



**UNIVERZITET U NOVOM SADU**

Tehnološki fakultet Novi Sad

**OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKOG PROCESA  
PROIZVODNJE NAPITAKA OD ENZIMSKI  
HIDROLIZOVANOG PERMEATA MLEKA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Mentor:

**Prof. dr Spasenija Milanović**

Kandidat:

**Dragana Ilić-Udovičić, dipl. inž. spec.**

Novi Sad, 2015. godina

## ZAHVALNICA

*Želim da se zahvalim svom mentoru prof. dr Spaseniji Milanović na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, podršci i angažovanju u svim fazama izrade doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem docentu dr Mireli Iličić na ogromnoj pomoći kako u eksperimentalnom radu tako i u obradi podataka, ali i na stručnim savetima.*

*Zahvaljujem se svim članovima komisije na korisnim sugestijama i savetima tokom izrade doktorske disertacije.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem kolegama sa Katedre za Tehnologije konzervisane hrane, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, kao i kolegama sa Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, koji su mi omogućili da deo svojih istraživanja izvedem u njihovim laboratorijama.*

*Posebno se zahvaljujem i dragim kolegama iz mlekare A.D. „Mlekara“ Šabac koji su mi obezbedili uzorke mleka i permeata, kao i stručnu pomoć.*

*Zahvaljujem se svojoj porodici, suprugu Draganu, roditeljima i bratu, za svu podršku, ljubav, strpljenje i razumevanje. Takođe se zahvaljujem i svim ostalim kolegama i prijateljima, koji su mi, na bilo koji način, pomogli da završim ovu doktorsku disertaciju.*

*Dragana Ilić-Udovičić*

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	<b>Dragana Ilić-Udovičić</b>
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Spasenija Milanović, redovni profesor
Naslov rada: NR	<b>Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje napitaka od enzimski hidrolizovanog permeata mleka</b>
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 6, stranica 108, slika 36, tabela 29, referenci 175
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Permeat, $\beta$ –galaktozidaza, enzimska hidroliza laktoze, napici od hidrolizovanog permeata, kvalitet, matematičko modelovanje

UDK	637.13:637.345:66.011 (043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Valorizacija permeata kao sporednog proizvoda industrije mleka je od izuzetnog ekološkog, ekonomskog i tehnološkog značaja.</p> <p>Cilj doktorske disertacije je razvoj tehnološkog procesa prerade permeata, kao sporednog proizvoda dobijenog nakon ultrafiltracije mleka tokom proizvodnje feta sira i svežeg („mladog“) sira. Ispitana je mogućnost enzimске hidrolize laktoze u permeatu korišćenjem enzima <math>\beta</math>-galaktozidaze izolovanog iz <i>Kluyveromyces lactis</i> u koncentraciji 0,1; 0,3 i 0,5 g/100g na temperaturama 20°, 30° i 40° C. Praćene su promene sadržaja laktoze, D-galaktoze i D-glukoze u vremenskim intervalima tokom 60 minuta. Posebna faza istraživanja obuhvatila je matematičko modelovanje i kinetiku procesa hidrolize laktoze u permeatu pod dejstvom <math>\beta</math> - galaktozidaze i primenu hidrolizovanog permeata u proizvodnji mlečnih napitaka po odabranoj formulaciji. Predložen je tehnološki proces proizvodnje napitka na bazi hidrolizovanog permeata sa dodatkom voćnih baza. Utvrđeni su parametri kvaliteta i trajnosti napitaka tokom 60 dana skladištenja.</p> <p>Na temperaturi 40° C dodatkom enzima <math>\beta</math> - galaktozidaze u koncentraciji 0,1 g/100g za 60 minuta postiže se 100 % stepen hidrolize prisutne laktoze u permeatu. Sa većom koncentracijom enzima, 0,3 g/100g odnosno 0,5 g/100g, na istoj temperaturi, isti efekat se postiže za 20 minuta.</p> <p>Ispitivanjem kinetike hidrolize laktoze potvrđena je kinetika prvog reda. Generalno posmatrano visoki koeficijenti determinacije pokazuju dobro poklapanje eksperimentalnih rezultata i matematičkog modela reakcije prvog reda. Vrednosti se kreću od 0,974 (temperatura 20° C) do preko 0,990 (na temperaturama 30° C i 40° C) pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g.</p> <p>Proizvedeni napici od hidrolizovanog permeata su delaktozirani i ne sadrže mlečnu mast. Od ukupnih šećera u svim napicima više od 50 % čini glukoza: 50,16 % - napitak</p>

	<p>šumsko voće, 50,42 % - napitak pomorandža /šargarepa, 54,65 % - napitak multivitamin, odnosno 55,13 % - napitak crveno voće.</p> <p>Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje imao je napitak sa dodatkom voćne baze multivitamin 0,3972 mg/100g, zatim šumsko voće 0,2887 mg/100g i pomorandža/šargarepa 0,1999 mg/100g.</p> <p>Najveću vrednost antioksidativne aktivnosti nakon proizvodnje pokazali su uzorci napitka sa multivitaminom i šumskim voćem. Tokom perioda skladištenja dolazi do smanjenja DPPH vrednosti. Najmanji pad je u napitku sa pomorandžom/šargarepom (smanjenje za 17 %), a najveći u napitku sa šumskim voćem (za 39 %). Analizirani uzorci sadrže ukupnih polifenola u intervalu od 53,78 do 120,38 mg GAE/l u zavisnosti od vrste napitka, odnosno dodatih voćnih baza.</p> <p>Generalno može se zaključiti da se primenjenim tehnološkim procesom dobijaju napici stabilnog fizičko-hemijskog sastava tokom 60 dana skladištenja, visoke nutritivne i niske energetske vrednosti.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	22.01.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO predsednik:  član (mentor):  član:  član:  član:	Dr Marijana Carić, profesor emeritus, Univerzitet u Novom Sadu  Dr Spasenija Milanović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu  Dr Mirela Iličić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu  Dr Aleksandar Jokić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu  Dr Anamarija Mandić, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY**

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	<b>Dragana Ilić-Udovičić</b>
Mentor: MN	Dr. Spasenija Milanović, Full Professor
Title: TI	<b>Beverage processing optimization of enzyme hydrolyzed milk permeate</b>
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Physical description: PD	Chapters 6, pages 108, figures 36, tables 29, references 175
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Dairy technology
Subject, Key words SKW	Milk permeate, enzyme $\beta$ -galactosidase, enzymatic hydrolysis of lactose, beverages from hydrolyzed permeate, quality, mathematical modeling
UC	637.13:637.345:66.011 (043.3)

Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Valuation of the permeate as a by-product of the dairy industry is of great ecological, economic and technological importance.</p> <p>The aim of the PhD thesis is the development of the technological process of refining permeate, as a by-product obtained after ultrafiltration of milk during the production of feta cheese and fresh cheese. The possibility of enzymatic hydrolysis of the lactose in the permeate using the enzyme <math>\beta</math>-galactosidase isolated from <i>Kluyveromyces lactis</i> in a concentration of 0.1, 0.3 and 0.5 g / 100 g at a temperature of 20°, 30° and 40° C was examined. Changes in the content of lactose, D-galactose and D-glucose at intervals of 60 minutes were monitored. A special stage of the research included mathematical modeling and kinetics of lactose hydrolysis in the permeate under the influence of <math>\beta</math>-galactosidase and application of hydrolyzed permeate in the production of dairy products under the selected formulation. A technological process of producing a beverage on the basis of hydrolyzed permeate with the addition of fruit bases was suggested. Quality and durability parameters were determined for drinks during the 60 days of storage.</p> <p>Addition of the enzyme <math>\beta</math>-galactosidase at a concentration of 0.1 g /100 g for 60 minutes at a temperature of 40° C a 100 % degree of hydrolysis of lactose is achieved, present in the permeate. With a higher concentration of enzyme, 0.3 g /100 g or 0.5 g /100g, at the same temperature, the same effect can be achieved in 20 minutes.</p> <p>By examining the kinetics of lactose hydrolysis the first order kinetics was confirmed. Generally high coefficients of determination show good correspondence between the experimental results and the mathematical model of the first order reaction. Values range from 0.974 (at a temperature of 20° C) up to over 0.990 (at temperatures 30° C and 40° C) at an enzyme concentration of 0.1g /100g.</p> <p>Beverages produced from hydrolyzed permeate are lactose-free and fat-free products. More than half of the total sugar content in all</p>

	<p>beverages consists of glucose: 50.16 % - forest fruit beverage, 50.42 % - beverage orange/carrot, 54.65 % beverage multivitamin and 55.13 % - beverage red fruit.</p> <p>The highest vitamin C content after production was in a beverage with the addition of fruit base multivitamin (0.3972 mg/100g), followed by forest fruit (0.2887 mg/100g) and orange/carrot (0.1999 mg/100g).</p> <p>Beverage samples with multivitamin and forest fruits showed the highest value of antioxidant activity after production. During the storage period there is a reduction of DPPH values. The smallest decrease was in the beverage with orange/carrot (decreased 17 %), and the biggest in the beverage with forest fruit (39 %). The content of polyphenols in analyzed samples ranges from 53.78 to 120.38 mg GAE/L depending on the type of beverage and added fruit base.</p> <p>Overall it can be concluded that the applied technological process gives beverages of stable physical and chemical content during the 60 days of storage, of high nutritional value and low energy.</p>
Accepted on Senate on: AS	22.01.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB president:  member (mentor):  member:  member:  member:	<p>Marijana Carić, Ph.D., Professor Emeritus, University of Novi Sad</p> <p>Spasenija Milanović, Ph.D., Full Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>Mirela Iličić, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>Aleksandar Jokić, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>Anamarija Mandić, Ph.D., Reserach Associate, Research Institute of Food Technology, University of Novi Sad</p>



## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>OPŠTI DEO</b> .....	<b>3</b>
<b>PERMEAT</b> .....	<b>3</b>
Dobijanje permeata - membranski procesi filtracije .....	3
Ultrafiltracija.....	6
Dijafiltracija.....	11
Reverzna osmoza .....	11
Mikrofiltracija .....	12
Nanofiltracija .....	12
<b>HEMIJSKI SASTAV PERMEATA</b> .....	<b>12</b>
<b>PRERADA PERMEATA</b> .....	<b>16</b>
Koncentrovani i sušeni proizvodi .....	17
Glukoza - galaktozni sirup .....	18
Fermentisani proizvodi .....	19
Napici od permeata.....	21
<b>LAKTOZA</b> .....	<b>24</b>
Osobine laktoze .....	26
Ravnoteža laktoze u rastvoru .....	28
Kristalizacija laktoze .....	29
Rastvorljivost laktoze .....	30
Hidroliza laktoze .....	31
Enzimaska hidroliza.....	31
Hemijska hidroliza laktoze .....	34
Intolerancija na laktozu.....	35
Primena laktoze i hidrolizovane laktoze .....	37
<b>MATERIJAL I METODI</b> .....	<b>40</b>
<b>MATERIJAL</b> .....	<b>40</b>
Permeat .....	40
Enzim .....	40
Voćni dodaci .....	40
<b>PROIZVODNJA NAPITAKA OD PERMEATA I HIDROLIZOVANOG PERMEATA</b> .....	<b>41</b>
Eksperiment I .....	41
Eksperiment II.....	42
Eksperiment III .....	44
<b>METODI</b> .....	<b>46</b>
Analiza kvaliteta mleka, permeata, voćnih dodataka, hidrolizovanog permeata i hidrolizovanog permeata.....	46
<b>REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>51</b>
<b>EKSPERIMENT I</b> .....	<b>51</b>
Karakteristike mleka, permeata i napitaka od permeata.....	51
Minerali .....	53
Vitamini .....	56
Antioksidativna aktivnost .....	57

<b>EKSPERIMENT II</b> .....	58
Hidroliza laktoze u permeatu .....	58
Matematičko modelovanje procesa enzimske hidrolize laktoze u permeatu .....	67
<b>EKSPERIMENT III</b> .....	72
Karakteristike sirovina za proizvodnju napitaka od hidrolizovanog permeata .....	72
Vitamin C .....	74
Minerali .....	74
Antioksidativna aktivnost hidrolizovanog permeata i voćnih baza .....	75
Boja hidrolizovanog permeata i voćnih baza .....	76
Kvalitet napitaka od hidrolizovanog permeata tokom skladištenja.....	78
Hemijski sastav napitaka .....	78
Minerali .....	80
Vitamin C .....	82
Antioksidativni potencijal napitaka .....	85
Senzorna analiza napitaka .....	87
Analiza boje .....	89
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	92
<b>LITERATURA</b> .....	95

## UVOD

Primenom membranskih procesa u industriji mleka, posebno ultrafiltracije, nakon tretmana mleka ili surutke nastaje permeat kao sporedni proizvod. Obzirom na visok sadržaj laktoze, koja čini 80-85% ukupne suve materije, i prisustvo drugih komponenata (mineralnih materija, neproteinskog azota, mlečne kiseline) permeat predstavlja ozbiljan izvor zagađenja životne sredine. Stoga je valorizacija permeata od izuzetnog ekološkog, ekonomskog i tehnološkog značaja.

U svetu su razvijeni brojni procesi prerade permeata u raznovrsne komercijalne proizvode namenjene ishrani ljudi, životinja, ili se koriste kao gorivo u industriji. Preradom permeata po odabranom tehnološkom postupku primenom selektivnih metoda i tehnika kao što su: evaporacija, ultrafiltracija, demineralizacija, sušenje, hidroliza i fermentacija ili kombinacijom navedenih postupaka, dobijaju se raznovrsni proizvodi, kao što su: koncentrovani i sušeni proizvodi (permeat u prahu, demineralizovan permeat, laktoza, napici), hidrolizovana laktoza (glukoza-galaktozni sirup), fermentisani proizvodi (etanol, metan, mlečna kiselina/amonijum laktat) (Carić i Milanović, 1995; Teixeira i sar., 1983).

Glavna komponenta permeata je laktoza. Laktoza je disaharid koji se sastoji od D-glukoze i D-galaktoze. Laktoza predstavlja jedan od izvora energije potreban ljudskom organizmu i ima funkciju u apsorpciji minerala u telu. Međutim upotreba laktoze je ograničena, jer može da izazove laksativni efekat u visokoj koncentraciji, slabo je rastvorljiva i malog stepena slasti.

Za razgradnju laktoze u organizmu potreban je enzim  $\beta$ -D-galaktozidaza (laktaza). Većina svetske populacije izgubi deo aktivnosti svoje  $\beta$ -D-galaktozidaze u tankom crevu posle detinjstva. Danas se teži razvoju mlečnih proizvoda bez laktoze kako bi se zadovoljile potrebe ljudi netolerantnih na laktozu.

Enzim  $\beta$ -D-galaktozidaza je široko rasprostranjen u prirodi i može se izolovati iz različitih izvora. Sam enzim može biti animalnog, biljnog ili mikrobiološkog porekla. Jedan je od najvažnijih enzima koji se danas koriste u prehrambenoj industriji.

Cilj doktorske disertacije je razvoj tehnološkog procesa prerade permeata, kao sporednog proizvoda dobijenog nakon ultrafiltracije mleka tokom proizvodnje feta sira i

svežeg („mladog“) sira. Ispitana je mogućnost enzimске hidrolize laktoze u permeatu korišćenjem enzima  $\beta$ -galaktozidaza izolovanog iz *Kluyveromyces lactis* u koncentraciji 0,1; 0,3 i 0,5 g/100g na temperaturi 20°, 30° i 40° C. Praćene su promene sadržaja laktoze, D-galaktoze i D-glukoze u vremenskim intervalima tokom 60 minuta. Posebna faza istraživanja obuhvatila je matematičko modelovanje i kinetiku procesa hidrolize laktoze u permeatu pod dejstvom  $\beta$ -galaktozidaze i primenu hidrolizovanog permeata u proizvodnji mlečnih napitaka po odabranoj formulaciji. Predložen je tehnološki proces proizvodnje napitka na bazi hidrolizovanog permeata sa dodatkom voćnih baza. Utvrđeni su parametri kvaliteta i trajnosti napitaka.

## OPŠTI DEO

### PERMEAT

Uvođenjem membranskih procesa u industriju mleka, posebno ultrafiltracije, nakon tretmana mleka ili surutke nastaje permeat kao sporedni proizvod. Zbog visokog sadržaja laktoze, koja čini 80 - 85 % ukupne suve materije, i prisustva mineralnih materija, neproteinskog azota i mlečne kiseline permeat predstavlja ozbiljan izvor zagađenja životne sredine. Biološka potrošnja kiseonika u zavisnosti od sastava permeata varira. Permeat ako se ne prerađuje postaje veliki zagađivač životne sredine zbog visoke hemijske potrošnje kiseonika (COD) ( $57-75 \text{ g l}^{-1}$ ) (Klasnja i Sciban, 2000) i biološke potrošnje kiseonika (BOD<sub>5</sub>) ( $35-40 \text{ g l}^{-1}$ ) (Marwaha i Kennedy, 2007; Anekar i Rao, 2009). Stoga je valorizacija permeata od izuzetnog ekološkog, ekonomskog i tehnološkog značaja.

Razvojem industrijske proizvodnje sira i upotrebom ultrafiltracije nastaju velike količine permeata. Ispuštanje permeata predstavlja značajan gubitak nutritivno vredne sirovine.

#### Dobijanje permeata - membranski procesi filtracije

Membranski separacioni procesi primenjuju se u tehnologiji mleka od sedamdesetih godina prošlog veka. Primena membranskih procesa predstavlja bitnu promenu mnogih tradicionalnih tehnologija.

Membranski proces je tehnika koja koristi koncentrovanje i separaciju (razdvajanje) pojedinih komponenata u rastvorima, smešama i drugim heterogenim jedinjenjima. Delovi tečnosti se razdvajaju na osnovu njihovih molekularnih veličina i oblika, uz upotrebu pritiska i specijalno dizajniranih polupropustljivih membrana.

Pod terminom membranski separacioni proces podrazumeva se fizički proces u kojem dolazi do separiranja kroz polupropustljivu (semipermeabilnu) membranu pod dejstvom pokretačke sile (Gavarić, 1995). Membranska filtracija menja zapreminu i sastav tečnosti koja se filtrira. Nakon filtracije dobijaju se dve komponente:

- a) **retentat** – koncentrat (koncentriše se na membrani) i
- b) **permeat** – filtrat (prolazi kroz membranu).

U industriji mleka uglavnom se primenjuju sledeći procesi:

- a) reverzna osmoza (RO) – koncentrisanje uklanjanjem vode,
- b) nanofiltracija (NF) - koncentrisanje organskih komponenti uklanjanjem dela monovalentnih jona kao što je natrijum i hlor (delimična demineralizacija),
- c) mikrofiltracija (MF) - uklanjanje bakterija, odvajanje makro molekula,
- d) ultrafiltracija(UF) – koncentrisanje makro molekula,
- e) dijafiltracija (DF).

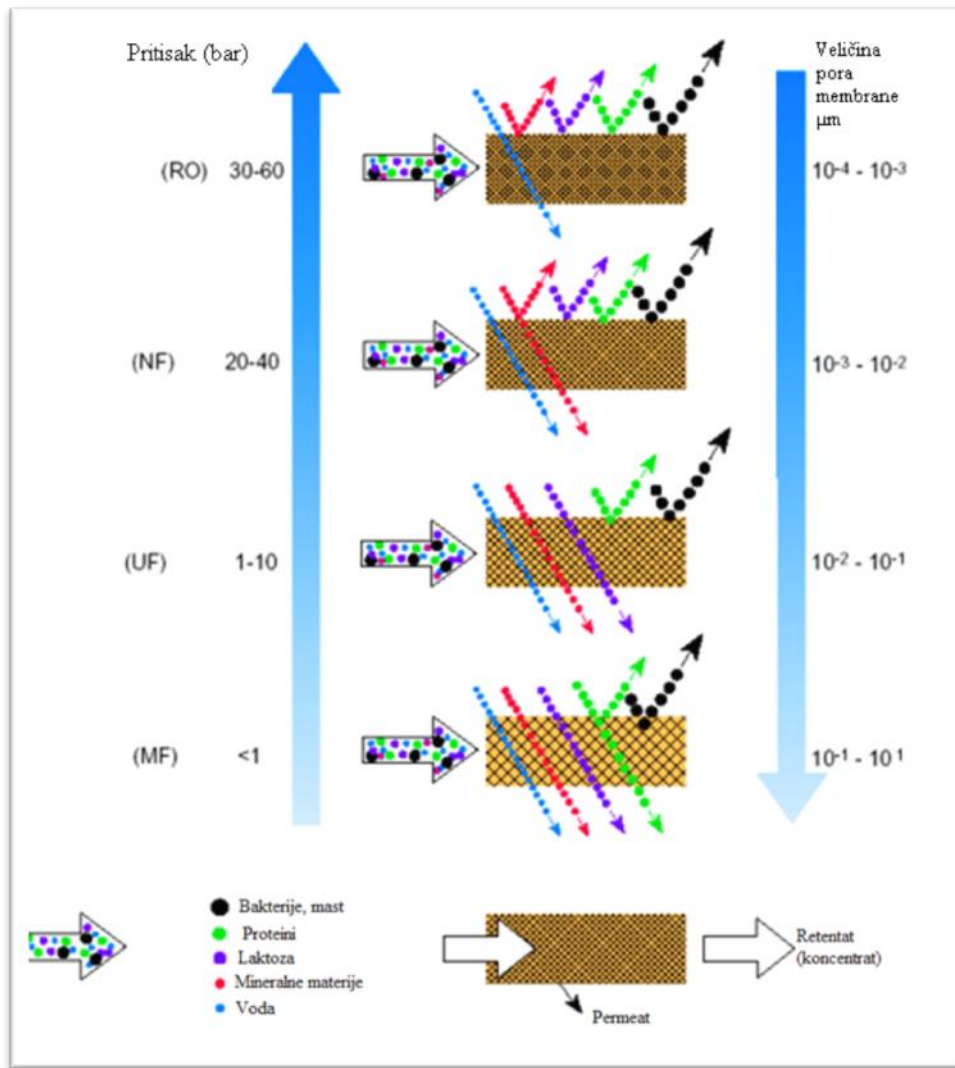
Membranski separacioni procesi u industriji mleka imaju različitu primenu:

- reverzna osmoza – za dehidratacija surutke, ultrafiltraciju permeata i kondenzata,
- nanofiltracija – za delimičnu desalinizaciju surutke, nakon ultrafiltracije permeata ili retentata,
- ultrafiltracija – obično se koristi za koncentrisanje mlečnih proteina u mleku i surutki, za standardizaciju proteina mleka namenjenog proizvodnji sira, jogurta i drugih proizvoda,
- mikrofiltracija – uglavnom se koristi za smanjenje broja bakterija u obranom mleku, surutki i slanim rastvorima, ali takođe za odmašćivanje surutke namenjene za proizvodnju koncentrata proteina surutke (Whey protein concentrates - WPC) i za frakcionisanje proteina (Bylund, 2003).

Osnovni principi različitih sistema membranske filtracije prikazani su na slici 1. Primena membranskih procesa se može kategorisati na sledeći način:

- koncentrisanje – sve komponente suve materije se zadržavaju, samo voda može da prođe kroz membranu (reverzna osmoza);
- frakcionisanje – pojedine komponente se koncentrišu, dok druge prolaze kroz membranu nepromenjene (nanofiltracija, ultrafiltracija i mikrofiltracija);
- klarifikacija – promena mutne tečnosti u bistru, uklanjanjem svih suspendovanih i mutnih čestica (ultrafiltracija i mikrofiltracija);
- sterilizacija – uklanja sve mikroorganizme iz tečnosti koja se filtrira (mikrofiltracija).

Veličina pora membrane i pritisak koji se primenjuje za separaciju ukazuje koji od pomenutih postupaka se koristi za razdvajanje (Bylund, 2003).



Slika 1. Princip membranske filtracije (Carić i sar., 2009)

Tabela 1. Karakteristike procesa membranske filtracije (Drgalić i Tratnik, 2004)

Membranski procesi	Veličina pora (μm)	Pritisak (bar)	Glavni ograničavajući faktor
Reverzna osmoza	$10^{-4} - 10^{-3}$	30-80	Osmotski pritisak
Nanofiltracija	$10^{-3} - 10^{-2}$	20-35	Osmotski pritisak
Ultrafiltracija	$10^{-2} - 10^{-1}$	1 - 10	Stvaranje gela, Koncentraciona polarizacija, Viskoznost koncentrata
Mikrofiltracija	$10^{-1} - 10^1$	<1	Kontrola transmembranskog pritiska, Začepljenje pora

Membranska filtracija (tabela 1) omogućila je koncentrisanje i frakcionisanje pojedinih komponenata mleka. Na taj način nastao je niz sasvim novih proizvoda: koncentrat proteina surutke (WPC), laktalbumin, laktoglobulin, proizvodi hidrolize surutke, permeat, laktoza, demineralizovana surutka. Pored navedenih koncentrovanih i sušenih mlečnih proizvoda, ultrafiltracija je našla i značajnu primenu u tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda i mnogih vrsta sireva.

## Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je membranski separacioni proces koji se odvija pod dejstvom pritiska (1-10 bara), pri čemu se pored rastvarača razdvajaju i pojedine komponente iz rastvora, u zavisnosti od njihove veličine i strukture (Gavarić, 1995). Veličina pora polupropustljive membrane je od 0,002-0,1  $\mu\text{m}$  (Ostojić i Karić, 2005). Kroz membranu prolaze mali molekuli, kao što su voda, laktoza i soli, a veće i složenije molekule, kao što su proteini i masti, membrana ne propušta. Na ovaj način dobija se visokomolekularna frakcija sastavljena od proteina i masti, koja se naziva **koncentrat** ili **retentat**, i niskomolekularna frakcija, koju čine voda, soli, laktoza i aminokiseline i koja se naziva **ultrafiltrat** ili **permeat**.

Pri procesima ultrafiltracije kroz membranu prolazi oko 50 % laktoze i mineralnih materija od ukupne količine koja se nalazi u separiranoj tečnosti. U zavisnosti od stepena koncentrisanja u retentatu može biti do 100 % proteina, do 100 % mlečne masti, oko 50 % laktoze i oko 50 % mineralnih materija od ukupne količine koja se nalazi u tretiranoj tečnosti (Bruhn, 2002).

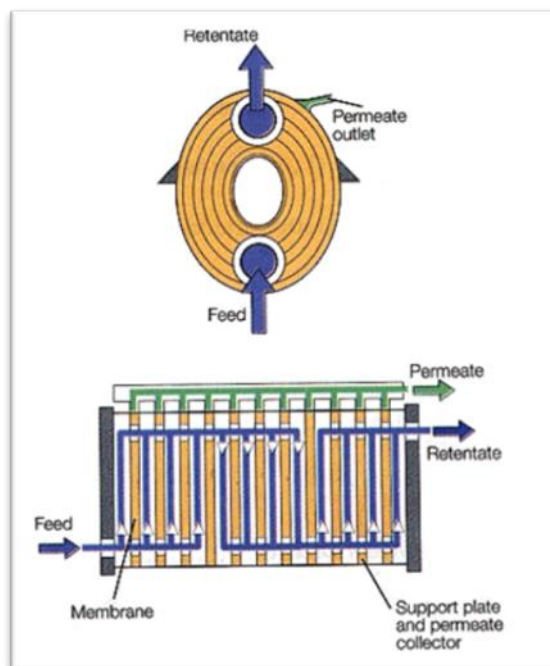
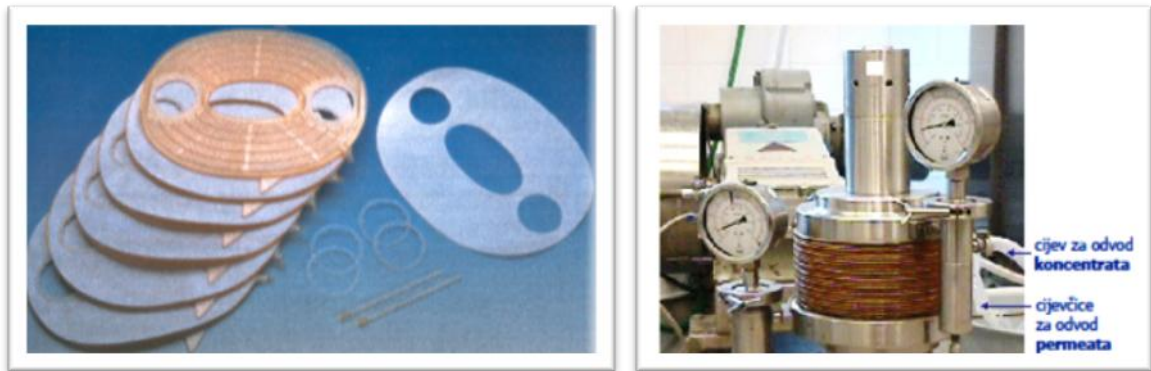
Sa aspekta tehnologije dobra membrana za ultrafiltraciju (i reverznu osmozu) treba da ima:

- oštru granicu separacije (da kvantitativno zadržava molekule koji se žele odvojiti, a druge da potpuno propušta),
- visoki protok uz što niži hidrostatički pritisak (što smanjuje troškove pogona),
- dobru postojanost - hemijsku, mehaničku, bakteriološku i termičku.

Pod dejstvom pogonske sile pojedine supstance lakše ili teže prolaze kroz membranu (Drgalić i Tratnik, 2004). Pogonska sila može da bude razlika:

- pritisaka,
- koncentracije,
- hemijskog, ili
- električnog potencijala.

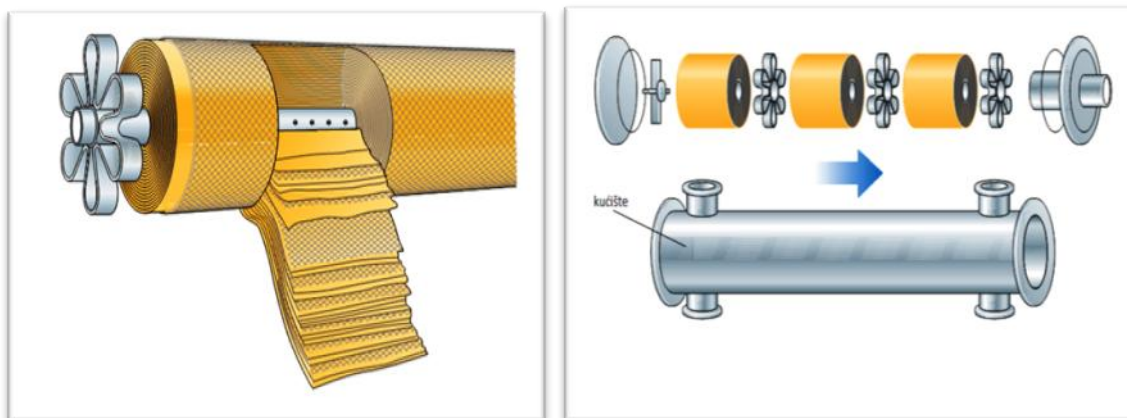




**Slika 2.** Pločasti modul u obliku filter prese (Bylund, 2003)

Modul sa membranama je glavni deo svakog membranskog procesa. Moduli ultrafiltracije su bazirani na karakteristikama membrane. U zavisnosti od modula u koje se montiraju, membrane mogu biti:

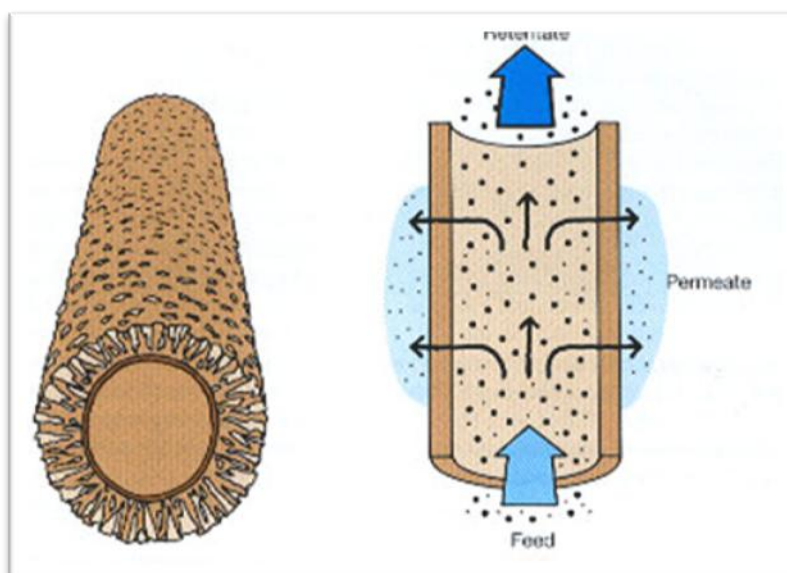
- ravne,
- cevne,
- spiralne i
- u obliku šupljeg vlakna (Carić, 1994).



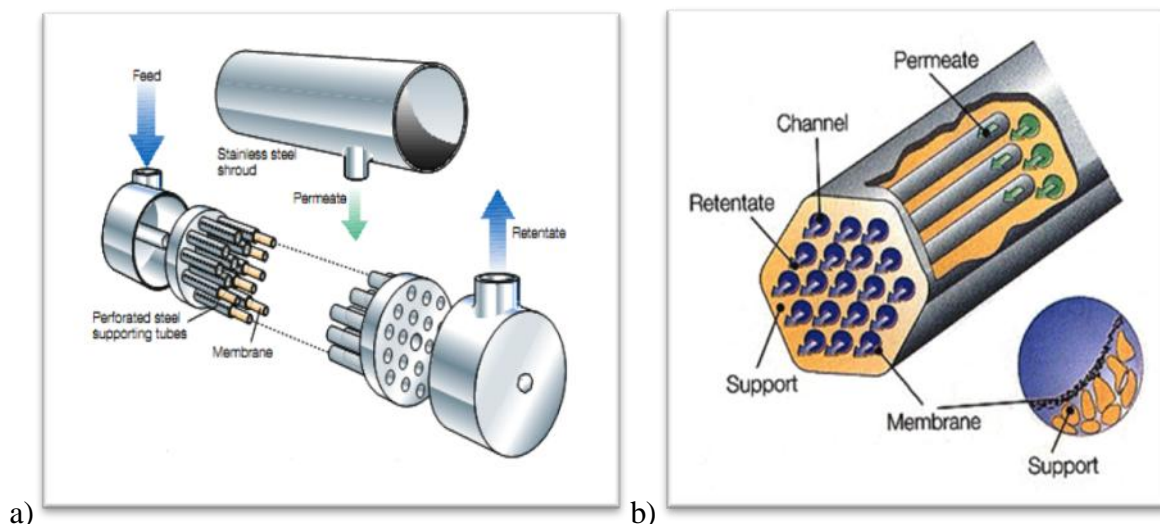
**Slika 3.** Modul u obliku spiralnog namotaja (Bylund, 2003)

Moduli koji se primenjuju za membranske separacije mogu se svrstati u četiri grupe (slike 2, 3, 4 i 5):

- pločasti modul;
- modul sa šupljim vlaknima;
- modul u obliku spiralnog namotaja;
- cevasti modul (Maubois i Ostojić, 1980).



**Slika 4.** Modul sa šupljim vlaknima (Bylund, 2003)



**Slika 5.** Cevni modul na bazi polimera (a) i cevni modul na bazi keramike (b) (Bylund, 2003)

Prema istraživanjima vreme boravka mleka u modulu ne bi trebalo da bude duže od 20 minuta, jer se pojavljuju mogućnosti za lipolitičku razgradnju mlečne masti (Maubois, 1978).

Utvrđeno je da je najprikladnija temperatura za funkcionisanje procesa između 50° i 55° C. Ovaj temperaturni režim je najbolji kompromis između maksimalne difuzije permeata kroz membranu, minimalnog viskoziteta retentata proteina, kontrolisanja bakteriološkog razvoja i izbegavanja denaturacije proteina (Ostojić, 1983).

Broj modula zavisi od potrebnog kapaciteta postrojenja. Ovi moduli imaju veliku gustinu pakovanja, veliku aktivnu površinu za kontakt, membranama nisu potrebni posebni nosači, pogodni su za upotrebu, manje je izražena koncentraciona polarizacija zbog tangencijalnog toka rastvora u odnosu na membranu.

Od karakteristika membrana zavisi efekat procesa. Posebno važne osobine membrane su:

- veličina pora,
- raspodela pora po veličini i
- vrsta makromolekularnog materijala od koga je membrana sastavljena (Carić i sar., 2009).

Membrana može da bude izrađena od: polimera, metala, oksida metala, keramike, tečnosti i gasa.

Prve korišćene membrane imale su malu propustljivost, slabu mehaničku otpornost i slabu hemijsku stabilnost. Prva generacija membrana je od celuloza-acetata. Upotreba ovih membrana bila je ograničena radnom temperaturom ( $t < 50^{\circ} \text{C}$ ), pH vrednošću (od 3 do 8) i osetljivošću na mikroorganizme i dezinficijense.

Membrane druge generacije su od sintetičkih polimera (uglavnom polisulfonske), mogu da se koriste u intervalima pH vrednosti od 2 do 12 i radna temperatura je do 100° C, osjetljive su na hlorne dezinficijense i mehanička oštećenja.

Danas se uveliko primenjuju membrane treće generacije (mineralne membrane) napravljene od cirkonijum oksida na grafitnoj podlozi. Otporne su do temperature 400° C i u celom dijapazonu pH (od 0 do 14). Nove membrane imaju veliku mehaničku čvrstoću, fleksibilnost i selektivnost. Na njima se zadržava više od 98 % proteina, a u permeat prelazi više od 90 % laktoze iz surutke (Carić i sar., 2009).

Ultrafiltracijom mleka, kao složenog koloidnog sistema, čestice proteina i neke soli se nakupljaju u blizini membrane, a kako proces odmiče, i na samoj membrani i njenim porama. Tako dolazi do stvaranja depozita na membrani, tj. smanjenja propustljivosti tokom vremena. Ova neželjena pojava naziva se *koncentraciona polarizacija* i ne može se nikad potpuno eliminisati, već samo umanjiti različitim mehaničkim postupcima, koji podstiču turbulentno proticanje surutke preko površine membrane (Drgalić i Tratnik, 2004).

U industriji mleka ultrafiltracija se koristi u različite svrhe za:

- koncentrisanje mleka i proteina surutke,
- poboljšavanje randmana pri proizvodnji sireva,
- frakcionisanje surutke i izdvajanje laktoze,
- koncentrovanje mleka,
- proizvodnju novih varijeteta sireva,
- standardizaciju mleka,
- konditorsku industriju, za izradu sladoleda i dr. (Ostojić i Karić, 2005).

Hemijski sastav mleka i frakcija koje su nastale nakon procesa ultrafiltracije prikazan je u tabeli 2 (Ostojić i Karić, 2005).

**Tabela 2.** Hemijski sastav mleka i frakcija nakon procesa ultrafiltracije  
(Ostojić i Karić, 2005)

Redni broj	MLEKO			RETENTAT			PERMEAT	
	Suva materija %	Proteini %	Mast %	Suva materija %	Proteini %	Mast %	Suva materija %	Mast %
1	11,61	2,79	3,50	18,59	5,79	7,25	5,34	0,14
2	12,56	3,13	3,60	19,27	6,15	7,15	5,64	0,14
3	11,53	2,81	3,50	18,84	5,84	7,20	5,24	0,15
4	11,30	2,93	3,70	18,19	5,92	7,50	5,15	0,16
5	10,53	2,60	3,20	19,20	6,13	7,80	4,62	0,13
6	12,17	2,89	4,20	18,38	5,46	7,95	5,14	0,18
Prosek	11,62	2,86	3,62	18,74	5,88	7,47	5,19	0,15

## Dijafiltracija

Dijafiltracija je postupak u procesu ultrafiltracije u kojem se retentat razblažuje dodatkom rastvarača i potom ponovo ultrafiltrira u cilju daljeg frakcionisanja (Gavarić, 1995).

Dijafiltracija se kombinuje sa ultrafiltracijom, tj. predstavlja njen nastavak, pri čemu se dodavanjem vode vrši ispiranje proteina surutke od komponenata laktoze i soli. Na ovaj način se koncentrat proteina prečišćava, u cilju smanjenja neproteinskih komponenata u retentatu. Ovim postupkom se dobija koncentrat proteina surutke koji sadrži preko 90% proteina u suvoj materiji. Voda se može dodavati šaržno ili kontinualno i najčešće je demineralizovana.

## Reverzna osmoza

Reverzna osmoza označava membranski separacioni proces koji se odvija pod dejstvom pritiska kao pokretačke sile i u kome se usled prisustva membrana separira rastvarač (najčešće voda), od ostalih komponenata rastvora (Gavarić, 1995).

Ovim postupkom postiže se razdvajanje molekula rastvoraka visokih (makromolekuli) i niskih molekulskih masa (šećer, soli) od molekula rastvarača (voda i dr.), odnosno membranu prolaze samo molekuli rastvarača, a na membrani se zadržavaju svi ostali sastojci.

Mala količina rastvorka male molekulske mase može zajedno sa rastvaračem proći kroz membranu. Obzirom na vrlo mali prečnik pora membrana i njihovu nepropustljivost za sve vrste jona i molekula, visok je osmotski pritisak, te je i pritisak koji se mora primeniti visok 3,4–4,4 MPa. Važnu ulogu igra dimenzija pora membrane koje su obično manje od  $1 \cdot 10^{-9}$  m i ponašaju se kao molekulski sita. Za molekule koji su veći od dimenzija pora, membrana predstavlja mehaničku barijeru.

Pogonska sila za reverznu osmozu je razlika pritisaka i to u oblasti od oko 10 MPa. Za separaciju molekula čija je dimenzija jednaka ili manja od dimenzija pora, važnu ulogu igra i oblik molekula. Međutim, najveći uticaj na separaciju imaju hemijske interakcije između membrane i komponenata napojnog rastvora.

Permeacija molekula rastvorka odvija se u dva stupnja: prvi stupanj je preferencijalna sorpcija molekula rastvarača na površini membrane, a drugi stupanj je difuzija kroz membranu (Carić, 1994).

## Mikrofiltracija

Mikrofiltracija je membranski separacioni proces koji u suštini predstavlja ultrafiltraciju sa membranama velikih prečnikapora (od 0,2  $\mu\text{m}$ ). Pogonska sila je pritisak (0,1-0,5 bar), a kretanje rastvora je tangencijalno u odnosu na membranu, kao kod ultrafiltracije i reverzne osmoze (Bird, 1996). Proces mikrofiltracije primenjuje se u industriji mleka od osamdesetih godina kada se razvojem novih tipova keramičkih membrana, veće permeabilnosti, s asimetričnom raspodelom pora mogla postići bolja separacija mlečnih komponenata (Saboya i Maubois, 2000).

Važan aspekt za industriju mleka je uklanjanje bakterija i spora iz sirovog mleka. Mikrofiltracija je relativno nova membranska metoda koja omogućava sterilizaciju pri niskoj temperaturi (najčešće 50° C), čime se obezbeđuje dobar bakteriološki kvalitet mleka (ili surutke), bez denaturacije proteina (Drgalić i Tratnik, 2004). Ovim postupkom uklanjaju se gotovo sve žive i mrtve ćelije mikroorganizama.

Membrane koje se koriste su keramičke sa veličinom pora 0,2 - 1,4  $\mu\text{m}$ . Zadržavaju mikroorganizme (bakterije, neke viruse) suspendovane čestice i rezidualnu mast.

Za razliku od procesa reverzne osmoze, ultrafiltracije i nanofiltracije, kojima je cilj dobijanje koncentrata glavni proizvod procesa mikrofiltracije uglavnom je *permeat* (Drgalić i Tratnik, 2004).

## Nanofiltracija

Nanofiltracija je jedan oblik reverzne osmoze. Membrane su otvorenije strukture jer osim vode propuštaju i male jone poput hloridnog ili natrijumovog, a zadržavaju veće jone i organske materije. Nanofiltracijom dolazi do delimične demineralizacije sirovine, permeata ili koncentrata.

### HEMIJSKI SASTAV PERMEATA

Permeat sadrži vodu, laktozu kao glavni sastojak suve materije, vitamine rastvorljive u vodi, soli mleka i može da sadrži malu količinu rastvorljivih proteina. Smatra se rastvorom koji ima nutritivni značaj (Hattem i sar., 2011). Permeat dobijen nakon ultrafiltracije mleka je kristalno jasna zelenkasta tečnost (Renner i Abd El – Salam, 1991). Sadrži oko 80 % laktoze,

dok ostale komponente prolaze u permeat u različitim proporcijama. Minerali i vitamini su frakcija između retentata i permeata (Hattem i sar., 2011).

Hemijski sastav permeata zavisi od sirovine koja se koncentriše i stepena koncentrisanja, zbog zavisnosti koeficijenta retencije (označava stepen separiranja određene komponente od rastvarača putem membrane) pojedinih komponenata od stepena koncentrisanja (tabela 3).

Nema velike razlike u hemijskom sastavu permeata dobijenog pri koncentrisanju mleka i slatke surutke, za razliku od permeata dobijenog ultrafiltracijom zakišelnog mleka ili kisele surutke (Glover, 1985).

Iz tabele 3 vidi se da porastom stepena koncentrisanja raste sadržaj suve materije (SM) permeata nezavisno od sirovine koja se koncentriše (Gavarić, 1995).

**Tabela 3.** Uticaj stepena koncentrisanja punomasnog i obranog mleka ultrafiltracijom na hemijski sastav permeata (Gavarić, 1995)

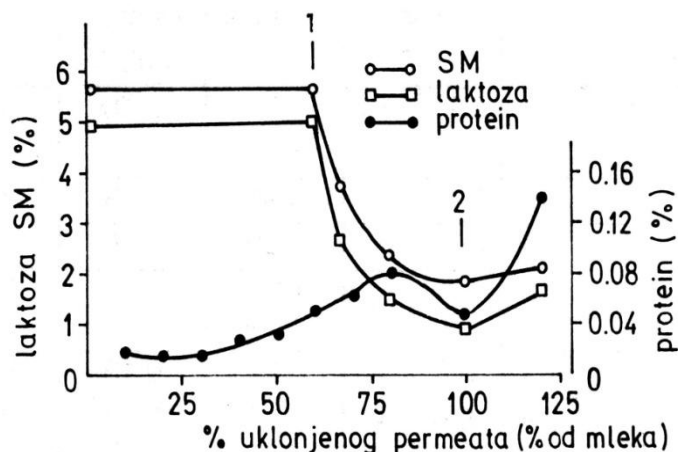
Stepen koncentrisanja	SM %	Proteini %		Neproteinski azot %	Laktoza %	Pepeo %
Punomasno mleko	5,7	0		0,18	4,8	0,53
1:1		0,06		0,19	5,1	0,53
3:1		0,49		0,19	5,2	0,54
5:1						
Obrano mleko		Kazein	Serum proteini			
1:1	5,0	0	0,02	0,15	4,2	0,42
2:1	5,6	0	0,06	0,14	5,0	0,44
3:1	5,7	0	0,05	0,17	5,3	0,48
4:1	6,0	0	0,09	0,18	5,4	0,49
5:1	6,1	0	0,12	0,17	5,5	0,48

**Tabela 4.** Promena hemijskog sastava permeata tokom simultane ultrafiltracije i fermentacije mleka (Gavarić, 1995)

pH mleka	SM %	Proteini %	Laktoza %	Pepeo %	Ca mg/kg	P mg/kg
6,60	5,48	0,12	4,91	0,52	340	430
6,0	5,42	0,11	4,79	0,59	412	520
5,60	5,40	0,12	4,62	0,62	620	595
5,30	5,39	0,11	4,52	0,65	790	625
4,92	5,25	0,11	4,35	0,64	1090	810
4,58	5,21	0,12	4,22	0,73	1258	920

U tabeli 4 prikazan je hemijski sastav kiselog permeata, tj. promena sastava permeata tokom ultrafiltracije zakiseljenog mleka. Uočljivo je da sa opadanjem pH vrednosti raste udeo pepela u permeatu, naročito kalcijuma i fosfora, usled prelaska koloidnog kalcijum-fosfata vezanog za kazeinske micide u rastvorljiv oblik, pa u izoelektričnoj tački kazeina praktično nema vezanog, micelnog kalcijuma (Gavarić, 1995).

Na slici 6 prikazan je uticaj dijafiltracije nezakiseljenog mleka na 50° C na promenu sastava permeata.



**Slika 6.** Promena sastava permeata tokom dijafiltracije mleka vrednosti pH = 6,6;

1- početak dijafiltracije, 2- kraj dijafiltracije (Ernstrom i sar., 1980).

Dodatkom proteina mleka ili surutke u permeat u koncentraciji većoj od 0,7 % sprečava se taloženje Ca-fosfata pri njegovom zagrevanju, iz čega sledi zaključak o protektivnoj ulozi ovih proteina. Zagrevanjem permeata bez dodatka proteina pri pH= 6,6 i temperaturi 60° C, taloži se 40 % prisutnog kalcijuma i 25 % fosfora, čime se snižava pH permeata za oko 0,47 jedinica, a zagrevanjem na 90° C precipituje 60 % kalcijuma i 30 % fosfora snižavajući pH za 0,64 jedinice. Do opadanja pH vrednosti dolazi zbog oslobađanja jona  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  s obzirom na to da se od njih odvojio kalcijum radi stvaranja taloga trikalcijum-fosfata. Pri pH vrednosti permeata 6,0 ne dolazi do precipitacije Ca-fosfata, jer je drugi jon fosforne kiseline nedisosovan (Donskaja i sar., 1978).

Variranjem parametara procesa kao što su pritisak i brzina fluida, koji se koncentriše, nema bitnog uticaja na hemijski sastav permeata (tabela 5) (Boer, 1980; Yan i sar., 1979).



**Tabela 5.** Prosečan sastav permeata dobijenog iz mleka (I), slatke (II) i kisele surutke (III)  
(Renner i Abd El-Salam, 1991)

Komponenta %	Vrsta permeata		
	I	II	III
Suva materija	5,8	5,8	5,8
Laktoza	4,9	4,9	4,1
Pepeo	0,45	0,5	0,7
Mlečna kiselina	-	0,15	0,5
Proteini	0,25	0,3	0,4

Prosečan sadržaj suve materije permeata iznosi 5,7 %, a od toga 80-85 % čini laktoza. Permeat sadrži i određene količine mineralnih materija i vitamina, prikazane u tabeli 6.

**Tabela 6.** Sadržaj mineralnih materija i vitamina u permeatu dobijenom iz mleka, slatke i kisele surutke (Renner i Abd El-Salam, 1991)

Komponente		Sadržaj u permeatu od		
<i>Mineralne materije</i>		Mleka	Slatke surutke	Kisele surutke
Ca	(mg/100g)	28	30	95
P	(mg/100g)	33	40	55
Mg	(mg/100g)	8	7	8
K	(mg/100g)	140	150	140
Na	(mg/100g)	40	65	45
Cl	(mg/100g)	-	120	100
Zn	(µg/100g)	6	1	8
Fe	(µg/100g)	5	4	9
Cu	(µg/100g)	-	0,5	0,7
Mn	(µg/100g)	0,2	0,15	0,15
<i>Vitamins</i>				
B <sub>1</sub>	(µg/100g)	27	28	-
B <sub>2</sub>	(µg/100g)	110	90	-

Permeat je dobar izvor esencijalnih elektrolita kao što su kalcijum, kalijum, natrijum, magnezijum i fosfor, te podseća na elektrolitni napitak koji se može uzeti kao sportski napitak posle normalnog ili energičnog vežbanja (Hattem i sar., 2011).

Ako se bez prethodne obrade permeat ispušta u kanalizaciju predstavlja ozbiljan izvor zagađenja za čovekovu okolinu. Visoka biološka potrošnja kiseonika (BPK) za permeat, koja

u zavisnosti od sastava varira i iznosi 30000 – 45000 g/l (Milanović i Carić, 1990) i strogi pravni standardi za otpadne vode zahtevaju promenu u pristupu upravljanja permeatom.

## PRERADA PERMEATA

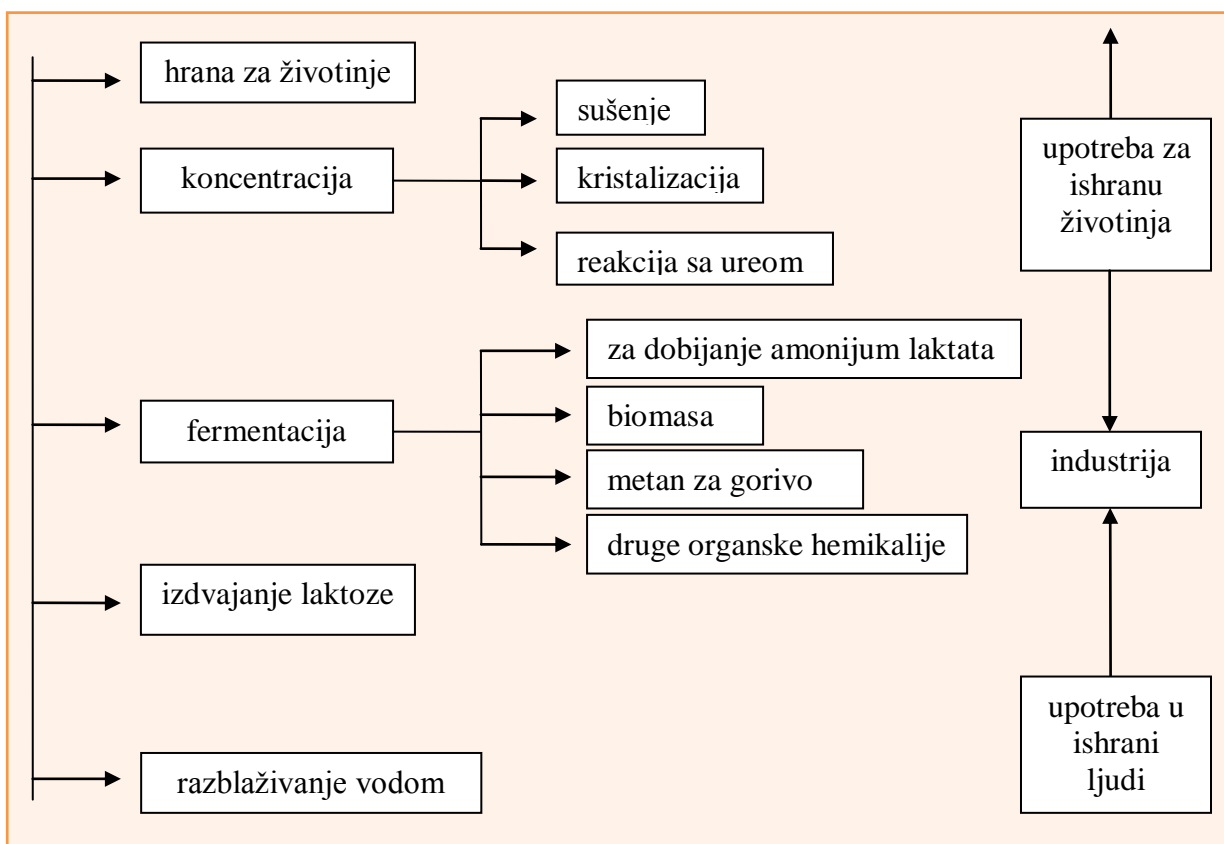
Uvođenjem savremenih membranskih procesa koncentrisanja i frakcionisanja, posebno ultrafiltracije, nakon tretmana mleka i surutke, nastaje permeat kao sporedni proizvod (Carić i Milanović, 1995). Permeat predstavlja osnovni sporedni proizvod u tehnologiji mleka i dragocenu sirovinu za proizvodnju brojnih produkata (Adamović i sar., 2004; Carić i Milanović, 1995). Ima relativno malu ekonomsku vrednost (Mann, 1989), zbog niskog sadržaja suve materije.

U cilju proizvodnje specijalnih vrsta sireva upotreba ultrafiltracije je u sve većem porastu, što dovodi do dobijanja velikih količina permeata. Zato je važno znati kakve su mogućnosti korišćenja permeata. Napredak nauke i tehnologije poslednjih godina ima veliki značaj, jer omogućava veoma raznovrsnu preradu permeata u nutritivno i funkcionalno visoko vredne proizvode (Ostergaard, 1988). Procesom biokonverzije pojedini sporedni proizvodi industrije mogu se koristiti kao supstrati za neke mikrobnе procese. Tako se mogu smanjiti ulaganja energije i novca u obradu otpadnih voda, a istovremeno dobiti korisni proizvodi. Zahvaljujući tom napretku, a u cilju zaštite životne sredine, u mnogim zemljama su razvijeni brojni tehnološki procesi valorizacije permeata. Prerodom permeata po odabranom tehnološkom postupku primenom selektivnih metoda i tehnika kao što su: evaporacija, ultrafiltracija, demineralizacija, sušenje, hidroliza i fermentacija ili njihovom kombinacijom, danas se u svetu komercijalno proizvode raznovrsni proizvodi za ljudsku i animalnu ishranu ili se koriste kao gorivo u industriji. Na slici 7 dat je šematski prikaz postupaka za preradu permeata u različite proizvode.

U pogledu upotrebe permeata u prehrambenoj industriji, nekoliko procedura se može primeniti za dobijanje proizvoda modifikovanih osobina koje nadograđuju njegovu upotrebu. Ovo je veoma važno jer sam permeat ima ograničenu upotrebu, pre svega zato što laktoza ima nisku slast, nisku rastvorljivost i slabe je digestibilnosti kod laktoza-netolerantnih osoba.

Iskorišćenje sporednih proizvoda industrije prerade mleka je sa ekološkog, tehnološkog i ekonomskog aspekta od velikog značaja. Glavne grupe mogućih proizvoda su: koncentrovani i sušeni proizvodi (permeat u prahu, demineralizovan permeat, laktoza), hidrolizovana laktoza (glukoza-galaktozni sirup), fermentisani proizvodi (etanol, metan,

mlečna kiselina/amonijum laktat, jednoćelijski proteini) i napici (Carić i Milanović, 1995; Renner i Abd El-Salam, 1991; Teixeira i sar., 1983).



**Slika 7.** Postupci za preradu permeata i mogući proizvodi  
(Renner i Abd El-Salam, 1991)

### Koncentrovani i sušeni proizvodi

Permeat se ranije vraćao poljoprivrednim proizvođačima za direktnu upotrebu u ishrani stoke, navodnjavanje zasejanih površina ili se ispuštao u kanalizaciju. Danas takav vid potrošnje permeata zbog strogih propisa o zaštiti životne sredine nije dozvoljen.

Industrijske metode prerade sporednih proizvoda, koje su prvo korišćene, bile su klasično koncentrisanje primenom povišene temperature i sušenje. Permeat ima nizak sadržaj suve materije i lako je kvarljiv. Prednost proizvodnje permeata u prahu je nepostojanje novih sporednih produkata u procesu (Carić i Milanović, 1995). Međutim, sušenje permeata je skup i složen postupak i sa komercijalnog aspekta neatraktivan. Cena gotovog proizvoda je relativno niska što predstavlja osnovni nedostatak ovog vida obrade (Ostojić i Karić, 2005).

## Glukoza - galaktozni sirup

Jedna od mogućnosti prerade permeata je hidroliza laktoze u cilju dobijanja smeše monosaharida glukoze i galaktoze, koja pokazuje veću slast, bolja funkcionalna svojstva i svarljivost u komparaciji sa laktozom. Prednost korišćenja hidrolizovanog sirupa je i što se mikrobiološki stabilan sirup proizvodi bez sušenja, što značajno pojeftinjuje proces i može da ga konzumira deo laktoza intolerantne populacije u svetu.

U procesu proizvodnje glukoza-galaktoznog sirupa hidrolizi laktoze prethodi demineralizacija, a potom sledi evaporacija.

Početak osamdesetih godina razvijena su dva procesa za komercijalnu proizvodnju glukoza-galaktoznog sirupa: *Corning proces* i *Valio postupak* (Zadow, 1986). U Corning procesu  $\beta$ -galaktozidaza je imobilisana na poroznim staklenim kuglicama, a u Valio procesu na fenol-formaldehidnoj smoli.

Tipičan sastav sirupa dobijenog nakon 90 % hidrolize laktoze u permeatu je prikazan u tabeli 7, a komparativne osobine laktoze i 90 % hidrolizovanog sirupa u tabeli 8. Obzirom na odličnu rastvorljivost i slast u poređenju sa laktozom, glukoza-galaktozni sirup se uspešno koristi za supstituciju tradicionalnih šećera u različitim prehrambenim proizvodima na isti način kao i kukuruzni ili krompirov sirup, zatim u konditorskoj i pekarskoj industriji, u proizvodnji sladoleda, različitih napitaka, čokolada, džemova, preliva, u pivarstvu i dr.

**Tabela 7.** Tipičan sastav glukoza-galaktoznog sirupa dobijenog iz surutke i permeata nakon 90 % hidrolize laktoze (Carić i Milanović, 1995)

Komponenta (%)	Hidrolizovani sirup iz	
	surutke	permeata
Suva materija	65	65
Laktoza	5,8	5,9
Glukoza	26	29
Galaktoza	25	29
Pepeo	0,6*	0,5*

\*nakon demineralizacije 90 % pepela

**Tabela 8.** Komparativne osobine laktoze i hidrolizovanog laktoznog sirupa (90 %) (Carić i Milanović, 1995)

Osobina	Laktoza	Hidrolizovana laktoza
Rastvorljivost (g/100g, 25° C)	17	55
Viskozitet (cp) 50 % rastvor, 25° C	17	105
Fermentabilnost	ograničena	dobra
Slatkoća u odnosu na saharozu	30-40	65-90

Hidroliza laktoze hemijskim putem se odvija u uslovima visoke temperature (90-100°C) i niske pH vrednosti oko 1,5 i uglavnom se koristi za permeat, dok se u slučaju surutke, zbog prisustva proteina, dešavaju Maillard-ove reakcije koje uzrokuju mrku boju rastvora. Prednost kisele hidrolize laktoze u poređenju sa enzimskom metodom je niža cena procesa, ali je nedostatak što se tokom reakcije formira više sporednih produkata (Carić i Milanović, 1995).

### Fermentisani proizvodi

Permeat predstavlja odličan medijum za rast i razvoj brojnih mikroorganizama, pa se fermentacijom dobija širok asortiman raznovrsnih produkata. Istraživanja mogućnosti fermentacije permeata intenzivna su i mnogobrojna (Renner i Abd El-Salam, 1991).

Na bazi dosadašnjih naučnih saznanja poznato je da se aerobnom ili anaerobnom fermentacijom surutka i permeat mogu transformisati u različite proizvode: metan – biogas, etanol – alkohol, mlečnu kiselinu/amonijum laktat, butanol/acetone, amino kiseline, pekarski kvasac, laktazu, galaktozu, 2,3 – butilen glikol, vitamin B<sub>12</sub>, riboflavin, biomasa - jednoćelijske proteine (SCP) i dr. (Teixeira i sar., 1983). Među potencijalnim produktima fermentacije permeata i surutke najprofitabilniji su: etanol, metan, amonijum laktat i jednoćelijski proteini (Renner i Abd El-Salam, 1991).

Moguća je proizvodnja fermentisanog koncentrovanog amonijum laktata iz permeata ili surutke uz pomoć kontrolisane anaerobne fermentacije laktoze pomoću *Lactobacillus bulgaricus*-a. Fermentisana tečnost se uparava do oko 60 % suve materije i zatim može biti uključena u ishranu stoke.

Fermentacijom laktoze iz permeata u aerobnim uslovima, dobijena biomasa može biti izdvojena i osušena. Ova biomasa može da sadrži izvesnu količinu sirovih proteina i može da

se upotrebljava u ishrani stoke. Nakon hidrolize biomasa može da se koristi i u ishrani ljudi (Ostojić i Karić, 2005).

**Etanol** - Profitabilna opcija za iskorišćenje permeata je i proizvodnja etanola (Renner i Abd El-Salam, 1991; Coté i sar., 2004). Iako ovu transformaciju mogu da izvrše razni kvasci, najbolje rezultate, pored *Torula cremoris*-a, daje kvasac *Kluyveromyces fragilis* u anaerobnim uslovima u fermentoru ili u propagacionim tankovima. Korišćenjem kontinualnih fermentora sa inkorporiranom UF membranom produktivnost procesa se povećava 5-30 puta u odnosu na diskontinualni postupak fermentacije. Praktično se iz 1t laktoze dobija 0,5t alkohola.

Alkohol se komercijalno proizvodi iz permeata u Irskoj, Danskoj, SAD i Novom Zelandu. Ovako dobijen alkohol može po kvalitetu u potpunosti da konkuriše alkoholu proizvedenom tradicionalnim postupkom iz melase, odnosno može da se koristi u konzumne svrhe. Primenu nalazi i u proizvodnji raznovrsnih napitaka, ili se koristi za supstituciju benzina u količini do 20 %.

**Metan** - U striktno anaerobnim uslovima fermentacijom laktoze u permeatu se, kao sledeća alternativa dobija metan – tačnije biogas ili „gorivo“ (Coton, 1980), jer se praktično ne dobija čist metan nego smeša metana i ugljen dioksida, obično u odnosu 60 : 40 ili 70 : 30 (Ostojić i Karić, 2005). Ovaj tip fermentacije se odvija u dvofaznom procesu. U prvom stepenu bakterije vrše konverziju organskog supstrata do organskih kiselina, a u drugoj fazi procesa organske kiseline se pretvaraju u metan i sporedni proizvod CO<sub>2</sub> pomoću metanogenih bakterija. Teorijski se iz 1t laktoze dobija 0,32 t biogasa, ali se u praksi postiže stepen konverzije od oko 80 % teorijske vrednosti. U vreme kada je cena energije u porastu, metan može poslužiti kao jedan od njenih izvora (Carić i Milanović, 1995).

**Mlečna kiselina/amonijum laktat** - Ako se fermentacija laktoze vrši *L. bulgaricus*-om u anaerobnim uslovima se produkuje mlečna kiselina iz koje se, potom, kontinualnom neutralizacijom sa amonijakom, formira amonijum laktat. Koristi se u ishrani stoke kao izvor neproteinskog azota (NPN), bez opasnosti od toksikoinfekcije (Carić i Milanović, 1995).

**Jednoćelijski proteini (SCP)** - Produkcija jednoćelijskih proteina (SCP), tzv. biomase, bazira se na aerobnoj fermentaciji laktoze pomoću kvasaca. Najčešće se koriste kvasci *Kluyveromyces fragilis* i *K. lactis*, ali se takođe upotrebljavaju i *Candida utilis*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. intermedia*, *K. marxianus* i *Torulopsis cutaneum* (Renner i Abd El-Salam, 1991). Prinos biomase iznosi oko 53 % od ukupne količine laktoze u inicijalnom supstratu, a

proizvod može da sadrži proteine (zavisi od stepena koncentrisanja ultrafiltracijom), ugljene hidrate, lipide, pepeo, nukleinsku kiselinu i vlagu. Velike količine SCP se koriste u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda: gotovih jela, supa, biskvita, pita, „snack“-a i dr. Takođe se biomasa veoma uspešno koristi kao komponenta u pripremi stočne hrane ili kao zamena za obrok na bazi soje, zbog visokog sadržaja mineralnih materija, vitamina i mogućeg dobrog profila amino kiselina (Carić i Milanović, 1995; Gavarić, 1984).

### **Napici od permeata**

Pregled patentne dokumentacije nudi formulacije tečnih proizvoda na bazi permeata ili surutke. Brojni naponi su uloženi da se permeat transformiše u proizvod pogodan za upotrebu kao hrana za ljude (Đurić i sar., 2004) i razviju napici sa prihvatljivim senzornim svojstvima naročito u pogledu ukusa (Koffi i sar., 2005).

Napici ovog tipa pripremaju se sa različitim voćnim dodacima. Jedna od najranijih referenci pojavila se 1976. kada je Bangert (1975) predložio napitak sa koncentratom pomorandže i dodatkom limunske kiseline. Od tada, pomorandža i citrus ukusi se najviše koriste za dobijanje ovih napitaka (Scibelli, 1980; Remer, 1982; Dahlen, 1984; Girsh, 1999; Reust, 2001; Girsh, 2001; Schroder, 2002). Takođe primenjuju se i voće kao što su jabuke, kruške, trešnje, dinje ili kajsije. Za pokrivanje nepoželjnih mirisa napitaka prema nekim autorima predlaže se upotreba tropskog voća (grejpfrut ili mandarina, banana, mango, papaja) (Đurić i sar., 2004). Dodavanje bobica (grožđa, borovnica, jagoda, malina, kupina ili duda) koje su poznate kao dobar izvor gvožđa i antioksidanata se pokazalo kao veoma korisno i to je posebno uticalo na poboljšane nutritivne vrednosti navedenih napitaka. Brazilska grupa naučnika koji su razvili napitke od surutke sa dodavanjem koncentrata jagode i obogaćeno gvožđem su dokazali da dugoročna potrošnja ovog proizvoda ima uticaj na smanjenje rasprostranjenosti anemije kod dece i adolescenata (Miglioranza i sar., 2003).

Autori Geilman i sar., (1992) i Beucler i sar., (2005) navode da se pri proizvodnji napitaka koristi enzim za hidrolizu laktoze i na taj način smanjuju digestivne probleme potrošača i povećava slast napitaka. Sa druge strane Abd El-Salam i sar., (1991) i Abd El-Kair (2009) su koristili jogurtne kulture ili bakterije mlečne kiseline (LAB) koje sadrže *Lactobacillus helveticus*, LH100 za proizvodnju voćnih napitaka i sportskih pića od permeata.

Suva materija voćnih dodataka u nopicima ovog tipa varira u širokom opsegu vrednosti: 5 % (Girsh, 1999; Girsh, 2001), 10 - 15 % (Reust, 2001) ili 4 - 20 % (Hammond, 1992). Upotrebom jagode ili manga kao dodatka za korigovanje ukusa znatno se povećava sadržaj

minerala kalcijuma, kalijuma, natrijuma, magnezijuma i fosfora u pripremljenim napicima. Mango je bolji izvor kalijuma i magnezijuma u odnosu na jagode, dok je jagoda bolji izvor kalcijuma i fosfora (Hattem i sar., 2011). Dodatak voća tj. suva materija voća značajno utiče na senzorna svojstva krajnjeg proizvoda kao što su boja, ukus i miris (Koffi i sar., 2005).

Osim voća, neki autori su dodavali druga sredstva za poboljšanje ukusa, kao što su: čokolada, kakao, vanila, žitarice (pirinač, ovas, ječam), med, itd. (Grish, 2001; Wiesenberger i sar., 1984). Dodavanjem žitarica, naročito mekinja, pri proizvodnji napitaka ima kao rezultat proizvod sa dijetetskim vlaknima, esencijalnim masnim kiselinama (uz dodatak ovasa) i antialergijskim proteinima što čini ove proizvode pogodnim za konzumiranje kod dece i populacije koja ima alergijske reakcije (Grish, 2001). Mekinje su veoma dobar izvor prehrambenih vlakana. Zato je važan pažljiv odabir mekinja jer mnoga vlakna imaju vrlo nisku rastvorljivost ili se ne rastvaraju uopšte. Mekinje pirinča su se pokazale kao jedan od najboljih izbora u ovoj kategoriji za poboljšanje ukusa. Imaju pravilnu ravnotežu rastvorljivih i nerastvorljivih dijetnih vlakana, gotovo da nema formiranja taloga tokom skladištenja napitaka i ne sadrže proteine koji izazivaju alergiju (Jeličić i sar., 2008).

Dodavanje meda umesto šećera ili drugih zaslađivača u napitke doprinosi unosu brojnih drugih hranljivih materija kao što su vitamini, minerali (Hammond, 1992) i fitoelementi koji nisu prirodno prisutni u permeatu ili surutki kao sirovini (Jeličić i sar., 2008).

Tokom skladištenja napitaka ovog tipa uočen je nastanak sedimenta. Koffi i sar. (2005) su koristili pektin za stabilizaciju proizvoda i primetili značajne promene u veličini čestica i stepenu sedimentacije tokom skladištenja.

Pronalazak optimalnog normativa za mešanje voćnih koncentrata i/ili drugih aditiva sa svežim permeatom u cilju proizvodnje napitka sa prihvatljivim senzornim svojstvima još uvek je izazov. Mnoge studije su izvedene u tu svrhu i to je rezultiralo u mogućim rešenjima koja mogu biti primenjena za proizvodnju napitka sa što manje nedostataka. Tako neki autori predlažu dodavanje metal-glukonata (Remer, 1982), limunske kiseline ili različitih zaslađivača kao što su fruktoza, saharoza ili hidrolizata laktoze za podešavanje mirisa i ukusa. Danas su neki autori predložili dodavanje CO<sub>2</sub> u kombinaciji sa voćnim dodacima (Sherwood i sar., 2007), drugi istraživači su koristili soja protein ili sojino mleko u prahu (Girsh, 2001; Girsh, 1999). Uglavnom je poželjno dodavanje kalcijum i magnezijumovih soli (glukonat, citrat, askorbat, itd.) kao izvora Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> jona (Đurić i sar., 2004). Prosečna elektrolitna kompozicija permeata je takva da se podudara sa komponentama koje ulaze u sastav ljudskog znoja (Konopka, 2001).

Kiselost napitaka se uglavnom podešava primenom limunske kiseline ili limuna, dok pH vrednost zavisi i od prisustva ostalih komponenata. Neki napici imaju pH vrednosti u



opsegu 3-5 (Scibelli, 1980) ili vrednosti između pH 4 i 5 (Girsh, 2001) ili vrednosti bliske pH vrednosti slatke surutke (Remer, 1982).

Slast napitaka se poboljšava enzimskom hidrolizom laktoze (Hammond, 1992) ili dodatkom fruktoze i saharoze (Girsh, 1999). Sadržaj ugljenih hidrata može biti 5 - 6 % (Bangert, 1975), ali i 11 % ili više (Girsh, 1999; Đurić i sar., 2004).

Napici dobijeni od permeata su bistre providne tečnosti, slične tradicionalnim prijatnim sokovima. Mnogi od njih su zasićeni ugljenom kiselinom i imaju karakterističan osvežavajući ukus. Upotreba permeata kao deproteinizovanog produkta smanjuje specifičan ukus surutke i produžava upotrebu (Renner i Abd El-Salam, 1991).

Komponente permeata podsećaju na elektrolitni napitak koji se koristi kao piće za sportiste (Geilman i sar., 1990). Konzumiranje napitaka ovog tipa je u stalnom porastu. Permeat ima potencijal da se proizvodi kao napitak sličan ovim sportskim pićima i takođe može sadržati veliku koncentraciju minerala, kao što su kalcijum i kalijum, koji mogu biti značajni za očuvanje dobrog zdravlja. Industrija elektrolitnih napitaka je rastući tržišni sektor, posebno za napitke za sportiste, koji se ubrajaju u kategoriju funkcionalnih pića (Williams, 2001).

Permeat iz surutke dobar je izvor Ca i vitamina E. On sadrži i neorganske azotne materije, aminokiseline, rastvorljive peptide i dr. (Coton, 1980).

Postoje različite formulacije napitaka na bazi permeata, kao primer u tabeli 9 prikazana je formulacija prema Beucler i sar., (2005).

**Tabela 9.** Formulacija napitka (za 1l) (Beucler i sar., 2005)

Sastojci	Količina	Poreklo
Voda/permeat (986 ml = 100%)	0%, 25%, 50%, 75%, 100%,	Tulare, Calif., U.S.A.
Fruktoza	70 g	A.E.Staley Manufacturing Co. (Decatur, Ill., U.S.A.)
Aroma maline*	0,5 ml	Mother Murphy's Laboratories, Inc. (Greensboro, N.C., U.S.A.)
Aroma maline*	0,5 ml	Flachsmann (Brampton, Ontario, Canada)
Limunska kiselina	3 g	Cargill Foods, Inc. (Eddyville, Iowa, U.S.A.)
Natrijum fosfat	0,5 g	Astari (Webster Groves, Mo., U.S.A.)
Natrijum benzoat	0,7 g	Cargill Foods, Inc. (Eddyville, Iowa, U.S.A.)
Vitamin C*	80 mg	Roche Vitamins Inc. (Belvidere, N.Y., U.S.A.)
Pantotenska kiselina *	5 mg	Roche Vitamins Inc. (Belvidere, N.Y., U.S.A.)
Vitamin B6*	0,3 mg	Roche Vitamins Inc. (Belvidere, N.Y., U.S.A.)
Niacin *	15 mg	Roche Vitamins Inc. (Belvidere, N.Y., U.S.A.)

\*Komponente su dodavane nakon pasterizacije i hlađenja

Industrija sportskih pića, daje formulacije napitaka takve da obezbede odgovarajuće količine ugljenih hidrata i elektrolita potrebnih za održavanje optimalnih performansi (Williams, 2001).

## LAKTOZA

Laktoza je glavna komponenta permeata (Jelen, 2009). To je redukujući šećer koji se nalazi samo u mleku (Solomons, 2002; Mądry i sar., 2010) i optički je aktivan (Đorđević, 1982).

Pripada grupi organskih hemijskih jedinjenja pod nazivom ugljeni hidrati. Ugljeni hidrati su najvažniji izvor energije u ishrani. Ugljeni hidrati, takođe, obezbeđuju materijal za sintezu pojedinih važnih hemijskih jedinjenja u telu. Prisutni su u mišićima u obliku glikogena i u jetri kao glikogen jetre (Bylund, 2003).

Laktoza je jedan od tri osnovna sastojka mleka, pored proteina i masti. Koncentracija laktoze u mleku obrnuto je srazmerna koncentraciji lipida i kazeina. Kod većine sisara najzastupljenija je i trenutno nedovoljno iskorišćena komponenta mleka. Sintetizuje se u epitelu ćelija mlečne žlezde iz dva molekula glukoze koji se apsorbuju iz krvi (Fox, 2011).

U ljudskom telu laktoza ima funkciju u apsorpciji minerala. Šećeri olakšavaju apsorpciju kalcijuma i drugih zemnoalkalnih metala u digestivnom traktu, stvarajući helate sa kalcijumom što smanjuje njegovu precipitaciju tokom transporta u organizmu (Carić, 1994). Fiziološki efekat laktoze je i u sledećem: obezbeđen je optimalni nivo magnezijuma; uspostavljajući blago kiselu reakciju u crevima sprečava rast i razvoj truležnih bakterija; učestvuje u sintezi nekih vitamina i poboljšava iskorišćenje mlečne masti.

Laktoza podleže mlečnoj, buternoj, propionskoj i alkoholnoj fermentaciji. Tehnologija fermentisanih mlečnih proizvoda, kiselih sireva i kisele pavlake, bazira se na mlečnoj fermentaciji laktoze (Carić, 1994; Đorđević, 1982). Bakterije mlečne kiseline koje sadrže laktazu hidrolizuju laktozu na molekule glukoze i galaktozu. Drugi enzimi iz bakterija mlečne kiseline, zatim razgrađuju glukoze i galaktoze, konvertuju ih preko intermedijarnih reakcija uglavnom u mlečnu kiselinu (Bylund, 2003).

Koncentracija laktoze u mleku varira između različitih vrsta. Takođe sadržaj laktoze u kravljem mleku varira u zavisnosti od rase, faze laktacije i zdravstvenog stanja životinje. U mleku (tabela 10) goveda, bivola i koza nalazi se oko 4,8; 4,8 i 4,1% respektivno; blago se povećava u ranim fazama laktacije, a onda se smanjuje na oko 70 % maksimuma krajem laktacije. Sadržaj laktoze u mleku kobilica i magarica povećava se tokom laktacije, dostiže

vrednosti u opsegu 6,0 - 7,4 %. Humano mleko sadrži 7,0 - 7,5 % laktoze (Fox, 2011; Solomons, 2002).

**Tabela 10.** Koncentracija (%) laktoze u mleku odabranih vrsta  
(Fox i McSweeney, 1998)

Vrsta životinje	Laktoza (%)	Vrsta životinje	Laktoza (%)
Magarac	7,4	Bizon	4,8
Zebra	7,4	Slo	4,7
Žena	7,0	Koza	4,1
Konj	6,2	Jelen	3,4
Svinja	5,5	Pas	3,1
Krava	4,8	Delfin	0,6
Ovca	4,8	Crni medved	0,4
Mačka (domaća)	4,8	Mehurasta foka	0,0

Mleko sadrži u tragovima druge šećere uključujući glukozu, fruktozu, glukozamin, galaktozamin, neuraminsku kiselinu i neutralne i kisele oligosaharide (Fox i McSweeney, 1998).

Od svih sastojaka mleka laktoza podleže relativno najmanjim kolebanjima u toku laktacionog perioda. Na količinu laktoze najveći uticaj ima zdravstveno stanje mlečne žlezde. U slučaju mastitisa količina laktoze se znatno smanjuje. Mastitis deprimira lučenje laktoze i izaziva povišen nivo natrijum-hlorida u mleku. Laktoza, zajedno sa jonima natrijuma, kalijuma i hloridnim jonima, igra glavnu ulogu u održavanju osmotskog pritiska u mlečnoj žlezdi. Svaka promena u sadržaju laktoze (formirana u okviru mlečne žlezde) kompenzuje se sa povećanim ili smanjenim izlučivanjem sastojaka soli. Ovaj osmotski odnos delimično objašnjava zašto neka mleka sa visokim sadržajem laktoze imaju mali sadržaj pepela i obrnuto (tabela 11) (Fox i McSweeney, 1998).

**Tabela 11.** Prosečna koncentracija (%) laktoze i pepela u mleku nekih sisara  
(Fox i McSweeney, 1998)

Vrste	Voda %	Laktoza %	Pepeo %
Humano mleko	87,4	6,9	0,21
Krava	87,2	4,9	0,70
Koza	87,0	4,2	0,86
Kamila	87,6	3,26	0,70
Kobila	89,0	6,14	0,51
Irvias	63,3	2,5	1,40

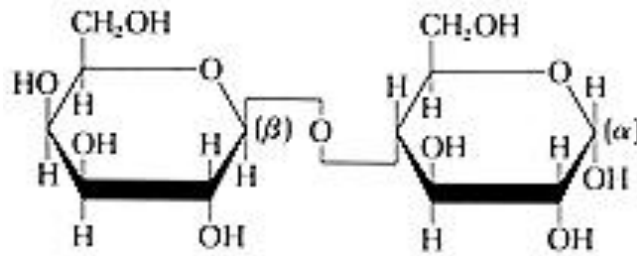
Laktoza igra važnu ulogu u mleku i mlečnim proizvodima koja se ogleda u sledećem: suštinski je sastojak u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka, doprinosi nutritivnoj vrednosti mleka i mlečnih proizvoda; međutim mnogi koji nisu Evropljani imaju ograničenu ili nultu sposobnost varenja laktoze u zrelijim godinama, što je dovelo do sindroma poznatog kao intolerancija laktoze; utiče na teksturu pojedinih koncentrisanih i smrznutih proizvoda; učestvuje u promenama boje i ukusa mleka zagrevanog na visokoj temperaturi (Bylund, 2003).

Laktoza u mleku podleže lakše promeni nego u suvom stanju. Na temperaturama iznad 100° C reakcija se odvija između laktoze i proteina, što dovodi do neenzimskog tamnjenja i pojave braon boje. Serija reakcija, koje se pojavljuju između amino grupa ostataka amino kiselina i aldehidne grupe laktoze, naziva se Maillard-ova reakcija. Ona rezultira potamnjanje proizvoda i promene ukusa kao i gubitak hranljive vrednosti, posebno gubitak lizina, jedne od esencijalnih aminokiselina (Bylund, 2003).

Tehnološki procesi proizvodnje laktoze mogu se podeliti u dve osnovne grupe: procesi gde se kristalizacija i odvajanje laktoze vrši iz surutke (bez prethodnog uklanjanja surutkinih proteina) i procesi gde se kristalizacija i odvajanje laktoze vrši iz deproteinizovane surutke (prethodno se uklone proteini ultrafiltracijom ili koagulacijom). U oba slučaja može da se proizvede sirova ili rafinisana laktoza. Proizvodnja laktoze podrazumeva koncentrisanje surutke ili ultrafiltrata-permeata vakuumskom koncentracijom, kristalizacije laktoze iz koncentrata, izdvajanje kristala centrifugiranjem i sušenje kristala (Bylund, 2003).

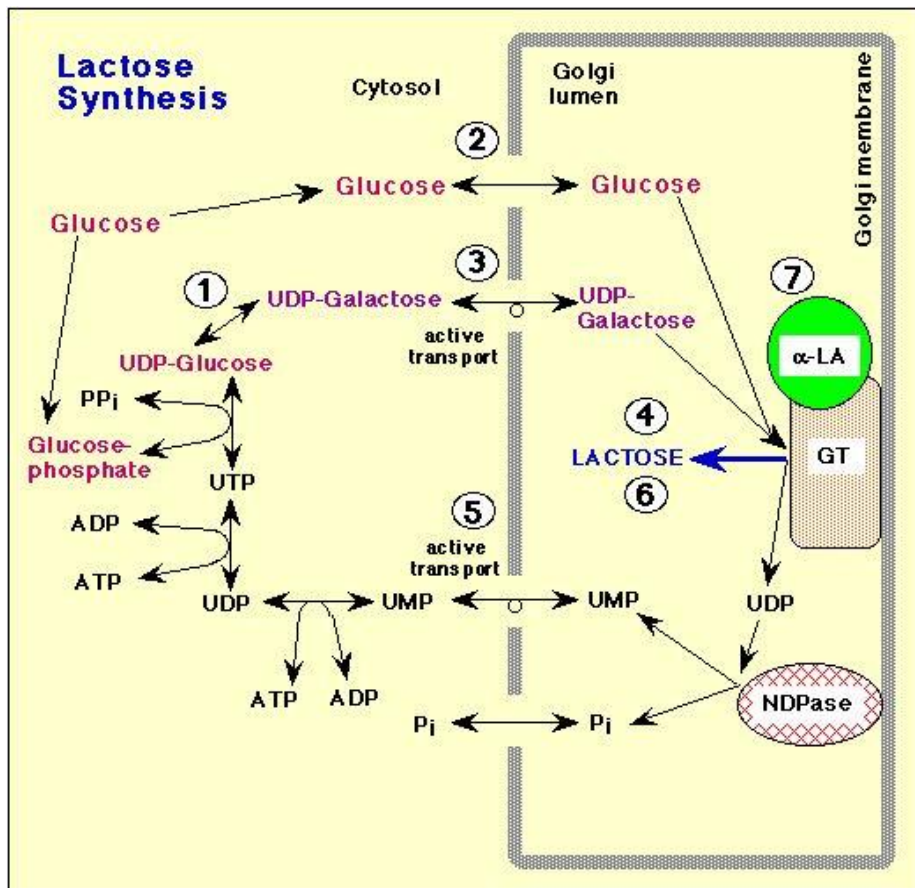
### Osobine laktoze

Laktoza (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) je disaharid koji se sastoji iz molekula D-galaktoze i molekula D-glukoze povezanih β- (1→4)-glikozidnim vezama. Sistemsko ime je β-galaktopiranozil-(1→4)-glukopiranoza (slika 8) (Fox, 2011; Carić, 1994; Ferreira i sar., 2003; Jelen, 2009). U mleku je laktoza prisutna u dva izomerna oblika α- i β-. Između α- i β- oblika postoji određeni odnos pri određenoj temperaturi. Porastom temperature jedan oblik laktoze prelazi u drugi, njihov odnos se menja (mutarotacija). Ova pojava je važna za proces kristalizacije laktoze u tehnološkom procesu proizvodnje laktoze i kondenzovanog zaslađenog mleka.



Slika 8. Strukturna formula laktoze (www.ansci.illinois.edu)

Laktoza nastaje sekrecijom u mlečnoj žlezdi. Sintetiše se iz glukoze apsorbovane iz krvi. Slika 9 prikazuje put sinteze laktoze (www.ansci.illinois.edu).



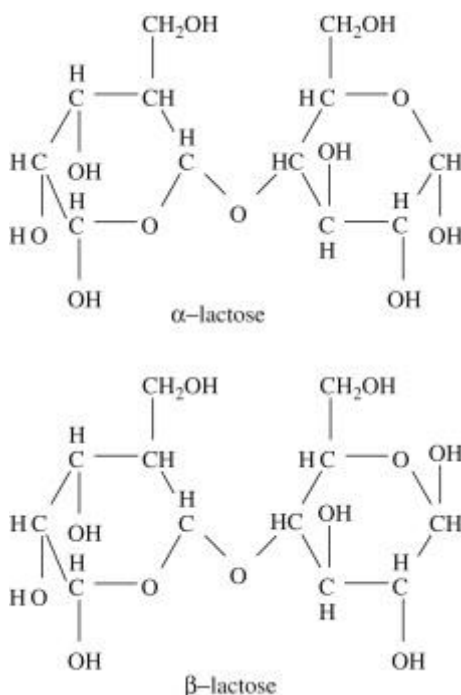
Slika 9. Sinteza laktoze (www.ansci.illinois.edu):

GT = galaktoziltransferaza;  $\alpha$ -LA =  $\alpha$ -laktalbumin; NDPase = nukleotid difosfataza; Pi = neorganski fosfat; PPi = neorganski difosfat; UDP = uridindifosfat; UDP-galaktoza = Uridin difosfat galaktoza; UDP- glukoza = uridin difosfat glukoza; UMP = uridin monofosfat; UTP = uridin trifosfat.

### Ravnoteža laktoze u rastvoru

Laktoza je slabo rastvorljiva na sobnoj temperaturi, ali se sa porastom temperature povećava rastvorljivost. U vodenim rastvorima prisutna je u  $\alpha$ - i  $\beta$ -formi, koji podležu mutarotaciji (slika 10). Kada se laktoza rastvara u vodi dolazi do postepenih promena iz jednog oblika u drugi dok se ravnoteža uspostavlja (Fox i McSweeney, 1998).

Na temperaturi od 20° C ravnotežna smeša se sastoji od 62,7 %  $\beta$ - i 37,3 %  $\alpha$ - laktoze. Ravnotežna konstanta,  $\beta/\alpha$ , je 1,68 na 20° C. Procenat laktoze u  $\alpha$ - obliku se povećava sa povećanjem temperature, a konstanta ravnoteže se smanjuje. Na ravnotežnu konstantu ne utiče pH, ali stepen mutarotacije zavisi od temperature i od pH. Stepenn mutarotacije je najsporiji na pH 5,0. Mutarotacija je spora na niskim temperaturama, ali se povećava 2,8 puta sa svakih 10° C porasta temperature i postaje gotovo trenutna na oko 75° C (Gänzle i sar., 2008).



**Slika 10.** Strukturni oblici laktoze –  $\alpha$  i  $\beta$  (Gänzle i sar., 2008)

Najčešći oblici laktoze,  $\alpha$ -hidrat i  $\beta$ -anhidrid, se međusobno razlikuju u:

- rastvorljivosti,
- obliku kristala i veličini,
- hidrataciji kristalnog oblika – higroskopnosti,
- specifičnoj rotaciji,
- slasti.

Karakteristike rastvaranja  $\alpha$  i  $\beta$  izomera laktoze su izrazito različite. Kada se  $\alpha$ -laktoza doda u višku u vodu na 20° C, oko 7 g na 100 g vode, rastvori se odmah. Deo  $\alpha$ -laktoze mutarotacijom prelazi u  $\beta$  oblik, do uspostavljanja ravnotežnog odnosa 62,7  $\beta$  : 37,3  $\alpha$ , stoga rastvor postaje nezasićen u pogledu  $\alpha$  laktoze. Ova dva procesa (mutarotacija i rastvaranje  $\alpha$ -laktoze) nastavlja se sve dok se ne ispune dva kriterijuma: 7 g  $\alpha$  laktoze u rastvoru i odnos  $\beta/\alpha$  1,6 : 1,0. Kada je  $\beta$ -laktoza rastvorena u vodi, početna rastvorljivost je 50 g na 100 g vode na 20° C (Fox i McSweeney, 1998). Nešto  $\beta$  laktoze mutarotacijom prelazi u  $\alpha$  formu da se uspostavi odnos 1,6:1. U ravnoteži rastvor bi sadržao 30,8 g  $\beta$  i 19,2 g  $\alpha$  na 100 ml. Dakle rastvor je superzasićen sa  $\alpha$  laktozom, deo kristališe i remeti ravnotežu i dovodi do dalje mutarotacije  $\beta$  ka  $\alpha$ . Kristalizacija laktoze i mutarotacija  $\beta$  laktoze nastaviće se sve dok se ne ispune gore pomenuta dva kriterijuma. Konačna rastvorljivost je 18,2 g laktoze na 100 g vode. S obzirom da je bolja rastvorljivost  $\beta$  laktoze u odnosu na  $\alpha$  laktozu i sporija mutarotacija moguće je da se formira visoko koncentrovan rastvor rastvaranjem pre  $\beta$ - nego  $\alpha$ -laktoze. U svakom slučaju, konačna rastvorljivost je ista (Fox i McSweeney, 1998).

### Kristalizacija laktoze

Laktoza može biti prisutna u mlečnim proizvodima u dva kristalna oblika,  $\alpha$  - hidrat i  $\beta$  - anhidrid, kao i amorfna mešavina  $\alpha$ - i  $\beta$ - forme. Ova nekristalna laktoza sadrži  $\alpha$ - i  $\beta$  - oblik u istom odnosu kao u rastvoru iz kojeg je generisana. Rastvor laktoze je sposoban da bude visoko prezasićen pre nastupanja spontane kristalizacije. Kristalizacija u svom osnovnom konceptu je proces u dva koraka koji uključuje formiranje nukleusa i rast jezgra na makro - veličinu (Nickerson, 1974).

Iz presićenih rastvora laktoza kristališe kao  $\alpha$ -laktoza hidratni oblik na temperaturi ispod 93,5° C i sadrži molekul kristalne vode, dok se  $\beta$ - anhidridni oblik pojavljuje pri kristalizaciji na temperaturi iznad 93,5° C i ne sadrži molekul kristalne vode. Ovo narušava postojeću ravnotežu, pa u presićenom rastvoru laktoze dolazi do mutarotacije, koja je brža na višim temperaturama (na 75° C mutarotacija je trenutna), te brzina kristalizacije određuje trajanje kristalizacije. Na nižim temperaturama (ispod 30° C) brzina mutarotacije je manja od brzine kristalizacije i tada ona određuje brzinu kristalizacije (Fox i McSweeney, 1998; Carić, 1994). Brzina kristalizacije zavisi od: ukupne dostupne površine kristala, čistoće rastvora, stepena presićenja, temperature, viskoziteta, intenziteta mehaničkog tretmana i drugih faktora (Carić, 1994).

Kristalizacija laktoze je kompleksan proces u kome dolazi do difuzije molekula laktoze na površinu kristala s jedne strane i istovremeno oslobađanja i prenosa toplote

kristalizacije sa kristala na tečnost s druge strane. Postupak treba voditi tako da se hlađenjem koncentrisani rastvor laktoze dovede u metastabilnu zonu, čime se izaziva relativno brza i kvantitativna kristalizacija, sa dobijanjem kristala takve raspodele da se mogu lako odvojiti centrifugovanjem. Laktoza, dobijena iz surutke ili permeata, može da bude u obliku  $\alpha$ -laktoza hidrata ili  $\beta$ -anhidrida, ili je to smeša oba oblika. U zavisnosti od primenjenih parametara procesa dobija se proizvod različitog sastava i osobina, za različite namene (Carić, 1994).

### Rastvorljivost laktoze

Rastvorljivost laktoze je niska u poređenju sa drugim disaharidima, ali je izražen uticaj temperature na rastvorljivost (Sienkiewicz i Riedel, 1990). Rastvorljivost laktoze je samo oko 10 % od saharoze na sobnoj temperaturi (Ryder, 1988). Oblici  $\alpha$ - i  $\beta$ - laktoze imaju različite rastvorljivosti.  $\beta$ - laktoza se bolje rastvara u ambijentalnim uslovima dok  $\alpha$ - laktoza iznad 93,5° C.

Među šećerima laktoza ima nizak nivo slasti koji je uglavnom mana. Tabela 12 prikazuje u % relativnu slast šećera u odnosu na saharozu. Slatkoća laktoze rastvorene pri sobnim uslovima je oko 20 % u odnosu na saharozu. Prema Ganzle i sar., (2008) laktoza je oko 16 % slatka kao saharozu u 1% rastvoru i stoga ima ograničenu upotrebu kao zaslađivač. Slast laktoze u mleku je jasno uočljiva i sladak ukus nakon dodavanja 0,75 % laktoze u obrano mleko se može detektovati receptorima ukusa (Jelen i Michel, 1999).

**Tabela 12.** Komparativna slast pojedinih vrsta šećera (%) (Nickerson, 1974)

Saharoza	Glukoza	Fruktoza	Laktoza
0,5	0,9	0,4	1,9
1,0	1,8	0,8	3,5
2,0	3,6	1,7	6,5
2,0	3,8	-	6,5
2,0	3,2	-	6,0
5,0	8,3	4,2	15,7
5,0	8,3	4,6	14,9
5,0	7,2	4,5	13,1
10,0	13,9	8,6	25,9
10,0	12,7	8,7	20,7
15,0	17,2	12,8	27,8
15,0	20,0	13,0	34,6
20,0	21,8	16,7	33,3



Kada pravilno kristališe, laktoza ima nisku higroskopnost što je čini atraktivnim šećerom za upotrebu u glazurama pri pripremi konditorskih proizvoda (tabela 13) (Fox i McSweeney, 1998).

**Tabela 13.** Relativna vlažnost saharoze, glukoze i laktoze (% apsorbovane vlage na 20° C) (Fox i McSweeney, 1998)

	Relativna vlažnost		
	60%	100%	
	1 h	9 dana	25 dana
<b>Šećer</b>	humektantnost		
Laktoza	0,54	1,23	1,38
Glukoza	0,29	9,00	47,14
Saharoza	0,04	0,03	18,35

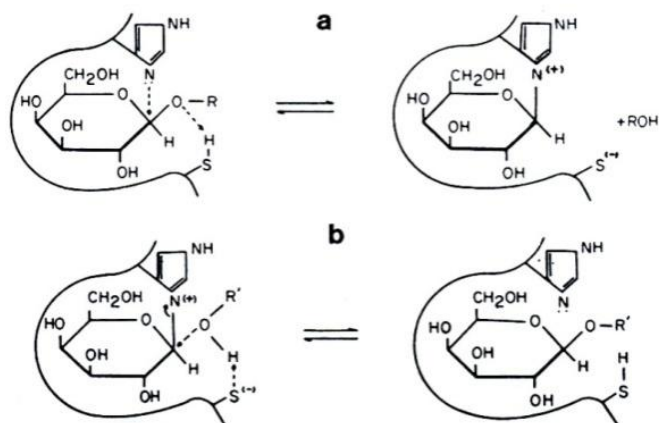
### Hidroliza laktoze

Tehnologija hidrolize laktoze u permeatu uključuje nekoliko različitih metoda:

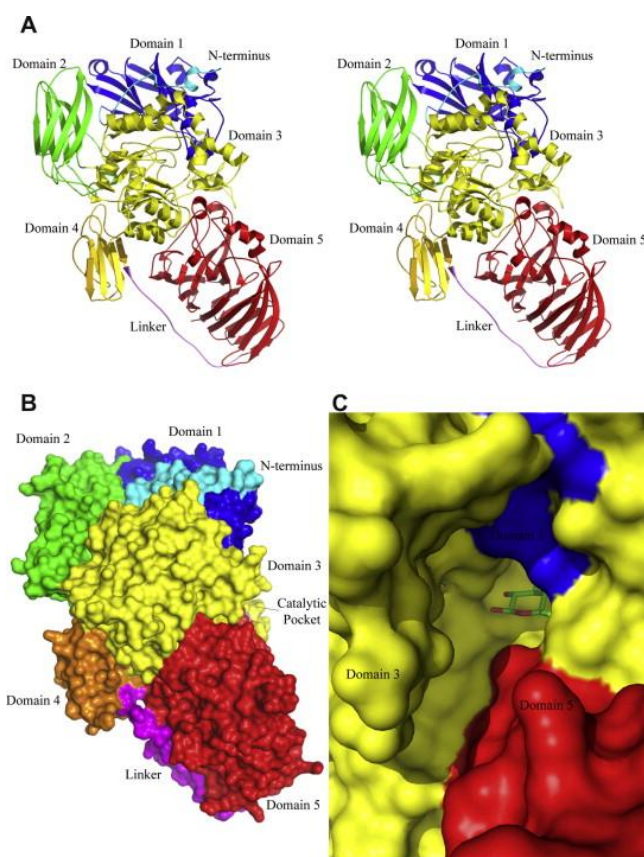
- enzimsku hidrolizu slobodnim ili imobilisanim enzimima ili u enzimskom reaktoru,
- hidrolizu kiselinom ili jonskom izmenom,
- hidrogenaciju (Renner i Abd El-Salam, 1991; Carić i Milanović, 1995).

### Enzimska hidroliza

Enzimska hidroliza laktoze jedan je od najvažnijih biotehnoloških procesa u prehrambenoj industriji. Hidrolizu laktoze katalizuje enzim  $\beta$ -galaktozidaza, čije je sistemsko ime  $\beta$ -D-galaktozid-galaktohidrolaza. Mehanizam delovanja ovog enzima je prikazan na slici 11. Ovaj enzim je grupno specifičan jer katališe hidrolizu  $\beta$ -glikozidnih veza između galaktoze i drugih organskih liganda, a primećena je aktivnost i u hidrolizi arabinozida i fukozida. Ipak, primarna uloga ovog enzima u prirodi je hidroliza laktoze pa se često u literaturi može naći i trivijalni naziv laktaza.  $\beta$  - galaktozidaza (slika 12) hidrolizuje disaharid laktozu do monomera D-galaktoze i D-glukoze (slika 11). Prirodno je prisutan u ljudskom crevu. Veliki deo svetske populacije ima nizak nivo  $\beta$  - galaktozidaze, što dovodi do netolerancije na laktozu i ograničenog konzumiranja mleka i mlečnih proizvoda (Panesar i sar., 2010; Richmond i sar., 1981). Proces hidrolize laktoze enzimom  $\beta$ -galaktozidaza ispitivali su brojni autori (Ladero i sar., 2000; Ladero i sar., 2001; Pessela i sar., 2003; Vasiljevic i Jelen, 2002; Roy i Gupta, 2003; Craven i sar., 1965).



**Slika 11.** Mogući mehanizmi za neutralno-pH  $\beta$ -galaktozidazu: Formiranje galaktozil-enzim kompleksa i oslobađanje glukoze (ROH); prenos galaktozil ostatka do akceptora (R'OH) da bi se formirala slobodna galaktoza ili oligosaharid (Mahoney, 1982)



**Slika 12.** Struktura  $\beta$ -galaktozidaze (Pereira-Rodríguez i sar., 2012)

- (a) Trodimenzionalni prikaz KL- $\beta$ -Gal monomera. Domeni su prikazani različitim bojama. N-terminalni region (crno), domen 1 (plavo), domen 2 (zeleno), domen 3 (žuto), domen 4 (narandžasto), purpurno crveno i domen 5 (crveno).
- (b) Prikaz površine monomera sa obojenim domenima.
- (c) Uvećan izgled vezivnog mesta. Residue domena 1, 5 i najvećim delom 3 grade džep. Ističe se aktivno mesto vezivanja galaktoze.

$\beta$ - galaktozidaza (EC 3.2.1.23) je široko rasprostranjena u prirodi, a enzimi koji su značajni za industriju mleka spadaju u podgrupu laktaze (Dekker i Daamen, 2011).

Sam enzim može biti animalnog, biljnog ili mikrobiološkog porekla (Gavarić, 1995). Najvažniji komercijalni izvori  $\beta$ -galaktozidaze su kvasci *Kluyveromyces fragilis* i *K. lactis*, gljive *Aspergillus niger* i *A. oryzae* i u novije vreme iz bakterije *Bacillus sp.* iz kojih je uspešno izolovan termostabilan enzim (Pereira-Rodríguez i sar., 2012).

Postoje dve grupe industrijske laktaze: neutralna i kisela laktaza. Njihova upotreba se razlikuje u zavisnosti od optimalne pH sredine i stabilnosti. Primenu u industriji mleka ima neutralna laktaza. Sve neutralne laktaze su proizvedene korišćenjem jednog od dve srodne vrste kvasca – *Kluyveromyces lactis* ili *Kluyveromyces fragilis*. Biohemijske osobine ovih enzima su slične, ali mogu imati različit uticaj na kvalitet proizvoda i prodaju se odvojeno (Dekker i Daamen, 2011). Neutralna laktaza iz *Kluyveromyces* kvasaca ima neutralan pH optimum i pogodna je za hidrolizu laktoze u mleku. Temperatura ima značajan uticaj na aktivnost enzima (Matioli i sar., 2001). Neutralna laktaza se brzo denaturiše iznad 40°C, iako mleko može imati donekle stabilišući efekat na enzim. Inaktivacija enzima na temperaturama pasterizacije sprečava prisustvo aktivnog enzima u finalnom proizvodu (Dekker i Daamen, 2011; Mlichova i Rosenberg, 2006; Jurado i sar., 2004).

Enzimi neutralnog pH (6-8) pogodni su i za hidrolizu laktoze u permeatu dobijenom nakon ultrafiltracije slatke surutke, manje su stabilni od fungalnih enzima i koriste se isključivo na nižim temperaturama (30 – 40° C), te postoji mogućnost mikrobiološke kontaminacije. Ovaj nedostatak se može izbeći izvođenjem hidrolize na temperaturi 4 - 6° C u trajanju 16 - 24h čime se mikrobiološke promene minimiziraju. Zbog niskih optimalnih temperatura delovanja i slabije termostabilnosti navedeni enzimi se uglavnom koriste u diskontinualnim procesima hidrolize laktoze. Komercijalni preparati bakterijskih enzima su najbolje rezultate pokazali ukoliko se koriste u imobilisanoj formi (Husain, 2010; Ladero, 2000).

Ispitivanja inhibitornog uticaja na enzim pokazuju da pojedini joni metala (metali cink, bakar  $>5 \times 10^{-4}$  M; slobodni joni kalcijuma u visokim koncentracijama  $>10^{-4}$  M) i galaktoza koja nastaje hidrolizom laktoze ima izražena inhibitorna svojstva, dok glukoza nema značajniji uticaj. Kalijum, magnezijum i mangan stimulišu aktivnost enzima iz kvasca. Kakav će efekat imati joni metala na enzim zavisi i od toga da li se hidroliza vrši u mleku ili je neki drugi izvor laktoze (surutka, permeat) (Dekker i Daamen, 2011).

Korišćenje  $\beta$ -galaktozidaze u slobodnom stanju, za hidrolizu laktoze, je ekonomski opravdano za industrijska postrojenja malog kapaciteta i za specijalne namene kao npr. za

proizvodnju raznih smeša na bazi slatke surutke, dok u svim drugim slučajevima, čak i ako se enzim dodaje u membranskom (UF) reaktoru, ova tehnika nije doživela širu primenu, ne samo zbog gubitka enzima u procesu hidrolize već i zbog rizika da prisutni enzim u proizvodu izazove neželjene promene (Renner i Abd El-Salam, 1991). Da bi se navedeni problemi prevazišli, razvijena je i usavršena tehnika aplikacije imobilisanih enzima u diskontinualnom ili kontinualnom postupku, pri čemu se postiže stepen hidrolize laktoze 70 – 75 %, ili čak 87 – 100 % ukoliko se prethodno permeat koncentriše do oko 15 % sadržaja laktoze.

Upotreba imobilizovane galaktozidaze je povoljnija od primene slobodnog enzima. Pruža mogućnost kontinualne obrade, tako da je laka regeneracija imobilizovanog enzima i nizak nivo troškova u industrijskoj preradi (Panesar, 2006). Takođe otklanja potrebu za razdvajanjem ćelije od permeata nakon obrade i poboljšava stabilnost enzima. Iz tih razloga, imobilisana  $\beta$  - galaktozidaza danas se preporučuje za upotrebu u procesu hidrolize laktoze ([www.sprinttechnologies.com](http://www.sprinttechnologies.com); Grosová i sar., 2008).

Enzimski tretman mleka i permeata smanjuje sadržaj laktoze i povećava mogućnosti za njihovu upotrebu, a takođe smanjuje problem nerastvorljivosti i nedostatak slasti laktoze. Osim toga, mleko i permeat postaju pogodnija hrana koja je dostupna većem broju odraslih i dece koji su na laktozu netolerantni. Hidroliza permeata pretvara laktozu u veoma koristan proizvod poput slatkog sirupa, koji može da se koristiti u raznim procesima proizvodnje u industriji mleka, konditorskoj industriji za pripremu slatkiša, pekarskoj industriji u nekim industrijama pića (Dekker i Daamen, 2011; German, 1997; Nijipels, 1981).

### **Hemijska hidroliza laktoze**

Hemijski put za hidrolizu laktoze je poznat još od početka 20. veka. Zahteva izuzetno kiselu sredinu ( $\text{pH} < 1,5$ ) i vrlo visoke temperature (do  $150^\circ \text{C}$ ) (Coughlin i Nickerson, 1975). Kao alternativa enzimskoj hidrolizi laktoze, ovaj pristup je privukao i obnovio interesovanje u Australiji, Holandiji, Novom Zelandu (de Boer i Robbertsen, 1981; Haggett, 1976; MacBean i sar., 1979) patentiran je (Block, 1952), ali je ograničena industrijska primenljivosti.

Za hidrolizu laktoze koriste se jake kiseline ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) jer je otpornija na ovaj način hidrolize od nekih drugih disaharida, npr. saharoze. Brzina hidrolize zavisi od koncentracije kiseline i temperature s tim što se ne koriste  $t > 100^\circ \text{C}$  jer tada nastaje niz jedinjenja koja pogoršavaju senzorna svojstva (Ganzle, 2008).

## Intolerancija na laktozu

Laktoza je od suštinskog značaja za ishranu novorođenčeta, čiji je jedini izvor hrane mleko. Ovaj disaharid hidrolizuje na monosaharide glukozu i galaktozu, od strane enzima tankog creva - laktaze. Enzim se nalazi na resicama tankog creva, na apikalnoj "trepljastoj površini" apsorpcionih ćelija enterocita. Nastali molekuli glukoze i galaktoze se zatim apsorbuju u enterocite preko specifičnog molekula transportera. Sisari ne mogu apsorbovati disaharide u intestinalnom traktu dok se oni prvo ne hidrolizuju u tankom crevu na monosaharide (Swallow, 2011).

Sinteza laktaze počinje u 6. - 8. nedelji fetalnog života, a zatim postupno raste i punu aktivnost dostiže u 35. nedelji fetalnog života (Lacroix i sar., 1984). Kod većine sisara aktivnost laktaze najveća je u perinatalnom razdoblju, ostaje visoka tokom dojenja, a maksimalna sposobnost hidrolize laktoze iznosi oko 60 g/dan, što odgovara količini jedne litre majčinog mleka (Jurčić i Oberiter, 1996). Njeno ponašanje u godinama koje slede zavisi od etničke pripadnosti podneblja (Karry i sar., 2001).

Maldigestija laktoze se intenzivno istražuje od njenog otkrića 1960-ih (Vesa i sar., 2000). Većina svetske populacije posle detinjstva izgubi deo aktivnosti laktaze u tankom crevu (Harju i sar., 2012; Brown-Esters i sar., 2012) tako da je netolerancija na laktozu uobičajen gastrointestinalni poremećaj prisutan u celom svetu (Mądry i sar., 2010).

Učestalost slabljenja aktivnosti enzima je veoma varijabilna, u rasponu od 5% u severozapadnoj Evropi do skoro 100 % u nekim azijskim populacijama (Svallov, 2003; Itan i sar., 2010). Procenjuje se da se netolerancija na laktozu javlja u 70 % svetske populacije odraslih i Istočna Azija ima najveći broj laktoze malapsorpcije sa više od 90 % stanovništva (Husain, 2010). U Africi, sa izuzetkom bele rase i nekih populacija, nakon 3. - 5. godine života aktivnost laktaze gotovo sasvim slabi, pa su stoga odrasle osobe "prirodno u deficitu" enzima.

Pojedinci koji su netolerantni na laktozu imaju tendenciju da izbegavaju konzumiranje mlečnih proizvoda pa nedavni rezultati pokazuju da je netolerancija na laktozu bitan faktor rizika za razvoj osteoporoze (Barling, 2012; Babu i sar., 2010). Shodno tome, postoji značajano tržište za mlečne proizvode bez laktoze, koji se mogu dobiti enzimskom hidrolizom korišćenjem  $\beta$ - galaktozidaze.

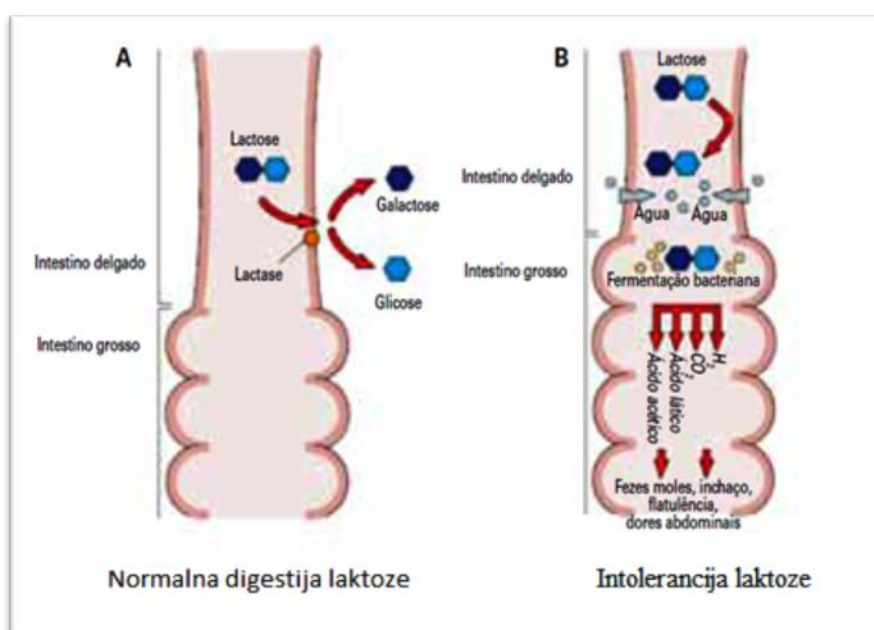
Prema uzroku postoje tri glavne vrste netolerancije na laktozu (tabela 14) (Rusynyk i Still, 2001; Jujajun i sar., 2011). Urođena netolerancija je izuzetno retka, a klinički simptomi se pojavljuju nakon prvog hranjenja novorođenčeta. Sekundarna intolerancija na laktozu prati

bolesti koje izazivaju oštećenja apikalne površine enterocita, gde se nalazi laktaza. Ova netolerancija je reverzibilna i prestaje sa regeneracijom crevne mukoze. Primarna netolerancija javlja se najčešće kod odraslih i povezana je sa hipolaktazijom (Lember, 2012). To je fiziološko stanje, a njene predispozicije su nasleđene i utiče na većinu svetske populacije (Jankowiak i Ludwig, 2008).

**Tabela 14.** Nedostatak  $\beta$ - galaktozidaze (Rusnyk i Still, 2001)

Deficit $\beta$ - galaktozidaze	
Tipovi	Uzroci
Urođen	Aktivnost enzima odsutna od rođenja
Primaran	Genetski predodređena smanjena enzimska aktivnost tokom detinjstva ili adolescencija
Sekundaran	Redukovana aktivnost enzima kao odgovor na razne bolesti creva, rotavirus, osip, celijakija, porast bakterija, Kronova bolest,

Nehidrolizovana laktoza u tankom crevu izaziva povećanje osmotskog pritiska i zajedno sa bakterijskim metabolitima igra važnu ulogu u nastanku klasičnih simptoma netolerancije (slika 13). Bez obzira na to koji je uzrok smanjene aktivnosti laktaze, nehidrolizovani i neresorbovani molekuli laktoze nakupljaju se u crevnom lumenu i povećavaju osmotski pritisak (Kerner, 1995). U kolonu laktoza fermentira do kratkolančanih masnih kiselina (octena, maslačna, propionska) i mlečne kiseline, uz oslobađanje CO<sub>2</sub> i vodonika (Schmitz, 1991).



**Slika 13.** Intolerancija laktoze (www.haspi.org/curriculum-library.com)

Simptomi netolerancije obuhvataju bol u stomaku, dijareja, nadimanje (Fidler i sar., 2009; Matthews i sar., 2005; Campbell i sar., 2005). Simptomi imaju tendenciju da se javljaju između 30 min i 2 h nakon uzimanja hrane koja sadrži laktozu (Rusynk i Still, 2001).

Prema literaturnim podacima većina ljudi osetljivih na laktozu može uzimati do 14 g laktoze dnevno bez ikakvih simptoma. Ozbiljnost simptoma zavisi i od stope pražnjenja želuca, dužine vremena prolaska sadržaja kroz creva i mikroflore kolona. Konzumacija laktoze preko viskoznijih proizvoda kao jogurt izazivaće manje probleme zbog delimične hidrolize laktoze nego upotreba mleka i tečnih mlečnih proizvoda (Dekker i Daamen, 2011).

### **Primena laktoze i hidrolizovane laktoze**

Laktoza ima višestruku primenu u prehrambenim proizvodima. Jedna od najvažnijih je u proizvodnji infant formula i dečje hrane (Yang i Silva, 1995). Takođe primenjuje se i u: konditorskim proizvodima, za sprečavanje lepljenja u visokoj relativnoj vlažnosti, za sprečavanje zgrudvavanja proizvoda u prahu, za određene vrste glazura, kod slatkiša popravljajući konzistenciju i trajnost, u cilju nastanka Maillard-ove reakcije ukoliko je poželjno. U pekarskim proizvodima povoljno deluje sem pomenutih osobina i na aromu, izgled i sposobnost za prženje. Služi kao nosač isparljivih aroma, kao skupljač neželjenih aroma, kao zaslađivač u proizvodima gde treba istaći ukus samog proizvoda, u proizvodnji chips-a, sosova, preliva za salate, pudinga i dr. Primenjuje se i u farmaceutskoj industriji (Harper, 1992).

Glavna upotreba hidrolizovane laktoze je za ublažavanje problema malapsorpcije. Potencijalna industrijska primena hidrolizovane laktoze je kako u preradi mleka tako i valorizaciji i iskorišćenju sporednih proizvoda industrije mleka. Neke od mogućnosti za upotrebu hidrolizovane laktoze su: hidroliza laktoze u tečnim mlečnim proizvodima, kontrola kristalizacije laktoze u koncentrovanim mlečnim proizvodima (sladoled, zaslađeno kondenzovano mleko), upotreba permeata i surutke (hrana i neprehrambena upotreba), upotreba za formulacije hrane za životinje, proizvodnja oligosaharida i exo-polisaharida, nove ideje kombinovane sa hidrolizovanom laktozom i razvoj ukusa, novi/modifikovani proizvodi (namazi, pića, poslastice zasnovane na mleku) (Gänzle i sar., 2008). S obzirom na široke mogućnosti primene hidroliza laktoze je još uvek nedovoljno iskorišćen proces.

U drugoj polovini 20. veka teorijski jednostavan, ali industrijski i posebno ekonomski izazovan proces hidrolize laktoze za proizvodnju sirupa za zaslađivanje dobija na značaju

(tabela 15). Ciljevi ovih industrijskih kretanja su da koriste laktozu kao zaslađivač i da omogući fermentaciju laktoze putem mikroorganizama. Hidroliza laktoze na monosaharidne komponente glukozu i galaktozu omogućava primenu tog sirupa kao zaslađivača u proizvodnji sladoleda i drugih mlečnih i nemlečnih proizvoda i u drugim granama prehrambene industrije. *Saccharomyces cerevisiae* i većina drugih vrsta kvasaca su laktoza - negativni i hidroliza laktoze je preduslov za konverziju permeata ili surutke u druge proizvode npr. pekarski kvasac, hrana za životinje zasnovana na biomasi kvasaca, etanol ili druge konverzije (Geilman, 1993; Gekas i Lopez-Leiva, 1985; Harju, 1987; Shukla, 1975).

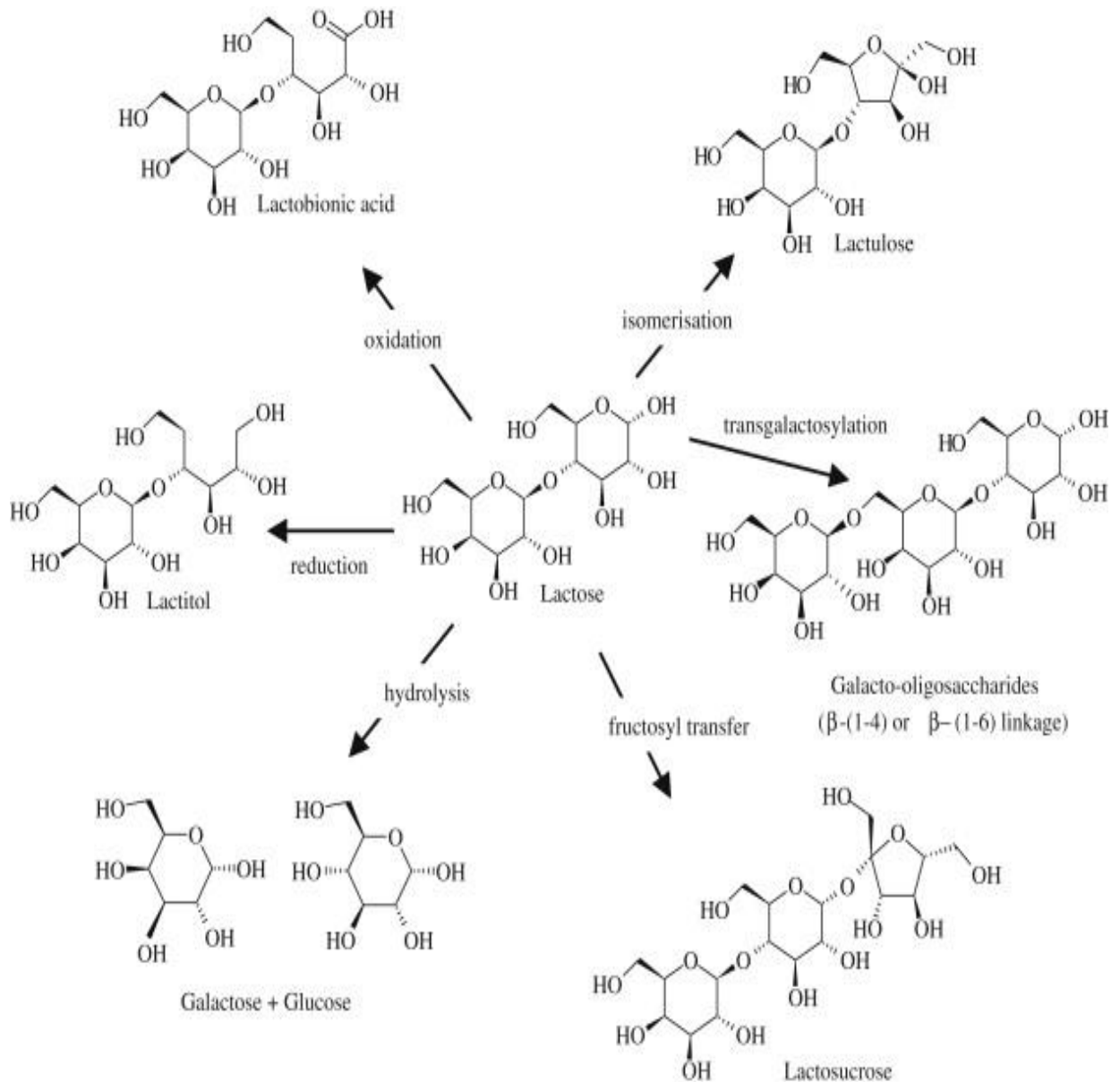
**Tabela 15.** Tehnološka alternativa za proizvodnju sirupa kao zaslađivača na bazi hidrolizovane laktoze (Gänzle i sar., 2008)

Procesi	Glavne karakteristike
Hidroliza katalizovana kiselinom	pH<1,5
Direktno dodavanje kiseline	Temperatura ~90° C
Jonoizmenjivačke smole	Temperatura ~150° C
Imobilizovani enzim	Reaktor koji sadrži imobilizovani enzim
Membranski u enzimskom reaktoru	Hidroliza slobodnim enzimom sa odvajanjem enzima i ponovnom upotrebom
Slobodni (rastvorljivi) prečišćen enzim	Jednokratna upotreba enzima sa dodatkom u svakoj seriji i bez regeneracije

Surutka sa hidrolizovanom laktozom uspešno se može koristiti za: bezalkoholne napitke i voćne sokove, fermentisane alkoholne napitke, stočnu hranu (zamena mleka za telad) i dr. Koncentrat surutke ili permeata sa hidrolizovanom laktozom može se koristiti za izradu: sirupa za kolače ili biskvite, čokolade ili karamela, sladoleda, raznih deserata i dr.

Samo mali deo laktoze se koristi kao sirovina za hemijsku, enzimsku ili mikrobiološku konverziju na derivate laktoze. Međutim, na tržištu vrednost derivata je znatno veća od laktoze i ova jedinjenja predstavljaju mogućnosti za konverziju laktoze do funkcionalnih sastojaka hrane. Komercijalno proizvedeni derivati laktoze prikazani su na slici 14 (Gänzle i sar., 2008).





**Slika 14.** Komercijalno proizvedeni derivati laktoze (Gänzle i sar., 2008).

Iako je potražnja za laktozom visoka u poslednjih nekoliko godina, još uvek ne postoji unosno tržište za sve potencijalne primene laktoze. Kako odlaganje surutke ili permeata u vodotokove nije dozvoljeno i nije profitabilno kao postupak za njihovu obradu koji je najviše u primeni pokazao se postupak enzimske hidrolize laktoze na glukozu i galaktozu.

## MATERIJAL I METODI

### MATERIJAL

#### Permeat

Za proizvodnju napitaka na bazi komponenata mleka korišćen je permeat koji se dobija ultrafiltracijom mleka sa 3,7 % mlečne masti pri proizvodnji feta sira i mladog sira, proizvođača A.D. "MLEKARA" Šabac. Uređaj za ultrafiltraciju, (proizvođača DDS Danska, membrane polisulfonske, pločasti modul), ima kapacitet 5000 l mleka/h, a u jednoj smeni može se obradi oko 20000 l mleka od čega se dobije 4500-4800 l koncentrata i oko 15000-16000 l permeata.

#### Enzim

Enzim  $\beta$  - D - galaktozidaza, proizvođača DSM Food Specialties Holandija, korišćen je za hidrolizu laktoze u permeatu. Komercijalni naziv enzima je Maxilact® LG 5000 (šifra proizvoda EC 3.2.1.23), izolovan iz kvasca *Kluyveromyces lactis*, u tečnom stanju i čuvan u frižideru na 4° C. Aktivnost enzima je 5000 prirodni laktaza jedinica (Natural Lactase Unit - NLU) po gramu enzima (1 NLU: masa komercijalnog enzima koja proizvodi 1  $\mu$ mol ONP (orto - nitrofenol) iz rastvora ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid) pod standardnim uslovima.

#### Voćni dodaci

Za proizvodnju napitaka na bazi komponenata mleka, u laboratorijskim uslovima, pored hidrolizovanog permeata korišćeni su voćni dodaci:

- baza pomorandže (10 g/l, proizvođača Dohler, Nemačka),
- baza pomorandža/šargarepa(30 g/l),
- multivitaminska baza (30 g/l),
- šumsko voće (30 g/l) i
- crveno voće (20 g/l) proizvođača Frutarom Etol, d.o.o. Slovenija.

## PROIZVODNJA NAPITAKA OD PERMEATA I HIDROLIZOVANOG PERMEATA

U cilju razvoja tehnološkog procesa proizvodnje napitaka od permeata istraživanja u okviru doktorske disertacije su podeljena u tri odvojene ali povezane celine označene kao eksperiment I, II i III.

### Eksperiment I

U prvom eksperimentu proizvedene su dve vrste napitaka od permeata koji su obeleženi kao napitak I i napitak II. Za proizvodnju napitka I na bazi UF permeata mleka, u laboratorijskim uslovima, pored permeata korišćene su sledeće komponente: baza pomorandže, šećer saharoza, voda, stabilizator pektin i limunska kiselina (E330) za korekciju kiselosti. Formulacija smeše data je u tabeli 16. Mešavina vode, šećera i stabilizatora je termički tretirana na temperaturi od 60° C, zatim je dodat permeat i baza pomorandže. Posle mešanja, smeša je termički tretirana na 93-95° C, pa ohlađena na 20° C. Pomoću limunske kiseline podešen je pH napitka na 3,75 i vršeno je pakovanje i skladištenje u frižideru na 4° C.

U sastav drugog napitka takođe ulaze: baza pomorandže i limunska kiselina. Napitak II proizveden od permeata koji je termički tretiran na 80° C u toku 2-3 minuta, zatim ohlađen na temperaturu 40° C, pa je dodat enzim Maxilact u koncentraciji 0,5 g/100g. Nakon 4 sata izvršena je inaktivacija enzima u permeatu na temperaturi 80° C, 1 minut. Baza pomorandže je dodata u ohlađen permeat i potom je podešen pH pomoću limunske kiseline na vrednost 3,9 (tabela 16). Zatim je izvršena sterilizacija na temperaturi 110° C, 3 sekunde, hlađenje i pakovanje u tetra pak ambalažu (250 ml). Nakon pakovanja uzorci su čuvani na temperaturi 6° C.

**Tabela 16.** Sastojci napitaka od permeata

Sastojci (g/100g)	Uzorci	
	Napitak I	Napitak II
Permeat	50	85
Voda	35	-
Baza pomorandže	10	12
Saharoza	5	-
Enzime Maxilact	-	0,5
Stabilizator	0,5	-

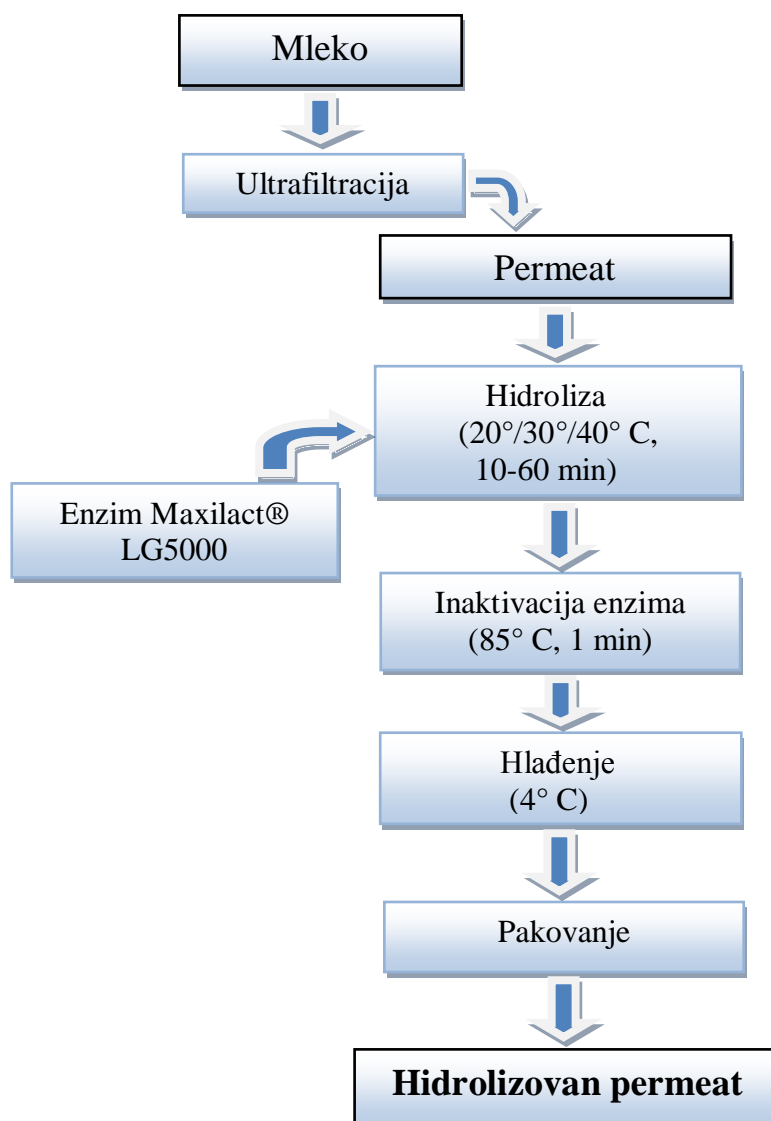
## Eksperiment II

Drugi eksperiment obuhvatio je ispitivanje uticaja različite koncentracije enzima i temperature na stepen hidrolize laktoze u permeatu i analizirana je kinetika hidrolize laktoze. Hidroliza laktoze u permeatu izvršena je dodatkom enzima  $\beta$  – galaktozidaze koncentracije 0,1; 0,3 i 0,5 g/100g na temperaturi 20°, 30° i 40° C tokom 60 min. Stepen hidrolize laktoze (X) izražen je na sledeći način:

$$X = \frac{C_{\text{glukoze}} + C_{\text{galaktoze}}}{C_{\text{laktoze}} + C_{\text{glukoze}} + C_{\text{galaktoze}}}$$

gde je C koncentracija u reakcionoj smeši (Mehaia i sar., 1993).

Tehnološki proces enzimske hidrolize laktoze prikazan je na slici 15.



**Slika 15.** Tehnološki proces enzimske hidrolize laktoze u permeatu mleka

U cilju egzaktno analize uticaja koncentracije enzima i vremena hidrolize na odabrane karakteristike permeata, formulisan je odgovarajući matematički model koji povezuje nezavisno promenljive veličine i funkcije - odabrane karakteristike hidrolizovanog permeata na odgovarajućoj temperaturi. U skladu sa planiranim eksperimentom za odabrani kvadratni model, potrebno je odrediti linearne, kvadratne i koeficijente interakcije u sledećem modelu:

$$Y = b_0 + \sum b_1 X_1 + \sum b_2 X_2 + \sum b_{11}^2 X_{11}^2 + \sum b_{22}^2 X_{22}^2 + \sum \sum b_{12} X_1 X_2$$

gde su:

Y - odzivna funkcija,

X - procesni parametri (koncentracija enzima, vreme hidrolize),

$b_0$  - odsečak,

$b_1$  - linearni koeficijent,

$b_2$  - linearni koeficijent,

$b_{11}$  - kvadratni koeficijent,

$b_{22}$  - kvadratni koeficijent,

$b_{12}$  - koeficijent interakcije.

Broj eksperimenata (n) za dobijanje kvadratnog modela dat je izrazom:

$$n = 2 * k * (k - 1) + C$$

gde su:

k - broj eksperimentalnih faktora (promenljivih)

C - ponavljanja u centralnoj tački.

Korišćen je eksperimentalni plan sa dva faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Faktori i njihovi nivoi su:

- koncentracija enzima (0,1; 0,3 i 0,5 g/100g),
- vreme trajanja hidrolize (10, 30 i 60 min).

Adekvatnost modela je ocenjena na osnovu koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) i p vrednosti. Rezultati su statistički obrađeni i grafički prikazani 3D dijagramima pomoću metode odzivnih površina (*Responce Surface Methodology* – RSM) i primenom kompjuterskog softvera Statistica 7.

Za svaki od eksperimentalnih uslova praćena je promena koncentracije laktoze, galaktoze i glukoze u permeatu tokom vremena hidrolize (10, 30 i 60 min) pri odgovarajućoj temperaturi hidrolize (20°, 30° i 40° C).

Ispitana je mogućnost primene kinetike prvog reda na reakciju enzimske hidrolize laktoze u permeatu mleka, kao i Arenijusove jednačine za određivanje energije aktivacije.

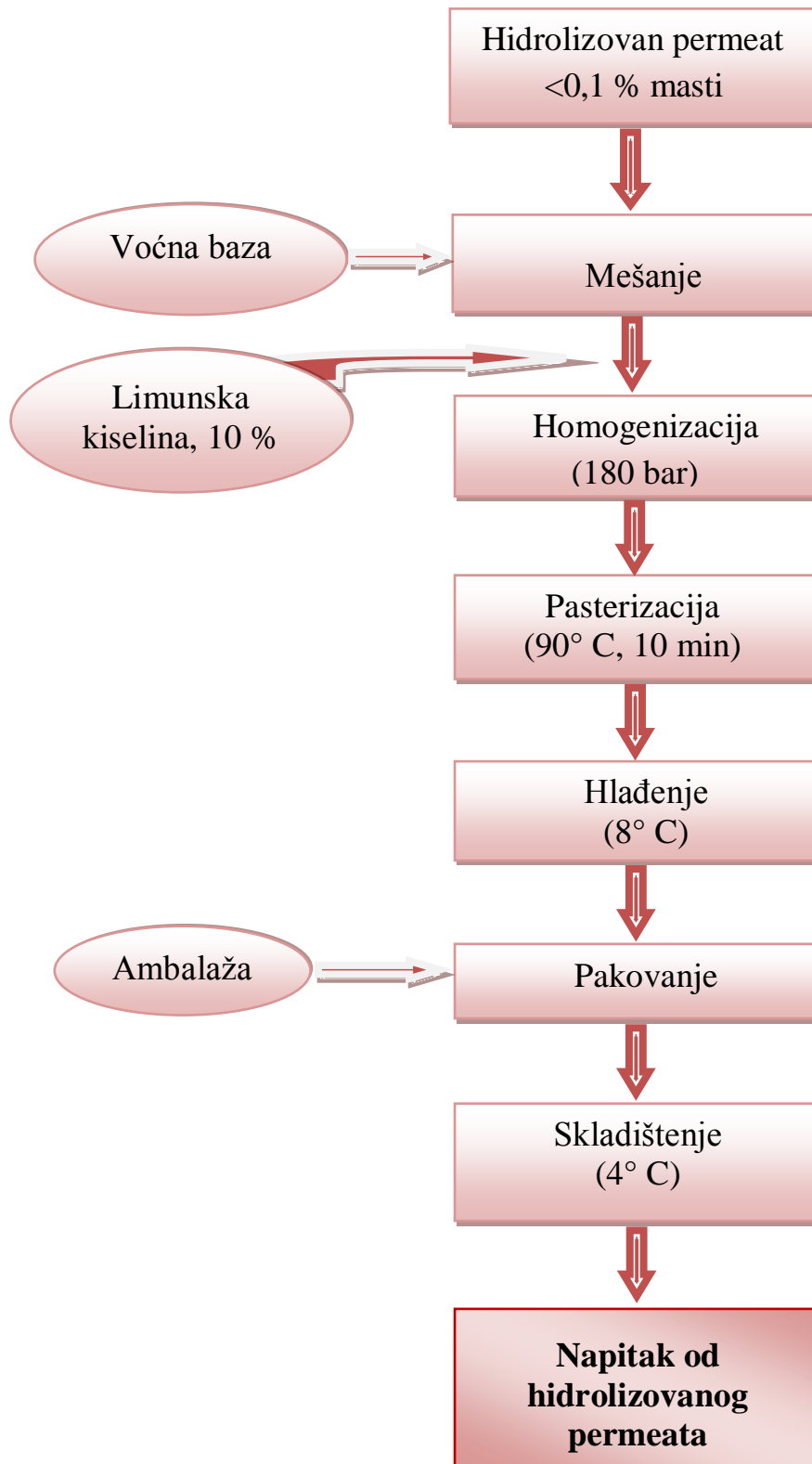
### **Eksperiment III**

U trećem eksperimentu izvršena je proizvodnja napitaka od hidrolizovanog permeata sa odabranim voćnim dodacima. Za pripremanje napitaka korišćen je prethodno proizveden hidrolizovani permeat sa < 0,1 % masti dobijen hidrolizom na temperaturi 40° C sa dodatkom enzima 0,1 g/100g (Eksperiment II, slika 15). Proizvedena su četiri napitka na bazi hidrolizovanog permeata sa četiri vrste voćnih dodataka:

- Napitak pomorandža / šargarepa sa dodatkom 3% voćne baze pomorandža / šargarepa;
- Napitak multivitamin sa dodatkom 3 % voćne baze multivitamin;
- Napitak crveno voće sa dodatkom 2 % voćne baze crveno voće i
- Napitak šumsko voće sa dodatkom 3 % voćne baze šumsko voće.

Ispitan je pH sastavljene smeše i podešen dodatkom 10 % rastvora limunske kiseline do pH 4,0. Homogenizacija je izvršena na laboratorijskom homogenizatoru (model MINI-LAB, tip 8.30H, firme Rannie, Danska) pri 180 bar. Uzorci napitaka su zatim pasterizovani na temperaturi 90° C, 10 min, potom ohlađeni i pakovani u odgovarajuću ambalažu (polipropilenske čaše). Tehnološki postupak proizvodnje napitaka na bazi hidrolizovanog permeata prikazan je na slici 16.

Uzorci su čuvani do trenutka analize u frižideru na 4° C. Za analize uzimani su uzorci napitaka nakon proizvodnje i tokom skladištenja u sledećim intervalima: 15, 30, 45 i 60 dana.



**Slika 16.** Tehnološki proces proizvodnje napitaka od hidrolizovanog permeata

## METODI

### **Analiza kvaliteta mleka, permeata, voćnih dodataka, hidrolizovanog permeata i napitaka od permeata i hidrolizovanog permeata**

Analiza fizičko–hemijskog kvaliteta mleka, permeata dobijenog UF mleka, voćnih baza i napitaka izvršena je primenom standardnih metoda analize (Carić i sar., 2000):

- **pH vrednost** – merena je korišćenjem laboratorijskog pH metra EcoScan, Holandija,
- **Suva materija** (SM) – sadržaj suve materije određen je direktnom metodom sušenja na temperaturi  $102 \pm 1^\circ\text{C}$  (IDF/ISO 21A:1982);
- **Mlečna mast** (MM) – sadržaj mlečne masti određen je metodom po Gerberu (IDF 105:1985);
- **Ukupni proteini** (UP) – sadržaj proteina određen je metodom po Kjeldahl-u (IDF 20:1962);
- **Pepeo** (Pe) – sadržaj pepela određen je metodom žarenja na temperaturi  $550^\circ\text{C}$  (IDF 90:1979);
- **Energetska vrednost** napitaka od permeata u 100 grama proizvoda izračunata je na sledeći način:

$$EV=(\% \text{ proteina} \times 4,4 + \% \text{ mlečne masti} \times 9,3 + \% \text{ ukupnih šećera} \times 4,1) \times 4,186 \text{ [kJ}100\text{g}^{-1}\text{]}$$

- **Šećeri**

Šećeri (laktoza, glukoza, galaktoza) određeni su primenom tečne hromatografije (High Performance Liquid Chromatografy – HPLC) Agilent Technologies 1200 Series sa ELSD (Evaporative Light Scattering detektorom) i Zorbax Carbohydrate Column (4.6x250mm. 5  $\mu\text{m}$ ) (Agilent Technologies). U odmerni sud od 25 ml odmereno je tačno 5g uzorka, a zatim su razblaženi sa 10 ml bidestilovane vode. Rastvori su inkubirani u vodenom kupatilu na  $50^\circ\text{C}$  tokom 15 min. Posle hlađenja dodato je 0,5 ml Karez I , 0,5 ml Karez II i 1 ml 100 mM NaOH. Posuda je dopunjena bidestilovanom vodom, nakon ručnog mućkanja uzorci su filtrirani kroz filter papir br. 381. U epruveti je pomešano 3 ml acetonitrila (Mallinckrodt Baker B. V, Holandija) i 10 ml profiltriranog uzorka. Dobijen filtrat (10  $\mu\text{l}$ ) je profiltriran kroz filter prečnika pora 0,45  $\mu\text{m}$  (CHROMAFIL RC-45/25) i u aparat je injektovano autosemplerom. Korišćena je mobilna faza acetonitril/voda (70/30 v/v) sa izokraskim



protokom od 1 ml/min. Hromatografisano je na sobnoj temperaturi i vreme rada je 15 min. Parametri detektora su bili sledeći: temperatura  $40 \pm 1^\circ \text{C}$ , pritisak azota:  $4,5 \pm 0,1 \text{ bar}$ .

- **Vitamin C**

Određivanje je izvršeno primenom tečne hromatografije (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Korišćen je sistem Agilent 1100 SAD, sa petljom injektora od 20  $\mu\text{l}$ , C-18 kolonom, prečnika čestica 5  $\mu\text{m}$ , i UV-DAD detektorom. Kao mobilna faza korišćen je rastvor amonijak - acetata (0,1 M, pH=5,1) protoka 0,4 mlmin<sup>-1</sup> a temperatura kolone je bila 37° C. Analize su trajale 4 minuta i ponavljane su tri puta.

Odmereno je 5 g uzorka u odmerni sud od 50 ml koji je do crte dopunjen 3% -nim rastvorom meta-fosforne kiseline u 8 %-noj sirćetnoj kiselini. Takav rastvor je ručno mućkan, odnosno vitamin C ekstrahovan, tokom 5 minuta. Nakon toga je rastvor profiltriran kroz filter hartiju plava traka, a zatim fino prečišćen propuštanjem kroz membranski filter, prečnika pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Econofilter, Agilent). Filtrat je analiziran tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (Malbaša i sar., 2009).

- **Vitamini B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub>**

Sadržaj vitamina B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub> analiziran je primenom reverzno-fazne tečne hromatografije uz fluorescentni detektor – metod HCTM-01, HCTM-02. Karakteristike HPLC sistema su: pumpa Waters M600, izokratsko eluiranje; injektor Rheodyne 7125, petlja 20  $\mu\text{l}$ ; analitička kolona RADIAL-PAK<sup>TM</sup> ketridž 5NVC184; detektor RF-535 Shimadzu, Fluorescence HPLC monitor; akvizicija/obrada podataka Shimadzu C-R4A, CROMATOPAC; špric filter hidrofilni sa veličinom pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Uslovi merenja su: mobilna faza (300 ml CH<sub>3</sub>OH + 770 ml 5mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>); protok 1,0 ml/min; temperatura kolone 20° C.

- **Antioksidativna aktivnost**

Antioksidativna aktivnost određena je testom radikalne inhibicije (DRI) uz pomoć 1,1-difenil-2-pikrihidrazila (DPPH) (Apostolidis i sar., 2007). Pripremani su ekstrakti za svaki uzorak (Shori i Baba, 2013). Odmereno je 10 g uzorka i homogenizovano sa 2,5 ml (sterilisane) dH<sub>2</sub>O. Vrednost pH je podešena na 4,0 sa 0,1 M HCl, uzorci su potom zagrejani na 45° C u vodenom kupatilu, pa centrifugirani 10 min na 5000 o pri 4° C. Supernatant je odvojen i vrednost pH podešena na 7,0 sa 0,1 M NaOH pa ponovo centrifugiran (5000 o, 10 min, 4° C). Supernatant je zatim skladišten na - 20° C do njegove upotrebe. 250  $\mu\text{l}$

pripremljenog ekstrakta pomešano je sa 3 ml 60 mmol/l DPPH u metanolu (p.a., Sigma-Aldrich, Nemačka) i ostavljeno je 60 min na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Potom se prati smanjenje absorbance na 517 nm (T80/T80+ UV-Vis Spectrofotometer PG instrument LTD) do postizanja konstantne vrednosti. Kontrolni uzorak se sastojao od 250 µl destilovane vode umesto ekstrakta (Amirdivani i Baba, 2011). Vrednosti absorbance ekstrakta i kontrolnog uzorka koriste se pri izračunavanju % inhibicije pri oksidaciji DPPH po sledećoj formuli (Apostolidis i sar., 2007):

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ ekstrakt}}{A \text{ kontrol}} \times 100$$

gde je

A kontrol – absorbanca kontrolnog uzorka,

A ekstrakt – absorbanca ekstrakta uzorka.

- **Polifenoli**

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola primenjen je metod Folin–Ciocalteu po modifikovanoj metodi (Shetty i sar., 2005).

Ekstrakt je pripreman po istom postupku kao i za određivanje antioksidativne aktivnosti (Amirdivani i Baba, 2011). Odmeri se 1 ml pripremljenog ekstrakta, prenese u epruvetu i pomeša sa 1 ml metanola (pro analysi) i 5 ml destilovane vode. Svakom uzorku doda se 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (razblažen 1:1 sa destilovanom vodom) i pomeša. Nakon 5 min, u prethodno pripremljenu smesu, doda se 1 ml 5 % natrijum karbonata i na sobnoj temperaturi ostavi 60 min. ApSORBANCA se meri na talasnoj dužini 725 nm korišćenjem spektrofotometra (SP6-550 UV/VIS Spectrophotometer, PYE UNICAM, Engleska). Sadržaj polifenola se određuje u odnosu na standardnu krivu galne kiseline. Standardna kriva se utvrđuje koristeći različite koncentracije galne kiseline u metanolu (5 - 60 mg/ml). Rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (GAE).

- **Minerali**

Sadržaj minerala u napicima iz eksperimenta I: **magnezijum, bakar, cink, gvožđe, mangan, kalcijum, kalijum i natrijum** određen je metodom ICP-MS (indukovana kuplovana plazma sa masenim detektorom) uz pripremu uzorka mikrotalasnom digestijom (0,5 g uzorka + 7 ml HNO<sub>3</sub>). Fosfor je analiziran spektrofotometrijskom metodom, a prethodna priprema uzorka je obuhvatila sledeće: pepeo nakon žarenja uzorka rastvara se u hlorovodoničnoj kiseline, rastvoru se dodaje amonijum - heptamolibdat koji sa fosfatima iz

uzorka gradi fosfomolibdani kompleks. Molibden u obliku fosfomolibdata se askorbinskom kiselinom redukuje u molibden-plavo. Njegova apsorpcija je direktno proporcionalna sadržaju fosfora koji se određuje spektrofotometrijski na 720 nm (na uređaju Spektrofotometar „Agilent 8453 UV-VISIBLE“).

Za analizu **natrijuma, kalcijuma i kalijuma** u uzorcima iz eksperimenta III korišćen je plameni fotometar Evans Electroselenium LTD.

Priprema uzoraka za određivanje plamenom fotometrijom izvedena je ekstrakcijom pomoću hlorovodonične kiseline primenom modifikovane metode prema Simpson i Blay (1966). Nakon homogenizacije uzoraka mešanjem, na tehničkoj vagi odmereno je 1,5 g uzorka u erlenmajer i dodato je 10 ml 6M hlorovodonične kiseline. Uzorak je zagrevan od momenta ključanja 10 minuta uz povratni hladnjak. Nakon hlađenja sadržaj erlenmajera je kvantitativno prenet u normalni sud od 50 ml, dodato je 2 ml 10 % rastvora lantana (Lantan (III) oksid, p.a., E. Merck, Darmstadt, Nemačka) (zbog kalcijuma) i nakon toga sud je dopunjen destilovanom vodom do crte. Radi uklanjanja taloga uzorak je filtriran kroz kvalitativnu filter hartiju, te je dobijeni filtrat korišćen za dalju analizu. Kvantitativno određivanje kalijuma, natrijuma i kalcijuma izvedeno je metodom kalibracione krive. Kalibracione krive su definisane za svaki element, kao i za postupak pripreme uzoraka, u cilju izjednačavanja sastava matriksa uzorka i standardnih rastvora, odnosno izvođenja analize standardnih rastvora i uzorka pri istim eksperimentalnim uslovima.

#### • Instrumentalno određivanje boje

Boja je određena fotoelektričnim tristimulusnim kolorimetrom CHROMAMETER CR-400, (Konica Minolta) sa nastavkom CRA33 koji je prethodno kalibrisan. Analiza boje je određena na principu merenja reflektovane boje i razlike boja različitih površina. Za obradu rezultata korišćen je Software Spectromagic NXPRO QC verzija 2.0.

Ukupna promena boje tokom skladištenja u odnosu na standard, izračunata je na sledeći način:

$$\Delta E = \{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2\}^{1/2}$$

gdje su:

$L_0^*$ ,  $a_0^*$ ,  $b_0^*$  parametri za standard, odnosno uzorak nakon proizvodnje koji je uzet kao referentna vrednost,

$L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$  parametri za mereni uzorak.

- **Senzorna analiza**

Senzornu analizu napitaka od hidrolizovanog permeata izvršila je grupa ocenjivača prema petobalnom bod sistemu i opisnom metodom (Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1 do 5. Za senzorne ocene određen je koeficijent važnosti: izgled - 1, boja - 2, sediment - 3, miris - 2 i ukus - 12. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na kvalitet, a izbalansirani da ukupan zbir iznosi 20. Sabiranjem pojedinačnih korigovanih ocena dobija se jedinstven kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet koji se izražava kao % od maksimalno mogućeg kvaliteta. Deljenjem ove vrednosti sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobija se ponderisana srednja ocena, koja takođe izražava sveukupni kvalitet proizvoda.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### EKSPERIMENT I

U cilju valorizacije UF permeata kao sirovine, u prvom eksperimentu, izvršena je proizvodnja napitaka po normativu i tehnološkom procesu navedenim u poglavlju Materijal i metodi (tabela 16). Izvršeno je ispitivanje hemijskog sastava, nutritivne vrednosti i senzornih karakteristika dobijenih proizvoda.

#### Karakteristike mleka, permeata i napitaka od permeata

Rezultati karakteristika mleka, permeata korišćenog za formulaciju napitaka i napitaka od permeata prikazani su u tabeli 17.

pH vrednost komercijalnih sportskih pića kreće se od 3 do 5, ili između 4 i 5, ili vrednosti blizu pH vrednosti slatke surutke. Može se zaključiti da je pH vrednost proizvedenih napitaka unutar opsega datog u literaturi (Đurić i sar., 2004; Beucler i sar., 2005).

**Tabela 17.** Karakteristike mleka, permeata i napitaka

Sastojci g/100g	Mleko	Permeat	Napitak I	Napitak II
Suva materija	12,67 ± 0,01	5,55 ± 0,01	14,78 ± 0,01	12,47 ± 0,01
Mlečna mast	3,7 ± 0,01	< 0,1 ± 0,01	< 0,1 ± 0,01	< 0,1 ± 0,01
Ukupni proteini	3,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,58 ± 0,01
Ukupni šećeri	5,08 ± 0,01	4,87 ± 0,01	11,22 ± 0,01	10,01 ± 0,01
Laktoza	5,47	4,72	2,16	1,83
Pepeo	0,76 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,68 ± 0,01
pH	6,75	6,46	3,75	3,64
Energetska vrednost kJ/100g	288,88	87,27	246,21	203,08

Karakteristike uzorka mleka (tabela 17) su u skladu sa važećim Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Sl. glasnik RS, 33/2010 i 69/2010).

Sadržaj suve materije u analiziranom permeatu je u proseku 5,55 % ± 0,01, a od toga 80-85 % čini laktoza. U napitku proizvedenom iz permeata suva materija prosečno iznosi u

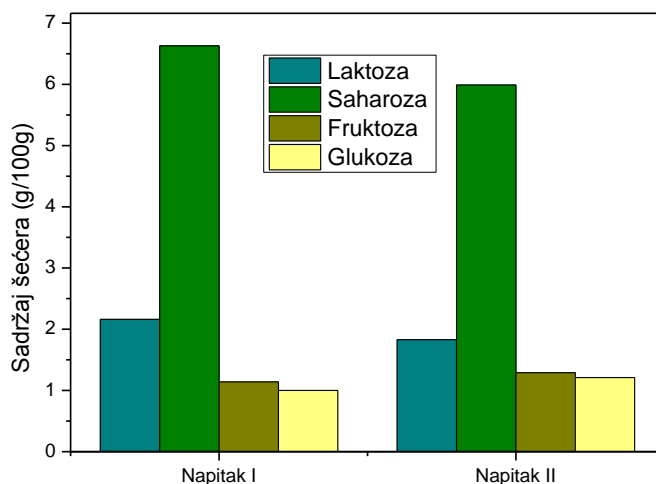
napitku I  $14,78 \% \pm 0,01$ . Ovo povećanje suve materije u odnosu na suhu materiju permeata može se objasniti dodavanjem saharoze i prirodnih šećera prisutnih u voćnoj bazi pomorandže. U drugom napitku (napitak II) srednja vrednost suve materije iznosi  $12,47 \pm 0,01 \%$ .

Vrednosti za sadržaj masti su manje od  $0,1\%$  što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Milanović i Carić, 1990), jer tokom procesa ultrafiltracije mlečna mast ne prelazi u permeat. U proizvedenim napicima sadržaj mlečne masti bio je takođe  $MM < 0,1 \% \pm 0,01$ .

Prosečna vrednost sadržaja pepela u permeatu je  $0,48 \pm 0,01 \%$ , što je u skladu sa prethodnim rezultatima (Milanović i Carić, 1990). Sadržaj pepela u napicima ima srednju vrednost  $0,47 \pm 0,01 \%$  za napitak I i  $0,68 \pm 0,01 \%$  za napitak II. Visok sadržaj pepela koji se unese putem napitaka ovog tipa može poslužiti kao zamena za unos minerala u obliku dijetetskih suplemenata i za povećanje sportskih performansi (Murray i Stofan, 2001).

Sadržaj ukupnih proteina u analiziranim uzorcima permeata prosečno iznosi  $0,20 \pm 0,01 \%$ . Drugi autori su nalazili različite vrednosti sadržaja proteina u permeatu -  $0,25 \%$  (Hattem i sar., 2011), odnosno  $0,31 \%$  (Milanović i Carić, 1990), što se može tumačiti razlikama u selektivnosti membrana i sastavu mleka koje se podvrgava ultrafiltraciji. Količina proteina koji se nalazi u permeatu je značajna zbog mogućnosti uticaja na promenu pH vrednosti tokom termičke obrade permeata. Sadržaj proteina u permeatu važan je i zbog mogućnosti alergijskih reakcija kod preosetljivih osoba (Hattem i sar., 2011).

Sastav i sadržaj šećera prikazan je na slici 17.



**Slika 17.** Sadržaj šećera u napicima od permeata

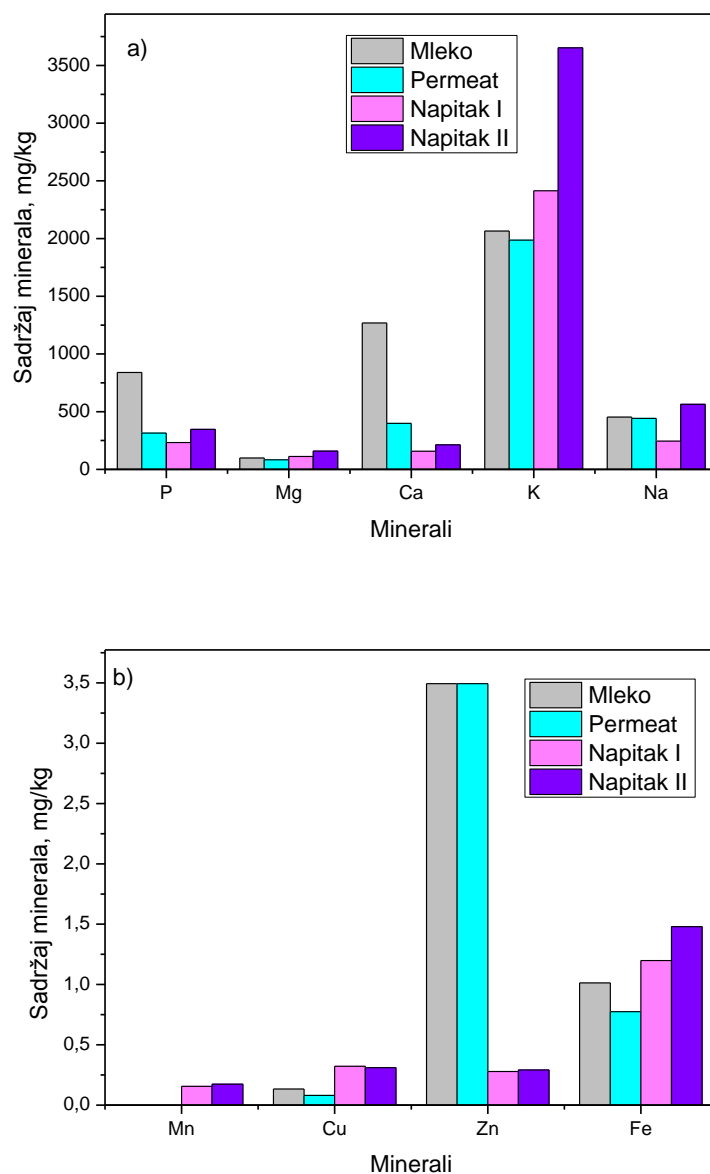
Evidentno je da su između napitaka minimalne razlike u sadržaju fruktoze i glukoze, ali se sadržaj saharoze razlikuje za 10,5 %, a sadržaj laktoze za oko 16 %. Ukupni šećeri prisutni su u manjoj količini u napitku II, što utiče i na njegovu manju energetska vrednost u odnosu na napitak I. Navedene razlike u sadržaju šećera mogu se objasniti činjenicom da je u formulaciji smeše za proizvodnju napitka I dodata saharoza, što je uobičajeno kod proizvodnje napitaka za sportiste (Geilman i sar., 1992). Napitak II proizveden je iz permeata kome je u proizvodnji dodat enzim koji je hidrolizovao laktozu 68% u odnosu na početni stepen u permeatu.

Danas se sve više vodi računa o izbalansiranoj ishrani, pa je u tu svrhu i primena permeata povoljna jer je energetska vrednost ovog proizvoda mala. Energetska vrednost permeata je 87,27 KJ/100g. Energetska vrednost proizvedenih napitaka iznosi: napitak I 246,21 KJ/100g i napitak II 203,08 KJ/100g.

## **Minerali**

Sadržaj minerala u uzorcima mleka, permeata i pripremljenih napitaka prikazan je na slici 18. Svi ispitivani minerali u mleku nalaze se i u permeatu. Sadržaj mangana, cinka, magnezijuma, natrijuma i kalijuma je približno isti u oba uzorka. U uzorku mleka u najvećoj količini zastupljen je kalijum sa 2065 mg/kg, odmah zatim je kalcijum sa 1269 mg/kg, dok u permeatu najviše ima kalijuma 1987 mg/kg, a zatim natrijuma 442,2 mg/kg što daje mogućnost upotrebe permeata kao elektrolitnih napitaka. Najmanje zastupljene mineralne materije u uzorku mleka i permeata su mangan <0,001 mg/kg i bakar kojeg u mleku ima 0,133 mg/kg, a u permeatu 0,081 mg/kg. Rezultati sadržaja minerala u permeatu su u skladu sa literaturnim podacima (Geilman i sar., 1990; Abd El-Khair, 2009).

Ključni faktori za pravilnu formulaciju elektrolitnog napitka su vrsta i količina elektrolita (Abd El-Khair, 2009). Elektroliti su minerali u krvi i drugim telesnim tečnostima koji nose električni naboj. Utiču na količinu vode u telu, kiselost krvi, funkciju mišića ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)).



**Slika 18.** Sadržaj minerala u mleku, permeatu i napicima:

a) P, Mg, Ca, K i Na, b) Mn, Cu, Zn i Fe

U navedenim uzorcima napitaka najzastupljeniji mineral je kalijum, čije vrednosti variraju od 2414 mg/kg (napitak I) do 3653 mg/kg (napitak II). Kalijum je glavni ćelijski katjon i omogućava sprovođenje elektriciteta u organizmu, kao i natrijum, hloridi, kalcijum, magnezijum. Kalijum je važan za pravilne srčane kontrakcije, metabolizam proteina, za pravilno funkcionisanje creva i mišića (Pribiš, 1999). Kalijum i natrijum zajedno imaju, u određenom odnosu, uticaju na regulaciju krvnog pritiska u organizmu (Kanbay i sar., 2013). Izbalansiranom ishranom kalijum se može uneti i preko napitka od permeata, s obzirom da je prisutan u značajnoj količini u proizvedenim napicima. Kod upotrebe jakih diuretika i drugih



lekova koji povećavaju izlučivanje kalijuma iz organizma, da bi se sprečio deficit, potrebno je dodatno unositi ovaj elektrolit (Pribiš, 1999).

Drugi mineral po zastupljenosti u napicima je natrijum, čije vrednosti variraju od 245,2 mg/kg (napitak I) do 563,7 mg/kg (napitak II), a potom fosfor, kalcijum od 157,5 mg/kg (napitak I) do 212,4 mg/kg (napitak II) i magnezijum.

Natrijum je najvažniji elektrolit u sportskim pićima jer je jedan od elektrolita koji se najviše izgubi putem znoja, a ima i najmoćniji uticaj na stimulisanje rehidracije. On takođe pomaže mišićne kontrakcije i prenos nervnih impulsa (Abd El-Khair, 2009).

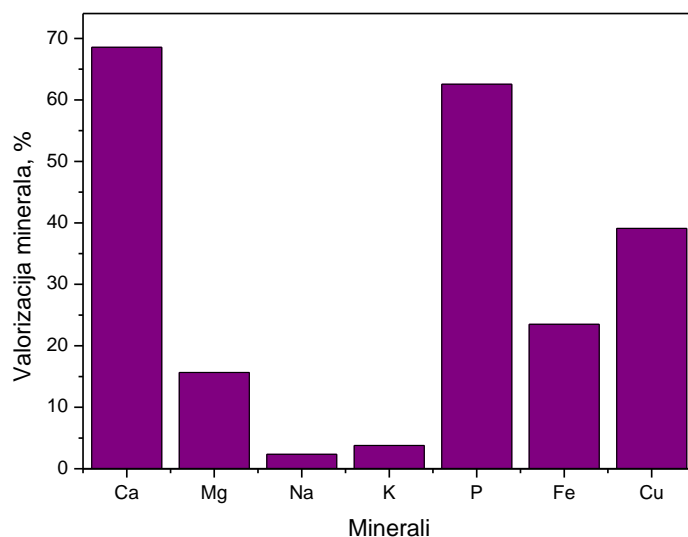
Evidentno je da napitak II sadrži značajno veću količinu magnezijuma, kalijuma i natrijuma nego permeal i mleko. Ova činjenica ukazuje da se putem voća koje ulazi u sastav voćne baze pomorandže, koja se koristi u proizvodnji napitaka, utiče na povećanje navedenih minerala u finalnom proizvodu. Sadržaj natrijuma i kalijuma u napitku II je približno isti kao i kod pojedinih formulacija pića za sportiste (Hattem i sar., 2011).

Ostali analizirani minerali: mangan, bakar, zink i gvožđe zastupljeni su u uzorcima u malim koncentracijama, ali se može uočiti veće prisustvo gvožđa, bakra i mangana u napicima nego u uzorcima mleka i permeata.

Gvožđe spada među najvažnije elemente u organizmu, neophodno je za očuvanje zdravlja, nalazi se u mnogim enzimima, hemoglobinu, mioglobinu. Bakar kao sastavni deo citohroma ulazi u sastav nekih enzima, proteina jetre, potreban je za stvaranje crvenih krvnih zrnaca (Pribiš, 1999).

Imajući u vidu značaj minerala u ishrani može se reći da napici od permeata predstavljaju veoma bogat izvor kalcijuma, kalijuma, natrijuma, magnezijuma i fosfora.

Iskoristljivost minerala (slika 19) varira od minimalno 2,34 % za natrijum, do 62,55 za fosfor i maksimalno 68,57 % za kalcijum.



**Slika 19.** Valorizacija minerala mleka u permeat

## Vitamini

U tabeli 18 prikazan je sadržaj vitamina C i B<sub>2</sub> u analiziranim uzorcima napitka II i zadovoljenje dnevnih potreba kod dece i odraslih konzumiranjem napitka od peremata.

**Tabela 18.** Zadovoljenje dnevnih potreba za vitaminom C i B<sub>2</sub> kod dece i odraslih konzumiranjem napitka

Vitamini	Napitak II Sadržaj vitamina mg/100 ml	DRIs <sup>a</sup> (mg/dan)		Konzumiranje napitka II (g/dan)		Udeo dnevnih potreba koje zadovolji 100 g napitka II (%)	
		Deca	Odrasli	Deca	Odrasli	Deca	Odrasli
<b>C</b>	9,16	40	50	437	546	23	18
<b>B<sub>2</sub></b>	0,49	0.5	1.2	102	245	98	41

<sup>a</sup>DRIs (Dietary Reference Intakes) – set standarda za unos nutrijenata radi planiranja i ocene dijete za zdravu populaciju u SAD i Kanadi (Smolin i Grosvenor, 2000)

Vitamin C poznat kao askorbinska kiselina u biohemijskim reakcijama predstavlja donator elektrona pri čemu doprinosi formiranju hemijskih veza gradeći čvršće veze između molekula kolagena unutar tkiva. Vitamin C ima važnu ulogu i u reakcijama sinteze drugih ćelijskih komponenata, uključujući hormone tireoidne žlezde i steroidne hormone, žučne

kiseline i karnitina koji je neophodan za razgradnju masnih kiselina. Takođe, antioksidativna svojstva vitamina C se ogledaju u sposobnosti da neutrališe reaktivne oksidativne molekule pri čemu sprečava promene u imunom sistemu, strukturi i funkciji pojedinih organa u humanom organizmu (Schlueter i Johnston, 2011).

Imajući u vidu značaj vitamina C u ishrani, na osnovu dobijenih rezultata (tabela 18) može se zaključiti da se konzumiranjem 437 g napitka II od permeata mogu da zadovolje dnevne potrebe za vitaminom C kod dece, a sa 546 g napitka II kod odraslih (tabela 18).

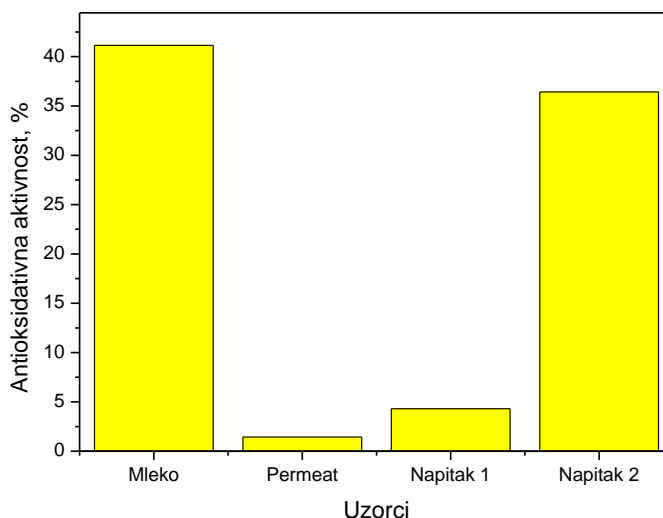
U uzorku napitka II sadržaj vitamina B<sub>12</sub> iznosi <10 µg/100 ml. Nedostatak vitamina B kompleksa izaziva brojne poremećaje u organizmu čoveka koji se primarno odražavaju na nervni i kardiovaskularni sistem i praćeno je padom imuniteta. Vitamini B<sub>2</sub> ulazi u sastav koenzima flavinmononukleotida i flavinadenindinukleotida (FMN i FAD), a fiziološko delovanje se manifestuje preko 60 flavinskih enzima u čijem je sastavu (Pribiš, 1999). Konzumiranjem 102 g/dan napitka od permeata mogu da se zadovolje dnevne potrebe dece za vitaminom B<sub>2</sub>. Kod odraslih je potreba za navedenim vitaminom veća i trebalo bi dnevno uneti oko 245 g napitka.

### **Antioksidativna aktivnost**

Antioksidativna aktivnost (AA) mleka i mlečnih proizvoda zavisi pre svega od sadržaja antioksidativnih supstanci, zatim sadržaja masti i dodataka koji se koriste u procesu proizvodnje (Unal, 2012). Postoji veliki broj prirodnih antioksidanata, a najvažniji među njima su vitamini ( $\alpha$ -tokoferol - vitamin E, askorbinska kiselina - vitamin C, retinol - vitamin A, tiamin i riboflavin - vitamini B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, itd.), flavonoidi, fenolne kiseline, polifenolna jedinjenja biljaka, azotna jedinjenja (alkaloidi, amini i aminokiseline), hlorofil, glukozinolati i druge supstance kao npr. neki diketoni i glikozidi.

Aktivnost antioksidanata zavisi ne samo od njihove strukture, nego i od drugih faktora, kao što su koncentracija, temperatura, svetlost, tip supstrata, fizičko stanje sistema, kao i prisustvo mikrokomponentata koje deluju kao prooksidanti ili sinergisti (Yanislava i sar., 2001). Antioksidanti su manje efikasni na povišenim temperaturama.

Napici od permeata sa dodatkom narandže su bogati antioksidantima. U njima se nalazi riboflavin (vit. B<sub>2</sub>) i askorbinska kiselina (vit. C). Antioksidativna aktivnost mleka, permeata i napitaka od permeata prikazana je na slici 20.



**Slika 20.** Antioksidativna aktivnost napitaka od permeata

Uzorak mleka sadrži 3,7 % mlečne masti i pokazuje veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na permeat u kojem je sadržaj masti < 0,1 %, zbog veće reaktivnosti liposolubilnih antioksidanata i proteina u membrani masne globule, što je u skladu sa rezultatima (Lindmark-Mansson i sar., 2000; Živković i Sunarić, 2009).

Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, antioksidativna aktivnost napitka II je 36,42 % i veća je u poređenju sa napitkom I (4,31 %). Navedene razlike mogu se objasniti činjenicom da se pri proizvodnji napitka II dodaje veća količina voćne baze pomorandže i da je permeat zastupljen dvostruko više nego u formulaciji za proizvodnju napitka I. Dodatak voćnog sadržaja izaziva povećanje antioksidativne aktivnosti, zbog velikog sadržaja antioksidativnih komponenata u voću (Lindmark-Mansson i sar., 2000).

## EKSPERIMENT II

### Hidroliza laktoze u permeatu

Rezultati statističke analize sadržaja laktoze, glukoze i galaktoze u uzorcima permeata hidrolizovanog primenom različitih koncentracija enzima  $\beta$ -galaktozidaze (0,1; 0,3 i 0,5 g/100g) na temperaturama 20°, 30° i 40° C tokom 60 minuta prikazani su u tabeli 19. Na osnovu rezultata analize evidentno je da koncentracija enzima i vreme hidrolize permeata, kao i interakcija navedenih faktora imaju značajan uticaj na sadržaj laktoze. Prikazani rezultati

pokazuju da koncentracija enzima ima značajan uticaj i na sadržaj glukoze i galaktoze. Generalno posmatrano, značajniji je uticaj linearnih koeficijenata u odnosu na kvadratne i koeficijente interakcije na promenu koncentracije glukoze i galaktoze pri temperaturi 20° C (tabela 19a).

Pri temperaturi 30° C (tabela 19b) linearni koeficijenti imaju značajniji uticaj na sadržaj laktoze u poređenju na kvadratne koeficijente. Takođe značajan uticaj na sadržaj laktoze ima koncentracija enzima, vreme hidrolize, kao i interakcija navedenih parametara. Na sadržaj glukoze i galaktoze značajno utiče koncentracija enzima i vreme hidrolize permeata.

Pri temperaturi 40° C (tabela 19c) linearni i kvadratni koeficijenti imaju značajan uticaj na sadržaj laktoze, glukoze i galaktoze. Takođe koncentracija enzima i vreme hidrolize, kao i njihova interakcija značajno utiče na sadržaj laktoze, glukoze i galaktoze jer su sve p vrednosti niže od 0,05.

**Tabela 19.** Parametri matematičkog modela uzoraka hidrolizovanog permeata

a) na temperaturi hidrolize 20° C

Uticaj	Laktoza		Glukoza		Galaktoza	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
b <sub>0</sub>	6,672	<0,00001	0,16375	0,58093	0,30342	0,34246
b <sub>1</sub>	-17,6025	<0,00001	6,08052	0,00167	7,33425	0,00066
b <sub>2</sub>	-0,1106	<0,00001	0,02606	0,07651	0,06093	0,00125
b <sub>11</sub>	13,5208	0,00003	-5,60615	0,02953	-5,93272	0,03003
b <sub>22</sub>	0,0005	0,00558	-0,00012	0,50936	-0,00041	0,04568
b <sub>12</sub>	0,1208	<0,00001	-0,02249	0,16096	-0,01966	0,24194

Značajan uticaj pri  $p < 0,05$

b) na temperaturi hidrolize 30° C

Uticaj	Laktoza		Glukoza		Galaktoza	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
b <sub>0</sub>	4,7328	<0,00001	0,02902	0,9073	-0,08112	0,82068
b <sub>1</sub>	-14,1826	<0,00001	8,17387	<0,00001	8,974	0,00013
b <sub>2</sub>	-0,1056	<0,00001	0,07594	<0,00001	0,0567	0,00277
b <sub>11</sub>	11,8265	0,00007	-6,26201	0,00368	-8,83167	0,00414
b <sub>22</sub>	0,0007	0,00116	-0,00056	0,00141	-0,00047	0,03625
b <sub>12</sub>	0,1202	<0,00001	-0,07179	0,00009	-0,0175	0,37139

Značajan uticaj pri  $p < 0,05$

c) na temperaturi hidrolize 40° C

Uticaj	Laktoza		Glukoza		Galaktoza	
	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost	Koeficijent	p-vrednost
b <sub>0</sub>	3,8018	<0,00001	0,61562	0,00614	0,07058	0,59229
b <sub>1</sub>	-10,5667	0,00022	5,70083	0,00005	8,73833	<0,00001
b <sub>2</sub>	-0,0973	0,00015	0,04995	0,00005	0,06209	<0,00001
b <sub>11</sub>	8,0417	0,02358	-4,6875	0,00633	-7,875	<0,00001
b <sub>22</sub>	0,0007	0,0157	-0,0004	0,00281	-0,00049	0,00003
b <sub>12</sub>	0,1086	0,00023	-0,03836	0,00178	-0,03871	0,00008

Značajan uticaj pri  $p < 0,05$

Rezultati ANOVA testa prikazani su u tabeli 20. Evidentan je visok koeficijent determinacije za koncentracije laktoze, glukoze i galaktoze u uzorcima hidrolizovanog permeata na temperaturi 20° C (tabela 20a). Koeficijent determinacije  $R^2$  iznosi 0,986; 0,883 i 0,956 respektivno. F – vrednost su redom 290,361 (laktoza), 326,488 (glukoza) i 834,044 (galaktoza).

Pri temperaturi hidrolize 30° C (tabela 20b) takođe je visok koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i iznosi redom za laktozu 0,955, glukoza 0,928 i galaktozu 0,911. F- vrednost se kreće od 66,41 (laktoza) do 1123,29 (glukoza).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 20c, na temperaturi 40° C ( $R^2$ ) koeficijent determinacije iznosi redom 0,893 (laktoza), 0,935 (glukoza) i 0,987 (galaktoza), a F- vrednost od 21,23 (laktoza) do 3976 (galaktoza).

**Tabela 20.** Analiza varijanse (ANOVA) za hidrolizovane uzorke permeata

a) na temperaturi hidrolize 20° C

Komponenta	Izvor								
	Ostatak			Model			F - vrednost	p - vrednost	$R^2$
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Laktoza	12	0,337	0,028	6	48,890	8,148	290,361	<0,001	0,986
Glukoza	11	0,342	0,031	6	60,840	1,014,0	326,488	<0,001	0,883
Galaktoza	11	0,386	0,035	6	175,376	29,229	834,044	<0,001	0,956

DF- degree of freedom / stepeni slobode; SS – suma kvadrata odstupanja;

MS – mean of square / srednje kvadratno odstupanje;

F-test  $p = p$  vrednost,  $p < 0,05$

b) na temperaturi hidrolize 30° C

Komponenta	Izvor								
	Ostatak			Model			F - vrednost	p - vrednost	R <sup>2</sup>
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Laktoza	14	0,480	0,034	6	13,66	2,277	66,41	<0,001	0,955
Glukoza	14	0,342	0,024	6	164,56	27,427	1123,29	<0,001	0,928
Galaktoza	14	0,704	0,050	6	152,72	25,453	506,30	<0,001	0,911

c) na temperaturi hidrolize 40° C

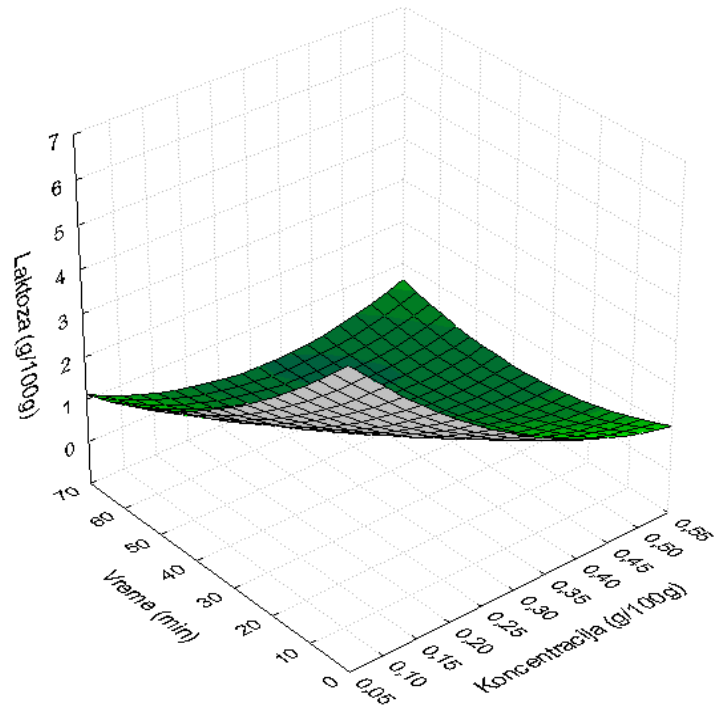
Komponenta	Izvor								
	Ostatak			Model			F - vrednost	p - vrednost	R <sup>2</sup>
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Laktoza	12	0,739	0,062	6	7,849	1,308	21,23	<0,001	0,893
Glukoza	12	0,155	0,013	6	116,087	19,348	1498,7	<0,001	0,935
Galaktoza	12	0,074	0,006	147,1	6,000	24,524	3976	<0,001	0,987

Generalno posmatrano visoki koeficijenti determinacije pokazuju dobro poklapanje eksperimentalnih rezultata i matematičkog modela.

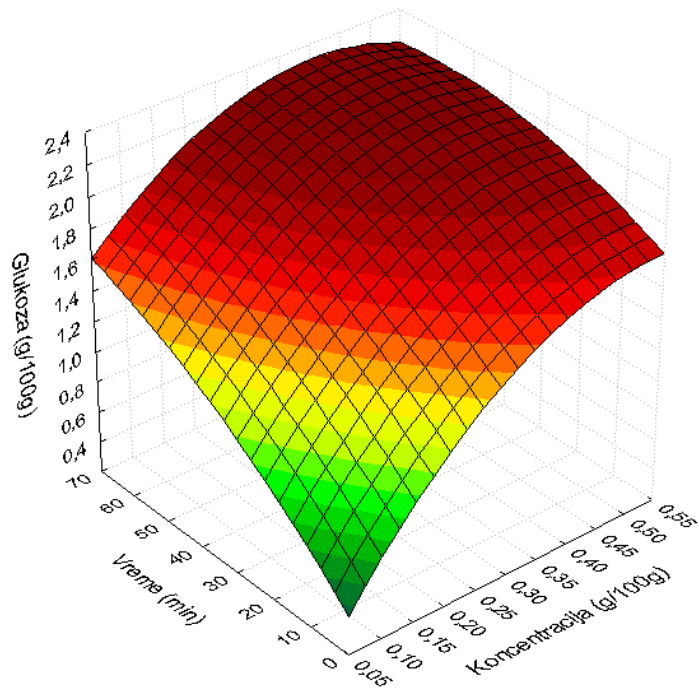
Uticaj vremena hidrolize i koncentracije enzima na sadržaj laktoze, glukoze i galaktoze u uzorcima hidrolizovanog permeata na određenim temperaturama (20°, 30° i 40° C) prikazan je 3D dijagramima na slikama 21-23.

Glukoza i galaktoza su primarni produkti hidrolize laktoze (Tamime i Robinson, 2004). Na temperaturi 20° C, u vremenu od 10 do 60 minuta, stepen hidrolize se povećava sa dodatkom 0,1 g/100g enzima od 37-84 %, sa dodatkom 0,3 g/100g enzima od 67 do 96 % i sa 0,5 g/100g enzima od 84 do 99 %. Na temperaturi 20° C sa ispitivanim koncentracijama enzima  $\beta$ -galaktozidaze nije postignuta 100 % hidroliza laktoze u toku 60 minuta procesa hidrolize.

a)

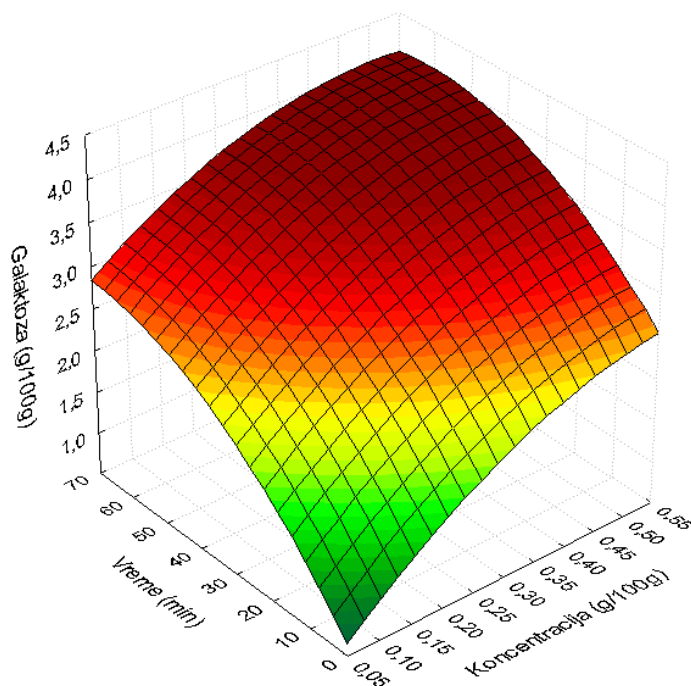


b)





c)

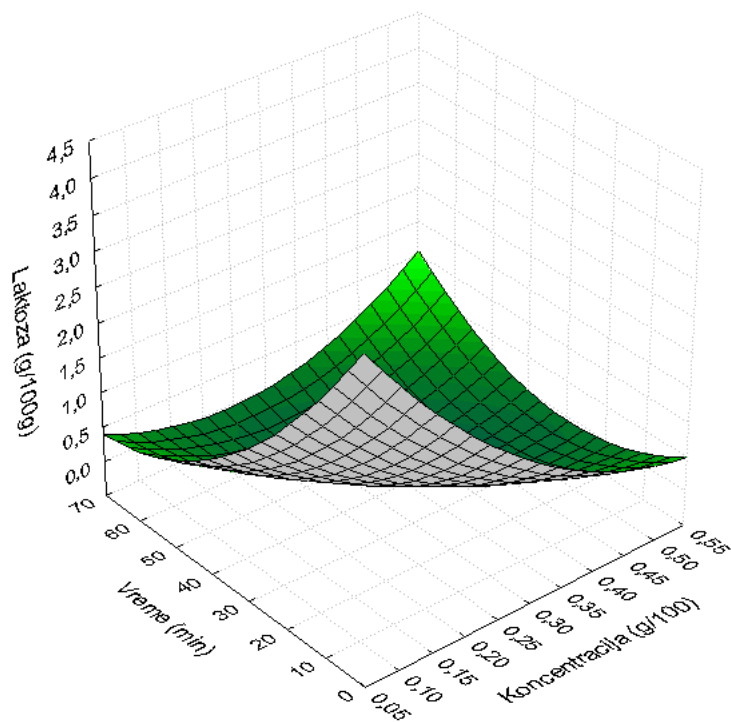


**Slika 21.** Uticaj vremena hidrolize na 20° C i koncentracije enzima na sadržaj:  
a) laktoze, b) glukoze i c) galaktoze

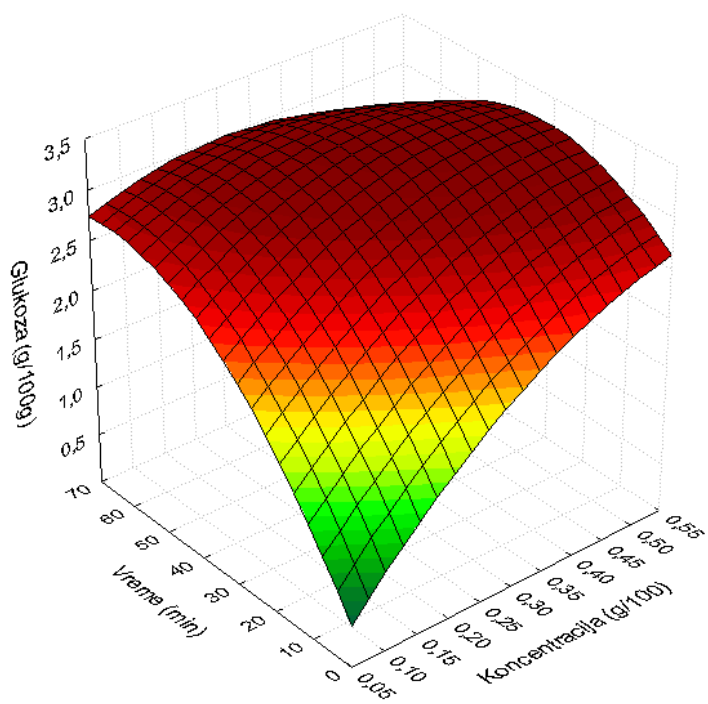
Na temperaturi 30° C posle 60 minuta hidrolize permeata sa 0,1 g/100g enzima sadržaj laktoze iznosi 0,27 g/100g, a stepen hidrolize je 95 %. Potpuna hidroliza laktoze na ovoj temperaturi postignuta je za 30 minuta sa 0,3 g/100g  $\beta$  - galaktozidaze, a u slučaju dodavanja 0,5 g/100g enzima za 20 minuta. Povećanje koncentracije enzima  $\beta$  - galaktozidaze (od 0,1 do 0,5 g/100g) značajno utiče na stepen hidrolize laktoze u permeatu na 30° C.

Maksimalni prinos glukoze postignut je tokom hidrolize laktoze sa 0,3 g/100g enzima, a galaktoze sa 0,5 g/100g enzima (slika 22).

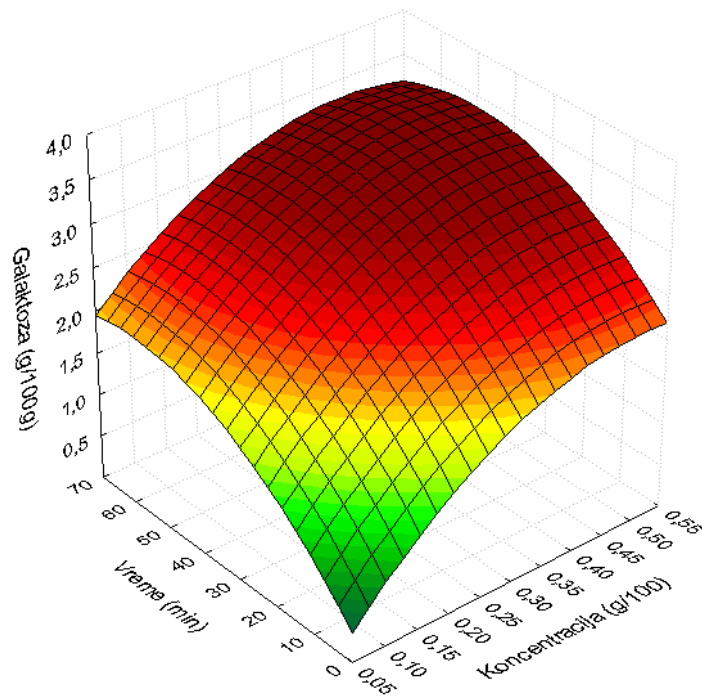
a)



b)



c)

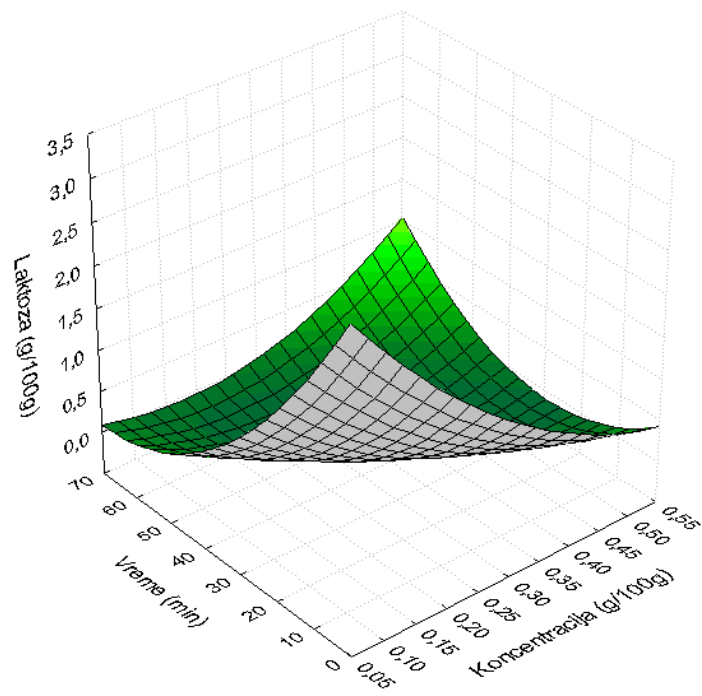


**Slika 22.** Uticaj vremena hidrolize na 30° C i koncentracije enzima na sadržaj:

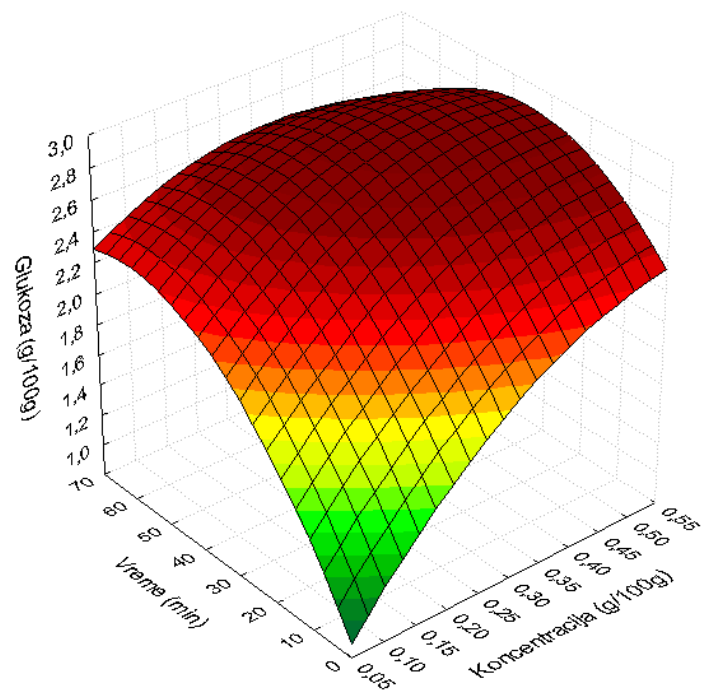
a) laktoze b) glukoze i c) galaktoze

Na temperaturi 40° C za 60 minuta sa koncentracijom enzima 0,1 g/100g izvršana je potpuna hidroliza laktoze tj. stepen hidrolize prisutne laktoze u permeatu je 100 %. Sa većom koncentracijom enzima, 0,3 g/100g odnosno 0,5 g/100g postiže se isti efekat za 20 minuta (100 % stepen hidrolize laktoze). Maksimalan sadržaj glukoze i galaktoze postiže se dodavanjem 0,5 g/100g enzima (2,8 g/100g; 3,48 g/100g, redom) (slika 23).

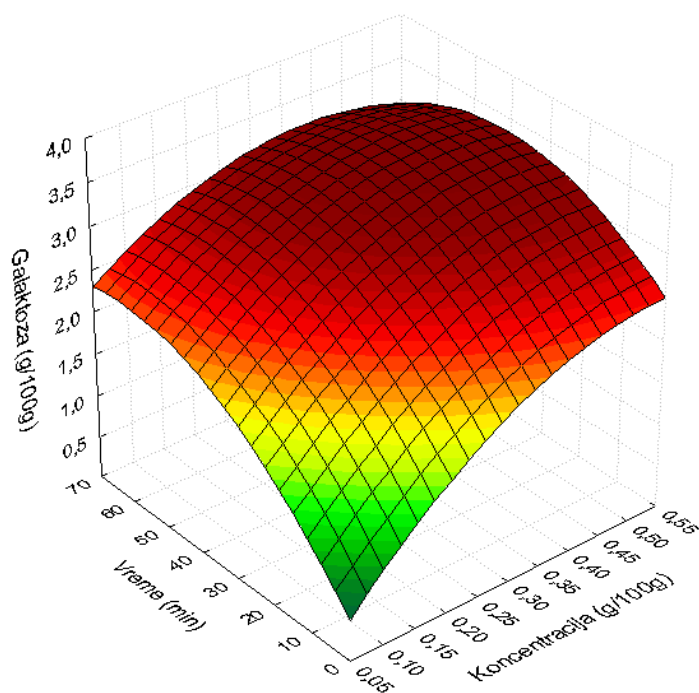
a)



b)



c)



**Slika 23.** Uticaj vremena hidrolize na 40° C i koncentracije enzima na sadržaj:

a) laktoze b) glukoze i c) galaktoze

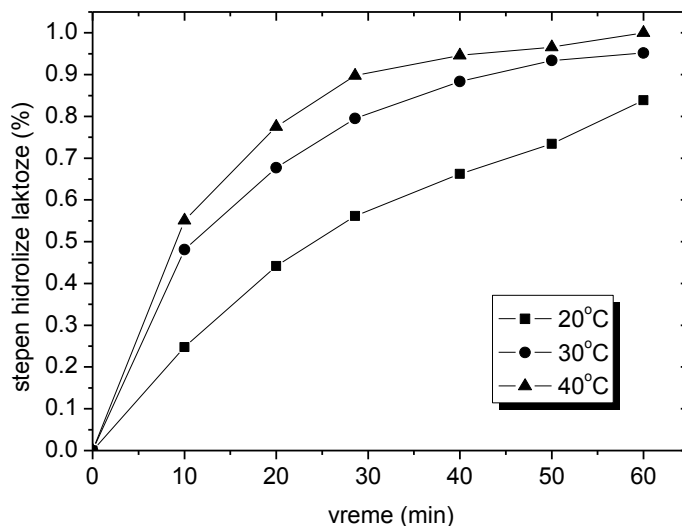
Analiza rezultata stepena hidrolize laktoze pokazuje da se sa koncentracijom enzima 0,5 g/100g za 10 minuta hidrolize na temperaturi 30° i 40° C postiže gotovo isti stepen hidrolize laktoze u permeatu (96 % i 97 %, redom), dok se sa istom koncentracijom enzima na istim temperaturama potpuna hidroliza prisutne laktoze (100 %) postiže za 20 minuta.

Generalno se može zaključiti da dodatak 0,1 g/100g enzimskog preparata Maxilact ( $\beta$ -galaktozidaza) na 40° C je optimalna količina za potpunu hidrolizu laktoze u permeatu. Za hidrolizu permeata namenjenog za proizvodnju napitaka od hidrolizovano permeata sa dodatkom voćnih baza odabrana je navedena koncentracija enzima.

### Matematičko modelovanje procesa enzimske hidrolize laktoze u permeatu

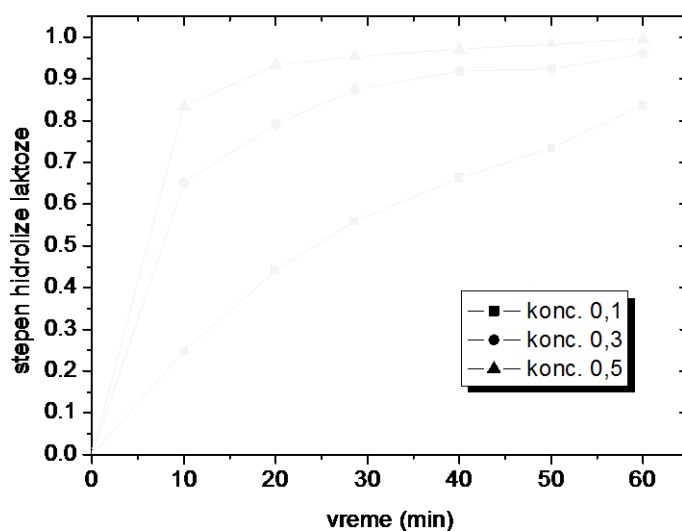
Rezultati hidrolize laktoze u zavisnosti od temperature njenog odvijanja pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g prikazani su na slici 24. Kako se moglo i očekivati stepen hidrolize laktoze raste sa porastom temperature na kojoj se odvija reakcija. Na temperaturi 40° C već nakon 10 minuta stepen hidrolize dostiže vrednosti oko 50 %, dok je nakon 60

minuta laktoza gotovo u potpunosti hidrolizovana. Sa druge strane na temperaturi 20° C stepen hidrolize nakon 60 minuta trajanja reakcije ima vrednost oko 85 %.



**Slika 24.** Stepen hidrolize laktoze u zavisnosti od temperature pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g

Na slici 25 prikazni su rezultati hidrolize permeata mleka na temperaturi 20° C pri različitim koncentracijama enzima. Sa porastom koncentracije enzima i stepen hidrolize laktoze raste tako da je nakon 30 minuta izvođenja reakcije pri koncentraciji 0,1 g/100g oko 50 %, dok je pri koncentraciji 0,5 g/100g stepen hidrolize oko 90 %.



**Slika 25.** Stepen hidrolize laktoze u zavisnosti od koncentracije enzima na temperaturi 20° C

Nakon 60 minuta hidroliza laktoze je skoro potpuna pri višim koncentracijama enzima (0,3 g/100g - 0,95; 0,5 g/100g - 0,98) dok je pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g stepen hidrolize laktoze oko 85%.

Za određivanje kinetičkih parametara reakcije hidrolize laktoze iz permeata mleka korišćeni su podaci o rezidualnoj (preostaloj) koncentraciji laktoze u funkciji vremena odvijanja reakcije. Tom prilikom je korištena jednačina modela reakcije prvog reda:

$$C_{LA} = C_{LA0} e^{-kt}$$

koja u linearizovanom obliku glasi:

$$\ln(C_{LA}) = \ln(C_{LA0}) - kt$$

Eksperimenti su izvedeni na temperaturama 20°, 30° i 40° C, pri pH permeata 6,46. U tabeli 21 prikazani su rezultati fitovanja hidrolize laktoze modelom reakcije prvog reda. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije koje se kreću u opsegu 0,974 – 0,993 ukazuju na adekvatno reprezentovanje dobijenih rezultata modelom reakcije prvog reda.

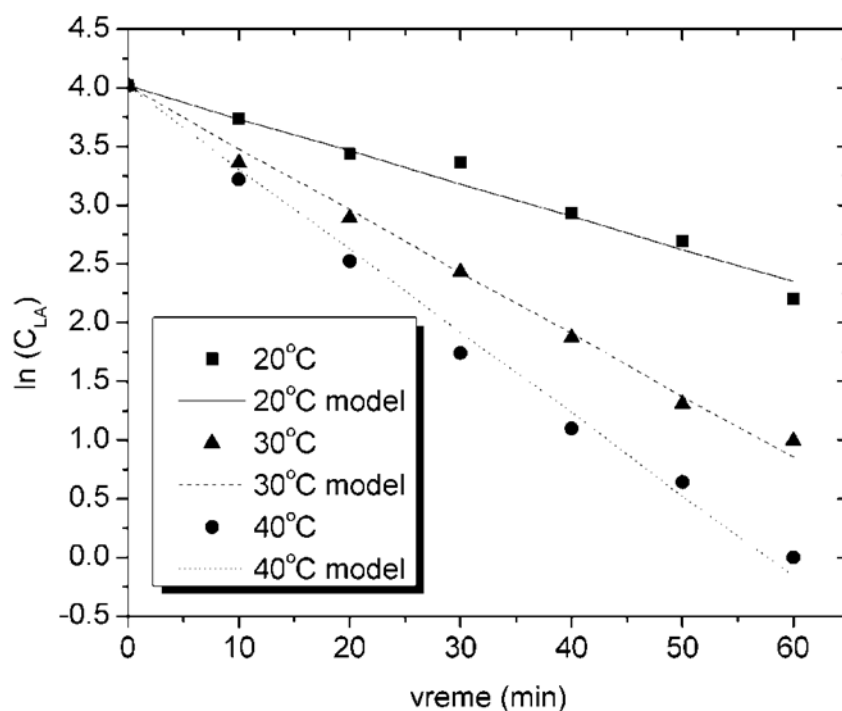
**Tabela 21.** Model reakcije prvog reda za hidrolizu laktoze

<b>Uticaj temperature (°C)</b>			
<b>Temperatura</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>
k (min <sup>-1</sup> )	0,0278	0,0527	0,0696
greška	0,0011	0,0009	0,0014
R <sup>2</sup>	0,974	0,993	0,991
<b>Uticaj koncentracije enzima (g/100g)</b>			
<b>Koncentracija</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>
k (min <sup>-1</sup> )	0,0278	0,0580	0,0934
greška	0,0011	0,0036	0,0058
R <sup>2</sup>	0,974	0,906	0,902

Za ispitivanje efekta koncentracije enzima na kinetiku reakcije hidrolize, enzimski preparat korišćen je u opsegu koncentracija 0,1 – 0,5 g/100g pri pH 6,46 i temperaturi 20° C. I u ovom slučaju vrednosti koeficijenta determinacije potvrđuju mogućnost primene modela reakcije prvog reda za prikazivanje reakcije hidrolize laktoze pri različitim koncentracijama

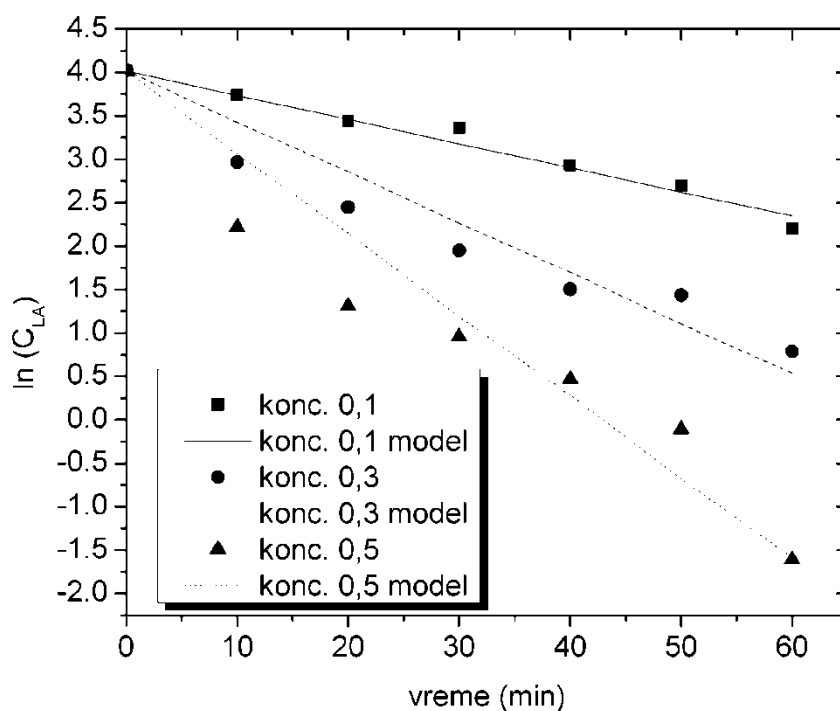
enzima. Vrednosti koeficijenta determinacije nešto su niže u odnosu na eksperimente na različitim temperaturama i kreću se u opsegu 0,902 – 0,974.

Uticaj temperature na kinetiku hidrolize laktoze prikazan je na slici 26. Kao što se vidi sa slike sa porastom temperature registrovan je i brži pad rezidualne koncentracije laktoze, odnosno brzina reakcije hidrolize je veća što potvrđuju i vrednosti konstante brzine reakcije (tabela 21). Porast temperature sa 20° C na 30° C praćena je većim rastom brzine reakcije nego kada temperatura poraste sa 30° C na 40° C. Razlog za ovakve rezultate može se pronaći u inaktivaciji enzima na višim temperaturama. Prema literaturnim podacima (Şener i sar., 2008) na temperaturama iznad 40° C smanjuje se enzimaska aktivnost ovog preparata. Ovakvi rezultati potvrđeni su i vrednostima konstante brzine reakcije (tabela 21) sa porastom temperature sa 20° C na 30° C konstanta brzine se skoro udvostruči. Sa druge strane porast temperature na 40° C ima za posledicu porast konstante brzine reakcije hidrolize od oko 30%.



**Slika 26.** Uticaj temperature na hidrolizu laktoze pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g





**Slika 27.** Uticaj koncentracije enzima na hidrolizu laktoze na temperaturi 20° C

Uticaj koncentracije enzima na kinetiku hidrolize laktoze prikazan je na slici 27. Sa porastom koncentracije enzima raste i brzina reakcije hidrolize laktoze.

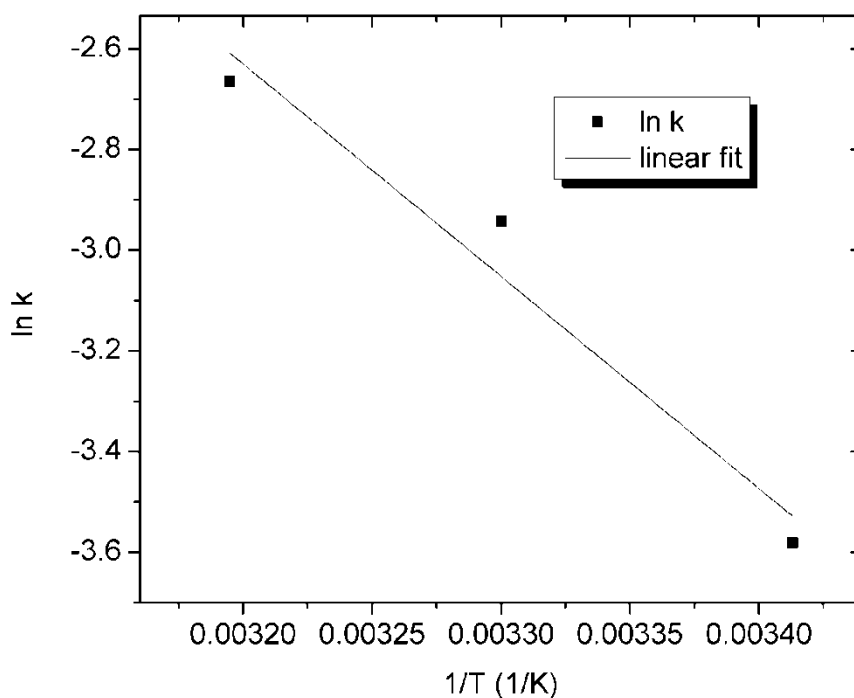
Za određivanje energije aktivacije reakcije hidrolize korišćeni su podaci o reakciji na različitim temperaturama i pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g. Pri proračunu energije aktivacije korišćena je Arenijusova jednačina:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

koja u linearizovanom obliku glasi:

$$\ln k = A - \frac{E_a}{RT}$$

Opseg razmatranih temperatura je od 20° C do 40° C. Energija aktivacije dobijena je iz nagiba prave linije ( $R^2 = 0,917$ ) prikazane na slici 28. Vrednost energije aktivacije iznosi  $35,1 \pm 7,2$  kJ/mol, što je u saglasnosti sa literaturnim navodima o energiji aktivacije za ovaj enzimski preparat pri koncentraciji 0,2 ml/l (Şener i sar., 2008).



**Slika 28.** Određivanje energije aktivacije hidrolize Arenijusovom jednačinom

### EKSPERIMENT III

U trećem eksperimentu određeni su parametri kvaliteta napitaka proizvedenih od enzimski hidrolizovanog permeata dobijenog na osnovu kinetike hidrolize laktoze (eksperiment II) i praćene su promene tokom skladištenja.

#### Karakteristike sirovina za proizvodnju napitaka od hidrolizovanog permeata

Hemijske karakteristike sirovina za proizvodnju četiri vrste napitaka od hidrolizovanog permeata prikazane su u tabeli 22. Hidrolizovan permeat korišćen za proizvodnju napitaka imao je pH 6,28 i suhu materiju 5,41 g/100g. Energetska vrednost 100 g hidrolizovanog permeata je niska i iznosi 84,32 kJ što pruža mogućnost njegove šire primene kao dijetetskog proizvoda.

Sadržaj pepela u suvoj materiji sirovine kreće se od 0,51 g/100g (hidrolizovan permeat) do 1,06 g/100g (voćna baza multivitamin). Među odabranim voćnim bazama, za proizvodnju napitaka, multivitaminska baza sadrži najviše pepela (tabela 22).

**Tabela 22.** Hemijski sastav hidrolizovanog permeata i voćnih baza

Komponenta g/100g	Hidrolizovan permeat	Voćna baza			
		pomorandža/ šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
Suva materija	5,41 ± 0,01	43,05 ± 0,06	45,84 ± 0,34	49,70 ± 0,02	52,01 ± 0,37
Mlečna mast	0,00 ± 0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Ukupni proteini	0,18 ± 0,01	0,67 ± 0,01	1,27 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,69 ± 0,01
Ukupni šećeri	4,23 ± 0,01	32,93 ± 0,01	40,97 ± 0,01	38,81 ± 0,01	45,47 ± 0,01
Pepeo	0,51 ± 0,01	0,84 ± 0,01	1,06 ± 0,00	0,97 ± 0,03	0,95 ± 0,00
pH	6,28	3,05	3,29	3,08	2,98

Na osnovu prethodnih eksperimenata za proizvodnju napitaka korišćen je permeat dobijen hidrolizom laktoze sa 0,1 g/100g  $\beta$  - galaktozidaze na temperaturi 40° C.

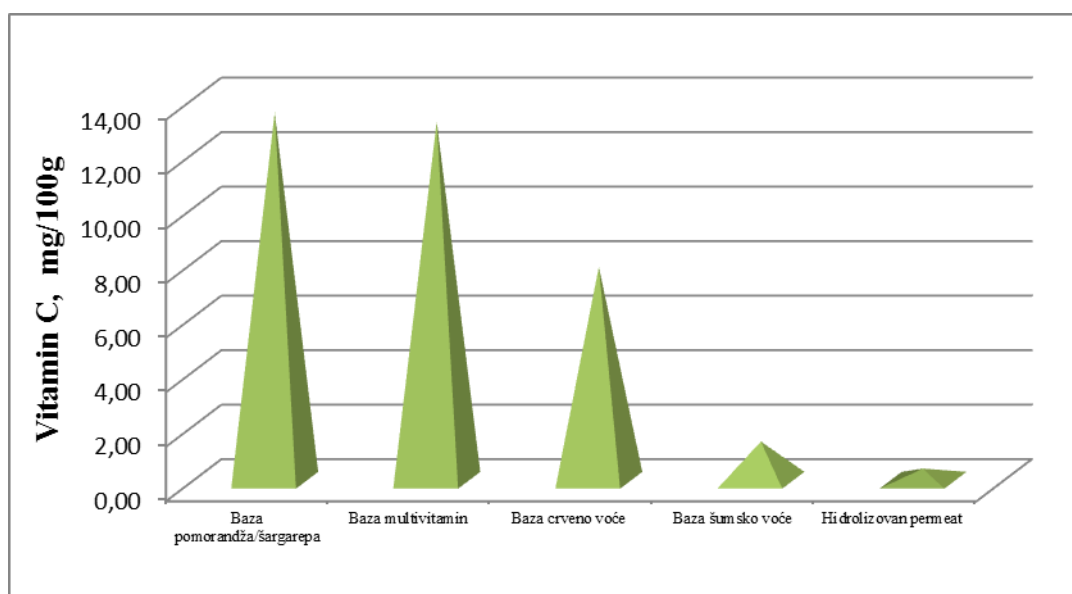
Analizom prisutnih šećera u hidrolizovanom permeatu je utvrđeno prisustvo monosaharida (nastali razgradnjom laktoze), 2,12 % glukoze i 2,11 % galaktoze (tabela 23). U voćnim bazama uglavnom su zastupljeni fruktoza i glukoza poreklom iz voća koje ulazi u sastav voćne baze i saharoza. Udeo šećera u suvoj materiji voćnih baza je najviši kod baze multivitamin – 89,38 %, zatim sledi baza šumsko voće - 87,43 %, crveno voće - 78,09 % i najniži je kod baze pomorandža/šargarepa - 76,49 %. U svim voćnim bazama dominira glukoza.

**Tabela 23.** Sadržaj šećera u hidrolizovanom permeatu i voćnim bazama

Sadržaj (g/100 g)	Hidrolizovan permeat	Voćna baza			
		pomorandža /šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
<b>Glukoza</b>	2,12	12,50	23,76	20,85	25,12
% u ukupnim šećerima	50,12	37,96	57,99	53,72	55,25
<b>Fruktoza</b>	0,00	10,10	14,59	13,48	20,35
% u ukupnim šećerima	0,0	30,67	35,61	34,73	44,75
<b>Galaktoza</b>	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00
% u ukupnim šećerima	49,88	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Saharoza</b>	0,00	10,33	2,62	4,48	0,00
% u ukupnim šećerima	0,0	31,37	6,39	11,54	0,0

## Vitamin C

U sirovinama za proizvodnju napitaka određen je sadržaj vitamina C prikazan na slici 29. Baza pomorandža/šargarepa sadrži najviše vitamina C i to 13,50 mg/100g, zatim baza multivitamin sa 13,16 mg/100g, dok crveno voće ima nešto manji sadržaj ovog vitamina - 7,83 mg/100g, a baza šumsko voće najmanje - 1,42 mg/100g. Hidrolizovan permealat ima ukupno 0,43 mg/100g vitamina C što je približno isto kao i vrednosti pronađene u polaznoj sirovini tj. permeatu (0,45 mg/100g).

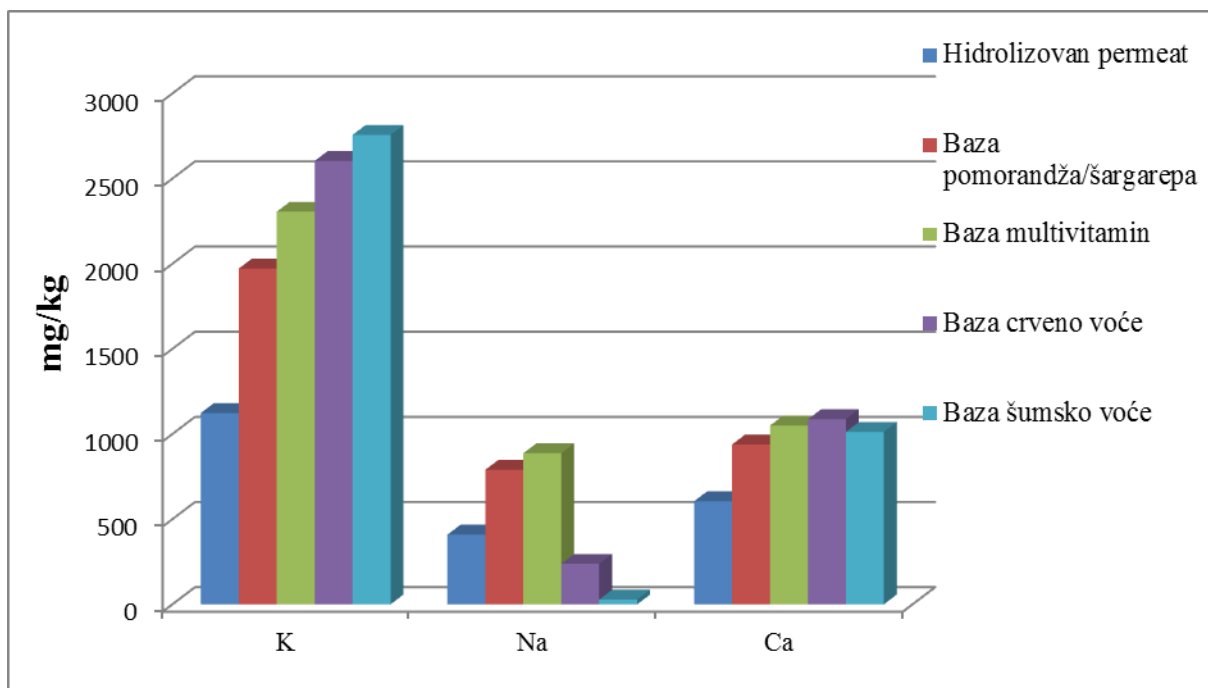


Slika 29. Sadržaj vitamina C u voćnim bazama i hidrolizovanom permeatu

Vitamin C je poznat kao efikasan antioksidant u biološkim tečnostima i ćelijama i generalno korisna komponenta povrća i voća (Ahabab i Korkmaz, 2011).

## Minerali

Analiza mineralnog sastava sirovina za dobijanje napitaka prikazana je na slici 30. Hidrolizovan permealat se ne razlikuje značajno po sadržaju mineralnih materija od permeata. U svim uzorcima dominantan mineral je kalijum. U voćnim bazama udeo ove mineralne komponente varira od 1971,9 mg/kg u bazi pomorandža/šargarepa do 2757,2 mg/kg u bazi šumsko voće gde je utvrđen najviši sadržaj. U voćnoj bazi multivitamin, u odnosu na druge uzorke, najviše ima natrijuma i to 887,6 mg/kg, dok je kalcijum najviše prisutan u bazi crveno voće 1087,1 mg/kg.



**Slika 30.** Sadržaj mineral u voćnima bazama i hidrolizovanom permeatu

### Antioksidativna aktivnost hidrolizovanog permeata i voćnih baza

Antioksidanti su supstance koje neutralisanjem slobodnih radikala, doniranjem svog elektrona, sprečavaju oštećenja važnih biomolekula u organizmu (Sen i sar., 2010).

Postoje antioksidanti u hrani koji se uspešno bore sa slobodnim radikalima. To su pre svega sastojci voća i povrća. Grožđe i vino imaju izražen antioksidativni potencijal, kao i borovnice, kupine i drugo tamno - plavo i ljubičasto voće. Voće i povrće koje ima crvene, narandžaste i žute pigmente sadrži beta - karotene, koji su takođe izraziti antioksidanti. Voće koje je tamno-plave i ljubičaste boje sadrži antocijane, koji takođe ispoljavaju dejstvo protiv slobodnih radikala (Borges i sar., 2010).

Antioksidativna aktivnost (AA) odnosno sposobnost hvatanja slobodnoradikaliskih jedinica uzoraka hidrolizovanog permeata i voćnih baza, ispitana je na DPPH radikale i sadržaj polifenola (tabela 24).

Dobijeni rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti sirovina na DPPH radikale ukazuju da voćna baza multivitamin poseduje najviši antioksidativni potencijal što je u skladu sa udelom voća koji je visok u ovoj bazi, a potom baza šumsko voće. Dodatak voćnog sadržaja izaziva povećanje antioksidativne aktivnosti, zbog velikog sadržaja antioksidativnih komponenata u voću. Vrednosti se kreću od 56,55 % kod baze crveno voće do 68,28 % u multivitaminskoj bazi.

**Tabela 24.** Antioksidativna aktivnost ( $AA_{DPPH}$ , %) i sadržaj polifenola u hidrolizovanom permeatu i voćnim bazama

	Hidrolizovan permeat	Voćna baza			
		pomorandža/šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
$AA_{DPPH}$ (%)	1,29	59,15	68,28	56,55	60,69
Polifenoli (mg GAE /l)	12,53	1919,75	2152,85	5077,50	5502,50

Poslednjih godina su mnoga polifenolna jedinjenja privukla pažnju naučnika iz oblasti hemije, hrane i medicine zbog svojih antioksidativnih, antimutagenih, antikancerogenih i antibakterijskih osobina. Ispitivanje količine polifenola u sirovinama za proizvodnju napitaka od hidrolizovanog permeata prikazan je u tabeli 24.

Polifenoli su esencijalne molekule za fiziologiju biljaka, budući da su uključene u različite funkcije poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene i druge. S obzirom na veliku raznovrsnost biljnih fenola, njihova klasifikacija je veoma kompleksna. Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula, a najznačajniji su: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, flavanoni i d-antocijani. Polifenoli čine prilično široku grupu jedinjenja (Sady i sar., 2013).

Po najvećem antioksidativnom kapacitetu među voćem i povrćem posebno se ističe jagodasto voće, tamno-plave ili crvene boje (Soobrattee i sar., 2005). Jagodasto voće je poznato kao dobar izvor polifenolnih jedinjenja koja doprinose visokoj antioksidativnoj aktivnosti. Od polifenola u najvećem procentu zastupljeni su antocijani i to u vidu glikozida i flavonoidi od kojih su najzastupljeniji derivati kvercetina i kemferola (Määttä-Riihinen i sar., 2004; Koponen i sar., 2007). U sastav voćne baze crveno voće i šumsko voće ulazi jagodasto voće.

Najveći sadržaj polifenola je utvrđen u bazi šumsko voće i to 5502,50 mg GAE/l, dok najmanju količinu ovih materija sadrži baza pomorandža/šargarepa 1919,75 mg GAE/l. Baze su proizvedene od različitog voća i u sastav šumske baze ulazi više različitih voćnih vrsta što utiče na polifenolni sastav, stoga ova baza pokazuje visok antioksidativni potencijal.

### Boja hidrolizovanog permeata i voćnih baza

Rezultati instrumentalnog određivanja boje uzoraka hidrolizovanog permeata i voćnih baza su prikazani u CIE i CIE  $L^*a^*b^*$  sistemu. Zapravo prikazane su izmerene i izračunate veličine za CIE – sistem (srednja reflektanca ili sjajnost  $Y$  (%), dominantna talasna dužina  $\lambda$

(nm). U CIE L\*a\*b\* sistemu prikazane su sledeće izračunate veličine: L\* - psihometrijska svetlost koja je analogna “Y” u CIE sistemu, a\* – psihometrijski ton (udeo crvene i zelene boje) i b\* – psihometrijska hroma (udeo žute i plave boje).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je sjajnost najveća kod uzorka hidrolizovanog permeata, odnosno među voćnim bazama kod multivitaminske baze, a najmanja kod uzorka baze šumsko voće, tj. da je ovaj uzorak tamniji. Sjajnost se kreće u granicama od 2,36 do 28,05 % (tabela 25).

**Tabela 25.** Rezultati instrumentalnog određivanja boje hidrolizovanog permeata i voćnih baza

a)			
Uzorci	CIE system		
	Y (%)	$\lambda$ (nm)	
<b>Hidrolizovan permeat</b>	28,05 ± 0,02	573,37 ± 0,04	
<b>Baza pomorandža/šargarepa</b>	16,05 ± 0,11	587,35 ± 0,07	
<b>Baza multivitamin</b>	17,06 ± 0,32	587,92 ± 0,05	
<b>Baza crveno voće</b>	2,46 ± 0,01	493,72 ± 0,30	
<b>Baza šumsko voće</b>	2,36 ± 0,06	573,36 ± 2,01	
b)			
Uzorci	CIE L*a*b*		
	L*	a*	b*
<b>Hidrolizovan permeat</b>	59,93 ± 0,02	-1,55 ± 0,02	8,96 ± 0,01
<b>Baza pomorandža/šargarepa</b>	47,04 ± 0,15	22,83 ± 0,08	47,20 ± 0,16
<b>Baza multivitamin</b>	48,34 ± 0,41	24,38 ± 0,46	47,65 ± 1,44
<b>Baza crveno voće</b>	17,73 ± 0,03	2,12 ± 0,06	0,4 ± 0,04
<b>Baza šumsko voće</b>	17,26 ± 0,27	-0,05 ± 0,03	0,28 ± 0,03

Vrednosti dominantne talasne dužine  $\lambda$  (nm) su 587,92 tj. 587,35 nm za uzorke baza pomorandža/šargarepa i baza multivitamin, što prema dijagramu hromatičnosti (Popov-Raljić, 2013) odgovara narandžastom delu spektra. Za uzorak baza crveno voće i šumsko voće ova vrednost iznosi redom  $\lambda = 493,72$  nm, 573,36 nm. Kod uzorka hidrolizovanog permeata dominantna talasna dužina je 573,37 nm što odgovara zelenkasto-žutom delu spektra.

Analiza rezultata po CIE L\*a\*b\*sistemu pokazuje da su vrednosti za svetloću identične vrednostima za srednju reflektancu Y (%) u CIE sistemu, tj. uzorak hidrolizovanog permeata je najsvetliji, a uzorak baze šumsko voće je najtamniji (tabela 25).

Na osnovu izračunatih vrednosti za psihometrijski ton a\* i psihometrijsku hromu b\* može se konstatovati da je vrednost psihometrijskog tona najveća kod uzorka obojenih

narandžastom bojom (baza pomorandža/šargarepa i multivitamin), kao i vrednost psihometrijske hrome.

### Kvalitet napitaka od hidrolizovanog permeata tokom skladištenja

#### Hemijski sastav napitaka

Sa aspekta održivosti i stabilnosti proizvoda tokom skladištenja, kao i senzornih osobina, fizičko-hemijske karakteristike proizvoda su veoma značajni parametri kvaliteta. Kvalitet napitaka je uslovljen, između ostalog, hemijskim sastavom sirovine i konverzijom osnovnih komponenata tokom skladištenja. Prosečan hemijski sastav proizvedenih napitaka od hidrolizovanog permeata prikazan je u tabeli 26. Pripremljeni napici su praćeni tokom 60 dana skladištenja i uočene su minimalne promene osnovnih hemijskih sastojaka.

Suva materija napitaka nakon proizvodnje iznosi od 6,23 g/100g (napitak crveno voće) do 6,64 g/100g (šumsko voće), prosečna vrednost je 6,49 g/100g. Slične vrednosti za suhu materiju su dobili Hattem i sar., (2011) i Đurić i sar., (2004), dok suva materija napitaka prema Sady i sar., (2013) ima znatno veću vrednost (12,01 g/100g). Tokom skladištenja dolazi do neznatnih varijacija sadržaja suve materije.

**Tabela 26.** Hemijski sastav napitaka od hidrolizovanog permeata tokom skladištenja

Karakteristike	Skladištenje	Napici			
	dana	Pomorandža /šargarepa	Multivitamin	Crveno voće	Šumsko voće
Suva materija g/100 g	0	6,52±0,07	6,56±0,01	6,23±0,04	6,64±0,02
	60	6,54±0,02	6,66±0,00	6,26±0,01	5,84±0,005
Mlečna mast g/100 g	0	0,00	0,00	0,00	0,00
	60	0,00	0,00	0,00	0,00
Ukupni proteini g/100 g	0	0,18±0,01	0,19±0,00	0,20±0,02	0,18±0,02
	60	0,22±0,01	0,22±0,01	0,33±0,01	0,23±0,01
Pepeo g/100 g	0	0,52±0,03	0,50±0,004	0,49±0,001	0,48±0,004
	60	0,47±0,003	0,45±0,003	0,44±0,02	0,42±0,04
pH	0	4,08±0,01	4,09±0,01	4,07±0,01	4,03±0,01
	60	4,03±0,01	4,06±0,01	3,97±0,01	4,01±0,01
Energetska vrednost KJ/100g	Sr. vrednost	88,295	101,605	97,215	109,065



U poslednje dve decenije brojni patenti koji sadrže normative za proizvodnju sličnih napitaka, ili napitaka na bazi mleka, sa dodatkom koncentrata voća beleže različite količine suve materije (5 - 20 %) (Jeličić i sar., 2008).

Proizvedeni napici od hidrolizovanog permeata su bez masti i bez laktoze, što se i očekivalo s obzirom na hemijski sastav sirovine za proizvodnju. Iz tabele 26 se vidi da je sadržaj proteina u odnosu na hidrolizovan permeat, kao sirovinu, bez značajnije promene.

Pepeo u napicima varira od 0,48 g/100g (napitak šumsko voće) do 0,52 g/100g (napitak pomorandža/šargarepa), prosečno čini 7,68 % suve materije i tokom skladištenja se nije značajnije menjao.

Vrednosti pH nakon proizvodnje napitaka iznosile su od pH 4,03 do pH 4,09. U poređenju sa vrednostim drugih autora (Hattem i sar., 2011; Đurić i sar., 2004) napici su imali nešto veću kiselost što je posledica prirodne kiselosti korišćenih voćnih baza i dodatka limunske kiseline u procesu proizvodnje. pH vrednost napitaka tokom perioda skladištenja neznatno se smanjuje i nakon 60 dana skladištenja varira od pH 3,97 (napitak crveno voće) do 4,06 (napitak multivitamin) (tabela 26).

Rezultati analize sastava šećera u napicima nakon proizvodnje i tokom skladištenja prikazani su u tabeli 26. Tokom skladištenja dolazi do manje promene udela glukoze i galaktoze u svim uzorcima.

**Tabela 27.** Sadržaj šećera u napicima od hidrolizovanog permeata

Sadržaj (g/100 g)	Skladištenje dana	Napici			
		Pomorandža/ šargarepa	Multivitamin	Crveno voće	Šumsko voće
<b>Glukoza</b>	0	1,78±0,01	2,82±0,01	3,01±0,01	3,14±0,01
	60	2,66±0,01	2,69±0,01	2,44±0,01	2,13±0,01
	Srednja vrednost	2,22±0,01	2,755±0,01	2,725±0,01	2,635±0,01
<b>Fruktoza</b>	0	0,15±0,01	0,30±0,01	0,00±0,01	0,49±0,01
	60	0,00±0,01	0,00±0,01	0,00±0,01	0,00±0,01
	Srednja vrednost	0,075±0,01	0,15±0,01	0,00±0,01	0,245±0,01
<b>Galaktoza</b>	0	1,38±0,01	2,04±0,01	2,25±0,01	2,63±0,01
	60	3,03±0,01	3,25±0,01	2,45±0,01	3,77±0,01
	Srednja vrednost	2,205±0,01	2,645±0,01	2,35±0,01	3,2±0,01

Prema literaturnim podacima sadržaj glukoze u sokovima od pomorandže može da varira u rasponu od 1,75 do 3,23 g/100g (Kelebek i sar., 2009; Farnworth i sar., 2001; Sanz i sar., 2004). Sadržaj glukoze u napitku od hidrolizovanog permeata sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa je u skladu sa citiranim vrednostima.

Količina šećera u napicima utiče na apsorpciju tečnosti i fizički status organizma. Glukoza je poželjan izvor energije za telo, lako se apsorbuje i stoga dovodi do smanjenja zamora i bržeg oporavka posle vežbanja (Anderson i sar., 2002). Od ukupnih šećera u svim napicima više od pola čini glukoza kao i u polaznim sirovinama. Istraživanja su pokazala da 6% rastvor ugljenih hidrata obezbeđuje optimalnu ravnotežu ukusa, brzu apsorpciju tečnosti i isporuku energije mišićima (Passe i sar., 2000). Sadržaj ugljenih hidrata u suvoj materiji proizvedenih napitaka od hidrolizovanog permeata je na visokom nivou 54,14 % do 94,28 % nakon proizvodnje, od čega je glukoza 50,16 % (napitak šumsko voće), 50,42 % (napitak pomorandža/šargarepa), 54,65 % (napitak multivitamin) odnosno 55,13 % (napitak crveno voće).

Proizvedeni napici od hidrolizovanog permeata su bez laktoze što omogućava njihovu upotrebu i kod osoba netolerantnih na mlečni šećer.

Energetska vrednost 100 g napitaka kreće se od 88,295 KJ (napitak pomorandža/šargarepa) do 109,065 KJ (napitak šumsko voće) i kao takavi mogu da se svrstaju u grupu niskoenergetskih napitaka. Pogodni su za upotrebu i kod energetski restriktivnih dijeta.

## **Minerali**

Rezultati mineralnog sastava napitaka nakon proizvodnje i 60-tog dana skladištenja prikazani su na slici 31. Najzastupljeniji mineral je kalijum, kao i u permeatu (polaznoj sirovini), s prosečnim sadržajem 1002,8 mg/kg u napicima nakon proizvodnje i 1006,5 mg/kg u napicima nakon 60 dana skladištenja. Najviše kalijuma sadrži napitak crveno voće - 1122,3 mg/kg, dok je najmanji sadržaj u napicima multivitamin i šumsko voće - 980,1 mg/kg.

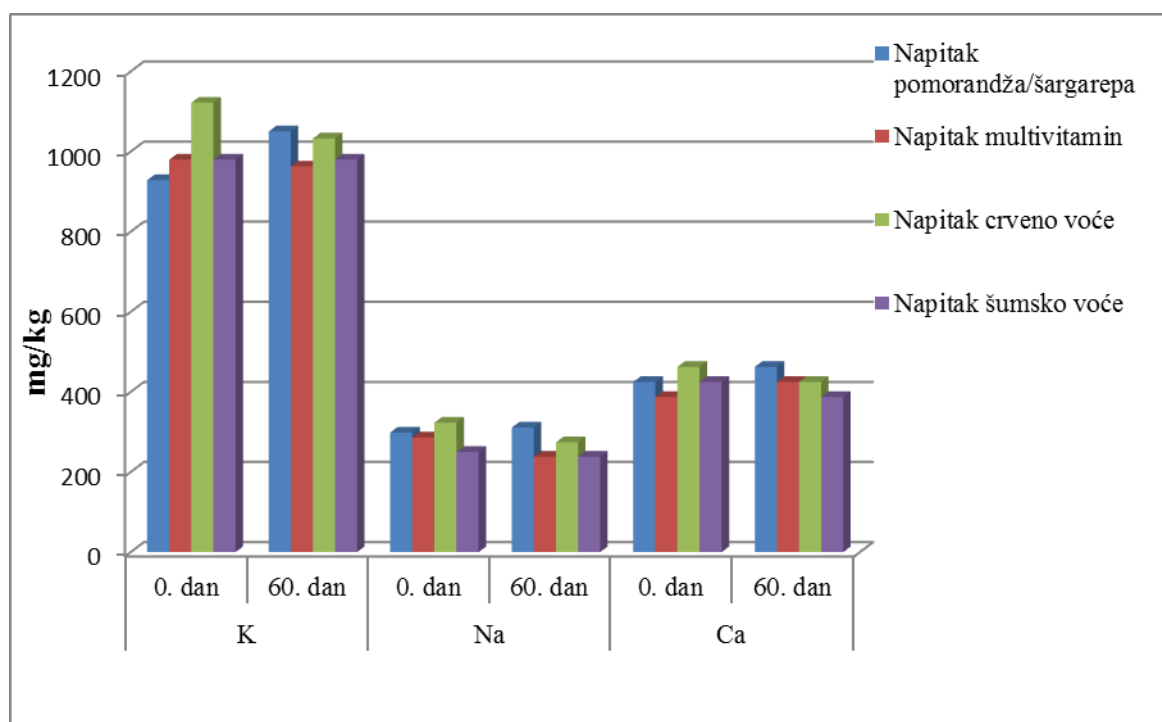
Drugi mineral u napicima po zastupljenosti je kalcijum. Prosečan sadržaj kalcijuma iznosi 424,9 mg/kg bez bitnog odstupanja do kraja perioda skladištenja. Zatim sledi natrijum koji je u proseku prisutan u količini 289,6 mg/kg. Natrijum je takođe kao i kalijum važan elektrolit u sportskim pićima, najviše se gubi putem znoja i ima najmoćniji uticaj na stimulisanje rehidracije. Deluje na povećanje uzimanja vode iz creva. Većina sportskih pića sadrže uglavnom natrijum i kalijum i nemaju druge vredne minerale koje telo koristi za niz fizioloških funkcija (Maughan i Murray, 2001). Kalcijum igra centralnu ulogu u sintezi i razgradnji glikogena umišićima i jetri pored svoje uloge u formiranju i održavanju kostiju. Nizak nivo kalcijuma u krvnom serumu može da izazove grčeve u mišićima (Rosenbloom, 2000). Upotrebom napitaka od hidrolizovanog permeata doprinosi se dnevnom unosu kalcijuma.

Soli u sportskim pićima deluju tako što stimulišu centar za žeđ u mozgu i podstiču uzimanje tečnosti, a minimiziraju formiranje urina, čime se poboljšava sposobnost tela da zadržava vodu (Passe i sar., 2000).

Sadržaj natrijuma i kalijuma u analiziranim uzorcima je približno isti kao i kod pojedinih formulacija pića za sportiste (Abd El-Khair, 2009). Pollard i sar., (2006) navode da pravilno formulisana sportska pića treba da sadrže 4 - 8 % ugljenih hidrata, elektrolite natrijum, kalijum i vodu.

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na slici 31 može se zaključiti da nakon 60 dana skladištenja nije došlo do značajnih promena u sadržaju mineralnih materija u proizvedenim napicima od hidrolizovanog permeata.

Konзумiranjem 250 ml napitka pomorandža/šargarepa i napitka crveno voće može se zadovoljiti 22 % dnevnih potreba za kalcijumom kod dece i 11 % kod odraslih, a napitkom sa multivitaminom i šumskim voćem 20 % kod dece i 10 % kod odraslih. Napici su izuzetan izvor kalijuma i kalcijuma, dok se natrijum nalazi u količinama koje zadovoljavaju potrebe organizma (uzimajući u obzir da napici nisu glavni izvor ovog elementa u svakodnevnoj ishrani) i kao takvi mogu se upotrebiti za nadoknadu minerala nakon napornog vežbanja.



**Slika 31.** Mineralni sastav napitaka od hidrolizovanog permeata

Adekvatna rehidracija, nadoknada izgubljene tečnosti i elektrolita, preduslov je za održavanje normalnog mišićnog rada aktivnih sportista. Rehidracija je potrebna jer se pri

naprezanju, zbog pojačanog znojenja, odstranjuje iz tela i znatna količina tečnosti. Tokom mišićnog rada dolazi do gubitka telesne mase koji je gotovo sav rezultat znojenja. Izgubljenu tečnost potrebno je nadoknaditi. Voda u telu ima esencijalnu ulogu obzirom da 50 do 70 % telesne mase čoveka čini voda i svi metabolitički procesi odvijaju se u vodenoj sredini (Guyton i Hall, 2006). Hidrolizovan permeal i napici na bazi permeata odličan su izvor vode i pogodni su za rehidraciju organizma.

Gubitkom vode gube se i elektroliti ( $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  prevladavaju u ekstracelularnoj tečnosti, a  $\text{K}^+$  se pretežno nalazi u ćelijskoj tečnosti) i potrebno ih je nadoknaditi. Njihova uloga u organizmu je višestruka. Sudeluju u regulaciji acidobazne ravnoteže, održavanju volumena plazme, membranskog potencijala, u transportnim procesima i prenosu nervnih impulsa. Ako se ne nadoknadi tečnost, dolazi do povećane osmolarnosti i smanjenja volumena plazme, usporenih metabolitičkih procesa, što organizam doživljava kao stresno stanje, a sportisti ne mogu postići željeni rezultat (Kleiner, 1999).

Osnovni razlozi uzimanja napitaka namenjenih sportistima upravo je nadoknada energije za utrošeni rad, tečnosti izgubljene znojenjem i elektrolita što bi moglo da se postigne konzumiranjem napitaka od hidrolizovanog permeata.

## Vitamin C

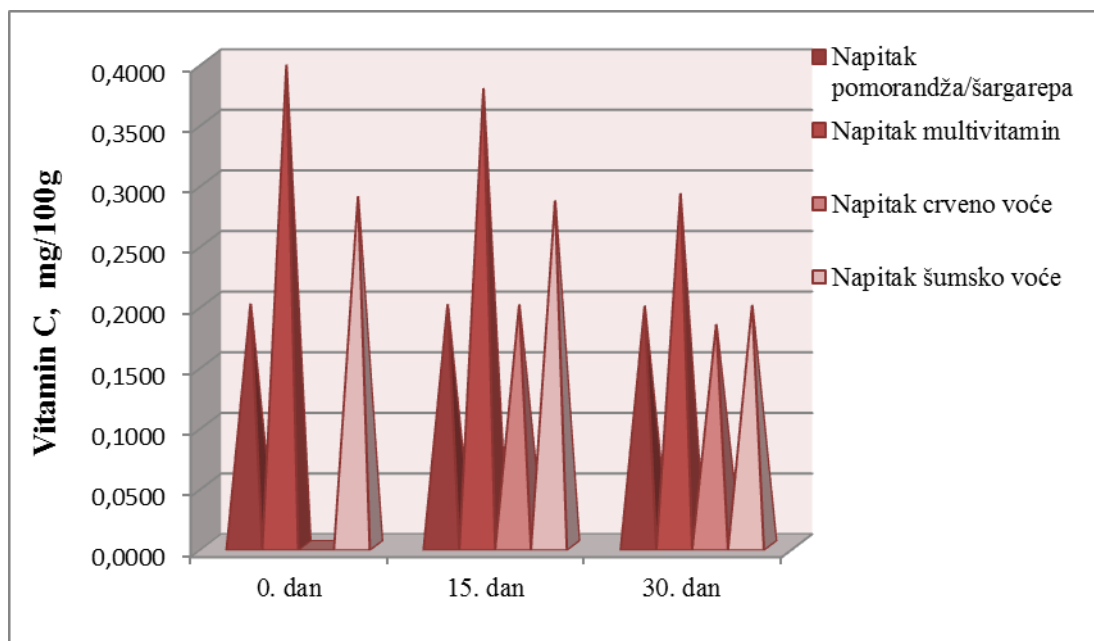
Sadržaj vitamina značajno doprinosi nutritivnoj vrednosti napitaka. Na osnovu dosadašnjih rezultata poznato je da sastav permeata, vrsta i sastav voćnih baza i parametri tehnološkog procesa su najvažniji faktori koji utiču na koncentraciju vitamina u napicima (Tamime i Robinson, 2004). Sadržaj vitamina C u uzorcima prikazan je na slici 32.

Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje imao je napitak sa dodatkom voćne baze multivitamin 0,3972 mg/100g, zatim šumsko voće 0,2887 mg/100g i pomorandža/šargarepa 0,1999 mg/100g.

Vreme skladištenja utiče na promene sadržaja vitamina C u svim uzorcima. Nakon 15 dana skladištenja koncentracija vitamina C je najmanje opala u napitku sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa i to za 0,3 %, a najveće smanjenje je uočeno u napitku sa multivitaminom i ono iznosi 5 %.

Posle mesec dana skladištenja zabeležene su značajnije promene sadržaja vitamina C, stim što su takođe najmanje kod napitka sa pomorandžom/šargarepom (manje od 1 %), a najveće u napitku sa šumskim voćem gde je zabeleženo smanjenje za 31 %.

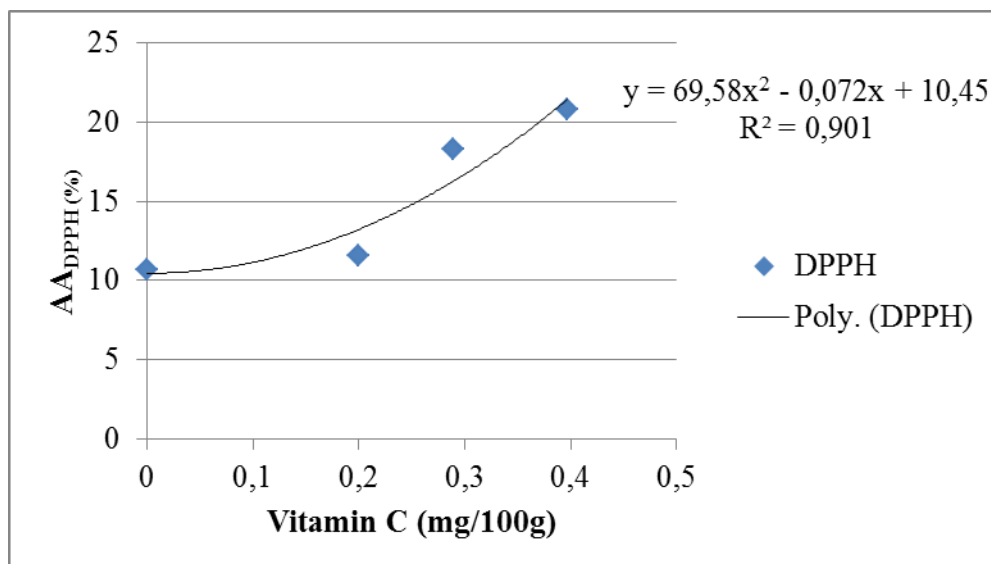
Gubitak vitamina C u napicima tokom skladištenja je očekivana pojava, a zavisi od sastava proizvoda, vrste pakovanja i uslova skladištenja (Sady i sar., 2013). Poznato je da je degradacija pasterizovanih sokova od pomorandže čuvanih na 10° C dvostruko brža nego u sokovima koje se skladište na 4° C (Esteve i sar., 2005).



**Slika 32.** Promena sadržaja vitamina C tokom skladištenja

Najpopularniji voćni napici među potrošačima, prema Sady i sar., (2013), su oni koji sadrže sok od pomorandže. Prosečna globalna proizvodnja pomorandža je oko 67,6 miliona tona, od kojih se znatan deo koristi u proizvodnji koncentrata za sokove (<http://faostat.fao.org>) koji se mogu primeniti i u proizvodnji napitaka od permeata. Zbog visokog nivoa potrošnje, pomorandže, bilo sveže ili obrađene, predstavljaju značajan izvor antioksidanata (uglavnom vitamin C i polifenolnih jedinjenja) u ishrani (Klimczak i sar., 2007; Sady i sar., 2013).

Značajna korelacija između sadržaja vitamina C i antioksidativne vrednosti  $AA_{DPPH}$  % zabeležena je u uzorcima napitaka ( $R^2 = 0,901$ ) (slika 33).



**Slika 33.** Korelacija sadržaja vitamina C i antioksidativne vrednosti AA<sub>DPPH</sub>%

Vitamin C je prirodni antioksidant rastvoran u vodi, koji deluje kao neenzimski antioksidant, prekidanjem lančane reakcije (Stojiljković i sar., 2012). Lako se oksiduje do oblika slobodnog radikala, semidehidroaskorbinske kiseline, koja je relativno stabilna. Dalja oksidacija stvara diketoglukonsku kiselinu koja nije biološki aktivna (Kaur i Kapoor, 2001).

Antioksidativna aktivnost vitamina C je prouzrokovana lakoćom gubitka elektrona, što ga čini vrlo efikasnim u biološkim sistemima. Kako je donor elektrona, on služi kao redukujući agens za mnoge reaktivne kiseonik vrste (ROS - radical oxygen species), azotne i tiol radikale. Štiti jedinjenja u vodenim sredinama ćelija i tkiva, a u lipidnoj sredini deluje kao sinergist  $\alpha$ -tokoferola na ćelijskim membranama (Schlueter i Johnston, 2011). Međutim, u prisustvu slobodnih jona gvožđa, može proizvesti fero jone, presudne katalizatore oksidativnog oštećenja. Pod uobičajenim uslovima u organizmu, u kojima je gvožđe propisno odvojeno u rezervne i transportne proteine, vitamin C ima isključivo antioksidativnu funkciju (Kaur i Kapoor, 2001).

Dokazano je da je rizik kancera jednjaka, pankreasa i pluća niži kod osoba sa dovoljnim unosom vitamina C. Vitamin C štiti od različitih vrsta povreda tkiva tako što smanjuje oksidativno oštećenje DNK, ćelijskih membrana i oksidativni stres (Stojiljković i sar., 2012; Schlueter i Johnston, 2011). Takođe sprečava formiranje N-nitrozo jedinjenja, supstanci koje potiču od nitrata i nitrita iz konzervisanog mesa a izazivaju kancer. Sa vitaminom E i koenzimom Q10 obezbeđuje značajnu antioksidativnu zaštitu za ćelijske membrane (Kaur i Kapoor, 2001).

Podnošljiva gornja granica (*Tolerable Upper Intake Levels*) za unos vitamina C kao antioksidanta je najviši dnevni nivo unosa koji ne predstavljaju rizik po zdravlje kod većine

populacije. Prema Smolin i Grosvenor (2000) kod odraslih osoba za vitamin C je postavljena granica na 2000 mg/dan što konzumiranjem napitaka na bazi permeata neće biti prekoračeno.

### Antioksidativni potencijal napitaka

Antioksidativna aktivnost napitaka ispitana je takođe na DPPH radikale i polifenole (tabela 28). Rezultati analize na DPPH radikale ukazuju na mogućnost supstrata da donira elektrone ili H atome u reakcijama. Najveću vrednost antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale ( $AA_{DPPH\%}$ ) nakon proizvodnje pokazali su uzorci napitka sa multivitaminom i šumskim voćem.

Tokom perioda skladištenja dolazi do smanjenja  $AA_{DPPH\%}$  vrednosti. Najmanji pad je u napitku sa pomorandžom/šargarepom (smanjenje za 17 %), a najveći u napitku sa šumskim voćem (za 39 %). Smanjenje antioksidativne aktivnosti nakon 60 dana može se objasniti degradacijom vitamina C i polifenola koji se dogodio tokom skladištenja.

Glavni doprinos antioksidativnim svojstvima napitaka na bazi permeata pored vitamina C, potiče iz polifenolnih jedinjenja. Ova jedinjenja su pokazala terapijska svojstva kao što su antiinflamatorno, antihipertenzivno, diuretičko, analgetičko i hipolipidemičnu aktivnost (Klimczak i sar., 2007).

U proizvedenim napicima utvrđen je sadržaj polifenola i praćena je promena tokom perioda skladištenja. Analizirani uzorci sadrže ukupnih polifenola u intervalu od 53,78 do 120,38 mg GAE/l u zavisnosti od vrste napitka, odnosno dodatih voćnih baza (tabela 28). Vreme skladištenja ima uticaj na promenu sadržaja polifenola u uzorcima. Sadržaj polifenolnih materija se tokom perioda skladištenja smanjio za 8 % kod napitka pomorandža/šargarepa, 11 % kod napitka multivitamin, 4 % kod napitka crveno voće i za 10 % u napitku šumsko voće.

**Tabela 28.** Sadržaj polifenola u napicima i antioksidativna aktivnost ( $AA_{DPPH\%}$ )

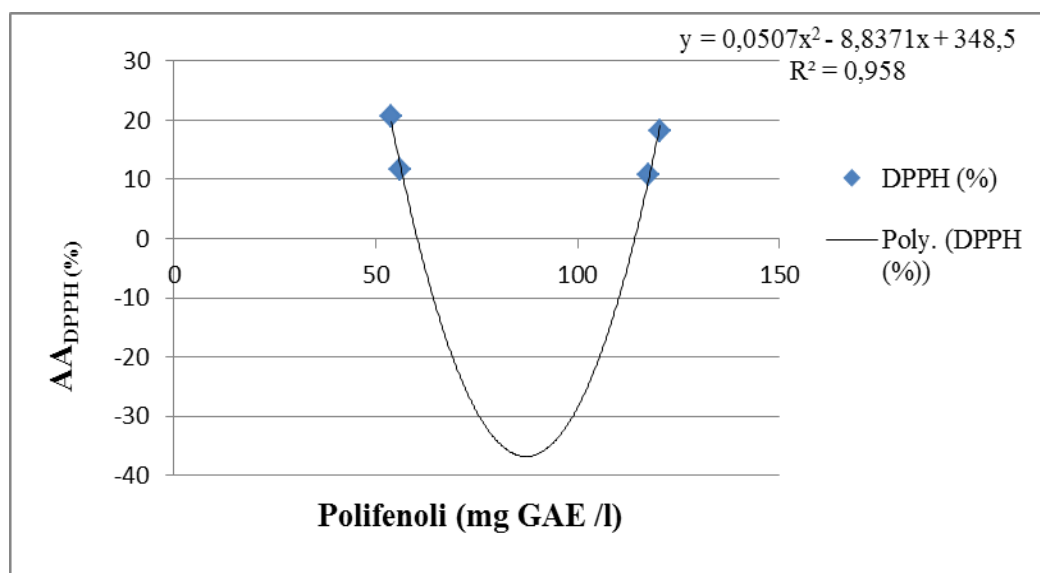
	Skladištenje	Napici			
	dana	pomorandža/ šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
$AA_{DPPH\%}$	0	11,61	20,74	10,7	18,26
	60	9,68	14,48	8,33	11,21
Srednja vrednost		10,645	17,61	9,515	14,735
Polifenoli (mg GAE /l)	0	55,97	53,78	117,56	120,38
	60	51,59	47,84	112,72	108,50
Srednja vrednost		53,78	50,81	115,14	114,44

U literaturi se mogu naći kontradiktorni podaci o promeni sadržaja polifenola tokom skladištenja. Značajan pad u nivou polifenola u sokovima od pomorandže tokom relativno kratkog perioda skladištenja ustanovili su del Caro i sar., (2004), dok u istraživanjima Calisanturk i sar., (2011) konstatovane su neznatne promene sadržaja polifenola.

Epidemiološke studije su pokazale korelaciju između visokog unosa polifenola i smanjenog rizika od kardiovaskularnih oboljenja kao i povoljno delovanje na neke tipove kancera i neurodegenerativna oboljenja kao što su Alzheimer-ova i Parkinson-ova bolest (Hertog i sar., 1996; Joshipura i sar., 2001). Novije studije su pokazale da fenolne fitohemikalije imaju visoku antioksidativnu aktivnost i izražena terapijska svojstva (Vattem, i sar., 2005), uključujući i borbu protiv šećerne bolesti i antihipertenzivnu aktivnost (Kwon i sar., 2006; Shetty, 1997; Shetty, 2001; Shetty i sar., 2005; Apostolidis i sar., 2007).

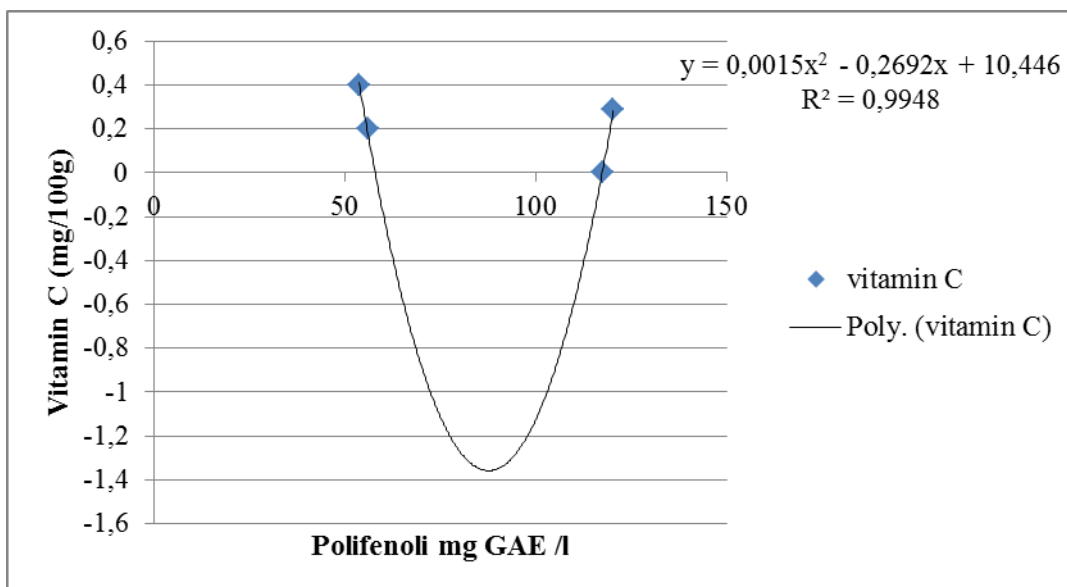
Rezultati sadržaja polifenolnih jedinjenja ukazuju da napici od hidrolizovanog permeata mogu da doprinesu povećanju dnevnog unosa ovih materija izraženih antioksidativnih svojstava.

Između sadržaja polifenola i antioksidativne vrednosti ( $AA_{DPPH\%}$ ) u napicima nakon proizvodnje utvrđena je značajna korelacija ( $R^2 = 0,958$ ) (slika 34). Takođe analizom rezultata primećen je visok koeficijet determinacije sadržaja polifenola i vitamina C u napicima  $R^2 = 0,9948$  (slika 35).



**Slika 34.** Korelacija polifenoli i DPPH antioksidativna vrednost u napicima nakon proizvodnje



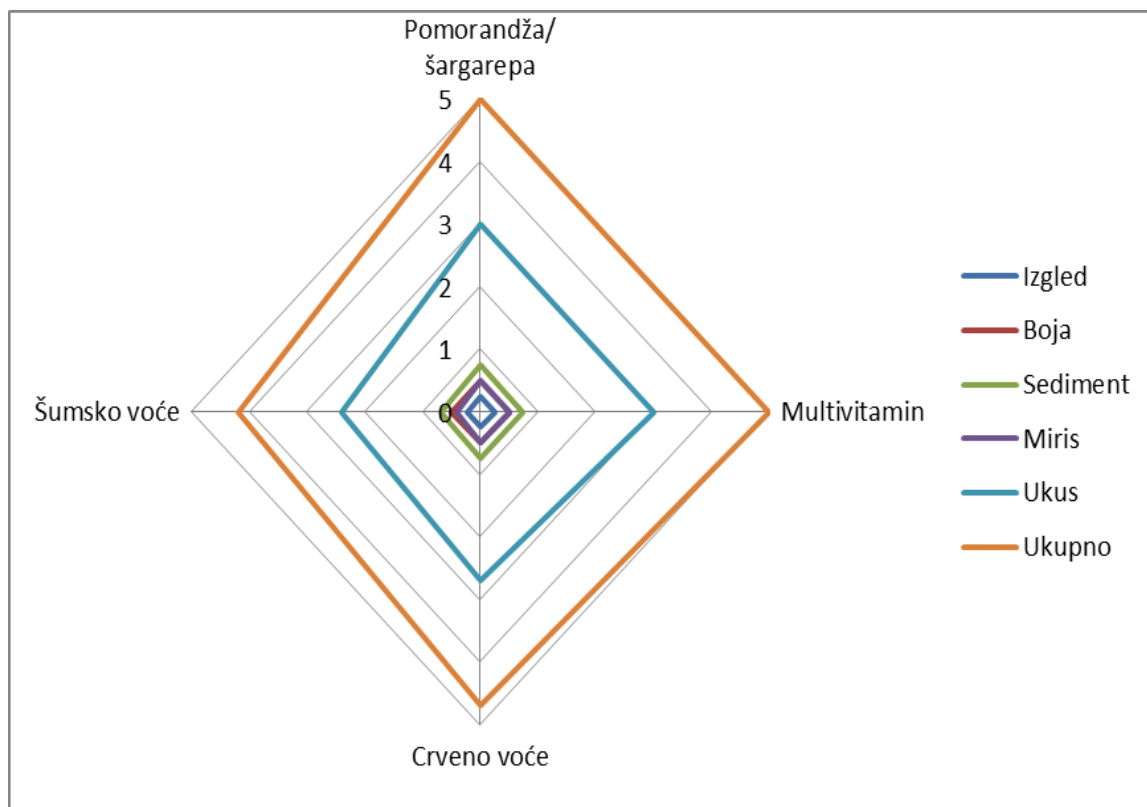


Slika 35. Korelacija sadržaja polifenola i vitamina C

### Senzorna analiza napitaka

Senzorna analiza napitaka na bazi hidrolizovanog permeata obuhvatila je ocenu sledećih karakteristika: ukus, miris, boja, talog, izgled i ukupni kvalitet (zbir prethodnih faktora). Ukus ima najveći uticaj na ukupan kvalitet proizvoda a ukupan kvalitet je najvažniji za procenu proizvoda (Đurić i sar., 2004). Termin „kvalitet“ sa aspekta senzorne analize proizvoda uglavnom se povezuje sa bezbednošću proizvoda, stvaranjem osećaja zadovoljstva (izgled, boja, viskozitet/konzistencija/tekstura, miris i ukus) kod potrošača, tj. opšte prihvatljivosti proizvoda (Popov-Rajić, 2013). Senzorna ocena napitaka prikazana je na slici 36.

Napitak sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa i multivitamin su ocenjeni maksimalno dok su napici sa crvenim voćem i šumskim voćem ocenjeni 93,6 %, odnosno 83,8 % od maksimuma. Ocena ukusa napitaka je bila veća za napitak pomorandža/šargarepa i multivitamin u odnosu na crveno voće i šumsko voće. Ukus je karakterističan, prepoznatljiv, blago kiseli i osvežavajući. Prema literaturnim podacima napici na bazi surutke sa sadržajem suve materije 6 % imaju osvežavajući ukus (Đurić i sar., 2004) što ispunjavaju svi uzorci napitaka od hidrolizovanog permeata.



**Slika 36.** Senzorna analiza napitaka nakon proizvodnje

Pojava sedimenta prisutna je u napitku šumsko voće, mada nije izražena, dok su ostali napici bili bez sedimenta. Miris napitaka od hidrolizovanog permeata je tipičan kod napitaka pomorandža/šargarepa, multivitamin i crveno voće, a kod napitka sa šumskim voćem miris je slabo izražen, za razliku od napitaka sličnog tipa koji se proizvode od surutke kao osnove (Đurić i sar., 2004).

Na osnovu senzorne analize nakon proizvodnje napitaka, zaključeno je sledeće:

- boja uzoraka je ujednačena, karakteristična za grupu proizvoda;
- konzistencija napitaka je ujednačena;
- ukus napitaka je blag, prijatan, kisel-sladak zbog dodatih voćnih baza i njihovog sastava (sadržaj šećera i kiselina);
- miris napitaka je prijatan, blag i tipičan za korišćeni aromatični dodatak.

## Analiza boje

Pored senzorne ocene izvršeno je i merenje boje uzoraka pomoću CIE i CIE  $L^*a^*b^*$  kolorimetrijskog sistema boja. Boja proizvoda je parametar senzornog kvaliteta hrane koji potrošači prvo procenjuju (Calvo i sar., 2001). U svetu postoji više sistema za definisanje boje od kojih CIE je najpoznatiji preporučeni sistem, kojim se kvantifikuje boja u smislu tristimulusnih vrednosti, koji su obračunati u CIE  $L^*a^*b^*$  prostoru boja (Popov-Raljić, 2013).

Rezultati instrumentalnog određivanja boje uzoraka proizvedenih napitaka na bazi hidrolizovanog permeata su prikazani u tabeli 29.

Na osnovu dobijenih rezultata sjajnost (Y) uzoraka iznosi od 10,07 % u napitku pomorandža/šargarepa do 4,61 % u crvenom voću, tj. uzorak crveno voće je tamniji. Tokom perioda skladištenja nije došlo do značajnije promene boje.

Vrednosti dominantne talasne dužine  $\lambda$  (nm) su iznosile od 583,01 (napitak sa multivitaminom), što prema dijagramu hromatičnosti odgovara narandžastom delu spektra, do 604,57 kod uzorka sa dodatkom voćne baze crveno voće. Prema vrednostima dominantne talasne dužine, a na osnovu dijagrama hromatičnosti uzorci sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa i multivitamin se nalaze u istom delu spektra.

Za CIE  $L^*a^*b^*$  sistem se može reći da su vrednosti za svetloću ( $L^*$ ) identične vrednostima za srednju reflektancu Y (%) u CIE sistemu, tj. uzorak sa pomorandžom/šargarepom je najsvetliji, a uzorak sa crvenim voćem je najtamniji.  $L^*$  služi kao psihometrijska korelacija percepcije svetlosti u opsegu od 0 (apsolutno crna) do 100 (apsolutno bela) i može se opisati korišćenjem pojmova jaka, umerena i bleđa, duž sive skale (Popov-Raljić, 2013).

Smanjenje  $L^*$  vrednosti parametara tokom perioda skladištenja napitaka nije prisutno u ovim uzorcima kao kod drugih autora (Sady i sar., 2013). Variranje  $L^*$  vrednosti u napicima od permeata je minimalno i na kraju procesa skladištenja vrednosti su nešto veće nego na početku. Povećanje ove vrednosti zabeležili su i Esteve i sar., (2005) u napicima od pomorandže.

**Tabela 29.** Rezultati ispitivanja boje napitaka tokom skladištenja

<b>a)</b>					
CIE sistem	Skladištenje dan	Napici			
		pomorandža/ šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
Y (%)	0	10,07±0,02	9,41±0,15	4,61±0,01	5,46±0,16
	15	10,50±0,02	9,29±0,08	4,61±0,05	5,4±0,06
	30	11,24±0,01	9,87±0,05	4,91±0,01	6,27±0,29
	45	11,11±0,04	9,98±0,17	4,87±0,03	6,21±0,20
	60	10,75±0,08	9,41±0,13	4,74±0,10	5,82±0,02
λ (nm)	0	583,70±0,05	583,01±0,03	604,57±0,09	597,46±0,06
	15	583,20±0,02	584,37±0,08	603,54±0,14	596,41±0,13
	30	582,82±0,02	584,39±0,03	603,17±0,23	595,34±0,14
	45	582,96±0,03	584,51±0,11	604,59±0,26	595,95±0,14
	60	583±0,03	584,64±0,09	603,47±0,47	595,22±0,75
<b>b)</b>					
CIE L*a*b*	dan	pomorandža/ šargarepa	multivitamin	crveno voće	šumsko voće
L*	0	37,97±0,03	36,76±0,28	25,61±0,02	27,99±0,44
	15	38,73±0,03	36,55±0,16	25,61±0,14	27,85±0,16
	30	39,98±0,02	37,6±0,10	26,48±0,02	30,08±0,70
	45	39,76±0,06	37,81±0,30	26,37±0,08	29,92±0,49
	60	39,15±0,13	36,75±0,25	25,98±0,27	28,93±0,06
a*	0	11,17±0,06	9,42±0,14	12,51±0,02	17,29±0,59
	15	10,74±0,03	11,60±0,21	11,92±0,39	16,11±0,23
	30	10,38±0,03	11,98±0,06	12,17±0,07	16,98±0,51
	45	10,50±0,07	12,37±0,31	12,29±0,04	17,07±0,43
	60	10,63±0,06	12,12±0,29	12,12±0,12	16,21±0,27
b*	0	30,1±0,09	27,39±0,59	6,34±0,02	13,35±0,53
	15	31,55±0,04	28,13±0,28	6,27±0,23	12,97±0,19
	30	32,37±0,04	29,14±0,18	6,50±0,06	14,63±0,60
	45	31,92±0,09	29,82±0,52	6,18±0,06	14,19±0,45
	60	31,58±0,12	28,44±0,53	6,40±0,20	13,64±0,21

Vrednosti parametara a\* i b\* za ispitivane napitke bili su pozitivni. Pozitivna vrednost a\* izražava crvenu boju, a pozitivna b\* vrednost žutu. Na osnovu izračunatih vrednosti za psihometrijski ton a\* i psihometrijsku hromu b\* može se konstatovati da je vrednost psihometrijskog tona najveća kod uzoraka sa šumskim voćem, a vrednost psihometrijske hrome najviša kod uzorka sa dodatkom pomorandže/šargarepe. Period skladištenja ima uticaja

na pomenute vrednosti. U svim uzorcima napitaka vrednost  $a^*$  je šezdesetog dana skladištenja manja nego na početku, sem kod napitka sa multivitaminom gde vrednost tokom skladištenja raste, tj. dolazi do promene vrednosti udela crvene/zelene boje ( $a^*$ ).

Udeo žute/plave boje ( $b^*$ ) tokom skladištenja se takođe menja. U svim napicima uočen je blagi porast udela žute boje, ali se međusobni odnos ne menja, tj. i šezdesetog dana uzorak sa pomorandžom/šargarepom ima najveću vrednost, a napitak sa crevenim voćem najnižu.

Izračunata je ukupna promena boje  $\Delta E$  u odnosu na uzorak nakon proizvodnje odnosno prvog dana skladištenja. Nakon 60 dana skladištenja ukupna promena boje iznosila je 1,968 za napitak sa voćnom bazom pomorandža/šargarepa, 2,897 za multivitamin, 0,541 za crveno voće i 1,461 za napitak sa šumskim voćem. Stepem razlike u boji između dva uzorka na osnovu ukupne promene boje vrednosti može se tumačiti na sledeći način:  $\Delta E$  u rasponu od 0 - 0,5 ukazuje neprimetnu razliku u boji, 0,5 - 1,5 mala razlika, 1,5 - 3,0 samo primetna razlika, 3,0 - 6,0 izražena razlika, 6,0 - 12,0 izuzetno izražena razlika i iznad 12,0 druga nijansa boje (Kim i sar., 2008).

Na osnovu prikazanih rezultata instrumentalnog određivanja boje napitaka tokom 60 dana skladištenja, može se zaključiti da je mala razlika u boji kod uzoraka sa dodatkom voćne baze crvenog voća i šumskog voća, a značajna razlika u napicima sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa i multivitamin.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih istraživanja i prikazanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izneti sledeći zaključci:

- Korišćenjem enzima  $\beta$  - galaktozidaze (0,1; 0,3 i 0,5 g/100g) na temperaturama 20°, 30° i 40° C postignuti su različiti stepeni hidrolize laktoze u UF permeatu mleka.
- Na osnovu rezultata statističke analize sadržaja laktoze, glukoze i galaktoze u uzorcima hidrolizovanog permeata evidentno je da koncentracija enzima  $\beta$ -galaktozidaze i vreme hidrolize permeata, kao i interakcija navedenih faktora imaju značajan uticaj na sadržaj laktoze.
- Najveći stepen hidrolize laktoze (99 %) na temperaturi 20° C postiže se nakon 60 minuta sa dodatkom enzima u koncentraciji 0,5 g/100g. Analiza rezultata hidrolize laktoze pokazuje da koncentracija enzima  $\beta$ -galaktozidaze i vreme hidrolize permeata, kao i interakcija navedenih faktora imaju značajan uticaj na sadržaj laktoze. Generalno posmatrano, značajniji je uticaj linearnih koeficijenata u odnosu na kvadratni i koeficijente interakcije na glukozu i galaktozu pri temperaturi 20° C.
- Na temperaturi 30° C posle 60 minuta hidrolize permeata sa 0,1 g/100g enzima sadržaj laktoze iznosi 0,27 g/100g, a stepen hidrolize je 95 %. Potpuna hidroliza laktoze na ovoj temperaturi postignuta je za 30 minuta sa 0,3 g/100g  $\beta$ -galaktozidaze, a u slučaju dodavanja 0,5 g/100g enzima za 20 minuta. Povećanje koncentracije enzima  $\beta$  - galaktozidaze (od 0,1 do 0,5 g/100g) značajno utiče na stepen hidrolize laktoze u permeatu na 30° C. Linearni koeficijenti imaju značajniji uticaj na sadržaj laktoze u poređenju na kvadratne koeficijente. Takođe značajan uticaj na sadržaj laktoze ima koncentracija enzima, vreme hidrolize, kao i interakcija navedenih parametara.
- Dodatkom enzima  $\beta$  - galaktozidaze u koncentraciji 0,1 g/100g na temperaturi 40° C za 60 minuta postiže se 100 % stepen hidrolize prisutne laktoze u permeatu. Sa većom koncentracijom enzima, 0,3 g/100g odnosno 0,5 g/100g, na istoj temperaturi, isti efekat se postiže za 20 minuta. Na temperaturi 40° C i linearni i kvadratni koeficijenti imaju značajan uticaj na sadržaj laktoze, glukoze i galaktoze. Takođe, koncentracija enzima i vreme hidrolize, kao i njihova interakcija značajno utiče na sadržaj laktoze, glukoze i galaktoze jer su sve p vrednosti niže od 0,05.

➤ Ispitivanjem kinetike hidrolize laktoze potvrđena je kinetika prvog reda. Generalno posmatrano visoki koeficijenti determinacije pokazuju dobro poklapanje eksperimentalnih rezultata i matematičkog modela reakcije prvog reda. Vrednosti se kreću od 0,974 (temperatura 20° C) do preko 0,990 (na temperaturama 30° C i 40° C) pri koncentraciji enzima 0,1 g/100g. Koeficijent determinacije pri različitim koncentracijama enzima na temperaturi 20° C ima niže vrednosti u opsegu od 0,902 (koncentracija 0,5 g/100g) do 0,974 (0,1 g/100g). Energija aktivacije ( $E_a$ ) za enzimske reakcije hidrolize laktoze iznosi  $E_a = 35,1$  kJ/mol, dok je koeficijent determinacije Arenijusove jednačine 0,917.

➤ Optimalna količina enzima za potpunu hidrolizu laktoze u permeatu u periodu od 60 minuta je 0,1 g/100g na 40° C. Pri navedenim uslovima konstanta brzine reakcije iznosi 0,0696 1/min. Tako dobijen hidrolizovani permeat korišćen je za proizvodnju četiri napitka sa voćnim dodacima.

➤ Promene osnovnih hemijskih sastojaka napitaka tokom 60 dana skladištenja su minimalne. Proizvedeni napici od hidrolizovanog permeata su delaktozirani i ne sadrže mlečnu mast. Od ukupnih šećera u svim napicima glukoza čini više od 50 %: napitak šumsko voće - 50,16 %; napitak pomorandža/šargarepa - 50,42 %; napitak multivitamin - 54,65 %, odnosno napitak crveno voće - 55,13 %.

➤ Najzastupljeniji mineral u napicima je kalijum. Najviše kalijuma sadrži napitak crveno voće - 1122,3 mg/kg, dok je najmanji sadržaj u napicima multivitamin i šumsko voće - 980,1 mg/kg. Drugi mineral u napicima po zastupljenosti je kalcijum. Prosečan sadržaj kalcijuma iznosi 424,9 mg/kg, zatim sledi natrijum koji je u proseku prisutan u količini 289,6 mg/kg. Nakon 60 dana skladištenja nije došlo do značajnih promena u sadržaju minerala u proizvedenim napicima od hidrolizovanog permeata.

➤ Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje imao je napitak sa dodatkom voćne baze multivitamin 0,3972 mg/100g, zatim šumsko voće 0,2887 mg/100g i pomorandža/šargarepa 0,1999 mg/100g. Vreme skladištenja utiče na promene sadržaja vitamina C u svim uzorcima. Posle mesec dana skladištenja zabeležene su značajnije promene sadržaja vitamina C, što su takođe najmanje kod napitka sa pomorandžom/šargarepom (manje od 1 %), a najveće u napitku sa šumskim voćem gde je zabeleženo smanjenje za 31 %. Značajna korelacija između sadržaja vitamina C i antioksidativne vrednosti izražene preko DPPH zabeležena je u uzorcima napitaka ( $R^2 = 0,901$ ).

➤ Analizirani uzorci sadrže ukupnih polifenola u intervalu od 53,78 do 120,38 mg GAE/l u zavisnosti od vrste napitka, odnosno dodatih voćnih baza. Napici mogu

da doprinesu povećanju dnevnog unosa ovih materija izraženih antioksidativnih svojstava. Vreme skladištenja utiče na promenu sadržaja polifenola u uzorcima. Sadržaj polifenolnih materija se tokom perioda skladištenja smanjio za 8 % - napitak pomorandža/šargarepa, 11 % - napitak multivitamin, 4 % - napitak crveno voće i za 10 % u napitku šumsko voće.

➤ Tokom perioda skladištenja dolazi do smanjenja DPPH vrednosti. Najmanji pad je u napitku sa pomorandžom/šargarepom (smanjenje za 17 %), a najveći u napitku sa šumskim voćem (za 39 %). Smanjenje antioksidativne aktivnosti nakon 60 dana može se objasniti degradacijom vitamina C i polifenola tokom skladištenja. Između sadržaja polifenola i DPPH antioksidativne vrednosti u napicima nakon proizvodnje utvrđena je značajna korelacija ( $R^2 = 0,958$ ).

➤ Senzorne osobine napitaka (izgled, boja, miris, konzistencija i ukus) nakon proizvodnje su karakteristične za grupu proizvoda i tipične za vrstu aromatičnog dodatka. Ukupna promena boje tokom šezdeset dana skladištenja (određena instrumentalnom metodom), računata u odnosu na uzorak nakon proizvodnje,  $\Delta E$ , pokazuje male vrednosti kod uzoraka sa dodatkom voćne baze crvenog voća i šumskog voća, a značajna razlika je konstatovana u napicima sa dodatkom voćne baze pomorandža/šargarepa i multivitamin.

➤ Generalno može se zaključiti da se primenjenim tehnološkim procesom dobijaju napici od hidrolizovanog UF permeata mleka stabilnog fizičko-hemijskog sastava tokom 60 dana skladištenja, visoke nutritivne i niske energetske vrednosti. Predloženim procesom prerade permeata rešava se problem odlaganja permeata njegovim prevođenjem u proizvod namenjen ljudskoj ishrani koji bi u potpunosti zadovoljio kriterijume potrošača intolerantnih na laktozu.



## LITERATURA

Abd El-Khair, A.A. (2009): Formulation of milk permeates for utilization as electrolyte beverages. *Australian Journal Basic and Applied Sciences*, 3: 572-578.

Abd El-Salam, M.H., Mahran, G.A., Haggag, H.F., Mahfouz, M.B., Zaglol, A. (1991): Manufacture and properties of beverages based on fermented permeate and natural fruit juices. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 13: 95-101.

Adamović, O., Stojanović, B., Grubić, G. (2004): Sporedni proizvodi industrije mleka – izvori hranljivih materija za ishranu podmlatka domaćih životinja. Zbornik radova, Beograd, 191-194.

Aydogan, M., Korkmaz, A. (2011): Does Vitamin C Act as an Antioxidant or Prooxidant?, chapter IV, in: *Vitamin C: Nutrition, Side Effects, and Supplements*, Jackson, C. M. (ed.), 169-204.

Amirdivani, S., Baba, A.S. (2011): Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and *in vitro* inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT –Food Science and Technology*, 44: 1458-1464.

Anderson, G.H., Catherine, N.L., Woodend, D.M., Wolever, T.M. (2002): Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 1023-1030.

Anekar, S., Rao, C.R. (2009): Ultra filtration-Tool to recover valuable constituent from dairy waste water. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 4:125-132.

Apostolidis, E., Kwon, Y-I., Shetty, K. (2007): Inhibitory potential of herb, fruit and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 46-54.

Babu, J., Kumar, S., Babu, P., Prasad, J.H., Ghoshal, U.C. (2010): Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91: 140-146.

Bangert, J.G. (1975): US Patent 3,949,098.

Barling, P.M. (2012): Lactose tolerance and intolerance in Malaysians. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*, 6 (Suppl 1): 12-23.

Beucler, J., Drake, M., Foegeding, A. (2005): Design of a beverage from whey permeate. *Journal of Food Science*, (70) 4: 77-85.

Bird, J. (1996): The application of membrane systems in the dairy industry. *International Journal of Dairy Technology*, 49 (1): 16-23.

Block, R. J. (1952): US Patent 2, 592, 509.

Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., Crozier, A. (2010): Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 3901–3909.

Brown-Esters, O., Mc Namara, P., Savaiano, D. (2012): Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22: 98-103.

Bruhn, J. (2002): Latest development in On-farm ultrafiltration. 1. History of On - farm ultrafiltration of milk. *Journal of Animal Science*, 84.

Bylund, G. (2003): Dairy Processing Handbook, Tetra Pak Processing Systems, Cornell University, 436.

Caliskantürk, S., Soylemez, Z., Özdemir, Y. (2011): Effect of time and temperature on orange juice during storage. *Advances in Food Sciences*, 33: 22–27.

Calvo, C., Salvador, A., Fiszman, S.M. (2001): Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit-flavoured yoghurts. *European Food Research and Technology*, 99–103.

Campbell, A.K., Waud, J.P., Matthews, S.B. (2005): The molecular basis of lactose intolerance. *Science Progress*, 88 (3): 157-202.

Carić, M., Akkerman, J.C., Milanović, S., Kentish, S.E., Tamime, A. (2009): Technology of Evaporators, Membrane Processing and Dryers, in: Dairy Powders and Concentrated Products, A. Tamime (ed.), Wiley-Blackwell, 99-148.

Carić, M., Milanović, S., Vucelja D. (2000): Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad, 204.

Carić, M., Milanović, S. (1995): Savremene mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda u tehnologiji mleka, u: *Ekotehnologija u prehrambenoj industriji i biotehnologiji*, Baras J. (ur.), Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet, 153-164.

Carić, M. (1994): Concentrated and Dried Dairy Products, VCH Publishers, Inc., New York, 249.

Coton, S. G. (1980): The utilisation of permeates from ultrafiltration of whey and skim milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 33-89.

Coté, A., Brown, W.A., Cameron, D., van Walsum, G. P. (2004): Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol. *Journal of Dairy Science*, 87 (6): 1608–1620.

Coughlin, J. R., Nickerson, A. (1975): Acid-Catalyzed Hydrolysis of Lactose in Whey and Aqueous Solutions. *Journal of Dairy Science*, 58 (2): 169-174.

Craven, G.R., Steers, E.J., Anfinsen, C.B. (1965): Purification, composition, and molecular weight of the beta-galactosidase of *Escherichia coli* k12. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 2468–2477.

Dahlen, A. (1984): US Patent 4,478,855.

De Boer, R., Zomerman, J. J., Hiddink, J., Aufderheyde, J., Van Swaay, W.P.M., Smolders, C.A. (1980): Fluidized beds as turbulence promoters in the concentration of food liquids by reverse osmosis. *Journal of Food Science*, 45:1522-1528.

De Boer, R., Robbertsen, T. A. (1981): A purified hydrolyzed lactose syrup made from ultrafiltration permeate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35: 95–111.

Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., Agabbio, M. (2004): Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84: 99–105.

Dekker, P. J. T., Daamen, C. B. G. (2011):  $\beta$ -D-Galactosidase, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd edition, J. W. Fuquay, P.F. Fox, P. L. H. Mc Sweeney (eds.), San Diego: Academic Press, 276-283.

Donskaja, G.A., Tihomirova, G.P., Kosarinskaja, R.K., Kuzmin, V.M., Žamakočjan, M.S., Potrapova, M.A. (1978): Moločnaja Promišljenost, 24-25.

Drgalić, I., Tratnik, Lj. (2004): Primjena i značaj mikrofiltracije u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo*, 54 (3): 225-245.

Đurić, M., Carić, M., Milanović, S., Tekić, M., Panić, M. (2004): Development of whey-based beverages. *European Food Research and Technology*, 219: 321–328.

- Dorđević, J. (1982): Mleko – hemija i fizika mleka, PKB – Agroekonomik, Beograd, 277.
- Ernstrom, C.A., Sutherland, B.J., Jameson, G.W. (1980): Cheese Base for Processing: A High Yield Product from Whole Milk by Ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 63: 228-234.
- Esteve, M.J., Frígola, A., Rodrigo, C., Rodrigo, D. (2005): Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and colour of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 1413–1422.
- Farnworth, E.R., Lagacé, M., Couture, R., Yaylayan, V., Stewart, B. (2001): Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34: 25–30.
- Ferreira, L. S., Souza, M. B., Trierweiler, J. O., Hitzmann, B., Folly, R. O. M. (2003): Analysis of experimental biosensor/FIA lactose measurements. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20: 7-13.
- Fidler, E., Lisowska, A., Walkowiak, J. (2009): Lactose intolerance - classification and diagnostics. *Pediatrics Polska*, 84 (6): 562-566.
- Fox, P. F. (2011): Lactose: Chemistry, Properties, in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd edition, J. W. Fuquay, P.F. Fox, P. L. H. McSweeney (eds.), San Diego: Academic Press, 173-181.
- Fox, P. F., McSweeney, P.L.H. (1998): Dairy Chemistry and Biochemistry, Blackie Academic and Professional Publishers, London, 478.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006): Extracellular and Intracellular Fluids, in: *Textbook of Medical Physiology*, 11th edition, Guyton, A.C., Hall, J.E. (eds.), Philadelphia: Elsevier Saunders, 291-305.
- Gavarić, D. (1995): Principi membranske filtracije sa primenom u tehnologiji mleka, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 556.
- Gavarić, D. (1984): Značaj laktoze u tehnologiji prerade mleka membranskim procesima, Savetovanje o značaju laktoze, Jugoslovenski mlekarSKI institut, Beograd, 20.
- Gänzle, M.G., Haase, G., Jelen, P. (2008): Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18: 685-694.
- Geilman, W.G., Schmidt, D., Herfurth-Kennedy, C., Path J. (1990): Potential of milk permeate as an electrolyte beverage. *Journal of Dairy Science*, 73 (1): 94.

- Geilman, W.G., Schmidt, D., Herfurth-Kennedy, C., Path, J., Cullor, J. (1992): Production of an electrolyte beverage from milk permeates. *Journal of Dairy Science*, 75: 2364-2369.
- Geilman, W. G. (1993): Preparation and properties of syrups made by the hydrolysis of lactose, in: *Lactose Hydrolysis*, Bulletin 289, International Dairy Federation. Brussels, 33–37.
- Gekas, V., Lopez-Leiva, M. (1985): Hydrolysis of lactose—a literature review. *Process Biochemistry*, 20: 2–12.
- German, J. H. (1997): Applied enzymology of lactose hydrolysis, *Milk Powders for the Future*, 46: 81–87.
- Glover, F.A. (1985): Ultrafiltration and Reverse Osmosis for Dairy Industry, National Institute for Research in Dairying, Reading, Great Britain, Bulletin No.5, 207.
- Girsh, L.S. (1999): Process of making a dairy permeate-based beverage. U.S. Patent No. 5912040.
- Girsh, L.S. (2001): US Patent No. 2001/0022986 A1.
- Grosová, Z., Rosenberg, M., Rebroš, M. (2008): Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26: 1–14.
- Haggett, T. O. R. (1976): The acid catalysed hydrolysis of lactose using a cationexchange resin. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11: 176–179.
- Hammond, N.A. (1992): US Patent 5153019.
- Harju, M. (1987): Lactose hydrolysis. Brussels, Belgium, International Dairy Federation. Bulletin 212, 50–55.
- Harju, M., Kallionen, H., Tossavainen, O. (2012): Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22: 104-109.
- Harper, W.J. (1992): Lactose and lactose derivatives, in: *Whey and Lactose Processing*, J.G. Zadow (ed.). Elsevier Appl. Sci., New York, 317.
- Hattem H. E, Elham H. Abouel-Einin, Mehanna N. M. (2011): Utilization of milk permeate in the manufacture of sports drinks. *Journal of Brewing and Distilling*, 2 (2): 23-27.

Hertog, M. G., Bueno-de-Mesquita, H.B., Fehily, A. M., Sweetnam, P. M., Elwood, P. C., Kromhout, D. (1996): Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 5: 673-677.

Husain, Q., (2010): Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30: 41–62.

<http://faostat.fao.org>. FAO Statistical Database, FAOSTAT, FAO, Rome, Italy (2009).

<http://www.haspi.org/curriculum-library/Med-Bio-Core-Labs/LactoseTolerance>.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002350.htm>.

Itan, Y., Jones, B.L., Ingram, C.J., Swallow, D.M., Thomas M.G. (2010): A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology* 9: 10-36.

Jankowiak, C., Ludwig, D. (2008): Frequent causes of diarrhea: celiac disease and lactose intolerance. *Medizinische Klinik (Munich)*, 103 (6): 413-424.

Jelen, P. (2009): Dried Whey, Whey Proteins, Lactose and Lactose Derivative Products, in: *Dairy Powders and Concentrated Products*, A. Y. Tamime (ed.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 255-266.

Jelen, P., Michel, C. (1999): Sensory impact in protein-standardised milk. *Milchwissenschaft*, 54: 438–441.

Jeličić, I., Božanić, R., Tratnik, Lj. (2008): Whey-based beverages- a new generation of dairy products. *Mljekarstvo*, 58 (3): 257-274.

Joshiyura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willett, W. C. (2001): The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 134: 1106-1114.

Juajun, O., Nguyen, T.H., Maischberger, T., Iqbal, S., Haltrich, D., Yamabhai M. (2011): Cloning, purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 645–654.

Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J.M. (2004): Kinetic models of activity for  $\beta$ -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (1): 33–40.

Jurčić, Z., Oberiter, V. (1996): Nepoželjne imunološke (preosjetljivost) i neimunološke (nepodnošljivost) reakcije pri prehrani kravljim mlijekom. *Mljekarstvo*, 46 (1): 41-55.

Kanbay, M., Bayram, Y., Solak, Y., Sanders, P.W. (2013): Dietary Potassium: a Key Mediator of the Cardiovascular Response to Dietary Sodium Chloride. *Journal of the American Society of Hypertension*, 7(5): 395–400.

Karry, A., Jackson, B.S., Savaiano, D.A. (2001): Lactose Maldigestion, Calcium Intake and Osteoporosis in African-, Asian-, and Hispanic-Americans. *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (2): 198–207.

Kaur, C., Kapoor, H.C. (2001): Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36 (7): 703-725.

Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T. (2009): HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91: 187–192.

Kerner, J. (1995): Formula allergy and intolerance. *Gastroenterology Clinics of North America*, 24: 1-15.

Kim, S., Ha, T. Y., Park, J. (2008): Characteristics of pigment composition and colour value by the difference of harvesting times in Korean red pepper varieties (*Capsicum annuum*, L.). *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 915–920.

Klašnja, M.T., Šćiban, M.B. (2000): Osnovi procesa anaerobnog prečišćavanja otpadnih voda prehrambene industrije i industrije pića, *Acta Periodica Technologica*, 31 1-748.

Kleiner, S.M. (1999): Water an essential but overlooked nutrient. *Journal of the American Dietetic Association*, 99 (2): 220-6.

Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., Gliszczynska-Swiglo, A. (2007): Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal Food Composition and Analysis*, 20: 313–322.

Koffi, E., Shewfelt, R., Wicker, L. (2005): Storage stability and sensory analysis of UHT processed whey-banana beverages. *Journal of Food Quality*, 28: 386-401.

Konopka, P. (2001): Sporternahrung. Leistungsforderung durch vollwertige und bedarfangepasste Ernährung, BLV Verlagsgesellschaft mbh, Munchen, 192.

Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P.H., Törrönen, A.R. (2007): Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1612 -1619.

Kwon, Y. I., Vatter, D. A., Shetty, K. (2006): Clonal herbs of Lamiaceae species against diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15: 107–118.

- Lacroix, B., Kedinger, M., Simon-Assman, P., Haffen, K. (1984): Early organogenesis of human small intestine: scanning electron microscopy and brush border enzymology. *Gut*, 25 (9): 925-930.
- Ladero, M., Santos, A., García-Ochoa, F. (2000): Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 583–592.
- Ladero, M., Santos, A., Garcia, J.L., Garcia-Ochoa, F. (2001): Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered beta-galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modeling. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 181 – 193.
- Lember, M. (2012): Hypolactasia: a common enzyme deficiency leading to lactose malabsorption and intolerance. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej: Polish Archives of Internal Medicine*, 122 (1): 60-4.
- Lindmark-Månsson, H., Åkesson, B. (2000): Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (1): 103-110.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., González-Paramás, A. M., Törrönen, A.R. (2004): Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4477-4486.
- MacBean, R., Hall, R., Willman, N. (1979): Heterogeneous acid catalysed hydrolysis of lactose with cation exchange resins. *Australian Journal of Dairy Technology*, 34: 53-59.
- Mądry, E., Fidler, E., Walkowiak, J. (2010): Lactose intolerance – current state of knowledge. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9 (3): 343-350.
- Mahoney, R.R. (1982): Modification of lactose and lactose-containing dairy products with  $\beta$ -Galactosidase, in: *Developments in Dairy Chemistry*, 3rd edition, P.F.Fox (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Ltd New York, 69-109.
- Malbaša, R., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2009): Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe. *Prehrambena industrija*, 20 (1-2): 31-34.
- Mann, E. J. (1989): Whey utilization – part 1. *Dairy Industries International*, 54 (7):10.
- Marwaha, S.S., Kennedy, J.F. (2007): Whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science & Technology*, 23: 323-336.
- Matthews, S.B., Waud, J.P., Roberts, A.G., Campbell, A.K. (2005): Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*, 81: 167-173.



Matioli, G., de Moraes, F.F., Zanin, G.M. (2001): Hydrolysis of lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. *Acta Scientiarum*, 23: 655-659.

Maubois, J.L., Ostojć, M. (1980): Najnoviji pravci razvoja ultrafiltracije u mlekarskoj industriji. Seminar za mlekarsku industriju, Institut za mlekarstvo, Beograd.

Maubois, J.L. (1978): XX C.I.L., Paris.

Maughan, R.J., Murray, R. (2001): Sports Drinks: Basic Science and Practical Aspects. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, USA.

Mehaia, M.A., Alvarez, J., Cheryan, M. (1993): Hydrolysis of Whey Permeate Lactose in a Continuous Stirred Tank Membrane Reactor. *International Dairy Journal*, 3: 179-192.

Miglioranza, L.H.S., Matsuo, T., Caballero-Cordoba, G.M., Dichi, J.B., Cyrion, E.S., Oliveira, I.B.N., Martins, M.S., Polezer, N.M., Dichi, I. (2003): Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia Prevalence in Children and Adolescents From Deprived Areas in Londrina, Parana, Brazil. *Nutrition*, 19: 419-421.

Milanović, S., Carić, M. (1990): Production and quality of demineralized: permeate, concentrated permeate and permeate powder. *Milchwissenschaft*, 45: 303-308.

Mlichova, Z., Rosenberg, M. (2006): Current trends of  $\beta$ -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45: 47-54.

Murray, R., Stofan, J. (2001): Formulating carbohydrate-electrolyte drinks for optimal efficacy, in: *Sports Drinks: Basic Science and Practical Aspects*, Maughan R. Murray R. (eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, 183-195.

Nickerson, T. A. (1974): Lactose, in: *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 2nd edition, B. H. Webb, A. H. Johnson, J. A. Alford (eds.), AVI Publishing, Westport, CA, USA, 273-324.

Nijpels, H. H. (1981): Lactases and their applications, in: *Enzyme and Food Processing*, G. G. Birch, H. Blakebrough, K. J. Parker (eds.), Applied Science Publishers, London, UK, 89.

Ostergaard, B. (1988): Lactose from Ultrafiltration Permeate, Marketing Bulletin, Pasilac-Danish Turnkey Dairies, Aarhus, Denmark, 14.

Ostojić, M., Karić, M. (2005): Mogućnosti primena membranskih procesa u proizvodnji mleka, *Zbornih naučnih radova*, 11(3-4): 103-114.

- Ostojić, M. (1983): Dekomponovanje mleka ultrafiltracijom sa osvrtom na hemijski sastav retentata i permeata, Univerzitet Novi Sad, Poljoprivredni fakultet,.
- Panesar, P.S., Kumari, S., Panesar, R. (2010): Potential Applications of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. *Enzyme Research*, 1-16.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Kumar, H. (2006): Microbial Production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Hemical Technology and Biotechnology*, 81: 530-543.
- Passe, D.H., Horn, M., Murray, R. (2000): Impact of beverage acceptability on fluid intake during exercise. *Appetite*, 35: 219-229.
- Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Esperanza Cerdán, M., Becerra, M., Sanz-Aparicio, J. (2012): Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Journal of Structural Biology*, 177 (2): 392–401.
- Pessela, B. C. CH., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A. V., Guisan, J. M., Lafuente, R. F., (2003): The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2-3): 199–205.
- Pollard, J. M., Carol, A., Jenna, A. (2006): Energy & Sports Drinks. *Health Hints*, 10: 1-7.
- Popov-Raljić, J. (2013): Senzorna analiza hrane i pića. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno - matematički fakultet, Novi Sad, 339.
- Pravilnik o izmenama i dopunama pravilnika o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010): Službeni glasnik Republike Srbije, broj 69/2010.
- Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010): Službeni glasnik Republike Srbije, broj 33/2010.
- Pribiš, V. (1999): Nutritivne osobine hrane, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 268.
- Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Beograd i Tehnološki fakultet, Novi Sad, 331.
- Remer, R.K. (1982): US Patent 4,325,977.
- Renner, E., Abd El-Salam, M.H. (1991): Application of Ultrafiltration in the Dairy Industry, Elsevier Science Publishers Ltd, Barking, 315-343.
- Reust, H. (2001): US Patent 6,277,426 B1.

Richmond, M., Gray, J., Stine, C. (1981):  $\beta$ -galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. *Journal of Dairy Science*, 64: 1759–1771.

Rosenbloom, C.A. (2000): Sports nutrition, a guide for the professional working with active people third edition. Chicago IL: The American Dietetic Association.

Roy, I., Gupta, M. N. (2003): Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39 (3): 325–332.

Rusnyk, R.A., Still, C.D. (2001): Lactose intolerance. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 101 (4): 10-12.

Ryder, D. N. (1988). Hydrolysis of lactose in whey products. *International Dairy Federation Bulletin*, Brussels, Belgium, 202: 45–52.

Saboya, L.V., Maubois, J.L. (2000): Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait*, (80): 541-553.

Sady, M., Jaworska, G., Grega, T., Bernas, E, Domagal, J. (2013): Application of Acid Whey in Orange Drink Production. *Food Technology and Biotechnology*, 51 (2): 266-277.

Sanz, M.L., Villamiel, M., Martínez-Castro, I. (2004): Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry*, 8: 325–328.

Schmitz, J. (1991): Conduite a tenir devant une intolerance au lactose. *Cahier Nutrition Dietetique*, 26: 207-210.

Schlueter, A. K., Johnston, C.S. (2011): Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16 (1): 49-57.

Schroder, B.G. (2002): US Patent 6,465,030.

Scibelli, G.E. (1980): US Patent 4,309,417.

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., De, B. (2010): Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3 (1): 91-100.

Sherwood, S., Jenkins, D., (2007): US PATENT US 2007/0178214 a1.

Shetty, K. (1997): Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 6: 162–171.

Shetty, K. (2001): Biosynthesis of rosmarinic acid and applications in medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 8: 161–181.

Shetty, K., Clydesdale, F., Vatter, D. (2005): Clonal screening and sprout based bioprocessing of phenolic phytochemicals for functional foods, in: *Food biotechnology*, 2nd edition, K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, & R. E. Levin (eds.), New York: CRC Taylor & Francis, 603.

Shukla, T. P. (1975):  $\beta$ -Galactosidase technology—a solution to the lactose problem. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 5: 325–356.

Shori, A. B., Baba, A. S. (2013): Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt. *Journal Saudi Chemical Society* 17(3): 295-301.

Sienkiewicz, T., Riedel, C.-L. (1990): Whey and whey utilization, 2nd edition, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, Germany, 263–264.

Simpson, G. R., Blay, R. A. (1966): Rapid method for determination of metals copper, zinc, tin, iron and calcium in foodstuffs by atomic absorption. *Food Trade Review*, 36: 35.

Smolin, L., Grosvenor, M. (2000): Nutrition: Science and Applications. A Division of Harcourt College Publishers, 3rd edition, Philadelphia, Saunders College Publishing, 597.

Solomons, N.W. (2002): Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (4): 50-55.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. (2005): Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.

Stojiljković, N., Stoiljković, M., Randjelović, P., Veljković, S., Mihailović, D. (2012): Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64 (1-2): 69-74.

Swallow, D.M. (2003): Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics*, 37: 197-219.

Swallow, D. M. (2011): Lactose Intolerance, in: Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd edition, J. W. Fuquay, P.F. Fox, & P. L. H. Mc Sweeney (eds.), San Diego: Academic Press, 236-239.

Şener, N., Kihç Apar, D., Demirhan, E., Özbek, B. (2008): Milk Lactose Hydrolysis in a Batch Reactor: Optimisation of Process Parameters, Kinetics of Hydrolysis and Enzyme Inactivation, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22 (2): 185–193.

Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2004): *Yoghurt, Science and Technology*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 619.

Teixeira, A., Johnson, D. E., Zall, R. (1983): New uses for lactose permeate. *Food Engineering*, 55 (5): 110.

Unal, G., (2012): Antioxidant activity of commercial dairy products. *Agro FOOD industry hi-tech*, 23 (1): 39-41.

Vattem, D. A., Ghaedian, R., Shetty, K. (2005): Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: Focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14, 120–130.

Vasiljevic, T., Jelen, P. (2002): Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for preparation of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3 (2): 175-184.

Vesa, T.H., Marteau, P., Korpela, R. (2000): Lactose Intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (2): 165-175.

Wiesenberger, A., Kolb, E., Engelhardt, I. (1984): US Patent 4,486, 413.

Williams, L.A. (2001): Trend setting drinks. The new developments and trends that will be shaping their industry in the years to come. *The World Food Ingredients*, 50: 45-48.

[www.ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milksynth\\_lactosesynth.html](http://www.ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milksynth_lactosesynth.html)

[www.sprinttechnologies.com](http://www.sprinttechnologies.com)

Yan, S.H., Hill, C.G.J., Amundos, C.H. (1979): *Journal of Dairy Science*, 62: 23-40.

Yanishlieva-Maslarova, N. N., Heinonen, M. (2001): Sources of natural antioxidants: Vegetables. Fruits. Herbs. Spices and Teas, in: *Antioxidants in Food. Practical Application*. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (eds.). Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, 210-263.

Yang, S. T., Silva, E. M. (1995): Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, 78: 2541-2562.

Zadow, J.G. (1986): Utilisation of Milk Components – Whey, chapter 7, in: *Modern Dairy Technology*, vol.1, R.K. Robertson, (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Barking, 273-317.

Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Pavlović, R., Kocić, G., Nikolić, G., Jovanović, T. (2009): DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk, *Food industry-Milk and milk products*, 20 (1-2): 45-47.