastati i nekoliko antimikrobnih peptida, kao laktofericin B f(17-41) (**Slika 6**) i laktoferampin f(268-284).

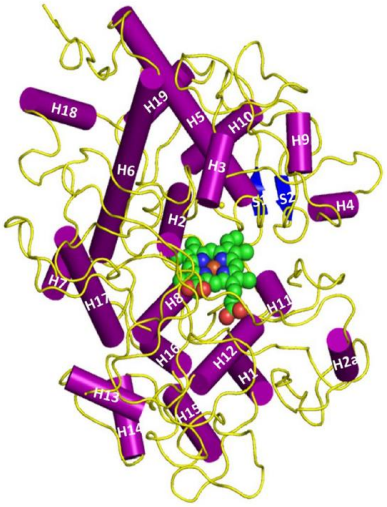


Slika 6 Aminokiselinski slijed kravljeg laktofericina (Farnaud i Evans 2003.)

Laktoferin igra važnu ulogu u urođenom obrambenom sustavu protiv mikrobnih infekcija i degenerativnih procesa uključujući i onih nastalih djelovanjem slobodnih radikala. Antimikrobna aktivnost laktoferina i njegovih derivata se većinom pripisuju trima mehanizmima: vezanjem željeza što dovodi do inhibicije bakterijskog rasta; neposrednim vezanjem laktoferina za membranu mikroba i sprječavanjem mikrobnog vezanja za epitelne stanice ili enterocite. Laktoferin također povećava osjetljivost bakterija na određene antibiotike, poput vankomicina, penicilina i cefalosporina. U kozjem mlijeku se nalazi u sličnim koncentracijama kao i u kravljem. Laktoferin ima nekoliko bioloških funkcija između ostalih i mikrobnu aktivnost (Park 2009.).

Laktoperoksidaza

Laktoperoksidaza (**Slika 7**) je glikoprotein koji se prirodno nalazi u kolostrumu, mlijeku i mnogim drugim ljudskim i životinjskim izlučevinama. U mlijeku se ovaj enzim nalazi u visokoj koncentraciji.

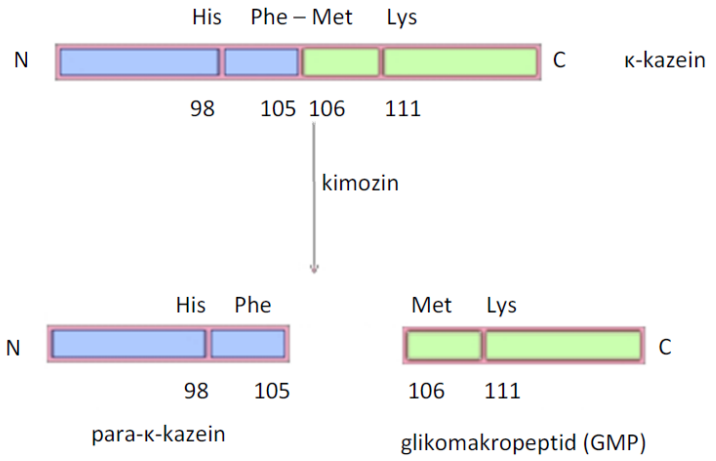


Slika 7 Molekularna struktura laktoperoksidaze (Sharma i sur. 2013.)

Katalizira peroksidaciju tiocijanata u prisutnosti hidrogen-peroksidaznog izvora pri čemu nastaju kratkotrajni oksidacijski produkti, koji uništavaju ili inhibiraju rast mnogih mikroorganizama. Hipotiocijanatni anion uzrokuje oksidaciju sulfhidrilne skupine mikrobnih enzima i drugih membranskih proteina što dovodi do posredne inhibicije rasta ili ubijanja velikog broja mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse, kvasce, plijesni i protozoe. Laktoperoksidazni sustav djeluje baktericidno protiv Gram-negativnih patogenih i bakterija koje uzrokuju kvarenje kao što su *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. i *Campylobacter* spp. S druge strane djeluje bakteriostatski protiv mnogih Gram-pozitivnih bakterija, kao što su *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. i *Streptococcus* spp. (Park 2009.). Laktoperoskidazni sustav je prirodna metoda zaštite svježeg mlijeka.

Glikomakropeptid

Glikomakropeptid je C-terminalni glikopeptid f(106-169) koji nastaje otpuštanjem iz κ-kazeinske molekule na ^{105}Phe-^{106}Met djelovanjem kimozina (**Slika 8**). Čini 20-25% ukupnih sirutkinih proteina.



Slika 8 Cijepanje κ-kazeina djelovanjem kimozina

Posljednjih godina se intenzivno istražuje njegova biološka aktivnost. Istraživanja in vitro pokazuju da glikomakropeptid inaktivira mikrobne toksine bakterija *E. coli* i *V. cholerae*, inhibira adheziju kariogenih bakterija *Str. mutans* i *Str. sobrinus* te virusa gripe, regulira odgovor imunološkog sustava, potiče rast bifidobakterija, smanjuje aktivnost probavnih hormona i regulira cirkulaciju krvi antihipertenzivnim i antitromboznim djelovanjem (Park 2009.).

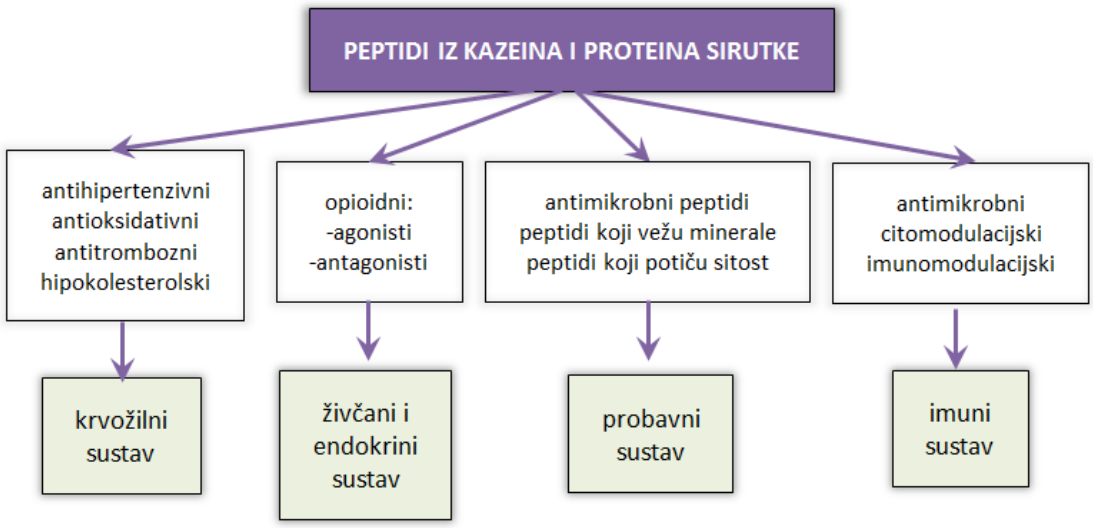
FAKTORI RASTA I SLIČNI SASTOJCI

Faktori rasta iz mlijeka su povezani s razvojem neonatalnog gastrointestinalnog trakta. Prisutnost faktora koji potiču ili inhibiraju rast različitih tipova stanica je prvo dokazano u majčinom kolostrumu i mlijeku tijekom 1980-ih te kasnije u kravljem kolostrumu, mlijeku i sirutki (Gauthier i sur. 2006.; Pouliot i Gauthier 2006.). Koncentracija svih poznatih faktora rasta je najviša u kolostrumu tijekom prvih sati nakon teljenja nakon čega se znatno smanjuje. Faktori rasta su u osnovi polipeptidi s molekularnom masom između 6.000 i 30.000 Da s 53-425 aminokiselinskih ostataka.

Kozje mlijeko pokazuje znatno veću aktivnost faktora rasta nego kravlje mlijeko, zbog čega kozje mlijeko može biti pogodan nutrijent kod gastrointestinalnih poremećaja. Peptidi dobiveni iz β-kazeina stimuliraju sintezu DNA u fibroblastima. Faktori rasta iz proteina sirutke su polipeptidi slični hormonima koji potječu iz krvne plazme. Imaju veliku ulogu u regulaciji i diferencijaciji različitih vrsta stanica. Mliječni faktor rasta (MGF) je peptid koji potiskuje proliferaciju ljudskih T-stanica (Park 2009.).

FUNKCIONALNA SVOJSTVA BIOAKTIVNIH PEPTIDA

Bioaktivni peptidi se definiraju kao proteinski fragmenti koji imaju pozitivan utjecaj na tjelesne funkcije ili stanja te dokazano mogu poboljšati zdravlje. Aktivnost peptida se zasniva na njihovom svojstvenom aminokiselinskom sastavu i slijedu. Veličina aktivnog slijeda može varirati 2-20 aminokiselinskih ostataka, a mnogi peptidi pokazuju višefunkcionalna svojstva. Mliječni proteini se smatraju najznačajnijim izvorom bioaktivnih peptida. Najbolje istraženi su antihipertenzivni, antitrombozni, antimikrobni, antioksidativni, imunomodulacijski i opiodni peptidi (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.). Ovi peptidi se nalaze u enzimskim proteinskim hidrolizatima i fermentiranim mliječnim proizvodima, ali mogu nastati i tijekom gastrointestinalne probave proteina (Gobbetti 2007., Korhonen i Pihlanto 2007., Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.). Mliječni bioaktivni peptidi pokazuju velik broj *in vivo* fizioloških učinaka na gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, imuni, živčani i druge tjelesne sustave, kao što prikazuje Slika 9. Funkcionalnost ovih peptida uključuje antimikrobna, antihipertenzivna, antitrombozna, antioksidacijska i imunomodulacijska djelovanja (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004.). Mnogi od ovih peptida pokazuju više od jedne funkcije, uključujući peptide iz slijeda 60-70 β-kazeina, koji djeluju imunostimulacijski, opioidno i ACE-inhibicijski (Korhonen i Pihlanto 2007.).



Slika 9 Fiziološke funkcije bioaktivnih mliječnih peptida (Korhonen i Pihlanto 2007.)

Bioaktivni peptidi su neaktivni unutar same proteinske molekule, te se mogu otpustiti iz prekursora proteina: enzimskom hidrolizom probavnim enzimima, fermentacijom mlijeka proteolitičkim starter kulturama i proteolizom mikrobnim i biljnim enzimima. Velik broj istraživanja dokazuje da hidrolizom mliječnih proteina probavnim enzimima nastaju biološki aktivni peptidi (Korhonen i Pihlanto 2007.). Najistaknutiji enzimi su pepsin, tripsin i kimotripsin, koji oslobađaju

velik broj antihipertenzivnih peptida, fosfopeptida koji vežu kalcij, antibakterijskih peptida, imunomodulacijskih peptida i opiodnih peptida i iz kazeina i iz proteina sirutke (Gobbetti 2007.; Gobbetti i sur. 2004.).

Mnoge industrijske starter kulture bakterija mliječne kiseline imaju visoku proteolitičku aktivnost i oslobađaju različite bioaktivne peptide iz mliječnih proteina djelovanjem mikrobne proteolize (Gobbetti 2007.; Schanbacher i sur. 1998.). Također i jogurtne bakterije, starteri u proizvodnji sira i komercijalne probiotičke bakterije proizvode različite bioaktivne peptide tijekom fermentacije mlijeka (Donkor i sur. 2007a.; Gobbetti i sur. 2004.).

ANTIMIKROBNI PEPTIDI

Peptidi s antimikrobnom aktivnošću su dobiveni iz nekoliko hidrolizata proteina kravljeg mlijeka. Ukupni antibakterijski učinak mlijeka je veći od zbroja individualnih učinaka imunoglobulinskih i neimunoglobulinskih (laktoferin, laktoperoksidaza i lizozim) proteina i peptida (Gobbetti 2007.). To se može pripisati, osim peptidima dobivenim iz inaktivnog proteinskog prekursora, sinergističkom djelovanju prirodno prisutnih proteina i peptida. Antimikrobni peptidi kod sisavaca se nalaze i na epitelnoj površini i unutar granule fagocitnih stanica, te su važni sastojci urođenog imuniteta, zbog svoje mogućnosti moduliranja upalnog odgovora, povrh svega uništavanja mikroorganizama (Park 2009.).

Mliječni proteini mogu djelovati kao prekursori antimikrobnih peptida, koji potpomažu prirodnu obranu organizma od napada patogena. Stoga se proteini hrane mogu smatrati sastojcima nutritivnog imuniteta. Ukupni antibakterijski učinak u mlijeku se očekuje da bude veći od zbroja pojedinih doprinosa imunoglobulinskih i neimunoglobulinskih obrambenih proteina i peptida (Park i sur. 2007.), što se može objasniti sinergističkim djelovanjem proteina i peptida (Gobbetti i sur. 2004.).

Tijekom prošlog desetljeća sve veću pozornost dobivaju peptidi s antibakterijskim djelovanjem dobiveni iz laktoferina (Park i sur. 2007.). Tomia i suradnici su 1991. godine prvi demonstrirali da enzimski oslobođeni antibakterijski peptidi imaju veću potencijalnu aktivnost nego prekursor laktoferin. Antibakterijski hidrolizati se dobivaju pepsinskom hidrolizom mlijeka. Najviše istraživan antimikrobni peptid je laktofericin, koji potječe od kravljeg i humanog laktoferina. Laktofericin pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv različitih Gram-pozitivnih i -negativnih bakterija, kvasaca i plijesni (Korhonen i Pihlanto 2007.). Antibakterijska aktivnost ovog peptida je djelomično uvjetovana mijenjanjem normalne membranske propusnosti. Većina djelovanja antibakterijskih

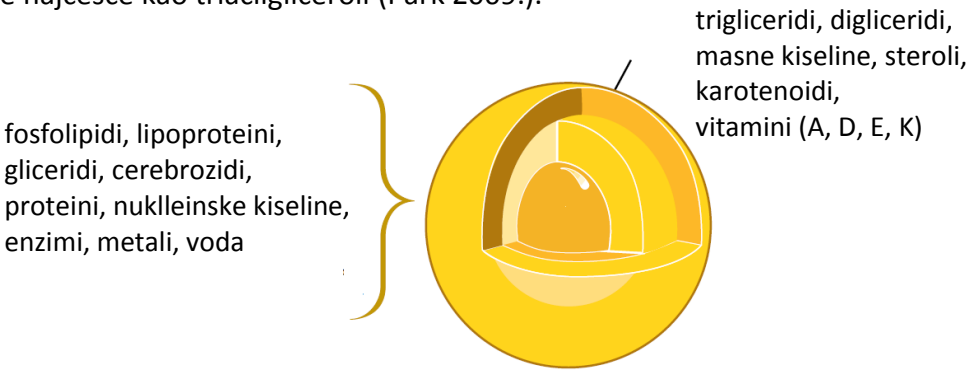
peptida se može objasniti razaranjem membranske funkcije, gdje ovi peptidi nastoje stvoriti kanale, specifično u membranama prokariotskih stanica (Gobbetti 2007.). Kozji laktofericin ima manji antibakterijski učinak od kravljeg protiv *Escherichia coli*, ali sličan protiv *Micrococcus flavus*.

Kazecidini su skupina osnovnih, glikoziliranih i visokomolekularnih (oko 5 kDa) polipetida, za koje je dokazano baktericidno djelovanje na laktobacile te također protiv velikog broja patogenih bakterija, poput *Staphylococcus aureus*. Laktenin je vjerojatno prvi antibakterijski faktor dobiven iz mlijeka obradom s reninom. Izracidin je drugi antibakterijski peptid dobiven tretiranjem s kimozinom. On pokazuje inhibitorno djelovanje na in vitro rast laktobacila i drugih Gram-pozitivnih bakterija, samo u relativno visokim koncentracija (0,1-1,0 mg/ml). Međutim, *in vivo* pokazuje snažan zaštitni učinak protiv *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Listeria monocytogenes* u vrlo niskom dozama (Park 2009.).

Kazein kozjeg mlijeka može biti izvor antimikrobnih peptida. U ovčjem mlijeku je nedavno identificirano četiri antibakterijskih peptida – fragmenti f(165-170), f(165-181), f(184-208) i f(203-208), iz pepsinskog hidrolizata αs2-kazeina. Oni su homologi prethodno identificiranih fragmenata f(165-181) i f(184-208) iz kravljeg proteina. Oni pokazuju snažnu aktivnost protiv svih ispitivanih bakterija. Fragment f(203-208) iz ovčjeg mlijeka je dobar primjer višefunkcionalnog peptida – on pokazuje ne samo antimikrobnu aktivnost, nego i potencijalnu antihipertenzivnu i antioksidacijsku aktivnost. Aktivnost ovih peptida se također može pripisati i peptidima kozjeg mlijeka jer je aminokiselinski slijed ovih peptida jednak (Park 2009.; Park i sur. 2007.).

2.1.1.2 Bioaktivni lipidni sastojci

Mast kravljeg mlijeka se sastoji od više od 400 masnih kiselina s različitom kemijskom strukturom. Većina ovih masnih kiselina je esterificirana glicerolnom molekulom kao osnovicom te se u mlijeku pojavljuje najčešće kao triacilgliceroli (Park 2009.).



Slika 10 Sastav masne globule (Bylund 1995.)

Postoji nekoliko lipidnih sastojaka s bioaktivnim funkcijama, kao što su kratko- i srednjelančane masne kiseline, fosfolipidi, kolesterol, gangliozidi i glikolipidi. Lipidi mlijeka se sastoje oko 98-99% triglicerida, koji čine masnu globulu (Slika 10). Ostatak čine minorni lipidni sastojci, među njima i digliceridi (0,3-1,6%), monogliceridi (0,002-0,1%), fosfolipidi (0,2-1,0%), cerebrozidi (0,01-0,07%), steroli (0,2-0,4%) i slobodne masne kiseline (0,1-0,4%).

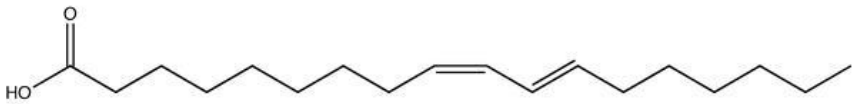
KRATKO I SREDNJELANČANE MASNE KISELINE

Zbog svog visokog sadržaja kratko i srednjelančanih triglicerida, mast kozjeg mlijeka može imati najmanje tri značajna doprinosa ljudskoj prehrani:

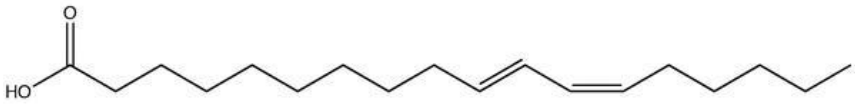
- mast kozjeg mlijeka se puno brže probavlja nego mast kravljeg mlijeka, jer lipaze napadaju esterske veze kratko i srednjelančanih masnih kiselina znatno lakše nego one dugih lanaca;
- ove masne kiseline osiguravaju energiju kod rastuće djece svojim jedinstvenim metaboličkim mogućnostima te također imaju povoljan učinak na metabolizam kolesterola, kao što je hipokolesterolno djelovanje na tkivo i krv inhibicijom nakupljanja kolesterola i otapanjem kolesterola u žučnim kamencima;
- također se primjenjuju u liječenju različitih slučajeva malapsorpcije (Haenlein 2004., Park 1994., 2006.).

KONJUGIRANA LINOLNA KISELINA (CLA)

Konjugirana linolna kiselina (CLA) posljednjih godina dobiva sve veću pozornost nutricionista, potrošača i znanstvenika, zbog svoje blagotvorne i bioaktivne funkcije na ljudsko zdravlje, među koja se ubrajaju antikancerogeno, antiaterogeno, imunostimulacijsko djelovanje te potiče rast i reducira masti u tijelu (Park 2006.). Konjugirana linolna kiselina (CLA) se odnosi na skupinu položajnih i geometrijskih izomera *cis*-9,*cis*-12-oktadekadienoične kiseline (C18:2) s konjugiranim dvostrukim vezama. Glavni CLA izomer u mliječnoj masti je 9-*cis*,11-*trans* (engl. *rumenic acid*).



cis-9,*trans*-11 CLA izomer



trans-10,*cis*-12 CLA izomer

Slika 11 Izomeri konjugirane linolne kiseline

CLA djelomično nastaje biokonverzijom polinezasićenih masnih kiselina u buragu djelovanjem anaerobnih bakterija, a većim djelom endogeno Δ9-desaturacijom vakcenske kiseline u mliječnoj žlijezdi krava. Mliječna mast je najbogatiji izvor CLA; u različitim studijama je zabilježeno da se kreće u velikom rasponu 2-53,7 mg/g masti (Collomb i sur. 2006.). Široki raspon vrijednosti CLA se može pripisati različitim čimbenicima poput režima prehrane i zemljopisnog područja. Mnoge studije istražuju mogućnost povećanja sadržaja CLA u mliječnim proizvodima s mikrobnim kulturama (Bisig i sur. 2007.; Sieber i sur. 2004.).

Tijekom posljednjih 20 godina velik broj studija na životinjama je pokazao višestruko korisno djelovanje CLA na zdravlje. Ovi pozitivni učinci uključuju antikancerogeno, antiaterogeno, antidijabetičko, također može smanjiti pretilost i poboljšati imuni sustav (Collomb i sur. 2006.). Ovi učinci se pripisuju dvama izomerima CLA: *cis*-9,*trans*-11 i *trans*-10,*cis*-12, ali se utjecaj može razlikovati ovisno o izomeru (Park 2009.).

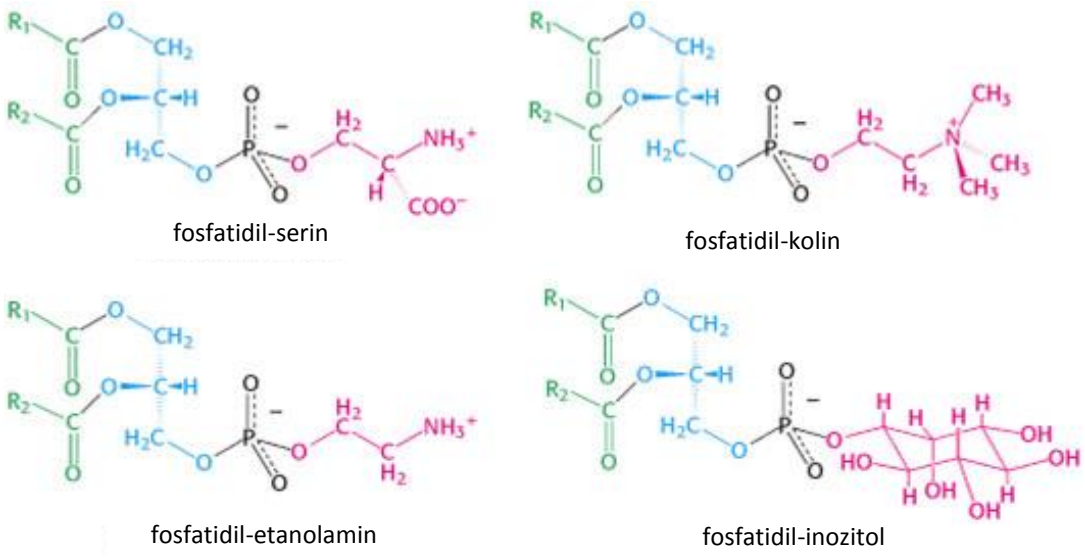
POLARNI (MEMBRANSKI) LIPIDI

Polarni lipidi su skupina lipida mliječne masti, koji se većinom nalaze u membrani mliječne globule. Membrana sadrži oko 60% proteina i 40% lipida koji se nalaze u obliku triglicerida, kolesterola, fosfolipida i sfingolipida… Polarni lipidi mlijeka dobivaju sve veći značaj uslijed svojih nutritivnih i tehnoloških svojstava. Oni su sekundarni glasnici uključeni u transdukciju i regulaciju transmembranskog signala, rast, diferencijaciju i apoptozu stanica. Oni su također uključeni u prijenos živčanog signala te bolesti uzrokovane starenjem, koagulaciju krvi, imunitet i upalne procese (Park 2009.).

Fosfolipidi

Fosfolipidi (**Slika 12**) su esencijalni sastojci staničnih membrana u humanim, životinjskim i biljnim tkivima. U kozjem mlijeku se mogu naći fosfatidil-etanolamin (35,4%), fosfatidil-serin (3,2%), fosfatidil-inozitol (4,0%), fosfatidil-kolin (lecitin, 4,0%) i sfingomijelin (29,2%). Uključeni su u funkciju stanične membrane, te imaju mogućnost interakcije s metabolitima, ionima, hormonima, antitijelima i drugim stanicama.

Fosfolipidi su polarni lipidi koji čine oko 1,6% ukupnih lipida mlijeka. Doprinose bržoj apsorpciji masti, pomažu transport masti iz jetre, smanjuju serumski kolesterol. Više od 90% lecitina se apsorbira u crijevnoj sluznici povećavajući razinu lipoproteina visoke gustoće, dok ne utječe na razinu ukupnog kolesterola i triglicerida u plazmi.



Slika 12 Struktura nekih fosfolipida

Pozornost znanstvenika plijeni saznanje da lecitin unijet hranom poboljšava učenje i pamćenje kod životinja i ljudi, iako se fosfolipidi ne mogu smatrati esencijalnim nutrijentom, jer ih tijelo može samo sintetizirati (Park 2009.).

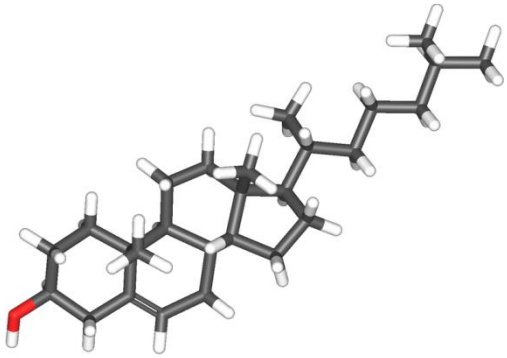
Sfingolipidi

Sfingolipidi i njegovi derivati se smatraju visoko bioaktivnim sastojkom budući da pokazuju antikancerogenu, hipokolesterolsku i antibakterijsku aktivnost. Nadalje, maslačna kiselina i butirati mogu inhibirati razvoj tumora debelog crijeva i dojke. Ovi obećavajući rezultati trebaju dodatnu potvrdu na humanim kliničkim studijama, ali sugeriraju da hrana bogata sfingolipidima može blagotvorno djelovati u prevenciji raka dojke i debelog crijeva i ostale crijevne bolesti (Park 2009.).

Kolesterol

Steroli su minorni sastojci ukupnih lipida u mlijeku, od kojih je najvažniji kolesterol (**Slika 13**) (Park i sur. 2007.). U mlijeku se nalazi najčešće kao slobodan (85-90%), dok se u manjoj koncentraciji nalazi vezan za masne kiseline, najčešće dugog lanca. Kozje mlijeko sadrži manje kolesterola (prosječno 11 mg/100 g mlijeka) nego druga mlijeka (kravlje i majčino 14 mg/100 g), iako kozje mlijeko općenito ima veći udio ukupne masti nego kravlje mlijeko. Niža razina kolesterola u kozjem mlijeku može biti značajna za ljudsku prehranu, budući da se on povezuje s koronarnim srčanim bolestima. Esteri kolesterola kozjeg mlijeka sadrže veći udio palmitinske i oleinske kiseline nego kravlje mlijeko.

Kolesterol se većinom sintetizira u jetri iz octene kiseline pomoću acetil-koenzima A. Veću količinu kolesterola sintetizira samo tijelo nego što se unosi hranom, što implicira da nema značajne povezanosti između unosa kolesterola i njegove razine u krvi. Ima esencijalne funkcije u tijelu kao strukturni sastojak celularne i subcelularne membrane, lipoproteina plazme i živčanih stanica.



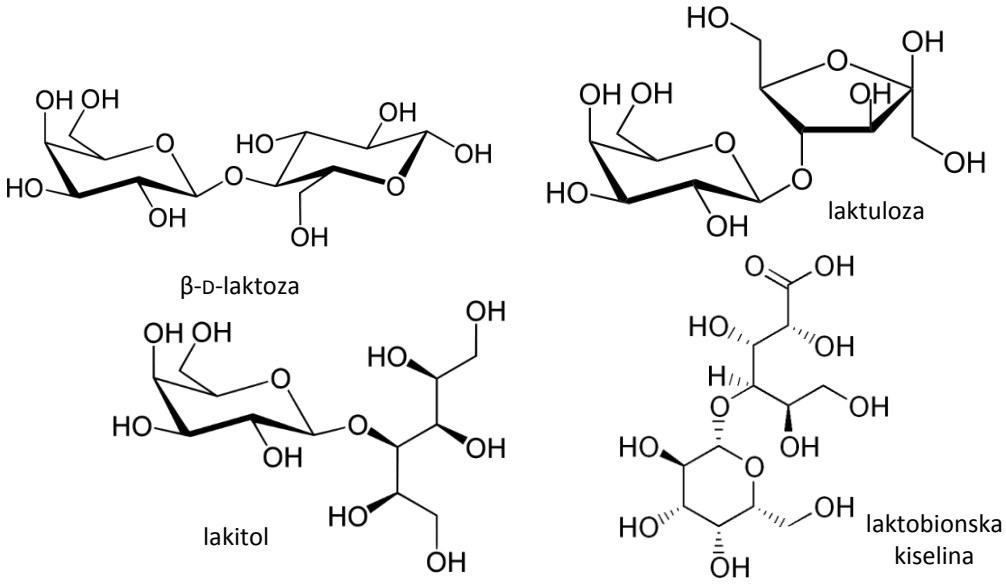
Slika 13 Molekularna struktura kolesterola

Kolesterol je metabolički prekursor žučne kiseline i steroidnih hormona uključujući i vitamin D, te je neophodan za metabolizam uključen u sintezu DNA i diobu stanica, te također ima veliku ulogu u transportu lipida (Park 2009.).

2.1.1.3 Bioaktivni ugljikohidratni sastojci

Laktoza i sastojci koji od nje potječu

Sadržaj laktoze u kozjem, kravljem i majčinom mlijeku redom iznosi 4,1; 4,7 i 6,9 g/100 ml (Park 2006.; Park i sur. 2007.).



Slika 14 Molekularne strukture laktoze i njenih derivata

Viši udio laktoze u majčinom mlijeku se može objasniti, barem djelomično, stimulacijom razvoja bifidus flore, što je povezano s povećanom otpornošću na patogene organizme u crijevima. Znanstvenici su dokazali da laktoza ima niži glikemični indeks od saharoze ili glukoze, što indicira da se laktoza može primjenjivati u prehrani dijabetičara. Sastojke koji nastaju iz laktoze čine: laktuloza, laktitol, laktobionska kiselina i galaktooligosaharidi (**Slika 14**).

Laktuloza je disaharid koji se sastoji od galaktoze i fruktoze, a nastaje iz laktoze tijekom toplinske obrade mlijeka. Za laktulozu je prvo pronađeno da potiče rast bifidobakterija. Udio laktuloze u zagrijanom mlijeku se kreće u rasponu 4-200 mg/100 ml. Laktuloza i laktitol su neprobavljivi te služe kao izvor topljivih vlakana i primjenjuju se u liječenju zatvora i kronične hepatične encefalopatije. Laktobionska kiselina se ne može razgraditi u tankom crijevu gdje ju može fermentirati crijevna flora. Ima prebiotička svojstva i tvori topljive komplekse s mineralima. Galaktooligosaharidi imaju prebiotička svojstva; selektivno stimuliraju bifidobakterije u crijevima, te također povećavaju intestinalnu apsorpciju kalcija (Park 2009.).

Oligosaharidi

Mlijeko osim laktoze sadrži manji udio ugljikohidrata, slobodne ili vezane za lipide, proteine ili fosfate. Najznačajniji među njima su oligosaharidi. To su ugljikohidrati koji se sastoje od 2-10 monosaharidnih jedinica. Oni sadrže galaktozu, fukozu, N-acetilglukozamin i N-acetilneuraminsku kiselinu u različitim udjelima, kao i glukozne ostatke. Više od 50 oligosaharida je identificirano u majčinom mlijeku, a u kravljem i kozjem mlijeku više od 30. Oligosaharidi mlijeka se ubrajaju u skupinu bifidus faktora; u intestinalnom traktu potiču rast *Lactobacillus bifidus*.

Majčino mlijeko sadrži značajnu koncentraciju (5-10 g/l) kompleksnih oligosaharida, koji pokazuju različite korisne učinke na novorođenče. Oni doprinose rastu korisne crijevne flore, stimuliraju imuni sustav i brane organizam od mikrobnih infekcija. Slični oligosaharidi i glikokonjugati se nalaze i u kravljem mlijeku, ali u mnogo manjoj koncentraciji. Niska koncentracija i složenost prirode ovih sastojaka sprječava njihovu karakterizaciju i primjenu kod ljudi (Park 2009.). Kozje mlijeko ima jedinstven sadržaj ugljikohidrata. Sadrži više od 10 puta veći udio oligosaharida, što je približno slično kao onom u majčinom mlijeku. Ovo je od posebnog značaja za prehranu dojenčadi, budući da oligosaharidi kozjeg mlijeka imaju funkcionalne učinke na ljudsko zdravlje. Oligosaharidi majčinog mlijeka se smatraju blagotvornim za dojenče uslijed svojih prebiotičkih i antiinfektivnih svojstava. U kozjem mlijeku je pronađena veća količina i veći broj različitih kiselih i neutralnih oligosaharida nego u kravljem i ovčjem mlijeku. Nadalje, identificirano je 15 novih oligosaharidnih

struktura u kozjem mlijeku. Istraživanja su pokazala da oligosaharidi kozjeg mlijeka mogu smanjiti crijevne upale te dovesti do oporavka oštećene crijevne sluznice (Park 2009.).

2.1.1.4 Bioaktivni minerali i vitamini

Mlijeko kao važan izvor minerala igra veliku ulogu za ljudsko zdravlje. Mnogi glavni i minorni minerali su bioaktivni, fiziološki i u metabolizmu ljudskog organizma. Postoji značajna povezanost između minerala unesenih hranom i pojave specifičnih oboljenja, poput hipertenzije, osteoporoze, raka i kardiovaskularnih bolesti. Usporedbu sadržaja glavnih i minerala u tragovima kozjeg, kravljeg i majčinog mlijeka prikazuje Tablica 4 (Park 2009.).

Kozje mlijeko sadrži veći udio kalcija, fosfora, kalija, magnezija i klora, a manji udio natrija i sumpora nego kravlje mlijeko .

Kalcij je važan bioaktivni sastojak uključen u rast, metabolizam i zdravlje kostiju. U razvijenim zemljama, mlijeko i mliječni proizvodi osiguravaju oko 70% preporučenog dnevnog unosa kalcija. Dobro je dokumentirana zaštitna uloga kalcija u nastanku raka debelog crijeva. Kalcij je povezan i s vezanjem i uklanjanjem karcinogenih tvari (npr. žučnih soli) u gastrointestinalnom traktu. Neke studije pokazuju i utjecaj kalcija u jačanju otpornosti protiv infekcija i patogenih bakterija. Kalcij je bitan za razvoj i održavanje cjelovitosti kostiju i prevenciji osteoporoze. Uz smanjeni unos kalcija se povezuje i hipertenzija (Park 2009.).

Fosfor ima nekoliko važnih metaboličkih funkcija u tijelu, uključujući i mineralizaciju kostiju, energetski metabolizam, metabolizam masti i ugljikohidrata, puferski sustav tijela (kiselo-bazna ravnoteža i pH tijela), te nastanak i prijenos nukleinskih kiselina i fosfolipida kroz staničnu membranu. U nerazvijenim zemljama, gdje je potrošnja mesa ograničena, a zbog nemogućnosti konzumacije kravljeg mlijeka, kozje mlijeko predstavlja važan izvor životinjskih proteina, fosfata i kalcija (Park 2006.; Park i sur. 2007.).

Vitamini su fiziološki, biokemijski i metabolički bioaktivni sastojci koji se nalaze u mlijeku. Svi poznati vitamini se nalaze u mlijeku (Tablica 4), te imaju specifičnu biološku funkciju u tijelu. Kravlje mlijeko je bogat izvor riboflavina (B_2) i vitamina B_{12}. Kozje mlijeko ima veći udio vitamina A nego kravlje, te ono osigurava dovoljne količine vitamina A i niacina, te prekomjerne količine tiamina, riboflavina i pantotenske kiseline. Međutim, kozje mlijeko ima znatno manji sadržaj bioaktivnih vitamina, folne kiseline i vitamina B_{12} u usporedbi s kravljim (Park 1994.).

Tablica 4 Mineralni i vitaminski sastav kozjeg, kravljeg i majčinog mlijeka (Park 2009.)

	sastojak (mg/100 g)	kozje mlijeko	kravlje mlijeko	majčino mlijeko
MINERALI	Ca	134	122	33
	P	121	119	43
	Mg	16	12	4
	K	181	152	55
	Na	41	58	15
	Cl	150	100	60
	S	2,89	-	-
	Fe	0,07	0,08	0,20
	Cu	0,05	0,06	0,06
	Mn	0,03	0,02	0,07
	Zn	0,56	0,53	0,38
	I	0,022	0,021	0,007
	Se*	1,33	0,96	1,52
VITAMINI	vitamin A**	185	126	190
	vitamin D	2,3	2,0	1,4
	tiamin	0,068	0,045	0,017
	riboflavin	0,21	0,16	0,02
	niacin	0,27	0,08	0,17
	pantotenska kiselina	0,31	0,32	0,20
	vitamin B_6	0,046	0,042	0,011
	folna kiselina*	1,0	5,0	5,5
	biotin*	1,5	2,0	0,4
	vitamin B_{12}*	0,065	0,357	0,030
	vitamin C	1,29	0,94	5,00

* µg/100 g
** I.U.

2.1.2. SPECIFIČNI BIOAKTIVNI SASTOJCI SOJE I FERMENTIRANOG SOJINOG MLIJEKA

Soja se u Kini i Jugoistočnoj Aziji kao hrana koristi već više od 5.000 godina. U posljednje vrijeme sve je izraženiji veliki interes potrošača za sojine proizvode u poboljšanju zdravlja ne samo zbog njenog visokog sadržaja proteina (38%) i ulja (18%), već i zbog prisutnosti fiziološki korisnih fitokemikalija. Posljednjih nekoliko godina kliničke i znanstvene studije su dokazale medicinsku korist sojinih sastojaka protiv različitih metaboličkih poremećaja (kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti itd.), kao i kroničnih bolesti (raka, osteoporoze, sindroma menopauze i

anemije). Mnogi od zdravstvenih učinaka soje potječe od sekundarnih metabolita, kao što su izoflavoni, fitosteroli, lecitini, saponini i dr. Učinak najčešćih nutritivnih i fiziološki funkcionalnih sastojaka sojinog zrna sažeto prikazuje Tablica 5 (Arai 1996.).

Tablica 5 Funkcionalni sastojci soje i njihov učinak na zdravlje (Arai 1996.)

sastojak	blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje
α-linolna kiselina	esencijalna masna kiselina, smanjuje razinu triglicerida, povoljno djeluje na zdravlje srca
izoflavoni	estrogeno djelovanje, smanjuju razinu kolesterola, poboljšavaju probavne funkcije, sprječavaju karcinom dojke, prostate i debelog crijeva, povoljno djeluju na zdravlje kostiju, poboljšavaju metabolizam lipida
lecitini	poboljšavaju metabolizam lipida, pamćenje i sposobnost učenja
linolna kiselina	esencijalna masna kiselina, smanjuje razinu kolesterola
peptidi	lako se apsorbiraju, smanjuju tjelesnu masnoću, antikancerogeno djelovanje
fitosteroli	smanjuju razinu kolesterola, djeluju protiv karcinoma prostate
proteini	smanjuju razinu kolesterola, antiaterogeno djelovanje, smanjuju tjelesnu masnoću
saponini	reguliraju metabolizam lipida, djeluju antioksidativno

Mogućnost sojinog mlijeka kao zamjene za kravlje ili majčino mlijeko posljednjih godina dobiva na važnosti, posebno kod dojenčadi i djece alergične na kravlje mlijeko te odraslih osobe s niskom razinom laktaze u crijevima. Sojino mlijeko se također može biti ekonomski isplativi proteinski napitak, u slučajevima kada je kravlje mlijeko nedostupno ili preskupo (Riaz 1999.).

Sojino mlijeko, vodeni ekstrakt sojinog zrna, pokazuje velik broj pozitivnih učinaka na zdravlje potrošača:

- odličan je izvor proteina i prehrambenih vlakana;
- ima mali sadržaj zasićenih masti, ne sadrži kolesterol niti laktozu;
- dobar je izvor željeza;
- proteini soje mogu smanjiti rizik od pojave raka dojke, prostate, pluća;
- sojino zrno povećava razinu plazma tiroksina;
- sadrži izoflavone koji pokazuju mnoštvo pozitivnih učinaka na zdravlje: najznačajniji su zaštita od nastanka raka, srčanih bolesti, osteoporoze;
- budući da ne sadrži galaktozu, sojino mlijeko može sigurno zamijeniti majčino mlijeko kod djece koja pate od galaktozemije;
- ne sadrži kazein, a dobar je izvor lecitina i vitamina E;

- sigurna je za osobe koje ne podnose laktozu, ili s alergijom na mlijeko;
- također pomaže u smanjenju simptoma menopauze te doprinosi zdravlju očiju;
- prikladno je kao osnova zamjene za majčino mlijeko, umjesto kravljeg mlijeka;
- djeluje antidijabetički i protiv pretilosti (Vij 2011.).

Usporedni sastav sojinog i kravljeg mlijeka prikazuje Tablica 6. Kravlje i sojino mlijeko se dosta razlikuju u svom sastavu. Kazein je glavni protein kravljeg mlijeka, dok se u sojinom mlijeku proteini nalaze pretežno u obliku glicinina. Nedostatak proteina sojinog mlijeka je manjak aminokiselina koje sadrže sumpor (metionin i cistin). U kravljem mlijeku najveći dio ugljikohidrata je u obliku laktoze, dok su glavni ugljikohidrati soje stahioza i rafinoza. Sojino mlijeko sadrži oko 10 puta višu koncentraciju željeza od kravljeg, ali je zbog prisutnosti fitata koji vežu željezo ono slabo iskoristivo.

Tablica 6 Sastav i svojstva sojinog i kravljeg mlijeka (Berk 1992.)

sastav i svojstva		**kravlje mlijeko**		**sojino mlijeko**
		punomasno	**djelomično obrano**	
sastojak (g/100 g)	proteini	3,4	3,5	3,6
	masti	3,5	1,5	2,3
	ugljikohidrati	4,6	5,4	3,4
	kolesterol*	10	5	-
sastav masnih kiselina (%)	zasićene	63,5	63,5	14,0
	mononezasićene	33,5	33,5	21,6
	polinezasićene	3,0	3,0	63,5
energijska vrijednost	kJ/100 g	269	208	204
	kcal/100 g	64	49	49

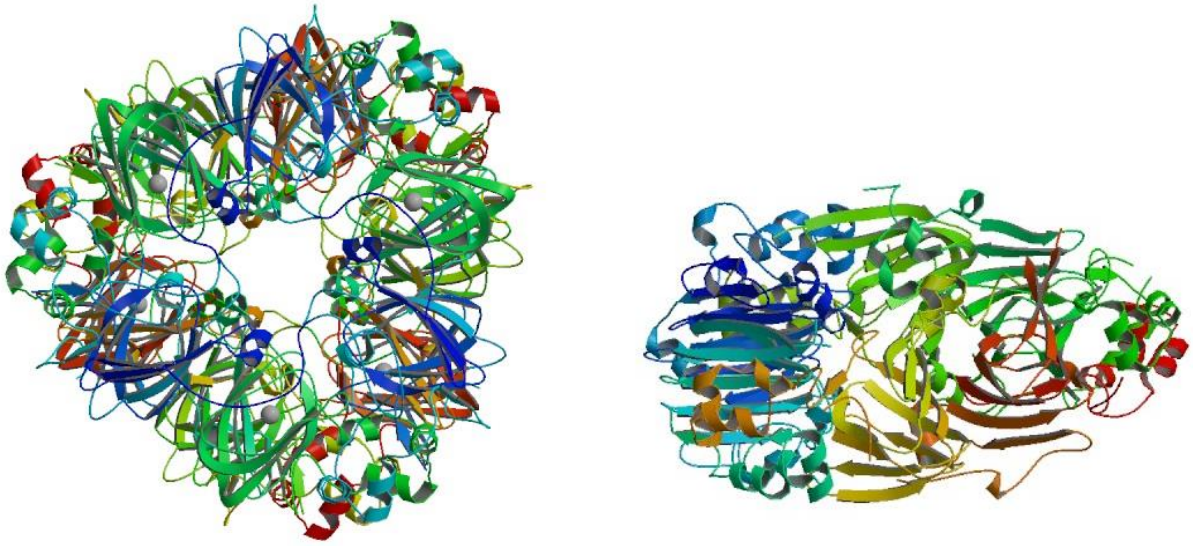
*mg/100 g

Za razliku od kravljeg mlijeka, sojino mlijeko ne sadrži kolesterol, a sadrži prehrambena vlakna kojih nema u kravljem mlijeku. Sojino mlijeko sadrži veću količinu nekih biološki aktivnih aminokiselina (arginin, alanin, glicin, asparaginska kiselina) te nekih vitamina i minerala (tiamin, niacin, Cu, Mn, Mg), što mu daje prednost nad kravljim mlijekom u zdravstvenom smislu (Božanić 2006.).

Fermentacijom sojinog mlijeka poboljšava se bioraspoloživost izoflavona, povećava probavljivost proteina, dobiva više topljivog kalcija, poboljšava intestinalno zdravlje i potiče imuni sustav (Vij 2011.).

2.1.2.1 Proteini i peptidi

Zrno soje sadrži 35-40% proteina u suhoj tvari, od kojih je 90% globulina, frakcije 11*S* glicinin i 7*S* β-konglicinin (**Slika 15**). Oni sadrže gotovo sve aminokiseline esencijalne za zdravu ljudsku prehranu, što čini sojine proizvode gotovo ekvivalentne kvalitete životinjskim izvorima proteina, ali s manje zasićenih masti i bez kolesterola. Sojino zrno također sadrži biološki aktivne proteinske komponente hemaglutinin, inhibitore tripsina, α-amilaze i lipoksigenaze (Dixit i sur. 2011.).



Slika 15 Kristalne strukture glicinina i β-konglicinina

Glicinin je jedini biljni protein koji sadrži sve esencijalne aminokiseline potrebne za rast i normalan razvoj organizma. Po aminokiselinskom sastavu, količini mineralnih tvari i koloidnom stanju u koje se može prevesti s obzirom na svoju djelomičnu topljivost u vodi, sličan je kazeinu mlijeka. Većina sojinih proteina su globulini, topljivi pri svojoj izoelektričnoj točki, čak i uz dodatak soli. Izoelektrična točka sojinih proteina je pri pH 4,2-4,6. Inhibitori tripsina smanjuju djelovanje tripsina, a time i probavljivost proteina, međutim lako se uništava toplinskom obradom. Neki tripsin inhibitori pokazuju i pozitivnu biološku aktivnost. Tako lunasin, polipetid male molekulske mase koji je sastavni dio Bowman-Birkovog inhibitora ima antikancerogeno djelovanje.

Lektini su bioaktivni proteini za koje je dokazano antikancerogeno djelovanje aglutinacijom i/ili agregacijom stanica raka. Soja sadrži i feritin – protein koji nosi željezo. Dokazano je da željezo iz feritina se bolje apsorbira i ima bolju bioiskoristivost poput onog iz životinjskih proizvoda. Stoga se soja preporuča u prehrani osoba koje pate od anemije. Najznačajniji enzim soje je lipokisgenaza/lipooksidaza koji katalizira oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina u aldehide i ketone tijekom prerade soje. Oni daju graškasti okus sojinom mlijeku neprihvatljiv

mnogim potrošačima. Ovaj okus se može prikriti između ostalog zaslađivanjem i aromatiziranjem ili ga se može riješiti fermentacijom sojinog mlijeka (Božanić 2006.; Dixit i sur. 2011.; Lonnerdal 2009.).

U fermentiranom sojinom mlijeku su pronađeni mnogi biološki aktivni peptidi (Korhonen i Pihlanto-Leppälä 2004.). Fermentacijom sojinog mlijeka, proteini se razgrađuju u jednostavnije oblike – oligopeptide, di- i tripeptide, čime se rješava problem alergija, a fermentirani proizvod služi kao izvor bioaktivnih peptida (Fukushima 2001.).

Biološki aktivni peptidi

U enzimskim hidrolizatima sojinih proteina se nalazi nekoliko ACE-inhibitornih bioaktivnih peptida. Inhibicija angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) je glavna terapija u liječenju visokog krvnog tlaka i kod dijabetičara i kod nedijabetičara. Peptidi soje su trenutno tema istraživanja razvoja novih lijekova i sastojaka funkcionalne hrane za zdravlje crijeva i modulaciju crijevne apsorpcije nutrijenata. U sojinom jogurtu, povećana proteolitička aktivnost probiotičkih mikroorganizama povećava proizvodnju ACE-inhibitora (Riaz 1999.; Tamura i sur. 2003.).

Konzumacija sojinog proteina, više nego animalnih proteina, značajno smanjuje koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida u serumu, bez da znatnije utječe na serumski HDL kolesterol. Neke studije su pokazale da unos izolata sojinog proteina (SPI) utječe na lipidni i energetski metabolizam, uključujući i sintezu i razgradnju kolesterola, zbog čega se preporučuju kod koronarnih srčanih bolesti. Fermentirano sojino mlijeko s bifidobakterijama značajno snižava razinu ukupnog plazma kolesterola i LDL-kolesterol. Sojini proteini također snižavaju razinu kolesterola u krvi i štite od kardiovaskularnih bolesti (Donkor i sur. 2007b.; Vij 2011.).

Pretpostavlja se da sojini proteini imaju antikancerogenu aktivnost. Neke studije su pokazale da hrana bogata SPI mijenja profil globalne ekspresije gena u debelom crijevu i povećava razinu somatostatina, poznatog antiprofileracijske tvari za stanice raka debelog crijeva, čime inhibiraju nastanak tumora. Lunazin je bioaktivni peptid iz sojinog zrna i drugih biljaka za koje je pronađeno da ima protuupalna i antikancerogena svojstva (Riaz 1999., Vij 2011.).

U hidrolizatima sojinog proteina su identificirani i peptidi s imunomodulacijskim aktivnostima (Dia i sur. 2009.).

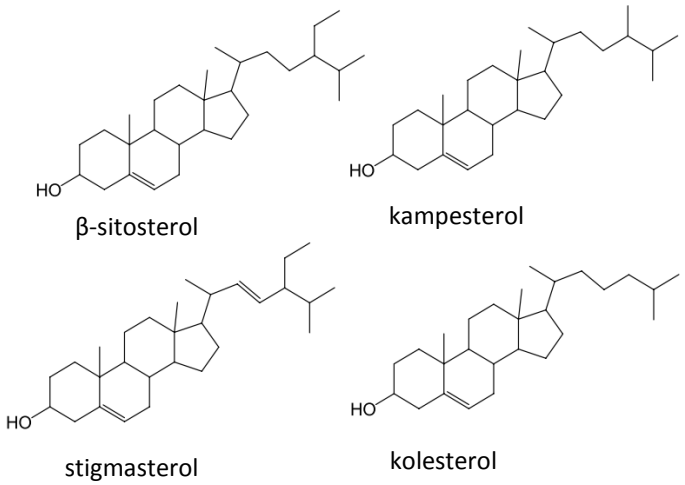
Nekoliko studija je izvijestilo da hrana s visokim sadržajem ISP povećava osjetljivost na inzulin (smanjuje koncentraciju plazma i jetrene lipida u jetri i plazmi, glukozu i inzulin u plazmi). Sojini

proteini su bogati argininom i glicinom, koji su uključeni u izlučivanje inzulina i glukagona u gušterači. Smanjenje kolesterola povezano sa sojinim proteinima u jogurtu može biti zbog smanjenog omjera inzulin-glukagon uzrokovanog argininom i glicinom (Kwon i sur. 2007.).

Dokazano je da sojini proteini također imaju ulogu u smanjenju pretilosti. Također je pronađeno da aktivnost hvatanja radikala sojinih peptida igra važnu ulogu u sprječavanju oksidacije lipida (Vij 2011.).

2.1.2.2 Lipidi

Sojino zrno sadrži oko 19% ulja, od kojih su trigliceridi glavni sastojak. Ulje soje sadrži relativno veliku količinu polinezasićenih masnih kiselina: 55% linolne, 21% oleinske, 12% palmitinske, 8% α-linolne kiseline, 7% linolenske, 4,5% laurinske i miristinske i 2,5% sterainske kiseline. Linolna kiselina je esencijalna ω-6 masna kiselina koja pokazuje važne nutritivne i fiziološke funkcije, dok se α-linolna ubraja u esencijalne ω-3 masne kiseline te igra važnu ulogu u regulaciji velikog broja metaboličkih puteva. Mono i polinezasićene masne kiseline snižavaju ukupni kolesterol u krvi te poboljšavaju omjer kolesterola i lipoproteina, zbog čega se povezuju sa smanjenjem rizika od pojave krvožilnih bolesti. Minorne komponente sirovog sojinog ulja su fosfolipidi (lecitin), te fitosteroli i tokoferol (vitamin E) (Božanić 2006.; Dixit i sur. 2011.).



Slika 16 Sojini fitosteroli i njihova strukturna sličnost kolesterolu (Dixit i sur. 2011.)

Soja sadrži oko 300-400 mg/100 g biljnih sterola. Glavni sastojci sojinih sterola su β-sitosterol (53-56%), kampesterol (20-23%) i stigmasterol (17-21%). Oni se od kolesterola razlikuju samo u strukturi (Slika 16) bočnog lanca. Steroli imaju aktivnost smanjenja razine kolesterola, iako mehanizam nije potpuno razjašnjen (Dixit i sur. 2011.; Riaz 1999.).

Sojino ulje sadrži 1-3% fosfolipida, od čega oko 35% fosfatidil-kolina, 25% fosfatidil-etanolamina, 15% fosfatidil-inozitola, 5-10% fosfatidne kiseline. To su polarni lipidi koji doprinose strukturi stanične membrane (Dixit i sur. 2011.; Riaz 1999.).

2.1.2.3 Ugljikohidrati

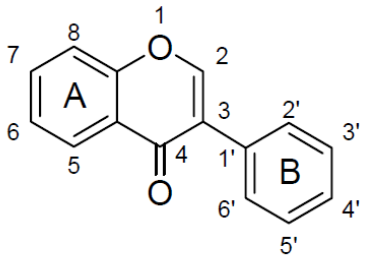
Soja sadrži oko 35% ugljikohidrata, većinom neškrobne polisaharide. Polisaharidi se većinom sastoje od netopljivih prehrambenih vlakana, celuloze, hemiceluloze i pektina. Također sadrži saharozu (5,4%) i oligosaharide (Grieshop i sur. 2003.) kao što su stahioza (4%) i rafinoza (1,1%). Stahioza je tetrasaharid sa strukturom Gal-Gal-Glu-Fru strukturom, dok je rafinoza trisaharid sa strukturom Gal-Glu-Fru (**Slika 26**).

Oligosaharidi se ne mogu razgraditi u sluznici tankog crijeva ljudi, jer ne postoji enzim α-galaktozidaza. Tako stižu u debelo crijevo gdje mikrobnom razgradnjom nastaju plinovi koji uzrokuju nadutost. Ovaj nedostatak se može riješiti fermentacijom sojinog mlijeka. Međutim, oligosaharidi imaju i pozitivno djelovanje; dokazano je da rafinoza i stahioza potiču rast autohtonih bifidobakterija u debelom crijevu. Također konzumiranje hrane bogate dijetalnim vlaknima je povezano sa stvaranjem otpornosti na bolesti. Topljiva vlakna snižavaju razinu LDL u krvnom serumu, a netopljiva smanjuju rizik od pojave karcinoma (Božanić 2006., Tsangalis i Shah 2004.).

Ranija istraživanja su pokazala da sojini polisaharidi smanjuju postprandijalnu koncentraciju glukoze (nakon obroka) sugerirajući da polisaharidi iz soje imaju potencijalni blagotvorni učinak kod stanja narušene tolerancije na glukozu (Vij 2011.).

2.1.2.4 Izoflavoni

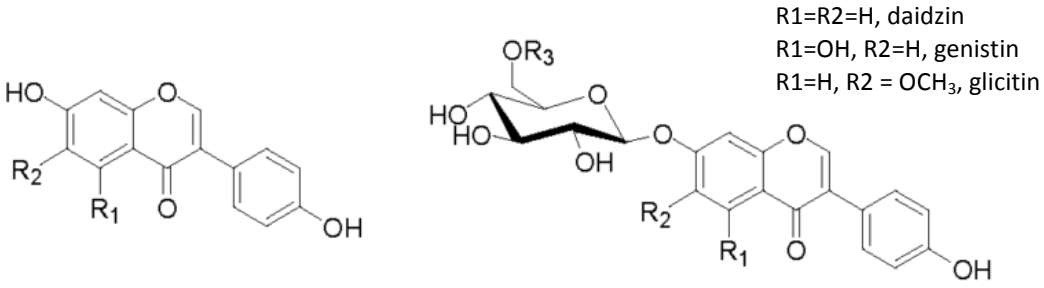
Izoflavoni su podskupina heterocikličkih biljnih fenolnih komponenata – flavonoida. Kod izoflavona je fenilni prsten (B) vezan na pozicij 3 1,4-benzopironskog prstena, kako prikazuje Slika 17 (Dixit i sur. 2011.).



Slika 17 Osnovna struktura izoflavona (Dixit i sur. 2011.)

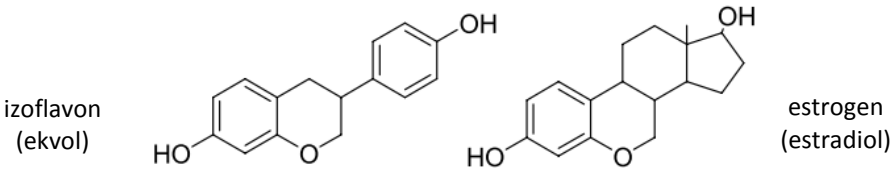
Sojino zrno je najznačajniji izvor izoflavona (do 3 mg/g suhe tvari) u prirodi (Dixit i sur. 2011.).

U soji se izoflavoni u najvećoj mjeri (80-95%) nalaze kao biološki inaktivni glukozidi, vezani na šećere: diadzin, genistin i u manjoj količini glicitin. Glukozni izoflavoni se vrlo slabo apsorbiraju u tankom crijevu u usporedbi s njihovim aglikonima, uslijed veće molekularne mase i više hidrofilnosti. Također, glukozidi su manje bioaktivni nego njihovi aglikoni. Probiotičke bakterije, kada rastu u sojinom mlijeku, biokonvertiraju glukozide izoflavona u biološki aktivne aglikone: genistein, daidzein i glicitein (Slika 18) (Riaz 1999., Vij 2011.).



Slika 18 Kemijska struktura izoflavona soje (Dixit i sur. 2011.)

Izoflavoni su strukturno slični estrogenu sisavaca (Slika 19) te se mogu vezati na estrogenske receptore i blokirati utjecaj estrogena, stoga se i nazivaju fitoestrogenima (Dixit i sur. 2011.).



Slika 19 Usporedba strukture izoflavona i estrogena (Dixit i sur. 2011.)

Iako izoflavoni nisu esencijalni nutrijenti koji su neophodni za život, ipak pokazuju mnoga blagotvorna djelovanja na ljudsko zdravlje i stoga su od neizmjerne pomoći za očuvanje zdravlja (Dixit i sur. 2011.; Riaz 1999.).

Bioaktivni izoflavoni

Izoflavoni u sojinom jogurtu poboljšavaju profil serumskih lipida, vaskularnu otpornost i štite LDL od oksidacije. Iako su neke studije pokazale da izoflavoni zajedno sa sojinim proteinima snižavaju kolesterol, istovremeno povećavajući HDL kolesterol, sami izoflavoni nemaju takav učinak (Božanić 2006., Vij 2011.).

Genistein i daidzein štite stanice od negativnih utjecaja slobodnih radikala koji potpomažu starenje te su uključeni u velik broj bolesnih stanja poput ateroskleroze, upale zglobova i komplikacija uzrokovanih dijabetesom. Jogurt od soje sadrži izoflavone (daidzein i genistein) koji posjeduju prirodna antioksidativna svojstva. Oni smanjuju oksidaciju LDL kolesterola što je bitno u prevenciji vaskularnih oštećenja i bolesti (Vij 2011.).

Sojini proizvodi su bogati izoflavonima, velike skupine fitoestrogena za koje se pretpostavlja da smanjuju rizik od pojave raka dojke. Konzumacija sojinih proizvoda tijekom adolescencije značajno smanjuje rizik od smrti i povratka raka, kod žena s rakom dojke. Pretpostavlja se da izoflavoni blokiraju receptore estrogena u mliječnoj žlijezdi, a kod muškaraca blokiraju testosteron koji potiče prostatu na rast tumora, te usporavaju angiogenezu – prvu fazu u nastanku tumora, iako mehanizam sprječavanja karcinoma nije do kraja razjašnjen (Božanić 2006., Riaz 1999.).

Sojino mlijeko fermentirano mliječnim bakterijama pokazuje povećanu imunomodulacijsku aktivnost. Genistein je jedan od najviše istraživanih izoflavona za učinak na imuni sustav. Genistein u sojinom jogurtu je poznat kao inhibitor proteina tirozin-kinaze. Smanjuje broj timocita do 86% i udvostručuje apoptozu (Vij 2011.).

Navodi se da sojini izoflavoni mogu biti korisni za dijabetičare uslijed svoje estrogenske aktivnosti i njihove sposobnosti sprječavanja glukoza-ovisne peroksidacije lipida i inhibiranja intestinalnog unosa glukoze smanjenjem natrij-ovisnog transporta glukoze, što rezultira u smanjenju postprandijalne hiperglikemije. Sojini izoflavonoidi poboljšavaju metabolizam glukoze, te soja može pomoći u prevenciji dijabetesa tipa 2 i odgoditi napredovanje bolesti (Kwon i sur. 2007.).

Postoje naznake da izoflavoni imaju svojstva zaštite kostiju što može biti potencijalna vrijednost u smanjenju rizika od nastajanja osteoporoze u postmenopauzi. Neke studije su pokazale da dodatak izoflavona sojinim proteinima u koncentraciji 90 mg/dan, rezultira smanjenjem gubitka kosti u lumbalnoj kralježnici. Druga istraživanja pokazuju da unos estradiola (estrogena) ili genisteina povećava koštanu masu, što dokazuje da genistein ima jednaka svojstva izgradnje kostiju kao i estrogen. Sojini izoflavoni iz jogurta imaju pozitivan učinak na koštano tkivo, što ukazuje na obećavajuću budućnost za sojine izoflavone kao primjena u funkcionalnoj hrani u smanjenju rizika nastajanja osteoporoze (Potter i sur. 1998.). Izoflavoni soje smanjuju masno tkivo apoptozom adipocita/masnih stanica i smanjenjem veličine pojedine masne stanice. Tako, slično učinku estrogena, genistein utječe na masno tkivo najvjerojatnije inhibicijom lipogenih lipoproteinskih lipaza koje reguliraju unos adipocitnih lipida (Velasquez i Bhathena 2007.).

2.1.2.5 Vitamini i minerali

Soja je bogati izvor B-vitamina u usporedbi s drugim žitaricama, a nedostaje joj B12 i vitamin C. Sojino ulje također sadrži tokoferol, koji je izvrstan prirodni antioksidans koji veže slobodne radikale. Soja sadrži također i oko 5% minerala. Relativno je bogata kalijem, fosforom, kalcijem, magnezijem i željezom. Sojin feritin može nadomjestiti značajnu količinu željeza.

Dostupnost kalcija je veća pri nižoj pH vrijednosti, tako da fermentacijom sojinog mlijeka i iskorištavanjem kompleksa ugljikohidrata koji se nalaze u njemu, također se povećava raspoloživost kalcija (Dixit i sur. 2011.; Vij 2011.).

2.1.2.6 Ostali sastojci soje

Soja sadrži oko 2% saponina (triterpen glikozid) koji su trenutno privlače pozornost znanstvenika. Sojini saponini imaju jedinstvenu kemijsku strukturu i fiziološku funkciju. Do sada je pronađeno ukupno 30 saponina u soji, ali se prisutnost i količina razlikuje ovisno o genetičkim i agronomskim varijacijama. Sojini saponini imaju nekoliko bioloških djelovanja, kao što su hepatoprotektivno, antihiperlipidno, antikancerogeno, antioksidativno i anti-HIV (Yoshiki i sur. 1998.).

Fitinska kiselina veže minerale (cink, kalcij, magnezij, željezo) smanjujući njihovu apsorpciju. Budući da je u soji prisutna u vrlo malim koncentracijama ne utječe na deficit minerala, a fermentacijom sojinog mlijeka se njena količina smanjuje. Također je dokazano da ima antioksidacijski učinak, što bi moglo imati ulogu u smanjivanju rizika od karcinoma (Božanić 2006.).

2.1.2.7 Biofunkcionalna svojstva fermentiranog sojinog mlijeka

Sojino mlijeko fermentirano mliječnim bakterijama značajno smanjuje razinu ukupnog kolesterola u plazmi i lipoproteina vrlo male gustoće. Izoflavoni u fermentiranom sojinom mlijeku (bogati aglikonima) se puno lakše apsorbiraju nego oni iz nefermentiranog sojinog mlijeka (bogati glukozidima). Nadalje, fiziološki učinak fermentiranog sojinog mlijeka je veći nego onaj nefermentiranog zbog veće bioraspoloživosti samih aglikona. Međutim, fermentacijski produkti (mliječna i octena kiselina) i probiotici mogu utjecati na apsorpciju ili metabolizam izoflavona. Slično, organske kiseline poboljšavaju apsorpciju kalcija, a intestinalna flora utječe na apsorpciju i metabolizam flavonoida. (Champagne i sur. 2009.; Vij 2011.). U usporedbi s kazeinom, sojini proteini pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u prevenciji oksidacije lipida, dok izoflavoni povećavaju aktivnost nekih antioksidativnih enzima u jetri (Fukushima 2001.).

2.2. FERMENTACIJA MLIJEKA PROBIOTIČKIM BAKTERIJAMA

Uklapanje probiotičkih organizama poput laktobacila i bifidobakterija u fermentirane proizvode poboljšava kakvoću prozvoda i utječe na zdravlje potrošača. Probiotička hrana se definira kao „hrana koja sadrži žive mikroorganizme, koji prilikom probave, aktivno poboljšavaju zdravlje potrošača poboljšavanjem ravnoteže crijevne mikroflore“ (Fooks i sur. 1999.). Uslijed povećanog znanstvenog interesa za hranu koja utječe na zdravlje i objavljivanjem dokaza o povoljnom djelovanju probiotika na zdravlje, dolazi do povećane potražnje potrošača za probiotičkom hranom. Znanstvenici navode velik broj zdravstvenih boljitaka uslijed potrošnje probiotičkih organizama, uključujući smanjenje kolesterola u krvi, povećanja imuniteta, ublažavanje simptoma netolerancije laktoze, liječenje dijareje, antikancerogena i antihipertenzivna svojstva te biotransformacija izoflavonskih fitoestrogena u poboljšanju hormonalne ravnoteže kod žena u postmenopauzi (Shah 2000.a., Vasiljević i Shah 2008.).

2.2.1. PROBIOTIČKE BAKTERIJE

Probiotički mikroorganizmi se svrstavaju u bakterije mliječne kiseline (BMK) koje su važne bakterije u fermentaciji hrane. Imaju ključnu ulogu u fermentaciji mliječnih, sojinih i mesnih proizvoda, te povrća kao što je kupus.

2.2.1.1 Karakteristike bakterija mliječne kiseline

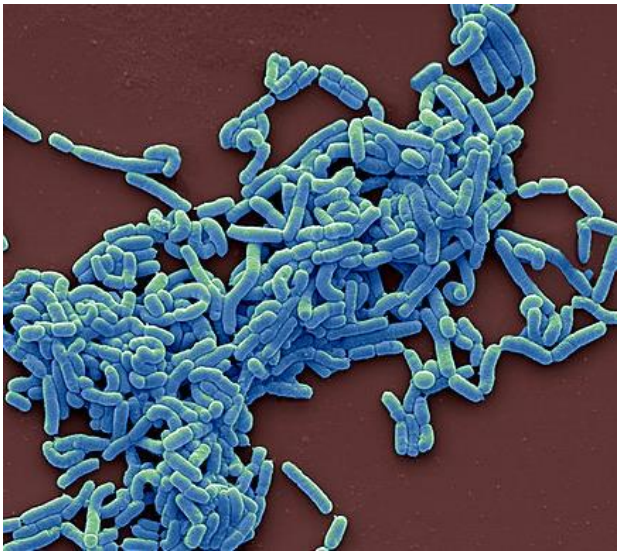
Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivni mikroorganizmi, bez citokroma koji preferiraju anaerobne uvjete, ali su aerotolerantni, izbirljivi, tolerantni na kiselinu, i strogo fermentativni. Ovi organizmi proizvode mliječnu kiselinu kao glavni konačni produkt tijekom fermentacije ugljikohidrata. Najznačajniji probiotički mikroorganizmi su bakterije mliječne kiseline rodova *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc* te rod *Bifidobacterium*. Na osnovi sadržaja gvanina i citozina u molekuli DNA, Gram-pozitivne bakterije se dijele u dvije velike filogenetske skupine. Bakterije roda *Bifidobacterium* imaju relativno visok sadržaj G+C (>55 mol%) te pripadaju *Actinomycetes* grani Gram-pozitivnih bakterija. BMK su dio *Clostridium* grane Gram-pozitivnih bakterija s nižim sadržajem G+C (<55 mol%). Međutim bifidobakterije dijele određena fiziološka i biokemijska svojstva s bakterijama mliječne kiseline te neke zajednička mjesta djelovanja, kao što je GIT. Stoga se iz praktičnih i tradicionalnih razloga bifidobakterije smatraju dijelom grupe BMK.

Bakterije mliječne kiseline se obično dijele u dvije skupine na osnovi njihovog metabolizma ugljikohidrata. Homofermentativnu skupinu čine rodovi *Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus, Streptococcus* i neki laktobacili koji koriste glikolitički put transformacije izvora ugljika, većinom u mliječnu kiselinu (Axelsson 1998.). Za razliku od homofermentativnih, heterofermentativne bakterije proizvode ekvimolarnu količinu laktata, ugljičnog dioksida i etanola ili acetata iz glukoze koristeći fosfoketolazni put. Tu se ubrajaju *Leuconostoc, Weissella* i neki laktobacili. Vrste roda *Enterococcus* se često nalaze kao dio mješovitih starter kultura nekih tradicionalnih fermentiranih proizvoda. Međutim, namjerna uporaba u mliječnoj industriji još uvijek je sporna, posebno jer se neke vrste smatraju oportunistima humanih patogena povezanih s infekcijama (Axelsson 1998.; Franz i sur. 1999.).

Laktobacili

Laktobacili su posvuda prisutni u prirodi; nalaze se u sredini bogatoj ugljikohidratima. Oni su Gram-pozitivni, nesporogeni mikroorganizmi, katalaza negativni s nekim izuzecima, oblika štapića ili kokobacila. Oni su fermentativni, mikroaerofilni i kemoorganotrofni. Homofermentativni laktobacili fermentiraju laktozu i druge monosaharide većinom u mliječnu kiselinu, a heterofermentativni u mliječnu kiselinu, ugljični dioksid i etanol. Često se primjenjuju u prehrambenim proizvodima, a probiotički sojevi uključuju *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* (noviji naziv *L. paracasei* subsp. *paracasei*), *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* (Hammes i Hertel 2002.).

Lactobacillus casei (Slika 20) se može se naći u različitim sredinama kao što su svježi i fermentirani mliječni proizvodi, probavni trakt i reproduktivni sustav ljudi i životinja, te u svježim i fermentiranim biljnim proizvodima. Optimalan pH za rast *L. casei* je 5,5, dok je optimalna temperatura oko 30-40 °C. Nadalje, *L. casei* može izlučivati bakteriocine, antimikrobne peptide. *L casei* se može prilagoditi niskim temperaturama (Cai i sur. 2007.) Najvažniji sastojak koji proizvodi *L. casei* je mliječna kiselina, koja nastaje fermentacijom glukoze. *L. casei* je vrlo bitan u reguliranju imunog sustava gastrointestinalnog trakta. On se veže na luminalnu površinu stanica i stimulira limfoidno tkivo crijeva (Marcos i sur. 2004.), što potiče urođeni imuni odgovor. U borbi protiv patogena koji mogu napasti imuni sustav, *L. casei* se natječe za nutrijente ili mjesto vezanja. Također može inhibirati rast patogenih bakterija snižavanjem pH sredine proizvodnjom organskih kiselina poput octene, propionske i mliječne, ili proizvodnjom vodikovog peroksida (Millette i sur. 2007.; Soccol i sur. 2010.).

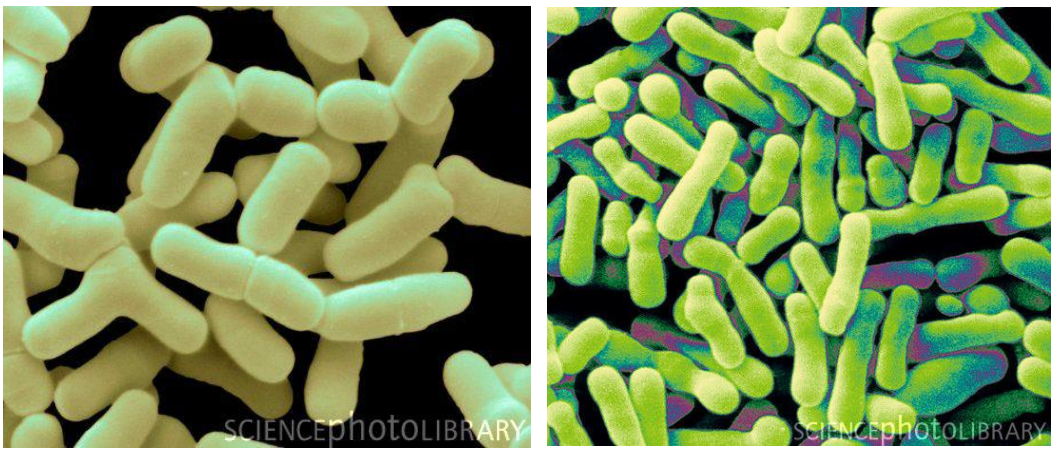


Legenda: povećanje: 3.000×

Slika 20 Mikroskopski prikaz (SEM) bakterije *Lactobacillus casei* (*Science Photo Library*)

Bifidobakterije

Bifidobakterije je prvi izolirao Tissier iz fecesa dojenčadi hranjenih majčinim mlijekom. Ovaj štapićasti, anaerobni organizam koji ne proizvodi plin je nazvan *B. bifidus* zbog svoje dvokrake morfologije. Bifidobakterije su normalni stanovnici ljudskog gastrointestinalnog trakta. Nedavna *in vivo* istraživanja su pokazala da konzumacija živih bifidobakterija ima povoljan učinak na crijevnu mikrofloru. Odabrani sojevi preživljavaju prolazak kroz želudac i crijeva u velikom broju. Crijeva novorođenčeta se kolonizira s bifidobakterijama u nekoliko dana nakon rođenja, a mikrobna populacija je prilično stabilna sve do starijih godina, kada dolazi do smanjenja broja bakterija. Ipak, prehrana, antibiotici i stres utječu na populaciju bifidobakterija u crijevima (Shah 2007.).



Legenda: lijevo: *Bifidobacterium bifidum*, povećanje 16.000×;
desno: *Bifidobacterium lactis*, povećanje 13.500×

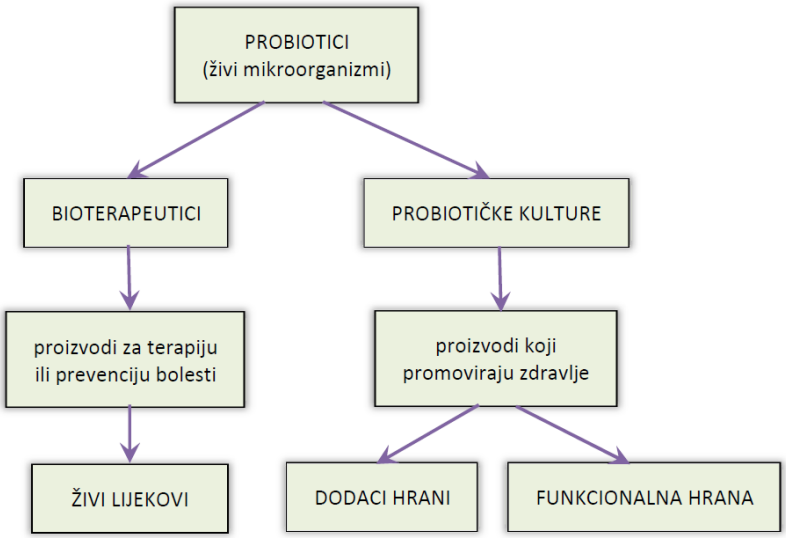
Slika 21 Mikroskopski prikaz (SEM) bifidobakterija (*Science Photo Library*)

One su općenito okarakterizirane kao Gram-pozitivni, nesporogeni, nepokretni i katalaza negativni anaerobi s posebnim metaboličkim putem koji omogućuje proizvodnju octene kiseline uz mliječnu kiselinu u molarnom omjeru 3:2. Zbog svoje izbirljive prirode, ove bakterije se često teško izoliraju i slabo rastu u laboratoriju. Promjenjivog su štapićastog oblika (**Slika 21**).

Taksonomija bifidobakterija se neprestano mijenja otkada su prvi put izolirane. Prvo su bile pridružene rodovima *Bacillus, Bacteroides, Nocardia* i *Corynebacterium*, prije nego su bile prepoznate kao poseban rod 1974. Trenutačno postoji 32 vrste roda *Bifidobacterium*, od kojih je 12 izolirano iz ljudskih izvora (npr. usna šupljina, feces, vagina), 15 iz životinjskog intestinalnog trakta ili buraga, 3 iz pčela, a preostale 2 su pronađene u fermentiranom mlijeku i fekalijama. *Bifidobacterium* vrste ljudskog porijekla su: *B. adolescentis, B. angulatum, B. bifidum, B. breve, B. catenulatum, B. dentium, B. infantis, B. longum* i *B. pseudocatenulatum*. *Bifidobacterium breve, B. infantis* i *B. longum* su pronađeni kod dojenčadi. *B. adolescentis* i *B. longum* su nađeni kod odraslih ljudi. Optimalan pH za rast bifidobakterija je 6,0-7,0, s prestankom rasta pri pH 4,5-5,0 i nižim ili pri pH 8,0-8,5 ili iznad. Optimalni rast se odvija na temperaturama 37-41 °C, a minimalne i maksimalne temperature rasta su 25-28 °C i 43-45 °C (Shah 2007.; Soccol i sur. 2010.; Vasiljević i Shah 2008.).

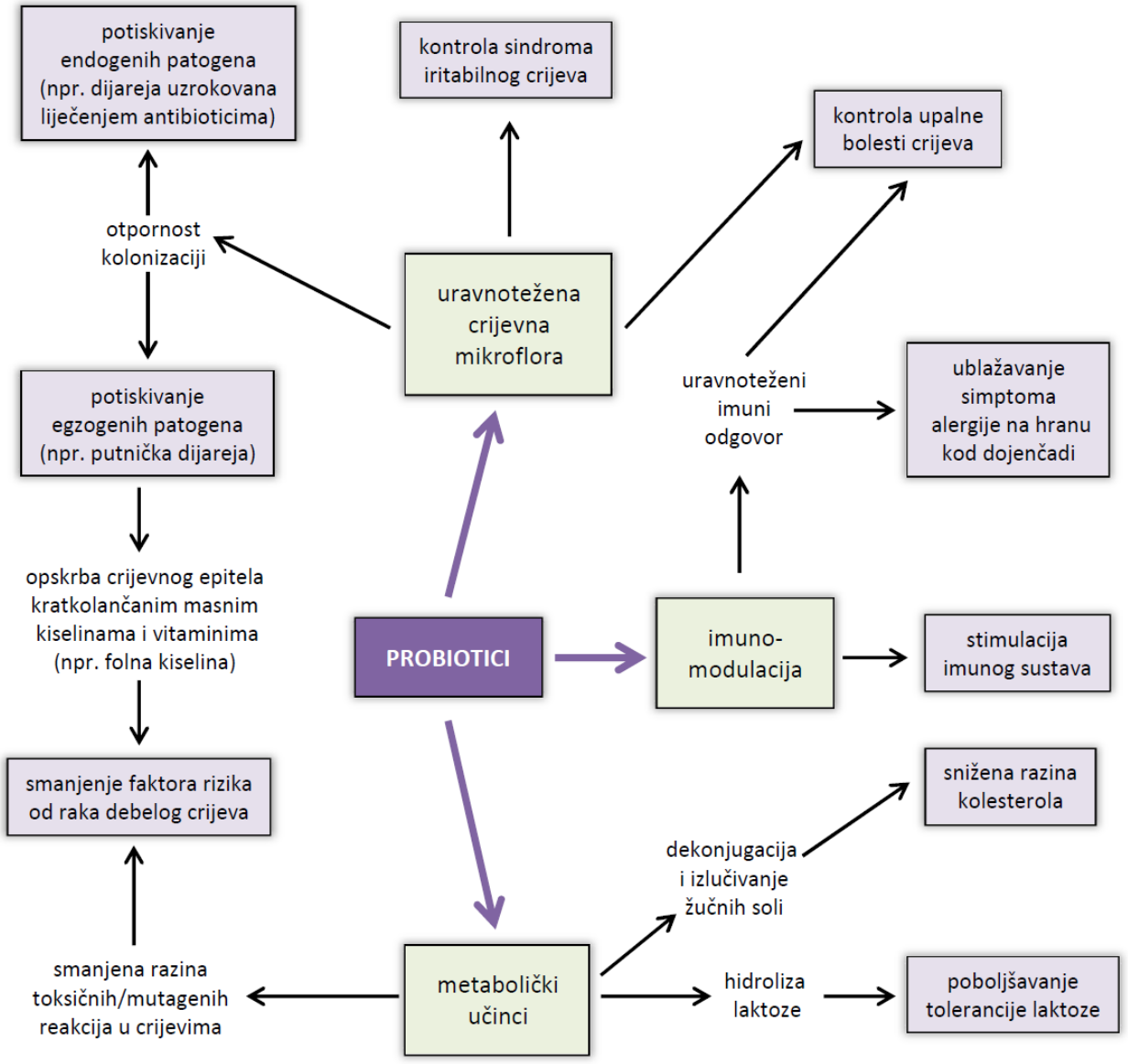
2.2.1.2 Utjecaj probiotika na ljudsko zdravlje i predloženi mehanizmi djelovanja

Probiotici se definiraju kao: "živi mikroorganizmi koji, ako se koriste u dovoljnoj količini, imaju blagotvorno djelovanje na organizam" (FAO/WHO 2002.). Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani (**Slika 22**).



Slika 22 Klasifikacija probiotičkih proizvoda (Šušković i sur. 2009.)

Bioterapeutici su probiotički sojevi namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti što ih svrstava u kategoriju živih lijekova, dok probiotici kao funkcionalni dodaci hrani promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore. Često iste probiotičke kulture, koje prehrambene tvrtke nazivaju funkcionalnim dodacima hrani, farmaceutska industrija naziva nutraceuticima (Šušković i sur. 2009.).



Slika 23 Različiti povoljni učinci konzumacije probiotika (Parvez i sur. 2006.)

Još od vremena Metchnikoffa, različiti povoljni učinci na zdravlje (**Slika 23**) su pridonijeli popularnosti proizvoda koji sadrže probiotičke organizme. Dosada su provedena istraživanja o utjecaju specifičnih živih mikrobnih sastojaka hrane na ljudsko zdravlje kao sastavni dio hrane ili kao pojedinačne ili mješovite kulture.

Tablica 7 Neki znanstveno dokazani i potencijalni korisni učinci probiotika na zdravlje (Shah 2007.)

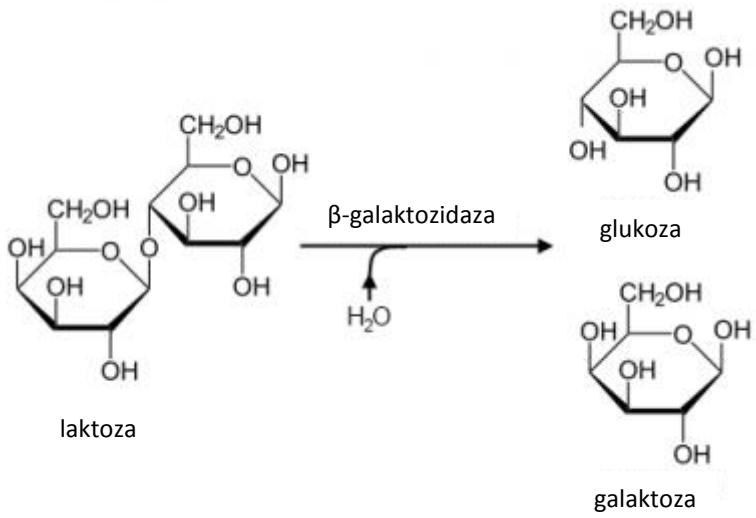
utjecaj probiotika na ljudsko zdravlje		predloženi mehanizam djelovanja
znanstveni	ublažavanje intolerancije laktoze	isporuka intracelularne β-galaktozidaze u ljudski gastrointestinalni trakt
	sprječavanje i smanjenje simptoma rotavirusnih i dijareja uzrokovanih antibioticima	kompeticijsko isključenje translokacija / efekt prepreke poboljšani imuni odgovor
potencijalni	liječenje i sprječavanje alergija (atopijski ekcem, alergija na hranu)	translokacija / efekt prepreke isključenje, eliminacija i regulacija otpornosti
	smanjenje rizika povezanog s mutagenošću i karcinogenošću	metabolizam mutagena promjena crijevne mikroekologije promjena crijevne metaboličke aktivnosti normalizacija crijevne propusnosti poboljšanje crijevne otpornosti
	hipokolesterolemijski učinak	dekonjugacija žučnih soli
	inhibicija *Helicobacter pylori* i crijevnih patogena	kompeticijsko isključenje efekt prepreke proizvodnja antimikrobnih tvari
	sprječavanje upalne bolesti crijeva	kompeticijsko isključenje poboljšanje epitelnih međustaničnih veza promjena crijevne propusnosti modulacija imunog odgovora proizvodnja antimikrobnih tvari raspadanje patogenih antigena
	stimulacija imunog sustava	prepoznavanje TLRS receptora urođenog i stečenog imuniteta: negativna regulacija proupalnih citokina i kemokina pozitivna regulacija fagocitne aktivnosti regulacija TH1/TH2 ravnoteže

Neki od povoljnih učinaka konzumacije probiotika uključuju: poboljšanje zdravlja intestinalnog trakta regulacijom mikrobne populacije i stimulacijom imunog sustava, sintetiziranje ili povećanje bioraspoloživosti nutrijenata, smanjenjem simptoma netolerancije laktoze i smanjenjem rizika od nastanka određenih bolesti. Mehanizam djelovanja probiotika je većim djelom nepoznat, ali može uključivati modificiranje pH crijeva, antagonizam prema patogenima proizvodnjom antimikrobnih tvari, natjecanjem za mjesto vezanja patogena, mjesta receptora, nutrijenata i faktora rasta, simulacijom imunomodulacijskih stanica i proizvodnjom laktaze (Lee i Salminen 2009.).

Dok su neka od ovih djelovanja dobro dokumentirana i dokazana, druga pokazuju obećavajući potencijal u životinjskim modelima. Još važnije, zdravstveno poboljšanje dodijeljeno probiotičkim bakterijama je jako ovisno o soju; stoga, ne postoji univerzalni soj koji će pružiti sva nabrojana poboljšanja, čak ni sojevi iste vrste. Nadalje, niti svi sojevi iste vrste nisu učinkoviti protiv određenih zdravstvenih stanja. Sojevi *L. rhamnosus* GG (Valio), *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii (Biocodex), *L. casei* Shirota (Yakult) i *B. lactis* Bb12 (Chr. Hansen) su trenutno najviše istraživane probiotičke kulture s utvrđenim podacima o učinkovitosti djelovanja na ljudsko zdravlje protiv malapsorpcije laktoze, rotavirusne dijareje, dijareje uzrokovane antibioticima i dijareje uzrokovane *Clostridium difficile*. Neka od djelovanja na zdravlje svojstvenih soju prikazuje **Tablica 7** (Shah 2007., Vasiljević i Shah 2008.).

Ublažavanje simptoma nepodnošenja laktoze

Smanjenje aktivnosti intestinalne β-galaktozidaze (laktaze) je biološka karakteristika sazrijevanja crijeva kod većeg dijela svjetske populacije. S izuzetkom stanovnika sjeverne i centralne Europe te bijelaca Sjeverne Amerike i Australije, više od 70% odraslih širom svijeta pate od malapsorpcije laktoze. Laktoza se nakon probave hidrolizira laktazom u sluznici tankog crijeva u sastavne monosaharide, glukozu i galaktozu, koji se lako apsorbiraju u krvotok.



Slika 24 Cijepanje laktoze pomoću β-galaktozidaze

Ipak, aktivnost crijevne laktaze kod laktoza netolerantnih osoba je uobičajeno manja od 10% razine u djetinjstvu (Buller i Grand 1990.). Ovo smanjenje, nazvano hipolaktazija, uzrokuje nepotpunu probavu laktoze u tankom crijevu, karakteriziranu povećanjem koncentracije glukoze u krvi ili koncentracije hidrogena u dahu nakon uzimanja 50 g laktoze, uvjetima utvrđenim kao maldigestija laktoze. Hipolaktazija i malapsorpcija laktoze praćeni kliničkim simptomima, kao što

su nadimanje, mučnina, bol u trbuhu i dijareja, nazivaju se netolerancija laktoze. Simptomi su uzrokovani neprobavljenom laktozom u debelom crijevu, gdje laktozu fermentira intestinalna mikroflora, a osmotski tlak povećava dotok vode u lumenu. Jačina simptoma ovisi primarno o količini unesene laktoze. Razvoj simptoma netolerancije također ovise o brzini prelaska laktoze u debelo crijevo, uzrokovanog osmotskim i kalorijskim opterećenjem, i mogućnošću crijevne mikroflore da fermentira laktozu.

Brojne studije su pokazale da pojedinci s hipolaktazijom lakše podnose fermentirane mliječne proizvode nego ekvivalentnu količinu mlijeka. Za razjašnjenje ovog fenomena predloženo je nekoliko obrazloženja. Najmanje tri čimbenika se doimaju odgovornim za bolje podnošenje laktoze iz fermentiranih mliječnih proizvoda: (a) starter kultura, (b) unutarstanična β-galaktozidaza koja se nalazi u toj kulturi, i najvažnije (c) vrijeme prolaska od usta do slijepog crijeva. Tradicionalne kulture koje se koriste u mliječnim fermentacijama koriste laktozu kao izvor energije tijekom rasta, čime dolazi, najmanje, do djelomičnog smanjenja njenog sadržaja u fermentiranim proizvodima. Nadalje, bakterijska laktaza može se oduprijeti luminalnim učincima izbjegavajući denaturaciju te se može detektirati u dvanaesniku i krajnjem vitom crijevu, nakon konzumacije proizvoda koji sadrže žive bakterije. Prisutnost enzima može dovesti do hidrolize laktoze i poboljšanja podnošenja laktoze. S druge strane, druge studije koje ne podržavaju ovu teoriju ne nalaze razlike u probavi i toleranciji laktoze u nekim fermentiranim mliječnim proizvodima sa značajno različitom aktivnošću laktaze. Pretpostavlja se da povećana viskoznost fermentiranog mlijeka, u ovom slučaju jogurta, usporava pražnjenje želuca i zbog toga produžuje vrijeme prolaska kroz gastrointestinalni trakt poboljšavajući apsorpciju i toleranciju laktoze (Shah 2007.).

Prevencija i liječenje dijareje

Jedna od glavnih primjena probiotika je liječenje i prevencija dijareje uzrokovane antibioticima, koja je često uzrokovana pojavom *C. difficile* nakon primjene antibiotika. *C. difficile* je autohtoni gastrointestinalni organizam koji se uobičajeno nalazi u malom broju u zdravim crijevima; međutim, primjena antibiotika može dovesti do poremećaja autohtone mikroflore i slijedom toga do povećanja koncentracije ovog organizma i povećanja proizvodnje toksina, koji uzrokuje simptome dijareje. Da bi se obnovila ravnoteža crijevne mikroflore potrebna je primjena egzogenih probiotičkih pripravaka. Primjena probiotika u kliničkim ispitivanjima značajno smanjuje dijareju uzrokovanu antibioticima za 52%, putnu dijareju za 8%, a one akutne dijareje različitih uzroka za 34%. Štoviše, odgovarajući rizik akutne dijareje kod djece je smanjen za 57%, a 26% kod odraslih. Zanimljivo, svi ispitani sojevi uključujući *S. boulardii, L. rhamnosus* GG*, L. acidophilus, L.*

bulgaricus, sami ili u kombinaciji pokazuju slično djelovanje. Najjači dokaz povoljnog djelovanja navedenih sojeva probiotika je utvrđen za *L. rhamnosus* GG i *B. lactis* Bb12. Oralna primjena rehidrirane otopine koja sadrži *Lactobacillus* GG kod djece s akutnom dijarejom rezultirala je u smanjenju trajanja dijareje, manjoj mogućnosti težeg oblika, i bržem otpuštanju iz bolnice. Slično kao kod dijareje uzrokovanoj antibioticima i rotavirusima, probiotici mogu spriječiti i olakšati simptome putne dijareje, koju uzrokuju bakterije, posebice enterotoksična *Esherichia coli*. Nekoliko istraživanja je procijenilo utjecaj probiotičkih pripravaka kao profilaksa za putnu groznicu, međutim, rezultati su bili proturječni zbog nedostatka metodologije, koja je nesumnjivo ograničila vrijednost njihovih zaključaka (Marteau i sur. 2002.).

Mehanizam pri kojem fermentirana mliječna hrana, koja sadrži probiotike ili mlijeko koje sadrži kulturu, smanjuje trajanje dijareje još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Nekoliko mogućih mehanizama prikazuje Tablica 7. Kompeticijsko isključenje je mehanizam kod kojeg probiotici inhibiraju adheziju rotavirusa izmjenom glikozilacijskih mjesta receptora u epitelnim stanicama izlučivanjem topljivih faktora. Prisutnost probiotika također sprječava poremećaj citoskeletnih proteina u epitelnim stanicama uzrokovanog patogenima, što dovodi do poboljšane funkcije sluznice i neuspjele prevencije u sekreciji elektrolita. Dodatno, probiotički sojevi mogu prilagoditi prirodni imuni odgovor u oba smjera; antiupalni i proupalni odgovor (Shah 2007.).

Alergije

Sprječavanje i liječenje alergija je još jedno područje u kojem probiotici mogu potencijalno pokazati svoju korisnu ulogu. Pojavljivanje alergija je u svijetu u stalnom porastu, s jasnom razlikom između razvijenih zemalja i zemalja u razvoju. Osnovno polazište hipoteze higijene je da ograničeno izlaganje djece bakterijskim i virusnim patogenima djeluje na ravnotežu između T-pomoćnih stanica favoriziranjem Th2 fenotipa imunog sustava. Nedovoljna stimulacija Th1 stanica ne može se nadoknaditi razvojem Th2 stanica i rezultira sklonošću za alergiju (Yazdanbakhsh i sur. 2002.). Zakašnjela kolonizacija *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* spp. u gastrointestinalnom traktu djece može biti jedan od razloga za alergijske reakcije. Također, razlika u gastrointestinalnoj mikroflori može igrati ulogu u podložnosti alergijama. Dojenčad s atopijskim dermatitisom ima više *Bifidobacterium* mikroflore odraslog tipa. Zdrava dojenčad, s druge strane, su kolonizirana većinom s *B. bifidum*, karakterističnim za dojenčad hranjenu majčinim mlijekom. Novija istraživanja također ukazuju da rana konzumacija probiotičkih pripravaka koji sadrže *Lactobacillus* GG mogu smanjiti učestalost ekcema kasnije tijekom života. Slično, druga istraživanja predlažu da liječenje s *Lactobacillus* GG može ublažiti simptome sindroma atopijskog ekcema/dermatitisa kod

IgE-osjetljivih novorođenčadi, ali ne u ne-IgE-osjetljivih novorođenčadi, dok 4-tjedna terapija s *Lactobacillus* GG ublažava crijevne upale kod dojenčadi sa sindromom atopijskog ekcema/dermatitisa i alergija na mlijeko. Mehanizam zaštitnog djelovanja probiotika na alergijske reakcije nije potpuno razjašnjen; premda je predloženo jačanje različitih pravaca crijevne obrane uključujući izuzimanje otpornosti, eliminacija otpornosti i regulacija otpornosti (Shah 2007., Vasiljević i Shah 2008.).

Antimutagena i antikancerogena svojstva

Antigenotoksičnost, antimutagenost i antikancerogenost su važna moguća funkcionalna svojstva probiotika, koja u posljednje vrijeme dobivaju sve više pozornosti. Mutageni često nastaju tijekom stresa ili zbog virusnih i bakterijskih infekcija i fagocitoze, ali također se često dobivaju preko hrane. Oštećenje endogene DNA dovodi do starenja i starenjem izazvanih degenerativnih bolesti. Obrambeni mehanizam preko leukocita oslobađa veliki broj sastojaka uključujući NO, O_2^- i H_2O_2 čime se brani od pojedinih bakterijskih i virusnih infekcija, ali mogu dovesti do oštećenja DNA i mutacija. Ireverzibilno oštećenje DNA je kritični faktor karcinogeneze i starenja. Antimutagenost se može opisati kao sprječavanje procesa mutacije, koji se očituje kao smanjenje razine spontanih i izazvanih mutacija. Neka epidemiološka istraživanja naglašavaju da uzimanje probiotika može biti povezano sa smanjenom učestalošću raka debelog crijeva, a eksperimentana istraživanja pokazuju mogućnost laktobacila i bifidobakterija da smanje genotoksičnu aktivnost određenih kemijskih sastojaka i povećaju antimutagenu aktivnost tijekom rasta u određenim medijima (Hirayama i Rafter 2000.).

Također je otkrivena antimutagena aktivnost fermentiranog mlijeka protiv niza mutagena i promutagena uključujući 4-nitrokinolin-N'-oksid, 2-nitrofluoren i benzopiren u različitim testiranim sustavima baziranim na mikrobnim stanicama i stanicama sisavaca. Pa ipak, antimutageno djelovanje može ovisi o interakciji između sastojaka mlijeka i bakterija mliječne kiseline. Lankaputhra i Shah (Shah 2007.) su proučavali antimutagenu aktivnost organskih kiselina koje proizvode bakterije protiv osam mutagena i promutagena uključujući 2-nitrofluoren (NF), aflatoksin B (AFTB) i 2-amino-3-metil-3*H*-imidazokinolin (AMIQ). Među organskim kiselinama, maslačna kiselina pokazuje široki spektar antimutagene aktivnosti protiv svih ispitivanih mutagena i promutagena. Osim toga, žive bakterijske stanice pokazuju višu antimutagenost nego mrtve stanice protiv ispitivanih mutagena, što sugerira da su žive bakterije uključene u metabolizam mutagena. Rezultati naglašavaju važnost konzumacije živih probiotičkih bakterija i zadržavanje njihove životne aktivnosti u crijevima kako bi se osigurala djelotvorna inhibicija mutagena.

Nekoliko čimbenika je identificirano kao odgovorni za indukciju kolorektalnog raka (crijeva) uključujući bakterije i metaboličke produkte kao što su genotoksični sastojci (nitrozamin, heterociklički amini, fenolni sastojci i amonijak). Epidemiološka ispitivanja su pokazala da prehrana igra ulogu u etiologiji većine karcinoma velikih unutrašnjih organa, ukazujući da je to bolest koja se potencijalno može spriječiti. Mnoga istraživanja potvrđuju sudjelovanje endogene mikroflore u napadu raka debelog crijeva. Ovo djelovanje je posredstvom mikrobnih enzima kao što su β-glukuronidaza, azoreduktaza i nitroreduktaza, koji pretvaraju prokarcinogene u karcinogene. Eksperimenti koji su se odvijali u životinjskim modelima su pokazali da su određeni sojevi *L. aciodophilus* i *Bifidobacterium* spp. sposobni smanjiti razinu enzima kao što su β-glukuronidaza, azoreduktaza i nitroreduktaza odgovornih za aktivaciju prokarcinogena. Ova inaktivacija na kraju dovodi do značajnog opadanja rizika povezanog s razvojem tumora. Neka istraživanja su pokazala da pripravci koji sadrže bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast tumorskih stanica kod eksperimentalnih životinja ili indirektno smanjuju karcinogenost smanjenjem bakterijskih enzima koji aktiviraju karcinogenezu (Shah 2007., Vasiljević i Shah 2008.). Kratkolančane masne kiseline koje proizvodi *L. acidophilus* i bifidobakterije također inhibiraju nastanak karcinogenih proizvoda redukcijom enzimske aktivnosti. Kada se inkubiraju *in vitro* s 4-nitrokinolin-1-oksidom (4NQO), neki probiotički sojevi inhibiraju genotoksičnu aktivnost 4-nitrokinolin-1-oksida. *L. casei* je najdjelotvorniji, a slijede ga *L. plantarum* i *L. rhamnosus* . Najuvjerljiviji klinički podaci postoje za *L. casei* Shirota, gdje je konzumacija ovog organizma povezana sa smanjenim izlučivanjem urinarnog mutagena. Nadalje, pretpostavlja se da uobičajena konzumacija mlijeka fermentiranog ovim sojem smanjuje rizik od raka mjehura u populaciji Japanaca.

Mehanizam antimutagenosti i antikancerogenosti probiotičkih bakterija nije do kraja razjašnjen. Pretpostavlja se da mikrobno vezanje mutagena na površini stanica može biti mogući mehanizam antimutagenosti. Drugi predloženi mehanizam uključuje izmjenu intestinalne mikroekologije i intestinalne metaboličke aktivnosti, normalizaciju intestinalne propusnosti i povećanje intestinalne otpornosti (Shah 2007.).

Smanjenje serumske razine kolesterola

Dobro je dokazano da prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama ili kolesterolom povećava serumsku razinu kolesterola, što je jedan od glavnih čimbenika krvožilnih bolesti. Mann i Spoerry su bili prvi koji su pratili smanjenje serumske razine kolesterola kod ljudi hranjenih velikim količinama (dnevno 8,33 l/osoba) mlijeka fermentiranog s *Lactobacillus*. Kao što su pretpostavili/predložili, do toga je došlo vjerojatno zbog hidroksi-metil-glutarata kojeg proizvode

probiotičke bakterije, koji inhibira hidroksimetilglutaril-CoA reduktazu potrebnu za sintezu kolesterola. Stoga će, unos fermentiranog mlijeka koje sadrži veliki broj probiotičkih bakterija u ljudi vjerojatno dovesti do hipokolesterolemijskog efekta. *In vitro* istraživanja su predložila da se hipokolesterolemijski efekt probiotika može provoditi preko nekoliko mogućih mehanizama uključujući asimilaciju rastom stanica ili vezanjem na površinu stanice. Drugi mehanizam predlaže dekonjugaciju žuči hidrolizom žučnih soli (hidrolaza žučnih soli; EC 3.5.1.24) i koprecipitaciju kolesterola s dekonjugiranom žuči (Vasiljević i Shah 2008.). Kolesterol se izlučuje fekalnim putem prije čega dekonjugacija žuči rezultira u slobodnim žučnim solima. One imaju manju sposobnost apsorpcije i stoga se izlučuju u većoj količini u fecesu. Ovaj efekt je dodatno pojačan slabom topljivošću lipida u prisutnosti slobodnih žučnih soli, što smanjuje njihovu apsorpciju u crijevima dovodeći do daljnjeg smanjenja koncentracije serumskih masnoća (Begley i sur. 2006.). Najveće istraživanje koje je utvrdilo sposobnost hidrolize žučnih soli velikog broja sojeva i vrsta bakterija mliječne kiseline je pokazalo je da aktivnost hidrolaze žučnih soli uobičajena kod *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, ali odsutna kod *Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides* i *S. thermophilus*. Gotovo svi sojevi i vrste bifidobakterija posjeduju aktivnost hidrolaze žučnih soli, dok je to utvrđeno samo za odabrane vrste laktobacila. Također je proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina uključena kao drugi mogući mehanizam za efekt snižavanja kolesterola probioticima. U nedavnim istraživanjima, razina serumskog kolesterola je smanjena izmjenom metabolizma lipida do kojeg su dovele kratkolančane masne kiseline. To je potkrijepljeno negativnom korelacijom između razine serumskog kolesterola i propionske kiseline u slijepom crijevu te pozitivne korelacije s koncentracijom fekalne octene kiseline. Međutim, otkrića nekih *in vivo* istraživanja su bila donekle proturječna, npr. ili je uočen efekt smanjenja ili nije (Vasiljević i Shah 2008.), iako je kasnije *in vitro* dokazana sposobnost soja za smanjenje kolesterola. Unatoč nekoliko studija na ljudima, efekt smanjenja serumskog kolesterola se još uvijek ne smatra dokazanim djelovanjem i dvostruko-slijepa placebo-kontrolirana klinička istraživanja na ljudima bi trebala dokazati ovu tvrdnju. Također mora biti razjašnjen i mehanizam uključen u smanjenje razine kolesterola.

Inhibicija *Helicobacter pylori* i crijevnih patogena

Probiotičke kulture proizvode velik broj antibakterijskih sastojaka koji uključuju organske kiseline (npr. mliječna i octena kiselina), hidrogen peroksid, bakteriocine, različite niskomolekularne peptide, antifungalne peptide/proteine, masne kiseline, fenilalanin i hidroksifenilalanin. Mliječna i octena kiselina su glavne organske kiseline koje se proizvode tijekom rasta probiotika, a njihov efekt sniženja pH vrijednosti u gastrointestinalnom traktu ima bakteriocidno i bakteriostatsko

djelovanje. Niskomolekularni sastojci kao što je mliječna kiselina su pokazali inhibicijsko djelovanje prema Gram-negativnim patogenim bakterijama. Osim toga, termostabilne niskomolekularne antibakterijske tvari različite od mliječne kiseline, prisutne u supernatantu bez stanica kulture su inaktivirale velik broj Gram-negativnih bakterija te inhibiralale adheziju Caco-2 stanica i napad *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*. Također, probiotici kao mnoge druge bakterije mliječne kiseline mogu proizvoditi različite bakteriocine. Bakteriocini su ribosomski antimikrobni peptidi koji djeluju protiv drugih bakterija, ili unutar iste vrste (uzak spektar) ili preko roda (široki spektar) s imunitetom na vlastite bakteriocine. Nedavno su Corr i suradnici pokazali da je *L. salivarius* sposobna zaštititi miševe od *Listeria monocytogenes* direktnim antagonizmom posredstvom bakteriocina Abp118. U nekim slučajevima inhibicija gastrointestinalnih patogena je multifaktorska, uključujući sve spomenute čimbenike djelovanja. Proizvodnja antimikrobnih sastojaka je stimulirana prisutnošću patogena. Općenito, predlažu se mnogi mehanizmi pomoću kojih probiotici sprječavaju štetne učinke crijevnih patogena uključujući kompeticiju za ograničavajuću hranjivu tvar, inhibiciju epitelne i mukozne adherencije patogena, inhibiciju epitelne invazije patogena, proizvodnju antimikrobnih tvari i/ili stimulaciju mukoznog imuniteta (Vasiljević i Shah 2008.).

Helicobacter pylori je intestinalni patogen, dugotrajne infekcije koja dovodi do kroničnog gastritisa, peptičkog ulkusa (čira) i povećava rizik od karcinoma želuca. Trenutno se infekcija s *H. pylori* liječi kombiniranom terapijom koja sadrži dva antibiotika i inhibitor protonske pumpe, koje iako se u mnogim slučajevima pokazao kao vrlo učinkovit, predstavlja vrlo skupu terapiju s mnogim nuspojavama koje uključuju dijareju uzrokovanu antibioticima i mogućnost nastanka rezistencije crijevnih patogena na antibiotike. Klinički ishodi infekcije s *H. pylori* ovise o jačini upale i gustoći stanica (Ernst i Gold 2000.). Rizik povezan s razvojem peptičkog ulkusa i karcinoma želuca je direktno proporcionalan razini infekcije. Jedna od mjera koja može pomoći u usporavanju infekcije *H. pylori* je prilagođena prehrana koja uključuje probiotike.

Probiotički organizmi ne mogu iskorijeniti *H. pylori*, ali su u istraživanjima na ljudima i životinjama pokazali mogućnost smanjenja broja bakterije i smanjenja upale. Pretpostavlja se da je supresijsko djelovanje ovisno o soju. Soj *L. casei* Shirota pokazuje značajno smanjenje razine kolonizacije *H. pylori* u antrumu i sluznici želuca kod miševa *in vivo*. Ovo smanjenje je praćeno značajnim opadanjem povezanih kroničnih i aktivnih upala želučane sluznice u svakom trenutku tijekom promatranog razdoblja. Slično, *L. acidophilus* može inhibirati rast *H. pylori*. U mješovitom istraživanju, 14 pacijenata zaraženih s *H. pylori* je dobivalo mlijeko fermentirano s *L. casei* Shirota

(2×10^{10} CFU/dan) šest tjedana. Ureolitička aktivnost je smanjenja na 64% kod pacijenata koji su konzumirali fermentirane proizvode s probioticima, u usporedbi s 33% u kontrolnoj skupini. Slično, nedavna istraživanja su pokazala da redovito uzimanje jogurta koji sadrži *B. lactis* Bb12 i *L. acidophilus* La5 može učinkovito potisnuti infekciju *H. pylori* kod ljudi. U ostalim studijima kod ljudi koji su uzimali ili liofiliziranu kulturu *L. brevis* ili jogurt sa *L. acidophilus* i *B. lactis* ili *L. johnsonii* La1, smanjenje broja bakterija *H. pylori* je određeno direktno pomoću ureaza izdisajnog testa. Kao što su brojna navedena ispitivanja predložila, samo uzimanje probiotika ne dovodi do potpunog uništenja bakterije *H. pylori*, međutim upotreba probiotika kao pomoćna terapija zajedno s liječenjem antibioticima može riješiti probleme nuspojava. Provedene su brojne studije s različitim uspjehom i prilično proturječnim rezultatima koji mogu biti uzrokovani različitim dizajnom eksperimenta i primijenjenim kontrolnim skupinama. Predloženo je nekoliko mehanizama koji se odnose na učinak probiotika na bakteriju *H. pylori* uključujući proizvodnju antimikrobnih tvari, poboljšanje funkcije crijevne pregrade i kompeticija za mjesta vezivanja; ipak stvarni značaj ovih mehanizama je još uvijek nejasan (Shah 2007., Vasiljević i Shah 2008.).

Upalna bolest crijeva

Upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) uključuje spektar poremećaja karakteriziranih upalnim procesima, čirevima i abnormalnim suženjima gastrointestinalnog trakta što rezultira abdominalnom boli, dijarejom i gastrointestinalnim krvarenjem . Zastupljena su dva glavna fenotipa: ulcerozni kolitis i Chronova bolest; obje kronične, relapsno-remitirajuće bolesti s individualnom sklonošću kasnijeg razvoja kolorektalnog karcinoma. Ova dva fenotipa imaju različite patogenoze, koje se temelje na upalnim procesima, simptomima i strategijama liječenja. Chronova bolest je pretežno Th1 imuni odgovor, karakteriziran početnim povećanjem ekspresije citokina (IL)-12, nakon čega slijede interferon (IFN)-γ i čimbenik nekroze tumora (TNF)-α. S druge strane, ulecerozni kolitis je Th2 imuni odgovor s pretežnom proizvodnjom proupalnih citokina uključujući IL-5. Etiologija upalne bolesti crijeva nije dovoljno razjašnjena s okolišnim, genetičkim i imunološkim čimbenicima koji igraju ulogu u razvoju oba tipa bolesti.

Nekoliko *in vitro* studija na staničnim modelima upalne bolesti crijeva je dokazalo sposobnost određenih probiotičkih sojeva kao što su *L. rhamnosus* GG prilagodbe imunog sustava smanjenjem proizvodnje TNF-α izazvanog IL-8. Učinak jasno ovisi o koncentraciji stanica, ali ne o životnoj aktivnosti budući da mrtve stanice pokazuju sličan učinak. Suprotno ovim opažanjima, učinak *L. reuteri* je povezan s njegovom održivošću i, uz smanjenje proizvodnje IL-8, dodatno povećanjem razine protuupalnih čimbenika živčanog rasta. *In vivo* studije na životinjama su ukazuju na važnost

probiotičkih bakterija u razvoju funkcionalnog imunog sustava. *B. lactis* Bb12 je početno povisila razinu ekspresije IL-6, ali su štakori sačuvali normalnu crijevnu histologiju. Nadalje, *B. lactis* Bb12 sprječava razvoj opsežne crijevne upale uzrokovane *B. vulgatus*, naglašavajući važnu ulogu probiotičkih bakterija u početnoj homeostazi epitelnih stanica. Ipak, ovaj učinak najvjerojatnije ovisi o soju (Schultz i sur. 2003.). Neka istraživanja su pokazala da probiotici mogu imati povoljan učinak na pacijente oboljele od upalne bolesti crijeva. U jednom istraživanju je proučavan mogući učinak dodatka *Lactobacillus* GG kod četvoro djece s aktivnom Chronovom bolešću. Troje od njih koji su uzimali oralno *Lactobacillus* GG su pokazali značajna poboljšanja u kliničkim rezultatima. Iako su prikazani rezultati vrlo ohrabrujući budući da se *Lactobacillus* GG pokazao učinkovitim u poboljšanju kliničkog stanja djece s Chronovom bolešću, potrebni su dodatni testovi s većim brojem uzoraka kako bi se potvrdila ova tvrdnja. Usprkos svim provedenim istraživanjima nedostaju opsežna, slučajno odabrana klinička ispitivanja s dvostrukim slijepim probama i kontrolirana placebom koji bi procijenili učinkovitost probiotičkog soja i/ili njihove kombinacije. Najbolji dokaz za upotrebu probiotika kod upalne bolesti crijeva dolazi od slučajno odabranog dvostruko-slijepog placebo kontroliranog pokusa s VSL#3 (mješavina četiri vrste laktobacila, tri vrste bifidobakterija i *S. thermophilus*) kod pacijenata s pouchitisom (upala operacijom formirane crijevne vrećice, rezervoara koji oblikuje kirurg nakon odstranjenja crijeva). Gionchetty i suradnici su u svom istraživanju utvrdili učinkovitost VSL#3 kao održivi tretman u 40 pacijenata s kroničnim relapsnim pouchitisom. Nakon 4 mjeseca u intervencijskoj skupini je došlo do manje relapsa nego u kontrolnoj skupini. Štoviše, svi pacijenti su kasnije, 3 mjeseca nakon prestanka uzimanja VSL#3 doživjeli relaps. Drugo istraživanje je potvrdilo ove nalaze pokazujući učinkovitost VSL#3 kao održivu terapiju kod pacijenata s periodičnim kroničnim pouchitisom. Godine 2003. Gionchetti je proširio svoje početno istraživanje da bi odredio da li je terapija s VSL#3 sposobna spriječiti napad akutnog pouchitisa i poboljšati kvalitetu života pacijenata u godini neposredno nakon kirurškog zahvata (Vasiljević i Shah 2008.). Samo se u 10% od skupine koja je primala VSL#3 terapiju razvio pouchitis u usporedbi s 40% placebo skupine. Dok su predloženi brojni mehanizami (Tablica 7), potrebna je daljnja razrada i potvrda prethodnih istraživanja.

Stimulacija imunog sustava

Složeni imuni sustav uključuje: urođeni i stečeni imunitet, koji rade usklađeno kako bi nas zaštitili od vanjskih i unutrašnjih napada. Urođeni sustav je naslijeđen i niti je anticipativan niti je klonski i ne može reagirati na promjene okoline. Predstavlja prvu liniju obrane s urođenim stanicama ubojicama kao primarnim stanicama uključenim u identifikaciju i spontanu razgradnju napadačkih

ciljeva (stanice inficirane virusom, tumorske stanice, matične stanice, embrionalne stanice). Između porasta i opadanja broja urođenih stanica ubojica i slučaja rasta tumora postoji inverzna povezanost . Suprotno tome, stečeni sustav se stiče interakcijom s okolinom. Podložan je indukciji, anticipaciji (imuna memorija) i klonskoj ekspanziji. Razumijevanje ovih odgovora je ključ razumijevanja mehanizma alergija, autoimunih oboljenja, cijepljenja i karcinogenosti. Urođeni i stečeni imuni sustavi su visoko integrirani i međuovisni (Hoebe i sur. 2004.).

Ljudi su kao sisavci razvili izrazito prilagodljiv imuni sustav, i sustavnog i lokalnog tipa. Intestinalne epitelne stanice su direktno povezane s intestinalnom mikroflorom i također povezuju i odvajaju imuni sustav. Pretpostavlja se da imuni sustav može korisno djelovati na prisutnost probiotika prepoznavanjem receptora izraženih na površini epitelnih stanica (Isolauri i sur. 2001.). Urođeni imuni sustav preko TLRs receptora prepoznaje velike skupine kemijskih struktura kod patogena kao što su lipopolisaharidi i lipoteikoične kiseline što im omogućuje prepoznavanje stranog tijela što aktivira kaskadni mehanizam imunog odgovora, kao što je proizvodnja proupalnih i protuupalnih citokina. TLRs receptori su izraženi većinom kod makrofaga i dendritičkih stanica, ali također uključuju mnoštvo drugih stanica kao što su B stanice i epitelne stanice. Aktivacija TLRs receptora rezultira pokretanjem odgovora dendritičkih stanica što dovodi do proizvodnje citokina i uzlazne ili silazne regulacije površinskih molekula stanice (Vasiljević i Shah 2008.). Ovi signali imaju veliki utjecaj na daljnju indukciju urođenog i stečenog imuniteta.

U nekoliko *in vitro* studija je uočena supresija nastanka proupalnih citokina i kemokina u prisutnosti probiotika. Odgovor imunog sustava na probiotike je slabiji nego u prisutnosti Gram-pozitivnih patogena. Što je još važnije, istraživanja su pokazala da ljudske dendritičke stanice nastale iz monocita odgovaraju različito na različite Gram-pozitivne bakterije. Različit imuni odgovor na različite bakterije je potvrđen u različitim istraživanjima, u kojima su uspoređene Gram-negativne *Klebsiella pneumoniae* i *L. rhamnosus*. Obje kulture izazivaju sazrijevanje dendritičkih stanica, ali rezultiraju različitim profilom citokina. *K. pneumoniae* aktivira ekspresiju T-pomoćnika (Th) 1 tipa stanica, dok *L. rhamnosus* smanjuje proizvodnju proupalnih citokina (TNF-α) i interleukina (IL-6 i IL-12) nezrelim dendritičkim stanicama kao i IL-12 i IL-18 zrelim dendritičkim stanicama. Štoviše, odgovor citokina može značajno varirati u prisutnosti različitih probiotika. Mješavina osam različitih probiotika koji uključuju *L. acidophilus, L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. casei, L. plantarum, B. longum, B. infantis, B. breve* i *S. thermophilus* pozitivno regulira proizvodnju IL-10, a negativno proizvodnju IL-12 dendritičkim stanicama nastalih iz ljudske krvi i lamine proprije. Proupalni efekt se smanjuje supresijom proizvodnje IL-12 u prisutnosti probiotika, dok je

zadržavanje visoke proizvodnje IL-10 regulirano bifidobakterijama koje pozitivno reguliraju IL-10 proizvodnju. Iako su mnoga istraživanja pokazala imunoregulacijski potencijal probiotika, još uvijek postoji zabrinutost o valjanosti rezultata zbog lošeg plana istraživanja, nedostatka odgovarajućih kontrola, neodgovarajućeg unosa probiotika, primjene *in vitro* pokazatelja i kratkog trajanja *in vivo* studija. Nadalje, nije ispitivano dugotrajno konzumiranje probiotika s obzirom na kontinuirana poboljšanja imunog sustava i imunoregulacijskog potencijala probiotika povezanog s različitim dobnim skupinama uključujući djecu i starije (Gill i Guarner 2004.).

2.2.2. METABOLIZAM PROBIOTIČKIH MIKROORGANIZAMA TIJEKOM FERMENTACIJE MLIJEKA

Biokemijski, fermentacija je metabolički proces u kojem se ugljikohidrati, proteini i slični sastojci djelomično oksidiraju tijekom čega nastaje energija u odsutnosti vanjskog akceptora elektrona. Konačni elektron akceptori su organske tvari koje se proizvode direktnom razgradnjom ugljikohidrata. Konačno, dolazi do nepotpune oksidacije početnih sastojaka, a samo mali dio energije se otpušta tijekom procesa. Produkt fermentacije sadrži neke organske tvari koji su više reducirani nego drugi (Fernandes 2009.).

Glavni proizvod fermentacije BMK je laktat. Neke od ovih bakterija zahtijevaju vrlo složen izvor nutrijenata, što je povezano s njihovim okruženjem kao što su biljke, mlijeko i GIT ljudi i životinja. BMK su striktni fermentativni organizmi, a neke su oksidotolerantne, poput *Streptococcus*. Drugi su obvezni anaerobi poput bifidobakterija, ali neki sojevi mogu tolerirati kisik u prisutnosti ugljikovog dioksida (Fernandes 2009.).

Bifidobakterije su prirodni sastojak crijeva ljudi i životinja, a njihova osjetljivost na kisik je ovisna o soju, a manje osjetljivi sojevi se čini da posjeduju slabu katalaznu aktivnost koja uklanja vodikov peroksid. Vodikov peroksid inaktivira fruktoza-6-fosfat-fosfoketolazu, ključni enzim bifidobakterija u metabolizmu ugljikohidrata. Bifidobakterije ne proizvode CO_2, maslačnu ili propionsku ksielinu. Proizvode tiamin, riboflavin, i vitamine B i K. Ove bakterije su također jedinstvene po proizvodnji mliječne kiseline u obliku L(+), koju dojenče lakše metabolizira nego D(-) oblik, koju proizvode *L. acidophillus* i *L. bulgaricus* (Gomez 1999., Swidan 2009.).

2.2.2.1 Metabolizam ugljikohidrata

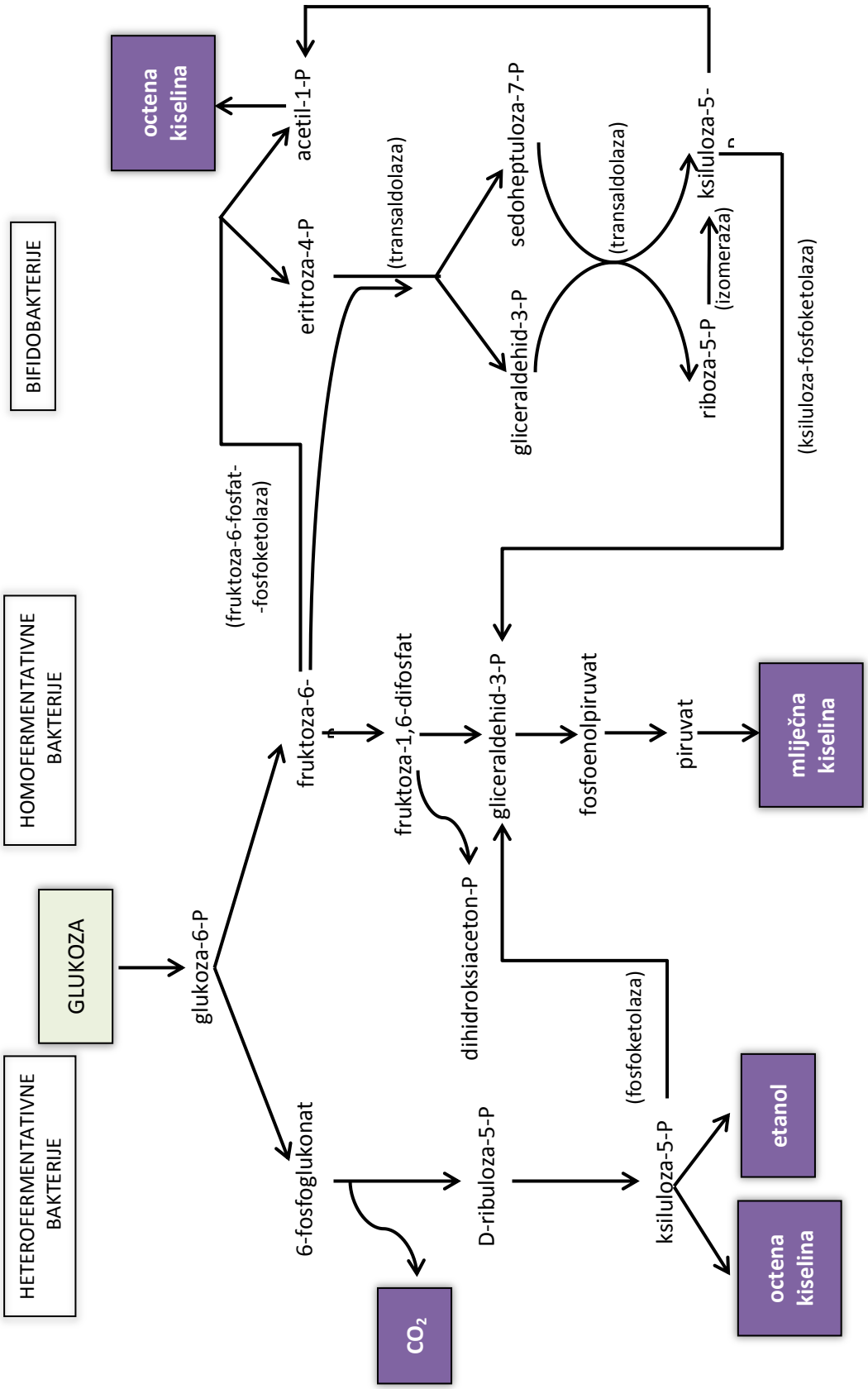
Postoje tri metabolička puta kojima se pretpostavlja BMK u fermentacijskim procesima ugljikohidrate u mliječnu kiselinu:

- homofermentativni put kojim nastaje 2 mol mliječne kiseline po molu glukoze;
- heterofermentativni put kojim nastaje po 1 mol mliječne kiseline, etanola i CO_2 po molu glukoze;
- bifidum put kojim nastaju octena i mliječna kiselina u omjeru 3:2 na 2 mola glukoze.

Bifiodobakterije metaboliziraju ugljikohidrate kao glavne izvore ugljika preko fruktoza-6-fosfata, po čemu se razlikuju od laktobacila. Osim nastanka L(+) mliječne kiseline te octene kiseline neki sojevi također proizvode i mravlju kiselinu i etanol.

Slika 25 prikazuje razlike u fermentacijskim procesima ugljikohidrata među homo-, heterofermentativnim bakterijama i bifidobakterijama (Swidan 2009.).

Bifidobakterije osim glukoze koriste laktozu, galaktozu i fruktozu, a osim jednostavnih šećera, imaju i sposobnost metaboliziranja oligosaharida poput inulina, fruktooligosaharida. Sposobnost je ovisna o soju; dokazano je da *Bifidobacterium lactis* Bb12 ima enzime potrebne za razgradnju nekih vrsta šećera poput onih iz obitelji rafinoza, i laktoze, koje ne mogu metabolizirati neki drugi sojevi bakterija. Ovi enzimi koji su pronađeni u većini sojeva bifidobakterija, a nemaju ga BMK, β-glukozidaza, α-glukozidaza, D-glukozaminidaza i β-galaktozidaza, su vrlo bitni u fermentacijskim procesima s bifidobakterijama. *B. lactis* Bb12 ima najveću aktivnost ovih enzima, a također najbrže raste u mlijeku, jer ima najveću aktivnost leucin-aminopeptidaze koja hidrolizira mliječne proteine, što stimulira njihov rast. Pronađeno je da *B. lactis* Bb12 može cijepati fruktooligiosaharide (FOS), koji imaju β(2-1) vezu, što znači da ima i β-fruktofuranozidazu. Navodi se da *B. breve* raste vrlo dobro u sojinom mlijeku jer ima α-D-galaktozidazu koja pomaže u razgradnji α-D-galaktozil-oligosaharida u sojinom mlijeku. Također se navodi povećanje fermentacije i rasta bifidobakterija korištenjem polimera nižih stupnjeva (1-2, ali manje od 8) oligosaharida kao što je arabinoza (Swidan 2009.).



Slika 25 Prikaz metaboličkih puteva i nastalih proizvoda kod BMK (Swidan 2009.)

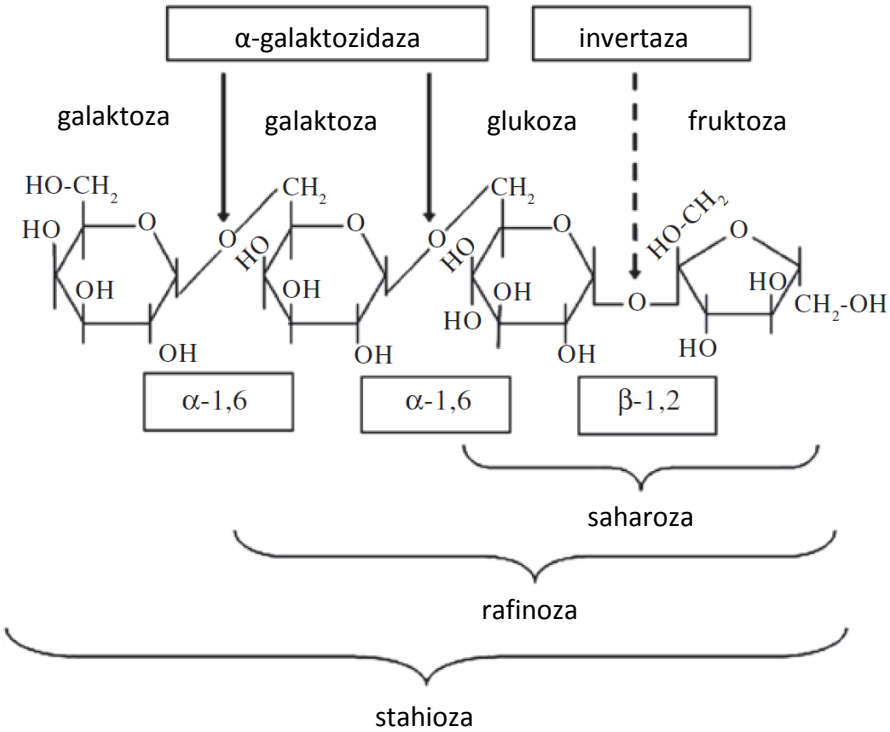
2.2.2.2 Razgradnja specifičnih sastojaka sojinog mlijeka

HIDROLIZA NEPROBAVLJIVIH OLIGOSAHARIDA

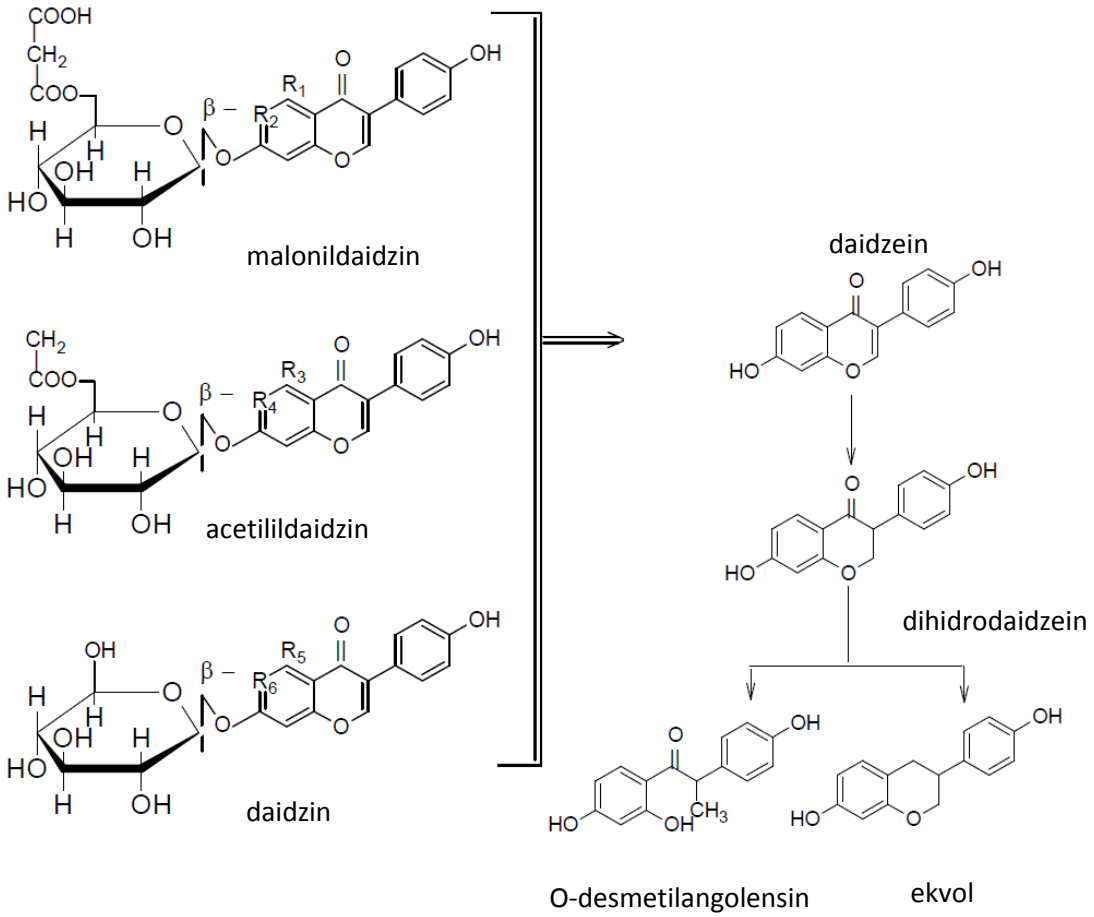
Upotreba proizvoda na bazi soje je ograničena zbog prisutnosti neprobavljivih oligosaharida, kao što su α-galaktooligosaharidi rafinoza i stahioza. Većina sisavaca, uključujući i čovjeka, nema enzim α-galaktozidazu. Ove neprobavljive oligosaharide može fermentirati većina sojeva bifidobakterija (Donkor i sur. 2007a.; Scalabrini i sur. 1998.) te neki sojevi laktobacila (Donkor i sur. 2007a.; Sumarna 2008.). Za hidrolizu ovih oligosaharida neophodan je enzim α-galaktozidaza, koji razgrađuje stahiozu i rafinozu u di- i monosaharide (saharozu, galaktozu; Slika 26) (Leblanc i sur. 2004.).

BIOTRANSFORMACIJA SOJINIH IZOFLAVONA

Intestinalna mikroflora ima važnu ulogu u metabolizmu i povećanju bioiskoristivosti izoflavona. Ove bakterije hidroliziraju glukozidne komponente pomoću β-glukozidaze, pri čemu nastaju bioraspoloživi i bioaktivni aglikoni oblici, te kemijski mijenjaju daidzein u ekvol (Slika 27). Neki sojevi bifidobakterija proizvode β-glukozidaze potrebnu za hidrolizu izoflavonskih glukozida u bioaktivne aglikone u sojinom mlijeku (Tsangalis i sur. 2004.).



Slika 26 Struktura stahioze i rafinoze i enzimi koji ih hidroliziraju (Leblanc i sur. 2004.)



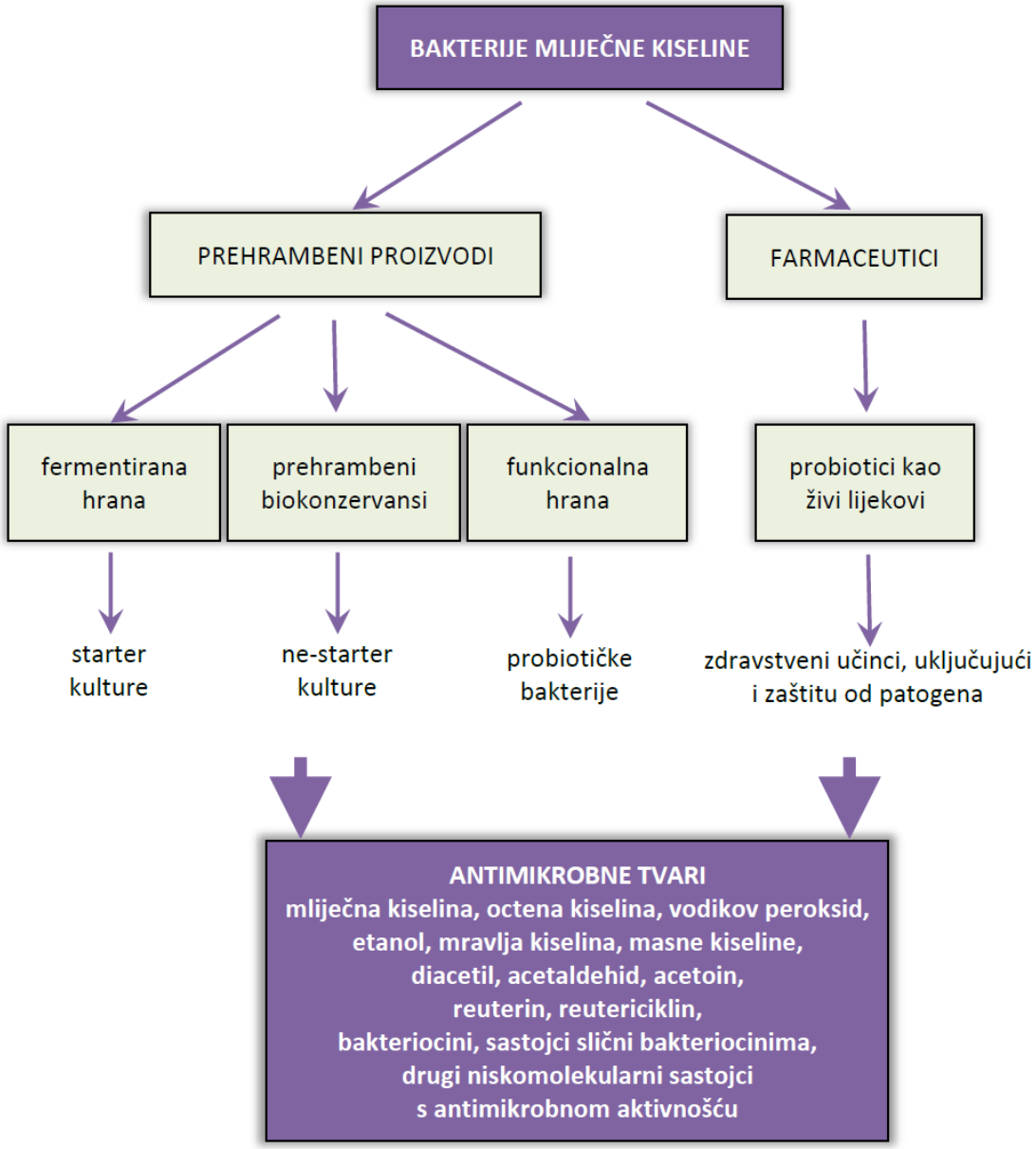
Slika 27 Biotransformacija sojinih izoflavona intestinalnom mikroflorom (Donkor 2007.)

2.2.2.3 Nastanak bioaktivnih peptida tijekom fermentacije

Mnoge mljekarske kulture imaju visoku proteolitičku aktivnost. Peptidi i aminokiseline nastale iz mliječnih proteina tijekom fermentacije doprinose tipičnom okusu, aromi i teksturi proizvoda. Proteolitički sustav BMK sadrži proteinaze vezane na staničnu stijenku i nekoliko unutarstaničnih peptidaza. U fermentiranim mliječnim proizvodima, duži oligopeptidi, dobiveni iz mliječnih proteina kao rezultat fermentacije, mogu biti izvor bioaktivnih peptida nakon razgrdnje unutarstaničnim peptidazama, nakon lize bakterijskih stanica. U GIT, probavni enzimi mogu dalje razgraditi duže oligopeptide, što također dovodi do mogućeg oslobađanja bioaktivnih peptida (Christensen i sur. 1999.).

2.2.2.4 Proizvodnja antimikrobnih tvari

Jedno od najvažnijih svojstava probiotika je zaštita od patogena u intestinalnom traktu domaćina. U složenom ekosustavu GIT probiotici su razvili mehanizme za preživljavanje u kompeticiji s drugim mikroorganizmima. U biti, antagonizam se provodi natjecanjem za nutrijente te za mjesta vezanja, ali također i proizvodnjom antimikrobnih tvari (Lee i Salminen 2009.).



Slika 28 Industrijski potencijal antimikrobnih tvari bakterija mliječne kiseline (Šušković i sur. 2010.)

Primarni antimikrobni učinak koji pokazuju BMK je proizvodnja mliječne kiseline i snižavanje pH vrijednosti. Dodatno, BMK proizvode različite antimikrobne sastojke, koji se mogu klasificirati kao niskomolekulani sastojci (Tablica 8), poput organskih kiselina, vodikovog peroksida (H_2O_2), ugljičnog dioksida (CO_2), diacetila (2,3-butandion) i drugih sastojaka niske molekularne mase s antimikrobnom aktivnošću, te visokomolekularni sastojci, poput bakteriocina. Svi oni mogu djelovati antagonistički na rast patogena i bakterija koje izazivaju kvarenje hrane (Ammor i sur. 2006.). Industrijski potencijal antimikrobnih tvari bakterija mliječne kiseline prikazuje Slika 28.

Tablica 8 Antimikrobne tvari male molekularne mase (Šušković i sur. 2010.)

sastojak	mikroorganizam proizvođač	antimikrobni spektar
mliječna kiselina	sve bakterije mliječne kiseline	kvasci, Gram-pozitivne i –negativne bakterije
octena kiselina	heterofermentativne bakterije mliječne kiseline	kvasci, Gram-pozitivne i –negativne bakterije
diacetil, acetaldehid, acetoin	neke vrste bakterija mliječne kiseline uključujući: *Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillusi i Pediococcus*	kvasci, Gram-pozitivne i –negativne bakterije
vodikov peroksid	sve bakterije mliječne kiseline	kvasci, Gram-pozitivne i –negativne bakterije
ugljični dioksid	heterofermentativne bakterije mliječne kiseline	većina taksonomskih skupina mikroorganizama
reuterin	*Lactobacillus reuteri*	plijesni, protozoe, Gram-pozitivne i -negativne bakterije
reutericiklin	*Lactobacillus reuteri*	Gram-pozitivne bakterije
ciklički dipeptidi	*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus*	kvasci
3-fenil-laktat, 4-hidroksifenil-laktat	*Lactobacillus plantarum, Lactobacillus alimentarius, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus sanfranciscensis, Lactobacillus hilgardii, Leuconostoc citreum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Leuconostoc mesenteroides*	kvasci
3-hidroksi masne kiseline	*Lactobacillus plantarum*	kvasci
benzojeva kiselina, metilhidantion, mevalonolakton	*Lactobacillus plantarum*	kvasci, Gram-negativne bakterije

ORGANSKE KISELINE

Organske kiseline proizvode sve BMK preko fermentacije heksoza. Količina i vrsta organskih kiselina koje nastaju tijekom fermentacijskog procesa ovisi o vrsti ili soju BMK, sastavu kulture te uvjetima rasta. Homofermentativne BMK koriste glikolitički put za proizvodnju piruvata koji se dalje transformira u laktat. U nedostatku šećera ili kisika heterofermentativne BMK kao što su leukonostoci i skupina laktobacila, kao i homofermentativne BMK, koriste koriste pentoza-fosfatni put kojim nastaju mliječna, octena kiselina/etanol i CO_2. Tijekom heterofermentacije može doći do nakupljanja mravlje kiseline, acetoina, acetaldehida i diacetila. Jabučna, mliječna i limunska kiselina se mogu dalje metabolizirati u druge antimikrobne produkte poput octene, mravlje kiseline i CO_2. Nedisocirani, jače hidrofobni oblik kiselina difundira kroz staničnu mebranu, disocirajući unutar stanica pri čemu otpušta H^+ ione koji zakiseljavaju citoplazmu. Octena i

propionska kiselina imaju višu pK_a vrijednost nego mliječna kiselina (redom 4,87; 4,75 i 3,08) i stoga veći udio nedisocirane kiseline pri određenoj pH vrijednosti. Octena kiselina ima veći inhibicijski potencijal nego mliječna te može inhibirati rast kvasaca, plijesni i bakterija. Osim pH učinka, nedisocirane kiseline uzrokuju gubitak elektrokemijskog protonskog gradijenta, uzrokujući bakteriostazu i konačno smrt bakterija. Nadalje, mliječna kiselina čini propusnijom vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija oslobađanjem (Ammor i sur. 2006.; Lee i Salminen 2009.; Šušković i sur. 2010.).

VODIKOV PEROKSID

Vodikov peroksid proizvode BMK u prisutnosti kisika, kao rezultat djelovanja flavoprotein-oksidaze ili nikotinamid-adenin-dinukleotid-peroksidaze (NADH-peroksidaza). Antimikrobni učinak peroksida potječe od oksidacije sulfhidrilnih skupina uzrokujući tako denaturaciju velikog broja enzima, te od peroksidacije membranskih lipida što povećava membransku propusnost. Vodikov peroksid također može biti prekursor za proizvodnju baktericidnih slobodnih radikala, kao što su superoksid (O_2^-) i hidroksil $(OH\cdot)$ radikali, koji mogu oštetiti DNA. Pretpostavlja se da laktobacili proizvode vodikov peroksid kao dio nespecifičnog antimikrobnog obrambenog mehanizma normalnog vaginalnog ekosustava (Ammor i sur. 2006.; Lee i Salminen 2009.).

UGLJIČNI DIOKSID

Ugljični dioksid proizvode većinom heterofermnetativne BMK. CO_2 može direktno stvoriti anaerobne uvjete što je toksično za neke aerobne mikroorganizme iz hrane, djelovanjem na staničnu membranu. Antimikrobno djelovanje nastaje uslijed inhibicije enzimske dekarboksilacije i nakupljanja ugljičnog dioksida u membranski lipidni dvosloj, što uzrokuje disfunkciju membranske propusnosti. Budući da CO_2 može učinkovito inhibirati rast mnogih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane, posebno Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija, CO_2 se koristi u primjeni modificirane atmosfere za hlađene proizvode (Ammor i sur. 2006.; Lee i Salminen 2009.).

DIACETIL, ACETALDEHID I ACETOIN

Diaectil, aromatični sastojak maslaca, proizvode mnogi sojevi BMK fermentacijom citrata. Heterofermentativne BMK proizvode aktivni acetaldehid dekarboksilacijom piruvata, iz kojeg daljnjim reakcijama može nastati diaectil, iz kojeg redukcijom nastaje acetoin. Diacetil, acetaldehid i etanol su u fermentiranom mlijeku prisutni u koncentracijama nedovoljnim za inhibiciju neželjenih mikroorganizama, ali zajedno s drugim antimikrobnim metabolitima imaju ulogu u kontroli rasta kontaminanata (Ammor i sur. 2006.; Šušković i sur. 2010.).

REUTERIN I REUTERICIKLIN

Neki sojevi bakterije *Lactobacillus reuteri* proizvode reuterin i reutericiklin, kao produkte stacionarne faze anaerobnog rasta u mješavini glukoze i glicerola ili gliceraldehida. Antimikrobna aktivnost ovih spojeva se temelji na inhibiciji ribonukleotid-reduktaze, što ometa sintezu DNA (Lee i Salminen 2009.; Šušković i sur. 2010.).

BAKTERIOCINI

Neke BMK stvaraju bakteriocine, antibakterijske tvari proteinske prirode s baktericidnom aktivnošću uskog ili širokog spektra djelovanja. Biosinteza bakteriocina je važan mehanizam inhibicije patogena u fermentiranoj hrani kao i u GIT (Rogelj i Bogovič-Matijašič 1994.; Šušković i sur. 2010.).

Tablica 9 Klasifikacija, karakteristike i primjeri bakteriocina (Šušković i sur. 2010.)

skupina		podskupina		primjeri
skupina I: lantibiotici/bakteriocini koji sadrže lantion	mali (<5 kDa) membranski aktivni peptidi koji sadrže nespecifične aminokiseline	lantibiotici tipa A	produženi peptidi s pozitivnim neto nabojem	nizin, laktocin S, lakticin 481
		lantibiotici tipa B	manji globularni peptidi s negativnim neto nabojem ili bez naboja	mersacidin
skupina II: bakteriocini koji ne sadrže lantion	heterogena skupina malih (<10 kDa) termostabilnih post-translacijskih nemodificiranih ne-lantibiotika	podskupina IIa	bakteriocini slični pediocinu	pediocin PA1, sakacin A, sakacin P, leukocin A, kurvacin A
		podskupina IIb	dipeptidi	laktokocin G, laktokocin M, laktacin F, plantaricin A
		podskupina IIc	bakteriocini s velikim rasponom učinaka na membransku propusnost i nastanak stanične stijenke	acidocin B, enterocin P, enterocin B, reuterin 6
skupina III: bakteriocilizini	veliki (>30 kDa) termolabilni antimikrobni proteinski kompleksi koji kataliziraju hidrolizu stanične stijenke			lizostafin, enterolizin A, helveticin J, helveticun V-1829
skupina IV	kompleksni bakteriocini kojima su za aktivno djelovanje potrebni neproteinski nosači (ugljikohidrati ili lipidi)			plantaricin S, leukonocin S, laktocin 27, pediocin SJ1

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani bioaktivni peptidi ili peptidni kompleksi (uobičajeno 30-60 aminokiselina) s antimikrobnom aktivnošću koje proizvode mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Najveći interes je za one koje proizvode BMK, zbog moguće primjene u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi (biokonzervansi). Bakteriocini bakterija mliječne kiseline su mali antimikrobni peptidi ili proteini s djelovanjem protiv srodnih Gram-pozitivnih bakterija, dok su stanice proizvođača imune na vlastite bakteriocine. Nizin je najbolje opisan, i jedini pročišćeni bakteriocin kojeg su proizvele BMK, koji se primjenjuje u prehrambenim proizvodima (Ammor i sur. 2006.; De Vuyst i Leroy 2007.; Nes i sur. 2007.; Šušković i sur. 2010.). Klasifikaciju bakteriocina prikazuje Tablica 9.

Bakteriocini koje proizvode BMK općenito djeluju protiv Gram-pozitivnih vrsta s niskim sadržajem G+C. Antibakterijski spektar uključuje mikroorganizme kvarenja i patogene koji se prenose hranom kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Bakteriocini se razgrađuju u probavnom sustavu i zbog toga imaju prednost u odnosu na antibiotike u zaštiti namirnica od kvarenja. Opisani su različiti mehanizmi djelovanja bakteriocina, kao što su modulacija enzimske aktivnosti, inhibicija nastajanja spora i stvaranje pora u staničnim membranama (Chen i Hoover 2003.; Šušković i sur. 2010.).

2.2.3. RAST I PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA U FERMENTIRANOM MLIJEKU

Unos probiotičkih bakterija s prehrambenim proizvodima je vrlo popularan način za obnovu ravnoteže mikroflore GIT. Literatura napominje da probiotički organizmi moraju biti prisutni u probiotičkim proizvodima u koncentraciji ne manjoj od 10^6 CFU/ml u trenutku konzumacije kako bi se postiglo blagotvorno djelovanje na zdravlje domaćina, odnosno da dnevni unos bude oko 10^8 CFU/g (Donkor 2007., Grajek i Olejnik 2005.). U mnogim slučajevima probiotičke kulture nisu mliječni mikroorganizmi već gastrointestinalnog porijekla, pa mlijeko i mliječni proizvodi često ne mogu osigurati povoljnu okolinu za razvoj ovih kultura. Mnogi probiotički mikroorganizmi, posebno bifidobakterije, slabo rastu u mlijeku.

Probiotičke bakterije u mliječnim proizvodima su izložene niskom pH, visokoj koncentraciji šećera, niskoj temperaturi skladištenja i visokoj temperaturi rasta. Rast i preživljavanje probiotika je ovisno o soju. Rast i održivost ovih mikroorganizama je također uvjetovana uvjetima kulture, fazom u proizvodnji u kojoj se dodaju u proizvod, proizvodnjom vodikovog peroksida nastalog bakterijskim metabolizmom, te koncentracijom mliječne i octene kiseline. Na rast i preživljavanje utječe i interakcija između bakterija u mješovitim kulturama (Fondén i sur. 2003.; Swidan 2009.).

Uobičajeni fermentirani mliječni proizvodi imaju pH 3,5-4,5 te sadrže 0,5-1,5% (w/v) mliječne kiseline (Lee i Salminen 2009.). Iako je pH jogurta neposredno nakon fermentacije oko 4,5, ova vrijednost se može spustiti i do 3,6 tijekom skladištenja na temperaturama hladnjaka. Ovo je jedan od glavnih čimbenika koji utječu na slabo preživljavanje probiotičkih kultura, posebice bifidobakterija, u jogurtu i fermentiranom mlijeku. Postoji nekoliko rješenja za povećanje preživljavanja probiotika osjetljivih na kiselinu: (1) mikroenkapsulacija probiotika; (2) zamjena bakterije *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* odgovorne za naknadno zakiseljavanje u jogurtu i (3) adaptacija kulture na kiselinu izlaganjem kiseloj sredini ili dodatkom u mlijeko tijekom fermentacije (Gardiner i sur. 2002.).

U fermentiranim mliječnim proizvodima može biti otopljena visoka koncentracija kisika, što može predstavljati problem za kulture osjetljive na kisik, posebno bifidobakterije, koje su strogi anaerobi. Predloženo je nekoliko mjera za umanjenje toksičnog učinka kisika tijekom proizvodnje i skladištenja mliječnih proizvoda: (1) deaeracija mlijeka prije fermentacije; (2) primjena startera *S. thermophilus* s velikom potrošnjom kisika; (3) pakiranje u kisik-nepropusnu ambalažu; (4) primjena reducirajućih tvari (cistein) ili „hvatača“ kisika (askorbinska kiselina) te (5) adaptacija startera na kisik (Gardiner i sur. 2002.; Grajek i Olejnik 2005.; Lee i Salminen 2009.).

Općenito, probiotičke kulture su gastrointestinalnog porijekla s optimalnom temperaturom rasta 37 °C i stoga su djelomično termolabilne. Međutim određeni sojevi i vrste su jače otoporne na visoku temperaturu, npr. „termofilni“ laktobacili, *E. faecalis, E. faecium*, i *Bifidobacterium thermophilum*, te se mogu primijeniti u praškastom obliku dobivenom sušenjem raspršivanjem (Gardiner i sur. 2002.).

Rast i preživljavanje probiotičkih bakterija također ovisi o kemijskim i mikrobiološkim sastojcima mlijeka i raspoloživosti nutrijenata. Različita mlijeka imaju različiti utjecaj na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija. Navedeno je da majčino mlijeko najviše stimulira rast i preživljavanje bifidobakterija, pa se pojam „bifidus faktor“ koristi za one nutrijente koji se u većoj količini nalaze u majčinom mlijeku (Shah 2000.a.,b.).

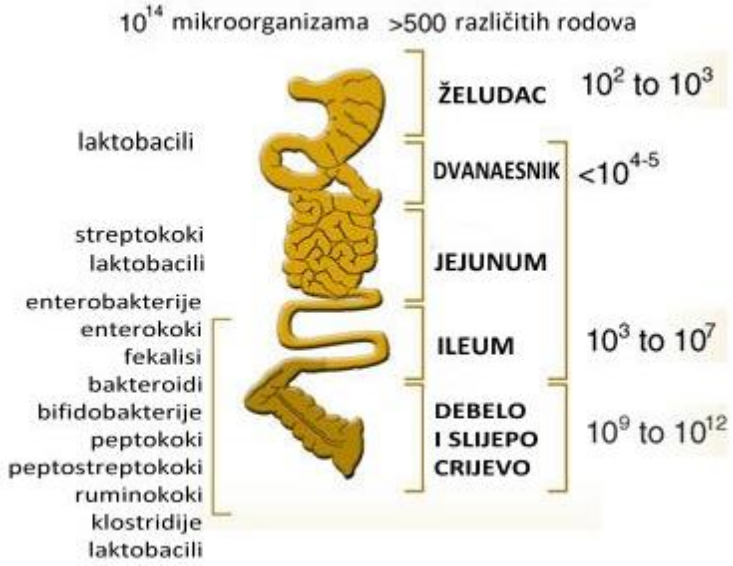
Rast nekih probiotičkih bakterija se značajno povećava dodatkom mliječnih i nemliječnih sastojaka u mlijeko, kao što su sirutka u prahu, koncentrati proteina sirutke, kiseli hidrolizati kiselina i hidrolizati proteina sirutke. Budući da probiotičke bakterije imaju slabu proteolitičku aktivnost, dodatak već hidroliziranih proteina osigurava raspoloživ izvor peptida i aminokiselina potrebnih za rast probiotika, što skraćuje i vrijeme fermentacije (Donkor 2007., Shah 2000.b.). Rast i aktivnost

bifidobakterija se može stimulirati i dodatkom bifidus faktora, kao što su laktuloza i drugi prebiotički supstrati (Tratnik 1998.).

2.2.4. PREBIOTICI I SINBIOTICI

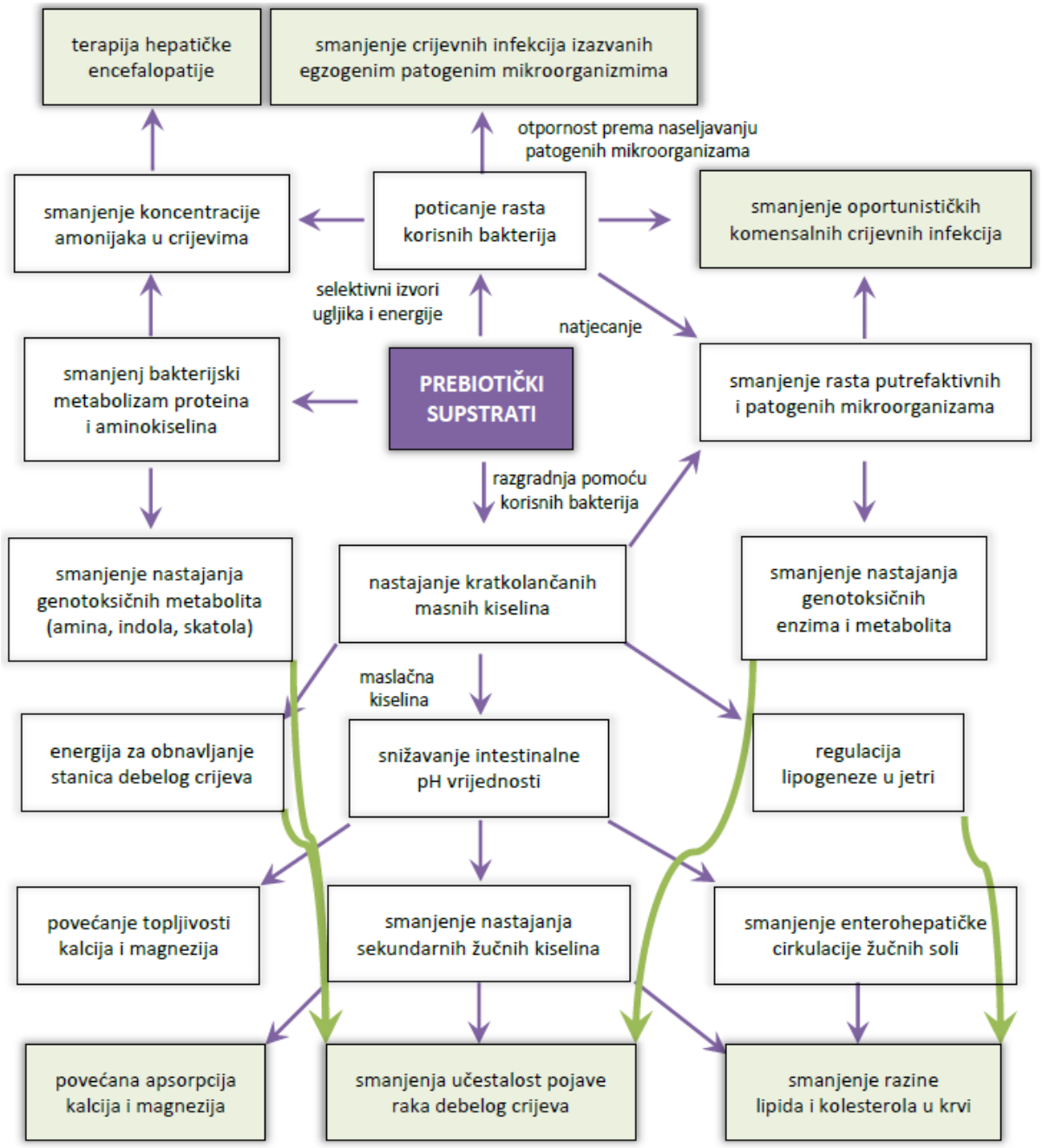
Prebiotici se definiraju kao „neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na domaćina selektivnom stimulacijom rasta i/ili aktivnosti jedne ili određenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu (**Slika 29**), i tako poboljšavaju zdravlje ljudi“ (Gibson i Roberfroid 1995.). Za proizvod koji sadrži kombinaciju probiotika i prebiotika predložen je naziv sinbiotik. Da bi se sastojak hrane mogao deklarirati kao prebiotik:

- ne smije se hidrolizirati niti apsorbirati u gornjem dijelu GIT;
- mora biti selektivan za jednu ili određeni broja potencijalno korisnih bakterija iz debelog crijeva, stimulirajući rast i/ili metaboličku aktivnost;
- mora imati sposobnost mijenjanja intestinalne mikroflore, povećavajući broj saharolitičkih vrsta, a smanjujući broj putrefaktivnih mikroorganizama, kao što su saharolitičke klostridije i enterobakterije.



Slika 29 Crijevna mikroflora (Giuliano, 2012)

Bakterije iz probiotičkog proizvoda moraju preživjeti nepovoljne uvjete u želucu i brzo se prilagoditi novim uvjetima intestinalne sredine. Prebiotici omogućavaju ne samo povećanje broja korisnih bakterija, već služe i kao fermentativni supstrati povećavajući tako njihovu metaboličku aktivnost. Povećanje metaboličke aktivnosti autohtonih i alohtonih (probiotičkih) mikroorganizama je osnovni, od mnogih predloženih mehanizama djelovanja prebiotika na ljudsko zdravlje (Slika 30) (Gardiner i sur. 2002.; Lee i Salminen 2009.; Šušković i sur. 2001.).



Slika 30 Mehanizam djelovanja prebiotika na zdravlje (Šušković i sur. 2001.)

Od velikog broja bakterijskih vrsta prisutnih u debelom crijevu, potrebno je razlikovati tri skupine:

- korisne bakterije (bifidobakterije, laktobacili i drugi rodovi BMK);
- bakterije koje imaju negativan utjecaj na zdravlje (enterobakterije i klostridije);
- ostale bakterije (za koje se smatra da nemaju utjecaja na zdravlje) (Šušković i sur. 2001.).

Većina identificiranih prebiotika su ugljikohidrati, koji se značajno razlikuju po molekularnoj strukturi. Zajedničko im je fiziološko djelovanje u poboljšanju zdravlja; oni su neprobavljivi ili djelomično probavljivi, ne apsorbiraju se u tankom crijevu, slabo ih fermentiraju bakterije u usnoj šupljini, dobro ih fermentiraju korisne bakterije, a slabo potencijalno patogene bakterije u

crijevima. Do danas, većina studija je dokazala prebiotički učinak za nekoliko neprobavljivih oligosahardia (NDO), kao što su fruktooligosaharidi (FOS), polifruktan inulin, galaktoligosharidi (GOS) i laktuloza (Lee i Salminen 2009.) koje prikazuje Tablica 10.

Tablica 10 Prebiotički supstrati (Šušković i sur. 2001.)

vrsta	prebiotik
POLIOLI (šećerni alkoholi)	ksilitol
	sorbitol
	manitol
DISAHARIDI (sintetički derivati laktoze)	laktuloza
	laktitol
OLIGOSAHARIDI	rafinoza
	sojini oligosaharidi (rafinoza + stahioza)
	fruktooligosaharidi (FOS)
	oligofruktoza (mješavina oligosaharida)
	galaktooligosaharidi (TOS, transgalaktozilirani oligosaharidi)
DRUGI NEPROBAVLJIVI OLIGOSAHARIDI	palatinoza
	izomaltooligosaharidi
	laktosaharoza
	galaktozil-laktoza
POLISAHARIDI	inulin
	rezistentni škrob (modificirani škrob otporan na endogene glikolitičke enzime)

Komercijalno proizvedeni oligosaharidi se uobičajeno dobivaju enzimskom katalizom iz različitih izvora ugljikohidrata. Ovi oligosaharidi nisu čisti pripravci, već mješavina mono-, di- i oligosaharida. Neprobavljivi oligosaharidi se također prirodno nalaze u hrani kao što je voće, povrće, mlijeko i med (Shin i Ustunol 2005.).

2.3. PREBIOTIČKA I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA MEDA

Dugo vremena u ljudskoj povijesti med je bio, ne samo jedini dostupni zaslađivač, nego se zbog svog sastava i svojstava koristio i kao lijek. Med ima antimikrobna, antioksidacijska, antitumorska, antimutagena, protuupalna svojstva, te poboljšava rad probave i metabolizam (Bogdanov 2012.).

2.3.1. GLAVNI SASTOJCI MEDA

Sastav meda prikazuje Tablica 11. Ugljikohidrati su glavni sastojci meda; oni čine 95% suhe tvari meda. Osim ugljikohidrata, med sadrži i brojne druge sastojke kao što su organske kiseline, protein, aminokiseline, minerali, polifenoli, vitamin i aromatične tvari. Sastav meda jako ovisi o njegovom botaničkom porijeklu (Persano Oddo i Piro 2004.).

Tablica 11 Kemijski sastav meda (Bogdanov i sur. 2008.)

sastojak*		cvjetni med		med medljikovac	
		srednja vrijednost	min – max	srednja vrijednost	min – max
VODA		17,2	15-20	16,3	15-20
MONOSAHARIDI	**fruktoza**	38,2	30-45	31,8	28-40
	glukoza	31,3	24-40	26,1	19-32
DISAHARIDI	**saharoza**	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
	drugi	5,0	2-8	4,0	1-6
TRISAHARIDI	**melezitoza**	<0,1		4,0	0,3-22,0
	erloza	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6,0
	drugi	0,5	0,5-1,0	3,0	0,1-6,0
	neidentificirani oligosaharidi	3,1		10,1	
UKUPNI ŠEĆERI		79,7		80,5	
MINERALI		0,2	0,1-5,0	0,9	0,6-2,0
AMINOKISELINE I PROTEINI		0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
KISELINE		0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
pH vrijednost		3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

* g/100 g

Glavni monosaharidi meda su fruktoza i glukoza, uz koje je još pronađeno i 25 različitih oligosaharida, poput disaharida saharoze, maltose, trehalose i turanoze, te nutritivni bitnih kao što su panoza, 1-kestoza, 6-kestoza i palatinoza. Med sadrži oko 0,5% proteina, većinom enzima i slobodnih aminokiselina. Glavna tri enzima meda su diastaza (amilaza), invertaza (saharaza, α-glukozidaza) i glukoza-oksidaza, koja proizvodi vodikov peroksid i glukonsku kiselinu iz glukoze. Količina vitamina i minerala je vrlo mala (Bogdanov i sur. 2008.).

Med s većom koncentracijom fruktoze (npr. bagremov) je slađi od onoga s višim sadržajem glukoze (npr. repičin). Posljednjih desetljeća su provedena opsežna istraživanja o sastojcima arome meda, te je identificirano više od 500 različitih hlapljivih tvari u različitim vrstama meda. Aroma meda potječe od različitih sastojaka, ovisno o botaničkom porijeklu. Polifenoli utječu na izgled i funkcionalna svojstva meda. U medu se nalaze u količini 56-500 mg/kg. Većinom su to flavonoidi (npr. kvercetin, luteolin, kemferol, apigenin, krizin, galangin) te fenolne kiseline i njihovi derivati, za koje je dokazano da imaju antioksidacijska svojstva (Bogdanov i sur. 2007.).

2.3.2. PREBIOTIČKA SVOJSTVA

Med sadrži mnoge oligosaharide i niskomolekularne polisaharide koji su otporni na razgradnju enzimima domaćina, te stoga mogu biti vrijedan izvor nutrijenata za intestinalnu mikrofloru. Dokazano je da oligosaharidi u medu imaju sličan prebiotički učinak kao fruktooligosahridi. Oni uzrokuju povećanje broja bifidobakterija i laktobacila. Prema rezultatima novijih *in vitro* istraživanja, med stimulira rast, metaboličku aktivnost i preživljavanje različitih sojeva bifidobakterija humanog porijekla, slično kao fruktozni i glukozni oligosaharidi. Prebiotički učinak je ovisan o soju bifidobakterija. Ova istraživanja daju obećavajuće rezultate o stimuliranju rasta i prebiotičkoj aktivnosti meda na bifidobakterije, ali ne uključuju studiju o učinku meda na nepoželjne intestinalne bakterije. Također su potrebna dodatna istraživanja koja bi kvantificirala prebiotički potencijal meda (Haddadin i sur. 2007.; Kajiwara i sur. 2002.; Shin i Ustunol 2005.; Ustunol 2000.).

2.3.3. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA

Med inhibira rast mikroorganizama i kvasaca. Antibakterijski učinak meda, većinom protiv Gram-pozitivnih bakterija, je dobro dokumentiran. I bakteriostatsko i baktericidno djelovanje je dokazano za mnoge sojeve, mnoge od njih patogene. Također je dokazano djelovanje protiv nekih virusa i parazita.

Antimikrobno djelovanje meda je rezultat različitih sastojaka i ovisi o botaničkom porijeklu meda. Nizak aktivitet vode inhibira bakterijski rast. Glukoza-oksidaza proizvodi antibakterijsku tvar – vodikov peroksid, što ovisi o aktivnosti katalaze. U medu se također nalaze i neperoksidne antibakterijske tvari (Bogdanov 2012., Molan 1992.a.,b.). Med ima direktno i indirektno antimikrobno djelovanje. Indirektno, med se može boriti protiv mikrobnih infekcija svojim imuno-djelovanjem, protuupalnim i prebiotičkim djelovanjem (Bogdanov 2012.).

Direktno, med inhibira rast mikroorganizama i gljiva. Antimikrobno djelovanje meda, protiv većinom Gram-pozitivnih bakterija, je dobro dokumentirano. Pokazuje i bakteriostatsko i baktericidno djelovanje protiv različitih sojeva, većina kojih su patogeni.

Za antibakterijsko djelovanje meda je odgovoran osmotski učinak šećera, niska pH vrijednost i kiseline iz meda, vodikov peroksid i drugi sastojci (fenoli, ugljikohidrati, Maillardovi produkti, proteini, peptidi, peptidi slični antibioticima, metilglioksal i drugi nedeterminirani sastojci).

Glukoza-oksidaza u medu proizvodi antibakterijski spoj vodikov peroksid, dok drugi enzim, katalaza ga razgrađuje. Med s visokom katalaznom aktivnošću ima malu antibakterijsku peroksidnu aktivnost. Navodi se dobra povezanost/korelacija između sposobnosti nakupljanja peroksida i antibakterijske aktivnosti izražene kao inhibin (Weston i sur. 1999.).

Navedeno je da je ovisno o primjenjenom antibakterijskom testu moguće da postoji razlika između peroksidnog i neperoksidnog antibakterijskog djelovanja. Pronađeno je da su glavne neperoskidne antibakterijske tvari kiseline. Također, med najbolje djeluje protiv bakterija u kiselom mediju. To je važan podatak, budući da je sredina infekcijske rane također kisela.

Više istraživanja je pokazalo da antibakterijski učinak meda nastaje uslijed različitih tvari i ovisi o botaničkom porijeklu meda.

Pronađene su različite neperoksidne antibakterijske tvari i sastojci meda, među koje se ubrajaju:

- fenoli i flavonoidi – dokazano je da med s većim sadržajem fenola ima veću antibakterijsku aktivnost;
- visoka koncentracija šećera i niska pH vrijednost;
- metanolni ekstrak meda (ugljikohidratna frakcija meda);
- razgrađeni ugljikohidratni Maillardovi produkti;
- antibakterijske aromatične kiseline i nezasićene masne kiseline 10-HDA (10-hidroksi-decenionske kiseline, glavna kiselina prisutna u matičnoj mlječi);
- antibakterijski proteini meda, kao što je defenzin-1 (koji potiče iz matične mliječi);

- antifunglani peptidni sastojci slični antibioticima (npr. bacilomicin F) koje proizvode bakterije iz meda;
- antibakterijska tvar metilglioksal iz nekih vrta meda.

Za razliku od neperoskidnog djelovanja, peroksidno može uništiti toplina, svjetlo i vrijeme skladištenja, stoga bi se med trebao skladištiti na hladnom i tamnom mjestu, te bi se trebao konzumirati svjež. Međutim Maillardovi produkti koji nastaju nakon zagrijavanja i skladištenja meda, također imaju antibakterijsku aktivnost (Bogdanov 1997., 2012.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je ispitivanje utjecaja dodatka bagremovog i kestenovog meda u različitim koncentracijama u kravlje, kozje i sojino mlijeko na kinetiku fermentacije, rast i preživljavanje probiotičkih bakterija, te senzorska svojstva proizvoda fermentiranih bakterijama *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. Osim toga, ispitan je i utjecaj dodanog meda u fermentiranim proizvodima na inhibiciju rasta odabranih psihrotrofnih patogenih bakterija: *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*.

3.2. MATERIJAL

Mlijeko

Za pripremu probiotičkog napitka korištene su tri različite vrste mlijeka:

- kratkotrajno sterilizirano, homogenizirano kravlje mlijeko tipizirano na 2,8% mliječne masti (proizvođač Vindija, Varaždin),
- kratkotrajno sterilizirano, homogenizirano kozje mlijeko tipizirano na 3,2% mliječne masti (proizvođač Vindija, Varaždin) te
- sojino mlijeko natural s 1,8% masti (proizvođač Alprosoya, Belgija).

Starter kulture

Za inokulaciju mlijeka korištene su sljedeće liofilizirane komercijalne probiotičke DVS monokulture:

- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12,
- *Bifidobacterium longum* Bb46 i
- Lactobacillus casei Lc01

(proizvođač Chr. Hansen, Copenhagen, Danska).

Med

Kao (prebiotički) dodatak su korištene dvije vrste monoflornog meda:

- prirodni vrcani (svijetli) bagremov i
- prirodni vrcani (tamni) kestenov med

(proizvođač Apimel, Višnjevac).

Patogene test bakterije

U radu su korištene dvije psihrotrofne patogene bakterije:

- Gram-pozitivna *Listeria monocytogenes* FSL N1-017 (serotip 4b) i
- Gram-negativna *Yersinia enterocolitica* YE133 (serotip O:8)

dobivene od Zavoda za javno zdarvstvo Osječko-baranjske županije, Osijek.

3.3. METODE

Istraživanje je podijeljeno u 5 faza:

1. prije priprave uzoraka provedeno je ispitivanje sirovina upotrijebljenih za proizvodnju fermentiranih probiotičkih proizvoda:

   (a) određivanje fizikalno-kemijskih svojstava mlijeka;

   (b) kemijska, mikrobiološka i peludna analiza meda meda;

2. svakih 5 h tijekom fermentacije određivani su pH vrijednost uzoraka i kinetički parametri zakiseljavanja broj živih stanica probiotičkih bakterija i kinetički parametri rasta bakterija;
3. inhibicijski učinak pripremljenih uzoraka ispitan je na početku, u sredini i na kraju fermentacije (i supernatant);
4. nakon jednog dana hladnog skladištenja provedena je senzorska ocjena svih uzoraka;
5. svakih tjedan dana tijekom 28-dnevnog skladištenja su određivani promjene pH vrijednosti (naknadno zakiseljavanje), broj živih stanica te preživljavanje probiotičkih bakterija u proizvodu.

Plan eksperimenta prikazuje Slika 31.



Slika 31 Plan eksperimenta

3.3.1. ISPITIVANJE SIROVINA UPOTRIJEBLJENIH ZA PROIZVODNJU FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH PROIZVODA

Određivanje sastava mlijeka

Za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava mlijeka primijenjene su sljedeće metode:

- suha tvar je određena gravimetrijskom metodom prema 990.20 AOAC, 1998.
- pepeo je određen gravimetrijskom metodom sušenja prema 942.05 AOAC, 1998.
- proteini su određeni metodom po Kjeldahlu prema 960.52 AOAC, 1998.
- mast je određena Babcockovom metodom prema 942.05 AOAC, 1998.
- titracijska kiselost (°SH) je određena metodom po Soxhlet-Henkelu prema 947.05 AOAC, 1996.
- pH vrijednost je određena na uređaju MA 235, pH/Ion Analyzer (Mettler Toledo)

Tijekom cjelokupnog ispitivanja analiziran je sastav 10 uzoraka kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka.

Analiza meda

Kemijska analiza bagremovog i kestenovog meda je određena službenim metodama analize prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (MPS 2000.) u tri ponavljanja:

- udio vode je određen refraktometrijskom metodom na temperaturi od 20 °C na uređaju Atago RX-5000 alpha-BEV Refractometer (Atago, USA);
- pepeo – metodom spaljivanja uzorka na 600 °C;
- kiselost meda – titrimetrijski – titracijom s 0,1 mol/l otopinom NaOH do pojave svijetloružičaste boje uz fenolftalein kao indikator;
- tvari netopljive u vodi gravimetrijskom metodom;
- reducirani šećeri – na temelju redukcije Fehlingove otopine titracijom uz metilensko modro bojilo kao indikator;
- saharoza – na temelju hidrolize saharoze i redukciji Fehlingove otopine titracijom uz metilensko modro bojilo;
- aktivnost dijastaze (dijastazni broj) – na temelju hidrolize 1%-tne otopine škroba tijekom 1 sata na temperaturi od 40 °C titracijom;
- hidroksimetilfurfural – fotometrijski metodom po Winkleru.

Mikrobiološka analiza je provedena posrednom metodom, brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj podlozi, a peludna analiza – mikroskopski prema prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (MPS 2000.).

3.3.2. PRIPRAVA UZORAKA

U preliminarnim istraživanjima je određena optimalna koncentracija meda za fermentaciju: 2,5% i 5% meda, ovisno o vrsti mlijeka i starter kulture. Koncentracija meda je određena na osnovi određivanja porasta broja bakterija tijekom fermentacije u uzorcima (veće koncentracije meda su djelovale inhibirajuće na rast probiotičkih bakterija) te senzorskog ocjenjivanja fermentiranog mlijeka nakon 24 h čuvanja na temperaturi 5 °C. Svako mlijeko podijeljeno je na pet dijelova u koje su dodane dvije vrste meda u dvije koncentracije, dok je peti dio bez dodatka služio kao kontrola (Tablica 12). Prije dodavanja u mlijeko, med je pasteriziran na 63 °C 15 min. Uzorci mlijeka s medom su zatim zagrijani na temperaturu inokulacije probiotičkih bakterija (37 °C). Probiotičke monokulture za inokulaciju su bile u liofiliziranom DVS (Direct Vat Set) obliku. Mlijeko je inokulirano s 0,2 mg/ml starter kultura prema preporukama proizvođača.

Fermentacija uzoraka je vođena 25 sati na temperaturi od 37 °C. Nakon fermentacije uzorci su ohlađeni i skladišteni na temperaturi od 4 °C tijekom 4 tjedna. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

Tablica 12 Oznake pripravljenih uzoraka

DODATAK MEDA	STARTER KULTURA	MLIJEKO	oznaka uzorka	MLIJEKO	oznaka uzorka	MLIJEKO	oznaka uzorka
bez dodatka	*L. casei* Lc01	kravlje mlijeko	c-Lc-0	kozje mlijeko	g-Lc-0	sojino mlijeko	s-Lc-0
	B. longum Bb46		c-Bl-0		g-Bl-0		s-Bl-0
	B. animalis subsp. *lactis* Bb12		c-Ba-0		g-Ba-0		s-Ba-0
2,5% bagremovog meda	*L. casei* Lc01		c-Lc-A2,5		g-Lc-A2,5		s-Lc-A2,5
	B. longum Bb46		c-Bl-A2,5		g-Bl-A2,5		s-Bl-A2,5
	B. animalis subsp. *lactis* Bb12		c-Ba-A2,5		g-Ba-A2,5		s-Ba-A2,5
5% bagremovog meda	*L. casei* Lc01		c-Lc-A5		g-Lc-A5		s-Lc-A5
	B. longum Bb46		c-Bl-A5		g-Bl-A5		s-Bl-A5
	B. animalis subsp. *lactis* Bb12		c-Ba-A5		g-Ba-A5		s-Ba-A5
2,5% kestenovog meda	*L. casei* Lc01		c-Lc-C2,5		g-Lc-C2,5		s-Lc-C2,5
	B. longum Bb46		c-Bl-C2,5		g-Bl-C2,5		s-Bl-C2,5
	B. animalis subsp. *lactis* Bb12		c-Ba-C2,5		g-Ba-C2,5		s-Ba-C2,5
5% kestenovog meda	*L. casei* Lc01		c-Lc-C5		g-Lc-C5		s-Lc-C5
	B. longum Bb46		c-Bl-C5		g-Bl-C5		s-Bl-C5
	B. animalis subsp. *lactis* Bb12		c-Ba-C5		g-Ba-C5		s-Ba-C5

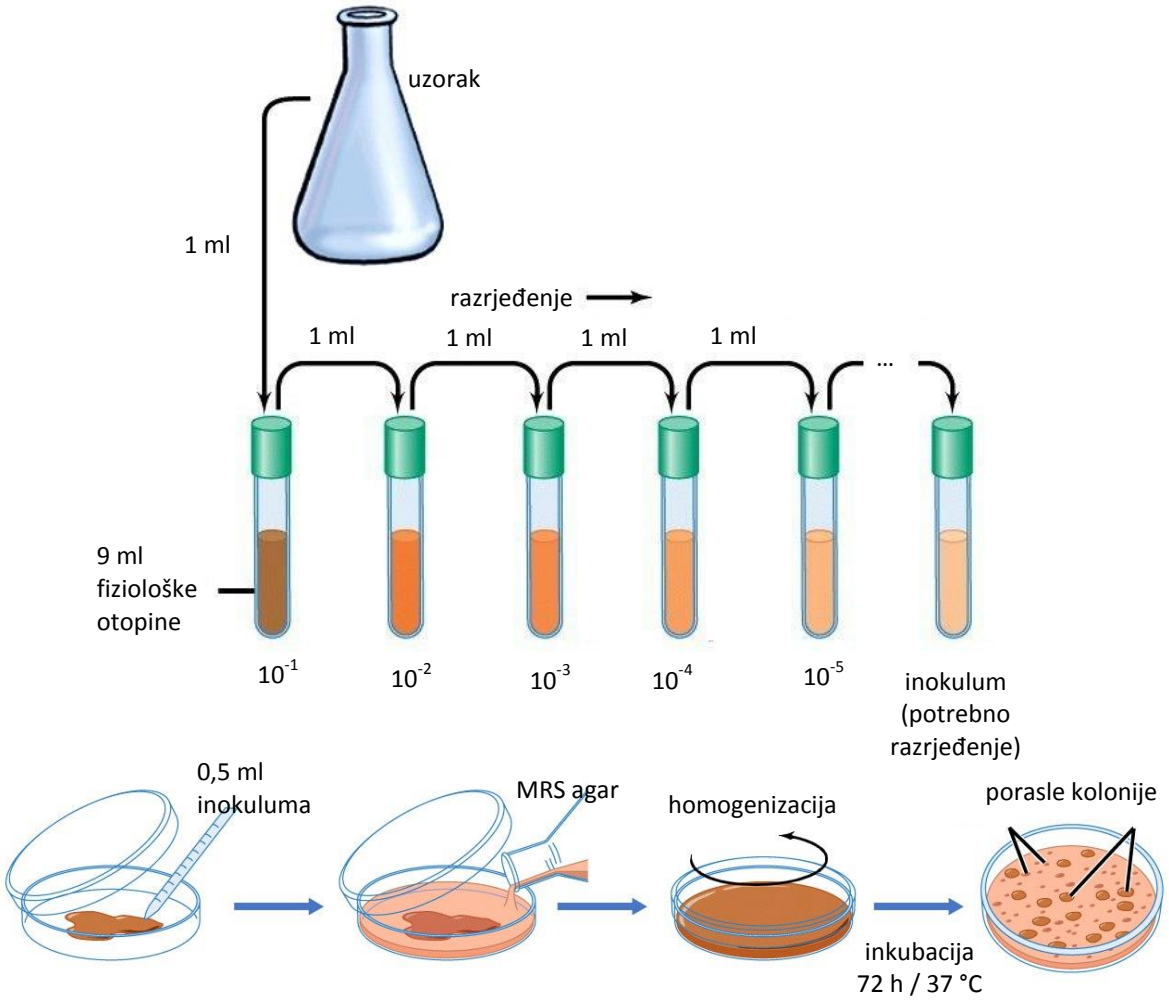
Prije te tijekom fermentacije i skladištenja proizvoda provedene su sljedeće analize:

- prije priprave uzoraka provedena je analiza sirovina;
- na početku te periodično nakon svakih 5 sati fermentacije, kao i na početku skladištenja te nakon svakih tjedan dana skladištenja mjerena je pH vrijednost i broj probiotičkih bakterija u uzorku;
- na početku, sredini i na kraju fermentacije je određivan stupanj inhibicije odabranih test-bakterija;
- nakon jednog dana hladnog skladištenja provedena je senzorska ocjena svih uzoraka.

3.3.3. ODREĐIVANJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA

Određivanje broja probiotičkih bakterija

Broj živih stanica u uzorcima je određen standardnom mikrobiološkom metodom, posredno određivanjem broja živih stanica na čvrstoj podlozi (Slika 32). Pripravljeno je potrebno decimalno razrjeđenje uzorka u sterilnoj fiziološkoj otopini iz kojeg je prenesen inokulum u Petrijevu zdjelicu u koju je uliven, rastopljen i na 45 °C ohlađen MRS agar (Merck, Njemačka). Nakon homogenizacije inokuluma i podloge, Petrijeve zdjelice su inkubirane 72 sata na temperaturi 37 °C u posudama za uzgoj anaeroba (Anaerobic jar, Merck, Njemačka). Anaerobna inkubacija (za anaerobne bifidobakterije) je vođena upotrebom vrećica za anaerobne uvjete (Anaerocult A, 0% O_2 i 18% CO_2, Merck, Njemačka), a mikroaerofilna inkubacija (za fakultativno anaerobni *L. casei*) upotrebom vrećica za mikroareofilne uvjete (Anaerocult C, 5% O_2 i 8% CO_2, Merck, Njemačka).



Slika 32 Shematski prikaz određivanja broja probiotičkih bakterija

Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije probiotičkih bakterija te je izračunat broj bakterija u 1 ml proizvoda (CFU/ml) prema formuli (Duraković 1996.):

$$CFU = \frac{N \cdot \frac{1}{D}}{V} \quad \textbf{(1)}$$

gdje je:

CFU – broj živih stanica (*Colony Forming Unit*) [ml^{-1}],

N – broj poraslih kolonija,

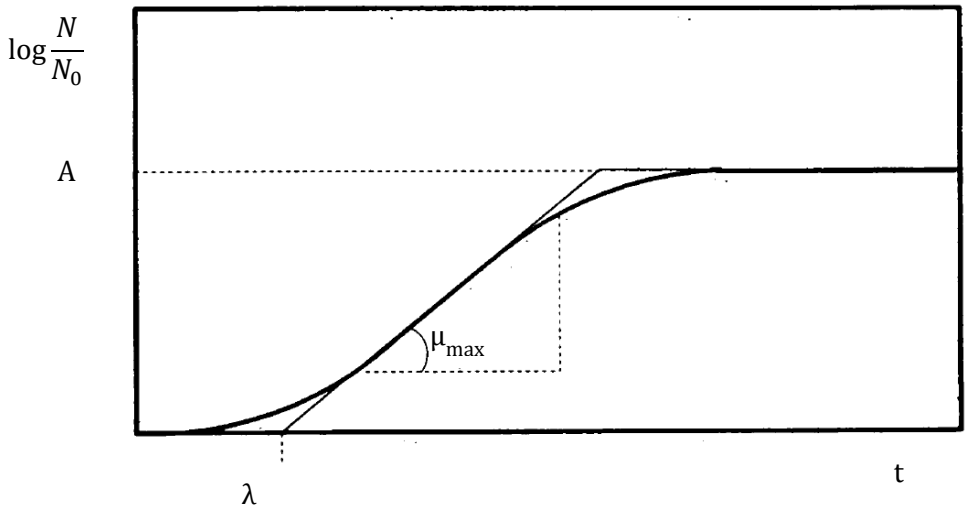
D – razrjeđenje,

V – volumen istraživanog uzorka inokuluma [ml].

Svako određivanje je ponovljeno u dvije paralele, te je izračunata srednja vrijednost broja bakterija za svaki eksperiment.

Određivanje kinetičkih parametara rasta probiotičkih bakterija

Budući da bakterije rastu eksponencijalno, često se njihov rast prikazuje kao ovisnost logaritma relativnog broja bakterija $\left(\log\frac{N}{N_0}\right)$ o vremenu (t) (Slika 33).



Slika 33 Krivulja rasta mikroorganizama

Tri faze krivulje rasta mogu se opisati trima parametrima:

- maksimalna specifična brzina rasta (μ_{max}) – definira se kao tangenta u točki infleksije;
- vrijeme lag faze (λ) – definira se kao odsječak tangente na x-osi; i
- maksimalna vrijednost relativne populacije stanica $A = \log\frac{N_\infty}{N_0}$ – definira se kao asimptota.

Većina modela opisuje sigmoidnu krivulju rasta koja sadrži matematičke parametre (a, b, c, …) umjesto parametara s biološkim značenjem (A, μ_{max} i λ). Gompertzov model rasta mikroorganizama

$$y = a \cdot e^{-e^{(b-c \cdot t)}} \quad \textbf{(2)}$$

se može modificirati zamjenom matematičkih parametara s biološkim parametrima. Da bi dobili točku infleksije krivulje, druga derivacija funkcije po t se izračunava kao:

$$\frac{dy}{dt} = a \cdot c \cdot e^{-e^{(b-c \cdot t)}} \cdot e^{(b-c \cdot t)} \quad \textbf{(3)}$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} = a \cdot c^2 \cdot e^{-e^{(b-c \cdot t)}} \cdot e^{(b-c \cdot t)} \cdot \left(e^{(b-c \cdot t)} - 1\right) \quad \textbf{(4)}$$

U točki infleksije, $t = t_i$, druga derivacija je jednaka nuli:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = 0 \rightarrow t_i = \frac{b}{c} \quad \textbf{(5)}$$

Sada se izraz za maksimalnu specifičnu brzinu rasta može dobiti računanjem prve derivacije u točki infleksije.

$$\mu_{max} = \left(\frac{dy}{dt}\right)_{t_i} = \frac{a \cdot c}{e} \quad \textbf{(6)}$$

Parametar c u Gompertzovoj jednadžbi se može zamijeniti izrazom:

$$c = \frac{\mu_{max} \cdot e}{a} \quad \textbf{(7)}$$

Tangenta koja prolazi točkom infleksije je:

$$y = \mu_{max} \cdot t + \frac{a}{e} - \mu_{max} \cdot t_i \quad \textbf{(8)}$$

Vrijeme lag faze se definira kao odsječak na x-osi tangente koja prolazi kroz točku infleksije:

$$0 = \mu_{max} \cdot \lambda + \frac{a}{e} - \mu_{max} \cdot t_i \quad \textbf{(9)}$$

Primjenom jednadžbi (5), (6) i (9) dobivamo:

$$\lambda = \frac{b-1}{c} \quad \textbf{(10)}$$

Parametar b se u Gompertzovoj jednadžbi može zamijeniti izrazom:

$$b = \frac{\mu_{max} \cdot e}{a} \cdot \lambda + 1 \quad \textbf{(11)}$$

Asimptotska vrijednost se dobiva kada t teži u beskonačnost:

$$t \to \infty; y \to a \Rightarrow A = a \quad \textbf{(12)}$$

Parametar a se u Gompertzovoj jednadžbi može zamijeniti s A, čime dobivamo modificiranu Gompertzovu jednadžbu (Zwietering i sur. 1990.):

$$y = A \cdot e^{-e^{\left[\frac{\mu_{max} \cdot e}{A} \cdot (\lambda - t) + 1\right]}} \quad \textbf{(13)}$$

Primjenom nelinearne regresije jednadžbe (13) pomoću statsističkog paketa XLSTAT dobivene su vrijednosti A, μ_{max} i λ. Iz vrijednosti μ_{max} je izračunato generacijsko vrijeme (vrijeme udvostručavanja bakterija) pomoću jednadžbe:

$$t_g = \frac{ln2}{\mu_{max}} \quad \textbf{(14)}$$

gdje je:

t_g – generacijsko vrijeme (Oliveira i sur. 2009a.).

Preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom skladištenja

Postotak preživljavanja svake kulture tijekom skladištenja uzoraka je izračunat prema jednadžbi (Riazi i Ziar 2008.):

$$PV = \frac{log\ CFU_n}{log\ CFU_f} \cdot 100[\%] \quad \textbf{(15)}$$

gdje je:

PV – postotak preživljavanja;

$\log CFU_n$ – logaritam broja bakterija nakon n dana skladištenja,

$\log CFU_f$ – logaritam broja bakterija nakon fermentacije.

Pomoću nelinearne regresije u programskom dodatku XLSTAT dobiveni su modeli ovisnosti broja bakterija o vremenu tijekom skladištenja. Iz najboljeg modela je izračunato vrijeme tijekom skladištenja pri kojem proizvod ima terapijska svojstva, odnosno sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml (terapijski minimum).

3.3.4. ODREĐIVANJE KISELOSTI I NAKNADNOG ZAKISELJAVANJA

Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost uzoraka tijekom fermentacije i skladištenja je određena na uređaju MA 235 pH/Ion Analyzer (Mettler Toledo).

Određivanje kinetičkih parametara zakiseljavanja

Analogno modelu porastu broja bakterija, modificirana Gompertzova jednadžba (Zwietering i sur. 1990.) se može primijeniti za opisivanje promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije (Servili i sur. 2011.):

$$y = A \cdot e^{-e^{\left[\frac{v_{max} \cdot e}{A} \cdot (\lambda - t) + 1\right]}} \quad \textbf{(16)}$$

gdje je:

y – razlika u pH vrijednosti između inicijalne i vrijednosti u vremenu t,

A – razlika u pH vrijednosti između inicijalne i vrijednosti dostignute u stacionarnoj fazi mliječne fermentacije ($\Delta \mathrm{pH} = \mathrm{pH}_0 - \mathrm{pH}_\mathrm{i}$),

$\mathrm{v}_{\max}$ – maksimalna brzina zakiseljavanja ($d\mathrm{pH}/\mathrm{t}$) [h^{-1}],

λ – dužina latentne faze zakiseljavanja [h],

t – vrijeme inkubacije [h],

Primjenom nelinearne regresije jednadžbe (16) pomoću statsističkog paketa XLSTAT dobivene su vrijednosti A, $\mathrm{v}_{\max}$ i λ.

Pomoću nelinearne regresije u programskom dodatku XLSTAT dobiveni su modeli ovisnosti pH vrijednosti o vremenu fermentacije. Iz najboljeg modela je izračunato vrijeme tijekom fermentacije u kojem uzorak postiže pH vrijednost 5,0; odnosno 4,6; kao kontrolne vrijednosti pri kojoj je dostignuta pH vrijednost izoelektrične točke kazeina, odnosno vrijednosti pri kojoj mlijeko koagulira (Oliveira i sur. 2009a.,b.).

3.3.5. OCJENA PREBIOTIČKOG DJELOVANJA MEDA

Za usporedbu prebiotika i njihovog djelovanja predloženi su različiti kvantitativni koncepti. Svi oni se temelje na selektivnosti prebiotika. Povećanje u broju bifidobakterija i/ili laktobacila rezultira većim prebiotičkim učinkom, dok povećanje enterobakterija rezultira smanjenjem prebiotičke aktivnosti.

Jedan od prvih kvantitativnih pristupa opisanih u literaturi je prebiotički indeks (PI, engl. *prebiotic indeks*). Prebiotički indeks je izvorno definiran kao povećanje broja bifidobakterija (izraženo kao apsolutna vrijednost „novih" bifidobakterija (CFU/g fecesa) podijeljen s dnevnom dozom (g) ispitivanog prebiotika (Palframan i sur. 2002.). Kasnije je u ovu jednadžbu uključena promjena broja nekoliko mikroorganizama (Palframan i sur. 2003.). Drugi kvantitavni koncept je mjera prebiotičkog djelovanja (*measure of the prebiotic effect*; MPE), koji uključuje osim utjecaja prebiotika na rast bakterijske populacije i utjecaj prebiotika na proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina (Vulevic i sur. 2004.).

U ovom radu je za određivanje prebiotičkog djelovanja meda *in vitro* modificirana jednadžba za ocjenu prebiotičke aktivnosti (engl. *prebiotic activity score*) (Huebner i sur. 2007.), te je uzet u obzir samo pozitivan učinak meda na porast broja probiotičkih bakterija, a kao kontrola je uzet uzorak bez dodatka meda:

$$mPAS = \frac{log\ CFU_{M+H,25h} - log\ CFU_{M+H,0h}}{log\ CFU_{M,25h} - log\ CFU_{M,0h}} \quad \textbf{(17)}$$

gdje je:

mPAS – modificirana mjera prebiotičkog djelovanja meda – predstavlja utjecaj dodatka meda na povećanje broja bakterija na kraju fermentacije u mlijeku s dodatkom meda u odnosu na mlijeko bez dodatka meda izračunat kao omjer razlike broja bakterija na početku i na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom meda u odnosu na uzorke bez dodatka meda,

$\log CFU_{M+H,0h}$ – logaritam broja probiotičkih bakterija u uzorcima s dodatkom meda na početku fermentacije [ml^{-1}],

$\log CFU_{M+H,25h}$ – logaritam broja probiotičkih bakterija u uzorcima s dodatkom meda na kraju fermentacije [ml^{-1}],

$\log CFU_{M,0h}$ – logaritam broja probiotičkih bakterija u uzorcima bez dodatka meda na početku fermentacije [ml^{-1}],

$\log CFU_{M,25h}$ – logaritam broja probiotičkih bakterija u uzorcima bez dodatka meda na kraju fermentacije [ml^{-1}].

3.3.6. ODREĐIVANJE ANTIBIOTIČKE AKTIVNOSTI UZORAKA METODOM IZBUŠENIH RUPICA U AGARU

Za određivanje stupnja inhibicije rasta patogenih bakterija korištena je modificirana metoda izbušenih rupica u agaru (engl. *well assay*) prema (Šušković i Kos 2007.).

Priprema uzoraka i supernatanta bez stanica

Za ispitivanje inhibicijskog djelovanja na odabrane patogene korišteni su uzorci na početku, sredini i na kraju fermentacije te čisti filtrat bez stanica na kraju fermentacije. Supernatant bez stanica je dobiven centrifugiranjem (2200 g, 15 min, 4 °C) te filtracijom pomoću membranskih filtera veličine pora 0,45 µm (Syringe filters, PA, Polyamide AO-45/25, Chromafil).

Priprava suspenzije stanica patogenih test-bakterija

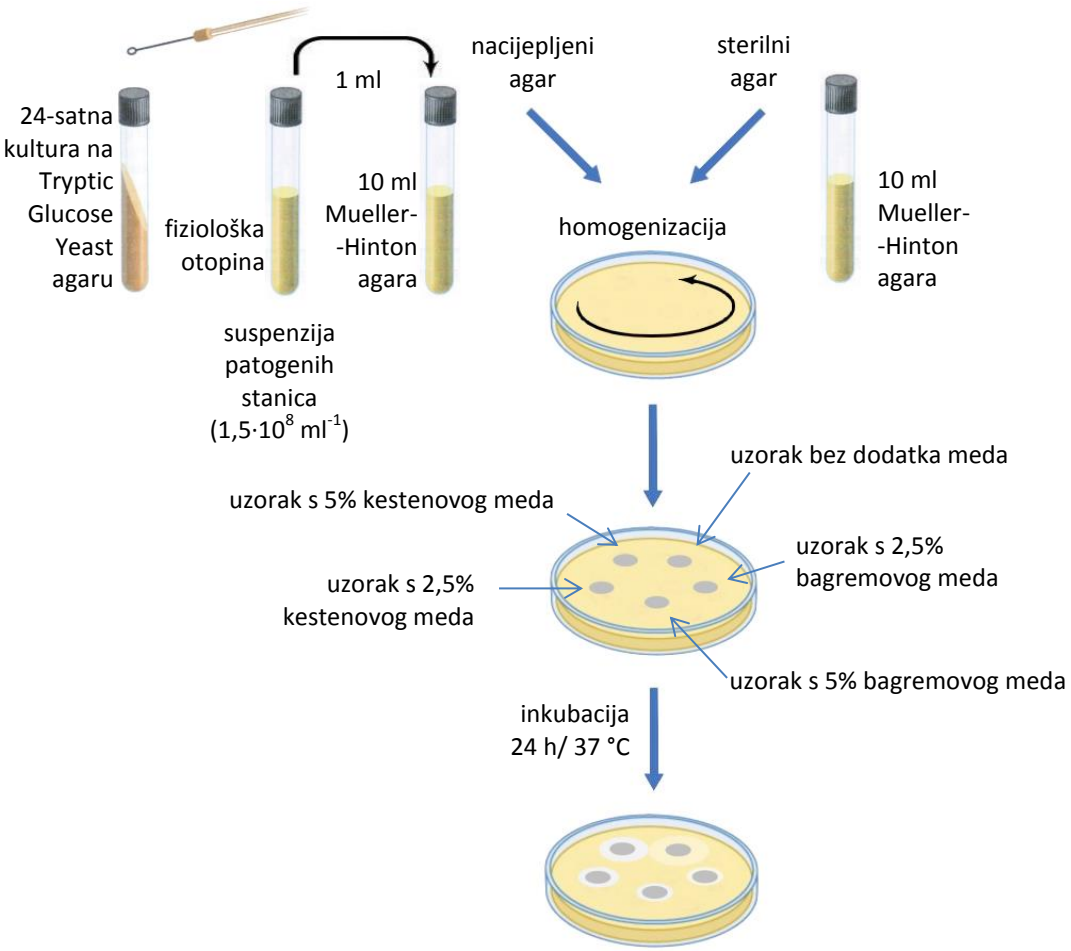
Čista kultura test-bakterija je uzgojena na kosom Tryptic Glucose Yeast Agaru (TGK, Biolife, Italija) tijekom 24 h na 37 °C. Prije ispitivanja stupnja inhibicije, čista kultura je regenerirana svakodnevnim precjepljivanjem na kosi TGK agar i inkubirana 24 h na 37 °C.

Od 24 satne kulture, pripremljena je suspenzija bakterijskih stanica (Slika 34). Mikrobiološkom ušicom prenesen je uzgoj bakterije u epruvetu sa sterilnom fiziološkom otopinom i homogeniziran. Usporedbom s McFarlandovim standardom 0,5 (denzitometrijski ekvivalent od približno $1{,}5 \cdot 10^8$ stanica/ml) kontroliran je broj stanica.

Ispitivanje stupnja inhibicije rasta odabranih patogenih bakterija

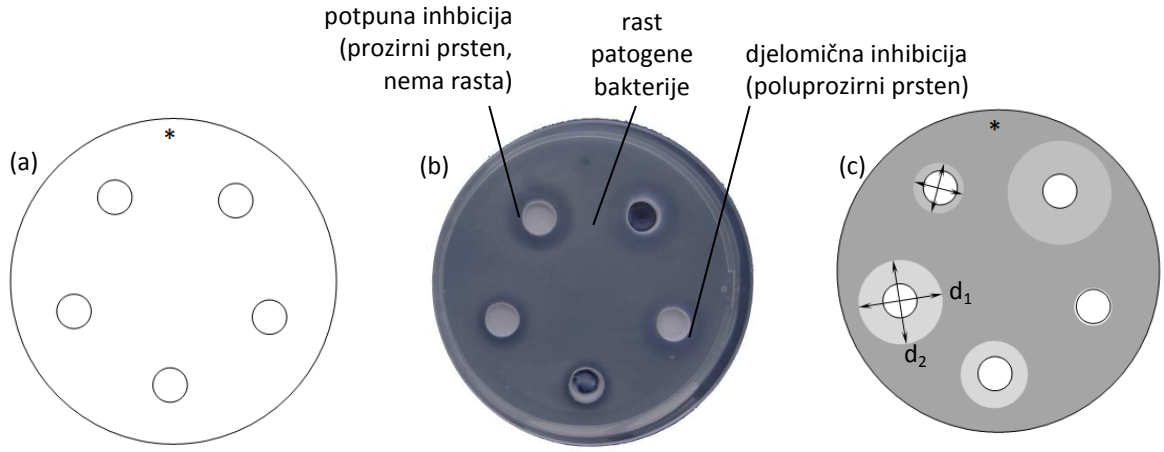
Za ispitivanje stupnja inhibicije korišten je Mueller-Hintonov agar (Merck, Njemačka), prethodno otopljen i ohlađen na 48-50 °C. U sterilnu Petrijevu zdjelicu preneseno je 10 ml sterilnog Mueller-Hinton agara, u koji je potom uliveno 10 ml Mueller-Hinton agara nacijepljenog s 1 ml pripremljene suspenzije patogenih stanica (Slika 34).

Tako se dobiju agarni slojevi jednolične debljine. Obje podloge su homogenizirane i ohlađene do skrutnjavanja. Nakon skrutnjavanja, u svakoj Petrijevoj zdjelici je metalnim bušačem izbušeno 5 rupica promjera 9 mm (prema unaprijed izrađenoj shemi na papiru, **Slika 35** (a)) koje su, nakon vađenja agarnih čepića sterilnom pincetom, ispunjene sa 150 µl uzorka. Po završetku dodavanja otopine, sve zdjelice su stavljene na 2 sata u hladnjak pri 4 °C kako bi sastojci uzorka difundirali u hranjivu podlogu prije početka rasta test-mikroorganizma. Nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24 sata, pojava zona inhibicije rasta oko rupica ukazuje na osjetljivost ispitivanog test-mikroorganizma na antibiotičku tvar (**Slika 35** (b)).



Slika 34 Shematski prikaz određivanja antimikrobne aktivnosti uzoraka

Inhibicija rasta patogene bakterije pomoću uzoraka ispitana je u dva ponavljanja, te je izračunata srednja vrijednost prosječnog promjera (srednja vrijednost dva mjerenja, d_1 i d_2) zone inhibicije rasta patogene kulture (promjer prstena oko rupica uključujući i promjer rupice, **Slika 35** (c)).



(a) shema za bušenje rupica, (b) inhibicija rasta, (c) očitavanje rezultata

Slika 35 Prikaz zona inhibicije

Antimikrobna aktivnost je ocijenjena u rasponu od vrlo snažne (+++++, > 25 mm), snažne (++++, 20-25 mm), srednje (+++, 15-20 mm), slabe (++, < 15 mm), vrlo slabe (+, teško mjerljiva), djelomične (±, poluprozirni prsten) i nema inhibicije (–) .

3.3.7. SENZORSKA PROCJENA

Senzorska svojstva proizvedenih uzoraka fermentiranih mlijeka (izgled, konzistencija, boja, miris i okus) ocijenila je panel skupina od 5 članova koristeći metodu ponderiranih bodova (ISO 1985.) prema priloženim obrascima (Prilog 1 i Prilog 2). Svako svojstvo je ocijenjeno ocjenom od 1 do 5, koja je zatim pomnožena sa čimbenikom značajnosti da bi se dobili ponderirani bodovi. Na osnovi ukupnog broja ponedriranih bodova (maksimalno 20 bodova) uzorci fermentiranog mlijeka su razvrstani u razrede kako prikazuje Tablica 13.

Proizvodi su ocijenjeni nakon jednog dana čuvanja proizvoda u hladnjaku na +4 °C. Rezultati ocjene senzorskih svojstava uzoraka su navedeni kao prosječna vrijednost svojstava svih ocjenjivača.

Tablica 13 Kategorije kakvoće prema rasponu ponderiranih bodova (Mandić i sur. 2000.)

kategorija kakvoće	raspon ponderiranih bodova
izvrsna	17,6-20,0
dobra	15,2-17,5
osrednja	13,2-15,1
prihvatljiva	11,2-13,1
neprihvatljiva	manje od 11,2

3.3.8. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja ± standardna devijacija. Analiza varijance (one-way ANOVA) i potom Fisherov LSD test najmanje značajne razlike (engle. *least significant difference*) su provedeni upotrebom programa Microsoft Office Professional Plus 2010 i statističkog paketa za MS Office XLSTAT-Pro 2012, a različita slova označavaju vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju na razini značajnosti $p<0,05$.

4. REZULTATI

Dobiveni rezultati su podijeljeni u pet cjelina:

- ✓ rezultati analize uzoraka mlijeka i meda korištenih za fermentaciju, što uključuje kemijski sastav i svojstva mlijeka i meda te mikrobiološki sastav i peludnu analizu meda;
- ✓ rezultati ispitivanja fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom fermentacije, što uključuje promjene pH vrijednosti i kinetičke parametre zakiseljavanja, broj živih stanica i kinetičke parametre rasta probiotičkih bakterija tijekom fermentacije te ocjenu prebiotičke aktivnosti meda;
- ✓ rezultati ispitivanja inhibicijskog djelovanja pripremljenih uzoraka fermentiranog mlijeka na odabrane patogene bakterije agar difuzijskim testom;
- ✓ rezultati ispitivanja fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara tijekom skladištenja, što uključuje promjene pH vrijednosti, broj živih stanica i preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom skladištenja;
- ✓ rezultati senzorske analize pripremljenih uzoraka provedene pomoću metode ponderiranih bodova.

4.1. REZULTATI ANALIZE UZORAKA MLIJEKA I MEDA KORIŠTENIH ZA FERMENTACIJU

Tablica 14 Kemijski sastav i svojstva kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka

kemijski sastav i kiselost		kravlje mlijeko	kozje mlijeko	sojino mlijeko
sastojak (g·100 g^{-1})	suha tvar	11,41 ± 0,02	11,45 ± 0,13	11,92 ± 0,17
	pepeo	0,68 ± 0,01	0,79 ± 0,04	0,62 ± 0,07
	mast	2,80	3,20	1,80
	laktoza/ugljikohidrati	4,91 ± 0,02	4,32 ± 0,05	2,51 ± 0,08
	proteini	3,08 ± 0,04	3,08 ± 0,07	3,08 ± 0,04
kiselost	pH	6,64 ± 0,06	6,55 ± 0,09	6,97 ± 0,05
	°SH	7,23 ± 0,05	8,05 ± 0,13	5,21 ± 0,09

Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja.

Tablica 15 Kemijski sastav i svojstva bagremovog i kestenovog meda

sastojak / svojstvo	bagremov med	kestenov med
voda (%)	16,4 ± 0,8	17,4 ± 0,3
pepeo (%)	0,06 ± 0,01	0,94 ± 0,02
kiselost (mmol·kg^{-1})	9,7 ± 0,6	16,2 ± 0,8
tvari netopljive u vodi (%)	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01
reducirani šećeri (%)	68,30 ± 1,71	75,82 ± 1,12
saharoza (%)	0,40 ± 0,08	1,95 ± 0,05
dijastazni broj	10,2 ± 0,6	24,6 ± 0,9
hidroksimetilfurfural (mg·kg-^{1})	3,4 ± 0,7	4,8 ± 0,5

Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja.

Tablica 16 Broj mikroorganizama (CFU/g) u bagremovom i kestenovom medu

mikroorganizam	bagremov med	kestenov med
aerobne mezofilne bakterije	manje od 10^4	manje od 10^4
kvasci i plijesni	manje od 10^2	manje od 10^2
enterobacteriaceae	manje od 10	manje od 10
sulfitoreducirajuće klostridije	manje od 10	manje od 10

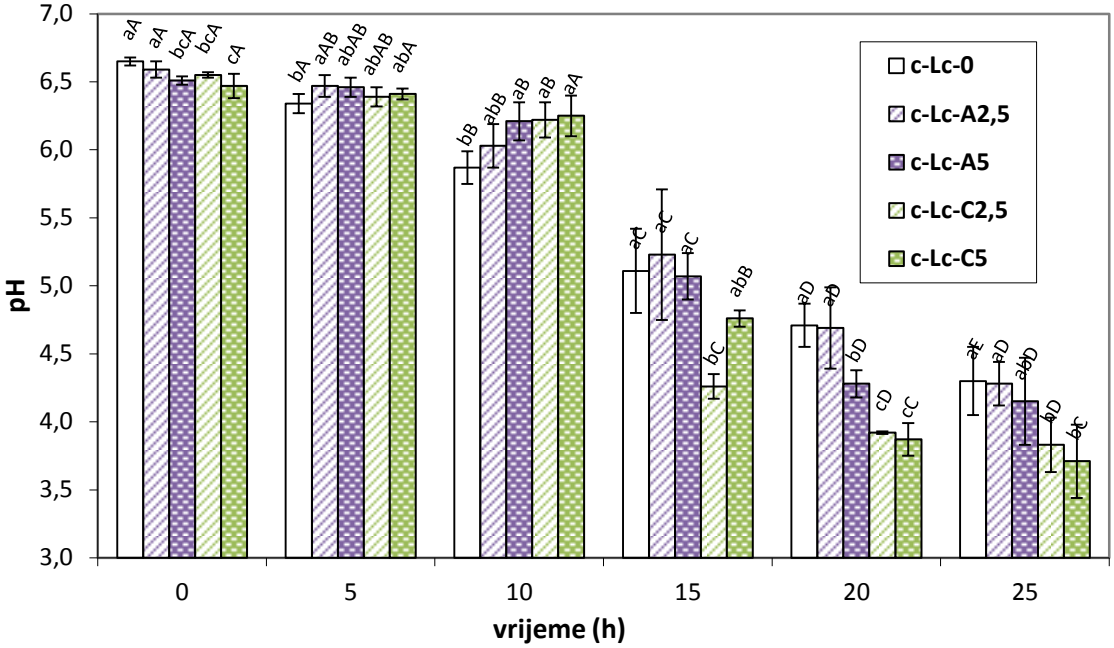
Tablica 17 Udio vrste peludi u bagremovom i kestenovom medu

pelud	bagremov med	pelud	kestenov med
***Robinia pseudoacacia* (bagrem)**	33,10%	***Castanea sativa* (pitomi kesten)**	91,20%
***Amorpha fruticosa* (bagremac)**	21,40%	***Amorpha fruticosa* (bagremac)**	5,30%
***Poaceae* (trave)**	17,50%	***Poaceae* (trave)**	2,60%
***Brasica* sp. (repice)**	11,00%	***Rubus* sp. (kupina, malina)**	0,90%
***Loranthus europaeus* (ljepak)**	6,40%		
***Rhamnus frangula* (krkavina)**	5,20%		
***Salix* sp. (vrbe)**	4,00%		
***Prunus* sp. (šljiva, trešnja)**	1,40%		

4.2. REZULTATI ISPITIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE

4.2.1. PRAĆENJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE

4.2.1.1 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije kravljeg mlijeka



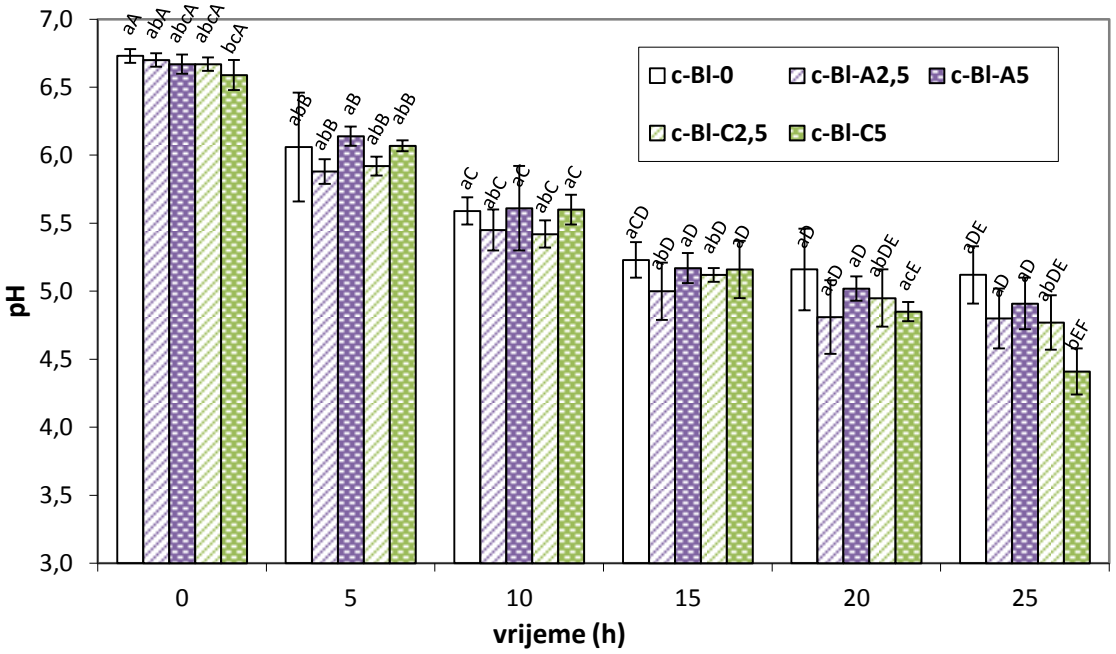
Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 36 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

Tablica 18 Kinetički parametri zakiseljavanja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
c-Lc-0	2,775 ± 0,080^{a}	0,133 ± 0,017^{a}	3,804 ± 0,197^{a}	17,573 ± 2,197^{a}	21,395 ± 2,270^{a}
c-Lc-A2,5	2,905 ± 0,605^{a}	0,169 ± 0,049^{b}	6,860 ± 0,658^{a}	18,227 ± 3,070^{ab}	21,337 ± 2,426^{a}
c-Lc-A5	2,485 ± 0,295^{a}	0,260 ± 0,020^{c}	9,202 ± 0,795^{a}	16,993 ± 1,554^{abc}	19,792 ± 1,337^{ab}
c-Lc-C2,5	2,698 ± 0,100^{a}	0,504 ± 0,028^{d}	9,492 ± 0,343^{b}	13,595 ± 1,020^{bc}	16,263 ± 0,913^{bc}
c-Lc-C5	2,844 ± 0,201^{a}	0,347 ± 0,036^{d}	9,860 ± 0,326^{c}	14,360 ± 0,592^{c}	17,087 ± 0,703^{c}

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{PH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{PH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



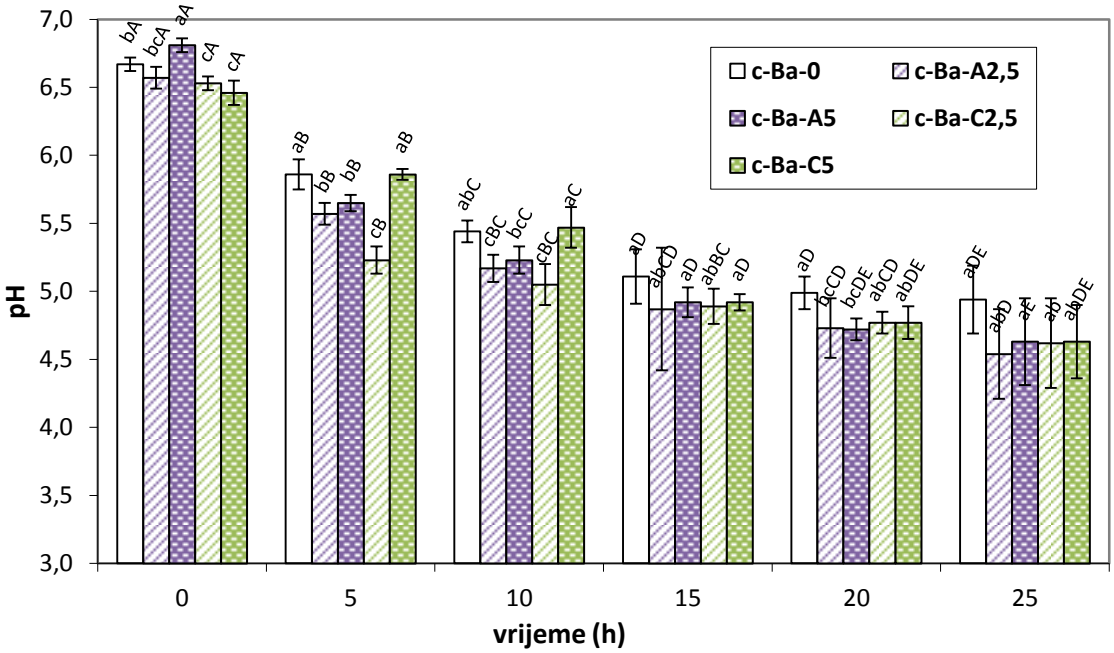
Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 37 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

Tablica 19 Kinetički parametri zakiseljavanja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
c-Bl-0	1,600 ± 0,178^{c}	0,158 ± 0,026^{a}	1,135 ± 2,017^{a}	24,639 ± 5,543^{a}	37,405 ± 6,709^{a}
c-Bl-A2,5	1,938 ± 0,208^{b}	0,146 ± 0,012^{a}	0,171 ± 0,143^{a}	18,162 ± 4,539^{abc}	27,502 ± 7,240^{bc}
c-Bl-A5	1,793 ± 0,012^{bc}	0,131 ± 0,023^{ab}	1,301 ± 0,223^{a}	20,638 ± 2,900^{ab}	29,820 ± 2,250^{ab}
c-Bl-C2,5	1,862 ± 0,181^{bc}	0,137 ± 0,006^{a}	0,138 ± 0,241^{a}	19,103 ± 3,455^{abc}	29,248 ± 5,734^{ab}
c-Bl-C5	2,545 ± 0,037^{a}	0,104 ± 0,007^{ab}	0,884 ± 0,545^{a}	17,427 ± 1,656^{bc}	22,688 ± 2,069^{bc}

Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

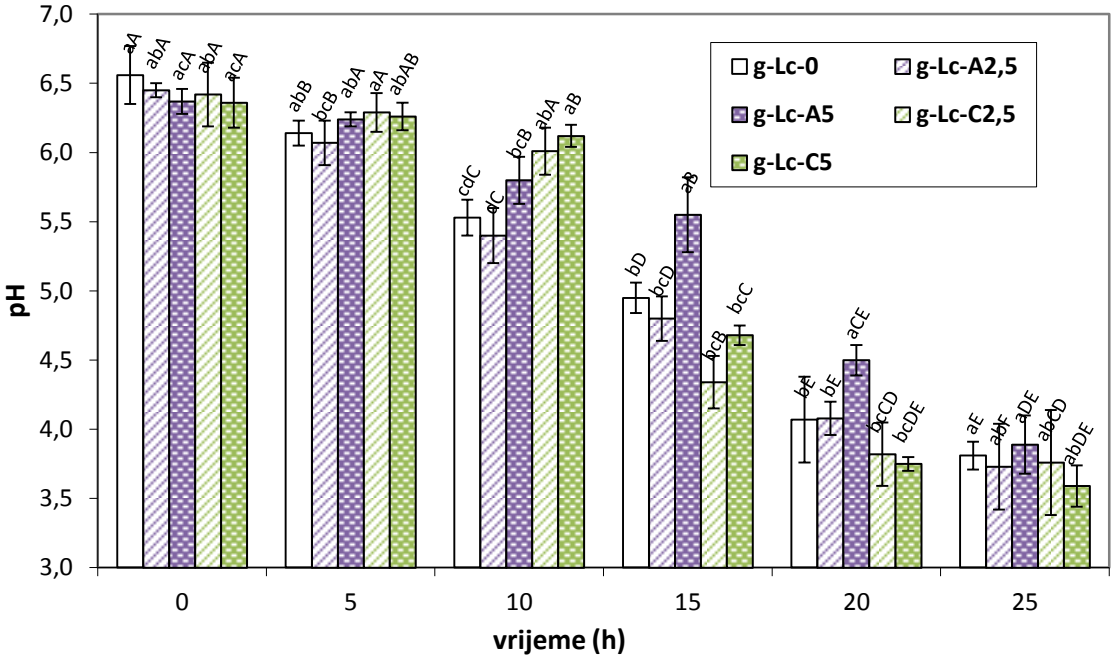
Slika 38 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

Tablica 20 Kinetički parametri zakiseljavanja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
c-Ba-0	1,714 ± 0,165^{a}	0,149 ± 0,002^{d}	0,185 ± 0,220^{c}	20,909 ± 4,819^{a}	33,138 ± 7,414^{a}
c-Ba-A2,5	1,915 ± 0,298^{a}	0,176 ± 0,015^{d}	0,016 ± 0,178^{b}	14,592 ± 4,834^{ab}	24,114 ± 8,499^{a}
c-Ba-A5	2,100 ± 0,176^{a}	0,199 ± 0,018^{c}	0,115 ± 0,283^{a}	14,960 ± 2,757^{ab}	23,964 ± 4,493^{a}
c-Ba-C2,5	1,722 ± 0,133^{a}	0,302 ± 0,006^{a}	0,502 ± 0,101^{a}	12,653 ± 4,053^{ab}	26,793 ± 8,957^{a}
c-Ba-C5	1,921 ± 0,174^{a}	0,117 ± 0,002^{b}	0,686 ± 0,118^{a}	16,338 ± 2,336^{b}	23,726 ± 3,238^{a}

Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.1.2 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije kozjeg mlijeka



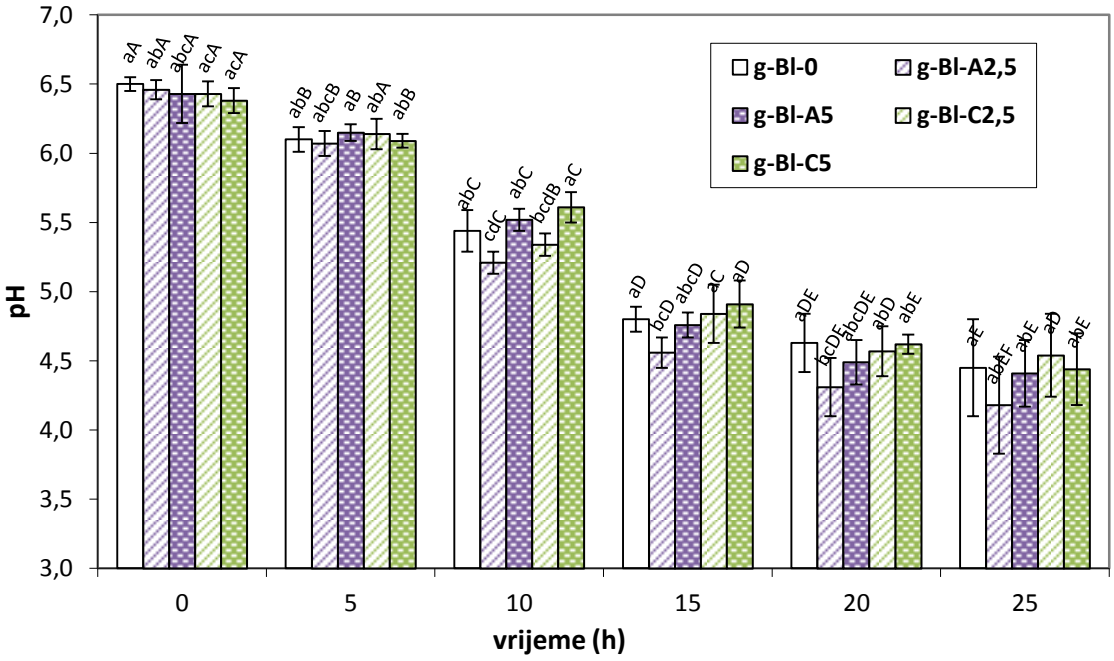
Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 39 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

Tablica 21 Kinetički parametri zakiseljavanja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *L. casei* Lc01 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
g-Lc-0	3,492 ± 0,245^{a}	0,150 ± 0,011^{d}	3,339 ± 1,064^{c}	14,512 ± 0,859^{b}	17,770 ± 0,984^{b}
g-Lc-A2,5	3,342 ± 0,478^{a}	0,149 ± 0,004^{d}	3,308 ± 0,901^{b}	13,425 ± 1,577^{bc}	16,819 ± 1,679^{b}
g-Lc-A5	5,375 ± 0,122^{a}	0,157 ± 0,002^{c}	8,895 ± 0,820^{a}	18,837 ± 2,188^{a}	21,466 ± 1,584^{a}
g-Lc-C2,5	2,683 ± 0,108^{a}	0,399 ± 0,020^{a}	9,093 ± 0,146^{a}	13,560 ± 2,723^{bc}	16,168 ± 2,529^{bc}
g-Lc-C5	2,857 ± 0,063^{a}	0,334 ± 0,001^{b}	9,796 ± 0,450^{a}	13,860 ± 1,243^{bc}	16,543 ± 1,130^{bc}

Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



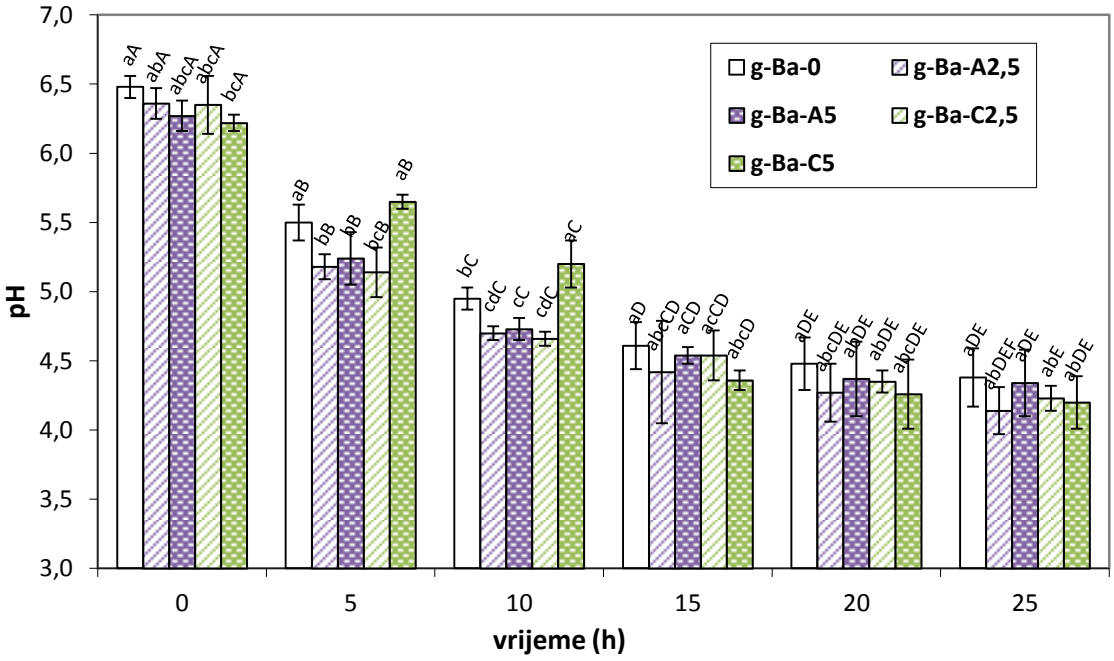
Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 40 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

Tablica 22 Kinetički parametri zakiseljavanja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
g-Bl-0	2,132 ± 0,324^{a}	0,150 ± 0,006^{c}	2,637 ± 0,498^{b}	15,173 ± 2,469^{ab}	20,818 ± 3,227^{a}
g-Bl-A2,5	2,352 ± 0,303^{a}	0,185 ± 0,013^{a}	3,086 ± 0,270^{ab}	12,200 ± 1,557^{b}	17,086 ± 2,468^{a}
g-Bl-A5	2,120 ± 0,007^{a}	0,165 ± 0,005^{b}	4,054 ± 1,256^{a}	14,787 ± 1,663^{ab}	19,792 ± 2,087^{a}
g-Bl-C2,5	1,941 ± 0,205^{a}	0,168 ± 0,003^{b}	3,456 ± 0,063^{ab}	14,852 ± 2,662^{ab}	21,371 ± 3,933^{a}
g-Bl-C5	2,100 ± 0,134^{a}	0,130 ± 0,006^{d}	3,582 ± 0,310^{ab}	16,076 ± 1,836^{a}	21,119 ± 2,124^{a}

Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

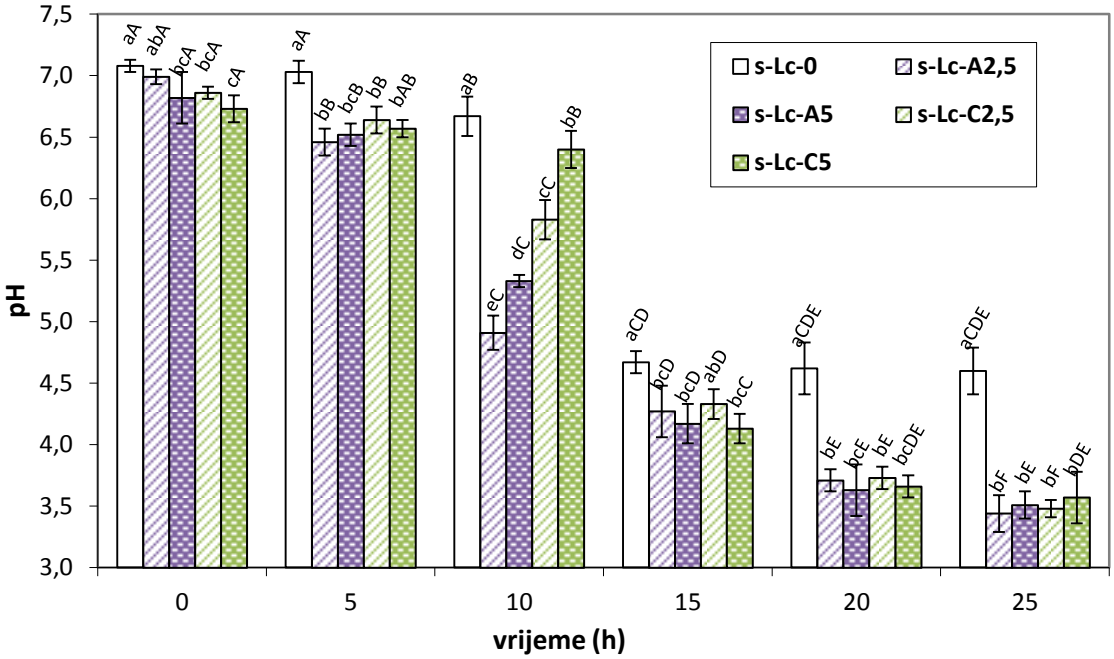
Slika 41 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

Tablica 23 Kinetički parametri zakiseljavanja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
g-Ba-0	2,050 ± 0,136^{ab}	0,188 ± 0,008^{ac}	0,273 ± 0,260^{ab}	10,183 ± 2,190^{ab}	17,989 ± 3,829^{a}
g-Ba-A2,5	2,084 ± 0,187^{ab}	0,509 ± 0,515^{a}	1,352 ± 2,183^{ab}	6,681 ± 1,654^{bc}	13,367 ± 3,262^{a}
g-Ba-A5	1,877 ± 0,105^{b}	0,210 ± 0,029^{ab}	0,394 ± 0,660^{ab}	7,391 ± 2,312^{bc}	15,343 ± 3,794^{a}
g-Ba-C2,5	1,974 ± 0,106^{ab}	0,250 ± 0,021^{ab}	0,373 ± 0,167^{ab}	5,658 ± 2,497^{c}	13,584 ± 2,726^{a}
g-Ba-C5	2,151 ± 0,155^{a}	0,147 ± 0,009^{ad}	1,827 ± 0,140^{a}	11,376 ± 1,883^{a}	16,018 ± 2,081^{a}

Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.1.3 Promjena pH vrijednosti i kinetički parametri zakiseljavanja tijekom fermentacije sojinog mlijeka



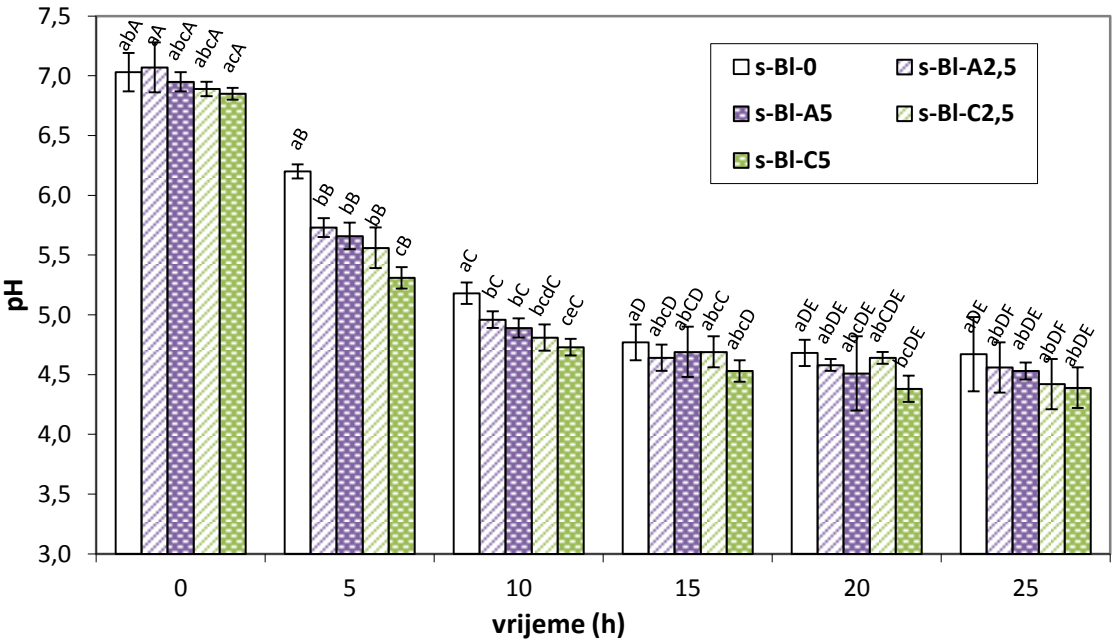
Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 42 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

Tablica 24 Kinetički parametri zakiseljavanja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *L. casei* Lc01 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
s-Lc-0	2,477 ± 0,144^{c}	1,322 ± 1,091^{a}	9,534 ± 0,363^{a}	20,925 ± 1,936^{a}	24,857 ± 1,991^{a}
s-Lc-A2,5	3,556 ± 0,047^{a}	0,278 ± 0,015^{b}	2,985 ± 0,040^{d}	9,919 ± 1,098^{c}	12,854 ± 1,226^{c}
s-Lc-A5	3,431 ± 0,092^{a}	0,290 ± 0,023^{b}	4,732 ± 0,933^{c}	11,216 ± 0,599^{bc}	13,943 ± 0,773^{bc}
s-Lc-C2,5	3,504 ± 0,060^{a}	0,307 ± 0,018^{b}	6,391 ± 0,674^{b}	13,036 ± 0,711^{b}	15,539 ± 0,698^{b}
s-Lc-C5	3,146 ± 0,052^{b}	0,570 ± 0,023^{ab}	9,614 ± 0,126^{a}	12,500 ± 1,178^{b}	14,894 ± 1,174^{bc}

Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



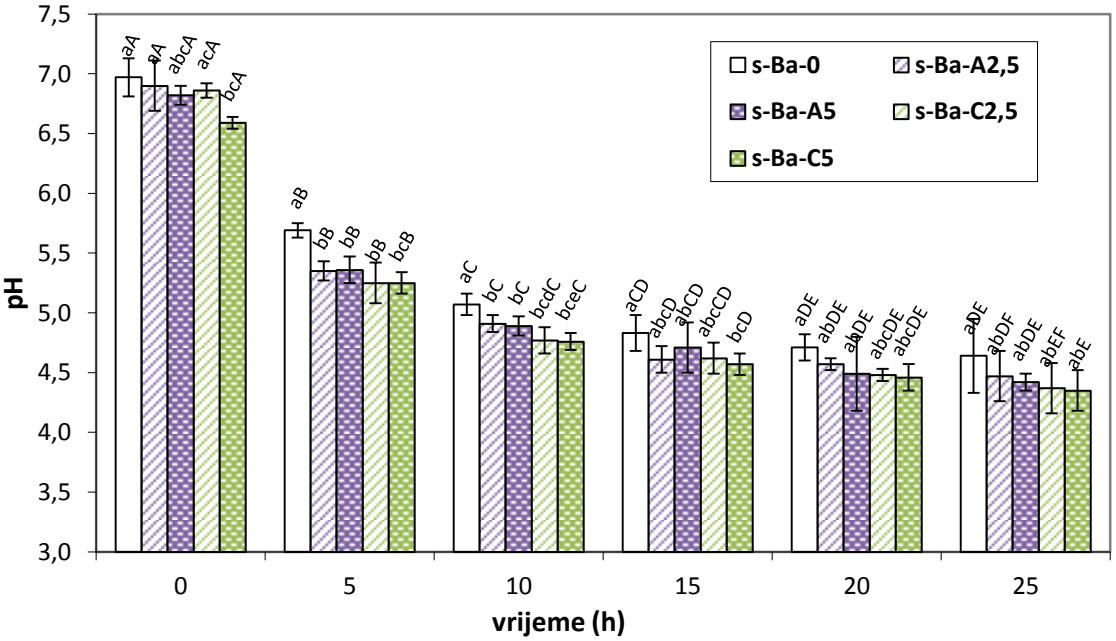
Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 43 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

Tablica 25 Kinetički parametri zakiseljavanja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
s-Bl-0	2,380 ± 0,065^{ab}	0,260 ± 0,023^{c}	1,831 ± 0,09^{a} 7	15,003 ± 2,414^{a}	25,328 ± 2,643^{a}
s-Bl-A2,5	2,487 ± 0,072^{a}	0,305 ± 0,041^{b}	0,724 ± 0,083^{bc}	12,255 ± 1,834^{ab}	19,339 ± 2,053^{ab}
s-Bl-A5	2,388 ± 0,117^{ab}	0,296 ± 0,013^{bc}	0,756 ± 0,178^{b}	11,926 ± 1,995^{ab}	19,232 ± 3,686^{ab}
s-Bl-C2,5	2,313 ± 0,062^{bc}	0,318 ± 0,013^{ab}	0,848 ± 0,162^{b}	10,843 ± 2,100^{bc}	18,792 ± 2,969^{abc}
s-Bl-C5	2,398 ± 0,071^{ab}	0,348 ± 0,006^{a}	0,606 ± 0,125^{bd}	7,826 ± 1,754^{c}	15,705 ± 2,449^{bc}

Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) pH određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 44 Promjena pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

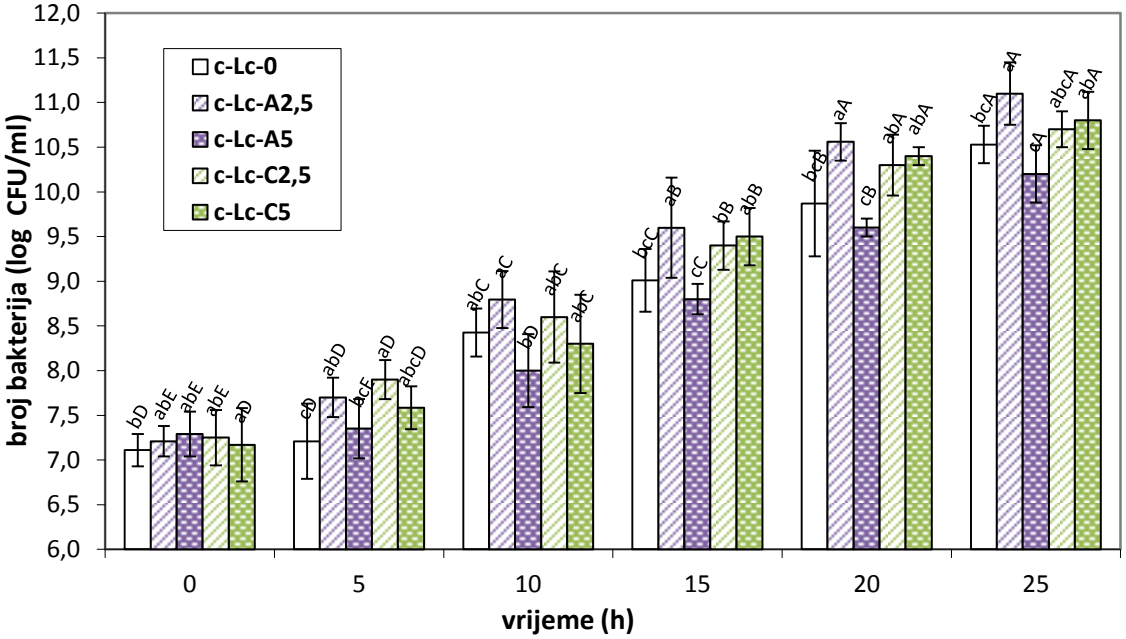
Tablica 26 Kinetički parametri zakiseljavanja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

uzorak	A	v_{max} (h^{-1})	λ (h)	$t_{pH=5,0}$ (h)	$t_{pH=4,6}$ (h)
s-Ba-0	2,257 ± 0,061^{ab}	0,274 ± 0,047^{b}	0,495 ± 0,226^{a}	14,028 ± 2,943^{a}	22,953 ± 4,472^{a}
s-Ba-A2,5	2,317 ± 0,078^{a}	0,338 ± 0,054^{ab}	0,459 ± 0,171^{a}	9,747 ± 1,837^{b}	18,714 ± 2,921^{ab}
s-Ba-A5	2,263 ± 0,115^{a}	0,305 ± 0,019^{b}	0,377 ± 0,195^{a}	10,088 ± 2,345^{ab}	18,416 ± 3,924^{ab}
s-Ba-C2,5	2,340 ± 0,059^{a}	0,373 ± 0,030^{a}	0,606 ± 0,013^{a}	7,797 ± 2,592^{b}	16,676 ± 3,254^{ab}
s-Ba-C5	2,116 ± 0,074^{b}	0,289 ± 0,007^{b}	0,475 ± 0,145^{a}	7,333 ± 1,571^{b}	16,199 ± 2,853^{b}

Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - smanjenje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije (ΔpH); v_{max} - maksimalna brzina zakiseljavanja; λ - duljina latentne faze zakiseljavanja; $t_{pH=5,0}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=5,0; $t_{pH=4,6}$ - vrijeme potrebno da se postigne vrijednost pH=4,6. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.2. PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM FERMENTACIJE

4.2.2.1 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije kravljeg mlijeka



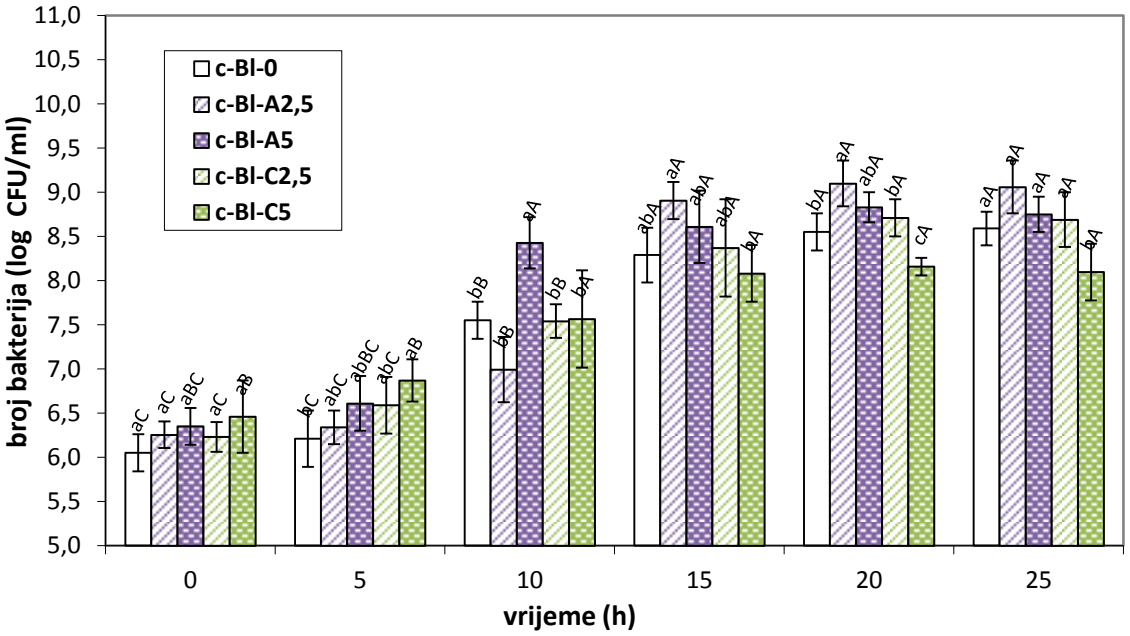
Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 45 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom fermentacije kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 27 Kinetički parametri rasta bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 u kravljem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
c-Lc-0	4,327 [a] ± 0,103 [a]	0,204 ± 0,013 [a]	3,627 ± 0,653 [a]	3,411 ± 0,214 [a]
c-Lc-A2,5	4,757 [a] ± 0,200 [ab]	0,218 ± 0,020 [ab]	2,782 ± 0,274 [a]	3,197 ± 0,289 [ab]
c-Lc-A5	3,913 [a] ± 0,648 [ab]	0,193 ± 0,033 [b]	5,852 ± 1,067 [b]	3,669 ± 0,612 [abc]
c-Lc-C2,5	4,274 [a] ± 0,462 [b]	0,180 ± 0,004 [b]	2,787 ± 0,213 [b]	3,845 ± 0,093 [bc]
c-Lc-C5	3,830 [a] ± 0,139 [b]	0,246 ± 0,030 [b]	6,109 ± 0,616 [b]	2,847 ± 0,333 [c]

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



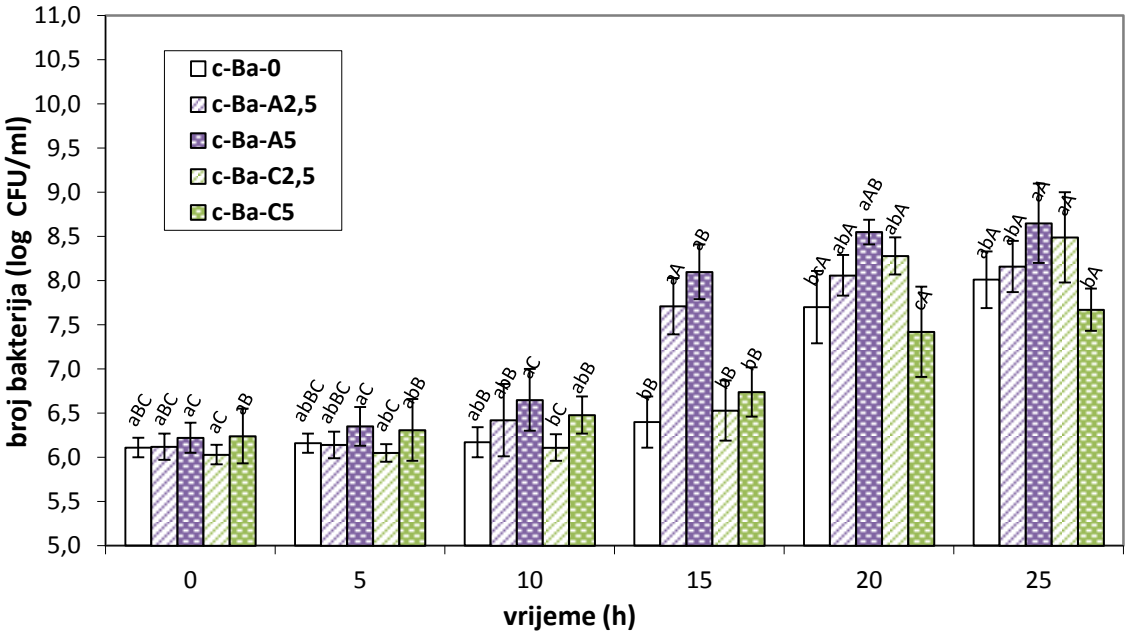
Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. ^{ABC} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 46 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom fermentacije kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 28 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 u kravljem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
c-Bl-0	2,541 ± 0,023^{b}	0,298 ± 0,013^{c}	4,921 ± 0,418^{b}	2,326 ± 0,105^{bc}
c- Bl-A2,5	2,829 ± 0,135^{a}	0,646 ± 0,096^{a}	8,820 ± 0,531^{a}	1,088 ± 0,160^{d}
c- Bl-A5	2,394 ± 0,041^{b}	0,476 ± 0,021^{b}	4,630 ± 0,271^{b}	1,457 ± 0,064^{cd}
c- Bl-C2,5	2,576 ± 0,136^{b}	0,220 ± 0,016^{cd}	3,798 ± 0,327^{bc}	3,159 ± 0,239^{ab}
c-Bl-C5	1,724 ± 0,235^{c}	0,190 ± 0,062^{d}	2,864 ± 1,248^{c}	3,899 ± 1,132^{a}

Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. ^{ABC} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

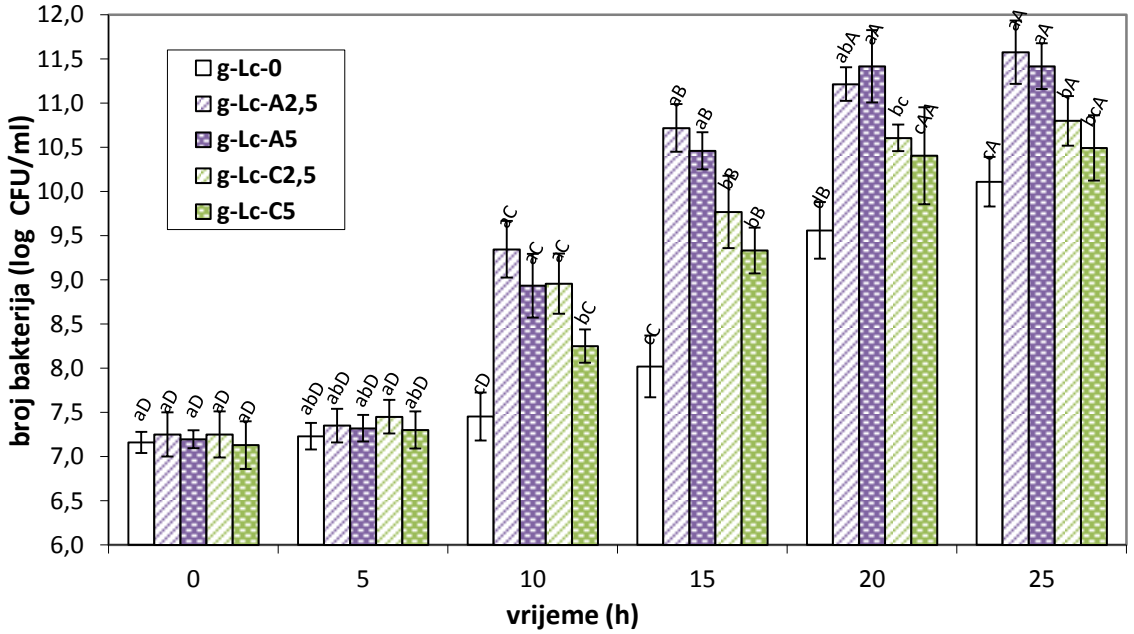
Slika 47 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom fermentacije kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 29 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kravljem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
c-Ba-0	1,939 ± 0,191^{ac}	0,335 ± 0,058^{acd}	14,363 ± 0,613^{a}	2,112 ± 0,350^{abc}
c-Ba-A2,5	2,027 ± 0,123^{ab}	0,319 ± 0,037^{ad}	9,297 ± 1,305^{c}	2,188 ± 0,237^{ab}
c-Ba-A5	2,450 ± 0,184^{ab}	0,335 ± 0,037^{ac}	8,749 ± 0,869^{c}	2,088 ± 0,239^{abcd}
c-Ba-C2,5	2,519 ± 0,439^{ab}	1,042 ± 1,024^{a}	14,034 ± 0,882^{ab}	1,147 ± 0,755^{d}
c-Ba-C5	2,713 ± 1,791^{a}	0,390 ± 0,498^{ab}	11,505 ± 2,824^{bc}	4,732 ± 3,487^{a}

Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.2.2 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije kozjeg mlijeka



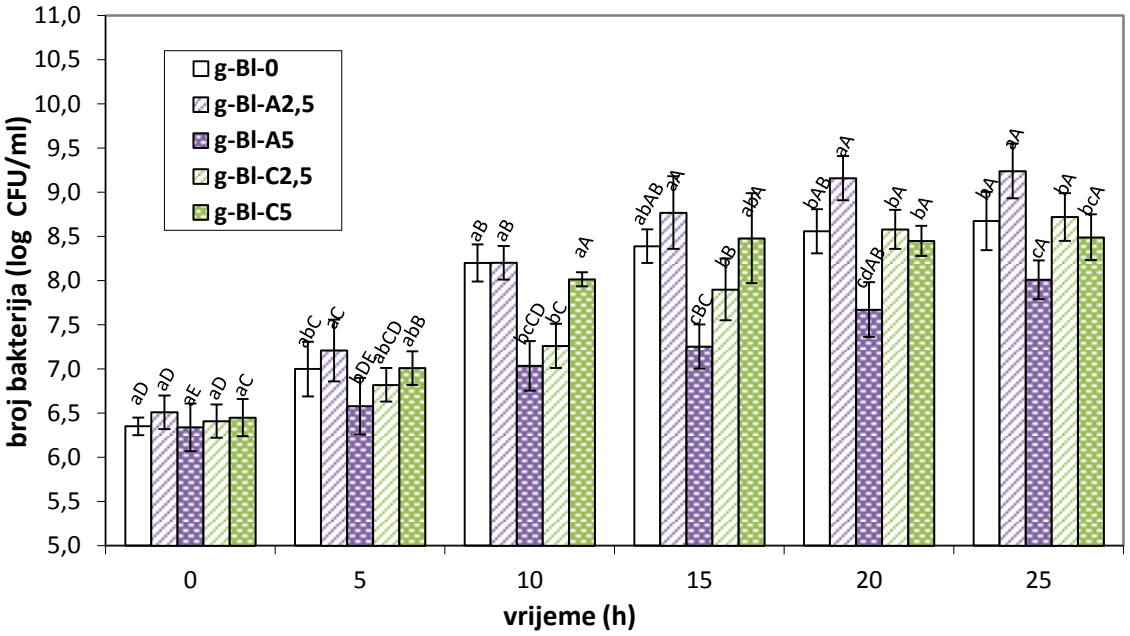
Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 48 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom fermentacije kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 30 Kinetički parametri rasta bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 u kozjem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
g-Lc-0	3,428 ± 0,512^{b}	0,298 ± 0,060^{b}	11,551 ± 1,842^{a}	2,393 ± 0,488^{a}
g-Lc-A2,5	4,252 ± 0,017^{a}	0,439 ± 0,010^{a}	5,394 ± 0,031^{b}	1,580 ± 0,037^{b}
g-Lc-A5	4,391 ± 0,228^{a}	0,411 ± 0,003^{a}	5,875 ± 0,523^{b}	1,686 ± 0,013^{b}
g-Lc-C2,5	3,682 ± 0,150^{b}	0,283 ± 0,030^{b}	4,496 ± 0,283^{b}	2,470 ± 0,262^{a}
g-Lc-C5	3,697 ± 0,152^{b}	0,263 ± 0,032^{b}	5,828 ± 0,883^{b}	2,657 ± 0,320^{a}

Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



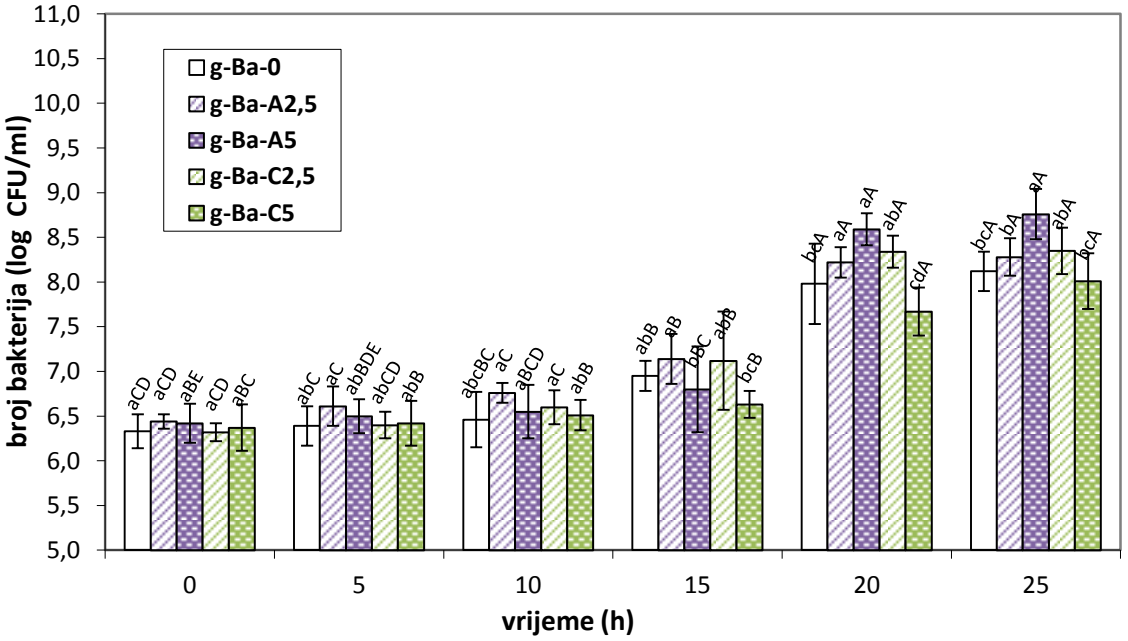
Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 49 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom fermentacije kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 31 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 u kozjem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
g-Bl-0	2,244 ± 0,192^{b}	0,287 ± 0,040^{a}	2,620 ± 1,099^{ab}	2,450 ± 0,344^{d}
g-Bl-A2,5	2,797 ± 0,135^{a}	0,208 ± 0,001^{b}	1,758 ± 0,516^{b}	3,331 ± 0,015^{c}
g-Bl-A5	2,276 ± 0,114^{b}	0,080 ± 0,002^{d}	2,652 ± 0,552^{ab}	8,693 ± 0,260^{a}
g-Bl-C2,5	2,815 ± 0,055^{a}	0,132 ± 0,009^{c}	3,173 ± 0,070^{a}	5,257 ± 0,372^{b}
g-Bl-C5	2,053 ± 0,097^{b}	0,258 ± 0,018^{a}	2,897 ± 0,113^{a}	2,697 ± 0,185^{d}

Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. [ABC] Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

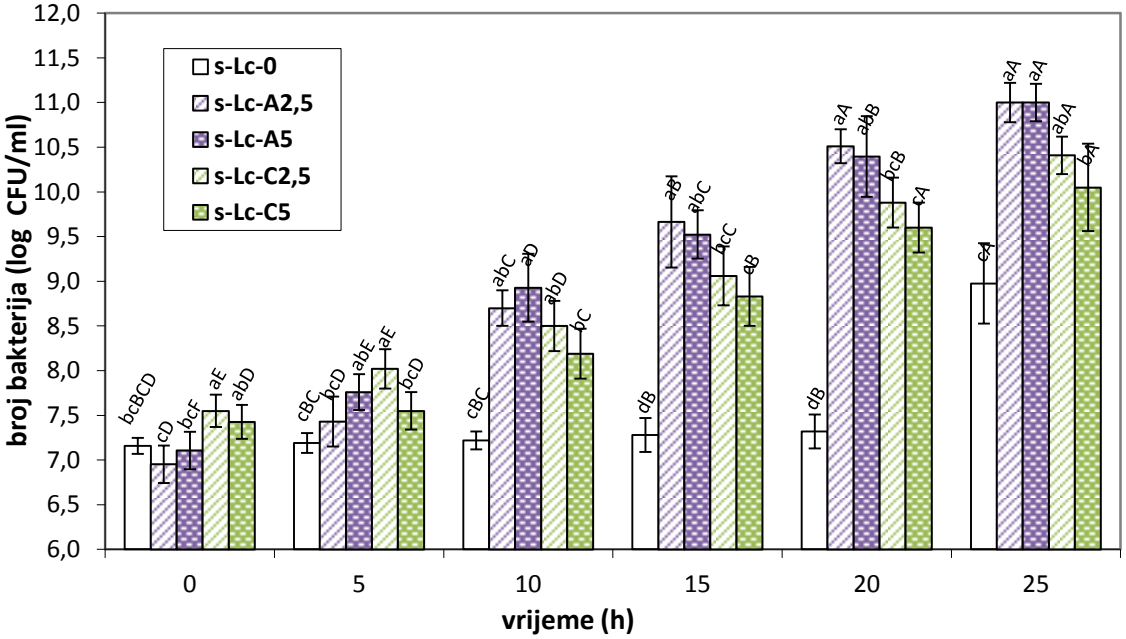
Slika 50 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom fermentacije kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 32 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kozjem mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
g-Ba-0	1,860 ± 0,054^{bc}	0,699 ± 0,773^{a}	13,083 ± 1,558^{ab}	2,130 ± 1,708^{ac}
g-Ba-A2,5	2,180 ± 0,453^{ab}	0,290 ± 0,251^{ac}	10,234 ± 3,548^{ab}	3,602 ± 2,122^{a}
g-Ba-A5	2,354 ± 0,076^{a}	0,572 ± 0,176^{ab}	14,304 ± 0,815^{a}	1,289 ± 0,384^{ad}
g-Ba-C2,5	2,106 ± 0,247^{abc}	0,901 ± 0,762^{a}	12,451 ± 3,384^{ab}	1,544 ± 1,571^{ad}
g-Ba-C5	1,705 ± 0,043^{c}	0,245 ± 0,030^{ad}	14,042 ± 0,724^{a}	2,858 ± 0,343^{ab}

Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. [abc] Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.2.3 Promjena broja bakterija i parametri kinetike rasta tijekom fermentacije sojinog mlijeka



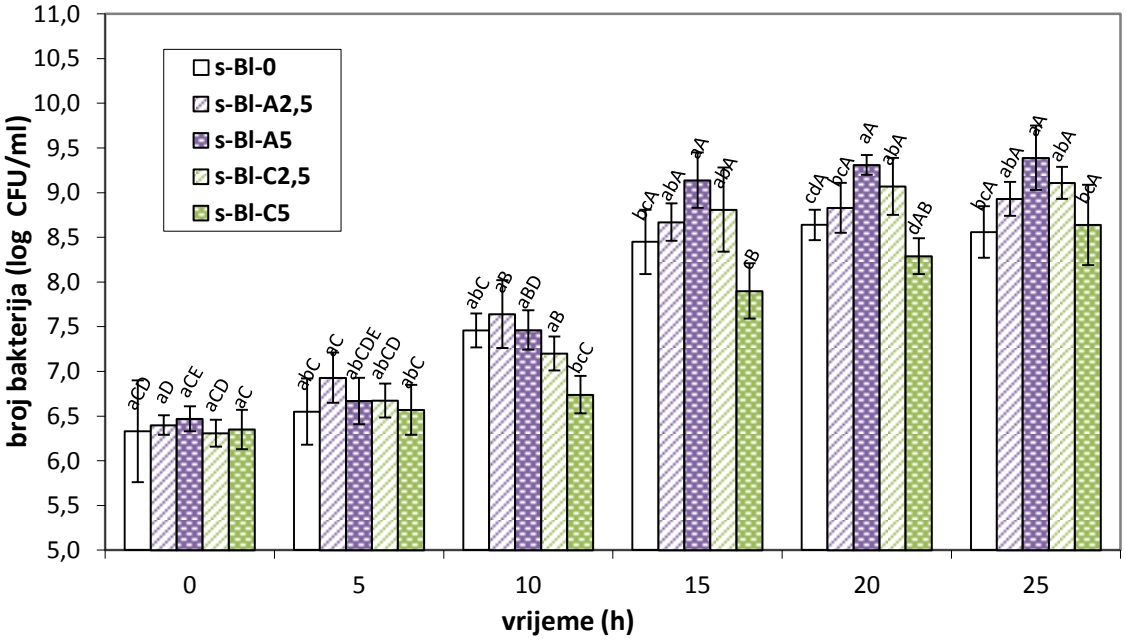
Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. ^{ABC} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 51 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom fermentacije sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 33 Kinetički parametri rasta bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 u sojinom mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
s-Lc-0	3,569 ± 1,150^{abc}	0,405 ± 0,050^{a}	20,472 ± 0,336^{a}	1,729 ± 0,224^{e}
s-Lc-A2,5	4,480 ± 0,205^{abc}	0,249 ± 0,019^{b}	3,401 ± 0,031^{c}	2,794 ± 0,209^{d}
s-Lc-A5	4,583 ± 0,261^{a}	0,202 ± 0,017^{c}	2,015 ± 0,046^{d}	3,443 ± 0,286^{c}
s-Lc-C2,5	4,527 ± 0,635^{a}	0,142 ± 0,002^{d}	3,769 ± 1,025^{c}	4,888 ± 0,058^{a}
s-Lc-C5	3,316 ± 0,553^{bc}	0,157 ± 0,005^{cd}	5,688 ± 0,285^{b}	4,424 ± 0,148^{b}

Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



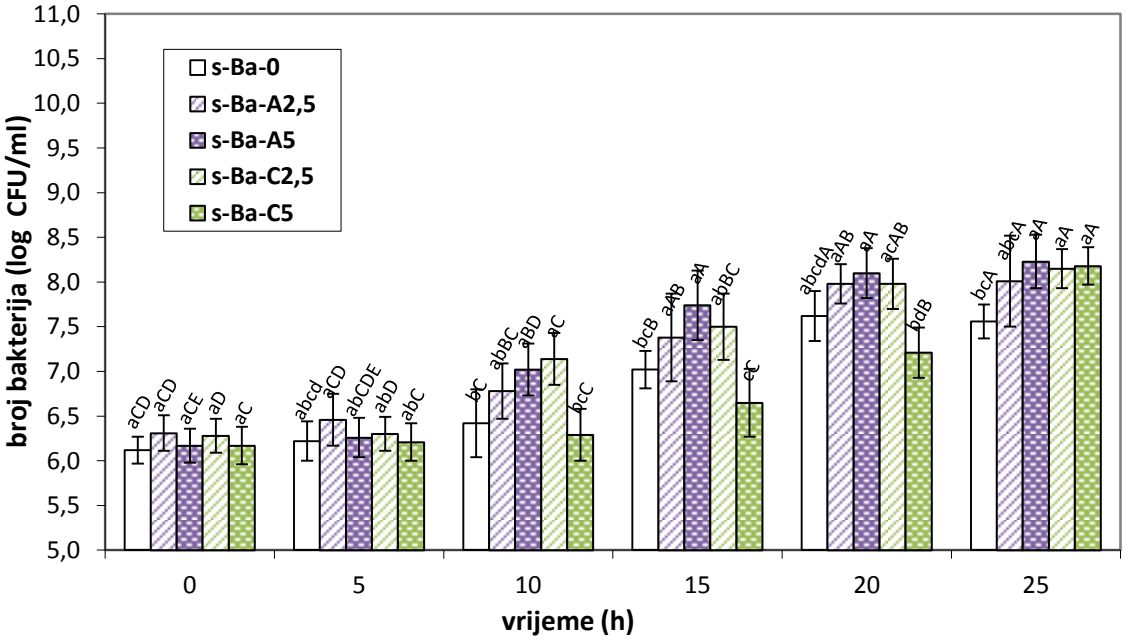
Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. ^{ABC} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 52 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom fermentacije sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 34 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 u sojinom mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
s-Bl-0	2,316 ± 0,372^{bc}	0,381 ± 0,221^{abc}	5,900 ± 2,640^{ab}	2,185 ± 0,949^{abc}
s-Bl-A2,5	2,650 ± 0,098^{abc}	0,204 ± 0,005^{cd}	3,122 ± 1,256^{b}	3,391 ± 0,084^{a}
s-Bl-A5	2,891 ± 0,099^{a}	0,557 ± 0,071^{a}	8,210 ± 0,082^{a}	1,259 ± 0,158^{bd}
s-Bl-C2,5	2,868 ± 0,066^{a}	0,521 ± 0,310^{ab}	7,589 ± 1,658^{a}	1,737 ± 1,091^{a}
s-Bl-C5	2,380 ± 0,323^{bc}	0,214 ± 0,030^{bc}	7,848 ± 0,772^{a}	3,286 ± 0,502^{a}

Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).



Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija različitih uzoraka tijekom istog sata fermentacije na razini značajnosti p<0,05. ^{ABC} Fisher testom potvrđena je statistička značajnost razlike između srednjih vrijednosti (±SD) broja bakterija određenog uzorka tijekom različitih sati fermentacije na razini značajnosti p<0,05.

Slika 53 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom fermentacije sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 35 Kinetički parametri rasta bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u sojinom mlijeku s dodatkom meda

uzorak	A	μ_{max}(h^{-1})	λ (h)	t_g (h)
s-Ba-0	1,585 ± 0,146^{bc}	0,152 ± 0,043^{bc}	7,982 ± 2,716^{b}	4,808 ± 1,348^{ac}
s-Ba-A2,5	1,948 ± 0,333^{bc}	0,131 ± 0,008^{bcd}	6,290 ± 1,705^{bc}	5,291 ± 0,301^{a}
s-Ba-A5	2,117 ± 0,070^{b}	0,183 ± 0,024^{b}	5,430 ± 0,092^{bc}	3,837 ± 0,505^{abd}
s-Ba-C2,5	1,968 ± 0,095^{bc}	0,144 ± 0,030^{bc}	4,913 ± 0,157^{c}	4,960 ± 1,018^{a}
s-Ba-C5	11,289 ± 4,035^{a}	0,258 ± 0,043^{a}	17,709 ± 1,661^{a}	2,729 ± 0,413^{bd}

Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. A - maksimalno povećanje broja bakterija ($\log(N/N_0)_{max}$; μ_{max} - maksimalna specifična brzina rasta; λ - duljina lag faze rasta; t_g - generacijsko vrijeme. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (± SD) tri ponavljanja. ^{abc} Različita slova u istom stupcu predstavljaju statistički značajnu razliku između vrijednosti istog parametra, prema Fisher LSD testu (p<0,05).

4.2.3. USPOREDBA UTJECAJA DODATKA MEDA NA PORAST BROJA BAKTERIJA U FERMENTIRANOM MLIJEKU

Tablica 36 Modificirana ocjena prebiotičke aktivnosti bagremovog meda

mlijeko	probiotička bakterija	udio bagremovog meda	
		2,5%	5%
kravlje	*Lactobacillus casei* Lc01	1,087 ± 0,040	0,842 ± 0,012
	Bifidobacterium longum Bb46	1,105 ± 0,068	0,945 ± 0,004
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,077 ± 0,046	1,278 ± 0,006
kozje	*Lactobacillus casei* Lc01	1,468 ± 0,042	1,432 ± 0,023
	Bifidobacterium longum Bb46	1,179 ± 0,065	0,725 ± 0,094
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,027 ± 0,055	1,307 ± 0,012
sojino	*Lactobacillus casei* Lc01	2,288 ± 0,457	2,201 ± 0,445
	Bifidobacterium longum Bb46	1,150 ± 0,182	1,332 ± 0,268
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,177 ± 0,182	1,430 ± 0,037

Podaci predstavljaju srednju vrijednost (±SD) modificirane ocjene prebiotičke aktivnosti meda ($mPAS$) koja predstavlja utjecaj dodatka meda na povećanje broja bakterija na kraju fermentacije u mlijeku s dodatkom meda u odnosu na mlijeko bez dodatka meda izračunat kao omjer razlike broja bakterija na početku i na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom meda u odnosu na uzorke bez dodatka meda.

Tablica 37 Modificirana ocjena prebiotičke aktivnosti kestenovog meda

mlijeko	probiotička bakterija	udio kestenovog meda	
		2,5%	5%
kravlje	*Lactobacillus casei* Lc01	0,924 ± 0,037	0,933 ± 0,032
	Bifidobacterium longum Bb46	0,967 ± 0,063	0,644 ± 0,030
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,290 ± 0,068	0,762 ± 0,122
kozje	*Lactobacillus casei* Lc01	1,206 ± 0,059	1,141 ± 0,028
	Bifidobacterium longum Bb46	0,999 ± 0,065	0,883 ± 0,066
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,133 ± 0,070	0,916 ± 0,013
sojino	*Lactobacillus casei* Lc01	1,615 ± 0,310	1,461 ± 0,127
	Bifidobacterium longum Bb46	1,270 ± 0,174	1,047 ± 0,236
	Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb12	1,299 ± 0,015	1,397 ± 0,039

Podaci predstavljaju srednju vrijednost (±SD) modificirane mjere prebiotičkog djelovanja meda ($mPAS$) koja predstavlja utjecaj dodatka meda na povećanje broja bakterija na kraju fermentacije u mlijeku s dodatkom meda u odnosu na mlijeko bez dodatka meda izračunat kao omjer razlike broja bakterija na početku i na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom meda u odnosu na uzorke bez dodatka meda

4.3. REZULTATI ISPITIVANJA INHIBICIJSKOG DJELOVANJA FERMENTIRANOG MLIJEKA NA ODABRANE PATOGENE BAKTERIJE AGAR DIFUZIJSKIM TESTOM

4.3.1. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes*

4.3.1.1 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kravljim mlijekom

Tablica 38 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	c-Lc-0	c-Lc-A2,5	c-Lc-A5	c-Lc-C2,5	c-Lc-C5
0	±	±	±	±	±
15	±	±	+	++	+++
25	±	±	+	+++	+++
25_{CFS}	±	±	+	++	++

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba inhibicija (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 39 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	c-Bl-0	c-Bl-A2,5	c-Bl-A5	c-Bl-C2,5	c-Bl-C5
0	±	±	±	±	±
15	±	±	±	±	+++
25	±	±	+++	++	++
25_{CFS}	±	±	+++	+	++

Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 40 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

t (h)	c-Ba-0	c-Ba-A2,5	c-Ba-A5	c-Ba-C2,5	c-Ba-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	+	++	+++	++
25	+	++	++	+++	++
25_{CFS}	+	++	++	++	+

Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.3.1.2 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim kozjim mlijekom

Tablica 41 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	g-Lc-0	g-Lc-A2,5	g-Lc-A5	g-Lc-C2,5	g-Lc-C5
0	±	±	±	±	±
15	+	++	+	++	+++
25	++	+++	+++	+++	+++
25_{CFS}	±	±	±	±	±

Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 42 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	g-Bl-0	g-Bl-A2,5	g-Bl-A5	g-Bl-C2,5	g-Bl-C5
0	±	±	±	++	++
15	++	+++	++	++	+++
25	+	++	++	++	++
25_{CFS}	±	+	+	+	+

Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 43 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

t (h)	g-Ba-0	g-Ba-A2,5	g-Ba-A5	g-Ba-C2,5	g-Ba-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	++	+	++	+
25	+	++	++	++	++
25_{CFS}	–	–	–	–	–

Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.3.1.3 Inhibicija rasta test bakterije *Listeria monocytogenes* fermentiranim sojinim mlijekom

Tablica 44 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	s-Lc-0	s-Lc-A2,5	s-Lc-A5	s-Lc-C2,5	s-Lc-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	±	±	++	++
25	++	++	++	++	+++
25_{CFS}	±	±	±	±	++

Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 45 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	s-Bl-0	s-Bl-A2,5	s-Bl-A5	s-Bl-C2,5	s-Bl-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	++	++	++	+++
25	++	+	+	+	+++
25_{CFS}	±	±	±	±	±

Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 46 Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

t (h)	s-Ba-0	s-Ba-A2,5	s-Ba-A5	s-Ba-C2,5	s-Ba-C5
0	±	++	++	+	++
15	++	+	+	+	+
25	+	+	++	++	++
25_{CFS}	–	–	–	–	–

Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.3.2. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica*

4.3.2.1 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim kravljim mlijekom

Tablica 47 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	c-Lc-0	c-Lc-A2,5	c-Lc-A5	c-Lc-C2,5	c-Lc-C5
0	–	+++	+++	++	++
15	++	+++	+++++	++	+++++
25	++	+++	+++	++++	+++++
25_{CFS}	+	++	+++	+++	+++

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 48 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	c-Bl-0	c-Bl-A2,5	c-Bl-A5	c-Bl-C2,5	c-Bl-C5
0	±	±	±	±	±
15	±	++	++	+++	++++
25	±	++	+++	++	+++
25_{CFS}	±	++	++	++	++

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 49 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kravljim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

t (h)	c-Ba-0	c-Ba-A2,5	c-Ba-A5	c-Ba-C2,5	c-Ba-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	++	±	±	±
25	+	++	++	++	++
25_{CFS}	+	++	++	++	++

Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.3.2.2 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim kozjim mlijekom

Tablica 50 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	g-Lc-0	g-Lc-A2,5	g-Lc-A5	g-Lc-C2,5	g-Lc-C5
0	+	+++	+++++	++	+
15	++	++	+++++	++	+++++
25	±	+++++	+++++	++	+++++
25_{CFS}	+	+++++	+++++	++	++++

Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 51 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	g-Bl-0	g-Bl-A2,5	g-Bl-A5	g-Bl-C2,5	g-Bl-C5
0	±	±	++++	±	++++
15	±	++++	+++++	±	+++++
25	±	++	++	++	+++
25_{CFS}	±	+	+	+	+

Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 52 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* kozjim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

t (h)	g-Ba-0	g-Ba-A2,5	g-Ba-A5	g-Ba-C2,5	g-Ba-C5
0	±	±	±	±	±
15	++	++	++	++	+++
25	+	++	++	++	++
25_{CFS}	–	++	++	+	++

Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.3.2.3 Inhibicija rasta test bakterije *Yersinia enterocolitica* fermentiranim sojinim mlijekom

Tablica 53 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda

t (h)	s-Lc-0	s-Lc-A2,5	s-Lc-A5	s-Lc-C2,5	s-Lc-C5
0	–	+++	+++++	±	+++++
15	±	+++	+++++	++++	++++
25	+	++	+++++	++	+++
25_{CFS}	–	++	+++++	++	++

Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 54 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

t (h)	s-Bl-0	s-Bl-A2,5	s-Bl-A5	s-Bl-C2,5	s-Bl-C5
0	–	–	±	±	±
15	±	+++	+++	±	+++
25	±	±	++	++	++
25_{CFS}	–	–	–	–	–

Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

Tablica 55 Inhibicija rasta bakterije *Yersinia enterocolitica* sojinim mlijekom fermentiranim probiotičkom kulturom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

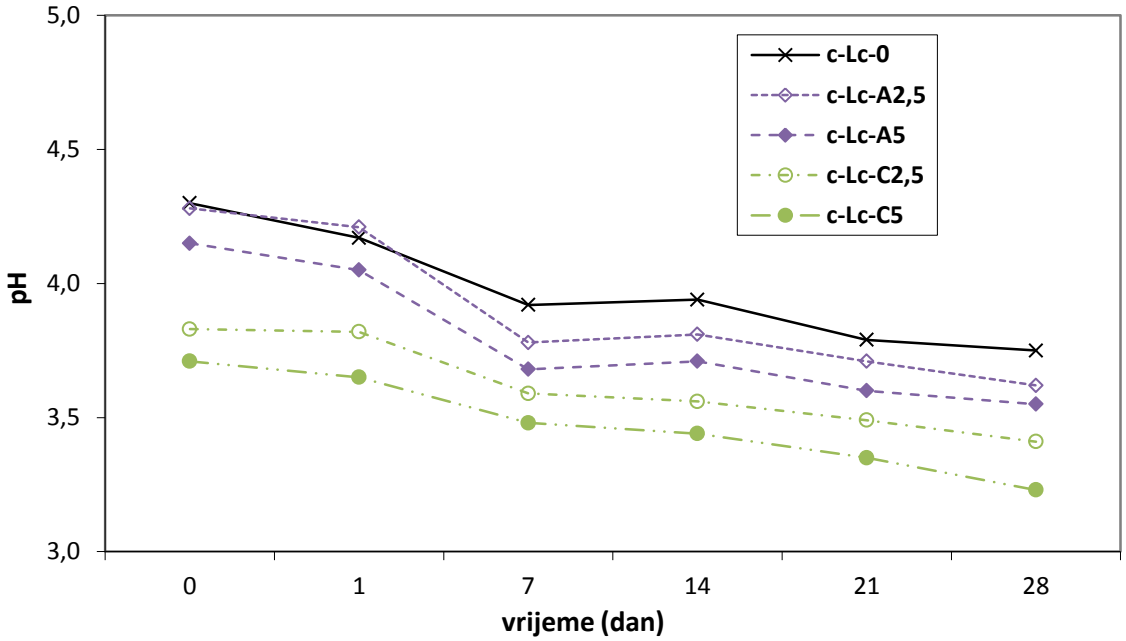
t (h)	s-Ba-0	s-Ba-A2,5	s-Ba-A5	s-Ba-C2,5	s-Ba-C5
0	++	++	±	±	±
15	++	++	±	±	++
25	+	+	+	++	++
25_{CFS}	–	+	+	+	+

Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda, CFS – supernatant bez stanica. Podaci: – nema inhibicije; ± djelomična inhibicija; + vrlo slaba (teško mjerljiva zona inhibicije); ++ slaba inhibicija (< 15 mm); +++ srednja inhibicija (15-20 mm); ++++ snažna inhibicija (20-25 mm); +++++ vrlo snažna inhibicija (> 25 mm).

4.4. REZULTATI ISPITIVANJA FIZIKALNO-KEMIJSKIH I MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

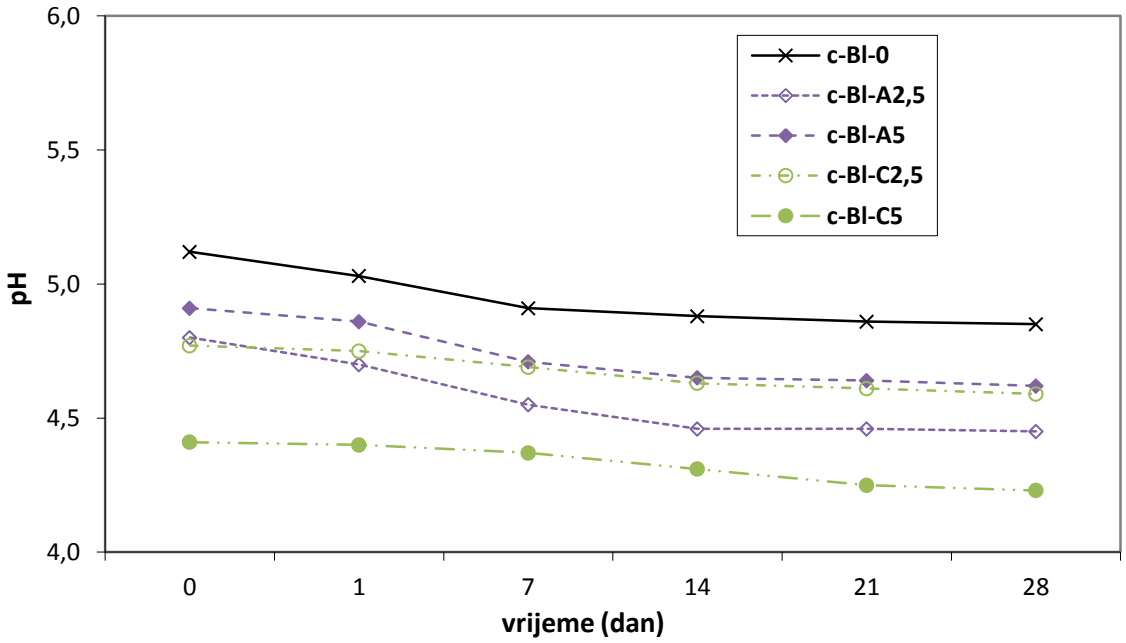
4.4.1. PRAĆENJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

4.4.1.1 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja kravljeg mlijeka



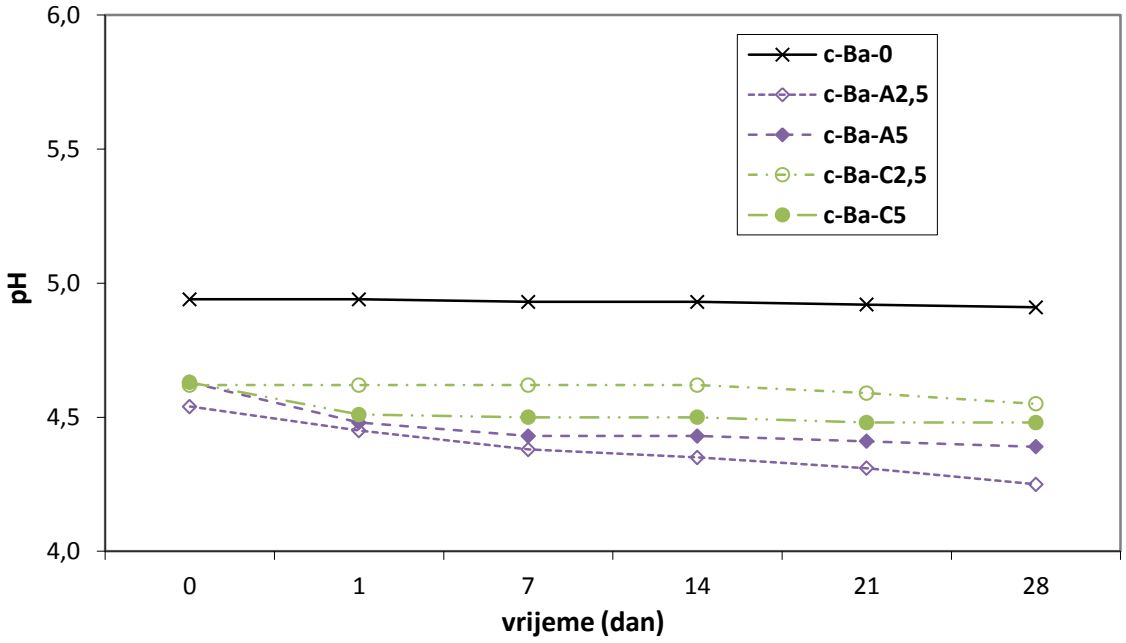
Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 54 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda



Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

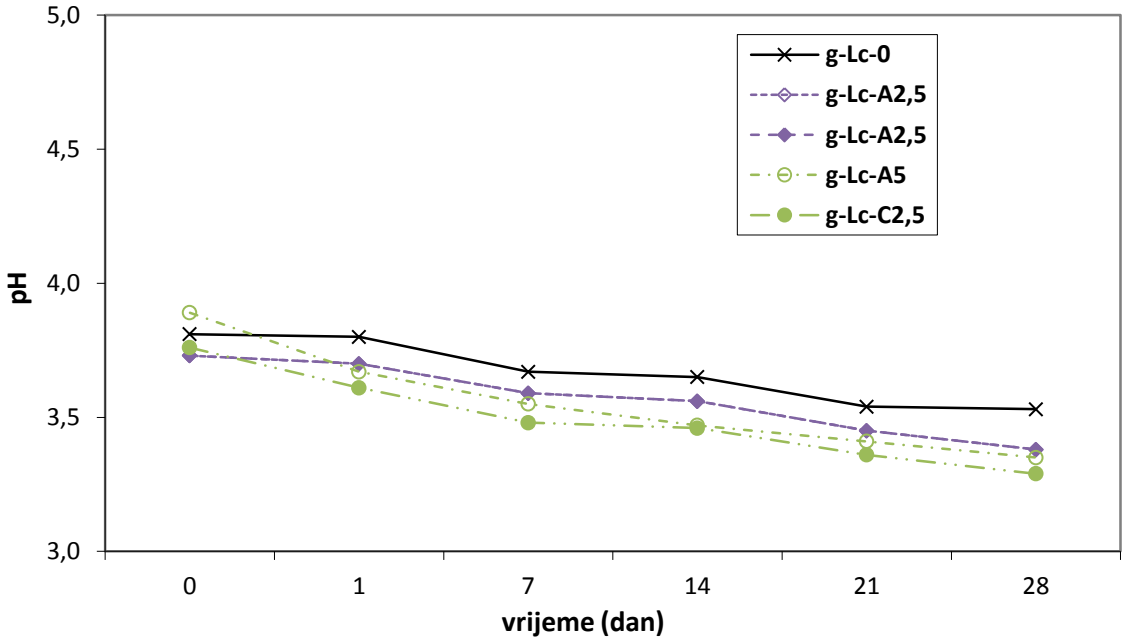
Slika 55 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda



Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

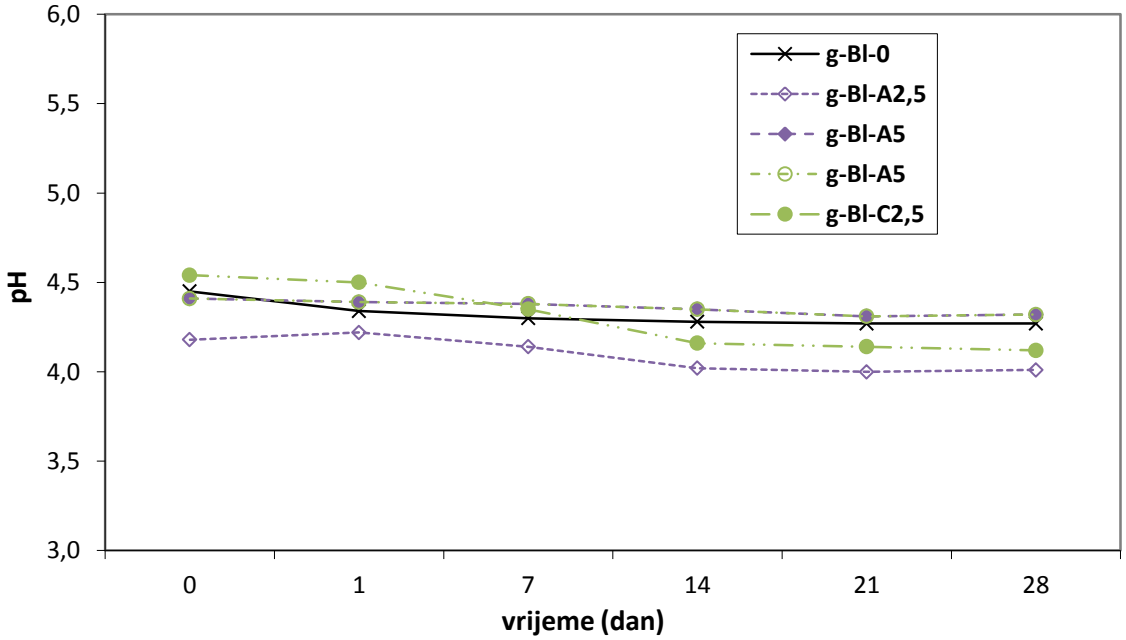
Slika 56 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

4.4.1.2 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja kozjeg mlijeka



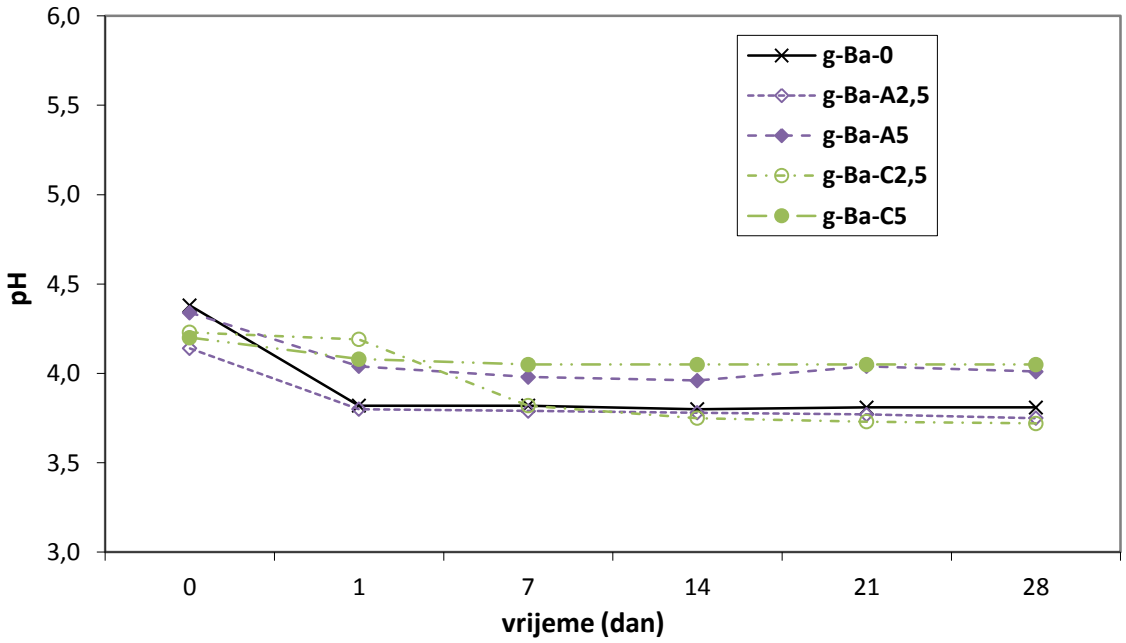
Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 57 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda



Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

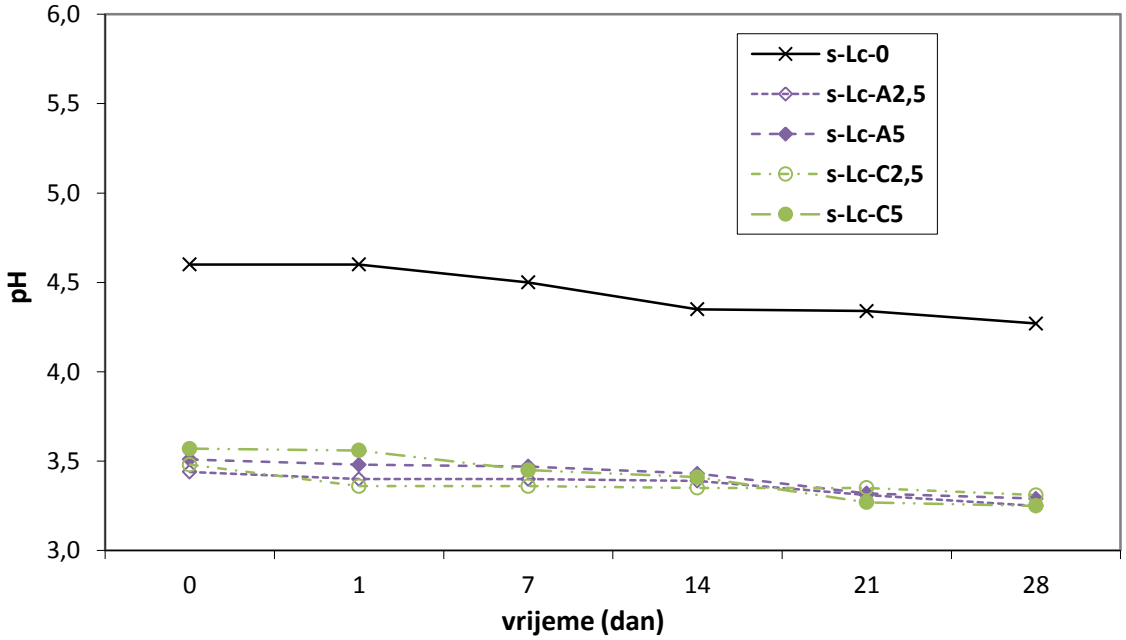
Slika 58 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda



Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

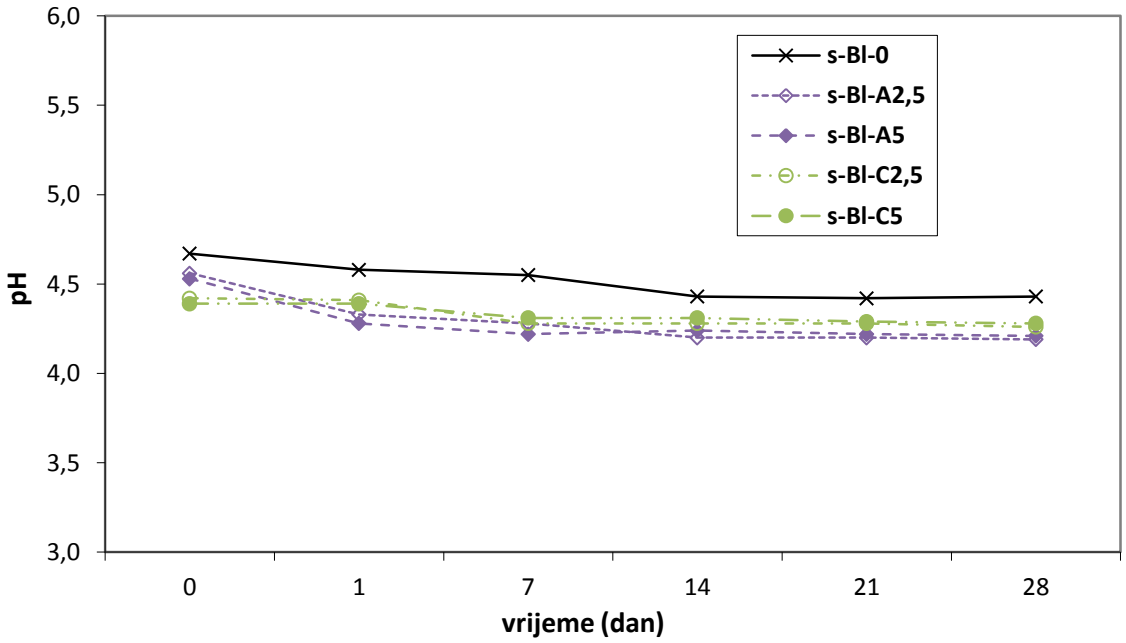
Slika 59 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja kozjeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

4.4.1.3 Promjena pH vrijednosti i naknadno zakiseljavanje tijekom skladištenja sojinog mlijeka



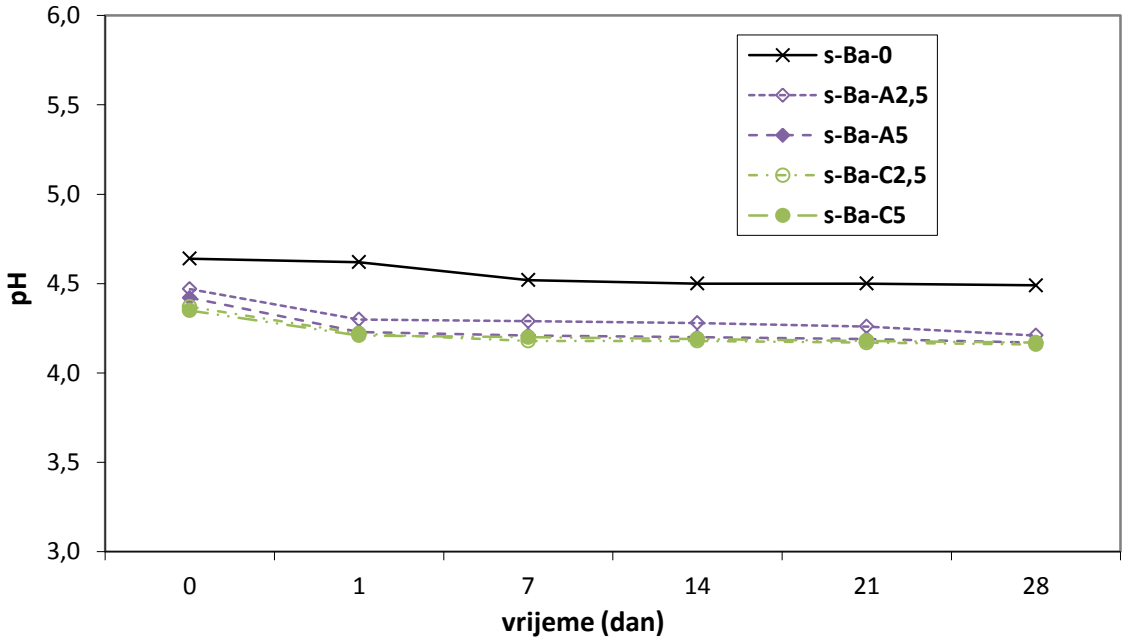
Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 60 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* Lc01 s dodatkom meda



Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 61 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb46 s dodatkom meda

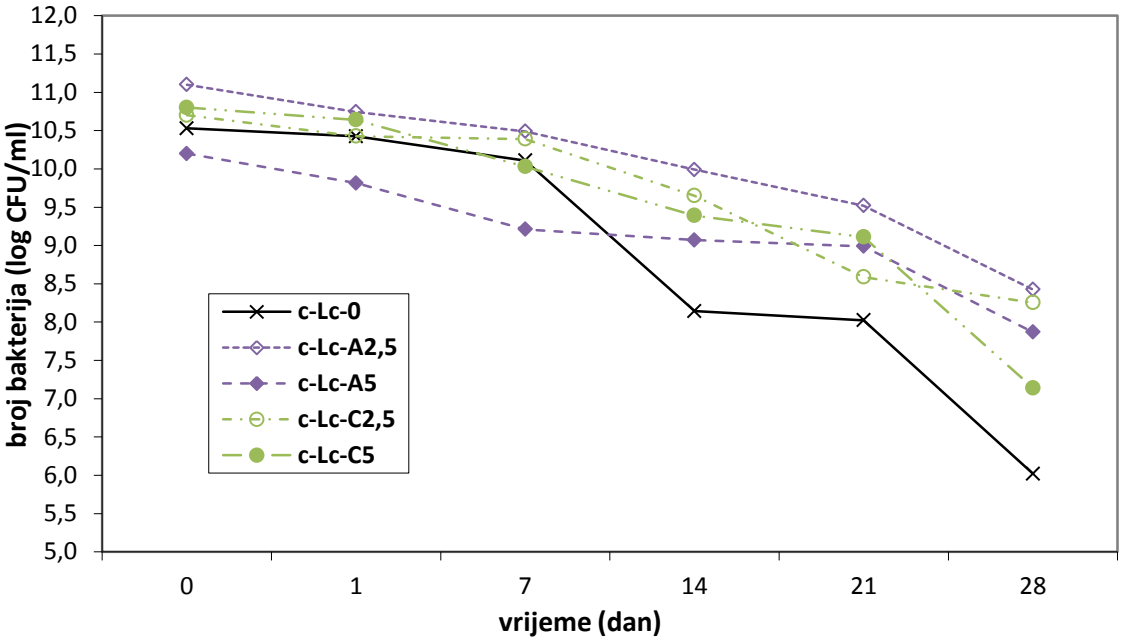


Legenda: s-Ba - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 62 Promjena pH vrijednosti tijekom skladištenja sojinog mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 s dodatkom meda

4.4.2. PRAĆENJE MIKROBIOLOŠKIH PARAMETARA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

4.4.2.1 Promjena broja bakterija tijekom skladištenja kravljeg mlijeka



Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 63 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja fermentiranog kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 56 Preživljavanje bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja u fermentiranom kravljem mlijeku s dodatkom meda

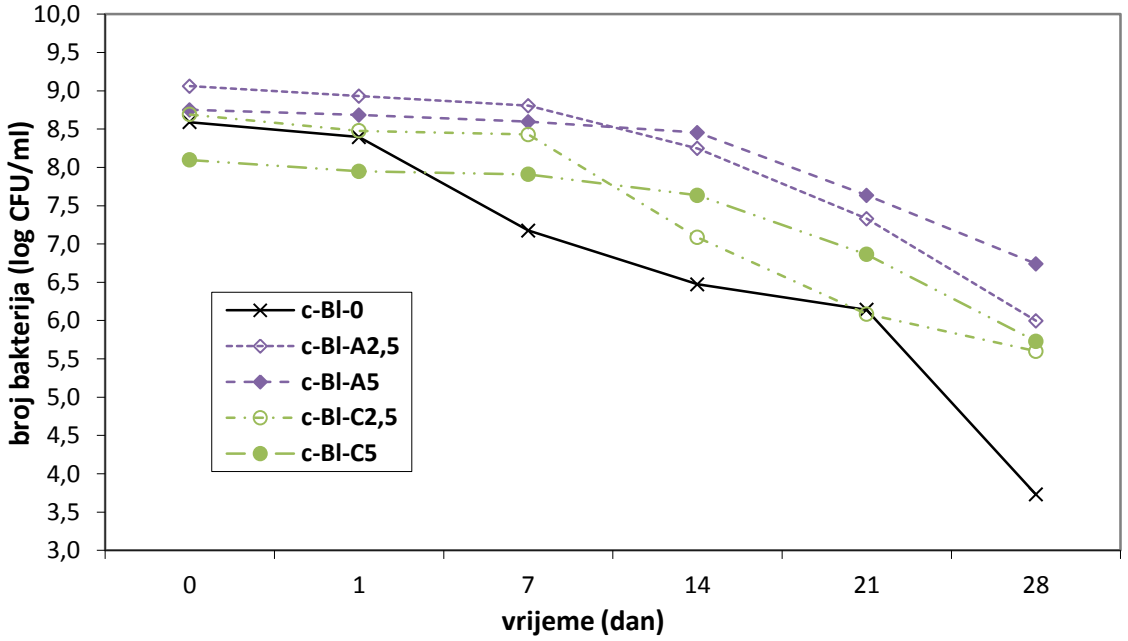
t (dan)	c-Lc-0	c-Lc-A2,5	c-Lc-A5	c-Lc-C2,5	c-Lc-C5
1	99,03 ± 1,49	96,78 ± 1,05	96,21 ± 1,36	97,44 ± 0,98	98,51 ± 0,77
7	95,99 ± 0,39	94,50 ± 0,44	90,25 ± 2,88	97,08 ± 1,36	92,84 ± 2,19
14	77,34 ± 0,03	88,10 ± 3,45	88,91 ± 0,56	90,19 ± 0,40	86,94 ± 0,56
21	76,14 ± 3,39	85,75 ± 1,62	88,14 ± 0,41	80,24 ± 2,65	84,35 ± 0,04
28	57,13 ± 2,38	75,87 ± 2,26	77,14 ± 0,93	77,09 ± 3,54	66,10 ± 0,91

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 57 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Lactobacillus casei* Lc01 u probiotičkom proizvodu od kravljeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	c-Lc-0	c-Lc-A2,5	c-Lc-A5	c-Lc-C2,5	c-Lc-C5
10^8	21,08 ± 0,29	+	27,57 ± 0,34	+	25,43 ± 0,31
10^6	27,76 ± 0,27	+	+	+	+

Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 64 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja fermentiranog kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 58 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja u fermentiranom kravljem mlijeku s dodatkom meda

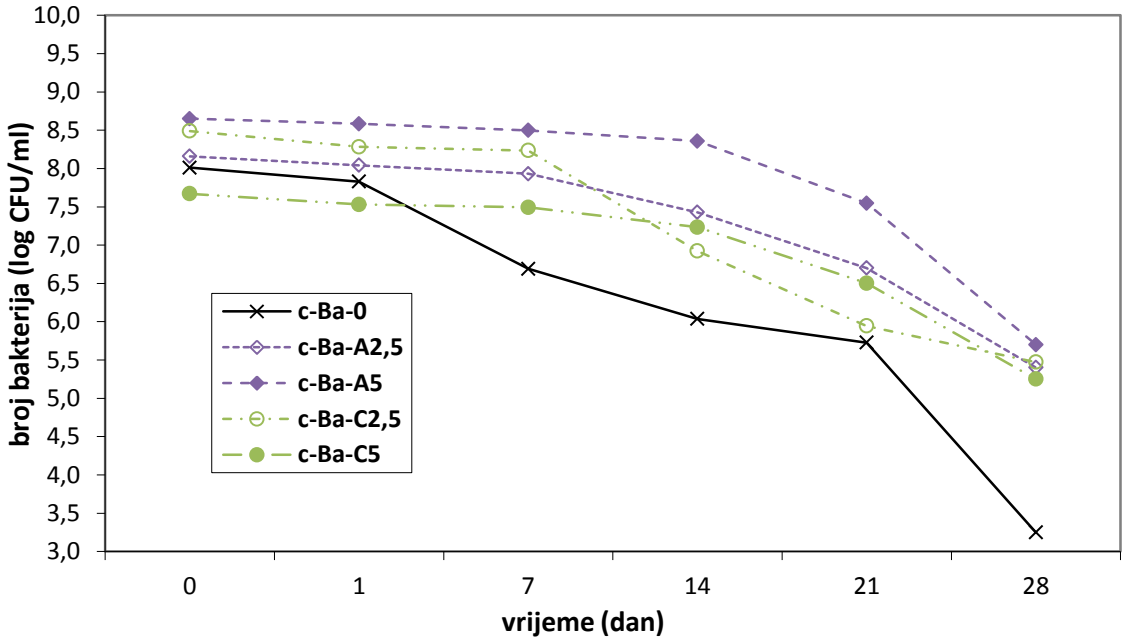
t (dan)	c-Bl-0	c-Bl-A2,5	c-Bl-A5	c-Bl-C2,5	c-Bl-C5
1	97,78 ± 1,79	98,54 ± 1,25	99,21 ± 1,51	97,53 ± 1,20	98,15 ± 1,04
7	83,51 ± 0,89	97,20 ± 0,60	98,18 ± 3,14	96,97 ± 1,67	97,63 ± 2,79
14	75,36 ± 0,10	87,00 ± 7,14	96,60 ± 0,44	81,54 ± 0,33	94,29 ± 0,53
21	71,41 ± 4,31	80,87 ± 2,10	87,27 ± 0,45	69,97 ± 3,46	84,77 ± 0,06
28	43,35 ± 3,36	66,15 ± 2,99	77,01 ± 1,09	64,39 ± 4,61	70,75 ± 1,08

Legenda: c-Bl - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 59 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium longum* Bb46 u probiotičkom proizvodu od kravljeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	c-Bl-0	c-Bl-A2,5	c-Bl-A5	c-Bl-C2,5	c-Bl-C5
10^8	3,14 ± 1,67	15,96 ± 2,87	19,02 ± 4,21	10,19 ± 1,01	1,62 ± 6,59
10^6	21,77 ± 4,17	27,74 ± 0,25	+	23,28 ± 4,24	26,42 ± 0,70

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 65 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja fermentiranog kravljeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 60 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja u fermentiranom kravljem mlijeku s dodatkom meda

t (dan)	c-Ba-0	c-Ba-A2,5	c-Ba-A5	c-Ba-C2,5	c-Ba-C5
1	96,61 ± 0,92	97,24 ± 2,39	99,27 ± 3,53	96,26 ± 0,23	96,75 ± 2,10
7	82,48 ± 1,95	96,18 ± 3,66	98,26 ± 2,17	97,00 ± 2,71	96,45 ± 1,94
14	74,67 ± 2,11	87,34 ± 1,57	95,51 ± 1,44	82,14 ± 1,34	95,38 ± 3,56
21	72,38 ± 0,62	82,07 ± 5,30	85,61 ± 2,46	70,17 ± 5,55	83,51 ± 6,06
28	40,48 ± 4,71	63,14 ± 2,32	65,87 ± 1,41	63,78 ± 2,72	68,42 ± 1,21

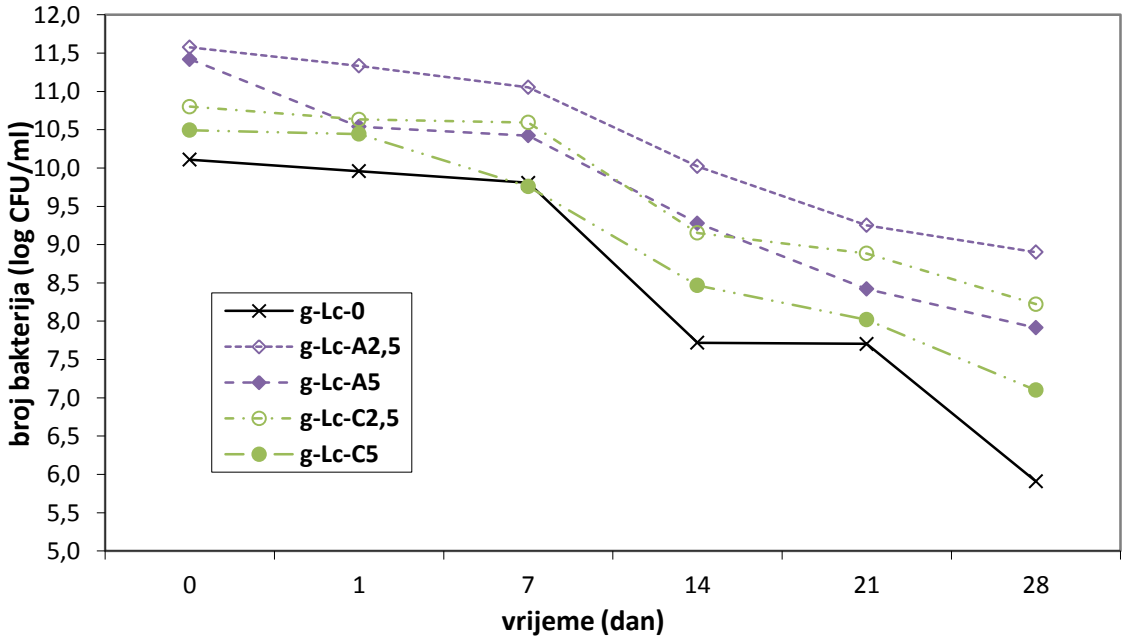
Legenda: c-Ba - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 61 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u probiotičkom proizvodu od kravljeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	c-Ba-0	c-Ba-A2,5	c-Ba-A5	c-Ba-C2,5	c-Ba-C5
10^8	0,07 ± 0,95	1,83 ± 3,56	16,43 ± 4,63	8,73 ± 1,20	–
10^6	14,41 ± 3,91	25,80 ± 1,41	27,09 ± 1,98	21,88 ± 3,82	24,64 ± 1,35

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

4.4.2.2 Praćenje mikrobioloških parametara tijekom skladištenja kozjeg mlijeka



Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 66 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja fermentiranog kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 62 Preživljavanje bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja u fermentiranom kozjem mlijeku s dodatkom meda

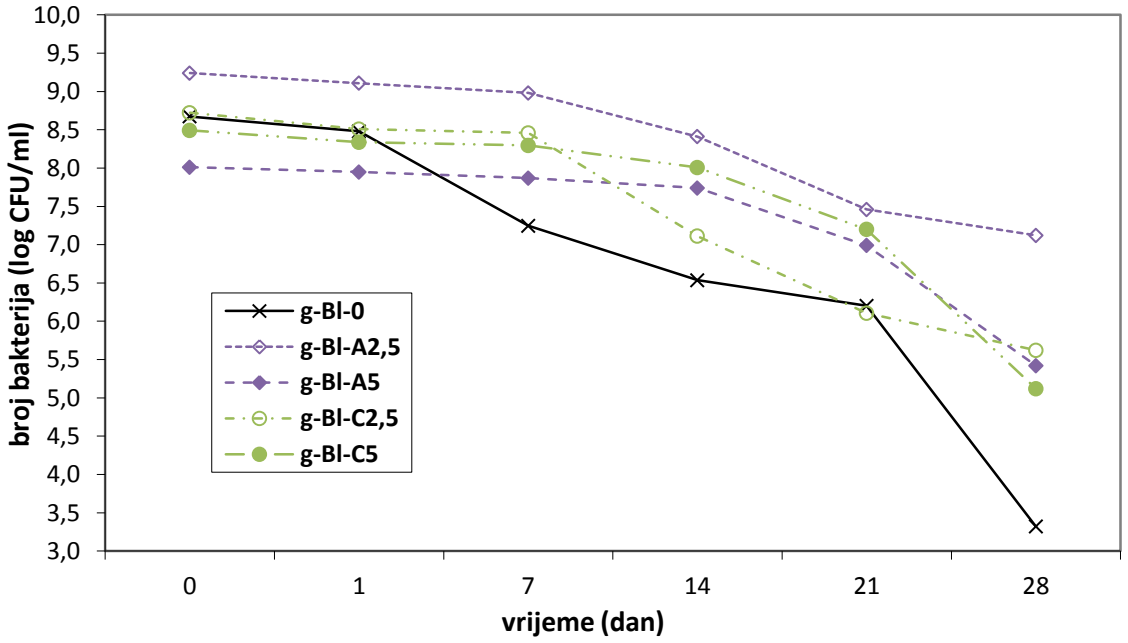
t (dan)	g-Lc-0	g-Lc-A2,5	g-Lc-A5	g-Lc-C2,5	g-Lc-C5
1	98,53 ± 1,54	97,89 ± 0,99	92,28 ± 1,30	98,44 ± 0,95	99,51 ± 0,77
7	96,99 ± 0,38	95,50 ± 0,44	91,24 ± 2,55	98,08 ± 1,33	92,97 ± 2,25
14	76,34 ± 0,06	83,87 ± 4,88	81,26 ± 0,77	84,74 ± 0,32	80,69 ± 0,71
21	76,13 ± 3,53	79,91 ± 1,66	73,74 ± 0,02	82,24 ± 2,59	76,43 ± 0,43
28	58,41 ± 2,44	76,87 ± 2,15	69,32 ± 1,00	76,09 ± 3,52	67,65 ± 1,11

Legenda: g-Lc - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 63 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Lactobacillus casei* Lc01 u probiotičkom proizvodu od kozjeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	g-Lc-0	g-Lc-A2,5	g-Lc-A5	g-Lc-C2,5	g-Lc-C5
10^8	13,58 ± 3,77^{c}	+	27,86 ± 3,24^{bc}	+	21,21 ± 1,68^{c}
10^6	27,25 ± 3,61^{bc}	+	+	+	+

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 67 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja fermentiranog kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 64 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja u fermentiranom kozjem mlijeku s dodatkom meda

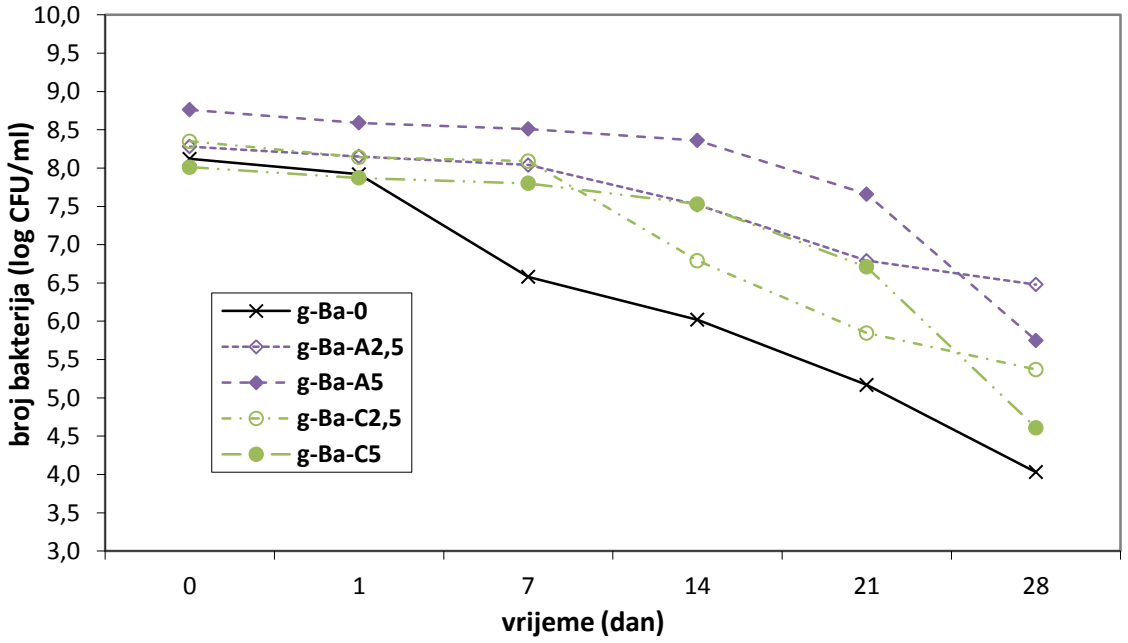
t (dan)	g-Bl-0	g-Bl-A2,5	g-Bl-A5	g-Bl-C2,5	g-Bl-C5
1	96,52 ± 0,77	97,91 ± 3,22	98,91 ± 2,65	96,62 ± 2,19	98,15 ± 0,99
7	82,92 ± 1,88	96,72 ± 1,59	97,97 ± 2,43	95,27 ± 3,06	97,13 ± 2,54
14	74,76 ± 5,10	86,96 ± 6,63	95,52 ± 3,48	80,14 ± 1,13	93,19 ± 3,11
21	70,87 ± 3,27	81,13 ± 1,31	86,24 ± 1,49	68,18 ± 2,41	83,26 ± 1,25
28	38,20 ± 2,77	77,02 ± 3,93	67,64 ± 1,22	63,29 ± 3,45	60,27 ± 1,70

Legenda: g-Bl - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 65 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium longum* Bb46 u probiotičkom proizvodu od kozjeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	g-Bl-0	g-Bl-A2,5	g-Bl-A5	g-Bl-C2,5	g-Bl-C5
10^8	3,61 ± 1,76	16,50 ± 2,70	1,87 ± 8,09	6,42 ± 0,99	9,95 ± 4,92
10^6	20,38 ± 4,20	24,65 ± 0,44	+	24,49 ± 4,31	+

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 68 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja fermentiranog kozjeg mlijeka s dodatkom meda

Tablica 66 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja u fermentiranom kozjem mlijeku s dodatkom meda

t (dan)	g-Ba-0	g-Ba-A2,5	g-Ba-A5	g-Ba-C2,5	g-Ba-C5
1	97,58 ± 1,89	98,41 ± 1,37	98,03 ± 1,54	97,47 ± 1,25	98,23 ± 1,05
7	81,01 ± 1,02	97,11 ± 0,65	97,09 ± 3,16	96,86 ± 1,74	97,32 ± 2,82
14	74,13 ± 0,15	87,18 ± 6,50	95,43 ± 0,47	81,32 ± 0,34	94,00 ± 0,55
21	63,56 ± 4,83	81,97 ± 2,27	87,45 ± 0,46	69,97 ± 3,61	83,77 ± 0,03
28	49,55 ± 3,34	78,21 ± 2,97	65,61 ± 1,40	64,25 ± 4,80	57,52 ± 1,47

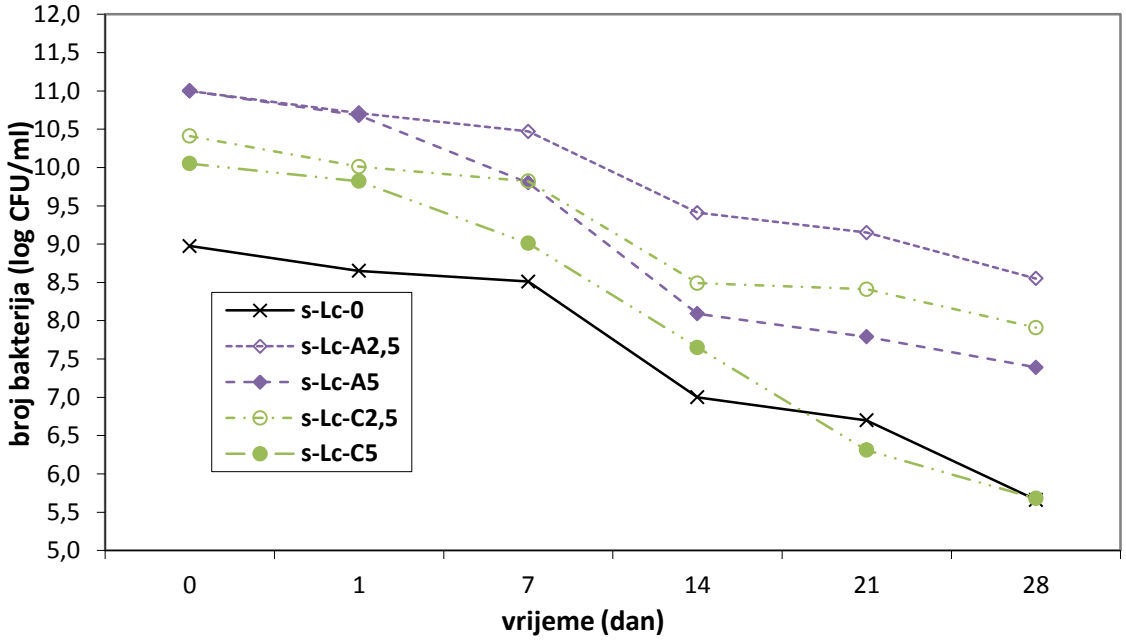
Legenda: g-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 67 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u probiotičkom proizvodu od kozjeg mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	g-Ba-0	g-Ba-A2,5	g-Ba-A5	g-Ba-C2,5	g-Ba-C5
10^8	0,62 ± 1,11	6,70 ± 3,49	17,18 ± 4,17	6,70 ± 1,38	0,77 ± 7,02
10^6	14,25 ± 3,97	+	27,41 ± 2,08	20,86 ± 3,52	21,94 ± 0,79

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

4.4.2.3 Promjena broja bakterija tijekom skladištenja sojinog mlijeka



Slika 69 Promjena broja bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja fermentiranog sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 68 Preživljavanje bakterije *Lactobacillus casei* Lc01 tijekom skladištenja u fermentiranom sojinom mlijeku s dodatkom meda

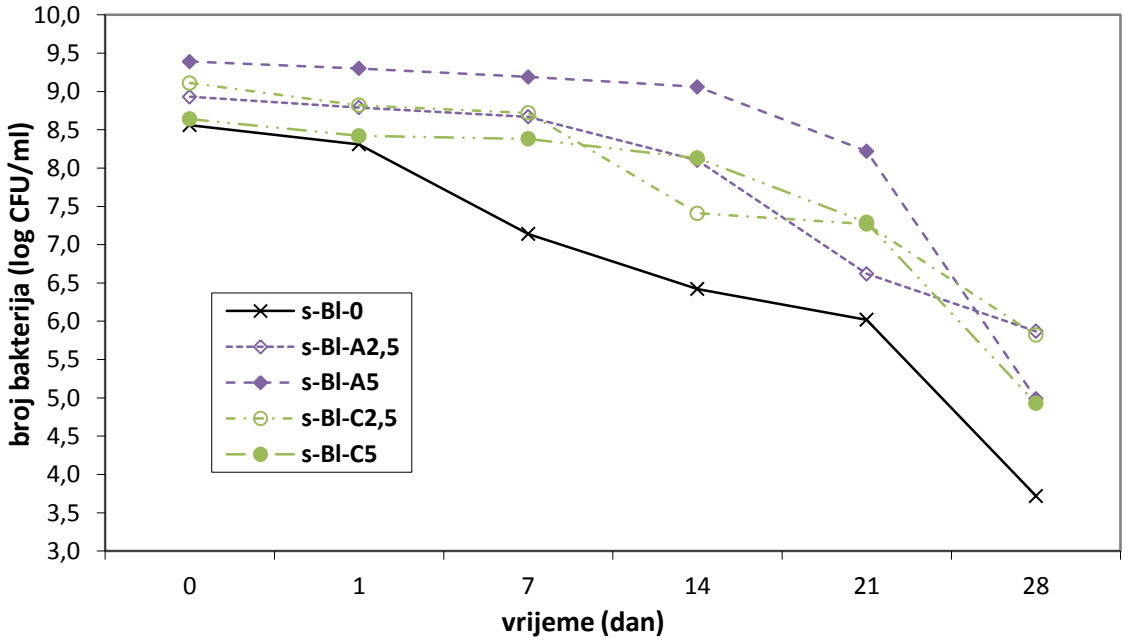
t (dan)	s-Lc-0	s-Lc-A2,5	s-Lc-A5	s-Lc-C2,5	s-Lc-C5
1	96,41 ± 2,67	97,35 ± 2,05	97,07 ± 2,25	96,15 ± 3,02	97,70 ± 1,85
7	94,81 ± 1,50	95,19 ± 3,45	89,05 ± 1,69	94,32 ± 2,44	89,61 ± 1,43
14	77,99 ± 3,02	84,28 ± 1,44	73,53 ± 1,85	81,56 ± 1,28	76,11 ± 2,85
21	74,57 ± 0,03	83,16 ± 0,69	70,82 ± 2,00	80,76 ± 0,72	62,78 ± 2,45
28	63,01 ± 1,60	77,70 ± 3,24	67,17 ± 2,08	75,94 ± 1,66	56,50 ± 3,19

Legenda: s-Lc - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 69 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Lactobacillus casei* Lc01 u probiotičkom proizvodu od sojinog mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	s-Lc-0	s-Lc-A2,5	s-Lc-A5	s-Lc-C2,5	s-Lc-C5
10^8	9,64 ± 2,51	+	15,73 ± 2,83	26,77 ± 5,88	13,06 ± 1,92
10^6	26,35 ± 3,43	+	+	+	24,86 ± 1,48

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 70 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja fermentiranog sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 70 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium longum* Bb46 tijekom skladištenja u fermentiranom sojinom mlijeku s dodatkom meda

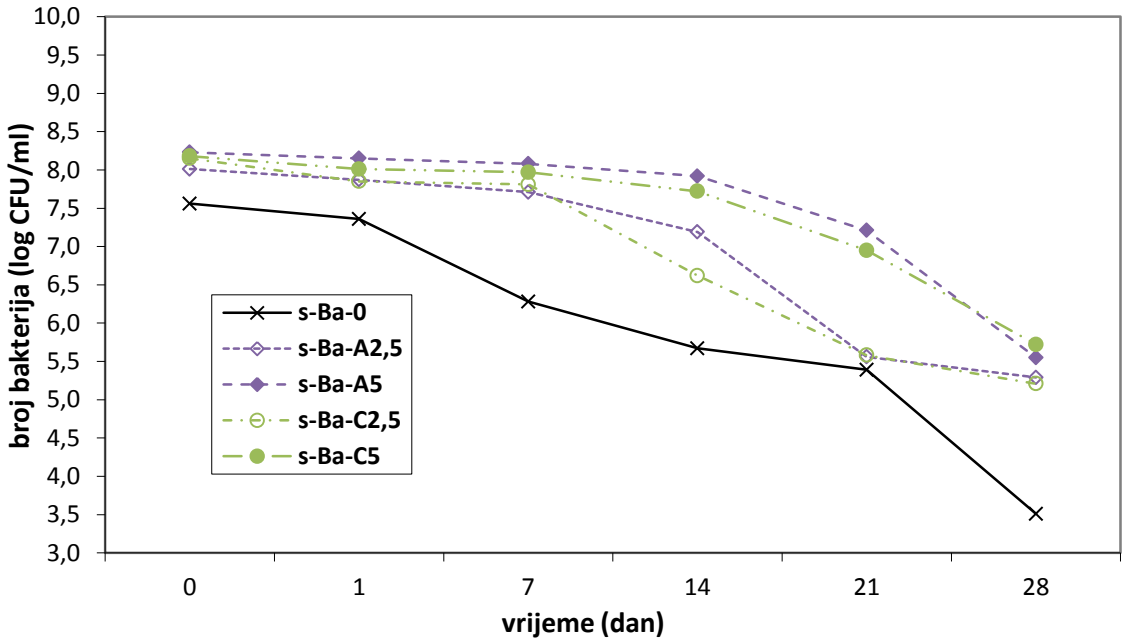
t (dan)	s-Bl-0	s-Bl-A2,5	s-Bl-A5	s-Bl-C2,5	s-Bl-C5
1	97,12 ± 1,78	98,41 ± 1,27	99,02 ± 1,41	96,80 ± 1,16	97,44 ± 0,99
7	83,39 ± 0,89	97,10 ± 0,60	97,82 ± 2,93	95,70 ± 1,62	96,94 ± 2,63
14	75,00 ± 0,12	84,47 ± 3,98	96,48 ± 0,41	81,34 ± 0,31	94,09 ± 0,50
21	70,23 ± 4,36	74,10 ± 2,29	87,55 ± 0,43	79,76 ± 3,12	84,38 ± 0,05
28	43,38 ± 3,37	65,69 ± 3,05	53,11 ± 1,62	63,83 ± 4,41	57,04 ± 1,38

Legenda: s-Bl - sojino mlijeko fermentirano bakterijom *B. longum* Bb46, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 71 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium longum* Bb46 u probiotičkom proizvodu od sojinog mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	s-Bl-0	s-Bl-A2,5	s-Bl-A5	s-Bl-C2,5	s-Bl-C5
10^8	2,48 ± 0,29^b	14,15 ± 0,21^a	22,57 ± 0,34^c	9,78 ± 0,21^{ab}	15,43 ± 0,31^c
10^6	21,76 ± 0,27^b	27,36 ± 0,21^a	27,93 ± 0,34^c	27,00 ± 0,21^{ab}	26,79 ± 0,31^b

Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.



Legenda: c-Lc - kravlje mlijeko fermentirano bakterijom *L. casei* Lc01, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti tri ponavljanja.

Slika 71 Promjena broja bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja fermentiranog sojinog mlijeka s dodatkom meda

Tablica 72 Preživljavanje bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom skladištenja u fermentiranom sojinom mlijeku s dodatkom meda

t (dan)	s-Ba-0	s-Ba-A2,5	s-Ba-A5	s-Ba-C2,5	s-Ba-C5
1	97,40 ± 2,02	98,23 ± 1,42	99,00 ± 1,61	96,30 ± 1,30	97,90 ± 1,04
7	83,04 ± 1,03	96,27 ± 0,65	98,11 ± 3,34	95,80 ± 1,81	97,38 ± 2,76
14	75,00 ± 0,13	82,15 ± 3,41	96,22 ± 0,47	81,23 ± 0,34	94,37 ± 0,53
21	71,18 ± 4,91	69,37 ± 2,68	87,62 ± 0,49	68,41 ± 3,73	84,96 ± 0,07
28	46,34 ± 3,71	65,98 ± 3,39	67,41 ± 1,44	63,86 ± 4,93	69,91 ± 1,09

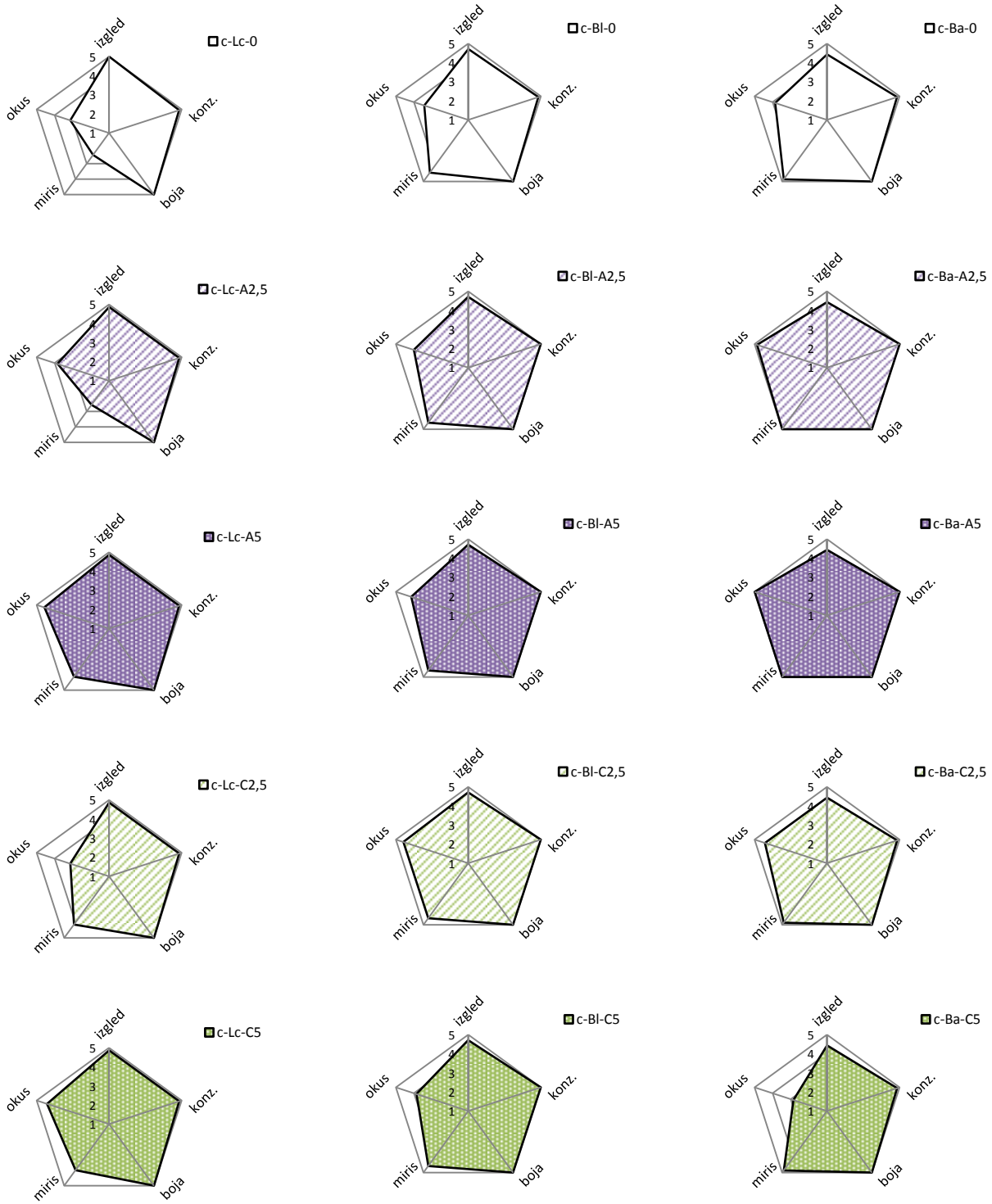
Legenda: s-Ba - kozje mlijeko fermentirano bakterijom *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Preživljavanje je izraženo kao % preživljavanja = 100 × (log CFU nakon n tjedana / log CFU nakon fermentacije). Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

Tablica 73 Vrijeme zadržavanja terapijskog broja stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u probiotičkom proizvodu od sojinog mlijeka s dodatkom meda

CFU/ml	s-Ba-0	s-Ba-A2,5	s-Ba-A5	s-Ba-C2,5	s-Ba-C5
10^8	–	$0,15 \pm 0,21^{a}$	$8,77 \pm 0,34^{c}$	$0,08 \pm 0,21^{ab}$	$1,43 \pm 0,31^{c}$
10^6	$9,76 \pm 0,27^{b}$	$18,36 \pm 0,21^{a}$	$26,93 \pm 0,34^{c}$	$17,00 \pm 0,21^{ab}$	$26,79 \pm 0,31^{b}$

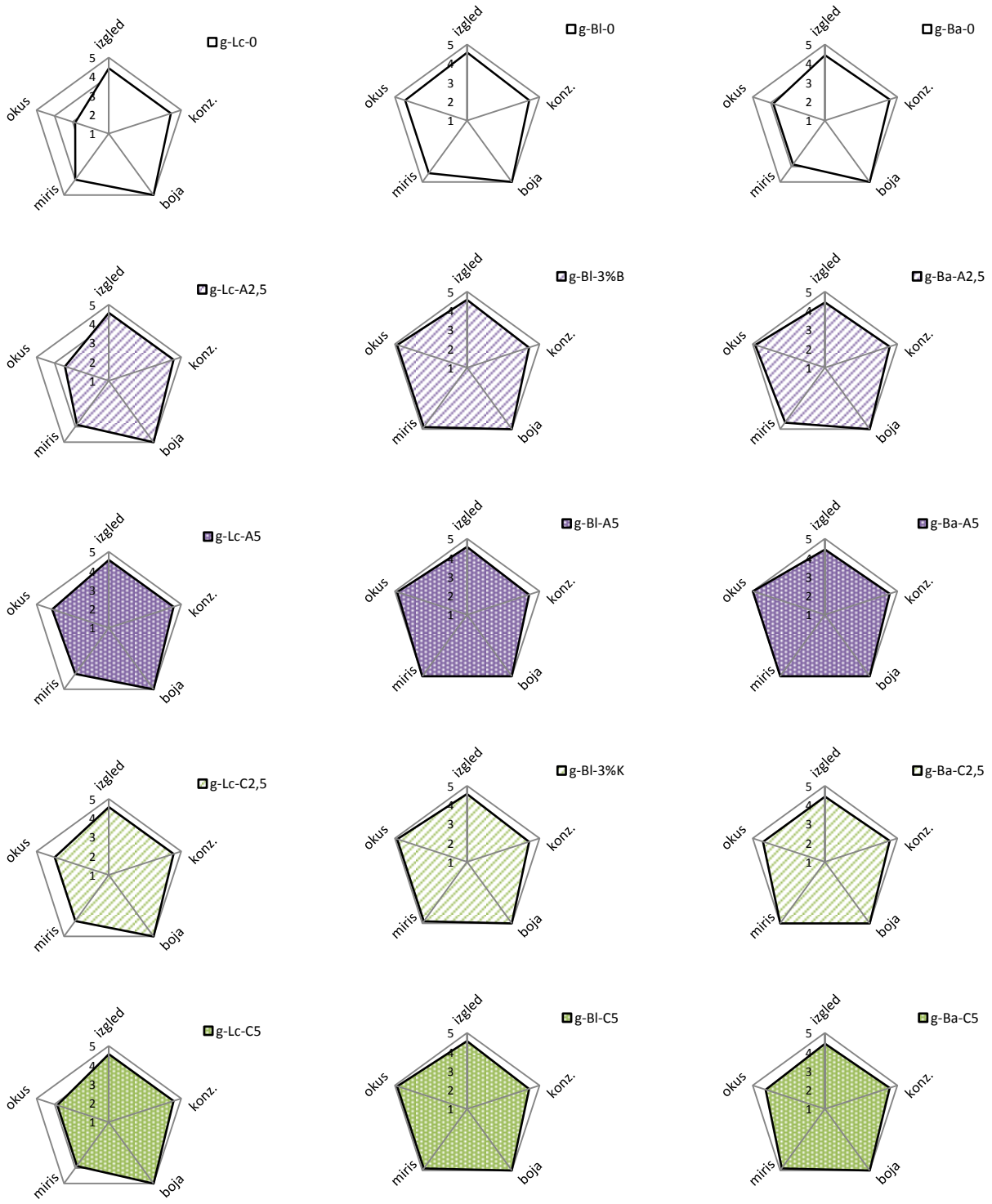
Podaci predstavljaju vrijeme (dan) u kojem proizvod još uvijek sadrži 10^8, odnosno 10^6 stanica/ml. + broj stanica se tijekom skladištenja nije spustio ispod navedenih vrijednosti; – broj stanica u proizvodu nije dostigao navedenu vrijednost. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) tri ponavljanja.

4.5. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE



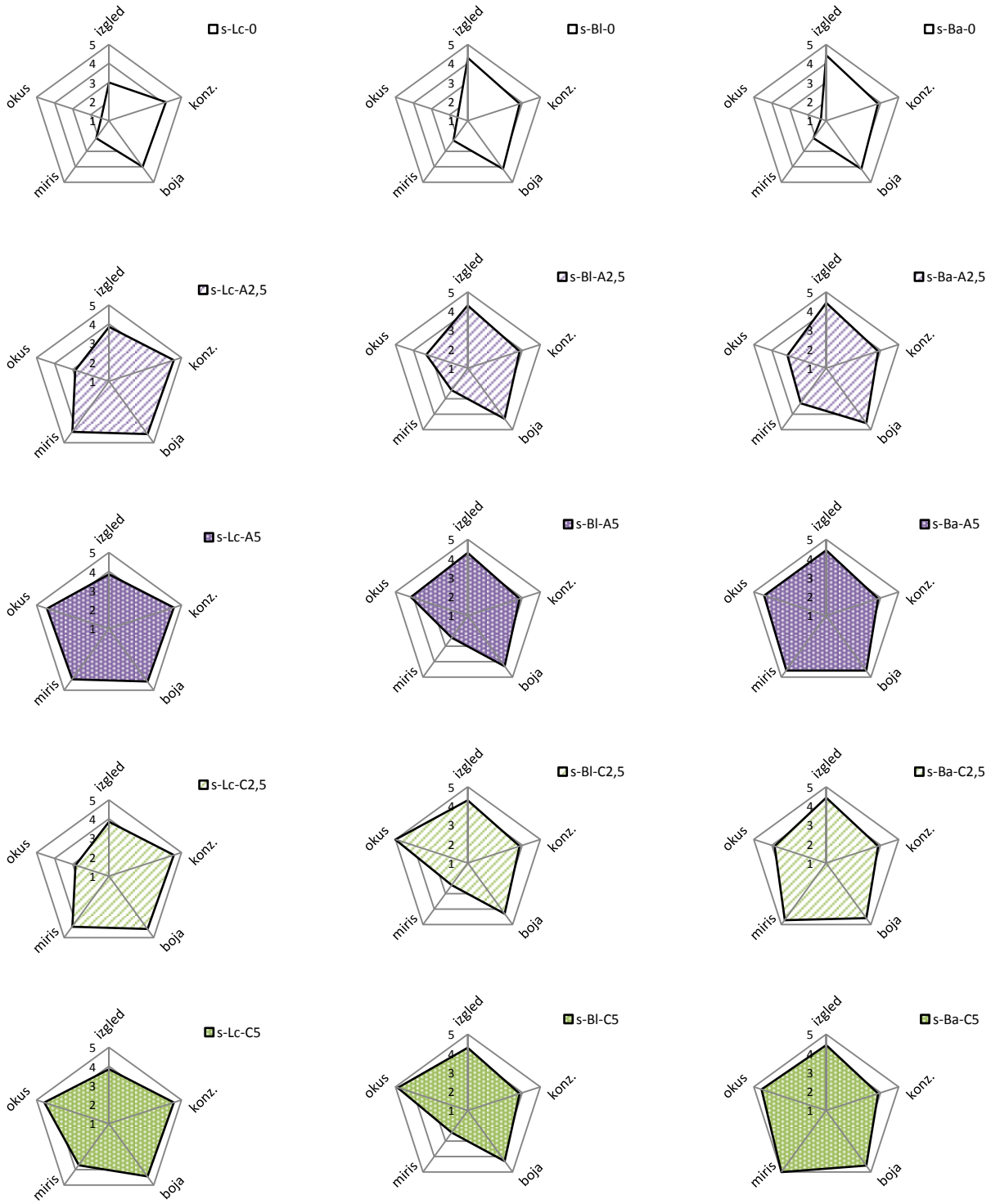
Legenda: c – kravlje mlijeko fermentirano bakterijom: Lc - *L. casei* Lc01, Bl - *B. longum* Bb46, Ba – *B. lactis* Bb12b, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti ocjena 5 panelista u 3 ponavljanja 24 sata nakon proizvodnje.

Slika 72 Ocjena senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda od kravljeg mlijeka



Legenda: g – kozje mlijeko fermentirano bakterijom: Lc - *L. casei* Lc01, Bl - *B. longum* Bb46, Ba – *B. lactis* Bb12b, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti ocjena 5 panelista u 3 ponavljanja 24 sata nakon proizvodnje.

Slika 73 Ocjena senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda od kozjeg mlijeka



Legenda: s – sojino mlijeko fermentirano bakterijom: Lc - *L. casei* Lc01, Bl - *B. longum* Bb46, Ba – *B. lactis* Bb12b, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti ocjena 5 panelista u 3 ponavljanja 24 sata nakon proizvodnje.

Slika 74 Ocjena senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda od sojinog mlijeka

Tablica 74 Senzorska procjena probiotičkih fermentiranih mlijeka

uzorak	bodovi	uzorak	bodovi	uzorak	bodovi
c-Lc-0	15,1 ± 0,2^{III}	c-Bl-0	16,4 ± 0,4^{II}	c-Ba-0	17,4 ± 0,3^{II}
c-Lc-A2,5	16,6 ± 0,2^{II}	c-Bl-A2,5	17,8 ± 0,2^{I}	c-Ba-A2,5	19,6 ± 0,1^{I}
c-Lc-A5	18,6 ± 0,3^{I}	c-Bl-A5	18,1 ± 0,1^{I}	c-Ba-A5	19,9 ± 0,1^{I}
c-Lc-C2,5	15,7 ± 0,2^{II}	c-Bl-C2,5	18,9 ± 0,2^{I}	c-Ba-C2,5	18,5 ± 0,2^{I}
c-Lc-C5	18,3 ± 0,1^{I}	c-Bl-C5	17,5 ± 0,2^{II}	c-Ba-C5	15,4 ± 0,1^{II}
uzorak	bodovi	uzorak	bodovi	uzorak	bodovi
g-Lc-0	14,5 ± 0,6^{III}	g-Bl-0	17,9 ± 0,3^{I}	g-Ba-0	16,6 ± 0,5^{II}
g-Lc-A2,5	15,8 ± 0,1^{II}	g-Bl-A2,5	18,9 ± 0,2^{I}	g-Ba-A2,5	18,9 ± 0,1^{I}
g-Lc-A5	17,3 ± 0,1^{II}	g-Bl-A5	19,0 ± 0,1^{I}	g-Ba-A5	19,4 ± 0,2^{I}
g-Lc-C2,5	17,0 ± 0,3^{II}	g-Bl-C2,5	18,9 ± 0,1^{I}	g-Ba-C2,5	18,2 ± 0,2^{I}
g-Lc-C5	16,7 ± 0,1^{II}	g-Bl-C5	18,9 ± 0,2^{I}	g-Ba-C5	17,9 ± 0,3^{I}
uzorak	bodovi	uzorak	bodovi	uzorak	bodovi
s-Lc-0	10,1 ± 0,8^{V}	s-Bl-0	10,4 ± 1,1^{V}	s-Ba-0	9,8 ± 0,9^{V}
s-Lc-A2,5	14,6 ± 0,5^{III}	s-Bl-A2,5	13,9 ± 0,7^{III}	s-Ba-A2,5	14,0 ± 0,8^{III}
s-Lc-A5	17,7 ± 0,3^{I}	s-Bl-A5	15,6 ± 0,3^{II}	s-Ba-A5	17,1 ± 0,2^{II}
s-Lc-C2,5	14,6 ± 0,2^{III}	s-Bl-C2,5	17,3 ± 0,2^{II}	s-Ba-C2,5	16,0 ± 0,5^{II}
s-Lc-C5	17,8 ± 0,3^{I}	s-Bl-C5	17,0 ± 0,4^{II}	s-Ba-C5	17,6 ± 0,6^{II}

Legenda: c – kravlje, g – kozje i s – sojino mlijeko fermentirano bakterijom: Lc - *L. casei* Lc01, Bl - *B. longum* Bb46, Ba – *B. lactis* Bb12, 0 - bez dodatka meda; A2,5 i A5 - 2,5% i 5% bagremovog meda, C2,5 i C5 - 2,5% i 5% kestenovog meda. Slova označavaju: I – izvrsna kategorija kakvoće; II – dobra; III – osrednja; IV - prihvatljiva; V – neprihvatljiva kategorija kakvoće. Podaci predstavljaju srednje vrijednosti (±SD) ponderiranih bodova proizvoda 24 sata nakon proizvodnje.

5. RASPRAVA

5.1. ANALIZE UZORAKA MLIJEKA I MEDA KORIŠTENIH ZA FERMENTACIJU

Rezultate kemijskih analiza kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka prikazuje Tablica 14. Rezultati analiza uzoraka pokazuju da su sve tri vrste mlijeka korištene za fermentaciju imale prosječno jednak udio ukupne suhe tvari. Ukupna suha tvar kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka kretala se između 11 i 12%, uz vrlo mala odstupanja u grupama uzoraka (SD 0,02 – 0,17%). Kozje mlijeko korišteno za fermentacije imalo je prosječno najveći udio mliječne masti, dok je udio ukupne masti u sojinom mlijeku bio najniži. Sojino mlijeko također je imalo najmanji udio ugljikohidrata dok je udio ukupnih proteina bio približno jednak u sve tri vrste mlijeka. Iako niži udio fermentabilnih ugljikohidrata u sojinom mlijeku može sugerirati sporu fermentaciju mlijeka probiotičkim bakterijama mliječne kiseline (BMK), rezultati niza prethodnih studija pokazuju da probiotički laktobacili, a posebno bifidobakterije, dobro fermentiraju sojino mlijeko (Slačanac i sur. 2012.). Kiselost kravljeg i kozjeg mlijeka kretala se u rangu normalnih prirodnih vrijednosti za obje vrste mlijeka, dok je sojino mlijeko imalo tek nešto nižu kiselost od animalnih mlijeka. Vrijednosti standardnih devijacija (SD) koje prikazuje Tablica 14 pokazuju da su odstupanja bila vrlo mala za sve određivane vrijednosti, u sve tri vrste mlijeka.

Sastav i svojstva bagremovog i kestenovog meda koji su dodavani u mlijeko prije fermentacije prikazuju Tablica 15-**Tablica 17**. Rezultati pokazuju da je kestenov med imao viši udio suhe tvari, minerala, reducirajućih šećera, saharoze i hidroksimetilfurfurala nego bagremov med. S obzirom na prirodni sastav i boju kestenovog meda, ovo su očekivani i logični rezultati. Tamnija boja kestenovog meda sugerira veći udio minerala u kestenovom u odnosu na bagremov med (vrlo svijetli), ali i veću podložnost kristalizaciji (Bertoncelj i sur. 2007.; Golob i sur. 2005.). S druge strane, veći udio minerala može utjecati na fermentativnu aktivnost BMK u mlijeku, jer su neki od njih sastavni dijelovi enzimatskih kompleksa za razgradnju laktoze i drugih ugljikohidrata (Shin i Ustunol 2005., Weston 1999.). Kestenov med imao je također značajno veću kiselost, te vrijednost dijastaznog broja u usporedbi s bagremovim medom. Rezultati fizikalno-kemijskih analiza monoflornih i poliflornih hrvatkih medova (Šarić i sur. 2008.) također pokazuju da je kestenov med imao značajno veću aktivnost dijastaze u odnosu na neke druge vrste meda, među njima i bagremov. Funkcija dijastaze (α- i β-amilaza) tijekom zrenja meda nije još dovoljno poznata, ali se unatoč tome aktivnost dijastaze uzima kao jedan od parametara kakvoće meda, jer se smatra da utječe na tehnološke parametre zagrijavanja meda (Cozmuta i sur. 2011.). Prema dostupnim biokemijskim podacima, aktivnost dijastaze u kravljem i kozjem mlijeku bila bi ograničena na minorne udjele manjih oligosaharida, ali bi važnu ulogu mogla imati u slučajevima kada se mlijeku

dodaju neki prebiotički supstrati. Znatno je zanimljivija moguća uloga dijastaze u sojinom mlijeku. Visoki udio rafinoze i stahioze u sojinom zrnu, čest su uzrok nadutosti kod konzumenata sojinog mlijeka. Rezultati prethodnih studija na fermentaciji sojinog mlijeka pokazali su da dijastaza iz nekih sojeva bifidobakterija tijekom fermentacije sojinog mlijeka utječe na sniženje udjela rafinoze i stahioze, pa tako i na lakšu probavljivost fermentiranog u odnosu na nefermentirano sojino mlijeko (Leblanc i sur. 2004.). Veća kiselost kestenovog meda u odnosu na bagremov posljedica je većih udjela gore navedenih tvari u kestenovom medu. Konačno, kestenov med imao je također i veći udio u vodi netopljivih tvari. Sve ove razlike u kemijskom sastavu između bagremovog i kestenovog meda sugeriraju i različito djelovanje na probiotičke startere tijekom kompleksnih fermentativnih procesa, ali i na organoleptička (senzorska) svojstva fermentiranih mlijeka.

5.2. ANALIZA TIJEKA FERMENTACIJE KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIJEKA PROBIOTIČKIM SOJEVIMA *Lactobacillus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12

5.2.1. DINAMIKA PROMJENE pH VRIJEDNOSTI TIJEKOM FERMENTACIJE

Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kravljeg mlijeka bakterijama *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 uz dodatak bagremovog i kestenovog meda prikazuju **Slika 36**, **Slika 37** i **Slika 38**, dok kinetičke parametre promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije izračunati Gompertzovim modelom (Zwietering i sur. 1990.):

$$y = A \cdot e^{-e^{\left[\frac{v_{max} \cdot e}{A} \cdot (\lambda - t) + 1\right]}} \quad \textbf{(18)}$$

gdje su A - kretanje pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije, v_{max} - maksimalna brzina pada pH vrijednosti (h^{-1}), λ - duljina latentne faze pada pH vrijenosti (h) i t - vrijeme potrebno da se postigne određena pH vrijednost (h); prikazuje **Tablica 18**, **Tablica 19** i **Tablica 20**.

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Rezultati koje prikazuje Slika 36 pokazuju brži pad pH vrijednosti u kravljem mlijeku tijekom fermentacije s *L. casei* Lc01 u slučaju kada je mlijeku prije fermentacije dodan kestenov med. Statističke vrijednosti dobivene Fisher-ovim LSD testom pokazuju da su razlike postignutih pH vrijednosti na kraju fermentacije bile statistički značajne između dodatka bagremovog i kestenovog meda, ali i između referentnih uzoraka i uzoraka s dodanim medom. Najnižu pH vrijednost na kraju fermentacije imali su uzorci kravljeg mlijeka s dodanih 5% kestenovog meda, a

najvišu pH vrijednost imao je referentni uzorak. Modelom izračunate vrijednosti kinetičkih parametara (Tablica 18) u skladu su s eksperimentalnim podacima (Slika 36). Pad pH vrijednosti u stacionarnoj fazi fermentacije nije se međusobno razlikovao između uzoraka, bez obzira na vrstu i udio dodanog meda (p ≤0,05). Najveću maksimalnu brzinu (v_{max}) i najdužu latentnu fazu (λ) pada pH vrijednosti imali su uzorci s dodanim kestenovim medom, statistički značajno veću nego referentni i uzorci s dodanim bagremovim medom. Jedino je još uzorak s dodanih 5% bagremovog meda imao latentnu fazu dužu od 9 h. Iz svih ovih podataka proizlaze i vrijednosti za vrijeme potrebno da fermentirani uzorak postigne pH vrijednost izoelektrične točke kazeina (pH=4,6). Uzorci s dodanim kestenovim medom dostigli su pH vrijednost 4,6 nakon 16 (2,5% dodanog kestenovog meda), odnosno 17 (5% dodanog kestenovog meda) sati. To je bilo 2-3 sata brže nego u uzorcima s dodanih 5% bagremovog meda te čak 4-5 sati brže nego u uzorcima s dodanih 2,5% bagremovog meda i referentnim uzorcima.

Slične, ali kinetički nešto slabije izražene relacije zabilježene su u slučaju fermentacije kravljeg mlijeka bifidobakterijama. Slika 37 i Slika 38 prikazuju kretanje fermentacije kravljeg mlijeka s *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12. Pad pH vrijednosti bio je općenito sporiji u uzorcima kravljeg mlijeka fermentiranog bifidobakterijama nego u slučaju kada je fermentirano s *L. casei* Lc01, pa su i pH vrijednosti na kraju fermentacije bile statistički značajno više, bez obzira na vrstu i udio dodanog meda (Tablica 19 i Tablica 20). I ovdje je dodatak kestenovog meda utjecao na brži pad pH vrijednosti nego dodatak bagremovog meda.

Uzorci kravljeg mlijeka fermentirani s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 i dodanih 2,5% kestenovog meda imali su najveću maksimalnu brzinu pada pH vrijednosti (0,302 h^{-1}). Najduže latentno vrijeme pada pH vrijednosti (eksponencijalna faza pada pH vrijednosti) imali su uzorci s 5% dodanog kestenovog meda (0,686 sati). Općenito, uzorci s dodanim kestenovim medom imali su višestruko dužu eksponencijalnu fazu pH vrijednosti nego uzorci s dodanim bagremovim medom ili referentni uzorci (≈ 4-5 puta dužu). Vrijeme potrebno za postizanje pH vrijednosti 4,6 bilo je najduže kod referentnih uzoraka, 6-9 sati duže nego kod uzoraka s dodanim medom. Uzorci s dodanih 5% kestenovog meda najbrže su dostignuli pH vrijednost izoelektrične točke kazeina (23,73 sata).

Kinetika pada pH vrijednostima u uzorcima kravljeg mlijeka fermentiranih drugim ispitivanim sojem bifidobakterija, *B. longum* Bb46, može se opisati slično kao kod *B. animalis* subsp. *lactis*. Ipak, uzorci kravljeg mlijeka fermentirani s *B. longum* Bb46, imali su dužu stacionarnu fazu i nižu maksimalnu brzinu pada pH vrijednosti usporedbi s uzorcima fermentiranim s *B. animalis* subsp.

lactis. Stoga su i vremena postizanja pH vrijednosti od 4,6 bila statistički značajno duža ($p \leq 0,05$) u usporedbi s uzorcima fermentranim s *B. animalis* subsp. *lactis*, bez obzira koja je vrsta i koji udio meda dodan u uzorak prije fermentacije.

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

U nizu studija provedenih u našem laboratoriju potvrđena je veća fermentativna aktivnost odabranih probiotičkih sojeva BMK u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje (Slačanac i sur. 2004a.,b., 2005a.,b., 2007a.,b., 2010a.). Ispitivani probiotički sojevi laktobacila i bifidobakterija tijekom fermentacije brže su rasli i brže zakiseljavali kozje mlijeko u odnosu na kravlje. Shodno tome, veće koncentracije biološki aktivnih organskih kiselina (mliječna, octena, propionska, SCFA, MCFA) nastajale su u kozjem mlijeku. U zadnjih desetak godina med se ističe kao mogući funkcionalni dodatak fermentiranim mliječnim proizvodima. Iako nije pravi prebiotik, svojim sastavom i svojstvima med može biti promotor rasta BMK. Rezultati naših preliminarnih ispitivanja pokazali su da med ubrzava rast određenih sojeva bifidobakterija i laktobacila ne samo u kravljem, nego i u kozjem i sojinom mlijeku. Stoga je logična pretpostavka da će dodatak meda u kozje mlijeko dodatno povećati nutritivnu i biološku vrijednost fermentiranog kozjeg mlijeka, što je istraženo u ovom radu. Promjenu pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka s *L. casei* Lc01, *B.longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 uz dodatak bagremovog i kestenovog meda prikazuju **Slika 39**, **Slika 40** i **Slika 41**, a kinetiku pada pH vrijednosti **Tablica 21**, **Tablica 22** i **Tablica 23**. U usporedbi s kravljim mlijekom, tijekom fermentacije kozjeg mlijeka utvrđen je statistički značajno brži rast sva tri analizirana soja (Slika 48, Slika 49 i Slika 50) uz istodobno brži pad pH vrijednosti. To je u skladu s rezultatima naših prethodnih studija (Slačanac i sur. 2004a.,b., 2005a.,b., 2007a.,b., 2010a.), kao i rezultatima studija drugih istraživača (Božanić i Tratnik 2001., Lim i Lee 2013.). Ukoliko se uspoređuje vrijeme dostizanja pH vrijednosti 4,6; razlike između referentnih uzoraka kravljeg i kozjeg mlijeka bile su: fermentacija s *L. casei* Lc01 20,4%, fermentacija s *B. longum* Bb46 79,68% i fermentacija s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 59,18%. Tijekom fermentacije kozjeg mlijeka sa sva tri ispitivana startera dodatak meda imao je određeni promotorni utjecaj na dinamiku pada pH vrijednosti, ali to je bilo slabije izraženo nego kod kravljeg mlijeka.

Tijekom fermentacije s *Lb casei*, identično kao i kod kravljeg mlijeka, uzorci kozjeg mlijeka s dodanim kestenovim medom imali su kraću lag fazu fermentacije, najveću maksimalnu brzinu pada pH vrijednosti i najdužu eksponencijalnu fazu (**Slika 39**, **Tablica 21**). Međutim, vremena

potrebna da se dostignu pH vrijednosti 5,0 i 4,6 nisu se statistički značajno razlikovala, s izuzetkom uzorka s dodanih 5% bagremovog meda, kod kojeg su zabilježena najduža vremena postizanja.

Različito nego kod kravljeg mlijeka, tijekom fermentacije s *B. longum* Bb46, vrijednosti kinetičkih parametara pokazuju značajnije djelovanje bagremovog meda na pad pH vrijednosti nego kestenovog (**Slika 40**, **Tablica 22**). Najveću maksimalnu brzinu zakiseljavanja i najkraća vremena potrebna da se tijekom fermentacije postignu pH vrijednosti 5,0 i 4,6 imali su uzorci kozjeg mlijeka s dodanih 2,5% bagremovog meda.

U slučaju fermentacije s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (**Slika 41**, **Tablica 23**) najbrži pad pH vrijednosti zabilježen je kod uzoraka s dodanih 2,5% bagremovog i kestenovog meda. Ti uzorci statistički su se značajno razlikovali od ostalih uzoraka.

Uspoređujemo li rezultate dinamike pada pH vrijednosti uz dodatak bagremovog i kestenovog meda između kravljeg i kozjeg mlijeka, može se izvesti vrlo očiti zaključak da je dodatak meda u kozje mlijeko imao manji utjecaj na pad pH vrijednosti nego dodatak meda u kravlje mlijeko te da su razlike u padu pH vrijednosti tijekom fermentacije između referentnih i uzoraka s dodanim medom bile manje kod kozjeg mlijeka. Uz veću brzinu pada pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg mlijeka očit je i negativan efekt dodatka 5% bagremovog i kestenovog meda na brzinu pada pH vrijednosti. Pregled kinetičkih vrijednosti broja stanica tri probiotička soja u kozjem mlijeku pokazuje upravo inhibicijsku ulogu dodatka 5% meda na rast ispitivanih startera u kozjem mlijeku, što nije bio slučaj u kravljem. Prethodno publicirani rezultati naših studija pokazuju slične relacije i kada se fermentacija u kravljem i kozjem mlijeku analizirala Raccachevim kinetičkim modelom (Slačanac i sur. 2011.).

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

U zadnjih desetak godina intenzivno se ispitivala fermentacija sojinog mlijeka probiotičkim BMK, osobito bifidobakterijama. Tendencija je proizvesti biološki vrijedan napitak za ciljnu skupinu konzumenata, konkretno populaciju alergičnu na laktozu ili proteine mlijeka animalnog podrijetla. Rezultati niza studija pokazali su da se fermentacijom sojinog mlijeka značajno poboljšava biološka vrijednost i probavljivost sojinog mlijeka, ali i njegova organoleptička svojstva (Chou i Hou 2000.; Leblanc i sur. 2004.; Wang i sur. 2002.). Rezultati predstavljeni u ovom radu također su doprinos ispitivanju kinetike fermentacije probiotičkih sojeva u sojinom mlijeku. Dodatak meda imao je izražajno značajan utjecaj na ubrzanje pada pH vrijednosti tijekom fermentacije sojinog mlijeka, izraženiji nego kod kravljeg i kozjeg mlijeka.

U fermentaciji s *L. casei* dodatak bagremovog i kestenovog meda utjecao je na pozitivne vrijednosti svih kinetičkih parametara pada pH vrijednosti. To je u konačnici rezultiralo 9-10 sati bržim postizanjem pH vrijednosti 4,6 u uzorcima s dodanim medom u odnosu na referentne uzorke (**Slika 42**, **Tablica 24**).

Razlike između referentnih i uzoraka s dodanim medom bile su nešto manje izražene u fermentaciji s *B. longum* Bb46, ali također statistički značajne. I u ovom slučaju je razlika postizanja pH vrijednosti 4,6 između referentnog i uzorka s dodanih 5% kestenovog meda bila ≈ 10 sati, dok je razlika između referentnog i uzoraka s dodanim medom bila ≈ 6-7 sati. Vrijednosti drugih kinetičkih parametara kretali su se u skladu sa završnim vrijednostima (**Slika 43**, **Tablica 25**).

Slične relacije su bile i u slučaju fermentacije sojinog mlijeka s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (**Slika 44**, **Tablica 26**). Uzorci s dodanim medom imali su značajno višu maksimalnu brzinu pada pH vrijednosti i kraća vremena postizanja pH vrijednosti 5,0 i 4,6.

Različito nego kod kravljeg, ili u drugom smislu kozjeg mlijeka, u sojinom mlijeku vrsta i udio dodanog meda nisu imali utjecaj na pad pH vrijednosti, nego se može reći općenito da je dodatak bagremovog i kestenovog meda u obje koncentracije značajno ubrzao zakiseljavanje.

U k u p n o , analiza kinetike brzine pada pH vrijednosti pokazuje različit utjecaj dodatka meda u sva tri ispitivana mlijeka i sa sva tri probiotička startera. Općenito, u sva tri mlijeka dodatak meda imao je više ili manje promotorni utjecaj na pad pH vrijednosti. U kravljem mlijeku kestenov med jače je djelovao na pad pH vrijednosti nego u bagremov, u kozjem je dodatak 5% meda djelovao inhibitorno, dok je u sojinom mlijeku med ubrzavao pad pH vrijednosti bez obzira na vrstu i količinu dodatka. Dokaz je to da je svaka vrsta mlijeka zasebna fermentacijska sredina različitog sastava i svojstava, čime su uvjetovane različite dinamike fermentacije, ali i različit utjecaj dodatka promotornih tvari za rast probiotičkih startera. Odabir tri vrste mlijeka, tri različita startera, dodatka dvije vrste meda u različitim udjelima omogućava ovakvu kompleksnu kinetičku analizu.

5.2.2. DINAMIKA PROMJENE BROJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA TIJEKOM FERMENTACIJE

Svaka analiza kinetike fermentacije mlijeka s BMK podrazumijeva promjenu broja stanica BMK ključnim parametrom procjene. Promjena broja stanica BMK određuje ne samo da ima brzinu pada pH vrijednosti kao dominantne posljedice, nego i funkcionalnu vrijednost proizvoda (kod probiotičkih sojeva), koncentraciju biološki aktivnih spojeva (biološki aktivne organske kiseline, biološki aktivni peptidi, bakteriocini) i konačno trajnost proizvoda s ishodnim svojstvima (Grajek i Olejnik 2005.). U nizu naših prethodnih studija i publikacija dokumentirane su razlike u kinetikama

fermentacija između kozjeg i kravljeg mlijeka (Slačanac i sur. 2004a.,b., 2005a.,b., 2007a.,b., 2010a.). U ovom radu analizirano je i sojino mlijeko, ali prvenstveno dodatak meda kao mogućeg promotora rasta probiotičkih bakterija u sve tri vrste mlijeka.

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Promjenu broja bakterija *L. casei* Lc01 tijekom fermentacije kravljeg mlijeka, s dodatkom i bez dodatka meda prikazuje Slika 45, dok faktore analize kinetike rasta *L. casei* Lc01 u kravljem mlijeku prikazuje Tablica 27. Umjesto faktora maksimalne brzine pada pH vrijednosti za rast BMK u mlijeku uzet je faktor maksimalne brzine rasta BMK (μ_{max}), a umjesto faktora postizanja kiselosti određene točke pH uzet je faktor generacijskog vremena rasta bakterija (t_g). Kinetički koeficijent A, za razliku od analize pH vrijednosti, predstavlja maksimalno povećanje broja bakterija. Analizom tih koeficijenata (Tablica 27) dolazi se do zaključka da dodatak kestenovog meda u udjelu 5% produžava lag fazu rasta, povećava maksimalnu brzinu rasta i skraćuje generacijsko vrijeme *L. casei* Lc01 kravljem mlijeku. I mikrobiološki kinetički parametri ukazuju na prethodno spomenuto jače djelovanje kestenovog meda na brzinu pada pH vrijednosti u odnosu na dodatak bagremovog meda. Jedino kinetički koeficijent λ ukazuje na to da su veće količine produkta (konkretno kiseline) nastajale u eksponencijalnoj fazi kada je dodan kestenov med, nego u slučaju dodatka bagremovog meda.

Suprotno tome, u slučaju fermentacije kravljeg mlijeka s *B. longum* Bb46, maksimalno povećanje broja bakterija i maksimalna brzina rasta bili su viši, kao i najduže vrijeme lag faze i najkraće generacijsko vrijeme u uzorcima s dodatkom bagremovog meda (Slika 46, Tablica 28). Ukoliko se ti podaci usporede s podacima za pad pH vrijednosti tijekom fermentacije istih uzoraka, očito je da sama brzina rasta bifidobakterija u mlijeku ne mora biti u direktnoj korelaciji s porastom kiselosti. Ključni faktor za probiotičke sojeve, osobito bifidobakterije, je sposobnost soja da u određenim fazama fermentacije proizvodi mliječnu (ili kod bifidobakterija mliječnu i octenu) kao produkt (Gomez 1999., Swidan 2009.). Očigledno je dodatak kestenovog meda stimulirao u kravljem mlijeku jaču produkciju kiseline u odnosu na dodatak bagremovog meda, što je jedan od bitnih zaključaka u ovome radu.

Pokazuju to i podaci za rast *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kravljem mlijeku tijekom fermentacije (Slika 47, Tablica 29). Ovdje su referentni uzorci i uzorci s dodanim kestenovim medom imali najdužu lag fazu i najveću maksimalnu brzinu rasta ali i duže generacijsko vrijeme od uzoraka s bagremovim medom, dok se podaci za maksimum povećanja broja nisu statistički razlikovali ovisno o vrsti dodanog meda. Najvažniji je zaključak da je dodatak obje vrste meda značajno

stimulirao rast sva tri startera u kravljem mlijeku. Kod fermentacije kravljeg mlijeka s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 najdužu lag fazu i najveću maksimalnu brzinu rasta te najkraće generacijsko vrijeme su imali uzorci s dodatkom 2,5%, dok se podaci za maksimum povećanja broja nisu statistički razlikovali od ostalih uzoraka.

Iz podataka koje prikazuju Slika 46 i Slika 47 i vrijednosti koeficijenata koje prikazuje Tablica 28 i Tablica 29 ipak se može zaključiti da je dodatak 5% kestenovog meda djelomično inhibirao rast bifidobakterija u kravljem mlijeku, a nije inhibirao rast *L. casei*. Inhibicija rasta bifidobakterija u kravljem mlijeku dodatkom viših udjela kestenovog meda predočena je i u našim ranijim publikacijama, kada je kinetika fermentacije analizirana modificiranim Raccachevim modelom (Slačanac i sur. 2011.).

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Više puta istaknuti brži rast različitih probiotičkih sojeva BMK u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje (Lučan i sur. 2009.; Slačanac i sur. 2004a.,b., 2005a.,b., 2007a.,b., 2010a.) potvrđen je i ovom studijom. Kretanje broja ispitivanih probiotičkih sojeva u kozjem mlijeku prikazuju **Slika 48**, **Slika 49** i **Slika 50**, dok analizu kinetike njihova rasta u kozjem mlijeku prikazuju **Tablica 30**, **Tablica 31** i **Tablica 32**. Usporedbom svih kinetičkih parametara za referentne uzorke kravljeg i kozjeg mlijeka očigledno je da su sva tri soja statistički značajno brže rasla u kozjem mlijeku ($p \leq 0,05$). U referentnim uzorcima kozjeg mlijeka bila je kraća lag faza rasta nego u referentnim uzorcima kravljeg mlijeka, viša maksimalna brzina rasta i veće maksimalno povećanje broja stanica. Stoga je, kako se vidi iz podataka koje prikazuju **Slika 48**, **Slika 49** i **Slika 50**, u svakom trenutku fermentacije veći broj stanica (neovisno o soju) bio u kozjem mlijeku.

Dodatak bagremovog meda u obje koncentracije povećavao je maksimalnu brzinu rasta i maksimalno povećanje broja bakterija *L. casei* Lc01 u odnosu na referentne uzorke i uzorke s dodanim kestenovim medom. Također je u uzorcima kozjeg mlijeka s dodanim bagremovim medom zabilježeno najkraće generacijsko vrijeme *L. casei* Lc01. Lag faza rasta *L. casei* Lc01 u kozjem mlijeku bila je statistički značajno najduža u referentnim uzorcima (**Slika 48**, **Tablica 30**).

Nasuprot tome, dodatak bagremovog meda nije povećavao μ_{max} *B. longum* Bb46 u odnosu na referentne uzorke, ali je utjecao na skraćenje lag faze i maksimalno povećanje broja bakterija u eksponencijalnoj fazi fermentacije (**Slika 49**, **Tablica 31**). Dodatak kestenovog meda u udjelu 2,5% utjecao je jedino na parametar maksimalnog povećanja broja bakterija *B. longum* Bb46 u eksponencijalnoj fazi fermentacije. Kao i u slučaju kravljeg mlijeka, iz podataka koje prikazuje **Slika 49** i vrijednosti kinetičkih parametara (**Tablica 31**), proizlazi da je dodatak 5% kestenovog meda

inhibirao rast *B. longum* Bb46 u kozjem mlijeku, ali je ovdje i dodatak 5% bagremovog meda djelovao inhibicijski na rast *B. longum* Bb46.

Isti zaključak proizlazi i iz podataka za rast *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (**Slika 50**, **Tablica 32**). I bagremov i kestenov med stimulirali su rast *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kozjem mlijeku, ali samo ukoliko su dodani u udjelu 2,5%. Dodatak kestenovog meda u udjelu od 5% inhibirao je rast *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kozjem mlijeku, što je vidljivo usporedbom svih kinetičkih parametara koje prikazuje **Tablica 32**. Dodatak 5% bagremovog meda djelovao je na povećanje μ_{max} *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 i na skraćivanje generacijskog vremena, ali je osjetno produžio lag fazu fermentacije u odnosu na uzorke s dodanih 2,5% bagremovog meda.

Na osnovi ovakvih dobivenih rezultata kinetike rasta obje ispitivane bifidobakterije u kravljem i kozjem mlijeku može se zaključiti da je udio dodatka meda (osobito kestenovog) od 5% previsok kada se fermentacija provodi bifidobakterijama, a udio dodatka od 2,5% promocijski i optimalan. U daljnjim istraživanjima potrebno je ispitati utjecaj dodatka ove dvije vrste meda u rasponu 2,5-5%, na osnovi čega se i može utvrditi gornja granica dodatka ove dvije vrste meda, koja će prebiotički djelovati na rast bifidobakterija.

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Analizu rasta *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u sojinom mlijeku prikazuju **Slika 51**, **Slika 52** i **Slika 53**, te **Tablica 33**, **Tablica 34** i **Tablica 35**. Iz svih podataka vidljivo je da je sojino mlijeko također pogodan supstrat za rast sva tri startera. Međutim, suprotno nego u slučaju kravljeg i kozjeg mlijeka, dodatak obje vrste meda u udjelu od 5% također je djelovao izrazito stimulatorno. Vidljivo je to iz odnosa broja bakterija tijekom fermentacije sojinog mlijeka koje prikazuju **Slika 51**, **Slika 52** i **Slika 53**, ali i iz vrijednosti izračunatih kinetičkih parametara. Dodatak obje vrste meda u oba udjela povisio je vrijednosti maksimalnog povećanja broja bakterija u eksponencijalnoj fazi, maksimalne brzine rasta, a snizio vrijednosti ograničavajućih parametara duljine lag faze i generacijskog vremena, za sva tri ispitivana startera. Kretanje svih vrijednosti kinetičkih parametara za fermentaciju sojinog mlijeka s *L. casei* Lc01, *B.longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, nije uvijek bilo u okviru spomenutih vrijednosti, ali je bilo kompenzirano vrijednošću drugog parametra. Tako npr. kod fermentacije sojinog mlijeka s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 određena je najduža lag faza fermentacije za uzorke s dodanih 5% kestenovog meda, ali je maksimalna brzina porasta broja bakterija *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u eksponencijalnoj fazi bila ≈ 10 puta veća nego u ostalim uzorcima (**Tablica 35**). Rezultat je to

najnižeg generacijskog vremena za uzorke sojinog mlijeka s dodanih 5% kestenovog meda, a vidljivo je i iz broja bakterija *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 koje prikazuje **Slika 53**.

S u m a r n o , rezultati mikrobioloških analiza kao i vrijednosti koeficijenata dobivenih kinetičkom analizom Gompertzovim modelom, prikazuju svu kompleksnost interakcija tijekom mliječno-kiselih fermentacija. Dokaz je to i da u kompleksnom sustavu kao što je mlijeko, različiti sojevi metaboliziraju različitom kinetikom, ovisno o njihovim svojstvima, ali i svojstvima mlijeka kao supstrata. Stoga vrijednost samo jednog parametra nije dovoljna da bi se opisala kinetika rasta startera ili pak kinetika same fermentacije. Potrebna je kompleksna analiza, kakva je prikazana u ovom radu, i koja nam daje korisne podatke za planiranje i projektiranje pojedinih fermentacija. Posebno su ovakve analize korisne u slučajevima kada se u mlijeko prije fermentacije dodaju neki promotori rasta, što je danas čest slučaj. Iako nije pravi prebiotik (s obzirom na svoj sastav) med se pokazao kao izrazito dobar promotor rasta sva tri ispitivana soja u kravljem, kozjem i sojinom mlijeku na što ukazuju i izračunate modificirane ocjene prebiotičke aktivnosti bagremovog meda i kestenovog meda (**Tablica 36** i **Tablica 37**).

5.3. UTJECAJ DODATKA MEDA NA INHIBICIJU RASTA TEST-BAKTERIJA

Naša prethodna istraživanja pokazala su da kravlje i kozje mlijeko fermentirano probiotičkim laktobacilima i bifidobakterijama inhibira *in vitro* rast niza urinarnih i probavnih patogena (Pavlović i sur. 2006.; Slačanac i sur. 2004a.,b., 2007a.,b., 2010b.). Hipoteza u ovom radu bila je da će osim stimulatornog djelovanja na rast probiotičkih sojeva, dodatak meda uzrokovati također pojačani inhibicijski učinak fermentiranog mlijeka na rast dva odabrana patogena u *in vitro* uvjetima. Ovakva pretpostavka čini se logična jer med kao takav posjeduje baktericidna svojstva (Al-Waili i sur. 2011.; Kuncič i sur. 2012.; Vica i sur. 2014.), a neke *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su i antivirusna svojstva sastojaka iz meda (Hashemipour i sur. 2014.).

5.3.1. INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Listeria monocytogenes*

Tablica 38-**Tablica 46** prikazuju rezultate ispitivanja inhibitornog djelovanja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 na rast bakterije *Listeria monocytogenes* FSL N1-017. *Listeria monocytogenes* definirani je enteropatogen koji se može naći u hrani animalnog podrijetla (Aygun i Pehlivanlar 2006.; Kramarenko i sur. 2013.). Izaziva rijetko, ali potencijalno fatalno oboljenje, znano kao liosterioza (Allerberger i Wagner 2010.). Studije napravljene u SAD pokazale su da je smrtnost od listerioze 28%, najčešće kod

imuno kompromitiranih osoba (Mead i sur. 2000.). Neke prethodne *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su moguću preventivnu i zaštitnu ulogu konzumacije mlijeka fermentiranog probioticima na spriječavanju listerioze, kao i na ublažavanju simptoma ove bolesti (Gahan i Hill 2014.; Ortiz i sur. 2014.).

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Rezultati koje prikazuje **Tablica 38** pokazuju da je dodatak kestenovog meda osjetno povećao inhibitorni kapacitet kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 prema bakteriji *Listeria monocytogenes* FSL N1-017. Visoki stupanj inhibicije na rast bakterije *Listeria monocytogenes* FSL N1-017 imali su polufermentirani (15 sati fermentacije) i fermentirani uzorci s 5% dodatka kestenovog meda te fermentirani uzorci s 2,5% dodanog kestenovog meda. Slab inhibicijski potencijal nefermentiranih uzoraka dokaz je da nije dodatak meda osnovni razlog inhibicije rasta *Listeria monocytogenes* FSL N1-017, nego i fermentacija stvara podlogu za inhibiciju. Inhibitorni učinak polufermentiranih uzoraka s dodatkom 5% kestenovog meda dokaz je da niti broj stanica *L. casei* Lc01, niti pH vrijednost fermentiranog mlijeka u ovom slučaju nije isključivi razlog antagonističkog djelovanja, nego nastaju i drugi aktivni spojevi koji uvjetuju inhibiciju. Jako inhibicijsko djelovanje djelomično fermentiranih uzoraka ABT kulture od kozjeg i kravljeg mlijeka na rast uropatogenog soja *E. coli* u odnosu na uzorke sa znatno većim brojem probiotičkih bakterija iz ABT kulture i nižim pH vrijednostima već je dokazano u našim prethodnim studijama (Slačanac i sur. 2004b.). Slično, kozje mlijeko djelomično fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb46 jače je inhibiralo rast uropatogenog kvasca *Candida albicans*, nego potpuno fermentirano kozje mlijeko (Slačanac i sur. 2004a.). Za razliku od kestenovog, dodatak bagremovog meda nije značajno utjecao na inhibicijski učinak kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 prema bakteriji *Listeria monocytogenes* FSL N1-017. Inhibicija s ovim uzorcima bila je tek djelomična, teško mjerljiva i slabo izražena. Uzorci fermentiranog kravljeg mlijeka bez dodatka meda također su slabo, ili uopće nisu inhibirali rast *Listeria monocytogenes* FSL N1-017. U slučaju supernatanta, iz kojega su mikrofiltracijom uklonjene stanice *L. casei* Lc01, dodatak kestenovog meda također je značajno povećao inhibicijski potencijal prema rastu *Listeria monocytogenes* FSL N1-017, a dodatak bagremovog meda nije imao nikakav učinak na povećanje inhibicijskog djelovanja. Supernatant s dodatkom kestenovog meda imao je ipak slabiji inhibicijski učinak nego fermentirano mlijeko sa stanicama *L. casei* Lc01, pa su i zone inhibicije oko supernatanta bile manje od 15 mm.

Nešto drugačije relacije s obzirom na inhibiciju rasta *L. monocytogenes* FSL N1-017 bile su za kravlje mlijeko fermentirano s *B. longum* Bb46. U ovom slučaju dodatak 5% kestenovog, ali i bagremovog meda, utjecao je na osjetno povećanje inhibicijskog potencijala kravljeg mlijeka (**Tablica 39**). Razlika je u tome što su i djelomično fermentirani uzorci kravljeg mlijeka s dodanih 5% kestenovog meda stvorili osjetne zone inhibicije rasta *L. monocytogenes* FSL N1-017 a samo su potpuno fermentirani uzorci s dodanim bagremovim medom stvarali zone inhibicije 20-25 mm. Uzorci s dodanih 2,5% bagremovog meda nisu značajnije inhibirali rast *L. monocytogenes* FSL N1-017, a polufermentirani uzorci s dodanih 2,5% kestenovog meda stvorili su zone inhibicije manje od 15 mm, što je ipak dokaz određenog antagonističkog djelovanja. Supernatant fermentiranog kravljeg mlijeka bez stanica *B. longum* Bb46 jednako je uspješno inhibirao rast ispitivanog patogena kao i fermentirano mlijeko.

Kao i u slučaju *B. longum* Bb46, dodatak bagremovog i kestenovog meda kravljem mlijeku fermentiranom s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 povećao je stupanj inhibicije u odnosu na referentne uzorke. Rezultati koje prikazuje **Tablica 40**, kao i u slučaju preostala dva ispitivana startera, pokazuju da je fermentacija mlijeka imala važan utjecaj na inhibicijski potencijal kravljeg mlijeka s dodanim medom. Nefermentirani uzorci s dodanim bagremovim i kestenovim medom nisu inhibirali rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 na Mueller-Hinton agaru, dok su i polufermentirani i fermentirani stvarali zone koje ukazuju na inhibitorno djelovanje. Izmjerene zone inhibicije pokazuju i određeni inhibicijski učinak referentnog mlijeka fermentiranog s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, ali osjetno manje nego kada je u mlijeko prije fermentacije dodan bagremov i kestenov med. Nadalje, kao i u slučaju *B. longum* Bb46, očigledno je da je viši udio dodanog bagremovog meda (5%) utjecao na dodatno povećanje inhibicijskog potencijala fermentiranog, dok su i uzorci fermentiranog mlijeka s dodanih 2,5% kestenovog meda stvarali zone inhibicije koje ukazuju na visok inhibicijski potencijal. Mikrofiltrirani supernatant fermentiranog kravljeg mlijeka iz kojeg su uklonjene stanice *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 također je inhibirao rast *L. monocytogenes* FSL N1-017, ali su zone inhibicije bile manjeg promjera i slabije izražene nego kod uzoraka fermentiranog mlijeka sa živim stanicama.

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Rezultati analiza inhibicije rasta test mikroorganizma rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 fermentiranim kozjim mlijekom uz dodatak bagremovog i kestenovog meda prikazani su u tablicama 41-43 **Tablica 41**-**Tablica 43**.

Kozje mlijeko fermentirano s *L. casei* Lc01 bez dodatka meda, za razliku od kravljeg referentnog mlijeka, inhibiralo je rast *L. monocytogenes* FSL N1-017. Fermentirano kozje mlijeko djelovalo je na stvaranje slabih zona inhibicije oko bunara, dok je djelomično fermentirano kozje mlijeko tvorilo male, teško mjerljive zone inhibicije. Također, različito nego kod kravljega mlijeka, dodatak obje vrste meda (bez obzira na udio dodatka), značajno je još pojačalo inhibicijski potencijal kozjeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01. Za sve izfermentirane uzorke s dodanim medom izmjerene zone inhibicije bile su veće od 15 mm. Supernatant fermentiranog kozjeg mlijeka bez stanica *L. casei* Lc01 nije inhibirao rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 na Mueller-Hintonu; zone oko bunara bile gotovo nevidljive i nemjerljive.

Za razliku od fermentacije s *L. casei* Lc01, referentno kozje mlijeko fermentirano s *B. longum* Bb46 bez dodatka meda slabije je inhibiralo porast *L. monocytogenes* FSL N1-017, ali je djelomično fermentirano kozje mlijeko stvaralo zone inhibicije nešto manje od 15 mm, što sugerira određenu inhibiciju (**Tablica 42**). Dodatak meda također je utjecao na povećanje inhibicijskog potencijala fermentiranog i djelomično fermentiranog kozjeg mlijeka s *B. longum* Bb46, ali ne u toj mjeri kao u slučaju kada je kozje mlijeko fermentirano s *L. casei* Lc01. Jedino su oko uzoraka djelomično fermentiranog kozjeg mlijeka s dodatkom 2,5% bagremovog i 5% kestenovog meda izmjerene zone inhibicije veće od 15 mm.

Ukoliko se usporede rezultati koje prikazuju **Tablica 41** i **Tablica 42**, očigledna je razlika u inhibicijskom potencijalu između ove dvije vrte fermentiranog kozjeg mlijeka. U slučaju kada je kozje mlijeko fermentirano s *L. casei* Lc01, potpuno fermentirani uzorci kozjeg mlijeka uz dodatak obje vrste meda najviše su inhibirale rast *L. monocytogenes* FSL N1-017. Suprotno tome, uzorci kozjeg mlijeka djelomično fermentirani s *B. longum* Bb46 uz dodatak bagremovog i kestenovog meda snažnije su inhibirali rast test patogena nego potpuno fermentirani uzorci. Razlozi takvih razlika su vjerojatno kompleksni i višestruki, a mogu biti vezani na specifične interakcije soja probiotika i *L. monocytogenes* FSL N1-017, ali i na različite produkte fermentacije *L. casei* Lc01 i *B. longum* Bb46. Dobiveni rezultati ne mogu sugerirati isključivost broja stanica probiotika i pH vrijednosti fermentiranog kozjeg mlijeka na stupanj antagonističkog djelovanja. Razlika između ove dvije vrste fermentiranog kozjeg mlijeka je i u inhibicijskom djelovanju supernatanta bez stanica *L. casei* Lc01 i *B. longum* Bb46. Iako su zone oko supernatanta kozjeg mlijeka fermentiranog s *B. longum* Bb46 bile teško mjerljive, ipak sugeriraju određenu inhibiciju, dok zona inhibicije oko supernatanta kozjeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 nije bilo.

Od sva tri ispitivana probiotička startera, najmanje zone inhibicije izmjerene su oko uzoraka fermentiranih s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (**Tablica 43**). Također, dodatak bagremovog i kestenovog meda najmanje je djelovao na povećanje inhibicijskog potencijala kozjeg mlijeka fermentiranog s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 prema test patogenu *L. monocytogenes* FSL N1-017. Referentni uzorci kozjeg mlijeka fermentirani s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 bez dodatka meda inhibirali su rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 identično kao referentni uzorci kozjeg mlijeka fermentirani s *B. longum* Bb46. Dodatak meda nije djelovao na povećanje inhibicijskog potencijala djelomično fermentiranih uzoraka, ali je dodatak obje vrste meda ipak djelovao na određeno povećanje inhibicije potpuno fermentiranih uzoraka kozjeg mlijeka, različito nego u slučaju fermentacije kozjeg mlijeka s *B. longum* Bb46. Dokaz je to razlike u fermentacijskim procesima među pojedinim sojevima bifidobakterija u kozjem mlijeku, što su pokazali i rezultati nekih prethodnih studija (Pavlović i sur. 2006.; Slačanac i sur. 2004a., 2005a., 2007a.). Iako nije bilo značajnih razlika u broju stanica i pH vrijednosti fermentiranog mlijeka na kraju fermentacije, očigledno je da su ova dva soja imale različite fermentacijske putove (poglavlja 5.2.1. i 5.2.2.). To može biti razlog različitih inhibicijskih potencijala s obzirom na vrijeme fermentacije.

Usporedimo li rezultate za zone inhibicije između kravljeg i kozjeg mlijeka (**Tablica 38**-**Tablica 42**), očigledno je da je kozje fermentirano mlijeko jače inhibiralo rast patogena, bez obzira koji starter bio korišten za fermentaciju. Referentni uzorci kravljeg mlijeka bez dodanog meda nisu inhibirali rast *L. monocytogenes* FSL N1-017. Suprotno, polufermentirani i fermentirani uzorci kozjeg mlijeka imali su određeni inhibicijski potencijal rasta *L. monocytogenes* FSL N1-017 na Mueller-Hinton agaru. Rezultati dobiveni u ovom radu podupiru rezultate niza naših prethodnih studija, u kojima je zabilježen značajno jači *in vitro* antagonistički potencijal fermentiranog kozjeg mlijeka prema nizu entero i urogenitalnih patogena (Pavlović i sur. 2006.; Slačanac i sur. 2004a.,b., 2007a.,b., 2010b.). Dok su u prethodnim studijama inhibicije rasta patogena rađena različitim mikrobiološkim i fizikalno-kemijskim metodama, u ovom radu je korišten isključivo modificirani antibiogramski test osjetljivosti na prisutnost fermentiranog mlijeka, kao i supernatanta fermentiranog mlijeka bez stanica probiotika.

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Rezultate analiza inhibicije rasta test mikroorganizma rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 fermentiranim sojinim mlijekom uz dodatak bagremovog i kestenovog meda prikazuju **Tablica 44**-**Tablica 46**. Općenito, uzorci sojinog fermentiranog mlijeka slabije su inhibirali rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 nego uzorci kravljeg i kozjeg fermentiranog mlijeka, bez obzira na

upotrijebljeni probiotički starter, te vrstu i udio dodanog meda. Referentni uzorci fermentiranog sojinog mlijeka bez dodatka meda djelomično su su inhibirali rast *L. monocytogenes* FSL N1-017. Zone ihnibicije na agarnim pločama najčešće su bile slabije izražene i varirale u rasponu od djelomične (±), do slabe (++) inhibicije. Za sva tri upotrijebljena startera najviše su rast *L. monocytogenes* FSL N1-017 inhibirali potpuno fermentirani uzorci (25 sati fermentacije). Dodatak kestenovog meda u udjelu 5% meda sojinom mlijeku sojevima *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 najviše je utjecao na inhibiciju *L. monocytogenes* FSL N1-017 (**Tablica 44** i **Tablica 46**), do vrijednosti srednje inhibicije (+++) za uzorke sojinog mlijeka fermentirane 15 i 25 sati s *Bifidobacterium longum* Bb46.

Međutim, kako je već gore naglašeno, inhibicija rasta *L. monocytogenes* FSL N1-017 fermentiranim sojinim mlijekom bila je značajno manja u odnosu na fermentirano kozje i kravlje mlijeko, iako broj probiotičkih stanica u sojinom fermentiranom mlijeku nije bio tako osjetno manji uspoređujući s animalnim fermentiranim mlijekom, a i pH sojinog fermentiranog mlijeka bio je nizak i sugerirao inhibiciju. Razlozi ovakvim dobivenim rezultatima vjerojatno su kompleksni i povezani sa sastavom mlijeka i različitim produktima fermentacije (Božanić 2006.; Donkor i sur. 2007a.). Tako se npr. zna da kravlje i pogotovo kozje mlijeko imaju laktoperoksidazni sustav (Savci i sur. 2002.), a sojino ne ili pak da fermentacijom kozjeg i kravljeg mlijeka nastaju različiti bakteriocini (Devi i Sankar 2010.), što se ne zna sa sigurnošću za sojino mlijeko.

5.3.2. INHIBICIJA RASTA BAKTERIJE *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica je izolirana iz niza prehrambenih proizvoda, uključujući sirovo i pasterizirano mlijeko, povrće i meso (Trajković-Pavlović i sur. 2007.). Povijesno su zabilježeni slučajevi oboljenja izazvanih bakterijom *Y. enterocolitica*, takozvane jersinioze. U SAD-u je zabilježen slučaj zaraze djece jersiniozom povezan s konzumacijom pasteriziranog mlijeka (Mead i sur. 2000.).

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Dodatak bagremovog i kestenovog meda snažno je utjecao na povećanje inhibicijskog kapaciteta kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 prema rastu bakterije *Y. enterocolitica* YE133 (**Tablica 47**). Uzorci bez dodatka meda slabo su inhibirali rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hintonu. Već dodatak 2,5% bagremovog i kestenovog meda utjecao je na snažnu inhibiciju rasta, kao i dodatak 5% bagremovog i kestenovog meda. Rast *Y. enterocolitica* YE133 inhibirali su i polufermentirani i potpuno fermentirani uzorci s dodanim bagremovim i kestenovim medom.

Za razliku od kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01, uzorci kravljeg mlijeka fermentirani s oba soja bifidobakterija osjetno su slabije inhibirali rast *Y. enterocolitica* YE133 (**Tablica 48**, **Tablica 49**). Tek su uzorci fermentirani s *B. longum* Bb46 i dodanih 5% kestenovog meda značajnije inhibirali rast *Y. enterocolitica*, a određeni inhibicijski potencijal pokazali su i uzorci s dodanih 5% bagremovog i 2,5% kestenovog meda. Uzorci kravljeg mlijeka fermentirani s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 vrlo su slabo inhibirali rast *Y. enterocolitica* YE133.

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Jednako kao i kod kravljeg mlijeka, dodatak bagremovog i kestenovog meda u kozje mlijeko prije fermentacije, povećao je značajno stupanj inhibicije fermentiranog mlijeka na rast bakterije *Y. enterocolitica* YE133. Već kozje nefermentirano mlijeko s dodatkom 5% bagremovog meda snažno je inhibiralo rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hinton agaru, isto kao i polufermentirano i potpuno fermentirano kozje mlijeko s *L. casei* Lc01 (**Tablica 50**). Ovakvi podaci mogu ukazati na pretpostavku da sama kombinacija kozje mlijeko + stanice *L. casei* Lc01 + bagremov med, može imati letalni učinak na *Y. enterocolitica*. U svijetu postoje proizvodi s inaktiviranim stanicama probiotika u slatkom mlijeku za koje su studije pokazale da imaju antagonistički efekt na mnoge patogene mikroorganizme, što su u ovom slučaju pokazali i rezultati istraživanja u našem laboratoriju. Dodatak kestenovog meda također je utjecao na povećanje inhibicijskog potencijala kozjeg mlijeka, ali jedino ukoliko je bilo polufermentirano ili fermentirano. Jak inhibicijski potencijal prema rastu *Y. enterocolitica* YE133 imali su i fermentirani uzorci supernatanta kozjeg mlijeka bez stanica *L. casei* Lc01 s dodanim bagremovim i kestenovim medom. Svi ovi rezultati pokazuju da je dodatak meda značajno utjecao na inhibicijski potencijal kozjeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 prema ispitivanom patogenu u odnosu na referentne uzorke bez dodanog meda.

Za razliku od fermentiranog kravljeg mlijeka, kozje mlijeko fermentirano s *B. longum* Bb46 s dodanim bagremovim i kestenovim medom vrlo je snažno inhibiralo rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hinton agaru. Posebno je interesantno da su polufermentirani uzorci kozjeg mlijeka u ovom slučaju imali veći inhibicijski potencijal nego potpuno fermentirani uzorci. To dokazuje nekoliko puta iznesenu tezu da broj probiotičkih bakterija i pH vrijednost nisu isključivi faktori inhibicijskog djelovanja fermentiranog mlijeka na rast pojedinih patogenih mikroorganizama, nego da je djelovanje kompleksnije i na njega mogu utjecati i drugi čimbenici, kao i drugi biološki aktivni spojevi poput SCFA, MCFA, bakteriocina i biološki aktivnih peptida koji se razvijaju u raznim fazama fermentacije (Šušković i sur. 2010.). Također ne treba isključiti baktericidnu ulogu meda, jer je iz

rezultata koje prikazuje **Tablica 51** očito da referentni uzorci fermentiranog kozjeg mlijeka s *B. longum* Bb46 samo djelomično inhibirali rast ispitivanog patogena. Fermentirani supernatant kozjeg mlijeka bez stanica *B. longum* Bb46 je također samo djelomično inhibirao rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hinton agaru.

Kozje mlijeko fermentirano s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 slabo je inhibiralo rast *Y. enterocolitica* YE133, a niti dodatak bagremovog i kestenovog meda nije utjecao značajnije na povećanje inhibicijskog potencijala (**Tablica 52**). Izmjerene su zone inhibicije koje odgovaraju vrijednostima slabe inhibicije, a tek su za polufermentirane uzorke s dodanih 5% kestenovog meda izmjerene zone odgovarale vrijednostima srednje inhibicije rasta *Y. enterocolitica* YE133 (15-20 mm). Također, gotovo da se nije razlikovao inhibicijski učinak između fermentiranih uzoraka sa stanicama i supernatanta bez stanica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12.

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Za uzorke fermentiranog sojinog mlijeka gotovo da vrijede iste relacije inhibicije *Y. enterocolitica* YE133 kao i za uzorke fermentiranog kozjeg mlijeka. Najveći stupnjevi inhibicije izmjereni su kod sojinog mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 (**Tablica 53**). Referentni uzorci bez dodanog meda nisu inhibirali rast *Y. enterocolitica* YE133, a dodatak bagremovog i kestenovog meda osjetno je povećao inhibicijski učinak, osobito za slučaj dodatka 5% meda u mlijeko prije fermentacije. Najviše su rast patogena inhibirali uzorci s dodanih 5% bagremovog meda, i to nefermentirani, polufermentirani, potpuno fermentirani, ali i uzorci supernatanta bez stanica *L. casei* Lc01. Dokazuje to izraziti utjecaj bagremovog meda na povećanje inhibicijskog potencijala sojinog mlijeka sa stanicama *L. casei* Lc01. Nefermentirani uzorci sojinog mlijeka sa stanicama *L. casei* Lc01 i dodanih 5% kestenovog meda također su snažno inhibirali rast *Y. enterocolitica* YE133, ali ipak slabije nego u slučaju bagremovog meda, dok su izmjerene zone inhibicije za polufermentirane uzorke sojinog mlijeka s dodanih 5% kestenovog meda odgovarale vrijednostima srednje inhibicije rasta patogena. Supernatant sojinog mlijeka s dodanih 5% kestenovog meda osjetno je slabije inhibirao rast patogena u usporedbi sa supernatantom s dodanih 5% bagremovog meda.

Kao i kod kozjeg mlijeka, sojino mlijeko fermentirano s *B. longum* Bb46 tek je djelomično inhibiralo rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hinton agaru (**Tablica 54**), ali jedino u slučaju kada je dodan bagremov ili kestenov med. I ovdje su najveće inhibicije zabilježene za polufermentirane uzorke s dodanih 5% bagremovog i kestenovog meda, a supernatant uopće nije inhibirao rast patogena, bez obzira da li je med dodan ili ne.

Identično kao i za kozje i kravlje mlijeko, sojino mlijeko fermentirano s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 slabo je ili uopće nije inhibiralo rast *Y. enterocolitica* YE133, a i dodatak meda nije značajno utjecao na povećanje inhibicijsog potencijala. Zabilježene su tek slabe inhibicije za uzorke s dodanih 2,5 i 5% kestenovog meda. Rezultati koje prikazuje **Tablica 55** ipak sugeriraju vrlo nizak inhibicijski potencijal sojinog mlijeka fermentiranog s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 na rast *Y. enterocolitica* YE133.

S u m a r n o , za sve tri vrste mlijeka, različite probiotičke startere i različite udjele meda, očigledno je da najveći inhibicijski potencijal na rast *Y. enterocolitica* YE133 na Mueller-Hinton agaru su imali uzorci fermentirani *L. casei* Lc01. Inhibicijsko djelovanje bifidobakterija bilo je u znatno nižoj mjeri, osobito kod kravljeg mlijeka. Za sve tri vrsta mlijeka, uzorci fermentirani s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 imali su najniže vrijednosti inhibicije, a i dodatak meda kod njih je najmanje djelovao na povećanje inhibicijskog potencijala. Za ostale uzorke, dodatak bagremovog i kestenovog meda značajno je djelovao na povećanje inhibicijskog potencijala.

Iz svega navedenog, moguće je za daljnja istraživanja postaviti hipotezu da mlijeko fermentirano probiotičkim laktobacilima snažnije inhibira rast *Y. enterocolitica* YE133 nego mlijeko fermentirano bifidobakterijama, osobito ako mu je dodatak neki kompleks s baktericidnim djelovanjem, kakav je med. Za potvrdu ovakve hipoteze potrebna su daljnja istraživanja s više sojeva latobacila i bififobakterija, i uz dodatak nekih drugih antimikrobnih kompleksa, kakav je npr. matična mliječ ili propolis.

5.4. ANALIZA TIJEKA SKLADIŠTENJA KRAVLJEG, KOZJEG I SOJINOG MLIJEKA FERMENTIRANOG PROBIOTIČKIM SOJEVIMA *Lactobacillus casei* LC01, *Bifidobacterium longum* BB46 I *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12

5.4.1. NAKNADNO ZAKISELJAVANJE TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Kretanje pH vrijednosti tijekom čuvanja fermentiranih mliječnih proizvoda vrlo je važan organoleptički parametar. Iako se pri temperaturi hladnjaka (4-6 °C) svi mikrobiološki i biokemijski procesi u fermentiranom mlijeku zaustavljaju, oni se ipak odvijaju vrlo usporeno tijekom određenog vremena skladištenja (Oliveira i sur. 2009b.). I ukoliko je proizvod pakiran aseptično, mliječno kisele bakterije iz starter kulture zadržavaju određenu minimalnu fermentacijsku aktivnost. Stoga je tijekom čuvanja moguć daljnji blagi porast kiselosti, što utječe na promjenu

organoleptičkih svojstava proizvoda, kao što su okus i tekstura (sinereza na površini krutog jogurta) (Güler-Akın i Akın 2007.).

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Promjene pH vrijednosti tijekom 28-dnevnog skladištenja kravljeg mlijeka fermentiranog s tri probiotička startera praćene u ovom radu prikazuje **Slika 54**-**Slika 56**. Rezultati koje prikazuje **Slika 54** pokazuju blagi, gotovo linearni pad pH vrijednosti tijekom skladištenja uzoraka kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01. Vidljivo je da dodatak bagremovog i kestenovog meda nije značajno djelovao na porast kiselosti uzoraka fermentiranog kravljeg mlijeka tijekom skladištenja. Vrijednosti pH bile su niže u uzorcima s dodanim medom (osobito s dodanih 5% kestenovog meda), ali to je uvjetovano krajnjim pH vrijednostima postignutim na kraju fermentacije. Kako je za sve uzorke pad pH vrijednosti bio manji od 0,5 pH jedinica, može se zaključiti da su svi uzorci bili stabilni tijekom čuvanja 28 dana na temperaturi hladnjaka i da im i ostala fizikalno kemijska svojstva nisu bitno promijenjena, jednako za referentne i uzorke s dodanim bagremovim i kestenovim medom.

Isto vrijedi i za uzorke kravljeg mlijeka fermentirane s *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (**Slika 55** i **Slika 56**). Minimalni pad pH vrijednosti ukazuje na visoku fizikalno kemijsku stabilnost fermentiranih uzoraka tijekom 28-dnevnog skladištenja. Jednako kao u slučaju *L. casei* Lc01, niže vrijednosti nakon 28 dana skladišenja uzoraka s dodanim medom posljedica su nižih pH vrijednosti na kraju fermentacije tih uzoraka, dok je razlika početne i završne pH vrijednosti bila minimalna.

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Gotovo iste relacije vrijede i za promjene pH vrijednosti tijekom skladištenja kozjeg mlijeka. $\Delta\left(pH_{poč} - pH_{kon}\right)$ za uzorke skladištenog fermentiranog kozjeg mlijeka bio je još manji nego za uzorke fermentiranog kravljeg mlijeka, bez obzira koji je starter korišten za fermentaciju (**Slika 57**-**Slika 59**). Dodatak bagremovog i kestenovog meda također nije imao utjecaj na promjenu pH vrijednosti u usporedbi s referentnim uzorcima, te se također može utvrditi visoka fizikalno kemijska stabilnost uzoraka kozjeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12. To je moguće stoga jer je kretanje pH vrijednosti direktan indikator ostalih fizikalno kemijskih, ali i teksturalnih promjena tijekom čuvanja fermentiranog mlijeka (Novaković i sur. 1998.).

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

U poglavlju 5.2.1 navedeno je da je dodatak bagremovog i kestenovog meda imao najveći utjecaj na pad pH vrijednosti u sojinom mlijeku. Ta tvrdnja odražava se i na skladištenje uzoraka fermentiranog sojinog mlijeka, jer uzorci s dodanim bagremovim i kestenovim medom ulaze sa značajno nižim pH vrijednostima nego referentni uzorci. Rezultati koje prikazuje **Slika 60** pokazuju da su uzorci sojinog mlijeka fermentiranih s *L. casei* Lc01 i dodanim medom imali pH vrijednost za 1 jedinicu nižu nego referentni uzorci na početku skladištenja, što je posljedica različitih dinamika pada pH vrijednosti tijekom fermentacije. Međutim, isto tako je vidljivo da je pad pH vrijednosti uzoraka fermentiranog sojinog mlijeka s dodanim medom tijekom čuvanja bio gotovo niži nego za referentne uzorke, što dokazuje da dodatak meda nije djelovao na fizikalno kemijsku stabilnost tijekom skladištenja uzoraka *L. casei* Lc01 fermentiranog sojinog mlijeka.

Razlike u početnim pH vrijednostima između referentnih i uzoraka s dodanim bagremovim i kestenovim medom bile su manje kod uzoraka fermentiranih s obje bifidobakterije (**Slika 61**-**Slika 62**) nego kod uzoraka sojinog mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc- 01, ali se jednako kao i za sve ispitivane uzorke može utvrditi stabilan pH tijekom 28 dana skladištenja na temperaturi hladnjaka.

Male razlike u početnim i završnim pH vrijednostima tiiekom 28 skladištenja svih ispitivanih uzoraka u dobroj su mjeri pokazatelj očuvanja fizikalno kemijskih, ali i organoleptičkih svojstava fermentiranog kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka, s dodatkom i bez dodatka meda.

5.4.2. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Cilj ovog rada bio je ispitati različite parametre tijekom fermentacije i skladištenja kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka fermentiranih s odabranim terapijskim sojevima laktobacila i bifidobakterija. Spominjani terapijski minimum broja stanica u proizvodu osnovni je faktor terapijske procjene proizvoda. Terapijski optimum je pak vrijednost broja stanica u proizvodu koja u potpunosti osigurava kolonizaciju i blagotvorno djelovanje u tankom crijevu, a definira se brojem stanica 10^8 i više (Shah 2000.b.). S obzirom na osjetljivost i posebne zahtjeve velike većine probiotičkih sojeva mliječno kiselih bakterija, za terapijsku vrijednost probiotičkog fermentiranog mlijeka od osobite je važnosti održivost soja u fermentiranom mlijeku tijekom skladištenja (Kailasapathy i Chin 2000.). Rezultati dobiveni u ovom radu doprinos su nizu studija koje su se bavile održivošću probiotičkih mliječno kiselih bakterija tijekom skladištenja raznih vrsta fermentiranog mlijeka. Cilj svih tih studija bio je smanjiti intenzitet pada broja stanica probiotika kroz što dulje vrijeme skladištenja.

Kravlje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Slika 63 pokazuje kretanje broja stanica *L casei* Lc01 tijekom skladištenja kravljeg mlijeka s i bez dodatka bagremovog i kestenovog meda. Postotak od broja preživjelih bakterija tijekom 28 dana skladištenja prikazuje **Tablica 56**, a vrijeme zadržavanja broja bakterija na terapijskom minimumu **Tablica 57**. Broj stanica *L. casei* Lc01 opadao je u svim uzorcima različitim intenzitetom do 28. dana skladištenja. Dodatak bagremovog i kestenovog meda djelovao je na održivost soja *L. casei* Lc01 u kravljem fermentiranom mlijeku tijekom skladištenja (**Slika 63**, **Tablica 56**). Broj bakterija *L. casei* Lc01 u fermentiranom kravljem mlijeku opao je preko 20% već nakon 14. dana skladištenja, a u uzorcima s dodanim medom broj *L. casei* Lc01 je opadao vrlo polagano sve do 21. dana skladištenja, a tek između 21. i 28. dana skladištenja zabilježeno je nešto značajnije smanjenje broja stanica. U skladu s time su i podaci za terapijski minimum i optimum (**Tablica 57**). Svi uzorci s dodanim medom zadržali su broj stanica veći od 10^6 nakon 28 dana skladištenja, a uzorci s dodanih 2,5% bagremovog i kestenovog meda imali su nakon 28 dana i broj stanica veći od 10^8. Dodatak bagremovog i kstenovog meda od 5% slabije je djelovao na održivost soja *L. casei* Lc01 nego dodatak od 2,5%.

Za razliku od *L. casei* Lc01, broj odabranih sojeva bifidobakterija održao se u fermentiranom kravljem mlijeku iznad 70% od početnog broja do 21. dana fermentacije. Dodatak meda i za bifidobakterije imao je promotornu ulogu tijekom čuvanja na temperaturi 4 °C, pa je u svim uzorcima fermentiranog kravljeg mlijeka, osim u uzorcima s dodanih 2,5% kestenovog meda, 21. dana fermentacije broj *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 bio čak iznad 80% od početnog broja zabilježenog odmah nakon fermentacije (**Slika 64**, **Slika 65**, **Tablica 58**-**Tablica 61**). Također, zabilježen je različit utjecaj udjela dodanog meda na održivost dva odabrana soja bifidobakterija u odnosu na *L. casei* Lc01. Kod bifidobakterija je veći udio dodanog bagremovog i kestenovog meda (5%) imao bolji utjecaj na održivost oba soja, dok je kod *L. casei* Lc01 udio 5% djelovao na smanjenje održivosti tijekom skladištenja u usporedbi s dodatkom 2,5%. Značajan pad broja stanica bifidobakterija u uzorcima fermentiranog kravljeg mlijeka zabilježen je između 21. i 28. dana fermentacije, najviše u uzorcima bez dodanog meda (28 - 30%), znatno manji u uzorcima s dodanih 2,5% bagremovog i kestenovog meda (do 19%) a najmanji u uzorcima s dodanih 5% bagremovog i kestenovog meda (~ 10%). Također, rezultati mjerenja pokazuju da je u uzorcima s dodanim medom broj bifidobakterija kontinuirano opadao između 14. i 28. dana fermentacije za prosječno 10%, a u uzorcima bez dodanog meda drastičan pad broja stanica je zabilježen tek nakon 21. dana skladištenja. Za sve ispitivane uzorke, s i bez dodanog meda, broj stanica bifidobakterija bio je više od 20 dana skladištenja iznad terapijskog minimuma (**Tablica 59** i **Tablica**

61). Izuzetak je mlijeko fermentirano s *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 bez dodanog meda (**Tablica 61**). Sukladno prethodno navedenim tendencijama, najduže se broj stanica bifidobakterija održao iznad terapijskog minimuma u uzorcima kravljeg fermentiranog mlijeka s dodanih 5% bagremovog i kestenovog meda.

Kozje mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

U nizu naših prethodnih istraživanja, pa tako i u ovom, potvrđena je različita kinetika rasta mliječno kiselih startera tijekom fermentacije kozjeg usporedno s kravljim mlijekom (Slačanac i sur. 2005a.,b., 2007a.). Iz toga slijedi pretpostavka da će i održivost pojedinih sojeva mliječno kiselih bakterija tijekom skladištenja biti različita u ove dvije vrste mlijeka.

Promjene broja stanica *L. casei* Lc01 tijekom 28-dnevnog čuvanja na temperaturi hladnjaka (+4 °C) prikazuje **Slika 66**, a tendencije promjene i očuvanja terapijskog minimuma prikazuju **Tablica 62** i **Tablica 63**. Različito od kravljeg fermentiranog mlijeka, u uzorcima kozjeg fermentiranog mlijeka bez dodanog meda održivost soja *L. casei* Lc01 bila je viša od 70% nakon 21 dana skladištenja, a znatniji pad broj stanica zabilježen je tek između 21. i 28. dana čuvanja (18%). I u kozjem fermentiranom mlijeku dodatak bagremovog i kestenovog meda imao je profilaktički učinak na održivost broja stanica *L. casei* Lc01 tijekom skladištenja. Kao i kod kravljeg fementiranog mlijeka, dodatak meda u udjelu 2,5% nešto je bolje djelovao na održivost broja stanica u usporedbi s većim udjelom dodanog bagremovog i kestenovog meda. Unatoč tome, svi uzorci kozjeg fermentiranog mlijeka, s i bez dodanog meda, zadržali su broj stanica iznad terapijskog minimuma više od 27 dana skladištenja, a uzorci s dodanim medom imali su koncentraciju stanica iznad 10^8 tijekom cjelokupnog 28-dnevnog skladištenja, osim uzoraka s dodanih 5% kestenovog meda, koji su također zadržali vioki udio stanica ekvivalentan terapijskom optimumu duže od 21 dana čuvanja na +4 °C (**Tablica 63**). S obzirom na rezultate naših studija i studija drugih autora koji potvrđuju prekiseljavanje kozjeg fermentiranog mlijeka tijekom fermentacije i skladištenja (Božanić i Tratnik 2001.; Kongo i sur. 2006.), ovo je vrlo bitan podatak jer potvrđuje izuzetno pozitivno djelovanje meda na održivost soja *L. casei* Lc01 tijekom čuvanja.

Pozitivan utjecaj dodatka bagremovog i kestenovog meda zabilježen je i rezultatima održivosti dva odabrana soja bifidobakterija tijekom skladištenja, ali manje izražen nego u slučaju *L. casei* Lc01 (**Slika 67** i **Slika 68**, **Tablica 64** i **Tablica 66**). Iz navedenih rezultata vidljivo je da je bila znatno manja održivost stanica *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 u kozjem fermentiranom mlijeku u usporedbi s *L. casei* Lc01, ali je također očito da dodatak bagremovog i kestenovog meda i u ovom slučaju ima pozitivan utjecaj na održivost sojeva bifidobakterija u kozjem fermentiranom

mlijeku. Vrijednosti broja stanica oba ispitivana soja bifidobakterija s dodanim bagremovim medom nakon 28 dana skladištenja bile su niže nego kod *L. casei* Lc01, ali su također bile veće od terapijskog minimuma duže od 20 dana skladištenja (**Tablica 65** i **Tablica 67**). U skladu s rezultatima niza prethodnih studija rađenih na fermentiranom kravljem i kozjem mlijeku (Slačanac i sur. 2004a., 2005a.) su i rezultati ovog rada, koji pokazuju da *B. longum* Bb46 bolje raste i održava se u kozjem (kao i kravljem) mlijeku nego *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, koji je istaknuti humani probiotik, ali vrlo slabih tehnoloških svojstava, u koje se ubrajaju i fermentabilna sposobnost i održivost tijekom čuvanja (Florence i sur. 2014.).

Sojino mlijeko fermentirano probioticima uz dodatak meda

Iako sojino mlijeko predstavlja u biti biljni ekstrakt, potpuno različitih svojstava od mlijeka animalnog podrijetla, slične tendencije zabilježene su kao i kod kravljeg i kozjeg mlijeka za sva tri ispitivana probiotička soja (**Slika 69**-**Slika 71**, **Tablica 68**-**Tablica 73**). Iako fermentabilni šećer u sojinom mlijeku nije laktoza, dodatak meda pokazao se dobrim promotorom održivosti ispitivanih probiotičkih sojeva u sojinom mlijeku. Dapače, za razliku od mlijeka animalnog podrijetla, dodatak višeg udjela bagremovog i kestenovog meda (5%) izuzetno je pozitivno djelovao na održivost bifidobakteija tijekom skladištenja, te je stoga i terapijski minimum i optimum u tim uzorcima bio iznimno visok tijekom cijelog perioda 28-dnevnog skladištenja (**Tablica 71** i **Tablica 73**). Razlog tome teoretski je vjerovatno bolji izvor fermentabilnog šećera (glukoza, transformirana fruktoza) koji nudi dodatak meda sojinom mlijeku u odnosu na teže fermentabilne rafinozu i stahiozu koje dominiraju u sojinom ekstraktu (Božanić 2006.).

Općeniti zaključak koji se može izvući iz prethodno komentiranih rezultata ovog istraživanja tijekom 28-dnevnog skladištenja u sve tri vrste mlijeka je da dodatak obje vrste meda pozitivno djeluje na održivost sva tri probiotička soja u obje vrste mlijeka animalnog podrijetla i sojinom mlijeku (ekstraktu). Navedene varijacije su normalne i očekivane, a vezane su uz sastav i građu fermentabilnog medija i osobine probiotičkog soja.

5.5. SENZORSKA ANALIZA UZORAKA

Jedan od ključnih uvjeta i najvećih tehnoloških problema u tehnološkom pogledu kada su u pitanju fermentacije osjetljivim probiotičkim sojevima je dobiti proizvod prihvatljivih senzorskih svojstava (Tratnik 1998.). U ovom istraživanju je to izuzetno važno, jer se uz navedeno mlijeku prije fermentacije dodaje med, različitog sastava i podrijetla, za koji se ne zna kako će nakon biokemijskih fermentacijskih procesa djelovati na ukupnu organoleptičkiu kakvoću proizvoda.

Rezultate senzorskih ispitivanja uzoraka priređenih u ovom istraživanju, provedenih prema metodama opisanim u poglavlju 3.3.7. prikazaju **Slika 72**-**Slika 74** i **Tablica 74**.

Istraživanja drugih autora (Sert i sur. 2011.; Varga 2006.) su pokazala da med, ovisno o vrsti, u koncentraciji oko 3% značajno poboljšava senzorsku kakvoću gotovog proizvoda dajući mu optimalnu slatkoću. Suprotno tome su jogurti koji sadrže niže i više koncentracije opisani kao proizvodi sa slabom, odnosno prejakom aromom. Slični zaključci se mogu izvući iz ovih rezultata, gdje su znatno više ocjene dobili proizvodi s dodatkom meda, a optimalna koncentracija je ovisila o vrsti meda.

Uzorci fermentiranog kravljeg i kozjeg mlijeka dobili su vrlo slične ocjene (**Slika 72** i **Slika 73**), s tim što su nešto više ocjene dobili uzorci s medom, sugerirajući na pozitivan utjecaj ovog prirodnog zaslađivača na senzorska svojstva. Proizvodi fermentirani laktobacilima u usporedbi s onima fermentiranim bifidobakterijama su imali znatno jače izraženu kiselost, što je uvelike utjecalo na nižu ocjenu okusa, pa tako i ukupnu ocjenu, ovog proizvoda. Može se primijetiti da se bagremov med i u nižoj i u višoj koncentraciji dobro uklopio u većinu pripremljenih uzoraka, dok su proizvodi s 5% kestenovog meda uglavnom dobili niže ocjene, s komentarima o prejako izraženoj aromi po kestenu, neprihvatljivoj većini ocjenjivača. Ovaj podatak ne čudi budući da je bagremov med vrlo cijenjen na tržištu zbog svog blagog i ugodnog okusa, dok je med kestena karakterističnog intenzivnog mirisa i pomalo gorkastog okusa, što u većim koncentracijama dolazi do izražaja (Persano Oddo i Piro 2004.).

Najveći pozitivni utjecaj meda na ocjene probiotičkih proizvoda zabilježene su kod probiotičkog sojinog mlijeka, gdje su svi uzorci bez dodatka meda redom ocjenjeni neprihvatljivima (10,1; 10,4; 9,8), dok ih dodatak meda svrstava u kategoriju proizvoda s osrednjom i dobrom, pa čak i izvrsnom kakvoćom (**Tablica 74**). Najniže ocjene kontrolnih uzoraka fermentiranog sojinog mlijeka (**Slika 74**) su posljedica nepoželjnih senzorskih svojstava koji su primjećeni kod ovih proizvoda (žućkasta boja, pukotine na površini i izdvajanje sirutke), a kao glavni nedostaci, ovih proizvoda navedeni su neugodan miris, graškasti sirovi okus i nedostatak karakteristične arome fermentiranog mlijeka, što su zamijetili i drugi autori (Nawaz i sur. 2007.; Yang i Li 2010.). Bitno je istaknuti da su ovdje, za razliku od kravljeg i kozjeg probiotičkog napitka, najbolje ocjenjeni proizvodi s 5% kestenovog meda, neovisno o upotrijebljenom soju. Pretpostavlja se da su ovdje intenzivan okus i aroma kestenovog meda, koji su u kravljem i kozjem mlijeku opisani kao nepoželjni, pozitivno utjecali na organoleptička svojstva prikrivajući tako neugodan graškasti okus soje. Dodatno, kod fermentacije sojinog mlijeka pomoću *L. casei* Lc01 ovako velika količina meda,

osim što prikriva nepoželjnu aromu čistog sojinog mlijeka, daje i potrebnu slatkoću proizvodima fermentiranim ovom bakterijom. Dodatak meda je značajno pridonio višim ocjenama svih ispitivanih senzorskih svojstava (izgled, okus, miris, boja, konzistencija), te se može zaključiti da se odgovarajućim dodatkom meda senzorska kakvoća probiotičkog sojinog napitka neprihvatljivog mnogim potrošačima može u velikoj mjeri poboljšati.

O s n o v n i zaključak proizašao iz senzorskog ispitivanja, a koji je bitan za ovo istraživanje, je da je dodatak bagremovog i kestenovog meda prije fermentacije kod većine pripremljenih uzoraka pozitivno utjecao na senzorska svojstva, neovisno o vrsti mijeka i upotrijebljenom probiotičkom starteru.

* * *

Iz svega navedenoga može se zaključiti da r e z u l t a t i o v o g a i s t r a ž i v a n j a potvrđuju osnovnu hipotezu da dodatak meda, ovisno o vrsti i koncentraciji, pozitivno utječe na rast, aktivnost i preživljavanje probiotičkih bakterija u kravljem, kozjem i sojinom mlijeku, odnosno fermentiranom mliječnom proizvodu. Dokaz toga su značajno brži pad pH vrijednosti, te veći broj *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 na kraju fermentacije, ali i tijekom cijelog vremena skladištenja, u uzorcima s dodatkom meda u odnosu na referentne uzorke. Također je dokazana pretpostavka da med dodan u mlijeko povećava antibakterijski potencijal dobivenog sinbiotičkog proizvoda prema patogenim bakterijama *L. monocytogenes* FSL N1-017 i *Y. enterocolitica* YE133, a stupanj inhibicije značajno ovisi o vrsti i udjelu meda, vrsti probiotičke kulture te vrsti mlijeka. Razlog tomu vjerojatno leži u kompleksnosti sastava različitih mlijeka, koje različiti sojevi uz dodatak različitih vrsta i koncentracija meda različito metaboliziraju. Međutim, kako bi se razjasnile ove korelacije potrebno je provesti daljnja istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ✓ Sastav i fizikalno-kemijska svojstva kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka korištenih u ovom istraživanju bila su u rangu njihovih prirodnih vrijednosti, uz vrlo mala odstupanja i devijacije. Sve tri vrste mlijeka korištene za fermentaciju imale su prosječno sličan udio ukupne suhe tvari (između 11-12%) i ukupnih proteina (oko 3%). Kozje mlijeko imalo je prosječno najveći udio mliječne masti, dok je sojino mlijeko imalo najmanji udio ukupne masti te najmanji udio ugljikohidrata. Sojino mlijeko imalo je nešto nižu kiselost (pH=6,97) od animalnih mlijeka (kravlje pH=6,64; kozje pH=6,55).
- ✓ Rezultati su pokazali da je kestenov med imao nešto viši udio suhe tvari, reducirajućih šećera, saharoze, hidroksimetilfurfurala i tvari netopljivih u vodi, te značajno viši udio mineralnih tvari (0,94%), veću kiselost (16,2 $mmol \cdot kg^{-1}$) i aktivnost dijastaze (24,6) nego bagremov med (0,06%; 9,7 $mmol \cdot kg^{-1}$; 10,2). Različiti kemijski sastavi i fizikalno-kemijska svojstva bagremovog i kestenovog meda sugeriraju njihovo različito djelovanje na ponašanje korištenih probiotičkih startera tijekom fermentacije i skladištenja, što su daljnji rezultati ovog istraživanja i potvrdili.
- ✓ Analiza kinetike pada pH vrijednosti tijekom fermentacije pokazala je različit utjecaj dodatka meda u sve tri vrste mlijeka (kravlje, kozje i sojino) fermentiranih sa sva tri ispitivana probiotička startera (*Lactobacilus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12). U sve tri vrste mlijeka i za sva tri startera dodatak bagremovog odnosno kestenovog meda djelovao je na brži pad pH vrijednosti tijekom fermentacije, ali su varijacije bile znatne ovisno o vrsti mlijeka koje se fermentira, vrsti dodanog meda te udjelu dodanog meda: u kravljem je mlijeku kestenov med jače djelovao na pad pH vrijednosti nego bagremov; u kozjem je dodatak 5% meda djelovao inhibitorno, dok je u sojinom mlijeku med ubrzavao pad pH vrijednosti bez obzira na vrstu i količinu dodatka (u fermentaciji s *L. casei* 9-10 sati brže postizanje pH=4,6). Slično, dinamika pada pH vrijednosti bila je različita za soj laktobacila u odnosu na sojeve bifidobakterija, ali i između dva ispitivana soja bifidobakterija, što sugerira različitu dinamiku biokemijskih reakcija tijekom mliječno kisele fermentacije, uvjetovanu sa sva četiri ispitivana čimbenika (vrsta mlijeka, soj probiotičkog startera, vrsta meda, udio dodanog meda). Pad pH vrijednosti bio je općenito brži u uzorcima fermentiranim s *L. casei*, nego u onima fermentiranim bifidobakterijama; među bifidobakterijama je dužu stacionarnu fazu (0,138-1,301 h) i nižu maksimalnu brzinu pada pH vrijednosti (0,104-0,158 h^{-1}) imao *B. longum*, u usporedbi s *B. lactis* (0,106-0,686 h i 0,117-0,302 h^{-1}).

- ✓ Rezultati mikrobioloških analiza (kretanje broja stanica probiotičkog startera) i vrijednosti izračunatih kinetičkih parametara pokazuju kompleksnost interakcija tijekom mliječno kisele fermentacije: slično kao i za dinamiku promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije sva tri ispitivana faktora u ovom istraživanju različito su djelovala na promjenu broja stanica *Lactobacilus casei* Lc01, *Bifidobacterium longum* Bb46 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 tijekom fermentacije. Dobivene podatke je vrlo teško komentirati i zahtijevaju niz daljih biokemijskih ispitivanja, ali rezultati ovog istraživanja jasno pokazuju tendencije: Iako nije pravi prebiotik med se pokazao kao izrazito dobar promotor sva tri ispitivana soja u sve tri vrste mlijeka. Kao optimalan udio meda (i bagremovog i kestenovog) se pokazao dodatak od 2,5% (što pokazuje najveći broj živih stanica probiotika na kraju fermentacije u uzorcima s dodatkom ovog udjela meda). Kod fermentacije bifidobakterijama i dodatak 5% bagremovog meda je također djelovao izrazito stimulatorno.

- ✓ Ispitivanje inhibicije rasta patogenih sojeva psihrotrofnih bakterija *Listeria monocytogenes* FSL N1-017 i *Yersinia enterocolitica* YE133, odgovornih za niz slučajeva trovanja hranom u svijetu, pomoću uzoraka fermentiranih mlijeka potvrdili su hipotezu o određenom inhibicijskom djelovanju probiotičkog fermentiranog mlijeka na rast entero- i uropatogena. Stupanj inhibicije bio je različit za ova dva patogena, a značajno je ovisio o vrsti fermentiranog mlijeka, upotrijebljenom soju probiotičke bakterije, te vrsti i udjelu dodanog meda. Općeniti zaključak je da su svi fermentirani uzorci, bez obzira na gore navedeno, jače inhibirali rast Gram-negativne bakterije *Y. enterocolitica* YE133 nego soja *L. monocytogenes* FSL N1-017 (Gram-pozitivna) na Mueller-Hinton agaru. Također, dodatak kestenovog meda je jače utjecao na povećanje inhibitornog djelovanja svih uzoraka.

- ✓ Kozje fermentirano mlijeko statistički je značajno jače inhibiralo rast soja *L. monocytogenes* FSL N1-017 nego kravlje fermentirano mlijeko, bez obzira na probiotički soj korišten za fermentaciju i dodani med, a fermentirano sojino mlijeko najslabije. Iz rezultata ispitivanja očigledno je da je dodatak obje vrste meda povećavao inhibicijski kapacitet sve tri vrste fermentiranog mlijeka prema *L. monocytogenes* FSL N1-017.

- ✓ Još značajniji utjecaj dodatka bagremovog i kestenovog meda na inhibicijski potencijal sve tri vrste fermentiranog mlijeka, neovisno o probiotičkom soju korištenom za fermentaciju, zabilježen je u slučaju ispitivanja inhibicije rasta *Y. enterocolitica* YE133. Rezultati ispitivanja rasta soja *Y. enterocolitica* YE133 pomoću kozjeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01 kojem je dodano 5% bagremovog odnosno kestenovog meda pokazuju potencijalno letalno djelovanje na *in vitro* rast ove patogene bakterije (zone inhibicije su bile veće od 25 mm), dok su uzorci sve tri vrste mlijeka s bifidobakterijama imali slabiji inhibicijski utjecaj. I kod

inhibicije rasta *Y. enterocolitica* YE133, sojino fermentirano mlijeko imalo je najslabiji inhibicijski potencijal, ali ga je ipak dodatak obje vrste meda u nekoj mjeri povećao.

- ✓ Vrlo bitan podatak, koji proizlazi iz treće faze ovog istraživanja, je da je dodatak obje vrste meda u sve tri vrste mlijeka djelovao pozitivno na održivost sva tri ispitivana probiotička soja tijekom 28-dnevnog skladištenja. U uzorcima kravljeg mlijeka fermentiranog s *L. casei* Lc01, *B. longum* Bb46 i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 dodatak meda utjecao je na održivost terapijskog minimuma i optimuma do 14 dana duže nego u uzorcima bez dodanog meda. Održivost sojeva bifidobakterija tijekom skladištenja sve tri vrste fermentiranog mlijeka bila je manja u usporedbi s održivosti *L. casei* Lc01. Održivost sva tri probiotička soja bila je tijekom skladištenja veća u kozjem fermentiranom mlijeku nego u kravljem, ali je i u ovom slučaju dodatak obje vrste meda pozitivno djelovao na održivost ispitivanih sojeva. Najmanja održivost ispitivanih probiotičkih sojeva tijekom skladištenja bila je u sojinom mlijeku, uz ponovnu konstataciju pozitivne uloge dodatka obje vrste meda.
- ✓ Male razlike u početnim i završnim pH vrijednostima tijekom 28-dnevnog skladištenja svih ispitivanih uzoraka u dobroj su mjeri pokazatelj očuvanja fizikalno kemijskih, ali i organoleptičkih svojstava fermentiranog kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka, s dodatkom i bez dodatka meda. Dodatak meda nije značajno djelovao na naknadno zakiseljavanje proizvoda. Niže pH vrijednosti u uzrocima s dodatkom meda tijekom čuvanja posljedica su nižih pH vrijednosti u ovim uzorcima na kraju fermentacije.
- ✓ Dodatak meda je poboljšao senzorska svojstva svih fermentiranih proizvoda, a najveći pozitivni utjecaj je imao na proizvode od fermentiranog sojinog mlijeka, koji su bez ovog dodatka ocijenjeni kao neprihvatljivi.
- ✓ Iz svega navedenoga se može zaključiti da su rezultati ovog istraživanja potvrdili osnovnu hipotezu da dodatak bagremovog i kestenovog meda pozitivno utječe na rast, aktivnost i preživljavanje *L. casei, B. longum, B. lactis* u kravljem, kozjem i sojinom mlijeku. Utjecaj meda na promatrane parametre je značajno ovisio o vrsti i koncentraciji, ali i vrsti mlijeka i soju probiotika. Razlog tomu vjerojatno leži u kompleksnosti sastava različitih mlijeka, koje različiti sojevi uz dodatak različitih vrsta i koncentracija meda različito metaboliziraju. Međutim, kako bi se razjasnile ove korelacije potrebno je provesti daljnja istraživanja.

7. LITERATURA

Allerberger F, Wagner M: Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16(1):16–23. 2010.

Al-Waili NS, Salom K, Butler G, Al Ghamdi AA: Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *Journal of medicinal food*. 14(10):1079–96. 2011.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I: Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*. 17(6):454–61. 2006.

Arai S: Studies on functional foods in Japan : State of the art. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 60(1):9–15. 1996.

Axelsson L: Lactic acid bacteria: classification and physiology. U *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*, prir. & Salminen, S., A von Wright, str. 1–72. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998.

Aygun O, Pehlivanlar S: Listeria spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control*. 17(8):676–79. 2006.

Begley M, Hill C, Gahan CGM: Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*. 72(3):1729–38. 2006.

Behrens J, Roig S, Da Silva M: Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. *Acta Alimentaria*. 33(2):101–9. 2004.

Berk Z: *Technology of production of edible flours and protein*. FAO Agricultural services bulletin No. 97, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 1992.

Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T: Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 105(2):822–28. 2007.

Bisig W, Eberhard P, Collomb M: Influence of processing on the fatty acid composition and the content of conjugated linoleic acid in organic and conventional dairy products-a review. *Le Lait*. 87:1–19. 2007.

Bizani D, Morrissy J a C, Dominguez APM, Brandelli A: Inhibition of Listeria monocytogenes in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International journal of food microbiology*. 121(2):229–33. 2008.

Bogdanov S: Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Center. www. apis. admin. ch/english/pdf/BeeProducts/AntibacterialInternet. pdf. (8):1–10. 1997.

Bogdanov S: *Honey as Nutrient and Functional Food*. www.bee-hexagon.net. 2012.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P: Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*. 27(6):677–89. 2008.

Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L: Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 35:4–17. 2007.

Božanić R: Utjecaj vrste i sastava mlijeka na aktivnost intestinalnih bakterija mliječne kiseline i kakvoću fermentiranih napitaka. Sveučilište u Zagrebu. 2000.

Božanić R: Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo*. 56(3):233–54. 2006.

Božanić R, Tratnik L: Quality of cow's and goat's fermented bifido milk during storage. *Proteins*. 3(2):2–25. 2001.

Bubonja M, Vučković D: Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. *Medicina*. 15–20. 2007.

Buller HA, Grand RJ: Lactose intolerance. *Annual review of medicine*. 41:141–48. 1990.

Bylund G: *Dairy processing handbook*. Lund: Tetra Pak processing Systems AB. 1995.

Cai H, Rodríguez BT, Zhang W, Broadbent JR, Steele JL: Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus casei strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology (Reading, England)*. 153(Pt 8):2655–65. 2007.

Champagne CP, Green-Johnson J, Raymond Y, Barrette J, Buckley N: Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with Streptococcus thermophilus. *Food Research International*. 42(5-6):612–21. 2009.

Chen H, Hoover DG: Bacteriocins and their food applications. *reviews in food science and food safety*. 2: 2003.

Chou CC, Hou JW: Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *International journal of food microbiology*. 56(2-3):113–21. 2000.

Christensen JE, Dudley EG, Pederson J a, Steele JL: Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76(1-4):217–46. 1999.

Collomb M, Schmid A, Sieber R, Wechsler D, Ryhanen EL: Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*. 16:1347–61. 2006.

Cozmuta AM, Cozmuta LM, Varga C, Marian M, Peter A: Effect of thermal processing on quality of polyfloral honey. *Romanian Journal of Food Science*. 1(1):45–52. 2011.

De Vuyst L, Leroy F: Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 13(4):194–99. 2007.

Devi DK, Sankar S: Synergistic effect of bacteriocin obtained from fermented goat and cow milk against pathogens (E. Coli, staphylococcus and pseudomonas). *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 4(2):605–8. 2010.

Dia VP, Torres S, De Lumen BO, Erdman JW, Gonzalez De Mejia E: Presence of Lunasin in Plasma of Men after Soy Protein Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4):1260–66. 2009.

Dixit AK, Antony JIX, Sharma NK, Tiwari RK: Soybean constituents and their functional benefits. . 367–83. 2011.

Donkor ON: Influence of probiotic organisms on release of bioactive compounds in yoghurt and soy yoghurt. Victora University, Werribee Campus, Australia. 2007.

Donkor ON, Henriksson a., Vasiljevic T, Shah NP: α-Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*. 104(1):10–20. 2007a.

Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP: Rheological Properties and Sensory Characteristics of Set-Type Soy Yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(24):9868–76. 2007b.

Duraković S: *Primijenjena mikrobiologija*. Zagreb: Durieux. 1996.

Ernst PB, Gold BD: The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Review of Microbiology*. 54(1):615–40. 2000.

FAO/WHO: Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario. 2002.

Farnaud S, Evans RW: Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*. 40(7):395–405. 2003.

Fernandes R: *Microbiology Handbook Dairy Products*. Leatherhead Food International and RSC Publishi. 2009.

Florence ACR, Béal C, da Silva RC, Oliveira MN: Survival of three Bifidobacterium animalis subsp. lactis strains is related to trans-vaccenic and α-linolenic acids contents in organic fermented milks. *LWT - Food Science and Technology*. 56(2):290–95. 2014.

Fondén R, Saarela M, Mättö J, Mattila-Sandholm T: Lactic acid bacteria in functional dairy products. U *Functional dairy products*, Tom 1, prir. T Mattila-Sandholm, M Saarela, str. 244-62. CRC Press. 2003.

Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR: Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International dairy journal*. 9(1):53–61. 1999.

Fox PF: The major constituents of milk. U *Dairy Processing: Improving Quality*, prir. G Smit, str. 5–41. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited. 2003.

Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME: Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*. 47(1-2):1–24. 1999.

Fukushima D: Recent progress in research and technology on soybeans. *Food science and technology research*. 7(1):8–16. 2001.

Gahan CGM, Hill C: Listeria monocytogenes: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 4(FEB):9. 2014.

Gardiner GE, Ross RP, Kelly PM, Stanton C, Collins JK, Fitzgerald G: Microbiology of therapeutic milks. U *Dairy Microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products*, prir. RK Robinson, str. 431–78. New York: John Wiley and Sons, Inc. Third Edit izd. 2002.

Gauthier SF, Pouliot Y, Maubois JL: Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Lait*. 86(2):99–125. 2006.

Gibson GR, Roberfroid MB: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 125(6):1401–12. 1995.

Gill HS, Guarner F: Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate medical journal*. 80(947):516–26. 2004.

Gobbetti M: Bioactive Ppetides in Dairy Products. U *Handbook of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood and Vegetables*, prir. YH Hui. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2007.

Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG: Angiotensin I - converting - enzyme - inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International journal of dairy technology*. 57:172–88. 2004.

Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG: Bioactive peptides in dairy products. U *Handbook of Food Products Manufacturing*, prir. YH Hui, str. 489–517. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2007.

Golob T, Doberšek U, Kump P, Nečemer M: Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. 91(4):593–600. 2005.

Gomez M: Bifidobacterium spp. And Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol*. 10: 1999.

Grajek W, Olejnik A: Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*. 52(3):665–71. 2005.

Grieshop CM, Kadzere CT, Clapper GM, Flickinger EA, Bauer LL, Frazier RL, Fahey GCJ: Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(26):7684–91. 2003.

Güler-Akın MB, Akın MS: Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chemistry*. 100(2):788–93. 2007.

Haddadin MSY, Jamal Abu Raddad INS, Robinson RK: Effect of Honey on the Growth and Metabolism of Two Bacterial Species of Intestinal Origin. *Pakistan Journal of Nutrition*. 6(6):693–97. 2007.

Haenlein G: Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51(2):155–63. 2004.

Hammes WP, Hertel C: Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Research International*. 35(2-3):165–70. 2002.

Hashemipour MA, Tavakolineghad Z, Arabzadeh SAM, Iranmanesh Z, Nassab SAHG: Antiviral activities of honey, royal jelly, and acyclovir against HSV-1. *Wounds*. 26(2):47–54. 2014.

Hirayama K, Rafter J: The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and infection Institut Pasteur*. 2(6):681–86. 2000.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B: The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 5(10):971–74. 2004.

Huebner J, Wehling R, Hutkins R: Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*. 17(7):770–75. 2007.

ISO: (TC 34) SC 12 (Secretariat - 139) E : «Sensory analysis» DC. 1985.

Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S: Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2 Suppl):444S – 450S. 2001.

Kailasapathy K, Chin J: Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. *Immunology and cell biology*. 78(1):80–88. 2000.

Kajiwara S, Gandhi H, Ustunol Z: Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal Bifidobacterium spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *Journal of food protection*. 65(1):214–18. 2002.

Kongo JM, Gomes a M, Malcata FX: Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of Bifidobacterium animalis and Lactobacillus acidophilus in a controlled bioreactor. *Letters in applied microbiology*. 42(6):595–99. 2006.

Korhonen H, Pihlanto A: Bioactive peptides : Production and functionality. *International dairy journal*. 16(9):945–60. 2007.

Korhonen H, Pihlanto - Leppälä A: Milk - derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. U *Handbook of functional dairy products*, prir. C Shortt, J O'Brien, str. 109–24. Boca Raton: CRC Press. 2004.

Kramarenko T, Roasto M, Meremäe K, Kuningas M, Põltsama P, Elias T: Listeria monocytogenes prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*. 30(1):24–29. 2013.

Kuncič MK, Jaklič D, Lapanje A, Gunde-Cimerman N: Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *British Journal of Biomedical Science*. 69(4):154–58. 2012.

Kushal R, Anand S: Evaluation of the virulence potential of Yersinia enterocolitica isolates from milk by cell invasion-inhibition assay. *Le Lait*. 86:171–76. 2006.

Kwon D, Jang J, Hong S, Lee J, Sung S, Park H, Park S: Long-term consumption of fermented soybean-derived Chungkookjang enhances insulinotropic action unlike soybeans in 90% pancreatectomized diabetic rats. *European Journal of Nutrition*. 46(1):44–52. 2007.

Leblanc JG, Silvestroni A, Connes C, Juillard V, Giori GS De, Piard J: Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk : application of engineered lactic acid bacteria that produce α - galactosidase. . 3(3):432–40. 2004.

Lee Y, Salminen S: *Handbook of probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Yersey. 2. izd. 2009.

Lim Y-S, Lee S-K: Characteristics of Cow Milk and Goat Milk Yogurts Fermented by Streptococcus thermophilus LFG Isolated from Kefir. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 33(6):787–95. 2013.

Lonnerdal B: Soybean ferritin : implications for iron status of vegetarians. *Am J Clin Nutr*. 89(suppl):1680S – 1685S. 2009.

Lourens-Hattingh A, Viljoen BC: Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11(1-2):1–17. 2001.

Lučan M, Slačanac V, Hardi J, Mastanjević K, Babić J, Krstanović V, Jukić M: Inhibitory effect of honey-sweetened goat and cow milk fermented with Bifidobacterium lactis Bb-12 on the growth of Listeria monocytogenes. *Mljekarstvo*. 59(2):96–106. 2009.

Mandić ML, Primorac L, Klapec T, Perl A: *Senzorske analize*. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet. 2000.

Marcos A, Warneberg J, Nova E, Gomez S, Alvarez A, Alvarez R, Mateos JA, Cobo JM: The effect of milk fermented by yogurt cultures plus Lactobacillus casei DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *European journal of nutrition*. 43(6):381–89. 2004.

Marteau P, Seksik P, Jian R: Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *The British journal of nutrition*. 88 Suppl 1:S51–57. 2002.

Martín-Diana a. B, Janer C, Peláez C, Requena T: Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 13(10):827–33. 2003.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe R V.: Food-related illness and death in the United States. 2000.

Millette M, Luquet FM, Lacroix M: In vitro growth control of selected pathogens by Lactobacillus acidophilus- and Lactobacillus casei-fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*. 44(3):314–19. 2007.

Molan PC: The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. 73(1):5–28. 1992a.

Molan PC: The antibacterial activity of honey: 2 . Variation in the potency of the antibacterial activity Variation in antibacterial activity. *Bee World*. 73(2):59–76. 1992b.

MPS: Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (2000), Zagreb, Narodne novine, broj 20 (NN 20/00). 2000.

Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW: Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International journal of food microbiology*. 97(1):1-8. 2004.

Nawaz H, Ahmad MM, Hussain S: Physico-chemical and Sensory Evaluation of Ready to Drink Soy-cow Milk Blend. *Better Nutrition*. 6(3):283–85. 2007.

Nes I, Yoon S, Diep D: Ribosomally synthesiszed antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*. 16(5):675–90. 2007.

Novaković P, Kordić J, Slačanac V: Reološke osobine kozjeg i kravljeg acidofilnog mlijeka tijekom skladištenja. *Mljekarstvo*. 48(2):75–86. 1998.

Oliveira RPDS, Perego P, Converti A, De Oliveira MN: Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with Streptococcus thermophilus. *Journal of Food Engineering*. 91(1):133–39. 2009a.

Oliveira RPDS, Perego P, Converti A, De Oliveira MN: Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with Streptococcus thermophilus: The effect of inulin. *LWT - Food Science and Technology*. 42(5):1015–21. 2009b.

Omoni AO, Aluko RE: Soybean Foods and Their Benefits: Potential Mechanisms of Action. *Nutrition Reviews*. 63(8):272–83. 2005.

Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell E a: Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Veterinary microbiology*. 114(1-2):1–15. 2006.

Ortiz L, Ruiz F, Pascual L, Barberis L: Effect of two probiotic strains of Lactobacillus on in vitro adherence of Listeria monocytogenes, Streptococcus agalactiae, and Staphylococcus aureus to vaginal epithelial cells. *Current microbiology*. 68(6):679–84. 2014.

Østlie HM, Helland MH, Narvhus J a: Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*. 87(1-2):17–27. 2003.

Palframan R, Gibson GR, Rastall R a.: Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*. 37(4):281–84. 2003.

Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA: Effect of pH and Dose on the Growth of Gut Bacteria on Prebiotic Carbohydrates in vitro. *Anaerobe*. 8(5):287–92. 2002.

Park YW: Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*. 14:151–59. 1994.

Park YW: Goat milk - Chemistry and Nutrition. U *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, prir. YW Park, GFW Haenlein, str. 34–58. Ames, Iowa, Oxford: Blackwell Publishers. 2006.

Park YW: Bioactive Components in Milk and Dairy Products. , prir. YW Park. Wiley-Blackwell. 2009.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW: Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68(1-2):88–113. 2007.

Parvez S, Malik K a, Ah Kang S, Kim H-Y: Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*. 100(6):1171–85. 2006.

Pavlović H, Hardi J, Slačanac V: Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by Bifidobacterium longum on Serratia marcescens and Campylobacter jejuni. *Czech journal of food Science*. 24(4):164–71. 2006.

Persano Oddo L, Piro R: Main European unifloral honeys : descriptive sheets. *Apidologie*. 35:38–81. 2004.

Potter SM, Baum JA, Teng G, Stillman RJ: Soya Protein and Isoflavones: Their Effect on Blood Lipids and Bone Density in Postmenopausal Women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 68(6):1366–77. 1998.

Pouliot Y, Gauthier SF: Milk growth factors as health products: Some technological aspects. *International Dairy Journal*. 16:1415–20. 2006.

Qiang X, YongLie C, QianBing W: Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 77(3):435–41. 2009.

Riaz M: Soybeans as functional foods. *Cereal foods world*. (2): 1999.

Riazi A, Ziar H: Growth and viability of yogurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk. *Journal of Biotechnology*. 7(12):2055–63. 2008.

Rogelj I, Bogovič-Matijašič B: Bacteriocins of lactic acid bacteria-properties, range of inhibitory activity and methods of detection. *Food Technology and Biotechnology*. 32(4):171–75. 1994.

Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*. 84(3):197–215. 2000.

Samaržija D, Tudor M, Prtilo T, Špehar ID, Zamberlin Š, Havranek J: Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje. *Mljekarstvo*. 59(1):28–32. 2009.

Savci Z, Sezgin E, Yildirim Z: Enhancing keeping quality of raw cow's, sheep's and goat's milks by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*. 57(1):13–15. 2002.

Scalabrini P, Rossi M, Spettoli P, Matteuzzi D: Characterization of Bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation. *International journal of food microbiology*. 39(3):213–19. 1998.

Scammell AW: Production and uses of colostrum. *Australian journal of dairy technology*. 56(2):74–82. 2001.

Schanbacher FL, Talhouk RS, Murray FA, Gherman LI, Willet LB: Milk-born bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 8:393–403. 1998.

Schultz M, Schölmerich J, Rath HC: Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Digestive diseases Basel Switzerland*. 21(2):105–28. 2003.

Science Photo Library. http://www.sciencephoto.com

Sert D, Akin N, Dertli E: Effects of sunflower honey on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics in set type yoghurt during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*. 64(1):42430. 2011.

Servili M, Rizzello CG, Taticchi a, Esposto S, Urbani S, Mazzacane F, Di Maio I, Selvaggini R, Gobbetti M, Di Cagno R: Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 147(1):45–52. 2011.

Shah NP: Effects of milk-derived bioactives: an overview. *The British journal of nutrition*. 84 Suppl 1(S1):S3–10. 2000a.

Shah NP: Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83(4):894–907. 2000b.

Shah NP: Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11):1262–77. 2007.

Sharma S, Singh AK, Kaushik S, Sinha M, Singh RP, Sharma P, Sirohi H, Kaur P, Singh TP: Lactoperoxidase: structural insights into the function,ligand binding and inhibition. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 4(3):108–28. 2013.

Shin H-S, Ustunol Z: Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison. *Food Research International*. 38(6):721–28. 2005.

Sieber R, Collomb M, Aeschlimann A, Jelen P, Eyer H: Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products — a review. *International Dairy Journal*. 14:1–15. 2004.

Slačanac V, Božanić R, Hardi J, Rezessyné Szabó J, Lučan M, Krstanović V: Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology*. 63(2):171–89. 2010a.

Slačanac V, Hardi J, Čuržik D, Pavlović H, Jukić M: Production of antibacterial organic acids during the fermentation of goat and cow milk with Bifidobacterium longum Bb-46. *Acta alimentaria*. 34(3):277–85. 2005a.

Slačanac V, Hardi J, Čuržik D, Pavlović H, Lučan M, Vlainić M: Inhibition of the in vitro growth of Salmonella enteritidis D by goat and cow milk fermented with probiotic bacteria Bifidobacterium longum Bb-46. *Czech journal of food Science*. 25(6):351–58. 2007a.

Slačanac V, Hardi J, Lučan M, Božanić R: Prevention of urogenital infections by oral administration of probiotic lactobacilli. *Mljekarstvo*. 60(3):156–65. 2010b.

Slačanac V, Hardi J, Lučan M, Kun S, Havas P: Effect of honey addition on fermentation activity of Lactobacillus casei Lc-01 in cow's and goat's milk: A kinetic study. *Acta Alimentaria*. 2011.

Slačanac V, Hardi J, Pavlović H, Čuržik D, Lučan M: Inhibition of growth of Staphylococcus aureus by goat's and cow's milk fermented with Bifidobacterium longum BB-46. *Acta Alimentaria*. 36(2):163–72. 2007b.

Slačanac V, Hardi J, Pavlović H, Vlainić M, Lučan M: Inhibicijski učinak kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog bakterijom Bifidobacterium longum Bb-46 na rast uropatogenog soja Candida albicans. *Mljekarstvo*. 54(4):285–97. 2004a.

Slačanac V, Hardi J, Pavlović H, Vlainić M, Lučan M: Promjena udjela masnih kiselina tijekom fermentacije kozjeg i kravljeg mlijeka ABT-2 kulturom. *Mljekarstvo*. 55(2):113–24. 2005b.

Slačanac V, Hardi J, Pavlović H, Vuković D, Čutić V: Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by ABT-2 culture (Lactobacillus acidophilus La-5 , Bifidobacterium lactis Bb-12 and

Streptococcus thermophilus) on the growth of some uropathogenic E. coli strains. *Italian Journal of Food Science*. 16(2):209–19. 2004b.

Slačanac V, Lučan M, Hardi J, Krstanović V, Koceva Komlenić D: Fermentation of Honey-Sweetened Soymilk with Bifidobacterium Lactis Bb-12 and Bifidobacterium Longum Bb-46: Fermentation Activity of Bifidobacteria and in Vitro Antagonistic Effect Against Listeria Monocytogenes FSL N1-017. *Czech journal of food Science*. 30(4):321–29. 2012.

Soccol CR, Porto L, Vandenberghe DS, Spier MR, Bianchi A, Medeiros P, Yamaguishi CT: The Potential of Probiotics : A Review. *Jornal of Food Technology and Biotechnology*. 48(4):413-34. 2010.

Sumarna: Changes of raffinose and stachyose in soy milk fermentation by lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian. *Malaysian Journal of Microbiology*. 4(2):26–34. 2008.

Swidan N: Factors affecting the growth and survival of probiotic in milk. University of Wales. 2009.

Šarić G, Matković D, Hruškar M, Vahčić N: Characterisation and Classification of Croatian Honey by Physicochemical Parameters. *Food technology and biotechnology*. 46(4):355–67. 2008.

Šušković J, Kos B: Mikrobiološke metode i antibiotici. U *Metode u molekularnoj biologiji*, prir. A Ambriović Ristov, A Brozović, B Bruvo Mađarić, H Ćetković, D Hranilović, i sur., str. 949–63. 2007.

Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc AL, Habjanič K, Matošić S: Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food technology and biotechnology*. 9862(3):296–307. 2010.

Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Leboš Pavunc A: Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici Probiotic Concept - Probiotics as Food Supplements and Probiotics as Biotherapeutics. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 4(3-4):77–84. 2009.

Šušković J, Kos B, Goreta J, Matošić S: Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food technology and biotechnology*. 39(3):227–35. 2001.

Tamura M, Hirayama K, Itoh K: Role of intestinal Flora on the Metabolism, Absorption and Biological Activity of Dietary flavonoids. *Bioscience Microflora*. 22(4):125–31. 2003.

Thompson A, Boland M, Singh H: *Milk Proteins - From expression to food*. San Diego: Elsevier. 2009.

Trajković-Pavlović LB, Popović MB, Novaković BD, Gusman-Pasterko VP, Jevtić MR, Mirilov JM: Occurrence of Campylobacter, Salmonella, Yersinia Enterocolitica and Listeria Monocytogenes in some retail food products in Novi Sad. *Central European Journal of Public Health*. 15(4):167–71. 2007.

Tratnik Lj: *Mlijeko: tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga. 1998.

Tsangalis D, Ashton JF, Stojanovska L, Wilcox G, Shah NP: Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria. *Food Research International*. 37(4):301–12. 2004.

Tsangalis D, Shah NP: Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*. 39(5):541–54. 2004.

Ustunol Z: *The Effect of Honey on the Growth of Bifidobacteria*. http://www.honey.com/downloads/bifido.pdf. 2000.

Varga L: Effect of acacia (Robinia pseudo-acacia L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. *International journal of food microbiology*. 108(2):272–75. 2006.

Vasiljević T, Shah NP: Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*. 18:714–28. 2008.

Velasquez MT, Bhathena SJ: Role of dietary soy protein in obesity. *International journal of medical sciences*. 4(2):72–82. 2007.

Vica ML, Glevitzky M, Dumitrel G-A, Junie LM, Popa M: Antibacterial activity of different natural honeys from Transylvania, Romania. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 49(3):176–81. 2014.

Vij S: Biofunctionality of Probiotic Soy Yoghurt. *Food and Nutrition Sciences*. 02(05):502–9. 2011.

Vulevic J, Rastall R a, Gibson GR: Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS microbiology letters*. 236(1):153–59. 2004.

Wang Y, Yu R, Chou C: Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Milchwissenschaft Milk Science International*. 501–8. 2002.

Weston R: The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*. 64(February 1998):33–37. 1999.

Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL: Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Methods*. 64: 1999.

Yang M, Li L: Physicochemical , Textural and Sensory Characteristics of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybean. *Food Technology and Biotechnology*. 9862(4):490–96. 2010.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R: Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 296(5567):490–94. 2002.

Yoshiki Y, Kudou S, Okubo K: Relationship between Chemical Structures and Biological Activities of Triterpenoid Saponins from Soybean. *Biosci Biotechnol Biochem*. 62(12):2291—2299. 1998.

Zimecki M, Kruzel ML: Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. . 6(2):89–106. 2007.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K: Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*. 56(6):1875–81. 1990.

8. PRILOZI

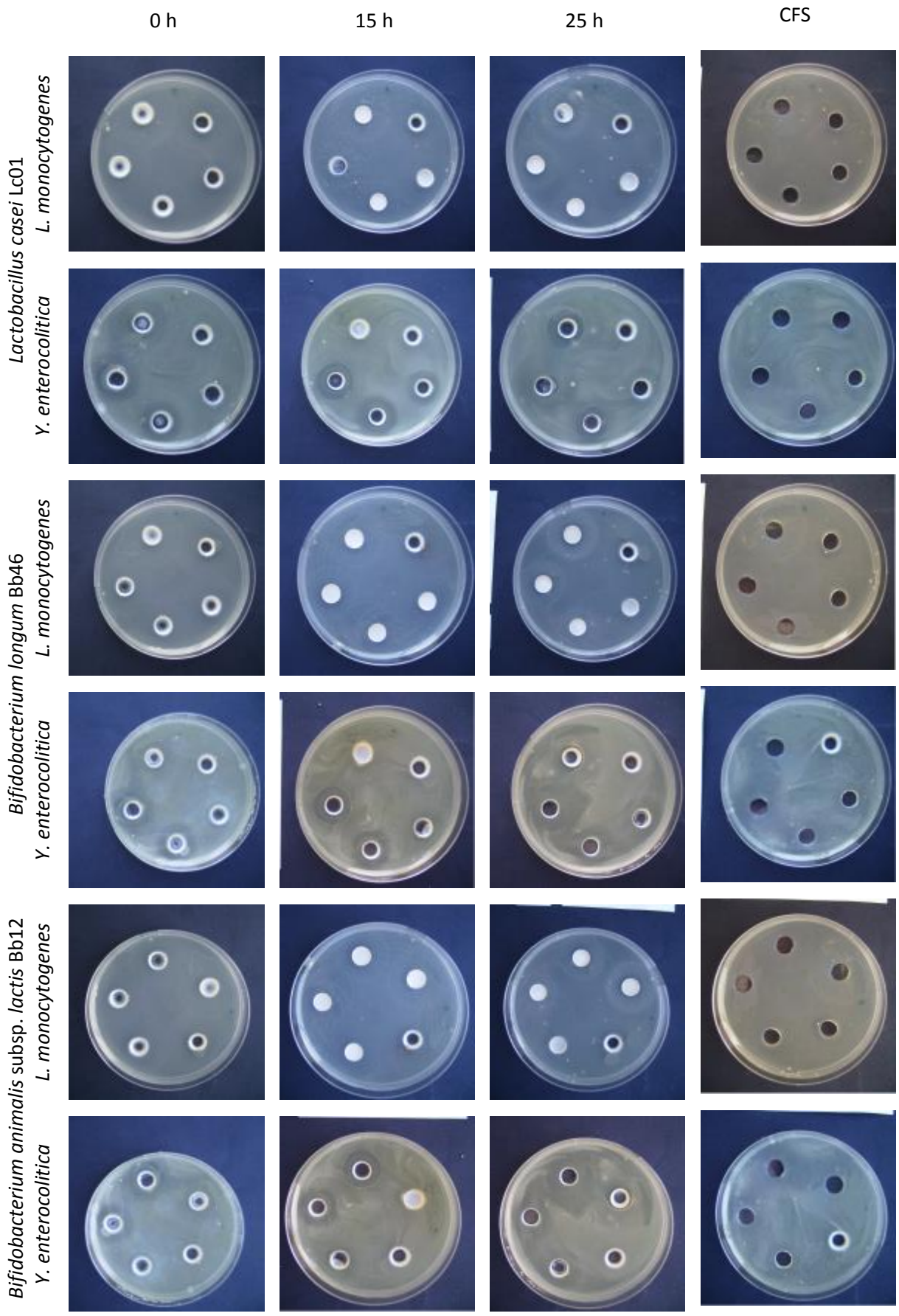
Prilog 1 Obrazac za senzorsko ocjenjivanje čvrstih fermentiranih mliječnih proizvoda (Božanić 2000., ISO 1985.)

parametar kakvoće	zahtjev za senzorsku kakvoću	ocjena	čimbenik značajnosti
izgled	površina glatka poput porculana, sjajna, bez izdvojenog seruma, bez pjene	5	0,2
	površina uglavnom glatka, malo izdvojenog seruma, tragovi slegnute pjene	4-3	
	izdvojen serum, površina raspuknuta, na površini slegnuta pjena	2-0	
konzistencija	čvrsta, homogena, kompaktna, bez grudica, bez mjehurića	5	1,2
	manje čvrsta, neujednačena, pojava grudica, mastan sjaj na površini, mekan gruš s dosta sirutke	4-3	
	nehomogena, zrnata struktura, brašnasta, raspucana, s pahuljicama i grudicama	2-0	
boja	ujednačeno bijela do bijelo-žućkasta	5	0,2
	neujednačena, ali još karakteristična za proizvod, žuta	4-3	
	sivožuta, zelenkasta, netipična	2-0	
miris	ugodan, tipičan, osvježavajući, karakterističan za proizvod	5	0,4
	slabije ili jače izražen, ali još karakterističan za proizod	4-3	
	stran ili bez mirisa, po kvascima i plijesnima	2-0	
okus	harmoničan, blag, ugodan, mliječno-kiseli, karakterističan	5	2,0
	manje harmoničan, slabije ili jače izražen, ali još karakterističan za proizvod	4-3	
	netipičan, gorak, neugodan, prekiseo ili preblag, jedva prepoznatljiv za proizvod, okus na ocat, na metale, pljesnjiv	2-0	

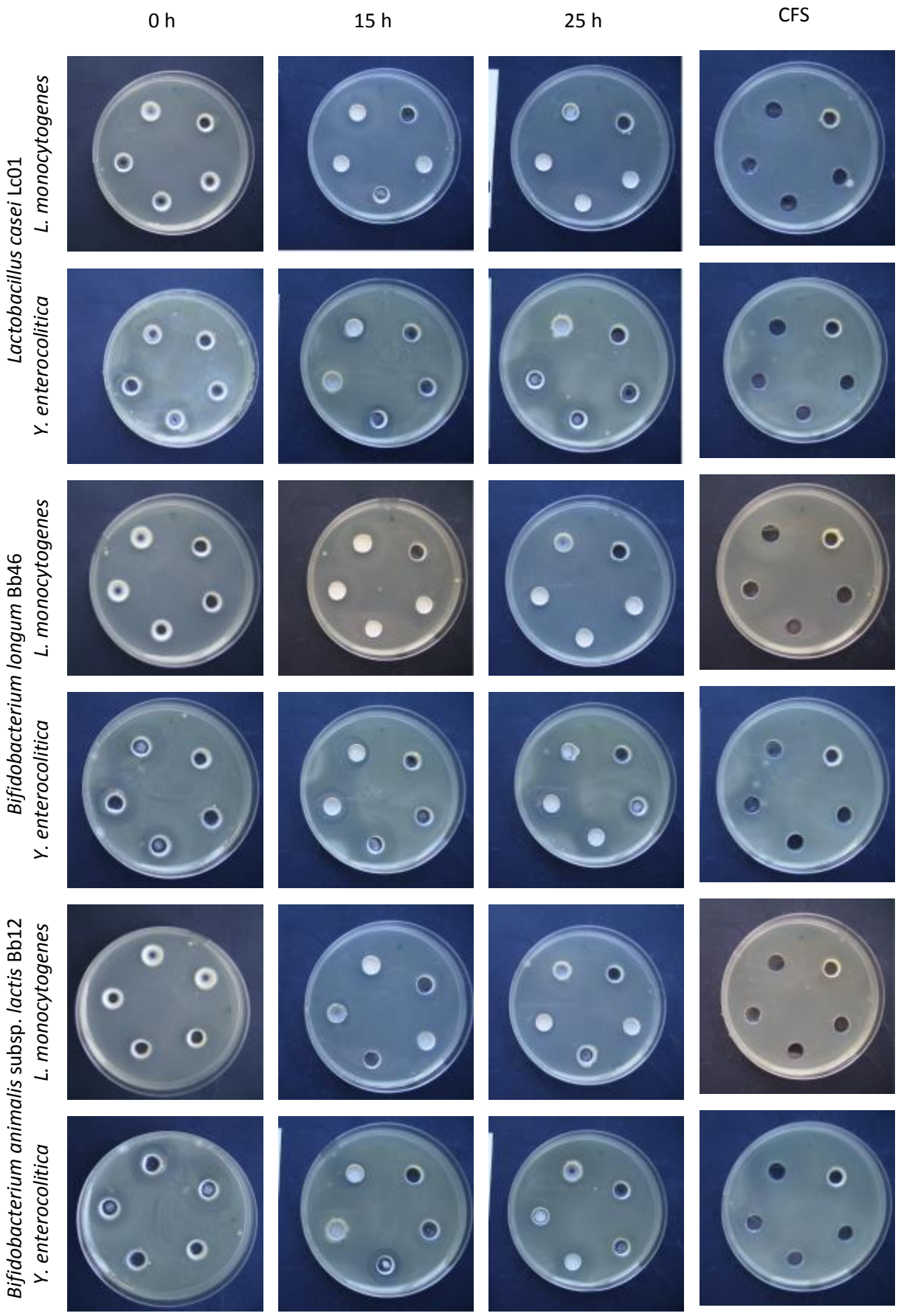
Prilog 2 Obrazac za senzorsko ocjenjivanje tekućih fermentiranih mliječnih proizvoda (Božanić 2000., ISO 1985.)

parametar kakvoće	zahtjev za senzorsku kakvoću	ocjena	čimbenik značajnosti
izgled	površina glatka poput porculana, sjajna, bez izdvojenog seruma, bez pjene	5	0,2
	površina uglavnom glatka, malo izdvojenog seruma, tragovi slegnute pjene	4-3	
	izdvojen serum, površina raspuknuta, na površini slegnuta pjena	2-0	
konzistencija	zadovoljavajuća, normalna, ujednačena, homogena, kompaktna bez grudica i mjehurića	5	1,2
	nešto odstupa od zadovoljavajuće, gušća, rjeđa	4-3	
	neujednačena, prerijetka, pregusta s grudicama	2-0	
boja	ujednačeno bijela do bijelo-žućkasta	5	0,2
	neujednačena, ali još karakteristična za proizvod, žuta	4-3	
	sivožuta, zelenkasta, netipična	2-0	
miris	ugodan, tipičan, osvježavajući, karakterističan za proizvod	5	0,4
	slabije ili jače izražen, ali još karakterističan za proizod	4-3	
	stran ili bez mirisa, po kvascima i plijesnima	2-0	
okus	harmoničan, blag, ugodan, mliječno-kiseli, karakterističan	5	2,0
	manje harmoničan, slabije ili jače izražen, ali još karakterističan za proizvod	4-3	
	netipičan, gorak, neugodan, prekiseo ili preblag, jedva prepoznatljiv za proizvod, okus na ocat, na metale, pljesnjiv	2-0	

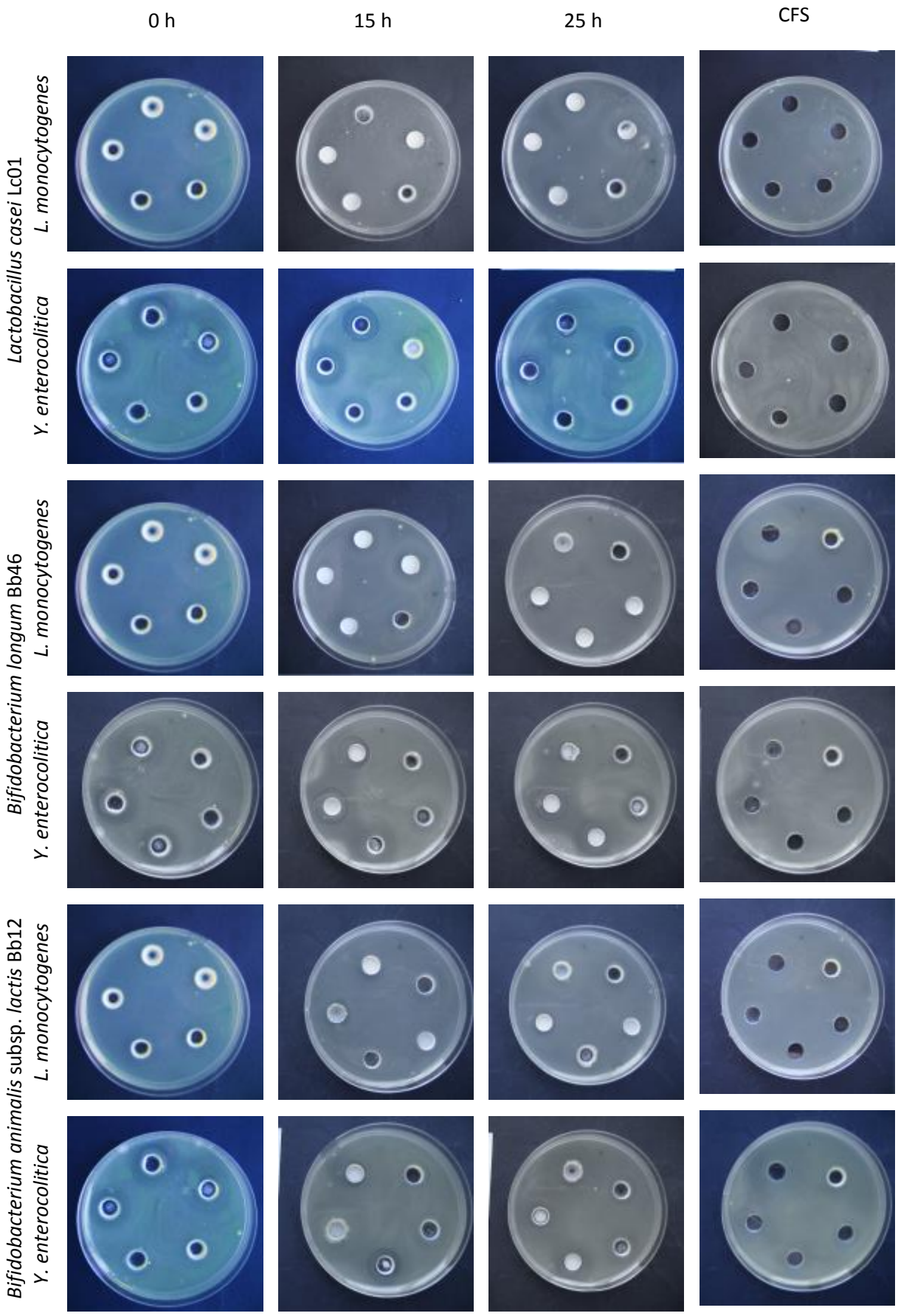
Prilog 3 Fotografije inhibicije rasta patogenih bakterija uzorcima kravljeg mlijeka



Prilog 4 Fotografije inhibicije rasta patogenih bakterija uzorcima kozjeg mlijeka



Prilog 5 Fotografije inhibicije rasta patogenih bakterija uzorcima sojinog mlijeka



ŽIVOTOPIS



Mirela Lučan rođena je 13. prosinca 1977. g. u Osijeku. Nakon završene osnovne škole, maturirala je na Tehnološkoj školi „Ruđer Bošković“ u Osijeku 1996. godine. Iste godine upisala je Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek na kojem je diplomirala 2003. godine obranivši diplomski rad pod naslovom „Promjene tijekom čuvanja fermentiranih napitaka od kozjeg mlijeka s dodatkom prebiotika“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Jovice Hardija. U sklopu CEEPUS programa 2000. godine boravila je tri mjeseca na Universität für Bodenkultur Wien, Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie u Beču. Poslijediplomski znanstveni studij Prehrambeno inženjerstvo upisala je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek akademske 2004./05. godine.

Godine 2004. zasnovala je radni odnos na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek u svojstvu znanstvenog novaka na znanstvenoistraživačkom projektu br. 0113002 "Unapređenje proizvodnje nutritivno visokovrijedne hrane" glavnog istraživača prof. dr. sc. Žanete Ugarčić, te je izabrana u suradničko zvanje asistenta na kolegiju Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda. U periodu 2006.-2011. godine radi kao suradnik na projektu br. 113-1130475-0336 „Funkcionalna svojstva raznih vrsta mlijeka i sirutke fermentiranih probioticima“ glavnog istraživača prof. dr. sc. Jovice Hardija, a od 2011. godine na projektu br. 113-1130475-2722 „Unapređenje kakvoće, trajnosti i funkcionalnosti proizvoda na bazi pšenice“ glavnog istraživača prof. dr. sc. Žanete Ugarčić. U razdoblju 2005.-2007. godine sudjeluje na bilateralnom hrvatsko mađarskom znanstvenoistraživačkom projektu „Bioactive components produced by bifodobacteria during fermentation and their effects on entero and urogenital pathogens“, a u razdoblju 2009.-2011. godine na bilateralnom hrvatsko mađarskom znanstvenoistraživačkom projektu „Fruit and vegetable juices fermentad with bifidobacteria: fermentation kinetics, composition and antagonistic action against selected intestinal and urogenital pathogens“.

Tijekom dosadašnjeg rada (od ak. god. 2004./2005.) u suradničkom zvanju asistenta aktivno je sudjelovala/sudjeluje u izvođenju vježbi i seminara iz kolegija preddiplomskog (*Sirovine animalnog podrijetla, Tehnologija prerade sirovina animalnog podrijetla*) i diplomskog (*Uvod*

u znanstvenoistraživački rad, Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda, Primarna prerada mlijeka i fermentirani mliječni napici, Autohtoni mliječni proizvodi, Mikrobiološki i biokemijski procesi u mljekarstvu) studija. Sudjelovala je u izradi 33 diplomska i završna rada izrađena i obranjena na Katedri za mljekarstvo Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

Pristupnica je kao autor i koautor objavila 8 radova indeksiranih u CC i/ili SCI (a1), 3 znanstvena rada indeksirana u časopisima druge vrijednosne skupine (a2) i 3 znanstvenih radova u zbornicima radova s međunarodnih znanstvenih skupova (a3). Sudjelovala je na 3 međunarodna i 2 domaća znanstvena skupa s ukupno 5 radova.

Od 2005. godine sudjeluje u radu Tajništva, kao član tehničkog uredništva Zbornika radova 2005. godine, a 2011. i u radu Organizacijskog odbora međunarodnog kongresa tehnologa proizvodnje i prerade brašna „Brašno-Kruh“. Član je Hrvatske mljekarske udruge.

Majka je dvojice sinova, Mateja (3,5) i Šimuna (1).