ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST MLIJEČNOG PROIZVODA DOBIVENOG POMOĆU KEFIRNIH ZRNACA

Ilijanić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:593312

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Valentina Ilijanić

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST MLIJEČNOG PROIZVODA DOBIVENOG POMOĆU KEFIRNIH ZRNACA

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Valentina Ilijanić

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST MLIJEČNOG PROIZVODA DOBIVENOG POMOĆU KEFIRNIH ZRNACA

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Diplomski rad izrađen je u laboratoriju na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i Laboratoriju za magnetske rezonancije na Zavodu za fizičku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu.

Mentor rada: **Prof. dr. sc. Srećko Valić**

Rad ima 57 stranica, 22 slike, 5 tablica, 61 literaturnih navoda.

Zahvala

Veliko hvala gospođi Saneli Vucelić što mi je poklonila kefirna zrnca za potrebe istraživanja.

Najveću zahvalnost dugujem mom mentoru, prof.dr.sc. Srećku Valiću na neizmjernoj podršci te ukazanom povjerenju, strpljenju i vremenu tijekom studiranja, kao i srdačnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Moram reći: da sam i htjela birati, ne bih mogla izabrati boljeg mentora od Vas!

Najljepša hvala mojoj najboljoj prijateljici Josipi koja je uvijek bila tu za mene kada mi je bilo i najljepše i najteže. Do sada smo doživjele mnoge zajedničke životne trenutke, a vjerujem da će tako ostati i u budućnosti. Neizmjerno sam sretna što te imam za prijatelja i što ću biti dio tvojih najljepših trenutaka. Želim da znaš da ću uvijek biti tu za tebe i da te stvarno jako volim!

Posebnu zahvalnost iskazujem obitelji i prijateljima s fakulteta koji su zaslužni da uz smijeh, veselje, zabavu, druženje, podržavanje, poticanje i kolegijalnost pet godina studiranja ostane u najljepšem sjećanju!

Posveta

Ovaj diplomski rad posvećujem mami Kati.

Znam da si ponosna na mene, hvala ti.

Volim te!

SADRŽAJ

SAŽETAK III

SUMMARY IV

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1. 1. Uvod 1

1. 2. Pregled područja istraživanja 4

1. 2. 1. Mlijeko 4

1. 2. 1. 1. Kravlje i kozje mlijeko 5

1. 2. 1. 1. 1. Kemijski sastav 6

1. 2. 1. 1. 1. 1. Mliječna mast 6

1. 2. 1. 1. 1. 2. Proteini 7

1. 2. 1. 1. 1. 3. Mliječni šećer – laktoza 8

1. 2. 1. 1. 1. 4. Mineralne tvari 9

1. 2. 1. 1. 1. 5. Vitamini 9

1. 2. 2. Fermentacija 9

1. 2. 2. 1. Fermentacija mliječnih proizvoda 11

1. 2. 3. Kefirna zrnca 12

1. 2. 3. 1. Sastav 13

1. 2. 3. 2. Identifikacija mikroorganizama 15

1. 2. 4. Kefir 16

1. 2. 4. 1. Sastav 17

1. 2. 4. 1. 1. Kemijski i nutritivni sastav 17

1. 2. 4. 1. 2. Mikrobiološki sastav 19

1. 2. 4. 2. Utjecaj na zdravlje 21

1. 2. 5. Antioksidacijska svojstva mlijeka i kefira 22

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 27
3. MATERIJALI I METODE 28
3. 1. Materijali 28
3. 2. Metode 30
3. 2. 1. Priprema kefirnih zrnaca 30
3. 2. 2. Priprema kefira 31
3. 2. 3. Metoda redukcije DPPH radikala 32
3. 2. 4. Metoda elektronske spinske rezonancije (ESR) 32
3. 2. 4. 1. Priprema uzoraka za mjerenje na ESR spektrometru 34
3. 2. 3. 2. Mjerenje na ESR spektrometru 34
4. REZULTATI 36
4. 1. Antioksidacijska aktivnost različitih vrsta mlijeka 36
4. 2. Utjecaj fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 38
4. 3. Utjecaj vremena fermentacije na antioksidacijsku aktivnost kefira 40
4. 4. Utjecaj tretiranja mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 41
4. 5. Utjecaj vrste mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 43
5. RASPRAVA 46
5. 1. Usporedba antioksidacijske aktivnosti različitih vrsta mlijeka 46
5. 2. Utjecaj fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 47
5. 3. Utjecaj vremena fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 49
5. 4. Utjecaj tretiranja mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 49
5. 5. Utjecaj vrste mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira 51
6. ZAKLJUČAK 52
7. LITERATURA 53

SAŽETAK

„Mlijeko je prirodna najsavršenija hrana!“, izrekao je grčki liječnik i filozof Hipokrat oko 400. godine prije Krista. Od davnina su mliječni proizvodi poznati po svom blagotvornom djelovanju na ljudsko zdravlje. Osim što su bogati biološki aktivnim komponentama, često se spominje njihov učinak neutraliziranja slobodnih radikala koji, uzrokovani oksidacijskim stresom, nerijetko izazivaju razvoj akutnih i kroničnih bolesti, malignih tumora, kardiovaskularnih, kao i upalnih oboljenja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati i usporediti antioksidacijsku aktivnost fermentiranog mliječnog proizvoda – kefira dobivenog pomoću kefirnih zrnaca, pripravljenog od sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka nakon 24 h i 48 h fermentacije. Pomoću redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, mjereno je antioksidacijsko djelovanje uzoraka elektronskom spinskom rezonancijom (ESR), spektroskopskom tehnikom koja omogućuje vrlo precizno i uspješno određivanje koncentracije radikala u uzorku. Otopini DPPH radikala u metanolu, koncentracije 0,15 mmol/L, dodani su uzorci kefira i praćen je pad intenziteta ESR signala u odnosu na početni, tijekom petnaest minuta. Intenzitet signala, računan dvostrukim integriranjem ESR spektara, proporcionalan je broju radikala u uzorku, a time i njegovoj antioksidacijskoj aktivnosti. Rezultati istraživanja pokazuju da mlijeko i fermentirani mliječni proizvodi zbog podrijetla, a time i nejednakog kemijsko-mineralnog sastava, imaju različita antioksidacijska svojstva. Isto tako, fermentacija i njezino trajanje, kao i tretiranost mlijeka od kojeg su kefiri uz pomoć kefirnih zrnaca pripravljeni, imaju utjecaj na inhibitornu djelotvornost antioksidansa u odnosu na DPPH radikal.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, antioksidansi, mliječni proizvodi, kefir, kefirna zrnca, fermentacija, kravlje mlijeko, kozje mlijeko, DPPH, elektronska spinska rezonancija (ESR)

SUMMARY

"Milk is the most perfect natural food!", said the Greek doctor and philosopher Hippocrates around 400 BC. Dairy products have long been known for their beneficial effects on human health. In addition, they are rich in biologically active ingredients, often mentioning their effects of neutralizing free radicals, which, provoked by the oxidative stress, often cause the development of acute and chronic diseases, malignant tumors, cardiovascular as well as inflammatory diseases. The aim of this research was to investigate and compare the antioxidant activity of fermented dairy product – kefir obtained using kefir grains, prepared from raw and durable (UHT) cow and goat milk for 24 h and 48 h. Using the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, the antioxidant activity of samples was measured by electron spin resonance (ESR), a spectroscopic technique that can precisely and accurately determine the concentration of radicals in a sample. The DPPH solution was irradiated in methanol at the concentration of 0.15 mmol/L, and the loss of the ESR signal intensity, relative to the initial one, was measured during fifteen minutes. Signal intensity, calculated by the double integration of the ESR spectra, is proportional to the number of radicals in a sample and therefore to its antioxidant activity. The results of this study show that milk and fermented dairy products, due to their origin, time and unlike chemical-mineral composition, have different antioxidant properties. Likewise, the fermentation and its duration, as well as the treatment of the milk from which kefirs are prepared with the help of kefir grains, have an effect on the inhibitory activity of antioxidants against the DPPH radical.

Keywords: antioxidant activity, antioxidants, dairy products, kefir, kefir grains, fermentation, cow's milk, goat's milk, DPPH, electron spin resonance (ESR)

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1. 1. Uvod

Hipokrat, „otac medicine“ te grčki liječnik i filozof, oko 400. godine prije Krista je uz najpoznatiju izreku: „Neka tvoja hrana bude tvoj lijek, a tvoj lijek neka bude tvoja hrana!“, utvrdio i: „Mlijeko je prirodna najsavršenija hrana!“ [1]. Može se reći da su od tog trenutka pa sve do danas, mlijeko i mliječni proizvodi hrana o kojoj se oduvijek najviše raspravljalo. Posljednjih sto godina, provedena su mnogobrojna istraživanja, premda zanimanje za sastav mlijeka i mliječnih proizvoda raste od vremena njihove upotrebe kao ljudskih namirnica. Nadalje, u 16. stoljeću je švicarski liječnik i znanstvenik Paracelsus mlijeko opisao veoma korisnim s obzirom na sadržaj mliječne kiseline [1,2].

U ljudskom organizmu se u svakom trenutku događaju milijarde najrazličitijih, međusobno ovisnih, metaboličkih procesa koji pospješuju samoizlječenje i suočavaju se s kojekakvim patogenim mikroorganizmima, alergenima, toksinima te štetnim tvarima koje uzrokuju razne bolesti. Da bi se metabolizam čovjeka uspio izboriti s oboljenjima i upalnim stanjima, potrebna mu je dostatna razina imuniteta i uravnotežen mikrobiom koji će se ostvariti konzumiranjem zdrave, kvalitetne i nutritivno bogate hrane. Prirodna, „prava“ hrana sadrži komponente koje ljudsko tijelo treba unijeti kako bi funkcioniralo na ispravan i normalan način, a to su esencijalne aminokiseline i masne kiseline, jednostavni šećeri, vitamini, minerali, antioksidansi, probiotičke „dobre“ bakterije, enzimi te ostali neophodni elementi [3].

Mikroorganizmi imaju svoju ulogu u ljudskom tijelu od trenutka rođenja pa sve do smrti. Najnovija istraživanja pokazuju kako mikrobne vrste metaboliziraju hormone, kontroliraju apsorpciju nutrijenta, propusnost crijeva, razinu upala pa čak i biološki ritam te cikluse buđenja i spavanja. Pospješuju detoksikaciju, pamćenje, koncentraciju te druge kognitivne sposobnosti, sve ono za što se mislilo da su zaslužne ljudske stanice [4]. Da bi se osigurao ispravan rad probavnog sustava i stabilna mikrobiota crijeva koja pozitivno utječe na jačanje imuniteta, potrebno je neprestano unositi prebiotike, probiotike i „dobre“ bakterije, najuspješnije konzumacijom fermentiranih proizvoda, slobodno nazvanih funkcionalnom hranom s visokom biološkom vrijednosti. Nedvojbeno je važno istaknuti fermentirane mliječne proizvode, „ali najbolji je u svakom slučaju domaći kefir“ [3,4].

Pretpostavlja se da je podrijetlo kefirnih zrnaca Kavkaz, gdje su ih, prema jednoj legendi, tadašnji žitelji izravno dobili od proroka Muhameda [5], dok druga usmena predaja govori o „mani s neba; daru” koji su Izraelci primili od Boga kada su s Mojsijem krenuli u Obećanu zemlju. Budući da njihova biomasa raste velikom brzinom, višak se u najvećem broju slučajeva poklanja drugoj osobi koja onda nastavlja uzgoj zrnaca i proizvodnju kefira. Takav način širenja kefirnih zrnaca potječe od davnina, a prema još jednoj narodnoj predaji koja kaže da je starosjediocima Kavkaza navodno bilo nedopušteno dijeliti kefir s drugima izvan njihove populacije, sve dok princ nije poklonio kefirna zrnca Ruskinji kao znak svoje ljubavi [3,6]. Kefir se u usporedbi s drugim fermentiranim mliječnim proizvodima razlikuje po vrlo složenom biokemijskom i mikrobiološkom sastavu s jedinstvenim biološki aktivnim tvarima [7]. Nastaje mliječno-kiselim i alkoholnim vrenjem posredstvom mikroorganizama kefirnih zrnaca koja imaju „vječan“ životni vijek. Znanstvenici su nebrojeno puta pokušali „stvoriti“ kefirna zrnca u laboratoriju, ali je to uvijek završavalo neuspjehom [3].

Slobodni radikali i drugi reaktivni spojevi uzrokuju oksidacijski stres koji ima veliku patološku ulogu u propadanjima i smrti stanica, a samim time nastanku bolesti te ubrzanim starenjem. Kako bi izbjegli stanična oštećenja, većina bioloških sustava razvila je svojstvene antioksidanse kao što su primjerice superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, mokraćna kiselina itd. Međutim, oni ne sprječavaju oštećenja na sveopćem području pa danas postoji sve veći interes za pronalaženjem prirodnih antioksidansa. Istraživanja su pokazala da prirodni antioksidansi iz hrane mogu smanjiti oksidacijska oštećenja na način da se vežu za slobodne radikale te tako pomognu spriječiti nastanak nakupljanja peroksidansa pa nadalje i razvoj akutnih i kroničnih bolesti, malignih tumora, kardiovaskularnih te upalnih oboljenja. Proučavanjem se otkrilo da fermentirano mlijeko ima antioksidacijsko, antimutageno, antitumorsko i imuno-potencirajuće djelovanje [8,9]. U određenim studijama ustanovljeno je da kefir pokazuje značajno veću razinu inhibitorne sposobnosti uklanjanja DPPH radikala nego mlijeko [9], a da za to mogu biti odgovorni peptidi iz kazeina [10]. Također, utvrđeno je da antioksidansi iz kefira pripravljenog od kravljeg mlijeka sudjeluju u uklanjanju superoksidnog radikala, neradikalnog, ali reaktivnog oblika kisika – vodikovog peroksida, kao i u inhibiciji autoksidacije vitamina C [8]. Vrijednost slobodne esencijalne aminokiseline taurina iz kefira pripravljenog od kozjeg mlijeka je za dvadeset puta veća nego iz kravljeg, a taurin dokazano ima antioksidacijsko djelovanje [11].

Pregled literature pokazao je da se antioksidacijska aktivnost mlijeka i kefira može pripisati aminokiselinama koje sadrže sumpor, poput cisteina i metionina; fosfatima, vitaminima A i E, karotenoidima, β-karotenu, cinku, selenu, superoksid dismutazi, glutation peroksidazi, katalazi, oligosaharidima, peptidima koji nastaju tijekom fermentacije te mnogim drugim bioaktivnim komponentama čija se aktivnost može povećati dodatkom fitokemikalija [12].

1. 2. Pregled područja istraživanja

1. 2. 1. MLIJEKO

Mlijeko je hrana života – humano mlijeko kao prva hrana novorođenčetu, a mlijeko životinjskog podrijetla kao hrana korisna djeci, odraslima, na kraju krajeva i zdravim i bolesnim ljudima. Čovječanstvo je od najranijih vremena spoznalo kako mlijeko udomaćenih krava, koza, ovaca, bivolica, kobila i magarica ima veliku hranidbenu, ali i ljekovitu vrijednost [2,13].

Mlijeko i mliječni proizvodi su, uz meso, jaja i ribu, osnovne i nezamjenjive namirnice u prehrani čovjeka, budući da sadrže sve sastojke prijeko potrebne za život, normalan rast i razvoj te promicanje zdravlja. Važno je napomenuti da je za kvalitetan mliječni proizvod potrebno očuvanje kvalitetne originalne sirovine, u ovom slučaju kvalitetnog mlijeka.

Na osnovne biološke sastojke mlijeka – proteine, ugljikohidrate, lipide, vitamine, minerale te na sveobuhvatni izuzetno složen fizikalno-kemijski sastav utječu razni čimbenici kao što su prvenstveno vrsta, zatim pasmina, dob, redoslijed i stadij laktacije (muznog razdoblja), zdravstveno stanje, način uzgoja, prehrane i dobivanja mlijeka same životinje. Kvaliteta i trajnost ovise o higijeni mužnje, higijeni prometa te temperaturi na kojoj se ono čuva i transportira, a utvrđuju se organoleptičkim, biološkim, fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim analizama. Zbog svog sastava, mlijeko je zasluženo dobilo opis najkompletnije i najizbalansiranije tekuće prehrambene namirnice [1,2,14,15,16].

1. 2. 1. 1. Kravlje i kozje mlijeko

Krave i koze proizvode mlijeko različitih tehnoloških i organoleptičkih svojstava, iako im je sastav u osnovi vrlo sličan [1,2,16]. Uobičajeni podaci koji utječu na kemijski sastav, ovisno o sastojcima i njihovim međusobnim omjerima, jesu sadržaj vode, ukupne suhe tvari, ukupne bezmasne suhe tvari, mliječne masti, proteina, mliječnog šećera – laktoze, mineralnih tvari koje se izražavaju prema postotku pepela (tablica 1), kao i sadržaj vitamina i enzima. Fizikalna svojstva mlijeka ovise o kemijskom sastavu, a karakteriziraju ih gustoća, površinska napetost, viskoznost, električna vodljivost, vrelište i ledište. Kiselost i pH vrijednost definiraju biokemijska svojstva [2,14,17]. Kravlje mlijeko je najzastupljenije mlijeko u prehrani ljudi te čini oko 85 % ukupne svjetske proizvodnje mlijeka, dok kozjem pripada samo 2 % [13,16].

Tablica 1. Kemijski sastav kravljeg i kozjeg mlijeka (u %).

Izvor: literaturni navod 2.

	Kravlje mlijeko	**Kozje mlijeko**
Voda	87,3	87,7
Suha tvar	12,7	12,3
Mliječna mast	3,8	3,7
Proteini	3,3	3,3
Laktoza	4,8	4,5
Mineralne tvari	0,8	0,8

1. 2. 1. 1. 1. KEMIJSKI SASTAV

1. 2. 1. 1. 1. 1. Mliječna mast

Sadržaj mliječne masti može biti vrlo varijabilan, a odgovoran je za teksturu, konzistenciju, okus i aromu mlijeka te mliječnih proizvoda. Opskrbljuje organizam esencijalnim masnim kiselinama i vitaminima koji su topljivi u mastima (A, D, E, K). Nadalje, posjeduje konjugiranu linolnu kiselinu te kolin koji se nalazi u fosfolipidima i spomenutim vitaminima. Poznata je antikancerogena aktivnost konjugirane linolne kiseline, a kolin ubrzava oksidaciju masti u jetri i održava odgovarajuću razinu koncentracije kolesterola. U usporedbi s kravljim, kozje mlijeko sadrži manje kolesterola [15,16].

Kravlje i kozje mlijeko imaju sličan sastav i raspored lipida, ali postoji bitna razlika u veličini i strukturi globula mliječne masti (slika 1). Kozje se uglavnom sastoji od triglicerida te posjeduje veći udjel kratkolančanih masnih kiselina u odnosu na kravlje. Isto tako, sadrži gotovo dvostruko veću količinu hlapivih masnih kiselina (kapronska, kaprilna, kaprinska), ali veći udio miristinske pripada kravljem mlijeku. Za karakterističan „kozji okus“ zaslužne su kapronska kiselina i frakcija slobodnih masnih kiselina.

Budući da je promjer globula manji u kozjem nego kravljem mlijeku, hidroliza u probavnom sustavu čovjeka je brža i potpunija pa je time i probavljivost veća. Sastav membrana globula je podjednak, a sastoje se od fosfolipida, cerebrozida, gangliozida i sterola, s tim da su globule kozjeg mlijeka nepostojanije te sklonije lipolizi i oksidaciji. Treba napomenuti da se veličina globula mliječne masti povećava u toplinski obrađenom mlijeku, ali se ukupan broj smanjuje [2,16,18].



Slika 1. Globula mliječne masti fotografirana krio-elektronskim mikroskopom.

Izvor: https://scienceandfooducla.wordpress.com/2013/05/28/homemade-butter/.

1. 2. 1. 1. 1. 2. Proteini

Proteini u mlijeku i mliječnim proizvodima stabiliziraju njihov okus. Glavni protein mlijeka je kazein koji ima oblik velike koloidne čestice. Sastoji se od α_{s1}-, α_{s2}-, β- i κ-kazeina te sadrži znatne količine kalcija i fosfata, a manje magnezija i citrata. Mlijeko i sirutka imaju i nekazeinske frakcije proteina – α-laktoalbumin, β-laktoglobulin i proteozepeptone; imunoglobuline (IgA, IgG, IgM), albumine krvnog seruma te manje peptide, kao što su enzimi (peroksidaza, katalaza, reduktaza, alkalna fosfataza, lipaza, proteaza) [14,16,19].

Kravlje mlijeko ima više proteina u odnosu na kozje, a micele su veće pa su proteini kozjeg mlijeka uzrok lakše probavljivosti i efikasnije apsorpcije aminokiselina. Međutim, kravlje sadrži manje α-laktoalbumina i β-laktoglobulina nego kozje. Oba mlijeka sadrže podjednaku količinu ukupnih i esencijalnih aminokiselina. Utvrđeno je da je udjel arginina, asparagina, cisteina histidina, leucina i valina veći u kozjem, a glutamina, serina i tirozina u kravljem mlijeku [2,16].

Količine slobodnih esencijalnih aminokiselina taurina u kozjem i humanom mlijeku su vrlo slične, a značajno veće u odnosu na kravlje mlijeko. Taurin je jednim dijelom odgovoran za rast i razvoj mozga pa se može zaključiti da je elementaran u prehrani novorođenčadi i male djece. Dokazana je njegova uloga u formaciji žučnih soli, djelovanju na protok kalcija, pobuđivanju neurona i u borbi protiv toksičnih tvari [16].

Kada na kazein kozjeg mlijeka djeluje kimozin, nastaje mekši koagulum u odnosu na kravlji, kojeg enzimi probavnog sustava lakše i brže razgrađuju. Isto tako, gruš kozjeg mlijeka je mekaniji jer sadrži manje α_{s1}-kazeina, što pridonosi bržoj probavi kozjeg mlijeka (četrdeset minuta) u usporedbi s kravljim (dva sata i trideset minuta) [2].

1. 2. 1. 1. 1. 3. Mliječni šećer – laktoza

Laktoza je glavni ugljikohidrat mlijeka, izvor energije za aktivnost raznih mikroorganizama i to prvenstveno mliječno-kiselih bakterija koje fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu. Svi fermentirani mliječni proizvodi dobiveni su fermentacijom laktoze. Stupanj njezine slatkoće je šest puta manji od saharoze pa uzrokuje blago slatkast okus mlijeka. Oba mlijeka sadrže gotovo istovjetnu koncentraciju laktoze, ali su neka istraživanja pokazala da kozje posjeduje manju. Energetska vrijednost mlijeka može se izračunati na temelju same količine spomenutog mliječnog šećera [2,14,16,18].

1. 2. 1. 1. 1. 4. Mineralne tvari

Prosječna količina mineralnih tvari kozjeg mlijeka je neznatno veća u usporedbi s kravljim, a time utječe na blago slankast okus. Najveći udio minerala pripada kalciju, fosforu, magneziju, natriju i kaliju u obliku iona te citratima, bikarbonatima, sulfatima, laktatima i kloridima u obliku soli. Kravlje mlijeko dominira koncentracijom citrata. Zanimljiva je činjenica da koze manjak mineralnih tvari, u uvjetima oskudne hranidbe, dijelom nadoknade trošeći vlastite tjelesne zalihe [2,16]. Kalcij i fosfor su najznačajniji za tehnologiju obrade i prerade mlijeka [14].

1. 2. 1. 1. 1. 5. Vitamini

Mlijeko sadrži gotovo sve vitamine, a bogato je vitaminima B2 i B12. Između ostalog, mogu se pronaći srednje količine vitamina A i B1, dok vitamina C, D i E ima najmanje [14]. Kravlje mlijeko posjeduje nižu koncentraciju vitamina A, više vitamina B6, B12 i E, kao i provitamina vitamina A – β-karotena, a nedostatak istog kozjem mlijeku daje izrazito bijelu boju. Vitamina D ima podjednako u oba mlijeka [2,16].

1. 2. 2. FERMENTACIJA

Fermentacija je jedan od najstarijih i najvažnijih načina konzerviranja namirnica upotrebom različitih tehnoloških postupaka. Katalitička aktivnost enzima raznih mikroorganizama izaziva

pretvorbu organskih tvari životinjskog ili biljnog podrijetla na način da se određeni sastojci mijenjaju, dok drugi nastaju ili nestaju. Te tvari služe kao dobra podloga za rast, razvoj i djelovanje mikroorganizama, a rezultiraju dobivanjem fermentiranog proizvoda koji ima visoku biološku vrijednost. Za proces su potrebni anaerobni uvjeti, međutim, nastali ugljikov dioksid je nepoželjan pa se nerijetko fermentacija odvija u otvorenom spremniku ili pokrivenom tkaninom (gazom). Fermentirani proizvodi imaju karakteristične mirise i okuse, a razlikuju se od namirnice do namirnice [14,20,21].

Od davnina je fermentiranje štitilo hranu od kvarenja, a danas, kada postoje mnogobrojni načini čuvanja namirnica, ponajviše omogućava održavanje zdrave crijevne mikrobiote jer pospješuje nastanak „dobrih“ bakterija, probiotika i enzima u proizvodima. Također, djelomično razgrađuje komponente hrane, čineći hranjive sastojke lakše dostupnima te probavljivijima, ali i povećava nutritivnu vrijednost same hrane te pogoduje u održavanju pH ravnoteže organizma. Dokazano je da takvi funkcionalni proizvodi potpomažu normalizaciju tjelesne mase, redukciju nepoželjnih masnoća u krvi, jačanje imuniteta, kao i eliminaciju toksina te sprječavanje alergija [20].

Najčešće se u prodavaonicama mogu kupiti fermentirani proizvodi i pripravci koji uglavnom sadrže razne aditive, puno šećera i kojekakve neželjene tvari, a ne posjeduju korisne enzime i probiotike. Fermentacija u kućnoj radinosti najčešće osigurava kvalitetu priželjkivanih produkata. Najpoznatiji fermentirani proizvodi su jogurt, sir, kefir, ocat, „kiseli“ kupus, pivo, vino, kobasice itd. [20,21].

1. 2. 2. 1. Fermentacija mliječnih proizvoda

U većini slučajeva mikroorganizmi sirovog mlijeka uzrokuju fermentaciju laktoze koja se u procesu mliječno-kiselog vrenja metabolizira u mliječnu kiselinu izazivajući koagulaciju proteina mlijeka. Proteini se razgrađuju do aminokiselina, dok se mliječna mast dijelom razgrađuje do masnih kiselina. Koncentracija laktoze obično se smanji za 20-30 %, a nastala mliječna kiselina potiče rad probavnog trakta i poboljšava resorpciju kalcija i fosfora iz njega. Produžuje se trajnost proizvoda, stoga što sama mliječna kiselina inhibira rast i razmnožavanje mikroorganizama, a to je posebice važno jer mlijeko može sadržavati i neželjenu mikrofloru. Za aromu i specifičan ugodan okus odgovorni su novonastali acetaldehid i diacetil. Na tržištu Hrvatske najtraženiji fermentirani proizvodi su jogurt, sir, kiselo vrhnje, kefir, acidofilno i kiselo mlijeko te dr. [14].

Mliječno-kiselo vrenje uz pomoć enzima homofermentativnih i/ili heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline u anaerobnim uvjetima izaziva nastanak određenih produkata. Ako je fermentacija vođena homofermentativnim bakterijama, prosjek nusprodukta iznosi 90 % mliječne kiseline. Ako se upotrebljavaju heterofermentativne bakterije, uslijedit će nastanak manje količine mliječne kiseline (oko 50 %) te ugljikovog dioksida, etanola, hlapljivih kiselina i karbonilnih spojeva.

Alkoholno vrenje je uz mliječno-kiselo među najvažnijim postupcima komercijalnih vrsta fermentacija u prehrambenoj industriji, koje uz pomoć kvasaca u anaerobnim uvjetima uzrokuje stvaranje etilnog alkohola (etanola) i ugljikovog dioksida.

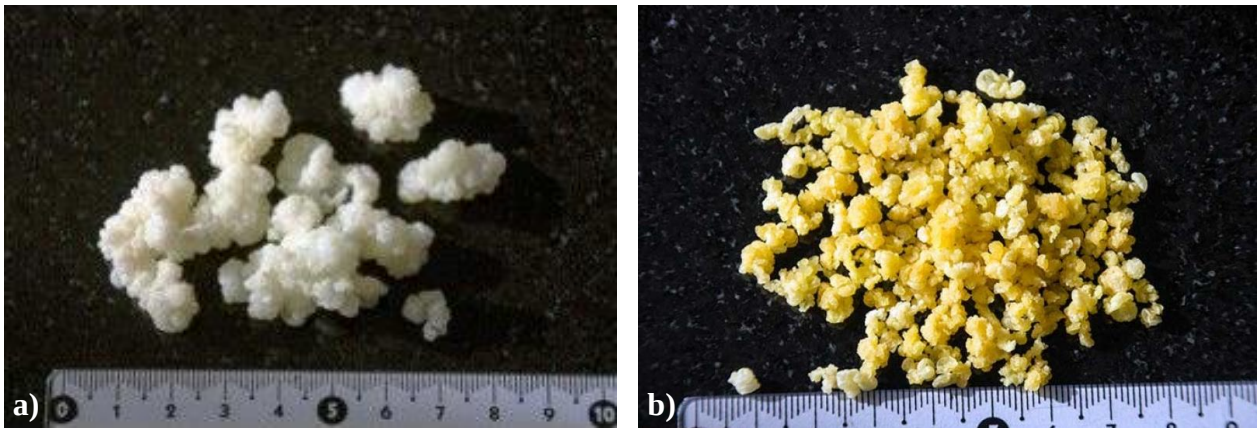
U nekim vrstama fermentacije, prirodni sadržaj mikroorganizama u sirovom mlijeku nije dovoljan za rapidno sniženje pH sredine i rast nepoželjnih kultura pa se dodaju početne kulture kompleksnih mikrobioloških mješavina i populacija. Važno je napomenuti da se one razviju kada

se promijeni dostupnost supstrata, razina pH ili redoks potencijal, a neke bakterije mliječne kiseline (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp.) proizvode različite bakteriocine koji potpomažu sprječavanje neželjene mikroflore [21].

1. 2. 3. KEFIRNA ZRNCA

Kefirna zrnca su vrlo složene tvorevine u kojima zajednica mnogobrojnih mikroorganizama živi u simbiozi [14,21]. Mogu se okarakterizirati kao jedinstveni, živi ekosustav izuzetno kompleksne mikrobiološke, promjenjive strukture koja broji više od osamdeset različitih vrsta bakterija i kvasaca te nitastu plijesan. Na ovim područjima često se nazivaju „tibetanskom gljivom“ ili „kefirnom gljivom“, ali naravno, zna se da kefirna zrnca nisu gljive [3].

Zrnca su bijele, blijedo-žućkaste boje ili boje slonovače, veličine 0,2-3,0 cm (slika 2a), karakterističnog mirisa. Izgledaju poput cvjetače i u suhom okruženju su tvrde strukture, a u vlažnom sluzave, elastične i gumaste [2,22]. Ponavljanjem inokulacije u mlijeko, kefirna zrnca svaki put povećaju svoju biomasu za oko 25 % [22]. Ako se ne žele koristiti neko vrijeme, mogu se dehidrirati sušenjem u vakuumu ili konvencionalno pri temperaturi od 33 °C i na taj način ostaju postojana više godina bez oštećenja aktivnosti (slika 2b) [23]. Ponovno se mogu aktivirati ponavljanjem inokulacije u pasterizirano mlijeko [24], a time sve brže i brže rastu, poprimaju iznova mekanu strukturu i stvaraju nova kefirna zrnca [22].

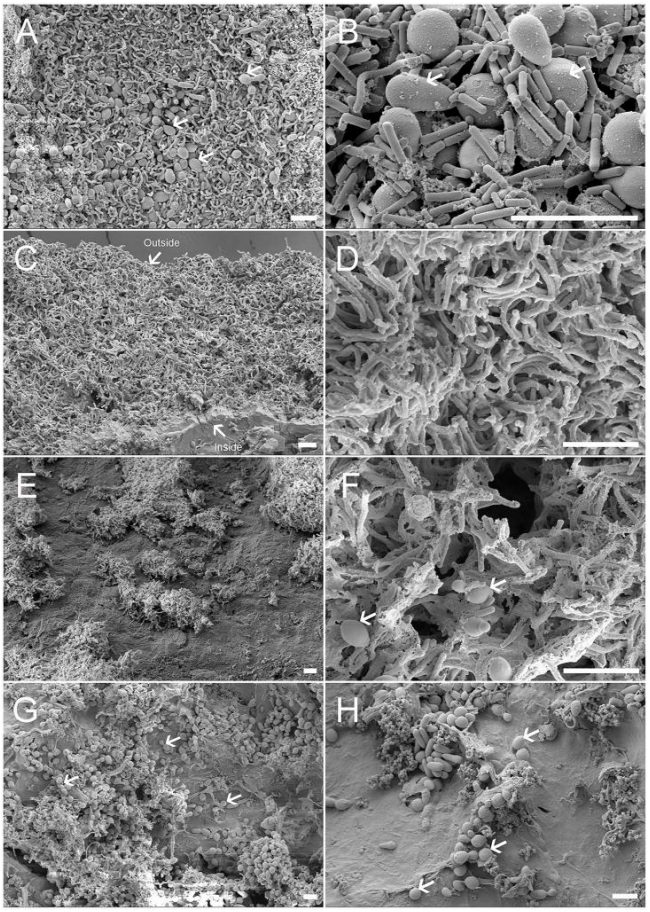


Slika 2. a) kefirna zrnca; b) dehidrirana kefirna zrnca.

Izvor: https://www.pinterest.com/pin/346988346274025182/; https://www.kefirshop.eu/en/review/product/list/id/17/.

1. 2. 3. 1. Sastav

Itekako je neophodno napomenuti da broj i omjer pojedinih mikroorganizama u kefirnim zrncima nije jednoznačno određen te se razlikuje u ovisnosti o podrijetlu i načinu kultivacije, kao i da je svaka struktura pojedinog kefirnog zrnca specifična [22]. Ona najviše posjeduje mezofilne homofermentativne i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline [25], a približno sadrži 10^9 CFU/mL *Lactococcus*, 10^7-10^8 CFU/mL *Leuconostoc*, 10^7-10^8 CFU/mL termofilnih *Lactobacillus* bakterija, 10^4-10^5 CFU/mL kvasaca, 10^4-10^5 CFU/mL bakterija octene kiseline i nitastu plijesan *Geotrichum candidum*. Mnogobrojnim istraživanjima izolirane su i bakterije iz roda *Streptococcus* i *Pediococcus* [22] te brojne vrste kvasaca iz roda *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Kazachstania* i *Zygosaccharomyces* [26].



Slika 3. SEM fotografija strukture kefirnih zrnaca – A + B: vanjska površina zrnaca; C + D: presjek zrnaca; E-H: unutarnje površine zrnaca uzgajanih na normalan i aseptičan način;

Strelice – A + B + F + G + H: reprezentativni kvasci zrnaca; C: vanjska i unutarnja površina zrnaca.

Izvor: literaturni navod 27.

Uz mikrobne vrste, struktura kefirnog zrnca građena je od polisaharida, proteina, raznolikih celularnih komponenti te brojnih drugih neodređenih sastavnica koje su uklopljene u matricu i povezane razgranatim dugim vlaknastim lancima (slika 3). Polisaharidni segment čini četvrtinu mase suhog zrnca, a sačinjen je od kefirana koji je inače topljiv u vodi. Kefiran, složena tvorba koja uključuje D-glukozu i D-galaktozu jednakih omjera, najzaslužniji je za uzajamnu simbiotsku

povezanost prisutnih mikroorganizama. Pretpostavlja se da to čini prema precizno definiranoj zakonitosti, s obzirom da bakterije dominiraju u perifernom dijelu zrnca, kvasci egzistiraju u centru, dok prostor između zauzimaju i bakterije i kvasci u ovisnosti o njihovim potrebama [22]. Primjerice, obje vrste koje su dobile ime prema kefiru, *Lactobacillus kefiranofaciens* i *Lactobacillus kefiri*, tvore kefiran, ali se *Lb. kefiranofaciens* nalazi bliže centru kefirnog zrnca, gdje prevladava anaerobna sredina puna etanola, a *Lb. kefiri* zauzima svoj prostor na rubnom dijelu [28]. Istovremeno, na perifernom dijelu nalaze se dominantne vrste – bakterija *Leuconostoc mesenteroides* i kvasac *Kluyveromyces marxianus* [29]. Također, mogu se pronaći bakterije iz roda *Lactobacillus* te kvasci koji ne tvore kefiran i nemaju mogućnost prolaska u unutrašnjost matrice kroz polisaharidni segment [22]. Dokazano je da je laktoza nužna za sintezu kefirana [30].

1. 2. 3. 2. Identifikacija mikroorganizama

Budući da kefirna zrnca imaju izuzetno kompleksnu, mikrobiološki varijabilnu strukturu, identifikacija i izolacija pojedine vrste mikroorganizma je vrlo metodološki delikatna i zahtjevna. Zbog te činjenice je mikroflora zrnaca u literaturi nejednako protumačena. Isto tako, njihovo podrijetlo utječe na različit izbor metoda detekcije i klasifikacije.

Metode koje se koriste za identifikaciju mikrobnog sastava kefirnih zrnaca počivaju na raznim mikrobiološkim i molekularnim eksperimentalnim istraživanjima. Usvojena klasična kultivacija mikroorganizama na različitim, više ili manje selektivnim, hranjivim podlogama još uvijek je najrasprostranjenija metoda. Također, moguće je izolirati genomsku mikrobnu DNA iz određenog izolata, koja se zatim određuje spektrofotometrijskim ili elektroforetskim tehnikama kako bi se na kraju metodama baziranim na lančanoj reakciji polimeraze utvrdile prisutne vrste.

Metagenomskom identifikacijom moguće je bez kultivacije i izolacije mikroorganizama istražiti strukture njihovih složenih zajednica na način da se iz kefirnog zrnca izolira ukupna mikrobna DNA ili RNA i pomoću lančane reakcije polimeraze umnoži ciljana regija, a kasnije detektira vrsta preko specifičnog nukleotidnog slijeda. Najnovija automatizirana i sofisticirana metoda, koja se koristi u zadnjih nekoliko godina, jest pirosekvenciranje. Najveća prednost te metode je što nudi uvid u najmanje strukture mikrobne zajednice detektirajući jedinstvene nukleotidne sekvence za pojedinu vrstu [22].

1. 2. 4. KEFIR

Kefir je fermentirani mliječno-kiseli napitak podrijetlom s Kavkaza, od davnina poznat po ljekovitom djelovanju na probavni sustav. Smatra se da je redovna i neograničena konzumacija kefira zaslužna za dobro i dugovječno zdravlje žitelja tog područja. Naziv „kefir“ dolazi od turske riječi „*kef-ir*“, koja znači „napitak za uživanje“. Prvobitno se za proizvodnju kefira upotrebljavalo ovčje mlijeko i pretpostavlja se da je taj funkcionalni napitak star nekoliko tisuća godina [2,20,22], a danas se najčešće proizvodi od kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka koje fermentira mliječno-kiselim i alkoholnim vrenjem uz pomoć mikroorganizama kefirnih zrnaca, a krajnji produkti su mliječna kiselina, etanol, ugljikov dioksid i mnoštvo probiotičkih „dobrih“ bakterija [14].

Kefir se u kućnoj radinosti, na tradicionalan način, obično proizvodi dodatkom 2-5 % kefirnih zrnaca u prokuhano pa ohlađeno ili industrijski pasterizirano i/ili sterilizirano mlijeko te ostavi na sobnoj temperaturi 24-48 h. Za industrijske potrebe proizvodnje kefira, u mlijeko se inokulira komercijalna kultura kefira, a postoje i kefirne kulture u obliku tableta ili praha [2].

Komercijalne kulture kefira pripravljene su izolacijom iz kefirnih zrnaca, a sastoje se od različitih izolata raznovrsnih mješavina bakterija i/ili kvasaca. Budući da komercijalne kefirne kulture sadrže prilično mali broj različitih mikroorganizama s obzirom na cijeli niz istih u kefirnim zrncima, kefir dobiven pomoću kefirne kulture je u osjetnoj mjeri izgubio svoju autentičnost [31].

1. 2. 4. 1. Sastav

Sastav kefira je vrlo promjenjiv i nejednako definiran u literaturi. On ovisi o vrsti mlijeka i udjelu mliječne masti, sastavu kefirnih zrnaca ili kefirne kulture te tehnološkom procesu proizvodnje. Isto tako, na sastav utječu temperatura i vrsta tretiranja mlijeka, količina dodanog inokuluma u mlijeko te temperatura i vrijeme fermentacije [30,31].

1. 2. 4. 1. 1. KEMIJSKI I NUTRITIVNI SASTAV

Glavni produkti tijekom fermentacije kefira su mliječna kiselina, ugljikov dioksid i etanol. Novonastali diacetil i acetaldehid su aromatski spojevi koji kefiru daju karakterističan okus i aromu, a diacetil proizvode *Leuconostoc* spp. i *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. pH vrijednost kefira iznosi od 4,2 do 4,6. Osim korisnih bakterija i kvasaca, u sastavu se nalaze vitamini, minerali te esencijalne amino i masne kiseline. Kefir je bogat vitaminima B2, B12, C, E i K; biotinom, folnom i pantotenskom kiselinom, magnezijem, kalcijem, kalijem, fosforom te lako i brzo probavljivim aminokiselinama. S obzirom da je sadržaj laktoze smanjen, a β-galaktozidaze povećan tijekom procesa fermentacije, konzumacija kefira savjetuje se osobama koje su intolerantne na laktozu. Kemijski i nutritivni sastav kefira prikazan je u tablici 2 [31].

Tablica 2. Kemijski i nutritivni sastav kefira.

Izvor: literaturni navod 31.

Sastojak	100 g	Sastojak	100 g
Energetska vrijednost	65 kcal	**Minerali (g)**	
masti (%)	3,50	fosfor	0,10
proteini (%)	3,30	kalcij	0,12
laktoza (%)	4,00	kalij	0,15
voda (%)	87,5	kloridi	0,10
		magnezij	12,0
mliječna kiselina (g)	1,00	natrij	0,05
etanol (g)	0,90		
kolesterol (mg)	13,0	**Elementi u tragovima**	
Esencijalne aminokiseline (g)		bakar (μg)	12,0
		cink (mg)	0,36
fenilalanin + tirozin	0,35	mangan (μg)	5,00
izoleucin	0,21	molibden (μg)	5,50
leucin	0,34	željezo (mg)	0,05
lizin	0,27		
metionin + cistein	0,12	**Aromatski sastojci**	
treonin	0,17		
triptofan	0,05	acetaldehid	
valin	0,22	diacetil	
		acetoin	
Vitamini (mg)			
A	0,06		
β-karoten (provitamin)	0,02		
B1	0,04		
B2	0,17		
B3	0,09		
B6	0,05		
B12	0,50		
C	1,00		
D	0,08		
E	0,11		

1. 2. 4. 1. 2. MIKROBIOLOŠKI SASTAV

Mnogobrojnim mikrobiološkim te molekularnim istraživanjima su iz kefira i kefirnih zrnaca izolirane i identificirane brojne, ali i raznolike vrste mikroorganizama. Procjenjuje se, prema dosadašnjim znanstvenim podacima, da mikrobiološke zajednice kefira i kefirnih zrnaca obuhvaćaju više od osamdeset različitih mikrobnih vrsta (tablica 3). Dakako, postoji mogućnost pronalaska novih mikroorganizama daljnjim razvojem i usavršavanjem postojećih metoda, a možda i otkrićem novih [22].

Tablica 3. Dosadašnje detektirane vrste mikroorganizama u kefiru i kefirnim zrncima.

Izvor: literaturni navodi 16, 22 i 32-50.

Bakterije	**Kvasci**	**Nitasta plijesan**
1. *Acetobacter aceti*	51. *Candida famata*	84. *Geotrichum candidum*
2. *Acetobacter fabarum*	52. *Candida holmii*	
3. *Acetobacter lovaniensis*	53. *Candida inconspicua*	
4. *Acetobacter syzygii*	54. *Candida kefyr*	
5. *Acinetobacter* spp.	55. *Candida krusei*	
6. *Bifidobacterium* spp.	56. *Candida lambica*	
7. *Dysgonomonas* spp.	57. *Candida lipolytica*	
8. *Enterococcus durans*	58. *Candida maris*	
9. *Enterococcus faecium*	59. *Cryptococcus humicolus*	
10. *Gluconobacter japonicus*	60. *Debaryomyces hansenii*	
11. *Halococcus* spp.	61. *Kazachstania aerobia*	
12. *Lactobacillus acidophilus*	62. *Kazachstania exigua*	
13. *Lactobacillus amylovorus*	63. *Kazachstania unispora*	
14. *Lactobacillus brevis*	64. *Kluyveromyces lactis*	
15. *Lactobacillus buchneri*	65. *Kluyveromyces marxianus*	
16. *Lactobacillus casei*	66. *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*	
17. *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*	67. *Klyveromyces lactis*	

Bakterije	Kvasci	
18. *Lactobacillus crispatus*	68. *Issatchenkia occidentalis*	
19. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	69. *Lachancea meyersii*	
20. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	70. *Pichia fermentans*	
21. *Lactobacillus fermentum*	71. *Pichia guilliermondii*	
22. *Lactobacillus fructivorans*	72. *Pichia kudriavzevii*	
23. *Lactobacillus gallinarum*	73. *Saccharomyces cerevisiae*	
24. *Lactobacillus helveticus*	74. *Saccharomyces fragilis*	
25. *Lactobacillus hilgardii*	75. *Saccharomyces lactis*	
26. *Lactobacillus kefiranofaciens*	76. *Saccharomyces lipolytic*	
27. *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*	77. *Saccharomyces martiniae*	
28. *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*	78. *Saccharomyces turicensis*	
29. *Lactobacillus kefiri*	79. *Saccharomyces unisporus*	
30. *Lactobacillus parabuchneri*	80. *Torulaspora delbrueckii*	
31. *Lactobacillus paracasei*	81. *Torulaspora delbrus*	
32. *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*	82. *Zygosaccharomyces* spp.	
33. *Lactobacillus parakefiri*	83. *Zygosaccharomyces rouxii*	
34. *Lactobacillus plantarum*		
35. *Lactobacillus reuteri*		
36. *Lactobacillus rhamnosus*		
37. *Lactobacillus satsumensis*		
38. *Lactobacillus uvarum*		
39. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*		
40. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*		
41. *Leuconostoc lactis*		
42. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*		
43. *Pediococcus acidilactici*		
44. *Pediococcus dextrinicus*		
45. *Pediococcus pentosaceus*		
46. *Pseudomonas putida*		
47. *Pelomonas* spp.		
48. *Shewanella* spp.		
49. *Streptococcus thermophilus*		
50. *Weissella* spp.		

1. 2. 4. 2. Utjecaj na zdravlje

Mnoga istraživanja pokazuju pozitivan utjecaj konzumiranja kefira na ljudsko zdravlje, a najveća potvrda je njegova upotreba već nekoliko tisuća godina. U doba Sovjetskog Saveza, liječnici u bolnicama davali su kefir pacijentima za poboljšanje raznih zdravstvenih stanja, kao što su metabolički poremećaji, ateroskleroza i alergije. Čak su ga koristili i za liječenje tuberkuloze, raznih vrsta karcinoma te gastrointestinalnih poremećaja u vrijeme dok modernije liječenje nije bilo dostupno.

Danas je dokazano da redovna konzumacija kefira može doprinijeti ublažavanju svih crijevnih poremećaja, promicanju rada probavnog trakta, smanjenju nadutosti i općenito zdravijem probavnom sustavu. Ustanovljeno je da utječe na detoksikaciju cijelog organizma, a time uspostavlja optimalno zdravlje i dugovječnost. Kefir je funkcionalan proizvod koji se lako probavlja, a izvor je korisnih probiotičkih bakterija i kvasaca, vitamina, minerala te ostalih bioaktivnih komponenti koje pridonose zdravom imunološkom sustavu. Upotrebljava se za pomoć pacijentima koji pate od AIDS-a, sindroma kroničnog umora, herpesa i raka.

U nedavnim studijama istraživani su pozitivni antibakterijski, imuno-potencirajući, antitumorski, hipokolesterolemički i antioksidacijski učinci kefira. Kefir posjeduje antibakterijsko djelovanje *in vitro* protiv širokog spektra Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i nekih kvasaca i plijesni. Također, utvrđeno je da mikrobne vrste kefira smanjuju aktivnost fekalnih enzima u gastrointestinalnom sustavu. *In vitro* i *in vivo* studije pokazale su da egzopolisaharid kefiran i sfingomijelin izoliran iz lipida kefira stimuliraju bolji rad imunološkog sustava. Određenim istraživanjima ustanovljeno je da kefir nema direktan *in vitro* utjecaj na tumorske stanice, ali da potpomaže mehanizme antitumorske aktivnosti. Pretpostavlja se da vodotopljivi dio

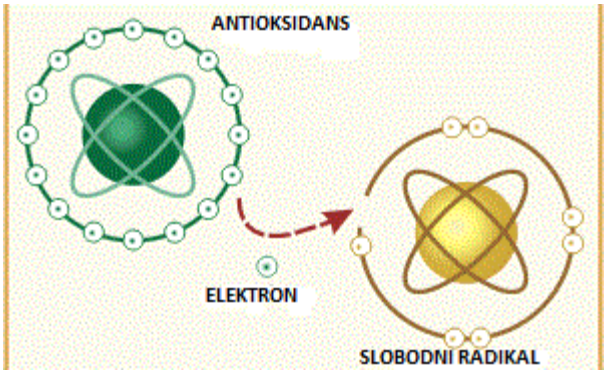
polisaharida (kefiran) potiskuje rast tumora pomoću makrofaga aktiviranih putem limfokina preko limfatičkog tkiva crijeva, dok u vodi netopljive frakcije (mikroorganizmi) djeluju povećanjem aktivnosti NK stanica (engl. *Natural Killer Cells*). S obzirom da kefir ima značajnu ulogu kontrole visoke razine kolesterola, na taj način štiti ljudski organizam od kardiovaskularnih bolesti. Sastojci kefira u *in vivo* i *in vitro* pokusima imaju antioksidacijska svojstva, što je veoma važno u borbi protiv oksidacijskog stresa, jednog od najvećih razloga oštećenja stanica organizma [30,31].

1. 2. 5. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA MLIJEKA I KEFIRA

Proces oksidacije svakom živom biću neophodan je za stvaranje energije. Međutim, razni poremećaji tog sustava dovode do oksidacijskog stresa koji može prouzročiti ozbiljne patološke promjene bioloških sustava. Antioksidansi su kemijske tvari koje mogu neutralizirati, a time inhibirati slobodne radikale i ostale reaktivne oblike, koji neprekidno nastaju upravo oksidacijskim stresom u organizmu. Proces neutralizacije ponavlja se sve do trenutka nastanka neradikalnog produkta, sparivanjem atoma vodika ili elektrona antioksidansa s nesparenim elektronom reaktivnog slobodnog radikala (slika 4).

Prije dvadeset do trideset godina, najveći postotak oboljenja pripadao je zaraznim bolestima, dok danas ljudi najviše obolijevaju od raznih akutnih i kroničnih (nezaraznih), a sve više i metaboličkih bolesti. Stoga, potrebno je odabrati zdravu, funkcionalno bogatu hranu kako bi se uzroci kojekakvih bolesti izbjegli ili sveli na najnižu moguću razinu. Svakodnevno se širom svijeta povećava potražnja hrane koja sadrži prirodne antioksidanse. Nerijetko se velikom broju

prehrambenih namirnica i mliječnih proizvoda dodaju prirodni antioksidansi i fitokemikalije koje pojačavaju njihovu, već prisutnu antioksidacijsku aktivnost.



Slika 4. Neutralizacija slobodnog radikala.

Izvor: https://apotekaweb.com/online-shop/samolijecenje/menopauza-samolijecenje/vitamini-minerali-i-dodaci-prehrani-menopauza-samolijecenje/altioks-200mg-30-kapsula/.

Mlijeko sadrži očigledne količine ekvola, polifenolnog metabolita daidzeina, koji ima dokazano antioksidacijsko djelovanje. Kazein, glavni protein mlijeka, u svome sastavu ima različite frakcije (α_{s1}-, α_{s2}-, β- i κ-kazein) koje sadrže znatne količine fosfata, a time i antioksidanse. Istraživanja su pokazala da kazein inhibira autooksidaciju lipida kataliziranu lipooksigenazom. Dokazana je antioksidacijska aktivnost proteina sirutke koji mogu učinkovito inaktivirati oksidaciju lipida, a i svojim djelovanjem povećati razinu glutation peroksidaze. Membrana globule mliječne masti smatra se najčešćim mjestom autooksidacije. Vjeruje se da preventivni antioksidans, kao što je β-karoten, može jednom molekulom inhibirati dvjesto pedeset do tisuću molekula neradikalnog, ali reaktivnog oblika kisika – singletnog kisika ($^1\Delta gO_2$). Na autooksidaciju lipida mlijeka i oksidaciju izazvanu svjetlošću utječe složena interakcija prooksidansa i antioksidansa. β-karoten, ovisno o koncentraciji, može spriječiti fotooksidaciju apsorbirajući

svjetlost koju bi npr. vitamin B2 mogao apsorbirati, što bi dovelo do problema vezanih za kvalitetu mlijeka. Glavni predstavnik antioksidansa iz mlijeka koji su topljivi u vodi jest vitamin C, jedan od najjačih, a najmanje toksičnih prirodnih antioksidansa. Vitamin C može neutralizirati superoksidne (O_2^-) i alkoksilne ($RO\cdot$) radikale, singletni kisik te željezove i dušikove okside, ali i značajno inhibirati razgradnju vitamina B2 u mlijeku izloženom svjetlu. Izuzetno je koristan za novorođenčad jer ima ključnu ulogu u stvaranju neurotransmitera, sintezi L-karnitina i apsorpciji željeza. Vitamini A i E (tokoferoli, tokotrienoli) smatraju se primarnim antioksidansima topljivim u lipidima, a glavni zadatak im je, kao i ubikvinolu, zaštita polinezasićenih masnih kiselina. α-tokoferol nalazi se u membrani globule mliječne masti i može djelovati kao preventiva u nastanku slobodnih radikala te inhibirati singletni kisik u mlijeku. Nadalje, vitamin E suprimira aktivnost proteolitičkog enzima – plazmina, ali može i izravno „očistiti“ slobodne radikale. Ustanovljeno je da antioksidacijsko djelovanje cinka, selena i glutationa izaziva supresiju superoksidnog radikala. Laktoferin može imati vrlo važnu ulogu antioksidansa, sve u svrhu vezanja prooksidacijskih iona željeza, a time smanjenja pretvorbe vodikovog peroksida (H_2O_2) u hidroksilni radikal ($\cdot OH$) putem Fentonove reakcije. Antioksidacijski potencijal mlijeka može se pripisati i aminokiselinama koje sadrže sumpor (metionin, cistein), superoksid dismutazi, glutation peroksidazi, katalazi, oligosaharidima itd. [12,51]. Treba napomenuti da je katalaza najtermolabilniji enzim koji se pojavljuje u mlijeku pa zato na visokoj temperaturi gubi svoja bioaktivna svojstva, dok aktivnost glutation peroksidaze ostaje relativno stabilna [9].

Istraživanja su pokazala da kefir pokazuje značajno veću razinu inhibitorne sposobnosti uklanjanja DPPH radikala nego mlijeko, a da za to donekle mogu biti odgovorni peptidi iz kazeina, čija je aktivnost najvećim dijelom usmjerena protiv peroksidacije lipida i masnih kiselina [52]. Laktoferin i albumini krvnog seruma pokazuju visok stupanj keliranja željeza, a ostaci fosfoserina,

koji su smješteni na površini kazeinskih micela, potpomažu odstranjivanje iona željeza i bakra pridonoseći antioksidacijskoj aktivnosti mlijeka. Isto tako, karboksilna skupina aminokiselina asparagina i glutamina može vezati katione željeza. Superoksidne slobodne radikale mogu suprimirati laktoperoksidaza, α-laktoalbumin, β-laktoglobulin te kazein, a novija istraživanja ukazuju i na glikoproteine, koji u svom sastavu imaju proteinsku komponentu i oligosaharidne lance. Također, pretpostavlja se da *Lactobacillus rhamnosus* inaktivira peroksidaciju lipida kelirajući ione željeza i eliminira superoksidne anione *in vitro*. Za sada i dalje ostaje nejasno na koji način funkcionira specifični mehanizam koji kefiru daje prednost u inhibiciji peroksidacije lipida u odnosu na mlijeko, ali se zna da se može pripisati doprinosu bioaktivnih komponenti mikroorganizama kefira i kefirnih zrnaca, kao i peptidima dobivenim tijekom fermentacije mlijeka. Određena studija pokazala je da superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza iz fermentiranog mlijeka pogoduju njegovoj antioksidacijskoj aktivnosti, ali u manjoj mjeri s obzirom na nefermentirano mlijeko [9]. Antioksidansi iz kefira pomažu u inaktivaciji autooksidacije vitamina C [8]. Ustanovljeno je da visoki sadržaj proteina, slobodnih aminokiselina i oligopeptida, koji je nastao kao posljedica djelovanja mikrobnih proteaza tijekom fermentacije, može pridonijeti antioksidacijskom kapacitetu kefira. Također, svoj doprinos ima i sinergistički učinak fenolnih i drugih prisutnih, biološki aktivnih komponenti [53]. Penicilamin je intracelularni kelator metalnih iona koji inače kataliziraju oksidacijske reakcije. Opisano je kako *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium longum* imaju sposobnost keliranja upravo penicilamina te sličnih unutarstaničnih kelatora [54]. Drugo istraživanje potvrdilo je visoku antioksidacijsku sposobnost sojeva bakterija u inhibiranju DPPH radikala, a to su sojevi *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus acidophilus* [55]. Nadalje, u *in vitro* i *in vivo* studiji zabilježeno je kako *Bifidobacterium* spp. ima potencijalni antioksidacijski učinak [56]. Zaključeno je da su antioksidacijska svojstva kefira

rezultat prisutnosti kazeina, peptida i aminokiselina, konjugirane linolne kiseline, vitamina A, C i E, karotenoida (β-karoten), koenzima Q10, enzimske skupine (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza), bakterija mliječne kiseline te proteina sirutke koji su bogati hidrofobnim aminokiselinama te aminokiselinama koje u svom sastavu imaju sumpor [57].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je ispitati i usporediti antioksidacijsku aktivnost mliječnog proizvoda – kefira dobivenog pomoću kefirnih zrnaca, pripravljenog od sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka; utvrditi razlike među ispitivanim vrstama mlijeka te utječe li fermentacija i njezino vrijeme na antioksidacijsko djelovanje. Također, cilj je ispitati odražavaju li se vrsta i tretiranje mlijeka na antioksidacijski učinak novonastalog fermentiranog proizvoda. Metode korištene u radu su redukcija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala i spektroskopsko mjerenje elektronskom spinskom rezonancijom (ESR). Za sada, nije zabilježeno istraživanje kombinacije DPPH i ESR metode određivanja antioksidacijske aktivnosti kefira, stoga je cilj povezati dobivene rezultate s dosadašnjim znanstvenim podacima o ispitivanom mliječnom proizvodu.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Materijali

Upotrijebljeno trajno (sterilizirano) mlijeko kupljeno je u trgovačkom lancu „Kaufland“ (Rijeka, Hrvatska), a sirovo dobiveno s područja Kukuljana i Trnovice (Jelenje, Hrvatska). Kefirna zrnca poklonila je gospođa Sanela Vucelić (Rijeka, Hrvatska). Upotrijebljeno mlijeko opisano je u tablici 4, a oznake ispitivanih uzoraka u tablici 5. Priređena koncentracija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, proizvođača „Sigma“ (St. Louis. MO, SAD), otopljenog u metanolu (p. a.), proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska), iznosila je c = 0,15 mmol/L.

Tablica 4. Opis upotrijebljenog mlijeka.

Mlijeko	Kupljeno/ dobiveno	Proizvođač/ područje proizvodnje	Zemlja podrijetla	Opis proizvoda	Sastojci
kravlje sirovo	dobiveno	Kukuljani	Hrvatska	-	sirovo kravlje mlijeko
kravlje trajno	kupljeno	'z bregov, Vindija d.d., Varaždin, Hrvatska	Hrvatska	sterilizirano, homogenizirano kravlje mlijeko	kravlje mlijeko s 2,8 % mliječne masti
kozje sirovo	dobiveno	Trnovica	Hrvatska	-	sirovo kozje mlijeko
kozje trajno	kupljeno	'z bregov, Vindija d.d., Varaždin, Hrvatska	Hrvatska	sterilizirano, homogenizirano kozje mlijeko	kozje mlijeko s 2,8 % mliječne masti, stabilizator E339

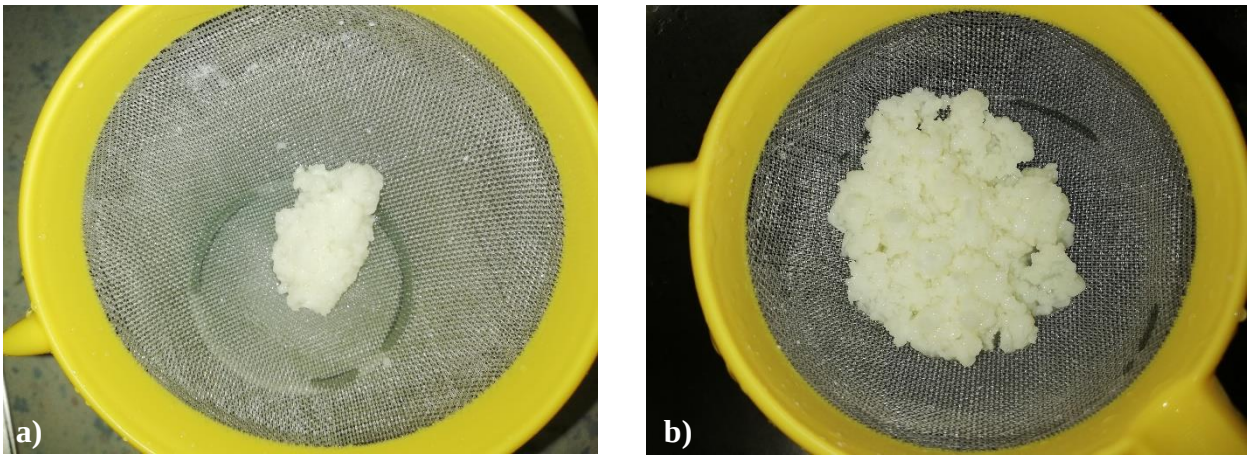
Tablica 5. Oznake ispitivanih uzoraka.

Uzorak	Oznaka
kravlje sirovo mlijeko	KRSM
kravlje trajno mlijeko	KRTM
kozje sirovo mlijeko	KOSM
kozje trajno mlijeko	KOTM
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kravljeg sirovog mlijeka, fermentiran 24 h	KRS1
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kravljeg sirovog mlijeka, fermentiran 48 h	KRS2
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kravljeg trajnog mlijeka, fermentiran 24 h	KRT1
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kravljeg trajnog mlijeka, fermentiran 48 h	KRT2
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kozjeg sirovog mlijeka, fermentiran 24 h	KOS1
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kozjeg sirovog mlijeka, fermentiran 48 h	KOS2
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kozjeg trajnog mlijeka, fermentiran 24 h	KOT1
kefir dobiven pomoću kefirnih zrnaca, pripravljen od kozjeg trajnog mlijeka, fermentiran 48 h	KOT2

3. 2. Metode

3. 2. 1. PRIPREMA KEFIRNIH ZRNACA

Kefirna zrnca dodana su u čistu staklenu posudu s određenom količinom svježeg (pasteriziranog) mlijeka i ostavljena fermentirati 24 sata. Staklena posuda je za vrijeme fermentacije bila pokrivena sterilnom gazom. Nakon 24 sata, kefir je miješajući plastičnom žlicom, procijeđen kroz cijedilo s plastičnom mrežicom. Zrnca su potom isprana destiliranom vodom te su prethodno spomenuti postupci na isti način ponovljeni nekoliko dana s ciljem povećanja potrebne biomase kefirnih zrnaca prije pripreme samih uzoraka (slike 5a i 5b).



Slika 5. Kefirna zrnca a) prije; b) nakon povećanja biomase.

3. 2. 2. PRIPREMA KEFIRA

U staklenu čašu dodano je 50 mL mlijeka i inokulirano s 2,5 g kefirnih zrnaca (5 % masa/volumen) te ostavljeno fermentirati 24 h. Postupak je ponovljen za svaku vrstu mlijeka te za fermentaciju u trajanju od 48 h. Staklene čaše su tijekom fermentacije bile pokrivene sterilnom gazom (slika 6). Nakon 24, odnosno 48 h, uzorci kefira su miješajući plastičnom žlicom, procijeđeni kroz cijedilo s plastičnom mrežicom te procijeđeni kroz tkaninu s ciljem dobivanja homogene smjese (slika 7). Fermentirani mliječni proizvodi pohranjeni su u hladnjaku na +4 °C do trenutka mjerenja.



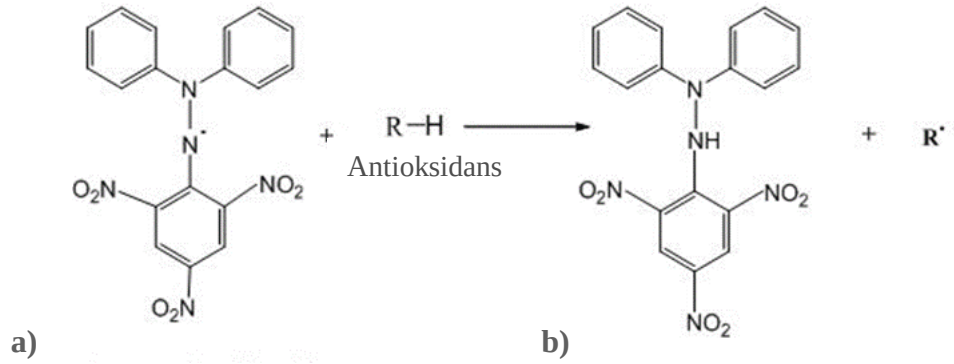
Slika 6. Pripremljeni uzorci za fermentaciju.



Slika 7. Procjeđivanje kefira kroz tkaninu.

3. 2. 3. METODA REDUKCIJE DPPH RADIKALA

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), molekulske formule $C_{18}H_{12}N_5O_6$, imena prema IUPAC-ovoj nomenklaturi di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazan, jest slobodni radikal relativno stabilnih svojstava na temelju delokalizacije nesparenog elektrona, s obzirom da molekula ne dimerizira. DPPH radikal reducira se sparivanjem njegovog nesparenog elektrona dušikovog atoma s atomom vodika antioksidansa. Tim procesom neutralizacije oslobodi se novi slobodni radikal R (slika 8), a ciklus se ponavlja sve do trenutka nastanka neradikalnog produkta [58].



Slika 8. Redukcija DPPH radikala: a) oksidirani; b) reducirani oblik strukture.

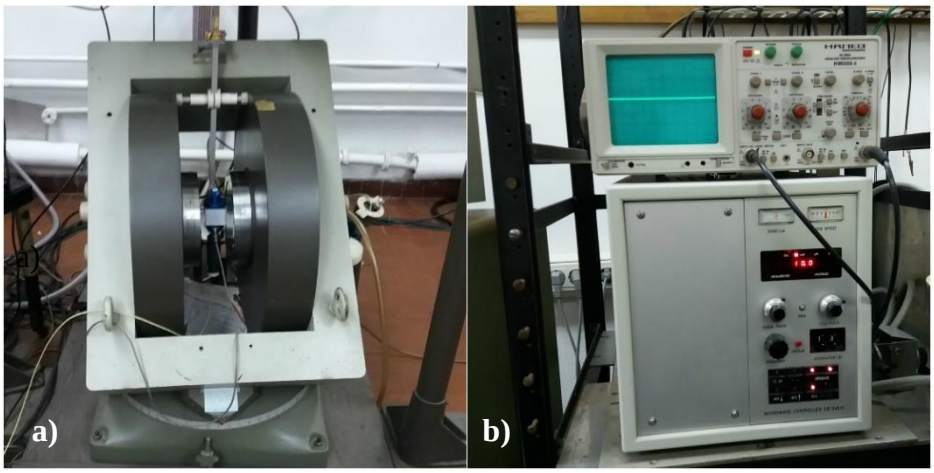
Izvor: http://www.assignmentpoint.com/science/biology/physical-chemical-constituents-zingiber.html.

3. 2. 4. METODA ELEKTRONSKE SPINSKE REZONANCIJE (ESR)

Elektronska spinska rezonancija (engl. *Electron Spin Resonance*, ESR), drugog imena elektronska paramagnetska rezonancija (engl. *Electron Paramagnetic Resonance*, EPR), jest spektroskopska metoda koja radi na način da elektromagnetsko polje molekula, koje imaju

nesparene elektrone, kao što su slobodni radikali i ioni prijelaznih metala, potiče mikrovalno zračenje određene frekvencije čiju apsorpciju uređaj na kraju detektira. Paramagnetski nespareni elektroni orijentiraju se paralelno ili antiparalelno u trenutku primjene vanjskog magnetskog polja, s obzirom na njegov smjer. Spinski magnetski moment uzrokuje spin elektrona koji iznosi $\pm \frac{1}{2}$. Spomenuto rezultira dvjema različitim razinama energije nesparenih elektrona, a apsorpcija mikrovalne energije uzrokuje prijelaz iz niže u višu razinu energije. Broj nesparenih elektrona, koji je prisutan u uzorku, proporcionalan je intenzitetu ESR signala, a navedeno pruža mogućnost kvantifikacije slobodnih radikala [59].

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti uzoraka provedeno je u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Zavodu za fizičku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu pomoću ESR spektrometra E-109 (slika 9), proizvođača „Varian, Inc.“ (Palo Alto. KA, SAD) i pripadajućeg mikrovalnog mosta ER 041 XG, proizvođača „Bruker“ (Karlsruhe, Njemačka).



Slika 9. Neki dijelovi uređaja: a) rezonantna šupljina s magnetskim poljem; b) kontrolni uređaj mikrovalnog polja s osciloskopom.

3. 2. 4. 1. Priprema uzoraka za mjerenje na ESR spektrometru

1.

a) pripremljena je otopina DPPH radikala u metanolu , koncentracije c = 0,15 mmol/L;
b) snimljen je spektar slijepe probe – otopine DPPH radikala u koju je dodano 10 % vode „Cetina“. .

2.

a) pripremljen je uzorak u kojem je otopini DPPH radikala dodano 10 % ispitivanog uzorka (mlijeka/kefira);
b) zabilježeno je početno vrijeme od dodatka uzorka otopini radikala (t = 0);
c) otopina DPPH s uzorkom je promiješana
d) potreban dio otopine s uzorkom uvučen je u kapilaru (s donje strane začepljenu glinom) koja je zatim ubačena u EPR cjevčicu promjera 4 mm
e) cjevčica je stavljena u rezonantnu šupljinu ESR spektrometra.

3. Postupci 1b i 2 ponovljeni su za svako slijedeće pojedino snimanje uzorka.

3. 2. 3. 2. Mjerenje na ESR spektrometru

Snimanje ESR spektara izvedeno je pri centralnom polju od 330,7 mT (3307 G), frekvenciji od 9,29 GHz, magnetskom posmaku od 8 mT (80 G), snazi mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudi modulacije 0,1 mT (1 G), pojačanju 2 500 i vremenu posmaka magnetskog polja od 20 s. Da bi se izbjegli neželjeni učinci dipolnih momenata vode i metanola koji dolaze do izražaja u magnetskom polju, smanjen je volumen otopine s uzorkom korištenjem kapilare smještene u ESR cjevčicu.

Energijski prijelaz nesparenih elektrona u primijenjenom magnetskom polju uzrokuje mikrovalno zračenje čiju apsorpciju detektira ESR uređaj, prikazujući rezultate u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija. Dvostruki integrali spektara računani su pomoću „Scientific Software Service EW (EPRWare)“ programa, a njihove su vrijednosti proporcionalne broju DPPH radikala.

Od zabilježenog početnog trenutka (t = 0), u kojem je otopini DPPH radikala dodano 10 % ispitivanog uzorka, mjeri se i prati intenzitet ESR signala, točnije pad intenziteta zbog pada broja DPPH radikala. Vrijednosti dvostrukih integrala za sve uzorke normirani su na početnu vrijednost dvostrukog integrala slijepe probe (otopina DPPH radikala u koju je dodano 10 % vode). Spektar slijepe probe snimljen je prije početka mjerenja svakog pojedinog uzorka. Spektri reakcijske otopine uzoraka su zatim snimani tijekom 15 minuta: svakih 30 sekundi tijekom prvih 10 minuta te svake minute zadnjih 5 minuta. Kako bi se osigurali isti uvjeti mjerenja pojedinih uzoraka i relevantna međusobna usporedba, napravljena su preliminarna mjerenja radi utvrđivanja optimalne koncentracije ispitivanih uzoraka.

Rezultati su obrađeni i prikazani pomoću grafova iz „MS Office Excel“ programa, a za opis uzoraka korištene su oznake iz tablice 5.

4. REZULTATI

U obliku relativnog intenziteta (*I*) prikazana je antioksidacijska aktivnost pojedinog ispitivanog uzorka mlijeka i kefira, odnosno sposobnost inhibiranja DPPH radikala. Relativni intenzitet (*I*) je omjer intenziteta DPPH otopine u određenom vremenu *t* po dodatku uzorka (I_t) i intenziteta slijepe probe (I_0); izračunan prema izrazu:

$$I = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100\ \%$$

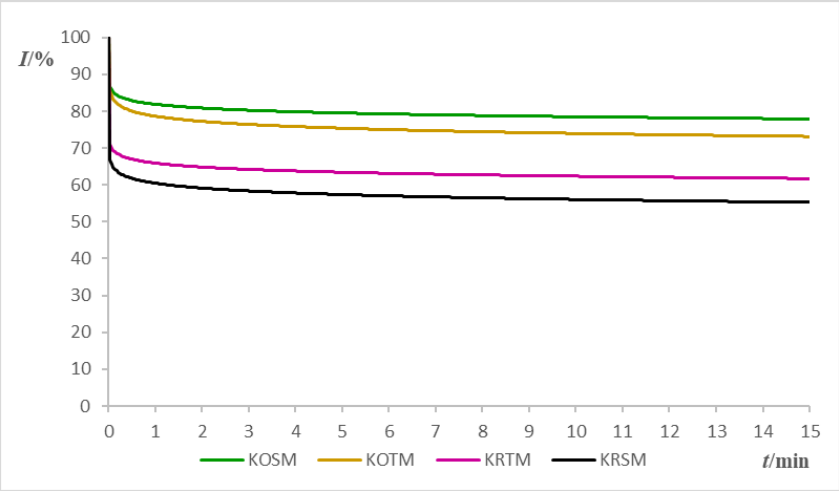
gdje je I_t iznos dvostrukog integrala spektra snimljenog po dodatku uzorka, a I_0 iznos dvostrukog integrala spektra slijepe probe. Dobivene vrijednosti izražene su u postocima.

4. 1. Antioksidacijska aktivnost različitih vrsta mlijeka

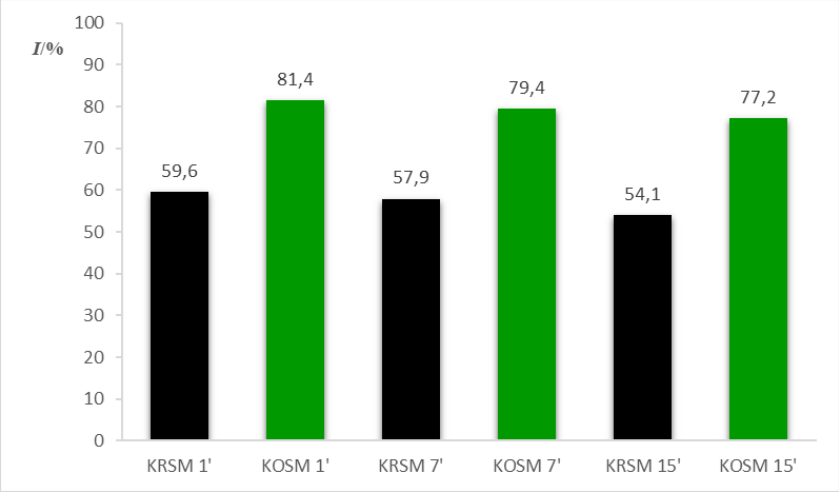
Slika 10 grafički prikazuje pad broja DPPH radikala, odnosno pad intenziteta ESR signala reakcijskih otopina pojedinih uzoraka snimanih tijekom petnaest minuta. Nakon petnaest minuta, uzorak kozjeg sirovog mlijeka pokazuje pad intenziteta početnog signala (I_0) na 77,2 %, kozjeg trajnog mlijeka 72,4 %, kravljeg trajnog mlijeka 61,0 % te kravljeg sirovog mlijeka na 54,1 %. Jasno je kako najveći pad intenziteta ESR signala pokazuje uzorak kravljeg sirovog mlijeka, dok se najmanji gubitak signala očituje kod kozjeg sirovog mlijeka.

Slika 11 grafički prikazuje razlike nakon prve, sedme i petnaeste minute u padu intenziteta ESR signala uzorka kravljeg sirovog mlijeka koji pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost i uzorka kozjeg sirovog mlijeka koji ima najslabiju antioksidacijsku aktivnost među ispitivanim

mlijekom. Početni intenzitet signala (I_0) je dodatkom KRSM prve minute pao na 59,6 %, nakon sedme na 57,9 %, a u zadnjoj, petnaestoj minuti mjerenja na 54,1 %. Uzorak KOSM je nakon prve minute smanjio početni signal na relativno slabih 81,4 %, nakon sedme na 79,4 %, a nakon petnaest minuta signal se smanjio za samo 22,8 %.



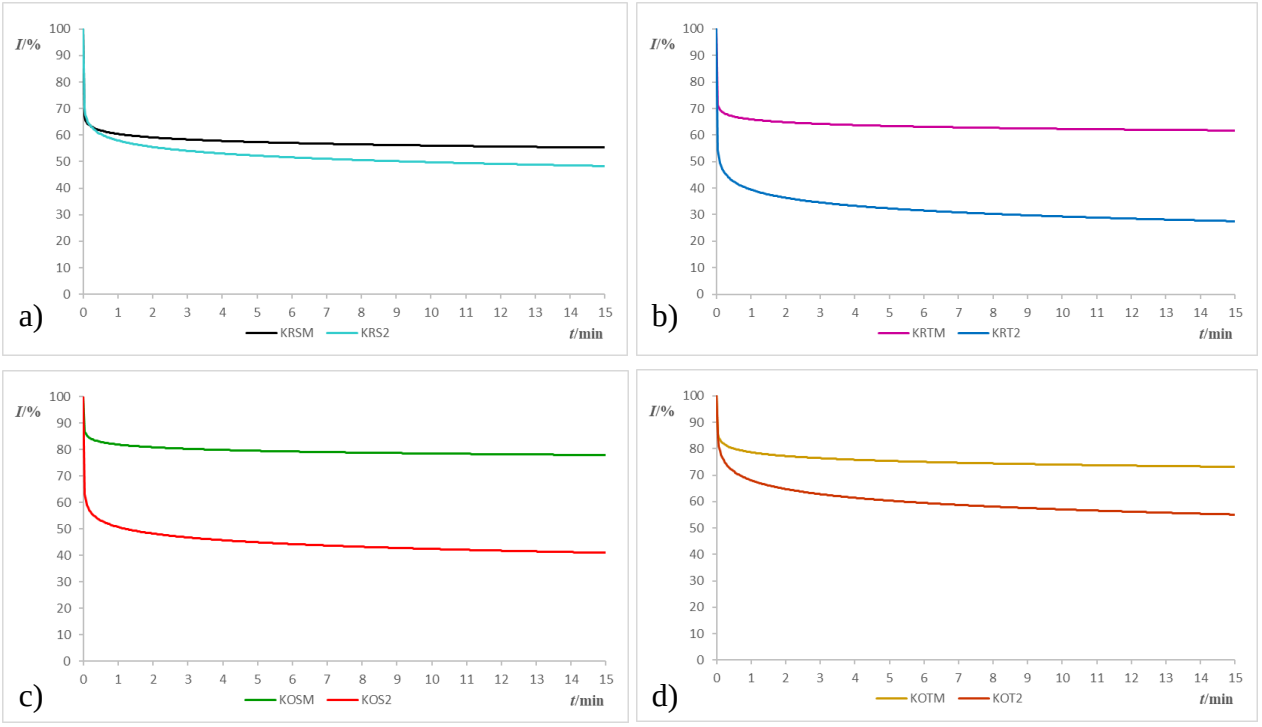
Slika 10. Ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke različitih vrsta mlijeka.



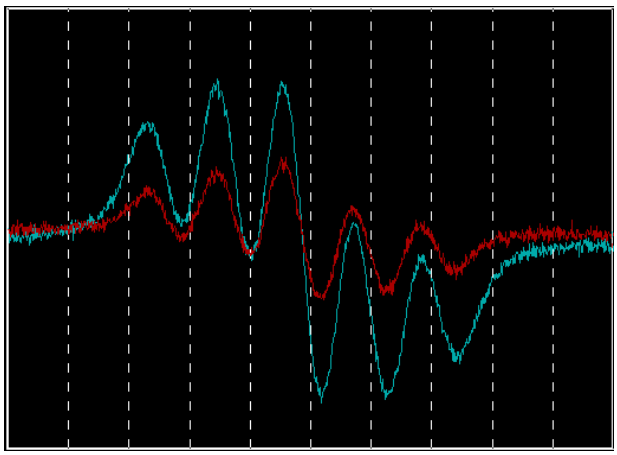
Slika 11. Relativni intenziteti ESR signala DPPH nakon dodatka kravljeg sirovog mlijeka (KRSM) i kozjeg sirovog mlijeka (KOTM) u trenutku t_1 = 1 min, t_5 = 7 min i t_{30} = 15 min.

4. 2. Utjecaj fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

Slike 12a, 12b, 12c i 12d grafički prikazuju razlike pada intenziteta ESR signala između mlijeka te pripadajućih novonastalih mliječnih proizvoda – kefira fermentiranih 48 h, a snimanih tijekom petnaest minuta. Uzorak kefira pripravljenog od kozjeg trajnog mlijeka je najslabije inaktivirao DPPH radikal, dok je kefir pripravljen od kravljeg trajnog mlijeka pokazao najveću antioksidacijsku moć u smanjenju početnog intenziteta signala naspram svih pripravljenih uzoraka kefira (slika 13). Prema tome, počevši od najjačeg, poredak ispitivanih kefira, fermentiranih 48 h, u odnosu na antioksidacijsku aktivnost glasi: KRT2, KOS2, KRS2, KOT2.

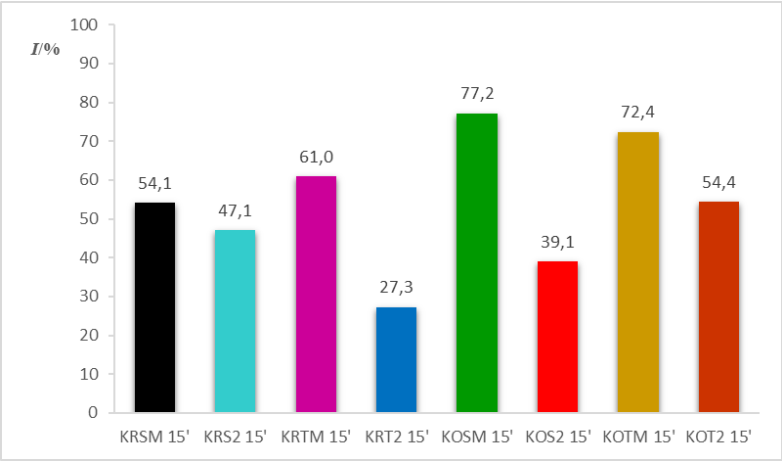


Slika 12. Utjecaj fermentacije na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine vrste mlijeka i pripadajuće kefire: a) kravlje sirovo mlijeko i pripadajući kefir fermentiran 48 h; b) kravlje trajno mlijeko i pripadajući kefir fermentiran 48 h; c) kozje sirovo mlijeko i pripadajući kefir fermentiran 48 h; d) kozje trajno mlijeko i pripadajući kefir fermentiran 48 h.



Slika 13. ESR spektri uzorka slijepe probe (veći intenzitet) i uzorka kefira pripravljenog od kravljeg trajnog mlijeka, fermentiranog 48 h (manji intenzitet).

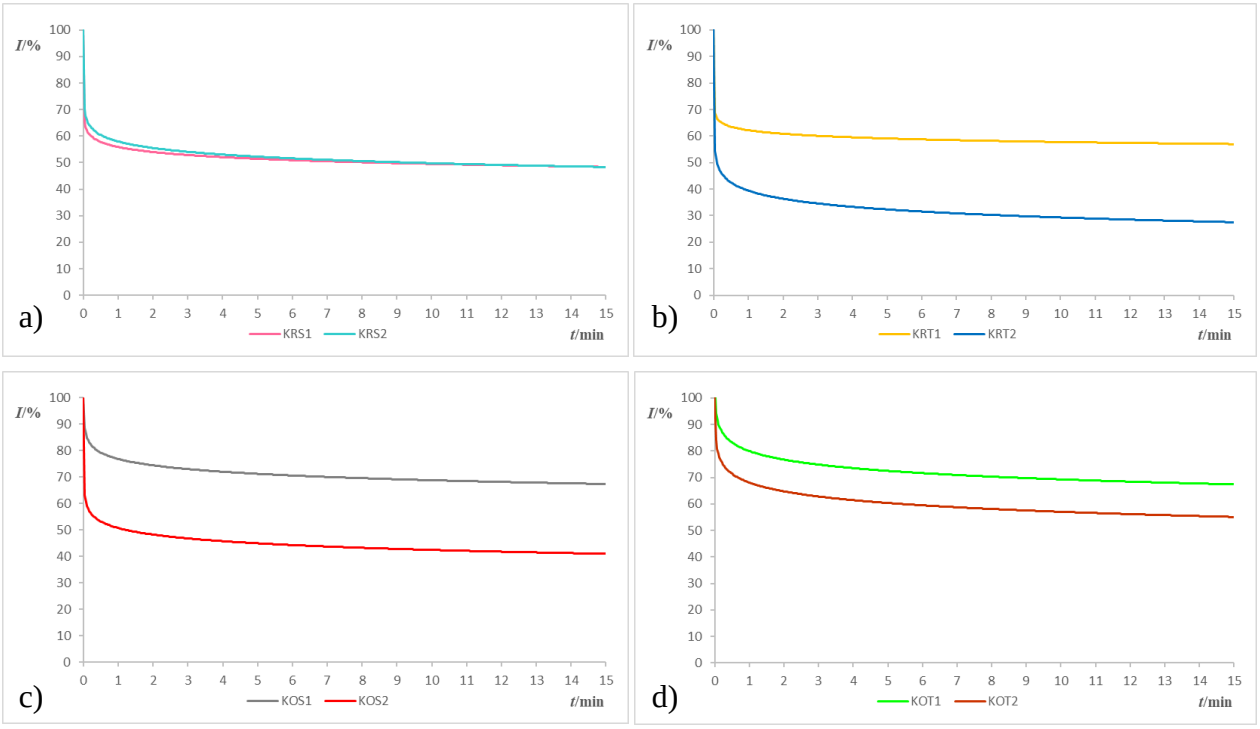
Na slici 14 također se mogu vidjeti razlike u padu ESR signala uzoraka različitih vrsta mlijeka i pripadajućih kefira, fermentiranih 48 h, nakon petnaeste minute. Početni intenzitet signala (I_0) je dodatkom KRT2 nakon petnaeste minute pao na 27,3 %. Također, uzorak KOS2 je početni signal smanjio za 60,9 %. Isto tako, relativni intenzitet signala KRS2 iznosio je 47,1 % vrijednosti početnog signala I_0 nakon petnaeste minute. Dodatkom KOT2 izmjeren je intenzitet od 54,4 % na kraju mjerenja.



Slika 14. Relativni intenziteti ESR signala DPPH nakon dodatka pojedine vrste mlijeka i pripadajućih kefira u trenutku t = 15 min.

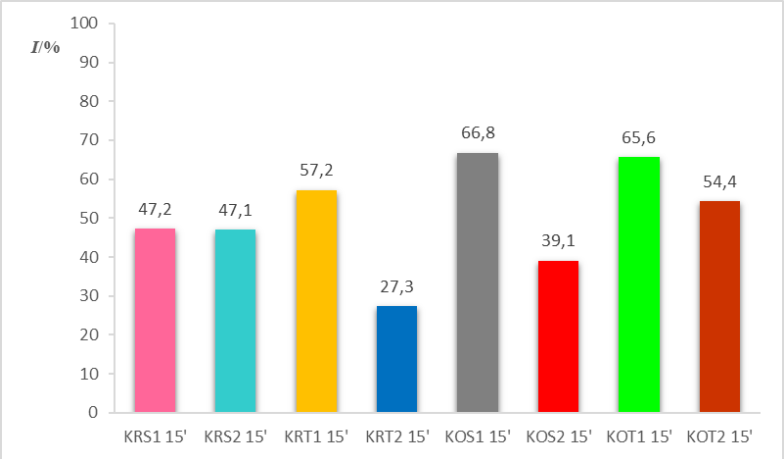
4. 3. Utjecaj vremena fermentacije na antioksidacijsku aktivnost kefira

Slike 15a, 15b, 15c i 15d grafički prikazuju razlike pada intenziteta ESR signala između mliječnih proizvoda – kefira fermentiranih 24 h i 48 h, snimanih tijekom petnaest minuta. Svi kefiri fermentirani 48 h inaktivirali su veći broj DPPH radikala, u odnosu na istovjetne fermentirane tijekom 24 h.



Slika 15. Utjecaj vremena fermentacije na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine kefire fermentirane 24 h i 48 h: a) kefiri pripravljeni od kravljeg sirovog mlijeka; b) kefiri pripravljeni od kravljeg trajnog mlijeka; c) kefiri pripravljeni od kozjeg sirovog mlijeka; d) kefiri pripravljeni od kozjeg trajnog mlijeka.

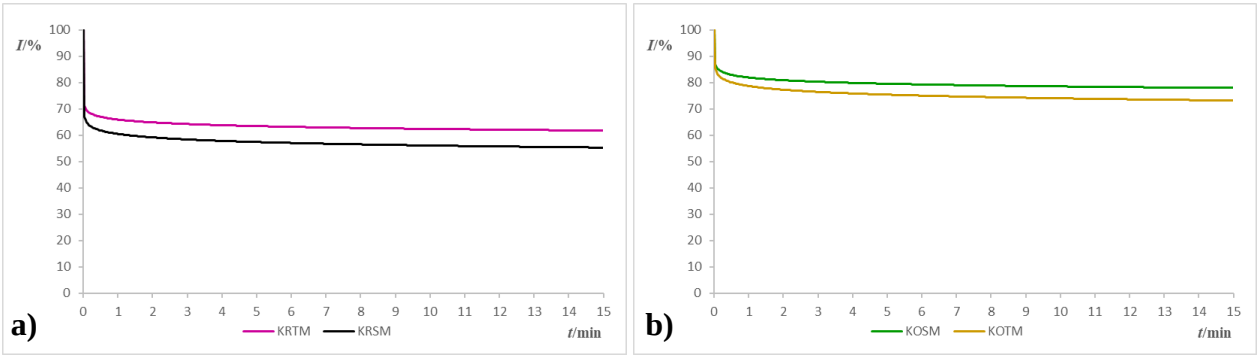
Na slici 16 se između ostalog mogu jasno vidjeti razlike u suprimiranju DPPH radikala uzoraka kefira fermentiranih 24 h i 48 h, tijekom petnaest minuta snimanja. Dodatkom uzorka KRS2 pad signala je za 0,1 % veći nego uzorka KRS1, dok je primjenom KRT2 u odnosu na KRT1 pad intenziteta viši za 29,9 % te kod KOS2 za 27,7 % veći s obzirom na KOS1, a pad signala uzorka KOT1 za 11,2 % manji nego uzorka KOT1.



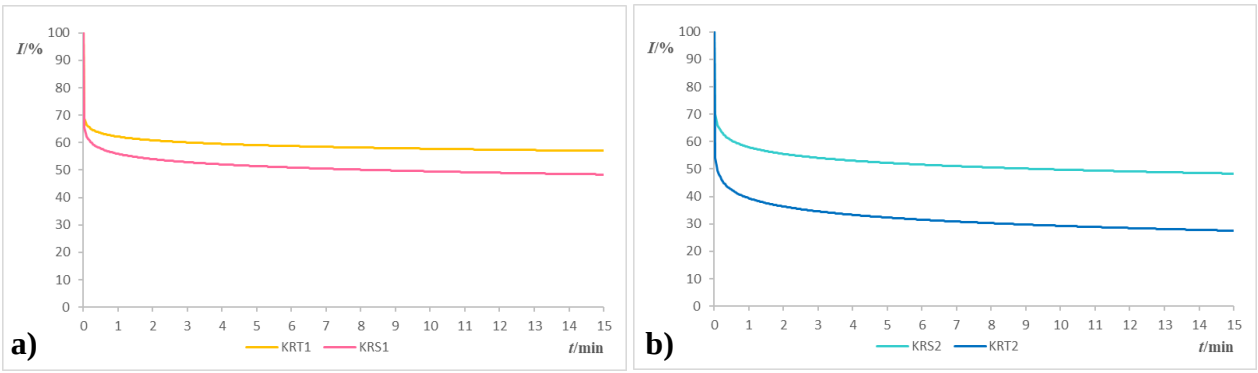
Slika 16. Relativni intenziteti ESR signala DPPH nakon dodatka kefira, fermentiranih 24 h i 48 h, u trenutku t = 15 min.

4. 4. Utjecaj tretiranja mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

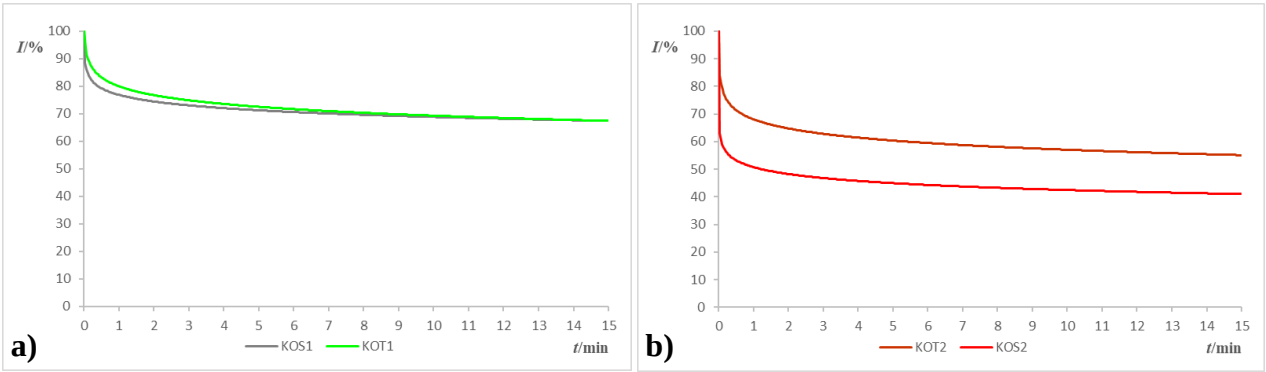
Slike 17, 18 i 19 grafički prikazuju utjecaj tretiranja mlijeka na razlike pada intenziteta ESR signala među ispitivanim uzorcima sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka te pripadajućim kefirima fermentiranim 24 h i 48 h. Uzorak KRSM je inaktivirao veći broj DPPH radikala nego KRTM (slika 17a), KOTM s obzirom na KOSM (slika 17b), KRS1 nego KRT1 (slika 18a) te KRT2 u odnosu na KRS2 (slika 18b). Također, uzorak KOT1 pokazao je veći antioksidacijski kapacitet u smanjenju početnog intenziteta signala u odnosu na KOS1 (slika 19a), a KOS2 s obzirom na KOT2 (slika 19b).



Slika 17. Utjecaj tretiranja mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka: a) kravlje sirovo i trajno mlijeko; b) kozje sirovo i trajno mlijeko.



Slika 18. Utjecaj tretiranja mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke kefira: a) kefiri pripravljeni od kravljeg sirovog i trajnog mlijeka fermentirani 24 h; b) kefiri pripravljeni od kravljeg sirovog i trajnog mlijeka, fermentirani 48 h.

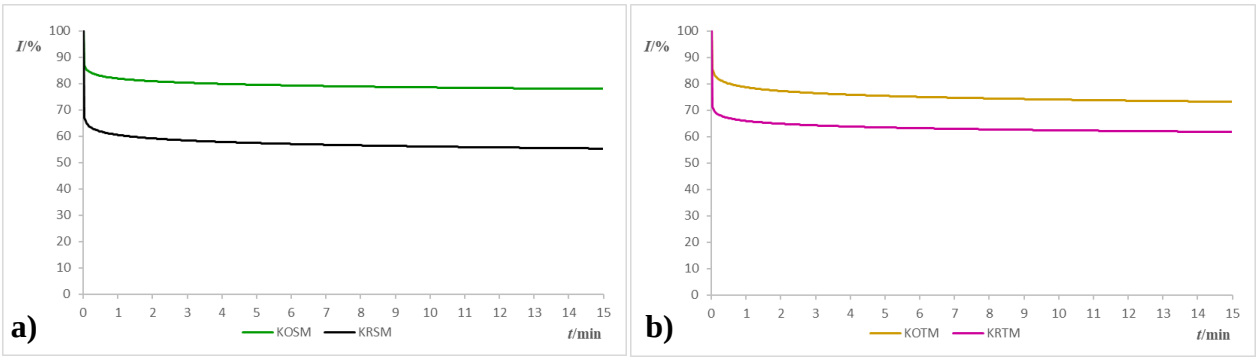


Slika 19. Utjecaj tretiranja mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke kefira: a) kefiri pripravljeni od kozjeg sirovog i trajnog mlijeka, fermentirani 24 h; b) kefiri pripravljeni od kozjeg sirovog i trajnog mlijeka, fermentirani 48 h.

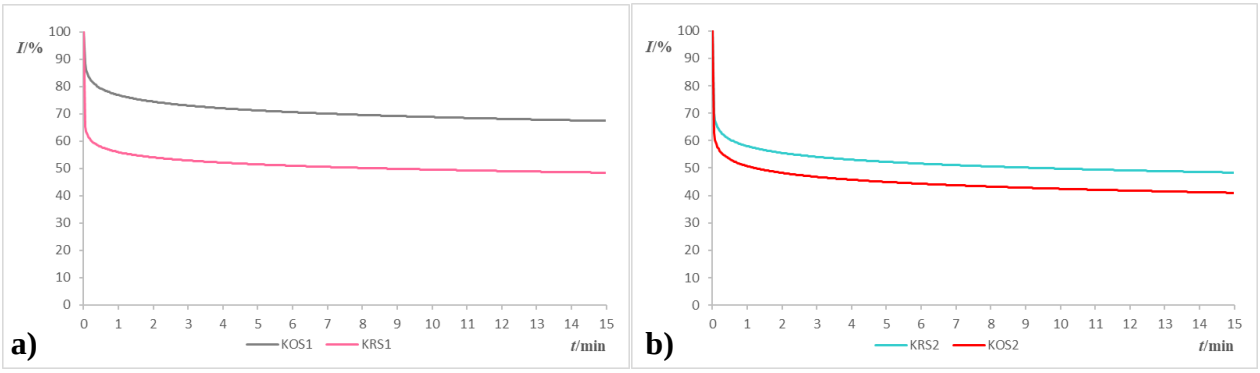
Nakon petnaest minuta snimanja, na slici 14 mogu se vidjeti razlike u suprimiranju DPPH radikala uzoraka tretiranog i netretiranog kravljeg i kozjeg mlijeka. Dodatkom uzorka KRSM pad signala je za 6,9 % veći nego uzorka KRTM, dok je primjenom KOTM u odnosu na KOSM pad intenziteta viši za 4,8 %. Slika 16 prikazuje utjecaj tretiranja mlijeka na razlike u padu ESR signala uzoraka kefira, fermentiranih 24 h i 48 h, nakon petnaeste minute. Pad intenziteta signala uzorka KRS1 je za 10,0 % veći nego kod uzorka KRT1, dok je primjenom KRT2 u odnosu na KRS2 pad signala viši za 19,8 % te kod KOT1 za 1,2 % veći s obzirom na KOS1, a pad intenziteta KOS2 za 15,3 % viši u odnosu na KOT2.

4. 5. Utjecaj vrste mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

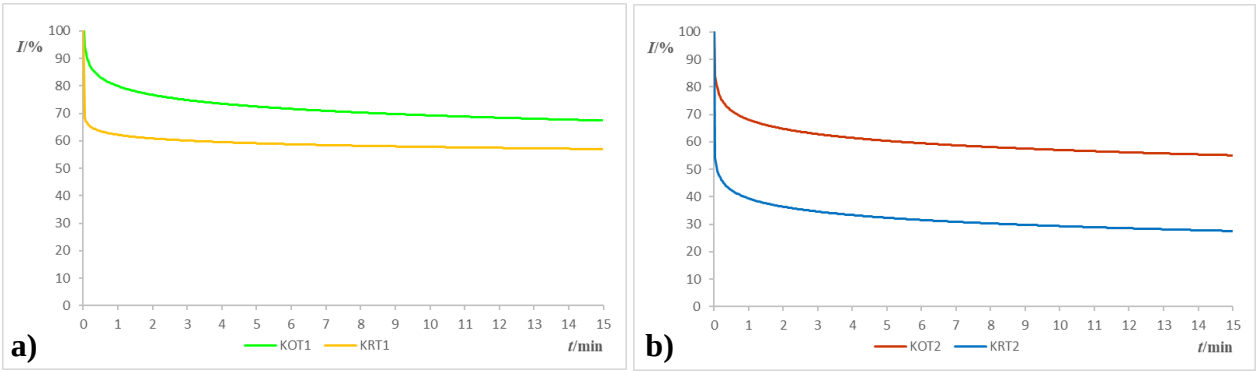
Slike 20, 21 i 22 grafički prikazuju utjecaj vrste mlijeka na razlike pada intenziteta ESR signala između ispitivanih uzoraka sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka te pripadajućih kefira fermentiranih 24 h i 48 h. Uzorak KRSM je inaktivirao veći broj DPPH radikala nego KOSM (slika 20a), KRTM s obzirom na KOTM (slika 20b), KRS1 nego KOS1 (slika 21a) te KOS2 u odnosu na KRS2 (slika 21b). Također, uzorak KRT1 pokazao je veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na KOT1 (slika 22a), a KRT2 s obzirom na KOT2 (slika 22b).



Slika 20. Utjecaj vrste mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka: a) kravlje i kozje sirovo mlijeko; b) kravlje i kozje trajno mlijeko.



Slika 21. Utjecaj vrste mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke kefira: a) kefiri pripravljeni od kravljeg i kozjeg sirovog mlijeka, fermentirani 24 h; b) kefiri pripravljeni od kravljeg i kozjeg sirovog mlijeka, fermentirani 48 h.



Slika 22. Utjecaj tretiranja mlijeka na ovisnost relativnog intenziteta *I* o vremenu *t* za pojedine uzorke kefira: a) kefiri pripravljeni od kravljeg i kozjeg trajnog mlijeka, fermentirani 24 h; b) kefiri pripravljeni od kravljeg i kozjeg trajnog mlijeka, fermentirani 24 h.

Nakon petnaest minuta, na slici 14 mogu se vidjeti razlike u neutraliziranju DPPH radikala uzoraka kravljeg i kozjeg mlijeka. Pad signala kod KRSM je za 23,1 % veći nego kod KOSM, a kod KRTM za 11,4 % s obzirom na KOTM. Slika 16 prikazuje utjecaj vrste mlijeka na razlike u padu ESR signala uzoraka kefira, fermentiranih 24 h i 48 h, nakon petnaeste minute. Dodatkom uzorka KRS1 pad signala je za 19,6 % veći nego uzorka KOS1, dok je primjenom KOS2 u odnosu na KRS2 pad intenziteta viši za 8,0 % te kod KRT1 za 8,4 % veći s obzirom na KOT1, a pad signala uzorka KOT2 za 27,1 % manji nego uzorka KRT2.

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem nastojalo se ispitati, utvrditi i usporediti antioksidacijsku aktivnost mliječnog proizvoda – kefira dobivenog pomoću kefirnih zrnaca, pripravljenog od sirovog i trajnog kravljeg i kozjeg mlijeka. Ispitane su razlike između vrsta mlijeka, utjecaj fermentacije i njezinog vremena te učinak vrste i tretiranja mlijeka na antioksidacijsko djelovanje novonastalih fermentiranih, funkcionalnih proizvoda s visokom biološkom vrijednosti. Istraživanje je provedeno korištenjem metode redukcije DPPH radikala i spektroskopskog mjerenja elektronske spinske rezonancije. Također, poštovan je tradicionalan način pripreme kefira te je potpuno jednako ponovljeno priređivanje otopine za svaki uzorak prije ESR mjerenja. Upotrijebljena je optimalna koncentracija uzoraka (mlijeka/kefira) od 10 % kako bi se osigurali isti uvjeti mjerenja i relevantna međusobna usporedba.

Svi ispitivani uzorci kefira pokazali su antioksidacijsku aktivnost, odnosno sposobnost neutraliziranja, a time i inhibiranja DPPH radikala.

5. 1. Usporedba antioksidacijske aktivnosti različitih vrsta mlijeka

Prema rezultatima, počevši od najjačeg, poredak uzoraka mlijeka i njihov pad ESR signala, u odnosu na antioksidacijsku aktivnost glasi: KRSM, KRTM, KOTM, KOSM. Navedeno se može pripisati drugačijoj vrsti i sastavu mlijeka, a time i različitoj koncentraciji sadržanih antioksidansa.

Na antioksidacijska svojstva mlijeka općenito utječe glavni protein mlijeka, kazein te njegove frakcije sa značajnim dodatkom fosfata. Isto tako, učinak izazivaju proteini sirutke koji

svojim djelovanjem mogu povećati razinu glutation peroksidaze. Sadržaj polifenolnih komponenti, ekvola i daidzeina, dokazano ima antioksidacijsko djelovanje. β-karoten, preventivni antioksidans, može jednom molekulom inhibirati tisuću puta više reaktivnih oblika i spriječiti fotooksidaciju vitamina B2. Na antioksidacijski učinak također mogu utjecati vitamini A, C i E, laktoferin, glutation, koenzim Q10, aminokiseline poput metionina i cisteina, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, oligosaharidi, konjugirana linolna kiselina, cink [12,15,16,51] te selen – jedan od četiri ključna antioksidansa prema američkoj Agenciji za hranu i lijekove [60].

Membrana globule mliječne masti smatra se najčešćim mjestom autooksidacije, a u njoj se nalazi α-tokoferol – moguća preventiva u nastanku slobodnih radikala [12,51].

Kravlje mlijeko je pokazalo jaču antioksidacijsku aktivnost nego kozje, a to se može pripisati višem sadržaju proteina, α_{s1}-kazeina, glutamina, vitamina E i β-karotena. Nadalje, kozje mlijeko je nepostojanije i sklonije lipolizi te oksidaciji pa se može zaključiti da kravlje sadrži i više α-tokoferola [2,16,18].

5. 2. Utjecaj fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

Svi fermentirani mliječni proizvodi imaju jača antioksidacijska svojstva s obzirom na istovjetno mlijeko, što se vrlo jasno vidi na slici 14.

Već je dokazano da fermentirano mlijeko ima antioksidacijska svojstva [8,9]. Fermentacija općenito pospješuje nastanak probiotika i enzima koji, u konačnici, utječu na antioksidacijski kapacitet [20], ali se mora napomenuti koliko zapravo kefirna zrnca pridonose još većoj koncentraciji biološki aktivnih komponenti [7,9,14,20,21].

Antioksidacijska aktivnost kefira se može pripisati laktoferinu, albuminima krvnog seruma te ostacima fosfoserina, koji imaju sposobnost keliranja raznih vrsta metala. Isto tako, karboksilna skupina aminokiselina asparagina i glutamina može vezati katione željeza. Također, dokazano je da *Lactobacillus rhamnosus* kelira ione željeza i eliminira superoksidne anione *in vitro* [9]. Opisano je kako *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium longum* imaju sposobnost keliranja intracelularnih kelatora, kao što je primjerice penicilamin [54]. Drugo istraživanje potvrdilo je visoku antioksidacijsku sposobnost sojeva bakterija u inhibiranju DPPH radikala, a to su sojevi *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus acidophilus* [55]. Nadalje, u *in vitro* i *in vivo* studiji zabilježeno je kako *Bifidobacterium* spp. ima potencijalni antioksidacijski učinak [56]. Antioksidacijski učinak kefira može se pripisati i laktoperoksidazi, α-laktoalbuminu, β-laktoglobulinu, kazeinu, glikoproteinima koji u svom sastavu imaju proteinsku komponentu i oligosaharidne lance, peptidima iz kazeina, konjugiranoj linolnoj kiselini, vitaminima A, C, i E, karotenoidima (β-karoten), koenzimu Q10, bakterijama mliječne kiseline, kao i proteinima sirutke koji su bogati hidrofobnim aminokiselinama te aminokiselinama koje u svom sastavu imaju sumpor, a superoksid dismutazi, glutation peroksidazi i katalazi u manjoj mjeri u odnosu na nefermentirano mlijeko [9,10,57]. Također, svoj doprinos ima i sinergistički učinak fenolnih i drugih prisutnih, biološki aktivnih komponenti [53]. Za sada i dalje ostaje nejasno na koji način funkcionira specifični mehanizam koji kefiru daje prednost u inhibiciji peroksidacije lipida s obzirom na mlijeko, ali se može pripisati doprinosu bioaktivnih komponenti mikroorganizama kefira i kefirnih zrnaca, kao i peptidima dobivenim tijekom fermentacije mlijeka [9].

5. 3. Utjecaj vremena fermentacije na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

Svi kefiri kod kojih je fermentacija duže trajala (48 h) pokazali su veći pad ESR signala i inhibirali veći broj DPPH radikala, u odnosu na istovjetne fermentirane tijekom 24 h, što je vidljivo na slici 16. Istraživanja su i pokazala da vrijeme fermentacije utječe na antioksidacijski učinak [30,31].

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da se koncentracija bioaktivnih komponenti, koje imaju antioksidacijsko djelovanje, povećava produljenjem vremena fermentacije. Da bi se potvrdila ova pretpostavka, bilo bi potrebno napraviti dodatna mjerenja koja uključuju praćenje koncentracije svake pojedine komponente u ovisnosti o vremenu fermentacije. Ovakvo istraživanje je vremenski vrlo zahtjevno i izlazi izvan okvira eksperimentalnih mjerenja predviđenih u ovom radu.

5. 4. Utjecaj tretiranja mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

Uzorak KRSM je inaktivirao veći broj DPPH radikala nego KRTM, KOTM s obzirom na KOSM, KRS1 nego KRT1 te KRT2 u odnosu na KRS2. Također, uzorak KOT1 pokazao je veći antioksidacijski kapacitet u smanjenju početnog intenziteta signala u odnosu na KOS1, a KOS2 s obzirom na KOT2. Navedeno se naravno može pripisati drugačijoj vrsti i sastavu mlijeka, a time i različitoj količini sadržanih antioksidansa.

Treba napomenuti da su globule kozjeg mlijeka nepostojanije te sklonije lipolizi i oksidaciji te da se veličina globula mliječne masti povećava u toplinski obrađenom mlijeku, ali se ukupan

broj smanjuje [2,16,18]. Utvrđeno je da katalaza na visokoj temperaturi gubi svoja bioaktivna svojstva, dok aktivnost vitamina A i glutation peroksidaze, koje inače ima više u kozjem mlijeku, ostaje relativno stabilna [9,11,16].

Što se tiče kravljeg mlijeka, sirovo ima veću antioksidacijsku aktivnost nego trajno, a kod kozjeg je obrnuto. Moguće je da su pojedine komponente kozjeg mlijeka, odgovorne za antioksidacijsko djelovanje više otporne na visoku temperaturu sterilizacije i tretman homogenizacije u odnosu na kravlje. Također, isto se može primijetiti kod kefira fermentiranog 24 h, pripravljenog od kravljeg sirovog mlijeka u odnosu na trajni. Kefir fermentiran 48 h, pripravljen od kravljeg sirovog mlijeka ima manju aktivnost nego isti od trajnog mlijeka. Postoji mogućnost da se kod tretiranog mlijeka odvija sporija fermentacija, a time u manje vremena nastane i manje komponenti koje su odgovorne za antioksidacijski učinak. Budući da kozje mlijeko ima više enzima glutation peroksidaze, a on ostaje relativno stabilan pri visokim temperaturama [9,11,16], ne čudi činjenica da kozje trajno mlijeko ima jače antioksidacijsko djelovanje u odnosu na sirovo, a isto se može vidjeti i kod kefira fermentiranog 24 h, pripravljenog od kozjeg trajnog mlijeka s obzirom na sirovi. U toplinski obrađenom mlijeku smanjuje se broj globula mliječne masti i to objašnjava činjenicu da je kefir fermentiran 48 h, pripravljen od kozjeg trajnog mlijeka slabiji u odnosu na sirovi zato što je dokazano da su globule kozjeg mlijeka nepostojanije i sklonije lipolizi te oksidaciji [2,16,18] pa mu je vjerojatno potrebno više vremena da izgubi svoju bioaktivnost.

5. 5. Utjecaj vrste mlijeka na antioksidacijsku aktivnost mlijeka i kefira

Uzorak KRSM je inaktivirao veći broj DPPH radikala nego KOSM, KRTM s obzirom na KOTM, KRS1 nego KOS1 te KOS2 u odnosu na KRS2. Također, uzorak KRT1 pokazao je veći antioksidacijski kapacitet u smanjenju početnog intenziteta signala u odnosu na KOT1, a KRT2 s obzirom na KOT2.

U svim uzorcima kefira i mlijeka, kravlje mlijeko pokazuje veći antioksidacijski kapacitet, osim kefira fermentiranog 48 h, a pripravljenog od kozjeg sirovog mlijeka. Taj uzorak ima najveći učinak u inhibiranju DPPH radikala poslije KRT2. Najvjerojatnije su za taj učinak odgovorni prethodno opisani parametri, a ne utjecaj vrste mlijeka.

Kravlje mlijeko ima više proteina i α_{s1}-kazeina u odnosu na kozje, a manje α-laktoalbumina i β-laktoglobulina. Utvrđeno je da je udjel asparagina i cisteina veći u kozjem, a glutamina u kravljem mlijeku. Količina taurina je značajno veća u kozjem mlijeku. Prosječna količina mineralnih tvari kozjeg mlijeka je neznatno veća u usporedbi s kravljim, osim selena kojeg ima znatno više. Kravlje mlijeko posjeduje nižu koncentraciju vitamina A, ali više vitamina E i β-karotena [2,16,61] što objašnjava činjenicu zbog čega kravlje mlijeko posjeduje bolju antioksidacijsku aktivnost.

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju razrađena tema te obrada prikupljenih rezultata pokazuju i potvrđuju kako je kefir, fermentirani mliječni proizvod dobiven pomoću kefirnih zrnaca, dobar izvor antioksidansa koji suzbijaju nastanak bolesti i starenje. Svi ispitivani uzorci pokazuju veću ili manju antioksidacijsku aktivnost, a među različitim vrstama mlijeka postoje razlike u rasponu rezultata.

Kefir pripravljen od kravljeg trajnog mlijeka, fermentiran 48 h pokazao je najjaču antioksidacijsku aktivnost, budući da njegov uzorak pokazuje najveći gubitak intenziteta ESR signala. Najslabija antioksidacijska svojstva među kefirima ima uzorak kefira fermentiran 24 h, pripravljen od kozjeg sirovog mlijeka, s obzirom da je inaktivirao najmanji broj DPPH radikala.

Može se zaključiti kako fermentacija i njezino vrijeme utječu na antioksidacijski učinak, budući da kefir ima mnogo veću inhibitornu sposobnost uklanjanja DPPH radikala u odnosu na istovjetno mlijeko, tj. bolji je izvor antioksidansa.

Isto tako, može se konstatirati da se razlika u antioksidacijskom djelovanju vrste i tretiranja mlijeka može pripisati drugačijem sastavu mlijeka, a time i različitoj koncentraciji sadržanih antioksidansa.

Metode DPPH i ESR pokazale su se dobrim, preciznim i uspješnim metodama za mjerenje antioksidacijske aktivnosti mlijeka i kefira.

Vrlo je važno naglasiti kako *in vitro* i *in vivo* istraživanja pokazuju različite rezultate antioksidacijske aktivnosti mlijeka i kefira, a sve u korelaciji s objavljenim znanstvenim podacima.

7. LITERATURA

1. Havranek, JL, Rupić, V. *Mlijeko – dobivanje, čuvanje i kontrola*. Zagreb: Biblioteka Poljoprivredni savjetnik, 1996.

2. Feldhofer, S., Banožić, S., Antunac, N. *Uzgoj i hranidba koza – proizvodnja i preradba kozjeg mlijeka*. Zagreb: Hrvatsko mljekarsko društvo, 1994.

3. Šupe, A. *Istine i laži o hrani.* Opatija: Primula, 2012.

4. „Mikrobiom – čovjekov najmoćniji saveznik.“ *Divine energy park*. Dostupno na https://dep.life/?p=19752. Pristupljeno 3. 9. 2019.

5. Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Nikam, V. et al. „The magic of kefir: a review.“ *Pharmacologyonline*. 2011;1:376-386.

6. „Kefir: omogućuje li dugovječnost, liječi li bolesti?.“ *Dokazi u medicini*. Dostupno na https://dokaziumedicini.hr/kefir-dugovjecnost-lijecenje-bolesti/. Pristupljeno 4. 9. 2019.

7. Guzel-Seydim, Z., Seydim, AC, Greene, AK. „Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir.“ *Journal of Dairy Science*. 2000;83(2):275-7.

8. Kesenkaşa, H., Dinkçia, N., Seçkinb, K., Kinika, Ö., Gönç, S. „Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures.“ *Tarim Bilimleri Dergisi*. 2011;17(3):253-259.

9. Liu, JR, Lin, YY, Chen, MJ, Chen, LJ, Lin, CW. „Antioxidative Activities of Kefir.“ *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 2005;18(4).

10. Nishino, T., Shibahara-Sone, H., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F. „Transit of Radical Scavenging Activity of Milk Products Prepared by Maillard Reaction and *Lactobacillus casei* Strain Shirota Fermentation through the Hamster Intestine.“ *Journal of Dairy Science*. 2000;83(5):915-22.

11. Biadała, A., Konieczny, P. „Goat’s milk-derived bioactive components - A review.“ *Mljekarstvo/Dairy*. 2018;68(4):239-253.

12. Taj Khan, I., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., Hayat Jaspal, M. „Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge.“ *Lipids in Health and Disease*. 2019;18(1).

13. Dorić, I., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., Božanić, R. „Utjecaj mlijeka na zdravlje čovjeka – pregledni rad.“ *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2019;14(1-2):24-32.

14. Šimundić, B., Jakovlić, V., Tadejević, V. *Poznavanje robe – živežne namirnice s osnovama tehnologije i prehrane*. Rijeka: Tiskara Rijeka d.d., 1994.

15. Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda – priručnik*. Zagreb: Plejada d.o.o., 2010.

16. Božanić, R., Tratnik, Lj., Drgalić, I. „Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti – revijalni prikaz.“ *Mljekarstvo*. 2002;52(3):207-237.

17. Bosnić, P. „Svjetska proizvodnja i kvaliteta kravljeg mlijeka – stručni rad.“ *Mljekarstvo*. 2003;53(1):37-50.

18. Garvanović, T. *Proizvodnja i sastav ovčjeg i kozjeg mlijeka u usporedbi s kravljim – diplomski rad*. Zagreb: Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

19. Dobrijević, Z. *Spektrofluorimetrijska analiza kiselo topljivih proteina kravljeg i kozjeg mlijeka – diplomski rad*. Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015.

20. Kefeček, M. *Fermentirano*. Zagreb: Planetopija, 2016.

21. Herceg, Z. *Procesi u prehrambenoj industriji – Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1*. Zagreb: Plejada d.o.o., 2011.

22. Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D. „Mikrobni sastav kefirnih zrna – pregledni rad.“ *Mljekarstvo*. 2013;63(1):3-14.

23. Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Guldager, H., Tamime AY. „Production of Kefir, Koumiss and other Related Products.“ 2006.

24. Sarkar, S. „Biotechnological innovations in kefir production: a review.“ *British Food Journal*. 2008;110(3):283-295.

25. Arslan, S. „A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir.“ *CyTA – Journal of Food*. 2014;13(3):340-345.

26. Kožić, K. *Fermentacija rižinog, bademovog, kravljeg i lješnjakovog mlijeka nacijepljenih kefirnim zrncima – završni rad*. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.

27. Lu, M., Wang, X., Sun, G., Qin, B., Xiao, J., Yan, S. et al. „Fine Structure of Tibetan Kefir Grains and Their Yeast Distribution, Diversity, and Shift.“ *PLoS ONE*. 2014;9(6):e101387.

28. Bottazzi, V., Bianchi, F. „A Note on Scanning Electron Microscopy of Micro-organisms associated with the Kefir Granule.“ *Journal of Applied Microbiology*. 2008;48(2):265-268.

29. Lin, TY, Chang Chien, MF. „Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time.“ *Food Chemistry*. 2007;100(4):1419-1423.

30. Farnworth, ER. „Kefir - A complex probiotic.“ *Food Science & Technology Bulletin Functional Foods*. 2005;2(1):1-17.

31. Otles, S., Çağındı, Ö. „Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects.“ *Pakistan Journal of Nutrition*. 2003;2(2).

32. Gao, J. Gu, F., Abdella, NH, Ruan, H., He, G. „Investigation on Culturable Microflora in Tibetan Kefir Grains from Different Areas of China.“ *Journal of Food Science*. 2012;77(8):M425-33.

33. Gao, J., Gu, F., He, J., Xiao, J., Chen, Q, Ruan, H. et al. „Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains.“ *European Food Research and Technology*. 2013;236(3).

34. Leite, AMO, Mayo, B., Rachid, CTCC, Peixoto, RS, Silva, JT, Paschoalinet, VMF al. „Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequence analysis.“ *Food Microbiology*. 2012;31(2):215-21.

35. Uraz, G., Akkuzu, S., Özcan, S., Sevimay, İ. „Isolation of yeast from microflora of kefir.“ J*ournal of Biotechnology*. 2012;161:39.

36. Zhou, J., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. „Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis.“ *Food Microbiology*. 2009;26(8):770-5.

37. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. „Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grain and kefir made from them.“ *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002;28(1):1-6.

38. Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D. „Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir.“ *Journal of Food Science*. 2010;75(9):M568-73.

39. Yüksekdağ, ZN, Beyath, Y., Aslim, B. „Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir.“ *Food/Nahrung*. 2004;48(3):218-20.

40. Withuhn, RC, Schoeman, T., Britz, TJ. „Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains.“ *International Journal of Dairy Technology*. 2004;57(1):33-37.

41. Delfederico, L., Hollmann, A., Martínez, M., Iglesias, NG, De Antoni, G., Semorile, L. „Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains.“ *J Dairy Res.* 2006;73(1):20-7.

42. Garbers, IM, Britz, TJ, Witthuhn, RC. „PCR-based denaturing gradient gel electrophoretictypification and identification of the microbial consortium present in kefir grains.“ *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2004;20:687–693.

43. Kök Taş, T., Ekinci, FJ, Guzel-Seydim, ZB. „Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR.“ *International Journal of Dairy Technology*. 2012;65(1).

44. Yüksekdağ, Z., Beyatli, Y., Aslim, B. „Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic.“ *LWT – Food Science and Technology.* 2004;37(6):663-667.

45. Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, MH, Goltapeh, EM. „Short Communication: Kefir production in Iran.“ *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 1997;13(5):579-581.

46. Magalhães, KT, Vinícius de Melo Pereira1, G., Campos, CR, Dragone, G., Rosane, RF. „Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition.“ *Brazilian Journal of Microbiology.* 2011;42(2):693-702.

47. Miao, J., Haoxian, G., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z. et al. „Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China.“ *Food Control.* 2014;42:48–53.

48. Withuhn, RC, Schoeman, T., Britz, TJ. „Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation.“ *International Dairy Journal*. 2005;15(4):383-389.

49. Garrote, GL, Abraham, AG, De Antoni, G. „Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios.“ *Journal of Dairy Research.* 1998;65(01):149-154.

50. Loretan, T., Mostert, JF, Viljoen, BC. „Microbial flora associated with South African household kefir.“ *South African Journal of Science.* 2003;99(1):92-94.

51. Lindmark-Månsson, H., Åkesson, B. „Antioxidative factors in milk.“ *British Journal Of Nutrition.* 2000;84(Suppl 1):S103-10.

52. Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. „Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein.“ *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2000;11(3):128-31.

53. Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Sahin, S. „Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefirs.“ *Journal of Dairy Science.* 2018;101(5).

54. Lin, MY, Yen, CL. „Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1999;47(4):1460-6.

55. Chen, H., Hui, Y., Chen L., Wan, H., Guowei, S., Li, H. „Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on antioxidant activity from fermented goat milk.“ *Carpathian Journal of Food Science and Technology.* 2015;7(2):109-114.

56. Huang, HC, Chiu, SH, Ke, HJ, Chiu, SW, Wu, SY, Chang, TM. „Antimelanogenic and antioxidant activities of *Bifidobacterium infantis*.“ *African Journal of Microbiology Research.* 2011;5(20):3150-3156.

57. Najgebauer-Lejko, D., Sady, M. „Estimation of the antioxidant activity of the commercially available fermented milks.“ *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2015;14(4)(2015):387-396.

58. Kedare, SB, Singh, RP. „Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.“ *Journal of Food Science and Technology – Mysore*. 2011;48(4):412-422.

59. Dikalov, S., Griendling, KK, Harrison, DG. „Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies.“ *Hypertension*. 2007;49(4):717–727.

60. Medić-Šarić, M., Buhač, I., Bradamante, V. *Vitamini i minerali: istine i predrasude*. Zagreb: 4000, 2000.

61. Antunac, N., Samaržija, D., Lukač Havranek, J. „Hranidbena i terapeutska vrijednost kozjeg mlijeka.“ *Mljekarstvo*. 2000;50(4)297-30.

OSOBNE INFORMACIJE

Valentina Ilijanić



Bujska 26, 51 000 Rijeka (Hrvatska)

+385958783544 ☎+38551631831

valentina.ilijanic@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 06. srpnja 1995. | Državljanstvo Hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

28. srpnja 18.-31. svibnja 19. — Blagajnik/blagajnica
Spar Hrvatska d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

1. srpnja 18.-14. srpnja 18. — Prodavač/prodavačica
Tommy d.o.o., Novalja (Hrvatska)

8. lipnja 18.-9. lipnja 18. — Promotor/promotorica
TW Connect d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

travanj 16.-svibanj 16. — Raznosač/raznosačica letaka
Štimung d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

srpanj 15.-svibanj 16. — Blagajnik/blagajnica
Kaufland Hrvatska k.d., Rijeka (Hrvatska)

srpanj 12.-kolovoz 12. — Prodavač/prodavačica sladoleda i pića
Euro Kvarner d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2. listopada 17.–25. rujna 19. — Diplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva — razina 7 EKO-a
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Diplomski rad pod naslovom "Antioksidacijska aktivnost mliječnog proizvoda dobivenog pomoću kefirnih zrnaca".

Mentor: prof. dr. sc. Srećko Valić.

6. listopada 14.-19. srpnja 17. — Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarnog inženjerstva — razina 6 EKO-a
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka (Hrvatska)

Završni rad pod naslovom "Antioksidacijska aktivnost ekstrakata odabranih vrsta ljekovitog bilja".

Mentor: prof. dr. sc. Srećko Valić.

6. rujna 10.-16. svibnja 14. — Srednja škola – Klasična gimnazija — razina 4 EKO-a
Salezijanska klasična gimnazija, s pravom javnosti, Rijeka (Hrvatska)

7. siječnja 02.-18. lipnja 10. Osnovna škola razina 1 EKO-a

Osnovna škola Kantrida, Rijeka (Hrvatska)

10. rujna 01.-21. prosinca 01. Osnovna škola

Osnovna škola Srdoči, Rijeka (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: Hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	B2	B2	B1	B1	B2
	Matura – viša razina Engleski jezik				

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine
- Komunikativna, ljubazna, nasmiješena i iskrena osoba

Organizacijske / rukoviteljske vještine
- Izrazito snalažljiva
- Spremna na rad u timu
- Spremna za preuzimanje vodstva
- Odgovorna osoba

Poslovne vještine
- Želja za učenjem i napretkom
- Trudim se kvalitetno izvršiti zadane zadatke
- Odgovorna i odlučna u donošenju odluka i izvršavanju postupaka
- Poštena osoba

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Iskusni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Vozačka dozvola: AM, B1, B

DODATNE INFORMACIJE

Konferencije	**2018.** 1. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2018 (aktivni sudionik, član Organizacijskog odbora i urednica Knjige sažetaka) **2018.** 2. studentski kongres Okolišnog zdravlja s međunarodnim sudjelovanjem (pasivni sudionik) **2019.** 2. Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas 2019 (aktivni sudionik, član Organizacijskog odbora i urednica Knjige sažetaka) **2019.** International Summer School FOOD SAFETY AND HEALTHY LIVING (FSHL) 2019 – Brașov, Rumunjska
Prezentacije	Usmeno predavanje s temom „Antioksidacijska aktivnost ekstrakata odabranih vrsta ljekovitog bilja“ na Studentskom kongresu zaštite zdravlja – Sanitas 2018
Prezentacije	Usmeno predavanje s temom „Antioksidacijsko djelovanje mliječnog proizvoda dobivenog pomoću kefirnih zrnaca“ na Studentskom kongresu zaštite zdravlja – Sanitas 2019
Priznanja i nagrade	**2017.-2018.** Stipendija Sveučilišta u Rijeci – stipendija za izvrsnost
Certifikati	Međunarodno ECCL natjecanje – European Certificate for Classics: ELEX Latin Level 1/*Vestibulum* (Europski certifikat iz poznavanja latinskog jezika i rimske kulture) – Srebrna medalja