

**Mladi za napredek Maribora 2016**

**33. srečanje**

**Vpliv homogeniziranega mleka na rast in stabilnost probiotične bakterije *Lactobacillus acidophilus***

Raziskovalno področje: Biotehnologija, Kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

Avtor: NIKA MIHAJLOVIĆ, TIM TERŠEK

Mentor: HELENA RIHTAR

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

**Mladi za napredek Maribora 2016**

**33. srečanje**

**Vpliv homogeniziranega mleka na rast in stabilnost probiotične bakterije *Lactobacillus acidophilus***

Raziskovalno področje: Biotehnologija, Kmetijstvo, živilstvo

Raziskovalna naloga

**Maribor, februar 2016**

## KAZALO VSEBINE

1.	UVOD .....	7
2.	HIPOTEZE.....	9
3.	TEORETIČNO OZADJE.....	10
3.1.	Homogenizacija.....	10
3.2.	Fizikalno-kemijske lastnosti homogeniziranega mleka.....	12
3.3.	Prednosti homogeniziranega mleka.....	12
3.4.	Pasterizacija.....	14
3.5.	Probiotiki .....	15
3.6.	Laktobacili.....	15
3.7.	Antimikrobni potencial laktobacilov .....	16
3.8.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	16
3.9.	Gojenje bakterije <i>L. acidophilus</i> .....	17
4.	MATERIALI IN METODE DELA.....	18
5.	MATERIAL .....	19
5.1.	Uporabljeni mikroorganizmi .....	19
5.2.	Zaščitna oprema .....	19
5.3.	Kemikalije .....	19
5.4.	Laboratorijski pribor.....	20
5.5.	Laboratorijske aparature.....	21
6.	METODE .....	22
6.1.	Merjenje pH.....	23
6.2.	Določanje številčnosti bakterij po shranjevanju v hladilniku 13 dni pri 2 °C.....	23
6.3.	Statistična obdelava podatkov .....	23
6.4.	Metoda barvanja po Gramu (povzeto po Cornell University).....	24
7.	REZULTATI.....	25
7.1.	Številčnosti bakterije <i>L. acidophilus</i> po inkubaciji v homogeniziranem ali nehomogeniziranem mleku za 24 h pri temperaturi 37 ° C.....	26
7.2.	Številčnost LA v posameznih vzorcih po 13-dnevem shranjevanju v hladilniku pri 2°C ...	28
7.3.	Merjenje pH.....	31
8.	RAZPRAVA .....	33
9.	POTRDITEV HIPOTEZ .....	35
10.	DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	36
11.	ZAKLJUČEK.....	37
12.	VIRI IN LITERATURA.....	38
13.	VIRI SLIK.....	40

## KAZALO SLIK

Slika 1: Homogenizirano in nehomogenizirano mleko (lasten vir).....	11
Slika 2: Homogenizator (vir slike 2) .....	12
Slika 3: Zgradba mlečne lipidne globula in njene membrane (vir slike 3).....	13
Slika 4: Mlečne globule pred in po homogenizaciji. (vir slike 4) .....	13
Slika 5: Lactobacillus acidophilus (vir slike 5) .....	16
Slika 6: Trdno gojišče MRS z nacepljeno kulturo LA. (lasten vir).....	17
Slika 7: Shema poteka dela (lasten vir) .....	18
Slika 8: Avtomatske pipete (lasten vir) .....	20
Slika 9: Laminarna komora (lasten vir).....	21
Slika 10: Priprava redčitvene vrste (Vir slike 10) .....	22
Slika 11: Uporabljene znamke mleka (lasten vir) .....	25
Slika 12: Bakterija Lactobacillus acidophilus pod mikroskopom (lasten vir).....	32

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Število enot CFU/mL po 24 h pri temperaturi 37 ° C .....	26
Graf 2: Število enot CFU/mL za vse homogenizirane vzorce mleka skupaj in vse nehomogenizirane vzorce mleka skupaj .....	27
Graf 3: Število enot CFU/mL po shranjevanju v hladilniku .....	28
Graf 4: Razlika v številčnosti LA pred in po shranjevanju v hladilniku .....	29
Graf 5: Zmanjšanje številčnosti LA po shranjevanju v hladilniku za 13 dni pri 2 °C.....	30
Graf 6: Primerjava zmanjšanja pH v % v poskusnih (z LA) in kontrolnih vzorcih mleka.....	31
Graf 7: Primerjava zmanjšanja pH v % v poskusnih (z LA) in kontrolnih vzorcih mleka za vzorce H mleka skupaj in vzorce N mleka skupaj .....	32

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Glavne vrste pasterizacije (Bylund, 1995) .....	14
Tabela 2: Najpogostejši probiotiki (Microbiology focus, 2010) .....	15
Tabela 3: Številčnost LA v homogeniziranem mleku .....	26
Tabela 4: Številčnost LA v homogeniziranem mleku .....	26
Tabela 5: Povprečna številčnost LA v vseh vzorcih H in N mleka .....	27
Tabela 6: Številčnost LA po shranjevanju v hladilniku .....	28
Tabela 7: Razlika v številčnosti enot logCFU/mL v homog./nehomog. mleku (povp. vrednost ± SD).....	29
Tabela 8: Znižanje številčnosti LA v homog./nehomog. mleku v log CFU/ml % (povp. vrednost ± SD) .....	30
Tabela 9: % znižanja pH vzorcev mleka z LA in kontrolnih epruvet po 48 h (povp. vrednost ± SD)..	31

## POVZETEK

Homogenizacija je tehnološki proces mlekarske industrije in eden najpogostejših načinov obdelave mleka, ki je prisotno na trgovskih policah. Postopek zmanjša maščobne kapljice in vpliva na strukturo mlečnih proteinov, pretežno kazeina, kar pa ima lahko za posledico razlike v delovanju. Mleko bi naj bilo lažje prebavljivo, vendar povzročalo več alergij kot nehomogenizirano mleko, pripisujejo mu tudi vpliv na povečano tveganje za nastanek ateroskleroze, ki še ni bil dokazan. V nalogi smo preverili ali vpliva način obdelave mleka (homogenizacija z UHT glede na samo pasterizirano mleko) različno na rast bakterije *Lactobacillus acidophilus* in ali obstaja tudi razlika v stabilnosti omenjene probiotične kulture po 13 dnevem shranjevanju v hladilniku.

Ugotovili smo, da je rast bakterije statistično značilno večja ( $p < 0,05$ ) pri nehomogeniziranem mleku, ni pa bilo razlik pri stabilnosti po shranjevanju v hladilniku pri obeh različno obdelanih mlekih.

Ugotovili smo tudi, da spremembe pH kažejo trend razlike ( $p = 0,06$ ), da se je pH pri nehomogeniziranem mleku znižal za večji %.

## **ZAHVALA**

Najlepše bi se rada zahvalila najini mentorici za ves trud, podporo, potrpljenje, usmerjanje in pomoč, ki nama jo je nudila med raziskovanjem. Prav tako bi se ji rada zahvalila za prikaz najrazličnejših mikrobioloških metod, za vse preživete ure v laboratoriju ter za pozitivno energijo in zagnanost, s katerima naju je nenehno spodbujala.

Prav tako bi se rada zahvalila vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te naloge in z nama delili svoje znanje. Zahvaljujeva se tudi šoli, za nudenje prostora in delovnega materiala.

## 1. UVOD

Homogenizacija je tehnološki proces mlekarske industrije in eden najpogostejših načinov obdelave mleka, ki je prisotno na trgovskih policah. Postopek zmanjša velikost maščobnih kapljic (globul) v mleku. Poteka pod vplivom visokega tlaka, zaradi katerega se kapljice globule mlečne masti drobijo, izenači se njihova velikost, rezultat procesa pa je večja stabilnost emulzije masti v mleku. Če tega postopka ne bi opravljali, bi se mlečna maščoba v obliki kroglic, ki imajo manjšo gostoto od mlečnega seruma, izločala na površino (Bajt, 2011).

Sama homogenizacija ne ubije mikroorganizmov, zato postopek spremlja tudi toplotna obdelava pasterizacija ali UHT proces (segrevanje pri ultravisokih temperaturah). Pri pasterizaciji surovo mleko na temperaturi 75°C zadržujemo 15 sekund in ga nato na hitro ohladimo, medtem ko pri UHT mleko za segrejemo na 140 – 150 °C za nekaj sekund (Michalski in sod. 2006).

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so se pričeli pojavljati pomisleki glede uživanja homogeniziranega mleka, saj se pri tem postopku spremenijo mnoge fizikalne lastnosti, tudi sestava lipidov in beljakovin v mleku, kar bi lahko imelo vpliv na zdravje ljudi. Uživanje homogeniziranega mleka bi naj bil eden od dejavnikov tveganja za naraščanje števila obolelih za srčno-žilnimi boleznimi kot je npr. ateroskleroza. Kljub številnim raziskavam na tem področju (Deeth 1983, Michalski 2006, Clifford in sodelavci 1983, Williams 2006, ...) zaenkrat negativni vplivi homogeniziranja mleka še niso bili dokazani. (Clifford in sod. 1983)

Probiotiki so nepatogeni živi organizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja, če je njihovo uživanje zadostno, pri tem pa morajo biti njihovi učinki na gostitelja znanstveno dokazljivi. Med najbolj znane predstavnike probiotičnih mikroorganizmov prištevamo tudi rod *Lactobacillus*, ki je dodan večini fermentiranih mlečnih izdelkov (jogurt, kislo mleko, kefir..), nekatere vrste (npr. *Lactobacillus acidophilus*) pa sestavljajo tudi črevesno mikrobioto (FAO/WHO, 2002). Probiotik *Lactobacillus acidophilus* fermentira mleko, čeprav rast v mleku ni hitra.

V nalogi smo preverili ali vpliva način obdelave mleka (homogenizacija z UHT glede na samo pasterizirano mleko) različno na rast bakterije *Lactobacillus acidophilus* in ali obstaja tudi razlika v stabilnosti omenjene probiotične kulture po 13 dneh shranjevanja v hladilniku. Pri poskusu smo uporabili mleka šestih proizvajalcev (3 homogenizirana in 3 nehomogenizirana).

Številčnost bakterije smo določili po inkubaciji mleka 24 h na 37 °C s pomočjo metode štetja enot CFU na ploščah MRS gojišča, prav tako pa smo izmerili razliko v pH v vseh omenjenih vzorcih.



### **Raziskovalno vprašanje:**

Kako vpliva homogenizacija v primerjavi z samo pasteriziranim mlekom na rast mlečnokislinske bakterije *Lactobacillus acidophilus* in kako se ohranja stabilnost te bakterije v homogeniziranem glede na nehomogenizirano mleko med shranjevanjem v hladilniku?

## **2. HIPOTEZE**

### **Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si postavili naslednje hipoteze:**

Glede na podatke iz literature, ki navajajo, da je homogenizacija postopek obdelave mleka, ki v največji meri prispevajo k spremembi fizikalno-kemijskih lastnosti mleka pričakujemo naslednje:

1. da bo hitrost rasti bakterije *Lactobacillus acidophilus* različna v UHT homogeniziranem mleku glede na nehomogenizirano mleko,
2. da bo stabilnost bakterije *Lactobacillus acidophilus* po shranjevanju v hladilniku različna v različno obdelanem mleku,
3. da bo % znižanja pH kot posledica mlečnokislinske fermentacije bakterije *Lactobacillus acidophilus* različen v različno obdelanem mleku.

### 3. TEORETIČNO OZADJE

#### 3.1. Homogenizacija

Mleko je živilo s katerim se srečamo že v zgodnjem otroštvu in je bogato z beljakovinami, minerali in vitamini, ki jih naše telo nujno potrebuje. Vsebnost posameznih sestavin v kravjem mleku:

- voda: 86–89 %
- maščobe: 3,2–5,5 %
- skupne beljakovine: 2,6–4,2 %
- kazein: 2,8 %
- serumske beljakovine: 0,7 %
- minerali: 0,6–0,8 %

Mlečna maščoba organizmu zagotavlja energijo, ker je bogata z esencialnimi maščobnimi kislinami in v maščobah topnimi vitamini A, D, E in K.

Povezava mlečnih maščob z zdravjem je precej kontroverzna. Medtem ko so saturirane mlečne kisline in vsebnost holesterola povezane s tveganjem za koronarne srčne bolezni, nekateri mlečni proteini kot so konjugirane linoleične kisline (CLA), sfingomielin in butirična kislina kažejo anti-kancerogene značilnosti (Michalski in sod. 2006).

Vsako mleko, ki ga kupimo na trgovskih policah je prestalo določene postopke obdelave. Najbolj osnovni postopek je pasterizacija, ki uniči vegetativne celice vseh potencialno patogenih bakterij (bakterij, ki povzročajo bolezni), ki bi lahko bile v mleku. Pri pasterizaciji surovo mleko vzdržujemo na temperaturi 75°C 15 sekund in ga nato na hitro ohladimo. Med tem postopkom hranilne snovi v mleku, tako vitamini, topni v vodi, kakor vitamini, topni v maščobi, ohranijo svojo hranilno vrednost.

Pasterizaciji sledi tipizacija mleka, pri kateri gre za uravnavanje maščobe na točno določeno vrednost. Med tem procesom se hranilne snovi ne poškodujejo, temveč se le odstrani maščoba, ki jo nato zberejo in v točno določenem deležu vračajo nazaj. Lahko pa obdelavi mleka sledi še homogenizacija.

Homogenizacija je postopek drobljenja in izenačevanja velikosti globul mlečne masti pod vplivom visokega tlaka zaradi večje stabilnosti emulzije masti v mleku. Maščoba v mleku se

nahaja v obliki kroglic, ki imajo manjšo gostoto kot mlečni serum, zato se rade izločajo na površino. V mlečnih izdelkih ta proces ni zaželen, zato mleko homogeniziramo, pri čemer zmanjšamo velikost maščobnih kroglic.

Mleko se najbolje homogenizira pri temperaturi 45 do 70 °C in pritisku med 10 in 25 MPa ali 100 do 250 barov. Homogenizacija je lahko popolna ali delna. Pri popolni homogenizaciji obdelamo celotno količino mleka, pri čemer se poškodujejo tudi druge sestavine mleka, zlasti beljakovine. Pri delni homogenizaciji pa homogeniziramo samo smetano in jo nato uvajamo nazaj v posneto mleko.

Homogenizator je sestavljen iz glave za homogenizacijo z ventili, visokotlačne črpalke z elektromotorjem, pokrova in podstavka. Glavni sestavni del je ventil z natančno obdelano odprtino, ki je oblikovan tako, da čim bolj razbije maščobo ob čim manjši porabi energije. Homogenizacija je lahko enostopenjska ali večstopenjska, najpogosteje je dvostopenjska. Pri tem načinu najprej mleko potuje skozi prvi ventil homogenizatorja pod večjim tlakom (npr. 180 barov), potem pa skozi drugi ventil pod nižjim tlakom (40 do 60 barov). Tak proizvod je stabilnejši, ker je preprečeno ponovno povezovanje maščobnih kroglic. Čim višji je tlak, tem manjše so kroglice (Bylund, 1995).



*Slika 1: Homogenizirano in nehomogenizirano mleko (lasten vir)*



*Slika 2: Homogenizator (vir slike 2)*

### **3.2. Fizikalno-kemijske lastnosti homogeniziranega mleka**

Surovo mleko je sestavljeno iz kazeinov, ki so stabilni do 100 °C. Toplotne obdelave mleka povzročajo, da proteini denaturirajo in spremenijo njihovo agregatno stanje.  $\beta$ -Lactoglobulin je najštevilčnejši med njimi, saj ga je v mleku 51% ter sprejema in transportira razne vitamine kot na primer vitamin A. Posamezni mlečni proteini imajo tudi določene zdravstvene prednosti kot preprečevanje zobnega kariesa (Michalski in sod. 2006).

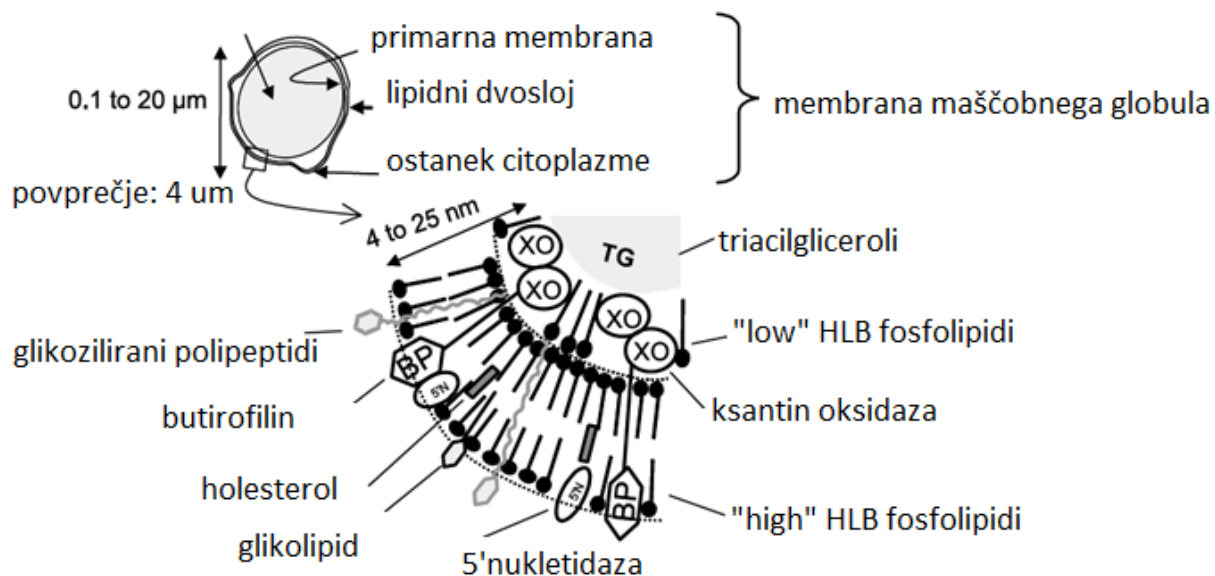
Na drugi strani pa so negativni na področju sladkorne bolezni, saj se pojavljajo pri nekaterih vrstah diabetesa.

Homogenizirano mleko za razliko od nehomogeniziranega lahko vpliva na metabolne odzive. Prav tako je bolj občutljivo za spremembo okusa pri daljšem shranjevanju. Nadaljnje se poveča tudi viskoznost homogeniziranega mleka v kombinaciji z povišano temperaturo. (Michalski in sod. 2006).

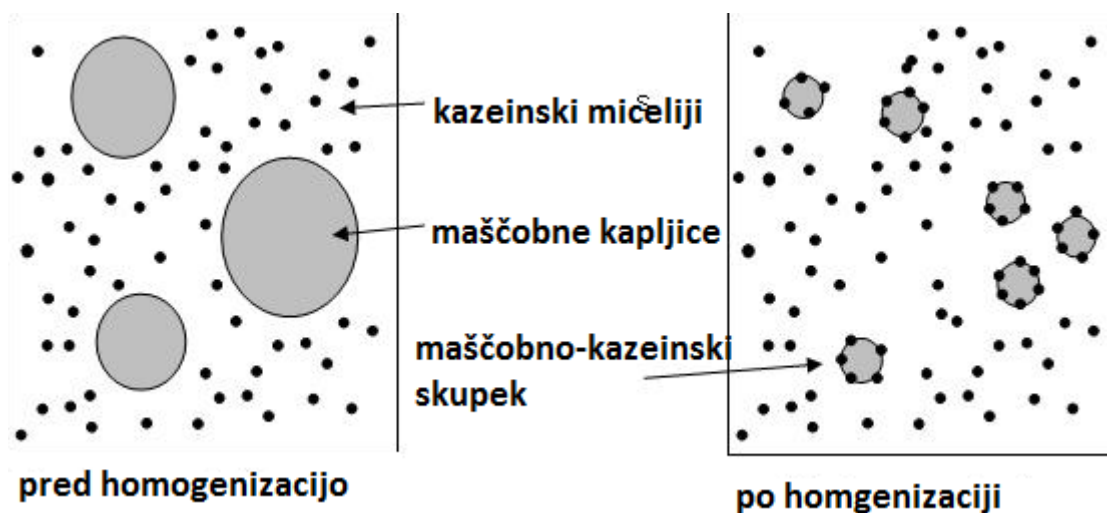
### **3.3. Prednosti homogeniziranega mleka**

- lepši izgled (saj se maščoba zaradi manjših maščobnih kapljic ne dviga in zbira na vrhu, ampak je lepo razporejena po vsem volumnu),

- lažja prebavljivost (če zaužijemo nehomogenizirano mleko, mora žolč v našem telesu najprej homogenizirati maščobe, da lahko potem encimi, ki razgrajujejo, lažje delujejo. Če pa zaužijemo homogenizirano mleko, da ta faza ni potrebna, zato je prebava lažja) (Bajt, 2011)



Slika 3: Zgradba mlečne lipidne kapljice (globula) in njene membrane (vir slike 3)



Slika 4: Mlečne globule pred in po homogenizaciji. (vir slike 4)

### 3.4. Pasterizacija

Louis Pasteur je bil francoski kemik, ki se je med drugim ukvarjal s preučevanjem vpliva različnih povišanih stopenj temperature na mikroorganizme v mleku, pivu in vinu. Po njem se imenuje postopek za toplotno obdelavo živil do 100°C in sicer pasterizacija.

Pasterizacija je po definiciji IDF (International Dairy Federation) proces, ki ga uporabljamo za uničenje patogenih mikroorganizmov v izdelku, tako zelo zmanjšamo nevarnost za zdravje, pri čemer so kemijske, fizikalne in senzorične spremembe izdelka minimalne (Tratnik, 1998).

*Tabela 1: Glavne vrste pasterizacije (Bylund, 1995)*

Postopek	Temperatura (°C)	Čas
termizacija	63–65	15 s
nizka ali dolgotrajna pasterizacija – LTLT (low temperature long time)	63–65	30 min
srednja ali kratkotrajna pasterizacija – HTST (high temperature short time)	72–75	15–20 s
visoka ali kratkotrajna – VHTST (very high temperature short time)	>80	1–5 s

### 3.5. Probiotiki

Probiotik je po definiciji prehranski pripravek, ki vsebuje žive organizme za boljše delovanje našega telesa, natančneje črevesne flore. Ta zajema vse mikroorganizme v debelem črevesu in so povsem normalni, vendar lahko pri raznih spremembah postanejo patogeni. (Tamime, 2005) V probiotičnih izdelkih se največkrat uporabljajo bakterijski rodovi laktobacilov, s katerimi se ukvarja predvsem mlekarstva industrija. Poleg tega poznamo še druge rodove, kot so bifidobakterije in kvasovke. (Tamime, 2005)

*Tabela 2: Najpogostejši probiotiki (Microbiology focus, 2010)*

Rod bakterij	Uporaba
Laktobacili	V mlekarstvu (jogurti, drugi mlečni izdelki)
Bifidobakterije	Za zvišanje imunskega sistema, v primeru driske
Kvasovke	Pri proizvodbi piva

### 3.6. Laktobacili

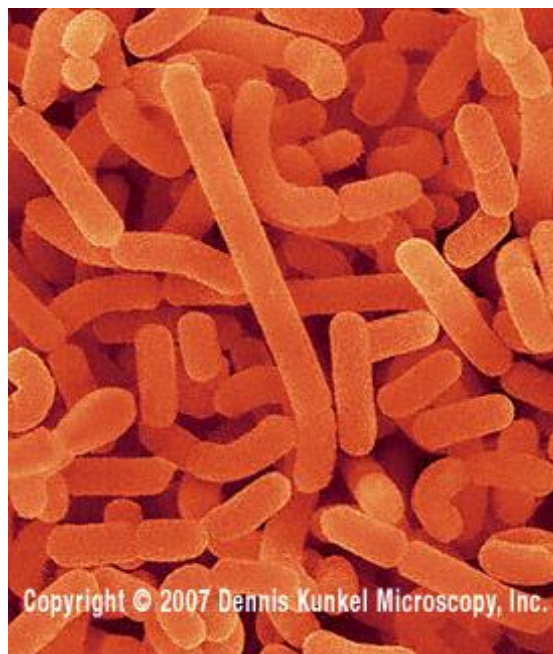
Laktobacili so Gramu pozitivne bakterije paličaste oblike. Večina so sestavljeni iz verig različnih dolžin ter so fakultativni anaerobni. Spadajo k mlečnokislinskim bakterijam in so njihov glavni predstavnik. Kot že ime pove proizvajajo mlečno kislino s fermentacijo laktoze, glukoze in drugih sladkorjev. Obstajajo tudi drugi laktobacili, ki razen mlečne kisline proizvajajo tudi alkohol. Ta mehanizem zavira rast drugih organizmov in spodbuja številčnost laktobacilov v okoljih z nizkim pH. V zadnjih nekaj letih je bilo predstavljenih več novih vrst laktobacilov kot probiotikov, ki bi naj s svojimi pozitivnimi učinki vplivali na človeško zdravje. (Fluka Analytical, 2010) Prav tako je laktobacil fakultativni anaerob, kar pomeni, da lahko preživijo v okolju, ki ne vsebuje kisika. Za rast je najoptimalnejše MRS gojišče, ki v kombinaciji z Tweenom omogoča najboljšo rast, zaradi vsebnosti določenih vitaminov in drugih hranilnih snovi. (Microbiology focus, 2010)

### 3.7. Antimikrobni potencial laktobacilov

Antimikrobna učinkovitost laktobacilov je bila dokazana v mnogih študijah. Laktocin 705 zavira mnogo prebavnih motenj povzročenih z patogenimi bakterijami. Naslednji primer je delovanje plantaricina C, ki je bil izoliran iz zorečega sira in deluje proti mnogim Gram-pozitivnim bakterijam vključno z rodом *Clostridium*. V študijah, narejenih na prišičih je prišlo do zaviranja rasti enterobakterij ob izpostavitvi bakteriocinu, ki ga izloča *L. salivarius* supsp, ki ima tudi dobre probiotične lastnosti. Sevi, ki producirajo bakteriocin ponujajo celo alternativo antibiotikom (Hayes, 2006)

### 3.8. *Lactobacillus acidophilus*

*L. acidophilus* je vrsta bakterije, ki spada v rod laktobacilov. Je ena izmed najbolj uporabljanjih bakterij v probiotikih, medtem, ko se v človeškem telesu naravno nahaja v ustni votlini, prebavnem traktu in nožnici. Prav pri slednji se ta bacil uporablja v zdravstvene namene, saj prepričuje bakterijske okužbe in pomaga tudi pri driski. (Tamime, 2005)



Slika 5: *Lactobacillus acidophilus* (vir slike 5)



### 3.9. Gojenje bakterije *L. acidophilus*

Za gojenje lactobacilov najpogosteje uporabljamo selektivno gojišče MRS, imenovano po izumiteljih (de Man, Rogosa and Sharpe). Gojišče med drugimi sestavinami vsebuje tudi kvasni ekstrakt, ki je bogat vir vitaminov, tudi tistih, ki so posebej pomembni za rast laktobacilov.

MRS gojišče splošno vsebuje:

- 1.0 % pepton
- 0.8 % jajčni ekstrakt
- 0.4 % kvasni ekstrakt
- 2.0 % glukozo
- 0.5 % natrijev acetat
- 0.1 % polisorbat 80 (Tween 80)
- 0.2 % dikalijev hidrogenfosfat
- 0.2 % triammonium citrat
- 0.02 % magnezijev sulfat heptahydrate
- 0.005 % manganezijev sulfat tetrahidrat
- pH 6.2 in temperatura 25°C

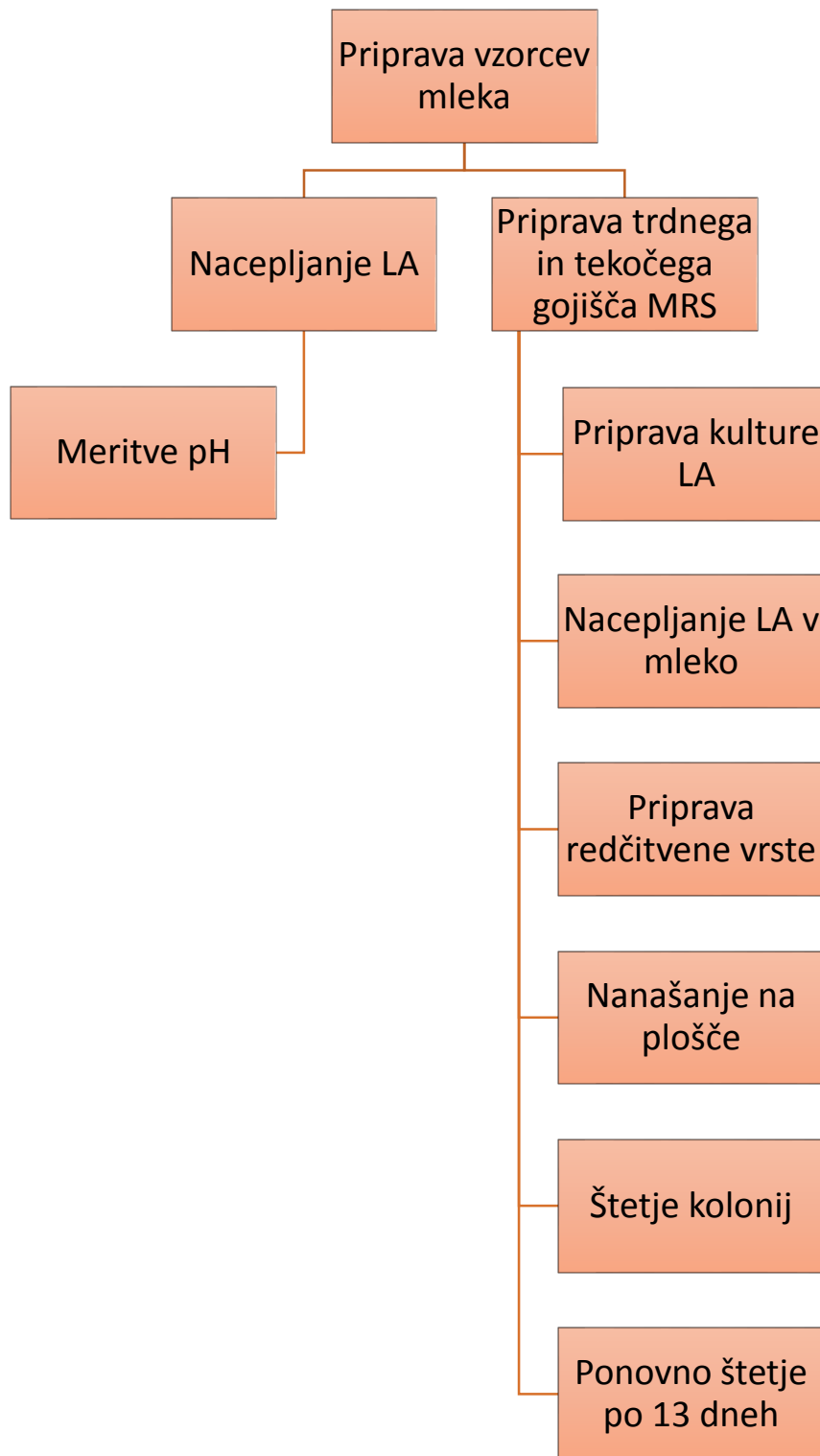
Uspešno rastejo tudi pri nizkem pH. Njihova optimalna temperatura za razmnoževanje pa je okrog 37°C. (Microbiology focus, 2010)



Slika 6: Trdno gojišče MRS z nacepljeno kulturo *LA*. (lasten vir)

#### 4. MATERIALI IN METODE DE LA

Eksperimentalni del je potekal po stopnjah prikazanih na spodnji shemi.



Slika 7: Shema poteka dela (lasten vir)

## 5. MATERIAL

### 5.1. Uporabljeni mikroorganizmi

Za poskus smo uporabili bakterijo *Lactobacillus acidophilus*.

### 5.2. Zaščitna oprema

- zaščitne rokavice za enkratno uporabo
- zaščitna halja
- zaščitna očala
- dezinfekcijsko sredstvo za roke

### 5.3. Kemikalije

Priprava selektivnega gojišča za izolacijo *Lactobacillov*:

- gojišče MRS broth (Fluka Analytical)
- tehnični agar (Pan Reac AppliChem)
- tween 80 (Merck KGaA)

Mleko različnih znamk s 3,5 % m.m.

- trije vzorci homogeniziranega in UHT steriliziranega mleka (Mercator Mila, Pomurske mlekarne, Alpsko mleko)
- trije vzorci nehomogeniziranega mleka (Zelene Doline, Mercator BIO, Mlekarna Planika)

Barvanje po Gramu:

- fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
- barvilo kristal vijolično,
- barvilo safranin,
- jodovica
- 96% etanol

Priprava redčitvene vrste:

- sterilna fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)

## 5.4. Laboratorijski pribor

### Pribor za pripravo gojišč in fiziološke raztopine:

- aluminijasta folija
- čaša (500 mL)
- erlenmajerice (250 mL)
- merilni valj (1000 mL)
- plastične petrijevke (premer 9 cm)

### Pribor za pipetiranje vzorcev mleka:

- epruvete s pripadajočimi pokrovi (16x100 mm)
- avtomatska pipeta in sterilni nastavki FinnpiPETTE F1 Thermo Scientific (1-10 mL)

### Pribor za pripravo redčitvene vrste in nacepljanje bakterij na plošče:

- mikro epruvete (epice) (1.5 mL)
- pincete
- avtomatska pipeta in sterilni nastavki LLG-Digital Micropipette (10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L)
- spatula Drigalski

### Barvanje po Gramu:

- cepilna zanka (eza)
- krovno steklo
- lesena prijemalka
- objektno steklo



Slika 8: Avtomatske pipete (lasten vir)

## 5.5. Laboratorijske aparature

### Priprava gojišč:

- avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg)
- elektronska tehtnica (Kern)

### Nacepljanje bakterij na plošče in priprava redčitvene vrste:

- inkubator (Binder GmbH)
- laminarna vertikalna komora (Iskra PIO serija MCxx-1)
- vibracijski mešalnik RS-VA10 (Phoenix)
- prenosni gorilnik (Campingaz)

### Merjenje pH v vzorcih mleka:

- Vernier vmesnik
- Vernier pH meter
- prenosni računalnik s programom Logger Pro

### Barvanje po Gramu:

- prenosni gorilnik (Campingaz)



*Slika 9: Laminarna komora (lasten vir)*

## 6. METODE

### Določanje številčnosti bakterije *L. acidophilus* po inkubaciji v homogeniziranem ali nehomogeniziranem mleku

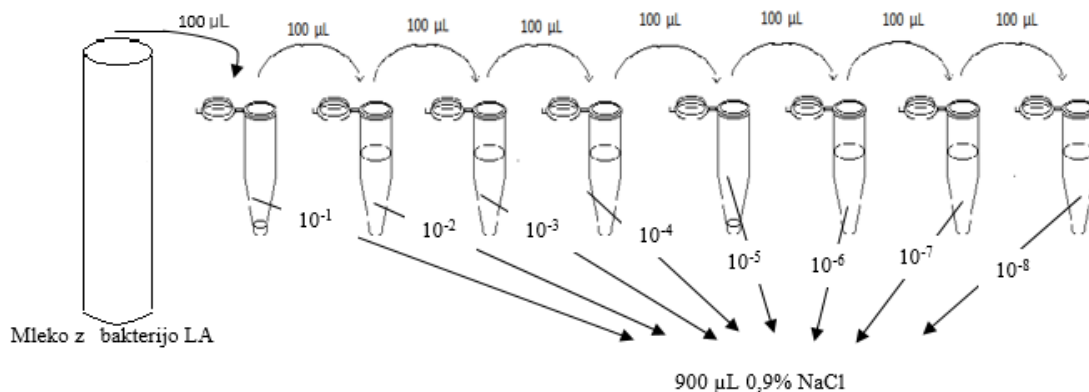
Pripravili smo 50 ml sterilnega (15 minut, 121 °C) tekočega gojišča MRS za *L. acidophilus* (v nadaljevanju LA). Vanj smo nacepili bakterijo in jo inkubirali na 37 °C, 48 h.

V 6 epruвет smo napipetirali po 7ml mleka vsakega od šestih vzorcev in jih sterilizirali v avtoklavu 15 minut na 100 °C.

Iz tekočega gojišča smo v laminarni komori aseptično nacepili bakterijsko kulturo v 3 od 6 epruвет vsakega od vzorcev mleka. Preostali trije vzorci so služili kot kontrola. Vse vzorce smo inkubirali aerobno 24 h pri temperaturi 37 °C.

Naslednji dan smo pripravili plošče s sterilnim trdnim gojiščem MRS za nacepljanje razredčene bakterijske kulture iz mleka za štetje enot CFU. Za vsako od epruвет, razen kontrolnih smo pripravili redčitveno vrsto s fiziološko raztopino do  $10^{-8}$ , razen za kontrole, ki smo jih na ploščo nanesli nerazredčene.

Pripravili smo redčitvene vrste iz mlečne kulture bakterije LA. V laminarni komori smo po 100  $\mu$ L kulture odpipetirali v mikro epruветo, napolnjeno z 900  $\mu$ L sterilne fiziološke raztopine. Premešali smo z vibracijskim mešalnikom epruвет in postopek nadaljevali po spodnji shemi do redčitve  $10^{-8}$ .



Slika 10: Priprava redčitvene vrste (Vir slike 10)

Na ploščo smo nanesti 100  $\mu$ l vzorca, naredili razmaz in inkubirali plošče aerobno 48 h pri T 37  $^{\circ}$ C. Po inkubaciji smo prešteli kolonije in preračunali število enot CFU/mL.

Vzorci smo takoj po pripravi redčitvenih vrst shranili v hladilniku in jih 13 dni vzdrževali pri temperaturi 2  $^{\circ}$ C.

### 6.1. Merjenje pH

Za ugotavljanje morebitnih razlik v rasti bakterije LA smo pri vseh vzorcih izmerili tudi pH na katerega vpliva nastanek mlečne kisline pri mlečnokislinskem vrenju. Poskus smo izvedli ločeno, saj merjenja pH nismo mogli izvesti aseptično.

Napipetirali smo 8 epruvet po 7 ml vsakega od šestih vzorcev in ponovili postopek sterilizacije, nacepljanja bakterije LA, s to razliko, da smo vzorcem po sterilizaciji izmerili začetni pH. Vzorce smo inkubirali 48 h pri temperaturi 37  $^{\circ}$ C in jim nato ponovno izmerili pH.

### 6.2. Določanje številčnosti bakterij po shranjevanju v hladilniku 13 dni pri 2 $^{\circ}$ C

Po 13 dneh smo ponovno pripravili redčitveno vrsto vzorcev fermentiranega mleka z bakterijo LA, vendar smo tokrat na plošče nanesti redčitev  $10^{-4}$ . Plošče smo nato 48 h inkubirali ter po inkubaciji prešteli kolonije, ki smo jih nato preračunali v št. enot CFU/mL.

### 6.3. Statistična obdelava podatkov

Pri obdelavi podatkov smo uporabili program Excel. Izračunali smo povprečne vrednosti. Povprečna vrednost ali povprečje je najpomembnejši statistični parameter. Uvrščamo ga med mere srednje vrednost, ki se nanaša na osrednjo težnjo niza podatkov. Na ta način lahko prikažemo tipične predstavnike populacije (niza podatkov).

Povprečno vrednost izračunamo po enačbi:

$$\bar{x} = \frac{x_1 f_1 + x_2 f_2 + x_3 f_3 + \dots + x_n f_n}{N}$$

oziroma (če uporabimo zapis s sumacijskim znakom):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^n x_k f_k}{N}$$

Zaradi majhnega števila ponovitev nismo računali standardne deviacije za določanje števila bakterij v posameznih vzorcih mleka po inkubaciji na 37<sup>0</sup> C in po shranjevanju v hladilniku. Intervali na grafih prikazujejo minimalno in maksimalno vrednosti.

Pri obdelavi podatkov vseh vzorcev mleka homogeniziranega mleka skupaj in vseh vzorcev nehomogeniziranega mleka skupaj smo izračunali standardne odklone in jih prikazali na grafu kot intervale napak.

Standardni odklon, tudi standardna deviacija ( $\sigma$ ; sigma) nam pove, za koliko vrednosti statističnega znaka odstopajo od povprečja. Izračunamo ga po formuli:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_1)^2 f_1 + (\bar{x} - x_2)^2 f_2 + (\bar{x} - x_3)^2 f_3 + \dots + (\bar{x} - x_n)^2 f_n}{N}} \quad \text{oz.} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (\bar{x} - x_k)^2 f_k}{N}}$$

Podatke smo statistično obdelali s t-testom. Za statistično značilne razlike smo izbrali vrednost t-testa  $p < 0,05$ , za trend razlike pa  $p < 0,1$

#### 6.4. Metoda barvanja po Gramu (povzeto po Cornell University)

Metodo barvanja po Gramu smo uporabili, ker smo želeli opazovati bakterijsko kulturo LA pod mikroskopom. Rezultat te metode je delitev bakterij na gram pozitivne oz. negativne glede na njihove razlike v zgradbi celične stene. Gram pozitivne bakterije (tudi *Lactobacilli*) so tiste, pri katerih ostane kristal vijolično barvilo tudi po razbarvanju z etanolom ujeta v plasti peptidoglikanov. To jim daje značilno modro-vijolično barvo. Gram negativne bakterije postanejo po spiranju z etanolom brezbarvne, zato jih obarvamo s safraninom, ki jih obarva v rdeče-rožnato barvo.

Najprej smo na objektno steklo kanili fiziološko raztopino in nato nanj z cepilno zanko nanесли tanek sloj bakterij. Nato smo preparat osušili nad plamenom in nanj kanili kapljico kristal vijoličnega barvila. Pustili smo ga delovati 1 minuto in nato smo sprali preparat z destilirano vodo. Zatem smo na preparat kanili jodovico, ki smo jo prav tako pustili delovati 1 minuto. Preparat smo ponovno sprali z destilirano vodo in nanj kanili etanol, ki smo ga pustili delovati 4 sekunde. Ko smo preparat ponovno sprali, smo nanj kanili barvilo safranin in ga pustili delovati 30 sekund. Preparat smo sprali in ga osušili ter si ga ogledali pod mikroskopom.



## 7. REZULTATI

### Legenda - okrajšave

H – povprečne vrednosti homogeniziranih znamk mleka

N – povprečne vrednosti nehomogeniziranih znamk mleka

LA- bakterijska kultura *Lactobacillus acidophilus*

Tabela 2: Okrajšave uporabljenih vzorcev mleka

Okrajšava	Pomen
H1	Homogenizirano UHT mleko Alpsko
H2	Homogenizirano UHT mleko Pomurske mlekarne
H3	Homogenizirano UHT mleko Mercator Mila
N1	Pasterizirano (nehomogenizirano) mleko Bio Mercator
N2	Pasterizirano (nehomogenizirano) mleko mlekarna Planika
N3	Pasterizirano (nehomogenizirano) mleko Zelene Doline



Slika 11: Uporabljene znamke mleka (lasten vir)

**7.1. Številčnosti bakterije *L. acidophilus* po inkubaciji v homogeniziranem ali nehomogeniziranem mleku za 24 h pri temperaturi 37 ° C**

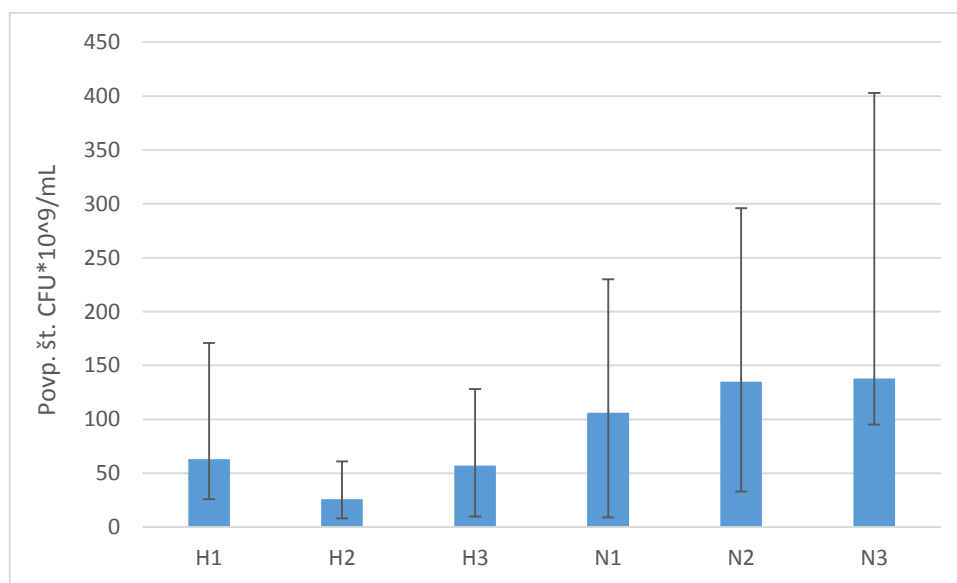
Tabela 3: Številčnost LA v homogeniziranem mleku

	H1- LA	H1-K	H2	H2-K	H3	H3-K
<b>povp. št. enot CFU*10<sup>9</sup>/mL</b>	63	sterilno	26	sterilno	57	sterilno
<b>max</b>	108		35		71	
<b>min</b>	37		18		47	

Tabela 4: Številčnost LA v homogeniziranem mleku

	N1	N1-K	N2	N2-K	N3	N3-K
<b>povp. št. CFU*10<sup>9</sup>/mL</b>	106	Okužba 3/3	135	Okužba 2/3	138	Okužba 3/3
<b>max</b>	124		161		265	
<b>min</b>	97		102		43	

Tabela 3 in 4 ter graf 1 prikazuje povprečno št. enot CFU po inkubaciji v N in H mleku za 24 h pri temperaturi 37 ° C. Za vsako povprečno vrednost so prikazane tudi minimalne in maksimalne vrednosti. V tabeli 4 vidimo tudi, da so bile kontrole okužene in sicer koliko plošč od treh ponovitev je bilo okuženih.



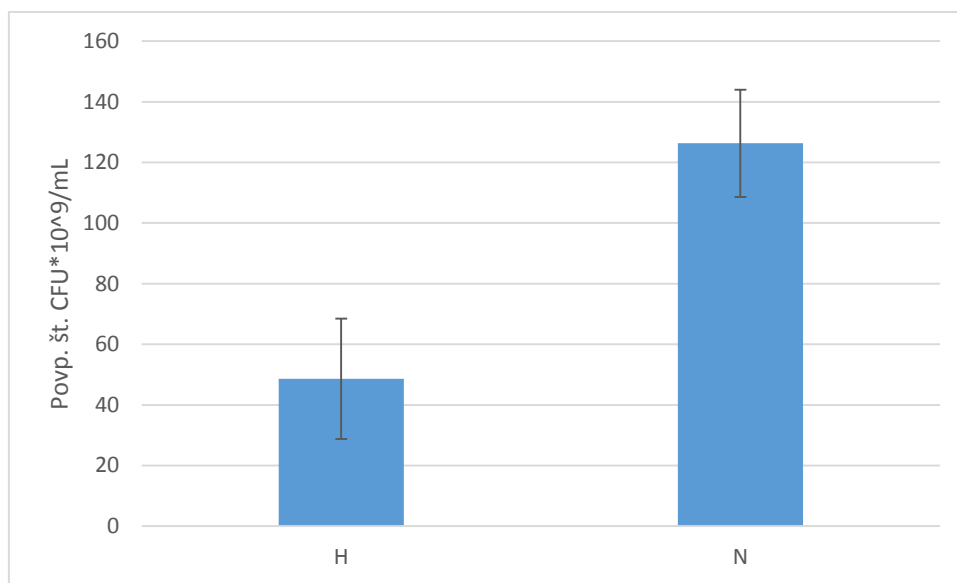
Graf 1: Število enot CFU/mL po 24 h pri temperaturi 37 ° C

Tabela 5: Povprečna številčnost LA v vseh vzorcih H in N mleka

	H	N
povp. št. CFU *10 <sup>9</sup> /mL	48,6 ± 19,9	126,3 ± 17,7

Razlike so statistično značilno različne (p<0,05)

Tabela 5 in graf 2 nam prikazujeta povprečno število bakterij v enotah CFU/ml v vseh homogeniziranih vzorcih skupaj in vseh nehomogeniziranih vzorcih skupaj. Za vsako povprečno vrednost izračuna so prikazani standardni odkloni.



Graf 2: Število enot CFU/mL za vse homogenizirane vzorce mleka skupaj in vse nehomogenizirane vzorce mleka skupaj

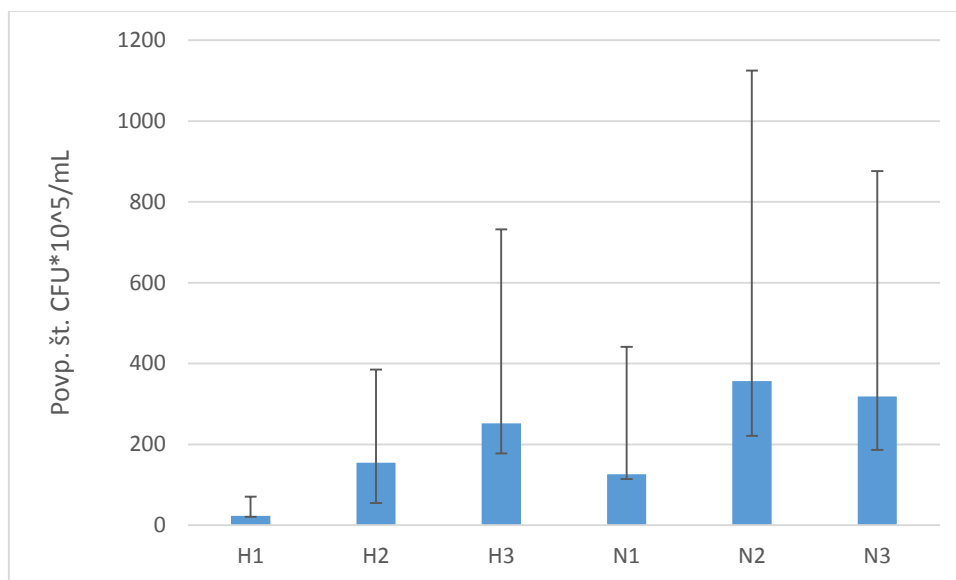
Iz grafa 2 je razvidno, da je št. enot CFU v nehomogeniziranem mleku trikrat večje kot v homogeniziranem mleku. Razlike so statistično značilno različne (p<0,05)

## 7.2. Številčnost LA v posameznih vzorcih po 13-dnevnem shranjevanju v hladilniku pri 2°C

Tabela 6: Številčnost LA po shranjevanju v hladilniku

	H1	H2	H3	N1	N2	N3
<b>povp. št. enot CFU*10<sup>5</sup>/mL</b>	23	155	252	126	357	319
<b>max</b>	48	230	480	315	768	557
<b>min</b>	2	100	74	12	136	133

Tabela 6 in graf 3 prikazujeta številčnost LA po shranjevanju v hladilniku. Prikazano je tudi najmanjše (min) in največje (max) št. enot CFU na mL v posameznem vzorcu.



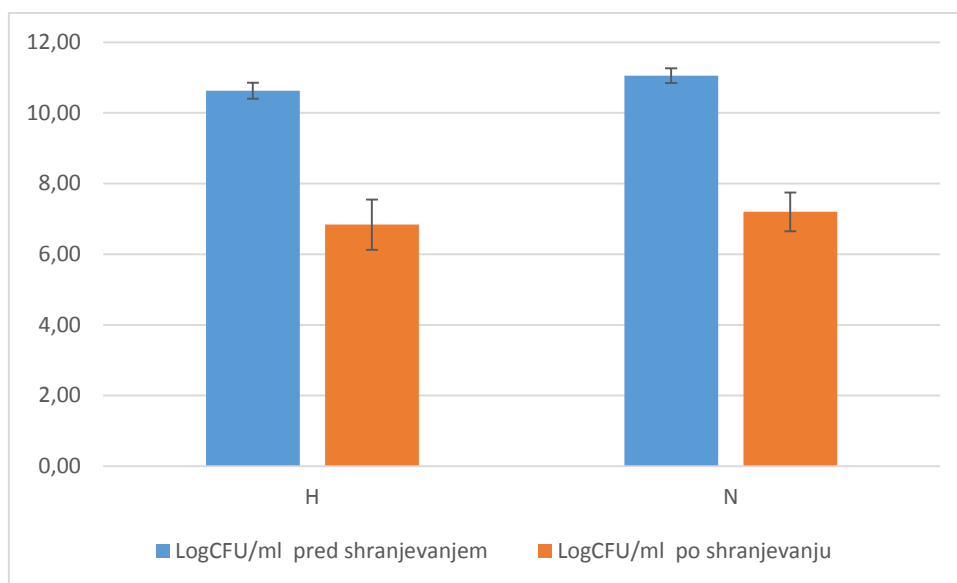
Graf 3: Število enot CFU/mL po shranjevanju v hladilniku

Iz grafa 3 je razvidno, da se je po 13 dneh shranjevanja v hladilniku število enot CFU bistveno zmanjšalo, v povprečju za 10<sup>4</sup> CFU enot/mL.

Tabela 7: Razlika v številčnosti enot logCFU/mL v homog./nehomog. mleku (povp. vrednost  $\pm$  SD)

vzorec mleka	LogCFU/mL pred shranjevanjem	LogCFU/ml po shranjevanju
<b>H</b>	10,63 $\pm$ 0,23	6,84 $\pm$ 0,71
<b>N</b>	11,06 $\pm$ 0,21	7,20 $\pm$ 0,55

Tabela 7 in graf 4 nam prikazujeta razliko v številčnosti podano v logCFU/ml LA v homogeniziranih in nehomogeniziranih vzorcih.

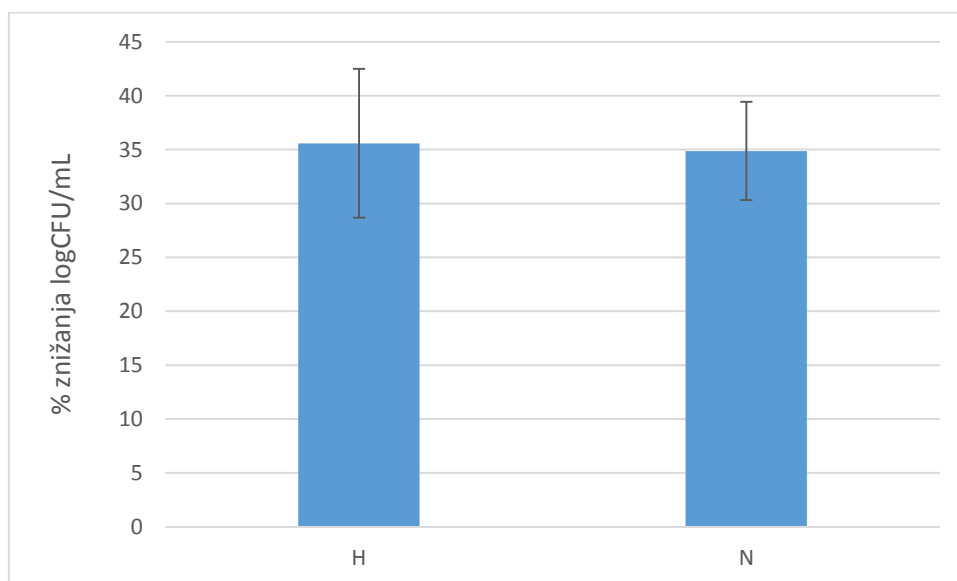


Graf 4: Razlika v številčnosti LA pred in po shranjevanju v hladilniku

Tabela 8: Znižanje številčnosti LA v homog./nehomog. mleku v log CFU/ml % (povp. vrednost ± SD)

vzorec mleka	% znižanja logCFU/mL
<b>H</b>	35,59 ± 6,9
<b>N</b>	34,87 ± 4,56

Razlike niso statistično značilno različne (p=0,8)



Graf 5: Znižanje številčnosti LA po shranjevanju v hladilniku za 13 dni pri 2 °C

Iz tabele 8 in grafa 5 je razviden % znižanja številčnosti v homogeniziranih vzorcih skupaj in nehomogeniziranih vzorcih mleka skupaj. % znižanja je bil izračunan po formuli:

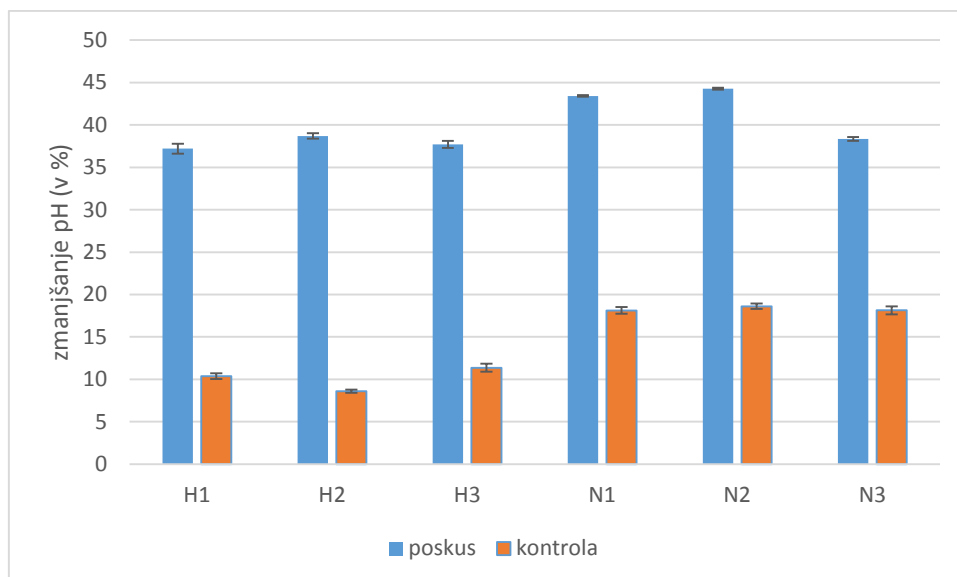
$$\frac{\frac{\log CFU_1}{ml} - \frac{\log CFU_2}{ml}}{\frac{\log CFU_1}{ml}} * 100\%$$

pri čemer je CFU1 število enot po prvi inkubaciji 24 h, št. CFU2 pa po shranjevanju v hladilniku.

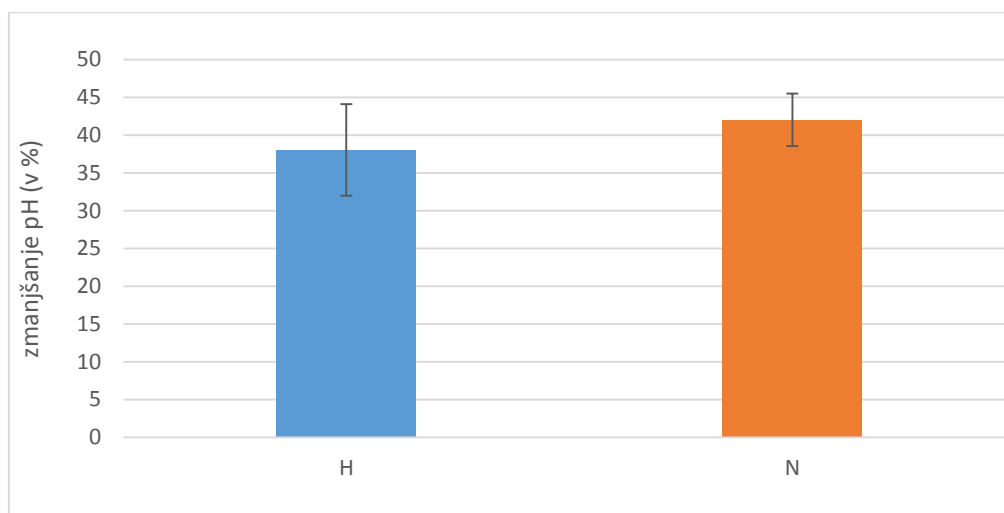
### 7.3. Merjenje pH

Tabela 9: % znižanja pH vzorcev mleka z LA in kontrolnih epruvet po 48 h (povp. vrednost  $\pm$  SD)

Vzorec mleka	% znižanja pH	% znižanja pH
H1	37,20 $\pm$ 0,58	10,37 $\pm$ 0,35
H2	38,70 $\pm$ 0,33	8,61 $\pm$ 0,19
H3	37,69 $\pm$ 0,42	11,37 $\pm$ 0,48
N1	43,42 $\pm$ 0,10	18,13 $\pm$ 0,39
N2	44,27 $\pm$ 0,11	18,62 $\pm$ 0,31
N3	38,35 $\pm$ 0,24	18,14 $\pm$ 0,46



Graf 6: Primerjava znižanja pH v % v poskusnih (z LA) in kontrolnih vzorcih mleka



Graf 7: Primerjava znižanja pH v % v poskusnih (z LA) in kontrolnih vzorcih mleka za vzorce H mleka skupaj in vzorce N mleka skupaj

Iz tabele 10 ter grafa 6 in 7 vidimo, da je se pH N vzorcev znižal za višji %. Kaže se trend razlike ( $p = 0,06$ )

### Barvanje po Gramu

Po protokolu za barvanje po Gramu smo pripravili preparat, ki smo ga nato opazovali pri 1000 X povečavi ter ga fotografirali. Iz slike vidimo, da gre za modrovijolične palčke.



Slika 12: Bakterija *Lactobacillus acidophilus* pod mikroskopom (lasten vir)



## 8. RAZPRAVA

Rast laktobacilov v mleku na splošno je počasna in bi bila hitrejša ob dodatku peptona ali kvasnega ekstrakta. Ker gre za fakultativne anaerobe bi jih bilo smiselno gojiti tudi anaerobno, vendar za to v našem laboratoriju nismo imeli pogojev.

V vseh vzorcih mleka smo kljub temu uspešno vzgojili kulturo bakterij *L. acidophilus*, vendar rezultati iz grafov 1 in 2 kažejo, da je bila rast boljša v vzorcih mleka, ki je bilo le pasterizirano. Razlike so statistično značilno različne ( $p < 0,05$ ).

Po navedbah Michalski M. in sod 2006 pri homogenizaciji, ki jo po navadi spremlja obdelava pri visoki UHT temperaturi pride do razpada nekaterih vitaminov, kar bi lahko bil vzrok nižje rasti bakterije LA. Poleg tega navajajo, da zaradi visoke temperature pride do glikacije oz. neencimatske glikozilacije zaradi visoke vsebnosti laktoze, kar pomeni kondenzacijo sladkorne aldehydne skupine in aminoskupine. Posledica je manjša dostopnost laktoze.

Možni vzroki za slabšo rast LA v homogeniziranem mleku bi lahko bila tudi večja razpršenost mlečne maščobe ter zmanjšanje maščobnih globul, kar omogoča, da v hladnih razmerah (v hladilniku) ne nastane jogurt (Hayes et al., 2006).

Massoud in sod. Iz leta 2015 pa navajajo nasprotno in sicer, da je rast probiotikov zaradi homogenizacije (60 – 100 kPa) boljša, saj nastanejo proste aminokisljine, ki prispevajo k rasti. Naši rezultati tega niso potrdili. Razlog za to je lahko tudi ta, ker je tipov homogenizacije več in potekajo pri različnih tlakih ne vemo ali so bili naši vzorci obdelani v zgoraj navedenem območju, saj to na embalaži ni navedeno.

Iz tabele 4 vidimo, da je bilo večino kontrolnih vzorcev okuženih. Okužba je bila vsekakor posledica nepopolne sterilizacije, saj smo jo izvedli le na 100 °C za 15 minut, ker smo želeli izključiti vpliv višjih temperatur na sestavo v mleka. S tem smo tvegali okužbo. Pri UHT homogeniziranem mleku v kontrolnih vzorcih ni prišlo do okužbe, saj je bilo to mleko že sterilizirano s strani predelovalca zaradi obdelave pri ultravisokih temperaturah.

Glede na to, da okužbe ni bilo prisotne pri vzorcih, kjer je bila prisotna bakterija LA bi lahko sklepali na antimikrobno učinkovitost, ki jo navaja Tamime iz l. 2005 za mnoge laktobacile.

Iz grafov 3 in 4 je razvidno, da shranjevanje bakterij v dveh skupinah različno obdelanega mleka ni bilo razlik v ohranjanju številčnosti. S tem lahko še bolj izključimo vpliv homogenizacije na preučevano bakterijo.

Pri analizi pH, ki jo prikazujejo smo ugotovili, da se je v povprečju pH kontrolam znižal za 14%, vzorcem s kulturo LA pa za 40%, od tega homogeniziranim mlekom za 37,8% in nehomogeniziranim za 40%. Razlika kaže trend razlike ( $p > 0,1$ ). merjenje pH smo izvedli po 48 h, saj smo po izvedbi preliminarne poskusa ugotovili, da je razlika pH premajhna, da bi naši merilni inštrumenti te razlike dovolj natančno zaznali.

Rezultat je v skladu s tem, da je bila rast v nehomogeniziranem mleku boljša, kar pomeni, da se je tudi pH zaradi mlečnokislinske fermentacije hitreje znižal.

Izstopa pa rezultat, da je vzorec N3 z 38,35% znižanjem pH precej odstopal od ostalih dveh nehomogeniziranih mlek (43 oz. 44% znižanje pH) in se zelo približal vzorcem homogeniziranih mlek z povprečnim pH 37,8%, čeprav je bila rast bakterij po 24 h v tem vzorcu najboljša.

V času eksperimenta je možno, da je prišlo do procesnih napak, ki so povezani z pomanjkljivostmi metode in vplivajo na zanesljivost rezultatov. Kljub temu, da smo izbrali vse vzorce mleka s 3,5 mlečne maščobe je bila vsebnost v nehomogeniziranih vzorcih nižja, saj se je izločila na površino. Prav tako bi bilo ustrezno za zanesljivejše rezultate narediti več ponovitev poskusa. Mi smo zaradi časovnih in razpoložljivih sredstev naredili le 3 ponovitve pri metodi štetja enot CFU na ploščah.

Možni viri napak pri merjenju pH so bili vezani predvsem na opremo, saj smo morali pH meter večkrat umerjati, poleg tega pa je vrednost pH pri nekaterih vzorcih nihala, tako, da smo jo morali večkrat ponoviti.

Na koncu smo z barvanjem po Gramu potrdili, da je šlo za paličaste po Gramu pozitivne bakterije, saj so dodajanju etanola niso razbarvale, ampak so ostale modro vijolične.

## 9. POTRDITEV HIPOTEZ

1. *Hitrost rasti bakterije Lactobacillus acidophilus bo različna v UHT homogeniziranem mleku glede na nehomogenizirano mleko*

Hipotezo potrdimo, saj je bila rast bakterije *L. acidophilus* boljša v UHT boljša ( $p < 0,05$ ).

2. *Stabilnost bakterije L. acidophilus bo po shranjevanju v hladilniku različna v različno obdelanem mleku.*

Hipotezo ovržemo. Stabilnost bakterij ni statistično značilno različna ( $p > 0,1$ )

3. *% znižanja pH bo kot posledica mlečnokislinske fermentacije bakterije L. acidophilus različen v različno obdelanem mleku.*

Hipotezo delno potrdimo. Kazal se je trend razlike, pri spremembi pH homogeniziranega in nehomogeniziranega mleka ( $p < 0,1$ )

## 10. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se nanašajo na osnovna načela družbene odgovornosti.

Z nalogo smo želeli opozoriti na pozitivne in negativne učinke različnih obdelav načinov mleka, ter pojasniti nekaj osnovnih pojmov kot so na primer homogenizacija, pasterizacija, probiotiki in ugotavljati ali različna obdelava, ki v strokovnih krogih povzroča deljena mnenja vpliva na rast preučevane bakterije. Želeli smo raziskati tudi vpliv same toplotne obdelave, vendar nam v tem šolskem letu ni uspelo razviti metode za netoplotno sterilizacijo mleka, tako da si to želimo narediti v prihodnje. Raziskovanja smo se lotili odgovorno in na koncu izvedenih poskusov vse bakterije in mleko, ki je vsebovalo kulturo *L. acidophilus* zavrgli s predhodno sterilizacijo.

## 11. ZAKLJUČEK

Cilj te raziskovalne naloge je bil raziskati vpliv homogeniziranega mleka na rast in stabilnost probiotične bakterije *Lactobacillus acidophilus*, pri čemer smo se osredotočili na preučevanje številčnosti in kislosti vzorcev homogeniziranega in nehomogeniziranega mleka z dodano bakterijske kulturo.

Pri metodi preučevanja številčnosti po 24 h smo zaznali znatno boljše rast bakterijske kulture v nehomogeniziranih mlekih. To pripisujemo predvsem različnim temperaturam obdelave in drugačni sestavi maščobe po opravljenem postopku homogenizacije. Ne moremo pa slabše rasti bakterije pripisati popolnoma homogenizaciji, saj so bili vzorci homogeniziranega mleka obdelani pri UHT temperaturah, ki pa je imela prav tako vpliva na sestavo mleka.

Pri metodi preučevanja številčnosti po 13 dneh shranjevanja v hladilniku na 2° C smo zabeležili velik upad številčnosti, v povprečju se je številčnost LA zmanjšala za 10<sup>4</sup> CFU enot/mL. Rezultati niso pokazali različne stabilnosti bakterije v obeh skupinah vzorcev.

Pri analizi pH razlika kaže trend razlike ( $p > 0,1$ ). Rezultat je v skladu s tem, da je bila rast v nehomogeniziranem mleku hitrejša, kar pomeni, da se je tudi pH zaradi mlečnokislinske fermentacije hitreje znižal.

Naša raziskava je le majhen del velikega področja, ki raziskuje vpliv obdelave mleka na organizme, predvsem na ljudi. Sama sva ob raziskovanju pridobila veliko različnih veščin, od mikrobioloških tehnik, priprave preparatov, uporabe laboratorijske opreme, iskanja in prebiranja strokovne literature. Naučila sva se denimo načrtovati lasten poskus, pri tem pa sva ugotovila tudi, da so za raziskovanje vedno pomembni, vztrajnost, potrpežljivost, natančnost in tudi kanček sreče.

## 12. VIRI IN LITERATURA

1. Ali F. S. et. al. 2013. Probiotic stability of yoghurts during refrigerated storage. The Second international Conference of Biological Sciences, 1-3 julij, str. 11-15
2. Bajt N. 2011. Tehnologija mleka. Gradiva za 2. letnik višješolskega strokovnega programa živilstvo in prehrana. str. 34- 35, 41-42. Prevezeto 5. februar 2016: [http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/vs/Gradiva\\_ESS/Impletum/IMPLETUM\\_371ZIVILSTVO\\_Tehnologija\\_Bajt.pdf](http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/vs/Gradiva_ESS/Impletum/IMPLETUM_371ZIVILSTVO_Tehnologija_Bajt.pdf)
3. Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB
4. Clifford A. J., C. J. Ho., H. Swenerton. 1983. Homogenized Bovine Milk Xanthine Oxidase: A Critique of the Hypothesis Relating to Plasmalogen Depletion and Cardiovascular Disease. The American Journal of Clinical Nutrition 1983 38: 2 327-32.
5. Cornell University. Animal Health Diagnostic Center. Gram Stain Protocol (on-line). Dostopno na spletnem naslovu: [https://ahdc.vet.cornell.edu/docs/Gram\\_Stain\\_Protocol.pdf](https://ahdc.vet.cornell.edu/docs/Gram_Stain_Protocol.pdf) (25. 1. 2016)
6. De Souza Oliveira, R. P. et. al. 2011. Growth and Survival of Probiotics in Nonfat Fermented Milk: the Effect of Inulin (on-line). Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/pres2011-and-icheap10/ICheaP10/179PinheiroOliveira.pdf> (29. 1. 2016)
7. FAO/ WHO. 2002. Report of a joint working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, April 30 and May 1 2002, London, Ontario, Canada. str. 11. Prevezeto 30. januar 2016: [http://who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
8. Goderska K., J. Nowak, Z. Czarnecki. 2008. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected Saccharides including prebiotics. *Technologia Alimentaria* 7 št. 2 str. 7-14
9. Hayes M. et. al. 2006. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. Applied and Environmental Microbiology, marec, let. 72, št. 3, str. 2260-2264

10. Kielczewska K. et. al. 2006. Effects of high-pressure homogenization on the physicochemical properties of milk with various fat concentrations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, let. 56, št. 15, str. 91-94
11. Massoud S. (2015). Effect of high pressure homogenization on improving the quality of Milk and sensory properties of yogurt: A Review. *International journal of Chemical engineering and application*, Vol7, No1.
12. *Microbiology Focus: Volume 2.3*. 2010. St. Louis: Sigma-Aldrich.co
13. Michalski M-C., C. Januel (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?. *Trends in Food Science & Technology*, št. 17, str. 423–437
14. Neogen Corporation. 2010. Lactobacilli MRS broth (on-line) Dostopno na spletnem naslovu: [www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7406\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7406_PI.pdf) (16.1.2016)
15. Rajiv I. D., Nagendra P. S. 1996. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. *Dairy Journal*, september, št. 7, str. 33-40
16. Symposium: Probiotic bacteria, Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. 2000. *Journal of Dairy Science*, let. 83, št. 4, str. 894-906
17. Tamime A. 2005. *Probiotic Dairy Products*. Singapur: Blackwell Publishing Ltd. Str: 181-185
18. Tratnik L. (1998). *Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga
19. Vinderola C. G. et. al. 1999. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, št. 33, str. 97-102

20. Waldemar G. et. al. 2011. The influence of selected prebiotics on growth of lactic acid bacteria for bio-yogurt production. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, let. 10, št. 4, str. 455-466

### 13. VIRI SLIK

1. Slika 1: Homogenizirano in nehomogenizirano mleko (lasten vir)
2. Slika 2: Homogenizator (spxflow.com, 2012)  
Dostopno na URL naslovu:  
[http://www.spxflow.com/en/apv/pd-040\\_mp-homogenizers-rannie-132t/](http://www.spxflow.com/en/apv/pd-040_mp-homogenizers-rannie-132t/)
3. Slika 3: Zgradba mlečne lipidne globula in njene membrane  
Povzeto po: Michalski M-C., C. Januel (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?. *Trends in Food Science & Technology*, št. 17, str. 425
4. Slika 4: Mleko pred in po homogenizaciji (web.utk.edu, 2014)  
Dostopno na URL naslovu:  
<http://web.utk.edu/~fede/high%20pressure%20homogenization.html>
5. Slika 5: *Lactobacillus acidophilus* (denniskunkel.com, 2007)  
Dostopno na URL naslovu:  
<http://www.denniskunkel.com/gallery/bacteria/27271D.jpg>
6. Slika 6: Trdno gojišče MRS z nacepljeno kulturo LA (lasten vir)
7. Slika 7: Shema poteka dela (lasten vir)
8. Slika 8: Avtomatske pipete (lasten vir)
9. Slika 9: Laminarna komora (lasten vir)
10. Slika 10: Priprava redčitvene vrste (faculty.plattsburgh.edu, 2009)  
Dostopno na URL naslovu:  
<http://faculty.plattsburgh.edu/donald.slish/lambdatitre.html>
11. Slika 11: Uporabljene znamke mleka (lasten vir)
12. Slika 12: *Lactobacillus acidophilus* pod mikroskopom (lasten vir)



