

Inhibicijski učinak kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb-46 na rast uropatogenog soja *Candida albicans*

Vedran Slačanac, Jovica Hardi, Hrvoje Pavlović, Mato Vlainić, Mirela Lučan

Izvorni znanstveni rad-Original scientific paper

UDK: 579.873.13

Sažetak

Cilj ispitivanja bio je utvrditi antagonistički utjecaj kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb-46 na rast uropatogenog kvasca *Candida albicans*. Hipoteza u ovom radu bila je da fermentirano kozje mlijeko ima moguće jače inhibicijsko djelovanje na rast *Candida albicans* u usporedbi s fermentiranim kravljim mlijekom. Povrh toga, praćene su korelacije između stupnja inhibicije i određenih parametara mliječno kisele fermentacije (broj stanica *Bifidobacterium longum* Bb-46 i pH vrijednost). Rezultati istraživanja pokazali su da fermentirano kozje mlijeko značajno jače inhibira rast *Candida albicans* u odnosu na fermentirano kravlje mlijeko ($P < 0,05$). Nije utvrđena nikakva korelacija stupnja inhibicije rasta *Candida albicans* s pH vrijednosti fermentiranog mlijeka i brojem živih stanica *Bifidobacterium longum* Bb-46 u fermentiranom kozjem i kravljem mlijeku.

Ključne riječi: *Bifidobacterium longum* Bb-46, *Candida albicans*, fermentirano kozje i kravlje mlijeko, inhibicijski učinak

Uvod

Infekcije uzrokovane kvascima roda *Candida* mogu se javiti u probavnom traktu (sindrom iritiranosti tankog crijeva - prerast nepoželjnih mikroorganizama u tankom crijevu) ili pak u urogenitalnom traktu kao kandidoze (Elahi i sur., 2003). Podaci svjetske zdravstvene organizacije pokazuju da godišnje oko 20% zapadnoeuropske populacije oboli od težih oblika crijevnih oboljenja (Mendall i sur., 1998.), a gotovo 100 milijuna ljudi (osobito žena) oboli od nekog oblika urogenitalnih infekcija koje su počesto praćene infekcijama *Candidom* (Reid i sur., 2001.).

Danas je opće poznato da je prisutnost probiotičkih mliječno-kiselih bakterija u probavnom i urogenitalnom traktu važan zaštitni i imunološki čimbenik (Reid i Bruce, 2001.). Mnoge *in vitro* i *in vivo* studije u zadnjih 20 godina pokazale su da probiotici antagonistički djeluju na potencijalno

patogene i patogene mikroorganizme (Saarela i sur., 2000.; Reid i Burton, 2002.). Posebno su interesantne studije koje pokazuju da se već oralnim unošenjem proizvoda s probioticima mogu spriječiti i ublažiti crijevne i urogenitalne infekcije (Reid i sur., 2001.; Juarez Tomas i sur., 2003.; Elahi i sur., 2003.; Winne i sur., 2004.).

Kozje mlijeko smatra se nutritivno i terapijski visoko vrijednom hranom (Haenlein, 2004.). U usporedbi s kravljim mlijekom kozje mlijeko ima veću probavljivost (Haenlein, 2004.), veći puferski kapacitet (Park i Attaie, 1986.), manji promjer globula mliječne masti (Mehaia, 1995.), veći udio niže (SCFA) i srednje (MCFA) lančanih masnih kiselina (Bickerstaffe i sur., 1972.), veći udio cinka, željeza i magnezija (Park, 1994a), jači antimikrobni (laktoperoksidazni) sustav (Zapico i sur., 1991.) te jače izražene imunološke i baktericidne osobine (Park, 1994b).

Cilj ovog rada bio je ispitati mogući antagonistički učinak kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46 na rast uropatogenog soja *Candida albicans*. Osnovna hipoteza u ovom radu bila je da fermentirano kozje mlijeko ima različit stupanj inhibicijskog djelovanja na rast *Candida albicans* u odnosu na kravlje mlijeko. Svega nekoliko studija u zadnjih 5 godina bavilo se *in vitro* i *in vivo* djelovanjem probiotika na kvasce roda *Candida*, ali vrlo malo djelovanjem fermentiranog mlijeka na njen rast. Nadalje, znanstveno uopće nije dokumentirano djelovanje kozjeg mlijeka fermentiranog probioticima na *in vitro* rast *Candida albicans*. Općenito, vrlo su oskudni znanstveno dokumentirani podatci o antagonističkom djelovanju fermentiranog kozjeg mlijeka na patogene mikroorganizme iz probavnog i urogenitalnog trakta.

Materijali i metode

Candida albicans izolirana je izravno iz cerviksa 41 pacijentice s dijagnosticiranom bakterijskom vaginozom (BV) ili kvašćevim vaginitisom (KV).

Izolacija *Candida albicans*

Nakon uzimanja brisa cerviksa, determinacija i određivanje broja kolonija (CFU/g) *C. albicans* rađeno je na kromogenom URI SELECT-4 agaru, nakon inkubacije 48 sati na 37 °C. Na kromogenom URI SELECT-4 agaru nalazila se miješana mikroflora cerviksa. Čista kultura *Candida* iz miješane mikroflore sterilnom mikrobiološkom ezom za potrebe ispitivanja precijepljena je na selektivni Sabouraud Dextrose agar (BIOLIFE, Italy).

Fermentacija kozjeg i kravljeg mlijeka

Za fermentaciju korišteno je komercijalno UHT kozje i kravlje mlijeko s 3,2% mliječne masti. Prosječan kemijski sastav kozjeg i kravljeg mlijeka određen je na uređaju MILKOSCAN FT 120 (FOSS ELECTRIC, Danska). Analiziran je sastav 30 uzoraka kozjeg i 30 uzoraka kravljeg mlijeka. Prosječni kemijski sastav kozjeg i kravljeg mlijeka prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1: Kemijski sastav ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) i kiselost kozjeg i kravljeg mlijeka

Table 1: Chemical composition ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) and acidity of the cow and goat milk

Sastav i kiselost Composition and acidity	Kozje mlijeko Goat milk			Kravlje mlijeko Cow milk		
	\bar{x}	Raspon Range	SD	\bar{x}	Raspon Range	SD
Suha tvar Total solids	11,45	11,26-11,91	0,128	11,40	11,35-11,44	0,026
Pepeo / Ash	0,79	0,76-0,89	0,039	0,72	0,69-0,73	0,014
Mliječna mast Milk fat	3,20	3,20	-	3,20	3,20	-
Laktoza / Lactose	4,24	4,20-4,34	0,037	4,91	4,87-4,96	0,026
Proteini / Proteins	3,05	2,85-3,21	0,085	3,08	3,01-3,17	0,039
Kiselost / Acidity	pH = 6,55 8,05 °SH	pH = 6,49-6,67 7,85-8,26 °SH	0,088 0,131	pH = 6,64 7,23 °SH	pH = 6,60-6,69 7,16-7,32 °SH	0,061 0,047

SD – standardna devijacija / SD – standard deviation

\bar{x} - Srednja vrijednost / \bar{x} - Mean value

Za fermentaciju kozjeg i kravljeg mlijeka korištena je Direct Vat Set (DVS) kultura *Bifidobacterium longum* Bb-46 (Chr. Hansen, Denmark). Fermentacija se odvijala na 37 °C kroz 25 sati.

Analize tijekom fermentacije

pH vrijednost kozjeg i kravljeg mlijeka određivana je uređajem MA 235, pH/Ion Analyzer (METTLER TOLEDO) svakih 5 sati fermentacije. Broj bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 (CFU/mL) određivan je na modificiranom Bifidobacterium agaru (prema Deutche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). Bifidobacterium agar je modificiran dodatkom 13,5 g/100 mL Agar Bacteriological (Agar Bios Special LL, biolife, Italy) i 3 g/100 mL LiCl. Anaerobna inkubacija provedena je u loncima upotrebom vrećica za anaerobne uvjete (Anaerocult A, MERCK KgaA, Germany), na temperaturi od 37 °C kroz 48 sati.

In vitro određivanje stupnja inhibicije rasta *Candida albicans*

Za određivanje utjecaja fermentiranog mlijeka na rast test mikroorganizma pripravljena je suspenzija izoliranih stanica *Candida albicans* u sterilnoj fiziološkoj otopini, razrjeđenja 10^{-6} . Kontrolni uzorak pripremljen je prijenosom 0,1 mL inokuluma suspenzije stanica na Sabouraud Dextrose agar. Postupak naciepljivanja suspenzijom stanica test mikroorganizma ponovljen je radi određivanja inhibicije fermentiranim mlijekom, gdje je nakon razmazivanja inokuluma po površini podloge za uzgoj, u Petrijevu zdjelicu prenesen i 0,1 mL fermentiranog mlijeka. Fermentirano mlijeko je sterilnim staklenim štapićem razmazano po površini podloge za uzgoj, naciepljene suspenzijom test mikroorganizma. Za ispitivanje utjecaja kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog s *Bifidobacterium longum* Bb-46 na rast *Candida albicans*, svakih 5 sati fermentacije uziman je 0,1 mL uzorka mlijeka i prenesen na podlogu naciepljenu test mikroorganizmom. Tako priređene ploče s agarom inkubirane su 48 sati na temperaturi 37 °C. Broj živih mikroorganizama određen je na osnovi broja kolonija poraslih na podlozi, a prema izrazu (Duraković, 1996.):

$$\text{CFU / mL} = \frac{N \cdot r}{V} \quad (1);$$

gdje je CFU/mL = Colony Forming Units / broj živih stanica koje tvore kolonije, N = broj poraslih kolonija, r = recipročna vrijednost razrjeđenja i V = volumen uzorka.

Test osjetljivosti na prisutnost antibiotika i fermentiranog mlijeka

Test osjetljivosti na prisutnost antibiotika rađen je prema standardnoj Kirby – Bauer metodi na Mueller – Hinton agaru. Uzorci fermentiranog mlijeka centrifugirani su na 222 x g kroz 10 minuta na temperaturi od 6 °C (Multifuge 3 L-R, Heraeus). Čisti supernatant je nanesen na površinu diskova za antibiogram test (diametar 12,7 mm; Schleicher & Schleicher, Germany). Diskovi su postavljani na ploče s Mueller – Hinton agarom inokuliranim s *Candida albicans*. Ploče su inkubirane na 37 °C kroz 24 sata, nakon čega su mjereni dijametri zona inhibicije.

Statistička obrada

Svi rezultati mjerenja statistički su obrađeni metodom deskriptivne statistike na nivou značajnosti 95% (Descriptive statistics, EXCEL 2000). Usporedba kretanja pH vrijednosti i CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46

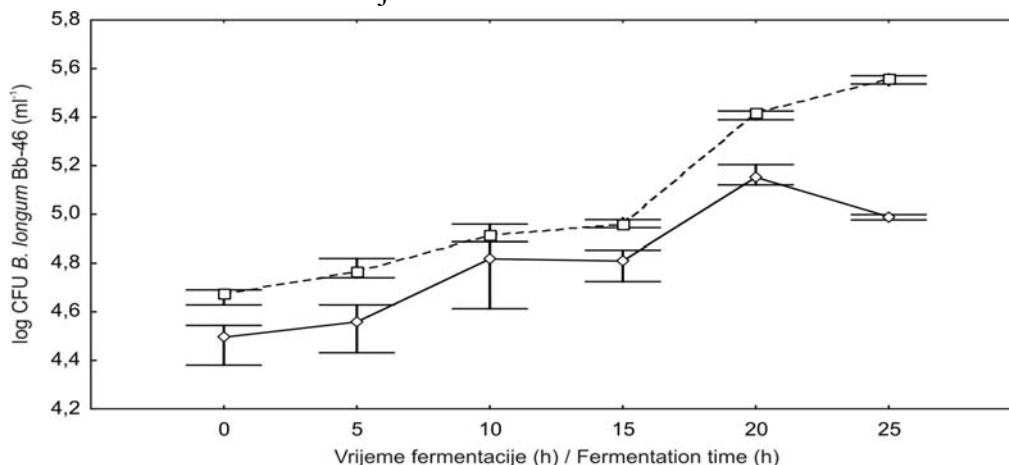
tijekom fermentacije između kozjeg i kravljeg mlijeka rađena je pomoću ANOVE (Two factors without replication, EXCEL 2000.).

Korelacije stupnja inhibicije s pH vrijednosti i CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46 rađene su metodom nelinearne regresije (Fixed Nonlinear Regression) modelom Multiple regresije u programu STATISTICA 6.0. Zavisna varijabla u modelu bila je stupanj inhibicije (Y). Nezavisne varijable bile su pH vrijednost (V1) i CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46 (V2). Model je postavljen kao $Y = f(Y, V1, V2)$. Za proračun parcijalnih koeficijenata korelacije korištene su sljedeće transformacijske funkcije: Y, Y^2 , V1, $V1^2$, $\ln(V1)$, $SS/N(V1)$, V2, $V2^2$, $\ln(V2)$, $SS/N(V2)$; gdje je SS/N = metoda najmanjih kvadrata.

Za statističku obradu rezultata mikrobioloških mjerenja korišten je koeficijent varijacija (CV) (Shelley i sur., 1987.).

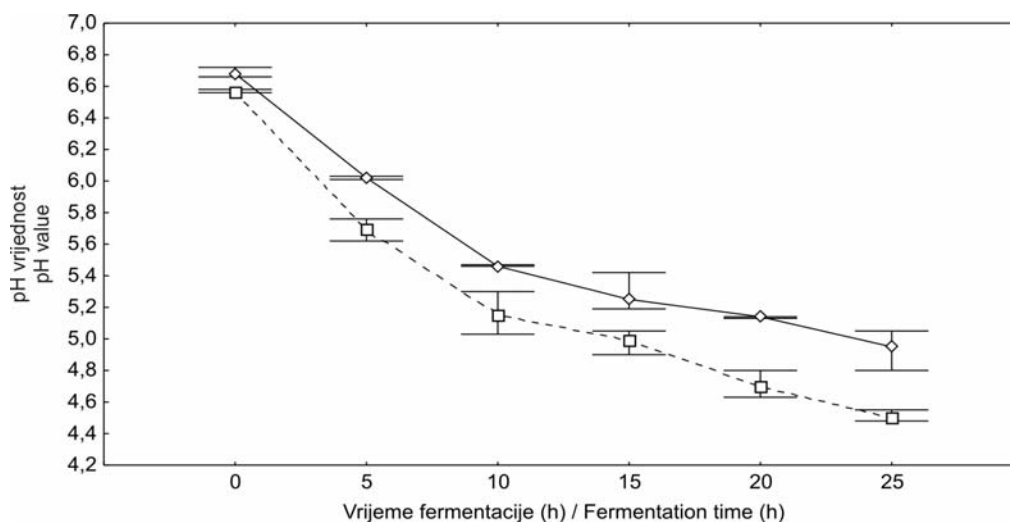
Rezultati i rasprava

Podatci na slici 1 ukazuju na jasnu razliku u tendenciji rasta probiotičke bakterije *Bifidobacterium longum* Bb-46 u kozjem u odnosu na kravlje mlijeko. Rezultati dobiveni ANOVA-om u tablici 2 pokazuju da je ta razlika bila i statistički visoko značajna.



Slika 1: Promjene CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46 tijekom fermentacije kozjeg (---□---) i kravljeg (—◇—) mlijeka (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Fig. 1: Changes in CFU of *Bifidobacterium longum* Bb-46 during the fermentation of goat (---□---) and cow (—◇—) milk (the mean ± standard deviation)



Slika 2: Promjene pH vrijednosti tijekom fermentacije kozjeg (--□--) i kravljeg (—◇—) mlijeka (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

Fig. 2: Changes in pH values during the fermentation of goat (--□--) and cow (—◇—) milk (the mean ± standard deviation)

Tablica 2: Analiza varijance podataka iz slika 1 i 2 (ANOVA – dvostruka analiza bez ponavljanja)

Table 2: Analysis of variance for data in Figs. 1 and 2 (ANOVA - Two factors without replication)

Izvor varijacija Source of variation	F _{izračunato} F _{calculated}	P _{vrijednost} P _{value}	F _{kritično} F _{critical}
A	36,68	<0,001	2,97
B	34,24	<0,001	4,96
C	148,10	0,065	5,05
D	44,34	0,017	6,61

A - pojedinačne razlike po satima fermentacije (pH vrijednost)

A - single variations by each hour of the fermentation (pH value)

B - ukupna razlika između kozjeg i kravljeg mlijeka (pH vrijednost) tijekom inkubacije

B - difference between fermented goat and cow milk (pH value)

C - pojedinačne razlike po satima fermentacije (CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46)

C - single variations by each hour of the fermentation process (CFU of *Bifidobacterium longum* Bb-46)

D - ukupna razlika u rastu *Bifidobacterium longum* Bb-46 između kozjeg i kravljeg mlijeka

D - total difference in *Bifidobacterium longum* Bb-46 growth between goat and cow milk

Do 15. sata, porast broja bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 bio je u kozjem i kravljem mlijeku u sličnim relacijama. Nakon 15. sata fermentacije, porast broja *B. longum* Bb-46 bio je osjetno veći u kozjem mlijeku nego u kravljem. Nakon 25 sati fermentacije u kozjem je mlijeku zabilježen 1,651 log (75,6%) veći broj stanica *Bifidobacterium longum* Bb-46 nego u kravljem.

Analogno bržem rastu *B. longum* Bb-46, u kozjem mlijeku kretale su se i pH vrijednosti kozjeg i kravljeg mlijeka. Nakon 25 sati fermentacije bakterijom *B. longum* Bb-46, u kozjem se mlijeku pH vrijednost spustila ispod izoelektrične točke kazeina (pH= 4,6), a u kravljem mlijeku nije (slika 2).

Ukupno, usporedba parametara tijekom fermentacije pokazuje veću fermentacijsku aktivnost *Bifidobacterium longum* Bb-46 u kozjem mlijeku u odnosu na kravlje. Iako postoje određeni znanstveni podaci o sposobnosti rasta bakterija mliječne kiseline (prije svega jogurtnih) u kozjem mlijeku (Alichandis i Polychroniadou, 1997.), vrlo malo istraživanja bavilo se sposobnošću rasta probiotičkih bakterija (osobito bifidobakterija) u kozjem mlijeku (Božanić i Tratnik, 1998.).

Tablica 3: Inhibicija rasta test mikroorganizma *Candida albicans* kozjim mlijekom fermentiranim s *Bifidobacterium longum* Bb-46

Table 3: Inhibition of growth of *Candida albicans* by goat milk fermented with *Bifidobacterium longum* Bb-46

Vrijeme fermentacije (h) Fermentation time (h)	⁽¹⁾ <i>C. albicans</i> CFU (mL ⁻¹)	Kontrolni CFU <i>C. albicans</i> (mL ⁻¹) Control CFU of <i>C. albicans</i> (mL ⁻¹)	Inhibicija (%) Inhibition (%)	Broj ponavljanja Number of replicates	CV (%)
0	4,40 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	26,66	5	7,55
5	3,32 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	44,66	5	11,28
10	3,40 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	43,33	5	9,11
15	6,14 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁸	48,83	5	7,07
20	8,70 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁸	27,50	5	8,66
25	9,42 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁸	21,54	5	6,66

⁽¹⁾ – izmjereni broj uz dodatak fermentiranog mlijeka

⁽¹⁾ – measured number with addition of fermented milk

Iako se u mnogim istraživanjima u posljednjih 5 godina ističe moguća preventivna uloga primjene probiotika u sprječavanju kandidoza i ublažavanju tegoba koje one izazivaju, znanstvena potvrda na ovom polju još je vrlo ograničena, a rezultati mikrobioloških studija oprečni. Rezultati dobiveni ovim radom zapravo su doprinos *in vitro* ispitivanjima inhibicije rasta kvasca *Candida albicans* primjenom probiotika.

Tablica 4: Inhibicija rasta test mikroorganizma *Candida albicans* kravljim mlijekom fermentiranim s *Bifidobacterium longum* Bb-46

Table 4 : Inhibition of *Candida albicans* growth by cow milk fermented with *Bifidobacterium longum* Bb-46

Vrijeme fermentacije (h) Fermentation time (h)	⁽¹⁾ <i>C. albicans</i> CFU (mL ⁻¹)	Kontrolni CFU <i>C. albicans</i> (mL ⁻¹) Control CFU of <i>C. albicans</i> (mL ⁻¹)	Inhibicija (%) Inhibition (%)	Broj ponavljanja Number of replicates	CV (%)
0	5,66 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	5,66	5	12,28
5	5,12 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	14,68	5	6,56
10	4,97 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	17,25	5	11,5
15	1,05 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	12,50	5	4,76
20	1,04 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	12,97	5	12,06
25	1,1 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁸	7,94	5	5,89

⁽¹⁾ – izmjereni broj uz dodatak fermentiranog mlijeka

⁽¹⁾ – measured number with addition of fermented milk

Broj kolonija *Candida albicans* prilikom istraživanja najčešće je bio ispod 50, što rezultate ispitivanja čini statistički upitnima. Stoga su i relativno visoke izračunate vrijednosti CV u većini slučajeva. Ipak, može se reći da su ukupni rezultati ispitivanja s kvascem *Candida albicans* dosta indikativni, jer očigledno pokazuju jači inhibicijski potencijal fermentiranog kozjeg u odnosu na kravlje mlijeko. Uzorci kozjeg mlijeka jače su inhibirali rast kvasca *Candida albicans* tijekom cijelog trajanja fermentacije. Da je razlika u stupnju inhibicije rasta *Candida albicans* između fermentiranog kozjeg i kravljeg mlijeka i statistički značajna pokazuju rezultati ANOVE u tablici 5.

Ukoliko se podatci u tablicama 3 i 4 usporede s podacima na slici 1 i 2, očigledno je da niti kod jedne vrste mlijeka nema korelacije stupnja

Tablica 5: Analiza varijanse podataka u tablicama 3 i 4 (odnos inhibicijskih učinaka fermentiranog kozjeg i kravljeg mlijeka, ANOVA – dvostruka analiza bez ponavljanja)

Table 5: Analysis of variance for data in Tables 3 - 4 (comparison of inhibitory effect between goat and cow milk by the use of ANOVA, two factors without replication)

Izvor varijacija Source of variation	SS	Df	MS	F _{izračunato} F _{calculated}	P _{vrijednost} P _{value}	F _{kritično} F _{critical}
A	7,66 x 10 ¹⁵	5	1,53 x 10 ¹⁵	23,48631	0,001752	5,050339
B	1,27 x 10 ¹⁵	1	1,27 x 10 ¹⁵	19,50731	0,006913	6,607877
Anal. greška	3,26 x 10 ¹⁴	5	6,52 x 10 ¹³			
Ukupno	9,26 x 10 ¹⁵	11				

A = pojedinačne varijacije po svakom satu procesa fermentacije

A = single variations by each hour of the fermentation process

B = razlika u ukupnom inhibicijskom učinku između kozjeg i kravljeg mlijeka fermentiranog ABT-2 kulturom

B = difference in overall degree of inhibition between fermented goat and cow milk

inhibicije s kretanjem pH vrijednosti i CFU *Bifidobacterium longum* Bb-46 tijekom fermentacije. Uzorci kozjeg mlijeka s manjim brojem bakterija *Bifidobacterium longum* Bb-46 i osjetno višom pH vrijednosti (fermentirani 5, 10 i 15 sati) osjetno su jače inhibirali rast *Candida albicans* u usporedbi s uzorcima fermentiranim 20 i 25 sati. Slično vrijedi i za kravlje fermentirano mlijeko. Rezultati Multiple regresije u tablici 6 pokazuju da nije bilo nikakve funkcionalne ovisnosti stupnja inhibicije s pH vrijednosti i brojem bifidobakterija u kozjem i kravljem mlijeku. Ovo odudara od uvriježenih teorija da je pH vrijednost ili broj probiotika u fermentiranom mlijeku glavni čimbenik antagonističkog djelovanja, a sugerira važnu ulogu i nekih drugih produkata fermentacije, kao i njihovo sinergističko djelovanje. Slične rezultate s uropatogenim sojevima *E. coli* navode Slačanac i sur. (2004a).

Vjerojatno je najbolji pokazatelj mogućnosti inhibicijskog djelovanja test antibiograma. Podatci u tablici 7 pokazuju da je i ovim testom nešto jače izražen inhibicijski potencijal fermentiranog kozjeg mlijeka. Općenito, na temelju rezultata ovog testa može se zaključiti da fermentirano kozje i kravlje mlijeko osjetno slabije inhibiraju rast *Candida* u usporedbi s nekim patogenim bakterijama u prethodnim radovima (Slačanac i sur., 2004a; Slačanac i sur., 2004b).

Tablica 6: Utjecaj pH vrijednosti (V1) i CFU (V2) u kozjem i kravljem mlijeku fermentiranim s *Bifidobacterium longum* Bb-46 na stupanj inhibicije rasta test bakterije *Candida albicans* (vaginalis) – Statistička analiza (Fixed Nonlinear Regression, Multiple Regression)

Table 6: Influence of pH values (V1) and CFU (V2) in goat and cow milk fermented with *Bifidobacterium longum* Bb-46 on the degree of inhibition of *E. coli* growth – statistical analysis (Fixed Nonlinear Regression, Multiple Regression).

	Transformacijska funkcija Transformation function	R ²	Parcijalne korelacije Partial correlation	Semiparcijalne korelacije Semipartial correlation
Kozje mlijeko fermentirano s <i>B. longum</i> *	V1 linearno	0,740	0,683	0,656
	V2 linearno	0,740	0,518	0,424
	V1 ²	0,999	0,372	0,261
	SS/N (V1)	0,999	-0,387	-0,272
Goat milk fermented with <i>B. Longum</i> *	ln (V1)	0,999	-0,392	-0,275
	V2 ²	0,999	0,043	0,030
	SS/N (V2)	0,999	-0,052	-0,036
	ln (V2)	0,999	-0,055	-0,038
Kravlje mlijeko fermentirano s <i>B. longum</i> ** Cow milk fermented with <i>B. longum</i> **	V1 linearno	0,784	0,236	0,231
	V2 linearno	0,784	0,122	0,117
Regresijska statistika: Regression statistics:	* R ² = 0,722; ε = 7,003; p = 0,086 ** R ² = 0,089; ε = 30,22; p = 856 (** ne postoji funkcionalna povezanost) (** none functional correlation exists)			

Rezultati testa antibiograma poklapaju se s rezultatima ispitivanja mikrobiološkom *in vitro* metodom, jer su ovdje također jedine zone inhibicije zabilježene za polufermentirane uzorke (12 sati) kozjeg i kravljeg mlijeka.

Tablica 7: Rezultati testa osjetljivosti na *Candida albicans* na kozje i kravlje mlijeko fermentirano s *Bifidobacterium longum* Bb-46

Table 7: Results of antibiotic sensitivity tests of *Candida albicans* to goat and cow milk fermented with *Bifidobacterium longum* Bb-46

Disk Disc	Zona inhibicije (mm) Inhibition zone (mm)			
	Kozje mlijeko Goat milk		Kravlje mlijeko Cow milk	
	\bar{X}	SD*	\bar{X}	SD*
Nefermentirani uzorci Unfermented samples	-	-	-	-
Uzorci nakon 12 h fermentacije Samples after 12 h fermentation	2,3	0,12	1,9	0,17
Uzorci nakon 24 sata fermentacije Samples after 24 h fermentation	-	-	-	-

- nema inhibicije / no inhibition

* SD od 5 ponavljanja / SD of 5 replicates

Zaključak

Bifidobacterium longum Bb-46 brže je rastao u kozjem mlijeku nego u kravljem, uz istovremeno brži pad pH vrijednosti. Kozje mlijeko fermentirano probiotičkom bakterijom *Bifidobacterium longum* Bb-46 imalo je jači inhibicijski potencijal na rast *Candida albicans* od kravljeg fermentiranog mlijeka ($P < 0,001$). Nije bilo nikakve korelacije stupnja inhibicije rasta *Candida albicans* s brojem bifidobakterija i pH vrijednosti kozjeg i kravljeg mlijeka. Najveći inhibicijski potencijal imali su polufermentirani uzorci, što je potvrđeno rezultatima testa osjetljivosti kvasca *Candida albicans* na prisutnost fermentiranog kozjeg i kravljeg mlijeka.

INHIBITORY EFFECT OF GOAT AND COW MILK FERMENTED WITH BIFIDOBACTERIUM LONGUM Bb-46 ON GROWTH OF UROPATHOGENIC CANDIDA ALBICANS

Summary

This study was carried out to determine the antagonistic influence of goat and cow milk fermented with *Bifidobacterium longum* Bb-46 on uropathogenic *Candida albicans* strain. The hypothesis of this study was that fermented goat milk could have possible stronger inhibitory effect on the growth of uropathogenic yeast *Candida albicans* than fermented cow milk. The

correlation between the inhibitory effect and the time of fermentation (number of viable *Bifidobacterium longum* Bb-46 cells and pH of fermented milk) was also determined. The obtained results have shown considerably higher inhibitory effect of fermented goat milk on the growth of *Candida albicans* compared with fermented cow milk. There was no significant correlation between number of *Bifidobacterium longum* Bb-46 cells in fermented and the inhibitory effect; as well as between changes in pH during fermentation and inhibitory effect of fermented goat or cow milk.

Key words: *Bifidobacterium longum* Bb-46, *Candida albicans*, fermented goat and cow milk, inhibitory effect

Reference

- ALICHANDIS, E., POLYCHRONIADOU, A. (1997.): Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view, *Sheep Dairy News* **14**, 11-18.
- BICKERSTAFFE, R., NOAKES, D. E., ANNISON, E. F. (1972.): Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans- isomers of octadecanoat and linoleat, *Biochem. J.* **13**,: 607-612.
- BOŽANIĆ, R., TRATNIK, Lj. (1998.): Cows and goats fermented Bifido milk, *Food Technol. Biotechnol.* **39**, 109-114.
- DURAKOVIĆ, S. (1996.): *Primjenjena Mikrobiologija*, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb.
- ELAHI, D., PANG, G., CLANCY, R. (2003.): Development of surrogate markers for oral immunization against *Candida albicans*, *Vaccine* **21**, 671-677.
- HAENLEIN, G. F. W. (2004.): Goat milk in human nutrition, *Small Rumin. Res.* **51**, 155-163.
- JUAREZ TOMAS, M. S., BRU, E., NADER-MACIAS, M. E. (2003.): Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **188**, 35-44.
- KLEABANOFF, S. (1991.): Control of the microbial flora of the vagina, *J. Inf. Dis.* **164**, 94-100.
- KOSS, L. G., PAPANICOLAOU, G. (2000.): Vaginal infections, *Citopathol.* **11**, 355-379.
- MEHAIA, M. A. (1995.): The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk, *Milchwissenschaft* **50**, 260-269.
- MENDALL, M. A., MAXWELL, P., KUMAR, D. (1998.): Antibiotic use and irritable bowel syndrome, *Gastroenterol.* **114**, 3298-3307.
- PARK, Y. W. (1994a): Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk, *Small Rumin. Res.* **14**, 151-159.

- PARK, Y. W. (1994b): Nutrient and mineral composition of commercial US goat milk yoghurts, *Small Rumin. Res.* **13**, 67-70.
- PARK, Y. W., ATTAIE, R. (1986.): Comparison of buffering capacity of goat milk with cow milk, commercial soy base infant formula, *J. Dairy Sci.* **69**, 193-199.
- PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P. AND KLEIN D. A. (ured.) (1996.): *Microbiology*, 3rd Ed., Wm. C. Brown Publishers, Guilford, CT.
- REID, G., BRUCE, A. W. (2001.): Selection of *Lactobacillus* for urogenital probiotic applications, *J. Infect. Dis.* **183**, 77-83.
- REID, G., BURTON, J. (2002.): Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria, *Microbes Inf.* **4**, 319-324.
- REID, G., ZALAI, C., GARDINER, G. (2001.): Urogenital lactobacilli probiotics, reliability and regulatory issues, *J. Dairy Sci.* **84**, 164-169.
- SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. (2000.): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *J. Biotechnol.* **84**, 197-215.
- SHELLEY, A. W., DEETH, H. C., MACRAE, I. C. (1987.): A numerical taxonomic study of psychotropic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk, *J. Appl. Bact.* **62**, 97-103.
- SLAČANAC, V., HARDI, J., PAVLOVIĆ, H., VUKOVIĆ, D., ČUTIĆ, V. (2004a): Inhibitory effect of goat and cow milk fermented by ABT-2 culture (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Streptococcus thermophilus*) on the growth of some uropathogenic *E. coli* strains, *Ital. J. Food Sci.* **16**, 209-220.
- SLAČANAC, V., HARDI, J., ČURŽIK, D. PAVLOVIĆ, H., JUKIĆ, M. (2004b): Production of antibacterial organic acids during the fermentation of goat and cow milk with *Bifidobacterium longum* Bb-46, *Acta Alimentaria* **33**, u tisku.
- WINNE A. G., McCARTNEY, A. L., BROSTOFF, J., HUDSPITH, B. N., GIBSON, G. R. (2004.): An in vitro assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concomitant isolation of a *Lactobacillus plantarum* with anti-*Candida* activities, *Anaerobe* **10**, 165-169.
- ZAPICO, P., GAYA, P., DE PAZ, M., NUNEZ M., MEDINA M. (1991.): Influence of breed, animal, and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk, *J. Dairy Sci.* **74**, 783-792.

Adrese autora – Author's addresses:

Dr. sc. Vedran Slačanac

Prof. dr. sc. Jovica Hardi

Mr. sc. Hrvoje Pavlović

Mirela Lučan, dipl. ing.

Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera, Osijek

Mato Vlainić, dipl. ing.

MEGGLE Osijek d.d., Osijek

Prispjelo – Received: 12. 01. 2005.

Prihvaćeno – Accepted: 02. 02. 2005.