

# Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti napitaka za sportaše

---

Mijić, Klaudia

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:638940>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam**

**Kludia Mijić**  
0058219702

**ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKE ISPRAVNOSTI NAPITAKA ZA SPORTAŠE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Mikrobiologija**

**Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov**

Zagreb, godina 2024.  
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti napitaka za sportaše

Klaudia Mijić, 0058219702

**Sažetak:**

U ovom eksperimentalnom radu provedena je mikrobiološka analiza 5 uzoraka napitaka za sportaše, odnosno proteina sirutke 1., 15. i 30. dan nakon otvaranja ambalaže. Proteini sirutke uživaju visoku reputaciju među sportašima, a u novije vrijeme sve češće i kod rekreativaca upravo zahvaljujući njihovom bogatom sastavu esencijalnih nutrijenata i utjecajem na zdravlje. Ipak, u slučaju kontaminacije, proteini sirutke hranjiva su podloga za rast bakterija poput vrsta *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, klostridija, enterobakterija, bakterija mliječne kiseline, aerobnih mezofilnih bakterija te kvasaca i plijesni. Za dokazivanje rasta navedenih mikroorganizama provedena je metoda praćenja rasta na selektivnim podlogama. Rezultati analize upućuju na prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, prisutnost laktobacila, stafilokoka te enterobakterija dok za ostale kulture rast nije dokazan. Rezultati također sugeriraju kako je mikrobiološka slika analiziranih napitaka za sportaše kontinuirana nakon otvaranja ambalaže kao i 15. i 30. dan. Na mikrobiološku čistoću znatno utječe predobrada mlijeka kao i njegova manipulacija tijekom proizvodnog procesa.

**Ključne riječi:** mikrobiološka ispravnost, sportski napitak, proteini sirutke, bakterije

**Rad sadrži:** 29 stranica, 7 slika, 6 tablica, 41 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Markov

**Datum obrane:** 10.7.2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Nutrition

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

### Microbiological safety evaluation for sports drinks

Klaudia Mijić, 0058219702

#### Abstract:

This experimental paper work was done for the purpose of conducting a microbiological evaluation of 5 different sports drinks, i. e. whey proteins including 1<sup>st</sup>, 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day after opening the package. Whey proteins are widely used among elite athletes because of their nutritional value and positive impact on health, but also among recreational athletes who do not compete. However, in the case of contamination, whey protein is a good substrate for the growth of various microorganisms including *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, enterobacteria, lactic acid bacteria, aerobic mesophilic bacteria, moulds and yeasts. The growth monitoring method was carried out on a selective substrate. The results of the analysis indicate the presence of aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, staphylococci and enterobacteria, while the presence of other cultures were not proven. The results also suggest that the microbiological picture of the analysed sports drinks were continuous even 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day after opening the package. Regarding the microbiological safety of whey protein, a key component is the proper handling of milk during the production process.

**Keywords:** microbiological safety, sport drink, whey protein, bacteria

**Thesis contains:** 29 pages, 7 figures, 6 tables, 41 references pages

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Ksenija Markov PhD /Full Professor

**Thesis defended:** 10.7.2024.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. SPORTSKI NAPITCI .....	2
2.2. PROTEINI SIRUTKE.....	3
2.2.1. SASTAV PROTEINA SIRUTKE .....	4
2.2.2. PROIZVODNJA I PRIMJENA PROTEINA SIRUTKE .....	5
2.2.3. NUTRITIVNI ASPEKT PROTEINA SIRUTKE.....	6
2.2.4. MIKROBIOLOŠKA SLIKA KONCENTRATA PROTEINA SIRUTKE .....	7
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>9</b>
3.1. MATERIJALI .....	9
3.1.1. UZORCI ZA MIKROBIOLOŠKU ANALIZU.....	9
3.1.2. PRIBOR I OPREMA.....	10
3.1.3. KEMIKALIJE I REAGENCI ZA MIKROBIOLOŠKU ANALIZU.....	10
3.1.4. MIKROBIOLOŠKE PODLOGE.....	11
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>17</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>27</b>

## 1. UVOD

Proteinski dodaci stekli su ogromnu popularnost posljednjih godina, a pojedinci koji brinu o zdravlju ih uključuju u svoju svakodnevnu rutinu. Ovi dodaci nude prikladan način za zadovoljenje potreba za proteinima, pomažući oporavak mišića, kontrolu tjelesne mase i opću dobrobit.

Proteini sirutke, nastali kao nusprodukt obrade mlijeka, do izražaja dolaze sredinom prošlog stoljeća zahvaljujući naglom razvitku agrikulture te industrijalizacije (King i Weedon, 2020). To jesu biološki aktivni proteini koji se tijekom proizvodnje sira i kazeina zadržavaju u topivoj frakciji mlijeka (Garrido i sur., 2016), a zbog svojih fizičkih, kemijskih te nutritivnih svojstva uvelike su potaknuli zanimaciju prehrambene industrije (Zain i sur., 2016). U današnje vrijeme proteini sirutke gotovo su nezaobilazan dodatak prehrani mnogim vrhunskim sportašima kao i rekreativcima (Vasconcelos i sur., 2021). Međutim, kao i svaki drugi konzumni proizvod, proteinski dodaci nisu izuzeti od potencijalne mikrobne kontaminacije koja može uključivati bakterije, kvasce i plijesni, pa čak i viruse, i dovesti do zdravstvenih rizika i smanjene učinkovitosti proizvoda (Nguyen, 2023). Smatra se da neke bakterije, kao što su *Staphylococcus* i *Bacillus* vrste, mogu tolerirati toplinske obrade poput termalizacije, pasterizacije i evaporacije, pritom zaostati na površini tijekom proizvodnje, tvoreći biofilm te na takav način dospjeti u konačan proizvod i onečistiti ga (Zain i sur., 2016). Stoga je, razumijevanje važnosti karakterizacije mikroba u proteinskim dodacima ključno za osiguranje njihove sigurnosti, kvalitete i učinkovitosti (Nguyen, 2023).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku ispravnost proteinskih napitaka na bazi sirutke obogaćene različitim okusima i procijeniti učinak skladištenja na mikrobnu kontaminaciju.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. *Sportski napitci*

Tijekom posljednjih desetljeća industrija bezalkoholnih pića prilagodila se trendovima potrošača prema zdravijem načinu života (Guerrero, 2023). Sportski napitci, koji se nazivaju i nadomjesci elektrolita ili ugljikohidratno-elektrolitni napitci, na tržištu se pojavljuju 1960., a 90-ih godina postaju najzastupljeniji pripravci čija je potražnja porasla zbog promjene potrošačkih trendova (Maughan, 2003). Najčešći su potrošači mlade i fizički aktivne osobe, sportaši- -natjecatelji, ali i sve više sportaša-rekreativaca (Legović i sur., 2007). Tijekom intenzivnog naprezanja dolazi do gubitka tekućine, koju je potrebno nadoknaditi, jer u protivnom dolazi do povećane osmolarnosti, usporenih metaboličkih reakcija što organizam doživljava kao stresno stanje pa je osnovni razlog uzimanja sportskih napitaka upravo nadoknada energije i elektrolita kroz hipotonične, izotonične i hipertonične napitke. Osim ove podjele sportske napitke dijelimo i s obzirom na cilj nadoknade na izotonične, elektrolitske, energetske, proteinske, rehidracijske i hranjive (Legović i sur., 2007).

Proteinski napitci kamen su temeljac u fitnessu i prehrani, koriste ih sportaši i aktivni pojedinci kako bi poboljšali unos hranjivih tvari, razvoj mišića i izvedbu. Međutim, dok proteinski napitci mogu biti korisni sportašima koji žele izgraditi mišiće i održati težinu, postoje i nedostaci. Prevelika ovisnost o proteinskim napitcima može dovesti do nedostatka esencijalnih nutrijenata kao što su vitamini, minerali i vlakna koja se nalaze u cjelovitim namirnicama i tako utjecati na crijevni mikrobiom, utječući na zdravlje (Kårlund i sur., 2019).

Među proteinskim napitcima proteini sirutke danas su sve više prepoznatljivi kao funkcionalna hrana zahvaljujući upravo svojim bioaktivnim komponentama, a hrana je funkcionalna ako sadrži komponente i/ili nutrijente koje pogoduju određenim funkcijama u tijelu tako da održavaju homeostazu pridonoseći zdravlju ili pak reduciraju rizik od pojave bolesti (Roberfroid, 2000).

## **2.2. Proteini sirutke**

Sirutka, prvi put opisana prije 3000 godina kada je i prirodnim putem sasvim neočekivano nastao sir, dugo se vrijeme smatrala neželjenim nusproduktom u mliječnoj industriji. Međutim, 80-ih godina prošlog stoljeća uz razvitak naprednije tehnologije na tržištu se pojavljuju proteini sirutke (Smithers G., 2008) koji ovisno o metodi koagulacije kazeina mogu biti dobiveni od slatke ili kisele sirutke. Danas zahvaljujući biološkim svojstvima proteina sirutke kao značajnog nutraceutika uživaju visoku reputaciju kako u svijetu sportaša tako i sve učestalije u svijetu rekreativaca što potvrđuje podatak da svjetska proizvodnja sirutke iznosi preko 160 milijuna tona godišnje sa stopom rasta od 1 do 2 % na godinu (Božanić i sur., 2014). Visoke su biološke vrijednosti te sačinjavaju kompletan protein sadržavajući sve esencijalne aminokiseline koje pridonose održavanju i funkciji nemasnoj masi tijela. Proteini sirutke još utječu i na različite bolesti povezane sa starenjem poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa te sarkopenije (propadanje mišićnog tkiva), a uočena je uloga i u održavanju povoljne tjelesne mase te pridonose imunitetu (Khan i Selamoglu, 2019). Uz esencijalne aminokiseline, proteini sirutke još su izvor natrija, kalija, kalcija te magnezija.



### 2.2.1. Sastav proteina sirutke

U mlijeku pronalazimo dvije glavne vrste proteina: kazein i proteine sirutke. Razlikujemo kiselu sirutku koja nastaje kao nusprodukt u proizvodnji kazeina ili svježeg sira podešavajući pH mlijeka do 4,6 uz dodatak kulture bakterija mliječne kiseline, glukono-delta-laktone ili obične kiseline, te uz kiselu razlikujemo i slatku sirutku koja se dobiva dodatkom starter kulture bakterija mliječne kiseline u mlijeko čiji je pH između 6,2 i 6,4. U sastavu sirutke najviše je prisutna voda, zatim laktoza, minerali te proteini sirutke (tablica 1) (Božanić i sur., 2014).

**Tablica 1. Sastav proteina sirutke (Božanić, 2014)**

	<b>PROTEINI OD SLATKE SIRUTKE</b>	<b>PROTEINI OD KISELE SIRUTKE</b>
<b>UKUPNA KRUTA TVAR</b>	96,0	96,0
<b>VODA</b>	3,6	4,0
<b>MASTI</b>	0,8	0,6
<b>PROTEINI</b>	13,1	12,5
<b>LAKTOZE</b>	75,0	67,4
<b>PEPEO</b>	7,3	11,8
<b>MLIJEČNA KISELINA</b>	0,2	4,2

Proteini sirutke definiraju se kao proteini koji zaostaju u serumu mlijeka nakon koagulacije kazeina pri pH 4,6 i temperaturi od 20 °C. Kažemo da proteini prisutni u sirutki poput  $\beta$ -laktoglobulina,  $\alpha$ -laktalbumina, seruma albumina, laktoferina te imunoglobulina su visoke biološke vrijednosti s indeksom od 110, većim čak i od vrijednosti kazeina, proteina soje, proteina goveda te proteina pšeničnog glutena. Biološka vrijednost označava koliko tijelo efikasno može iskoristiti određeni nutrijent (Smithers, 2008). Od minerala najprisutniji su elektroliti natrij i kalij, s nešto manjim udjelom kalcija, magnezija te fosfora što sirutki čini i više nego povoljnom za utažiti žeđ. Vitamini topivi u vodi zaostaju u sirutki u različitim koncentracijama pa se tako može naći 40-70 % vitamina B12, 55-75 % vitamina B6 i pantotenske kiseline, 70-80 % riboflavina i biotina te čak 90 % tiamina, nikotinske kiseline, folne kiseline te askorbinske kiseline (Macwan i sur., 2016).

### 2.2.2. *Proizvodnja i primjena proteina sirutke*

Kako bi se proizveo prah sirutke, potrebno je provesti kristalizaciju laktoze prije samog sušenja radi smanjenja higroskopnosti, nakon čega slijedi evaporacija i sušenje raspršivanjem. Po dobivanju praha za proizvodnju koncentrata, izolata ili druge frakcije proteina sirutke potrebno je izvršiti separaciju proteina od ostalih komponenata sirutke i to uz pomoć od nekih navedenih metoda kao što su: termokoagulacija, membranski procesi (reverzna osmoza, ultrafiltracija, mikrofiltracija, nanofiltracija te elektrodijaliza), kromatografska frakcionacija te ostale metode. Najčešća metoda za proizvodnju koncentrata proteina sirutke jest ultrafiltracija koja se može kombinirati s mikrofiltracijom ili nanofiltracijom (Tsakali i sur., 2010). Proteini sirutke na tržištu nalaze se u različitim oblicima. Između ostalog to su koncentrat proteina sirutke (sadrže od 35 do 80 % proteina), izolat proteina sirutke (sadrže od 85 do 90 % proteina), hidrolizat proteina sirutke u čijem se sastavu nalazi 100 % proteina te ostale inačice prikazane u tablici 2.

**Tablica 2.** *Proizvodi od sirutke i njihov prosječan sastav (Hebishy i sur., 2023)*

<b>Vrsta proizvoda od sirutke</b>	<b>Proteini (%)</b>	<b>Masti (%)</b>	<b>Laktoza (%)</b>	<b>Minerali (%)</b>
<i>Sirutka u prahu</i>	11-14,5	1-1,5	63-75	8,5
<i>Demineralizirana sirutka u prahu (70 %,90 %)</i>	13,7/15,0	-	75,7/83,0	3,5/1,0
<i>Koncentrat proteina sirutke</i>	25-89	1-9	4,0-52,0	3,0-5,0
<i>Izolat proteina sirutke</i>	88,0-95,0	0,5-1	<1	2,0-3,5
<i>Hidrolizirani koncentrat proteina sirutke</i>	>80	<10	<8	-
<i>Hidrolizirani izolat proteina sirutke</i>	>90	0,5	0,5-1	-

Primjena koncentrata proteina sirutke u prehrambenoj industriji zastupljena je u velikoj mjeri upravo zahvaljujući sastavu i funkcionalnim svojstvima iste. Pa tako nutritivnim prednostima u primjeni pridonosi visokoproteinski i visokoaminokiselinski profil, niski udio kilokalorija, masti kao i soli, te izostanak patogena, toksičnih komponenti i antinutritivnih sastojaka (Onwulata i Huth, 2009). Iako su različiti koncentracije proteina sirutke proizvedeni od različitih izvora sirutke uključujući i različite uvjete proizvodnje, njihova fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva jesu razlog njihove višenamjenske uporabe kao i prepoznate vrijednosti. Neka od ovih svojstva jesu topivost, sposobnost stvaranja gela, emulzije ili pjene te mogućnost transformacije zahvaljujući neutralnoj boji i okusu (Morr i Ha, 2009). Prah sirutke može se koristiti u proizvodnji kruha, mliječnih proizvoda, dok se demineralizirani prah sirutke koristi još i u proizvodnji formule za novorođenčad. Najčešći i najiskoristiviji oblik sirutke zasigurno je koncentrat proteina sirutke koji se osim u napitcima za sportaše koristi još za proizvodnju proteinskih pločica, u konditorskoj te mliječnoj industriji. Izolat proteina sirutke kao i hidrolizirani oblici koncentrata i izolata koriste se uvelike u sportskoj prehrani. Sirutka još može poslužiti i kao stočna hrana (Hebishy i sur., 2023).

### **2.2.3. Nutritivni aspekt proteina sirutke**

Proteini sirutke se u mlijeku, kao ishodnoj sirovini u proizvodnji iste, nalaze u postotku između 15 i 20 %. Glavne komponente prisutne u navedenom postotku jesu  $\beta$ -laktoglobulini,  $\alpha$ -laktalbumini, zatim slijede imunoglobulini, albumini seruma te laktoferin.  $\beta$ -laktoglobulini sačinjavaju polovicu od ukupnih proteina sirutke. Smatra se da osim što pomažu u vezanju minerala poput kalcija, još obavljaju važnu ulogu i u promociji sinteze glutathiona – glavnog unutarstaničnog antioksidansa zahvaljujući njegovom bogatom izvoru cisteina.  $\alpha$ -laktalbumini, druga najzastupljenija proteinska frakcija u sirutki, bogata je triptofanom za koji se smatra da pridonosi razini serotonina u mozgu. Albumini seruma imaju ulogu u pasivnoj imunosti, dok laktoferin zbog toga što ima mogućnost vezanja željeza pokazuje antioksidativne učinke. Peptid laktofericin kojeg oslobađa laktoferin uslijed proteolize u ljudskom organizmu djeluje još antimikrobno i imunomodulatorno. Bioaktivni peptidi iz proteina sirutke pokazali su mogući pozitivan učinak na smanjenje povišenog krvnog tlaka, time posljedično i na kardiovaskularne bolesti. Pokazalo se da nakon hidrolize  $\beta$ -laktoglobulina u želudcu uz pepsin, tripsin i kimotripsin nastaje  $\beta$ -laktorfin, a na sličan način nastaje i  $\alpha$ -laktorfin hidrolizom  $\alpha$ -laktalbumina. Upravo ti biogeni peptidi pokazuju inhibitorni učinak na angiotenzin-konvertirajući enzim sprječavajući suženje arterija i povišenje krvnog tlaka (Yigit i sur. 2023). Proteini sirutke bogati su esencijalnim aminokiselinama uključujući i onim razgranatim kao što su to leucin, izoleucin

i valin za koje se smatra da imaju važnu ulogu kao modulatori metabolizma u održavanju proteinske i glukozne homeostaze uključujući i metabolizam lipida što može biti ključno u održavanju tjelesne mase i kontroli dijabetesa tipa 2 (Smithers, 2008).

#### **2.2.4. Mikrobiološka slika koncentrata proteina sirutke**

Proteinski dodaci, uključujući proteinske prahove i shakeove, formulirani su s pomoću različitih sastojaka poput sirutke, kazeina, soje i biljnih izvora. Ovi sastojci, često dobiveni iz prirodnih supstrata, mogu sadržavati različite mikroorganizme poput bakterija, kvasaca, plijesni i virusa. Mikrobna kontaminacija u ovim dodacima može dovesti do zdravstvenih rizika i smanjene učinkovitosti proizvoda (Nguyen, 2023).

Sirutka se smatra prirodnim supstratom za bakterije kvarenja, patogene bakterije i bakterije mliječne kiseline (BMK). Za razliku od tekuće sirutke, sirutka u prahu ima vrlo nisku  $a_w$  (aktivitet vode) vrijednost, što je čini neprikladnom okolinom za rast i razmnožavanje mikroorganizama, međutim, kada sastojci praha apsorbiraju vlagu tijekom rehidracije,  $a_w$  se povećava i nastaju optimalni uvjeti za klijanje spora bakterije *Clostridium botulinum* i za proizvodnju toksina (Bouymajane i sur., 2018; Hebishy i sur., 2023).

Na sastav i kvalitetu sirutke u prahu utječu brojne varijable, kao što su mlijeko koje se koristi za proizvodnju sira, tehnologija koja se koristi za njegovu preradu, vrsta korištene koagulacije (sirilo ili kiselina), temperatura i trajanje koagulacije. Pravilno obrađena sirutka ima nizak rizik od kontaminacije patogenima, jer proces pasterizacije mlijeka ubija patogene kao što su *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* i *Shigella*, ali uvijek postoji rizik od kontaminacije mlijeka sporama zbog česte pojave bakterija iz rodova *Clostridium* i *Bacillus* (Aljaloud i sur., 2016; Bouymajane i sur., 2018).

Suplementacija prehrani s proteinima sirutke može rezultirati nekim od pozitivnih učinaka na zdravlje kao što su bolesti povezane sa starenjem poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa te sarkopenije (propadanje mišićnog tkiva), uočena je uloga i u održavanju povoljne tjelesne mase te jačanju imunitetu (Khan i Selamoglu, 2019). Istovremeno u sastavu proteina sirutke mogu zaostati termorezistentni mikroorganizmi koji predstavljaju izvor mikrobiološke kontaminacije te time narušavaju optimizaciju proizvodnog procesa kao i sigurnu konzumaciju za ljude (Atamer i sur., 2013). Praškasti proizvodi od mlijeka, uključujući i koncentrat proteina sirutke, drže visoku ekonomsku vrijednost budući da ne zahtijevaju stroge uvjete skladištenja radi njihovog niskog aktiviteta vode ( $a_w < 0,26$ ) koji otežava rast mikroorganizama. Kvalitativna i sigurnosna indikacija za praškaste proizvode mlijeka jesu, kako smo već spomenuli bakterijske endospore. Najzastupljeniji gram-pozitivni aerobni bacili u koncentratu proteina

sirutke jesu *Geobacillus stearothermophilus* i *Anoxybacillus flavithermus* koji su termofili, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* i *Bacillus pumilus* čija je optimalna temperatura rasta između 10 i 30 °C što ga čini mezofilnim te psihrotolerantne vrste poput *Paenibacillus* spp. (Hebishy i sur., 2023).

Što se tiče klostridija, u mliječnom prahu moguća je prisutnost *Clostridium halophilum*, *C. septicum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* te ostalih vrsta. Smatra se da prilikom zrenja sireva klostridiji stvaraju plin što znači da spore mogu završiti u nusproizvodima sirutke. Iako je rijetka pojava botulizma uzrokovanog sporama vrste *Clostridium botulinum* ipak postoji određeni rizik pojave koji se može reducirati uporabom visokokvalitetnog mlijeka, kontrolom temperature, sanitacijom opreme i pogona te uporabom najnovijih tehnologija (Hebishy i sur., 2023).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci za mikrobiološku analizu

Proteini sirutke postaju popularni dodaci prehrani, međutim, ti sastojci obično nisu sterilni te je potrebno ispitati mikrobiološku ispravnost ovih proizvoda. Istraživanje je provedeno na 5 uzoraka proteinskih napitaka na bazi sirutke obogaćenih različitim okusima (tablica 3).

Uzorci su analizirani na prisutnost: aerobnih mezofilnih bakterija, bakterije *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, sulfireducirajuće klostridije, na prisutnost kvasaca i plijesni te bakterija mliječne kiseline. Navedeni mikrobiološki parametri određivani su odmah nakon otvaranja ambalaže (1. dan), zatim nakon 15. i 30. dana nakon skladištenja uzoraka na hladnom i suhom mjestu, zaštićeno od sunčeve svjetlosti pri 25 °C.

**Tablica 3.** Ispitivani uzorci proteinskih napitaka

Broj uzorka	Okus	Sastojci	Proizvođač
1	„Swiss chocolate supreme“	koncentrat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA, emulgator (SOJIN lecitin), kakaov prah smanjene masti (10,5 % masti), aroma, zgušnjivač (celulozna guma), L-glutamin, hidrolizat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), iBCAA (L-leucin, L-izoleucin, L-valin, emulgator (SOJIN lecitin), izolat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), sladilo (sukraloza)	Polleo Sport, EU
2	„Vanilija“	koncentrat sirutkinih bjelančevina (MLIJEKO) (95,6 %), emulgator (SOJIN lecitin), aroma, bojilo (beta-karoten), sladilo (sukraloza)	Polleo Sport, EU
3	„Vanilija i malina“	koncentrat sirutkinih bjelančevina (MLIJEKO) (97 %), arome, bojilo (betanin), emulgator (sojin lecitin), sladilo (sukraloza), sol	Polleo Sport, EU
4	„Keksi i vrhnje“	koncentrat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA, emulgator (SOJIN lecitin), aroma, kakaov prah smanjene masti (10,5 % masti),	Polleo Sport, EU

		zgušnjivač (celulozna guma), L-glutamin, hidrolizat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), iBCAA (L-leucin, L-izoleucin, L-valin), emulgator (SOJIN lecitin), izolat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), sladilo (sukraloza)	
5	„Čokolada Jaffa naranča“	Koncentrat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA, emulgator (SOJIN lecitin)), kakaov prah smanjene masti (10,5 % masti), aroma, zgušnjivač (celulozna guma), L-glutamin, hidrolizat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), iBCAA (L-leucin, L-izoleucin, L-valin), emulgator (SOJIN lecitin)), izolat sirutkinih bjelančevina (iz MLIJEKA), sladilo (sukraloza)	Polleo Sport, EU

### 3.1.2. Pribor i oprema

- Erlenmayerove tikvice (V=300 mL)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- Autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- Mikrobiološka ušica
- Štapić po Drigalskom
- Mikrobiološke epruvete (16×160 mm)
- Pipetman i pipete
- Mikrobiološke epruvete
- Termostat (Memmert GmbH+Co.KG, Büchenbach, Njemačka)
- API test trake
- Optički mikroskop (Olympus Japan, CX21)
- Vibracijska miješalica za homogenizaciju (Tehnica, Slovenija)
- Sterilan pribor za uzimanje uzoraka
- Laboratorijska tresilica za homogenizaciju (IKA-WERKE GmbH&Co. KG)
- brojač kolonija (WTW, BZG 30)

### 3.1.3. Kemikalije i reagensi za mikrobiološku analizu

- kristal violet (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- Lugolova otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- 96% etanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)

- safranin (Biognost, Zagreb, Hrvatska)

### **3.1.4. Mikrobiološke podloge**

#### **Podloga za rast aerobnih mezofilnih bakterija**

Hranjivi agar (Biolife, Italija) osnovna je kruta hranjiva podloga za rast bakterija. Otopljeno je 23,5 g agara u 1 L hladne destilirane vode, zagrijavano do potpunog otapanja u vodenoj kupelji. Sterilizirano na 121 °C/30 minuta. Prije uporabe agar je otopljen u mikrovalnoj pećnici, ohlađen na 45-50 °C i razliven u Petrijeve zdjelice.

#### **Podloga za *Salmonella spp.***

Ksiloza-lizin-deoksilatni agar (Biolife, Italija), skraćeno XLD agar, selektivan je i diferencijalni medij koji se koristi u svrhu utvrđivanja prisutnosti gram-negativnih enterobakterija, najčešće *Salmonella* vrsta. Uslijed fermentacije ugljikohidrata, dekarboksilacije lizina te formacije sumporovodika iz kojeg se precipitira željezov(II) sulfid, potvrđuje se prisutnost *Salmonella* vrsta na podlozi. Otopljeno je 54,9 g agara u 1 L hladne destilirane vode, zagrijavano uz miješanje dok medij ne proključa. Premješteno u vodenu kupelj na temperaturi između 44 i 47 °C te razliveno u Petrijeve zdjelice.

#### **Podloga za *Listera monocytogenes***

Oxford agar (Biolife, Italija) je medij za izolaciju *Listeria sp.* koja, ako je prisutna, hidrolizira eskulin tvoreći crne zone okolo njezinih kolonija kao posljedica formacije crnih željezovih fenolnih sastavnica iz aglukona. Otopljeno je 28,7 g u 0,5 L hladne destilirane vode, zagrijavano do potpunog otapanja agara u vodenoj kupelji. Sterilizirano na 121°C/15 minuta. Nakon hlađenja na temperaturi između 45 i 50 °C dodan je sadržaj bočice „Listeria Oxford Antimicrobial Supplement“ pomiješane s 5 mL etanola/sterilne destilirane vode (1:1). Dobro promiješano i razliveno u Petrijeve zdjelice.

#### **Podloga za *Staphylococcus aureus***

Braid-Parker agar (Biolife, Italija) djeluje kao selektivna i dijagnostička podloga namijenjena za rast koagulaza-pozitivnih stafilokoka. 50 g podloge koja sadrži pepton, ekstrakt mesa, kvasni ekstrakt, Na-piruvat, glicin i litijev klorid te agar otopi se u 950 mL destilirane vode i sterilizira se na 121 °C/15 minuta. Podloga se ohladi na 45-50 °C, pomiješa se s 50 mL teluritne emulzije sa žumanjkom i ako je potrebno doda se 50 mg/L sulfametazina. Razlije se u Petrijeve zdjelice te se do uporabe pohranjuje u hladnjaku na 4 °C.



### **Podloga za *Enterobacteriaceae***

Ljubičasto crveni žučni glukoza agar (Biolife, Italija) koristi se za detekciju enterobakterija. Kristal violet inhibira rast gram-pozitivnih bakterija poput stafilokoka što pridonosi selektivnost ove podloge kao i žučne soli. Enterobakterije fermentiraju glukozu čime nastaju kiseli produkti te formiraju crvene do tamnoljubičaste kolonije okružene crveno-ljubičastim zonama. Otopljeno je 40,62 g agara u 1L destilirane vode. Zagrijavati do ključanja, odnosno do potpunog otapanja. Ohladiti na temperaturi između 45 i 50 °C te razliti u Petrijeve zdjelice. Nije potrebno koristiti autoklav.

### **Podloga za sulfitoreducirajuće klostridije**

Sulfitni željezni agar (Biolife, Italija) pogodan je medij za rast i dokazivanje sulfitoreducirajućih klostridija. Imaju sposobnost redukcije sulfita do sulfida koji potom reagira sa željezo(III) citratom tvoreći crni talog i bojeći porasle bakterije u crno. Otopljeno je 31 g u 1 L destilirane vode te zagrijavano do potpunog otapanja. Sterilizirano u autoklavu na 121 °C/15 minuta, ohlađeno te razliveno u Petrijeve zdjelice.

### **Podloga za bakterije mliječne kiseline**

MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar (Biolife, Italija) podloga je koja se koristi za dokazivanje rasta bakterija mliječne kiseline. Natrijev acetat i amonijev citrat osim što služe kao izvor energije djeluju i kao selektivni faktori rasta, ako su navedene bakterije prisutne, na podlozi rastu u obliku bijelih kolonija. 66,2 g agara koji sadrži polisorbit, acetat, magnezij i mangan koji su osobiti faktori rasta laktobacila se otopi u 1L destilirane vode te se sterilizira na 118 °C/15 minuta. Podloga je prozirna i smečkaste boje te je vrlo slabo selektivna pa uz laktobacile mogu rasti i *Pediococcus* i *Leuconostoc* vrste.

### **Podloga za plijesni i kvasce**

Sladni agar (Biolife, Italija) koristi se za izolaciju kvasaca i plijesni. U sadržaju agara nalazi se optimalna formulacija ugljika, proteina i ostalih nutrijenata poput dekstroze i peptona koji služe kao izvori energije koji omogućuju njihov rast. pH navedene podloge podešen je na 5,5 čime se omogućava rast plijesni i kvasaca, a istovremeno inhibira rast bakterija. 47 g agara otopljeno je u 1L destilirane vode te zatim sterilizirano u autoklavu na 121 °C/15 minuta. Podloga je ohlađena, homogenizirana te razlivena u Petrijeve zdjelice, pH vrijednost je oko 5,6 te je prozirna i svjetložute boje.

### 3.2. METODE ZA ODREĐIVANJE MIKROORGANIZAMA U UZORCIMA

- ***Salmonella sp.***

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 0,1 mL na selektivnu podlogu XLD agar
    - inkubacija na 37 °C / 48 h
    - očitavanje rezultata

- ***Listeria monocytogenes***

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 0,1 mL na podlogu Oxford agar
    - inkubacija na 37 °C / 48 h
    - očitavanje rezultata

- ***Bakterije mliječne kiseline***

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 0,1 mL na selektivnu podlogu MRS agar
    - inkubacija na 37 °C / 48 h
    - očitavanje rezultata

#### **Potvrdni test:**

- 1) Bojanje po Gramu metoda je s pomoću koje se vizualno diferenciraju bakterije na gram-pozitivne i gram-negativne. Zahvaljujući debljem sloju peptidoglikana u staničnoj stijenci gram-pozitivne bakterije zadržavaju boju nakon ispiranja te poprimaju ljubičastu boju. Za razliku od gram-negativnih bakterija koje zbog tanjeg sloja peptidoglikana ne zadržavaju ljubičastu boju (Priručnik, 2015.). Suspenzija bakterija nanosi se na predmetnicu, fiksira se na vrućem zraku, potom se nanese nekoliko kapi kristal violeta te Lugolove otopine i nakon 1-2 minute ispiru se alkoholom i vodom. Na vlažni preparat se nanese kontrastno crveno bojilo safranin kroz 5 minuta, i ispiru vodom. Preparat se osuši staničevinom te se mikroskopira uz imerzijski objektiv pod P=1000x.
- 2) API 50 CHL test biokemijski je test koji se koristi za identifikaciju bakterija roda *Lactobacillus* temeljeno na njihovom metabolizmu ugljikohidrata odnosno fermentaciji šećera (Ozgun i Vural, 2011). Suspenziju bakterija s pomoću mikrobiološke

ušice nanesimo u API 50 CHL medij tako da na denzitometru očitamo koncentraciju od 2 McFarlanda, potom na prethodno ovlaženu podlogu stavimo test trake te ampule ispunimo načinjenom suspenzijom tako da nam ne zaostaju mjehurići zraka. Nanesimo mineralno ulje te se inkubira 48 sati na 37 °C. Ovisno o promjeni boje u ampuli iz žute u plavu rezultat se bilježi kao pozitivan (+), označava da je došlo do fermentacije šećera uslijed zakiseljavanja i promjene boje bromkrezol-purpurnog indikatora. Pozitivan rezultat u ampuli 25 očitava se kao promjena boje iz ljubičaste u crnu što predstavlja iznimku, dok negativan (-) rezultat očitavamo kao izostanak promjene boje. Dobivene rezultate unosimo u softver Api-Web™ (BioMerieux, Francuska) pomoći kojih se provodi identifikacija ispitivane kulture.

- ***Staphylococcus aureus***

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
- 0,1 mL na selektivnu podlogu BAIRD-PARKER agar
  - inkubacija na 37 °C / 48 h
  - očitavanje rezultata

**Potvrdni test:**

- 1) Bojanje po Gramu
- 2) API STAPH V5.0 test provodimo u svrhu identifikacije vrste stafilokoka. Biomasu re-suspendiramo u API STAPH mediju s pomoću mikrobiološke ušice sve dok na denzitometru ne očitamo 0,5 McFarlanda. Načinjenom suspenzijom punimo ampule API STAPH stripa koje potom popunjavamo mineralnim uljem. Po završetku inkubacije na 37 °C nakon 48 sati na temelju promjene boje u ampuli determiniramo pozitivan ili negativan rezultat kojeg zatim unosimo u softvere Api-Web™ (BioMerieux, Francuska) te se izvrši identifikacija.

- **Enterobacteriaceae**

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 0,1 mL na ljubičasto crveni žučni agar
  - inkubacija na 37 °C / 48 h
  - očitavanje rezultata

- **Sulfitoreducirajući klostridiji**

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 1,0 mL uzorka u rastaljeni sulfitni agar
  - zagrijavanje u vodenoj kupelji 80 °C / 10 min
  - inkubacija na 37 °C / 3 dana
  - očitavanje rezultata

- **Aerobne mezofilne bakterija – *Bacillus sp.***

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - razrjeđenje ( $10^{-3}$ )
  - 0,1 mL na hranjivi agar
  - inkubacija na 37 °C / 48 h
  - očitavanje rezultata

- **Plijesni i kvasci**

- 10 g uzorka + 90 mL fiziološke otopine (homogenizacija)
  - 0,1 mL na sladni agar
- inkubacija na 28 °C / 48-72 h
  - očitavanje rezultata

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je mikrobiološka analiza uzoraka proteinskih napitaka na bazi sirutke obogaćenih različitim okusima (tablica 3), prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2019), prema kategoriji hrane: mlijeko u prahu i drugi praškasti proizvodi od mlijeka. Parametri analize su bili: aerobne mezofilne bakterije; *Enterobacteriaceae*; *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*; Sulfitoreducirajući klostridiji; kvasci i plijesni, a određivana je i prisutnost bakterija mliječne kiseline. Mikrobiološki parametri određivani su odmah nakon otvaranja ambalaže 1. dan, zatim nakon 15. i 30. dana nakon skladištenja uzoraka na hladnom i suhom mjestu, zaštićeno od sunčeve svjetlosti pri 25 °C. Provedenom izolacijom izdvojene su čiste kulture bakterija koje su dodatno potvrđene bojenjem po Gramu i API-testom.

Rezultati mikrobne identifikacije i kvantifikacije u proteinskim napitcima prikazani su u tablicama 4-6 i na slikama 1-7.

**Tablica 4. Rezultati mikrobiološke analize proteina sirutke odmah nakon otvaranja ambalaže**

	CFU/g							
	S	Lm	Sa	E	SRK	AMB	BMK	K i P
Uzorak 1.	ND	ND	pozitivan	ND	ND	nebrojivo	1 x 10 <sup>1</sup>	ND
Uzorak 2.	ND	ND	ND	5 x 10 <sup>1</sup>	ND	nebrojivo	ND	ND
Uzorak 3.	ND	ND	ND	2 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	ND	ND
Uzorak 4.	ND	ND	4 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	nebrojivo	pozitivan	ND
Uzorak 5.	ND	ND	2 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	nebrojivo	pozitivan	ND

S - *Salmonella* spp.; Lm - *Listeria monocytogenes*; Sa - *Staphylococcus aureus*; E – *Enterobacteriaceae*;

SRK - Sulfitoreducirajući klostridiji; AMB - Aerobne mezofilne bakterije; BMK – bakterije mliječne kiseline; K i P - Kvasci i plijesni

ND – nije dokazano

**Tablica 5. Rezultati mikrobiološke analize proteina sirutke 15. dan nakon otvaranja ambalaže**

	CFU/g							
	S	Lm	Sa	E	SRK	AMB	BMK	K i P
Uzorak 1.	ND	ND	ND	ND	ND	nebrojivo	ND	ND
Uzorak 2.	ND	ND	ND	ND	ND	2 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND
Uzorak 3.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Uzorak 4.	ND	ND	6 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	1 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>1</sup>	ND
Uzorak 5.	ND	ND	2 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	2 x 10 <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>1</sup>	ND

S - *Salmonella* spp.; Lm - *Listeria monocytogenes*; Sa - *Staphylococcus aureus*; E – *Enterobacteriaceae*;

SRK - Sulfitoreducirajući klostridiji; AMB - Aerobne mezofilne bakterije; BMK – bakterije mliječne kiseline; K i P - Kvasci i plijesni

ND – nije dokazano

**Tablica 6. Rezultati mikrobiološke analize proteina sirutke 30. dan nakon otvaranja ambalaže**

	CFU/g							
	S	Lm	Sa	E	SRK	AMB	BMK	K i P
Uzorak 1.	ND	ND	ND	ND	ND	nebrojivo	ND	ND
Uzorak 2.	ND	ND	ND	ND	ND	2 x 10 <sup>2</sup>	ND	ND
Uzorak 3.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Uzorak 4.	ND	ND	4 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	2 x 10 <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	ND
Uzorak 5.	ND	ND	4 x 10 <sup>1</sup>	ND	ND	3 x 10 <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	ND

S - *Salmonella* spp.; Lm - *Listeria monocytogenes*; Sa - *Staphylococcus aureus*; E – *Enterobacteriaceae*;

SRK - Sulfitoreducirajući klostridiji; AMB - Aerobne mezofilne bakterije; BMK – bakterije mliječne kiseline; K i P - Kvasci i plijesni

ND – nije dokazano

U mliječnoj industriji bakterije koje uzrokuju kvarenje kao i patogene bakterije koje tvore spore glavna su prepreka u proizvodnji i vijeku trajanja proizvoda dobivenih od mlijeka kao ishodišne sirovine. Kontaminacija takovih praškastih namirnica od mlijeka, posljedica je prilagodbe bakterija na preživljavanje u nepovoljnim uvjetima ponajviše zahvaljujući njihovoj sposobnosti da tvore spore, zatim da tvore biofilm, kao i sposobnost održavanja faze dormantnosti kako bi preživjele visoke temperature obrade.

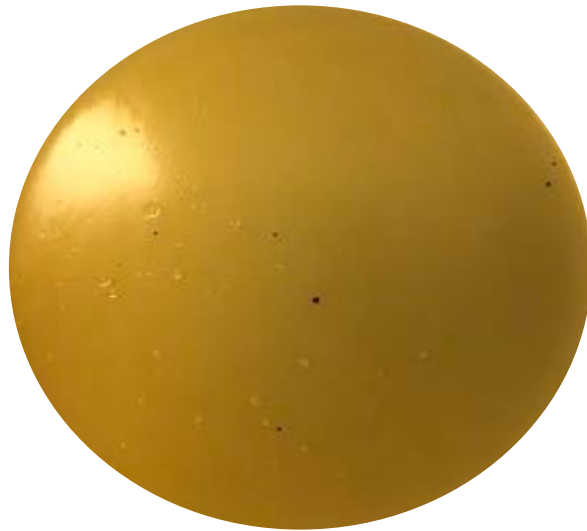
Eliminacija spora u prahovima proteina sirutke minimiziraju se uporabom mlijeka odgovarajuće kvalitete, kontrolom temperature, pravilnom sanitacijom opreme i strojeva uz kombiniranje različitih tehnoloških procesa. Uz pasterezaciju mlijeka preporučuje se i baktofugacija – metoda koja uporabom centrifuge visoke brzine eliminira bakterijske spore psihrofila, mezofila i termofila pri temperaturi između 55 i 60 °C (Ribeiro-Junior i sur., 2020; Hebshy i sur. 2023). Iako primjenom ovih metoda se eliminira većina nepoželjnih bakterija ipak koristeći se odgovarajućim mikrobiološkim metodama za određivanje mikroorganizama u ispitivanom uzorku dokazali smo da je došlo do porasta određenih mikrobioloških kultura.

Iz rezultata (tablice 4 – 6) vidljivo je da niti u jednom uzorku tijekom 30 dana skladištenja nisu dokazane patogene vrste *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, sulfitoreducirajući klostridiji kao ni kvasci i plijesni. Enterobakterije su dokazane samo u dva uzorka 1. dan u broju  $2 \times 10^1$  i  $5 \times 10^1$  CFU/g, a daljnjim vremenom skladištenja nisu dokazane. Aerobne mezofilne bakterije prisutne su u svim analiziranim uzorcima (osim u uzorku br. 3) u nebrojivom broju odmah nakon otvaranja ambalaže što se može objasniti i predugom manipulacijom uzoraka nakon otvaranja, ali se taj broj dužim stajanjem (15. i 30. dan) na hladnom i suhom mjestu smanjio na oko  $10^2$  CFU/g. Iako su literaturni podatci o mikrobnjoj kontaminaciji ovih proizvoda oskudni, dobiveni rezultati su djelomično u suglasju s rezultatima nekih autora. Ukuku i sur. (2014) su dokazali prisutnost koliforma u broju  $10^2$  CFU/g, aerobnih mezofilnih bakterija  $10^3$  CFU/g, kvasaca i plijesni  $10^1$  CFU/g, dok su Hussein i sur. (2021) dokazali prisutnost koliforma u broju  $10^2$  CFU/g, aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca i plijesni  $10^3$  CFU/g. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u sportskom napitku na bazi sirutke u istraživanju Beckera i sur. (2021) iznosio je  $<1,0 \times 10^1$  CFU/mL, a koliformne bakterije nisu dokazane. Ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija i koliformnih bakterija važni su pokazatelji opće mikrobne kontaminacije, a prisutnost ovih bakterija u velikom broju može dovesti do kvarenja proizvoda, mijenjajući okus, teksturu i ukupnu kvalitetu proteinskih dodataka. Niski aktivitet vode ( $a_w < 0,26$ ) ovih proizvoda uz prisutnost laktoferina i drugih kratkih peptida s antimikrobnim potencijalom otežava rast ili potpuno inhibira rast patogenih mikroorganizama



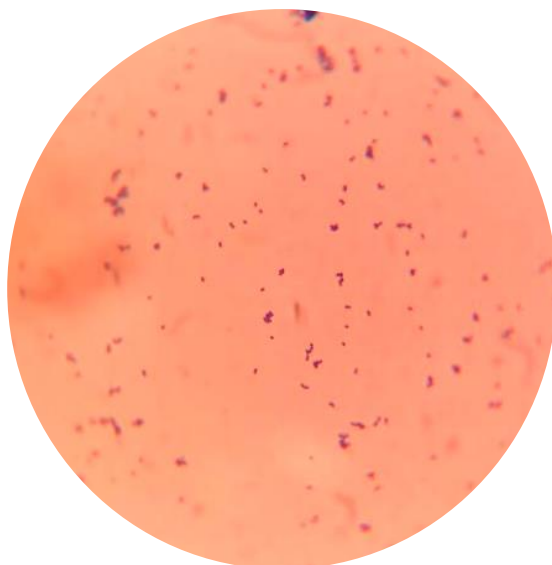
(Hebishy i sur., 2023; Elaziz i sur., 2024). Međutim, ako se iz nekog razloga ne postigne sadržaj vlage manji od 5 %, tada kserofilni i/ili osmofilni organizmi (npr. plijesni) mogu s vremenom postati problem u osušenom prahu i kao takvi mogu predstavljati prijetnju sigurnosti hrane (Ukuku i sur., 2014; Hussein i sur., 2021; Hebishy i sur., 2023).

U tablicama 4-6 prikazano je da je prisutna bakterija *Staphylococcus aureus* jer su na Baird Parker podlozi porasle tamne/crne kolonije karakteristične za *Staphylococcus* vrste (slika 1).



**Slika 1.** Porasle kolonije na Baird Parker podlozi (vlastita fotografija)

Kao potvrdni test načinjen je preparat obojen po Gramu i zaključeno je da se radi o gram-pozitivnim kokcima (slika 2).

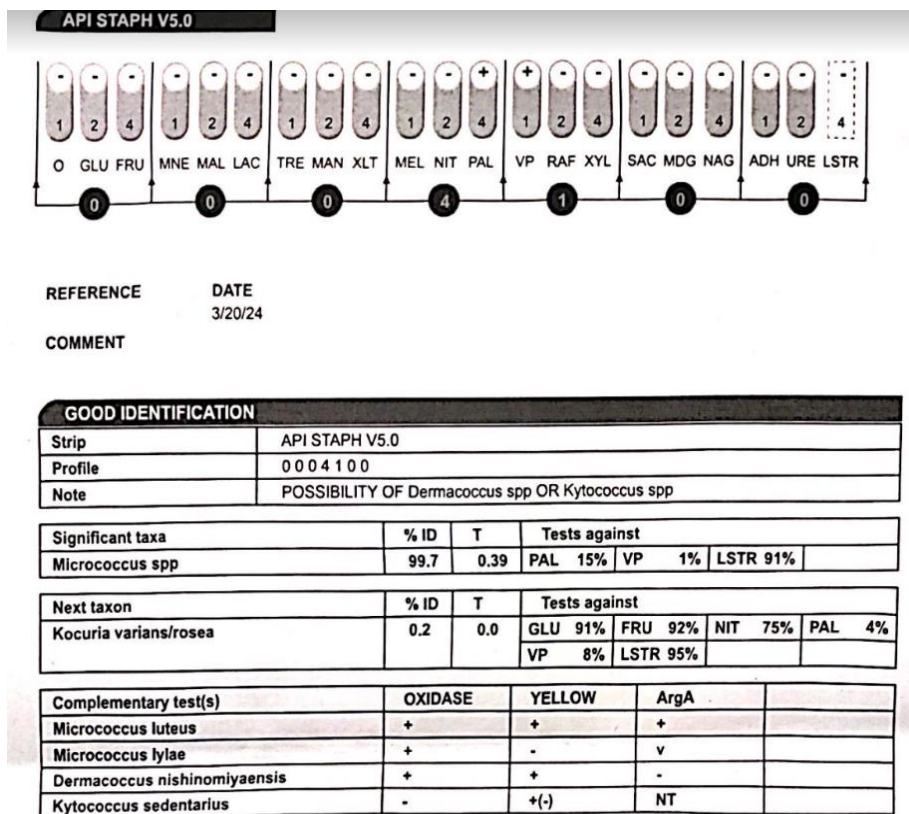


**Slika 2.** Mikroskopska slika gram pozitivnih koka (vlastita fotografija)

Kako bi sa sigurnošću mogli reći da li se radi o *Staphylococcus aureus* izolirana čista kultura dodatno je testirana API biokemijskim testom (slika 3).



**Slika 3.** API biokemijski profili ispitivanih bakterijskih izolata (vlastita fotografija)

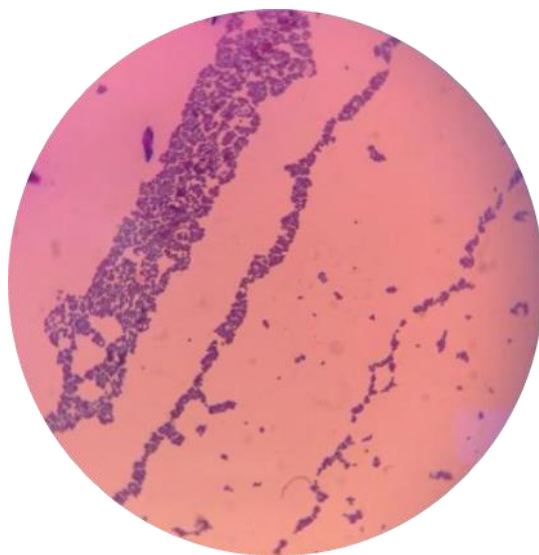


**Slika 4. Rezultati API testa bakterijskih izolata**

Biokemijski profil je identificiran na računalo s pomoću programa (V 5.1) s razinom pouzdanosti koja je izražena: izvrsna ( $\geq 99,9\%$ ); veoma dobra ( $\geq 99,0\%$ ); dobra ( $\geq 90,0\%$ ); prihvatljiva ( $\geq 80\%$ ) ili neprihvatljiva identifikacija ( $< 80\%$ ). Rezultat API testa prikazani na slici 4 su pokazali s razinom pouzdanosti od 99,7% da se radi o *Micrococcus* spp. Dobiveni rezultati nisu iznenađujući budući da mikrokoki čine glavni dio flore sirovog mlijeka, a neki termorezistentni mikrokoki mogu preživjeti pasterizaciju i javljaju se u siru od pasteriziranog mlijeka. Neke vrste mikrokoka kao *M. luteus* mogu formirati inaktivne strukture koje omogućuju stanicama da prežive duga razdoblja u nepovoljnim uvjetima okoline, kao što su osušeni praškasti supstrati s vrlo niskim aktivitetom vode.

Porast bakterija mliječne kiseline na MRS agaru neposredno nakon otvaranja ambalaže u nebrojnom je broju u uzorcima 4 i 5, dok je u uzorku broj 1 poraslo  $1 \times 10^1$  CFU/g (tablica 4). Prilikom stajanja, nakon 15. i 30. dana, porast bakterija u uzorcima 4 i 5 smanjio se na broj oko  $3 \times 10^1$  CFU/g za razliku od uzorka 1 gdje do porasta nije niti došlo u periodu nakon otvaranja (tablice 5 i 6). Bojenjem po Gramu utvrđeno je da se radi o gram-pozitivnim kokcima

(slika 5).



**Slika 5.** Mikroskopska slika bakterija mliječne kiseline izolirane na MRS agaru (vlastita fotografija)

Za potvrdu bakterijske kulture nakon 48 sati inkubacije očitani su rezultati API 50 CHL biokemijskog testa. Pozitivni testovi su oni kod kojih je došlo do promjene boje jažica u žuto (slika 6), a biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu (slika 7). Nakon provedenog API 50 CHL biokemijskog testa identificirana je ispitivana kultura i ustanovljeno da se radi o vrsti *Lactococcus lactis* s razinom pouzdanosti od 94,5 %.



**Slika 6.** API biokemijski profil bakterijskog izolata (vlastita fotografija)



izvora, mogu sadržavati raznoliku mikrobnu populaciju, a kontaminacija mikrobima u ovim dodacima može dovesti do zdravstvenih rizika i smanjene učinkovitosti proizvoda (Patel S, 2015). Mikrobna karakterizacija moćan je alat koji proizvođačima omogućuje prepoznavanje potencijalnih kontaminanata, pridržavanje regulatornih standarda i pružanje potrošačima sigurne i pouzdane proizvode. Kako su proteini sirutke u praškastom obliku, što podrazumijeva vrlo niski aktivitet vode, ne ostavlja se puno prostora za mikroorganizme da eksponencijalno rastu i iskorištavaju proteine sirutke kao izvor energije (Hebishy i sur., 2023). Stoga su pravilni uvjeti skladištenja i pakiranje koji sprječavaju prodor vlage ključni za sprječavanje rasta mikroba u konačnom proizvodu, što je djelomično dokazano i ovim istraživanjem.

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedene mikrobiološke analize ispitivanih uzoraka proteina sirutke zaključuje se sljedeće:

1. Ispitivani uzorci proteina sirutke mikrobiološki su ispravni, nema odstupanja od propisanih standarda te nije dokazana kontaminacija.
2. Ne mijenja se mikrobiološka kvaliteta uzoraka proteina sirutke 15. i 30. dana nakon otvaranja kada su uzorci skladišteni na propisan način.
3. Izuzetno je važna ispravna manipulacija mlijekom prilikom proizvodnje kako kasnije u obradi mlijeka ne bi došlo do kontaminacije konačnog proizvoda.

## 6. POPIS LITERATURE

Abd Elaziz A, Baker N, Ibrahim H, & Ali E (2024) Effect of whey protein isolate on keeping quality and shelf life of minced meat. *Journal of Advanced Veterinary Research* **14**, 824-830. <https://advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/1758>

Abo El-Makarem H S, El-Fatah A, Sara T, Amer A A, & Ahmed A A (2021) Prevalence of Microbiota in Some Dried Dairy Products at Alexandria City, Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, **71**, 111-117. doi. 10.5455/ajvs.91328

Agar, L M LACTOBACILLI MRS AGAR (2017). [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7543\\_pi.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7543_pi.pdf).  
Pristupljeno 12. travnja 2024.

AGAR, M E Malt Extract Agar Plates. <https://www.carter-health.com/Content/Images/uploaded/Product%20Data%20Sheets/chp93.pdf>.  
Pristupljeno 1. svibnja 2024.

Aljaloud S O (2016) Microbiological quality and safety of energy drink available in the local markets in Saudi Arabia. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **5**, 287-289. <http://dx.doi.org/10.19070/2326-3350-1600051>

Atamer Z, Samtlebe M, Neve H, Heller KJ and Hinrichs J (2013) Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology* **4**, 191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00191>

Becker A F, Rebelatto E, Sabadin K, Becker J, Steffens J, Bagatini L, i sur. (2021) Evaluation of whey permeate obtained through nanofiltration for the formulation sports drinks. *Brazilian Journal of Development* **7**, 18753-18769. doi:10.34117/bjdv7n2-493

Beveridge T J (2001) Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* **76**, 111-118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>

Biolife (2023) <https://gest.joyadv.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-inglese/TS-491032.pdf>. Pristupljeno 12. travnja 2024.

Božanić R, Barukčić I & Lisak K (2014) Possibilities of whey utilisation. *Austin journal of nutrition and food sciences*, **2**, 7.

de Castro R J S, Domingues M A F, Ohara A, Okuro P K, dos Santos J G, Brexó R P, & Sato H H (2017) Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. *Food structure* **14**, 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>

Filali F R (2018) Microbiological quality and risk factor of contamination of whey in Meknes (Morocco). *BJSTR* **6**, 5521-5525.

Garrido B C, Souza G H, Lourenço D C, & Fasciotti M (2016) Proteomics in quality control: Whey protein-based supplements. *Journal of proteomics* **147**, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.044>

Guerrero F G R, Signorini M, Garre A, Sant'Ana A S, Gorbeña J C R, & Jaimes M I S (2023) Quantitative microbial spoilage risk assessment caused by fungi in sports drinks through multilevel modelling. *Food Microbiology* **116**, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104368>



Hebishy E, Yerlikaya O, Mahony J, Akpınar A, & Saygılı D (2023) Microbiological aspects and challenges of whey powders—I thermotolerant, thermophilic and spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology* **76**, 779-800. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13006>

Kårlund A, Gómez-Gallego C, Turpeinen A M, Palo-Oja O M, El-Nezami H, & Kolehmainen M (2019) Protein supplements and their relation with nutrition, microbiota composition and health: is more protein always better for sportspeople?. *Nutrients* **11**, 829. <https://doi.org/10.3390/nu11040829>

Khan U M, & Selamoglu Z (2019) Nutritional and medical perspectives of whey protein: A historical overview. *Journal of Pharmaceutical Care* **7**, 112-117. <https://doi.org/10.18502/jpc.v7i4.2380>

King S, & Weedon G (2020) Embodiment is ecological: The metabolic lives of whey protein powder. *Body & Society* **26**, 82-106. <https://doi.org/10.1177/1357034X19878775>

Kumar C G, & Anand S K (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology* **42**, 9-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)

Legović D, Lopac D, Šantić V, Jurdana H, Gulan G, & Tudor A (2007) Sportski napitci i umor sportaša. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis* **43**, 215-223. <https://hrcak.srce.hr/file/36916>

Macwan S R, Dabhi B K, Parmar, S C, & Aparnathi, K D (2016) Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **5**, 134-155. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016>

Maughan R J (2003) Unos i djelovanje ugljikohidrata: Športski napitci sa elektrolitima. *Športska medicina*, Zagreb: Medicinska naklada, 284-9.

Morr C V, & Ha E Y W (1993) Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **33**, 431-476. <https://doi.org/10.1080/10408399309527643>

Onwulata C, & Huth P (2009) *Whey processing, functionality and health benefits*, 1. izd., John Wiley & Sons, Iowa.

Oxford agar - ScienceDirect (2003) [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(03\)80073-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80073-5).  
Pristupljeno 12. travnja 2024.

Ozgun D, & Vural H C (2011) Identification of Lactobacillus strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *Journal of Medical Genetics and Genomics* **3**, 46-49. <http://www.academicjournals.org/jmagg>

Patel S (2015) Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods* **19**, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.040>

Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije (2015) ured. D. Hajsig i F. Delaš, Izdavač Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb.

Ribeiro-Júnior J C, Tamanini R, Alfieri A A, & Beloti V (2020) Effect of milk bactofugation on the counts and diversity of thermotolerant bacteria. *Journal of dairy science* **103**, 8782-8790. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18591>

Roberfroid M B (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 1660S-1664S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1660S>

Smithers G W (2008) Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. *International dairy journal* **18**, 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>

Song A A L, In L L, Lim S H E, & Rahim R A (2017) A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial cell factories* **16**, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>

Strengt, G Violet Red Bile Glucose Agar (DM287H). <https://www.micromasterlab.com/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/2023/12/DM287H-PSS.pdf>. Pristupljeno 12. travnja 2024.

Strength G Iron Sulphite Agar (DM122). [https://www.micromasterlab.com/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/DM122\\_PSS\\_545.pdf](https://www.micromasterlab.com/wp-content/uploads/bsk-pdf-manager/DM122_PSS_545.pdf). Pristupljeno 12. travanj 2024

Tsakali E, Petrotos K, D'Allessandro A, & Goulas P (2010) A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. In *Proc. 6th Int. Conf. Simul. Modelling Food Bioind*, 195-201. <http://arianco.co/wp-content/uploads/2022/11/wpc.pdf>.

Ukuku D O, Onwulata C, Thomas A, Mukhopadhyay S, & Tunick, M (2014) Behavior of native microbial populations of WPC-34 and WPC-80 whey protein stored at different temperatures. *Journal of Food Processing & Technology* **5**, 1-5. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000304>

Vasconcelos Q D J S, Bachur T P R, & Aragão G F (2021) Whey protein supplementation and its potentially adverse effects on health: a systematic review. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* **46**, 27-33. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0370>

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. NN 74/2008. Pristupljeno 18. 6. 2024. [Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu \(nn.hr\)](http://pravilnik.o-mikrobioloskim-kriterijima-za-hranu.nn.hr)

Wirunsawanya K, Upala S, Jaruvongvanich V, & Sanguankeo A (2018) Whey protein supplementation improves body composition and cardiovascular risk factors in overweight and obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Nutrition* **37**, 60-70. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1344591>

Yiğit A, Bielska P, Cais-Sokolińska D, & Samur G (2023) Whey proteins as a functional food: Health effects, functional properties, and applications in food. *Journal of the american nutrition association* **42**, 758-768. <https://doi.org/10.1080/27697061.2023.2169208>

Zain S N M, Flint S H, Bennett R, & Tay H S (2016) Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Science & Technology* **96**, 285-295. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0264-z>

### Izjava o izvornosti

Ja                     Klaudia Mijić                     izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis