

Mr Mirela D. Iličić

**OPTIMIZACIJA TEHNOLOŠKOG PROCESA PROIZVODNJE
FUNKCIONALNOG FERMENTISANOG MLEČNOG
NAPITKA**

Doktorska disertacija

Mentor:

Prof. dr Spasenija Milanović

Novi Sad, mart 2010.

**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:

VR Doktorska disertacija

Autor:

AU Mr Mirela Iličić, dipl. inž. tehnologije

Mentor:

MN Dr Spasenija Milanović, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Naslov rada:

NR Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka

Jezik publikacije:

JP Srpski (latinica)

Jezik izvoda:

JI Srpski/engleski

Zemlja publikovanja:

ZP Srbija

Uže geografsko područje:

UGP Vojvodina

Godina:

GO 2010

Izdavač:

IZ Autorski reprint

Mesto i adresa:

MA Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada:

FO Broj poglavlja: 6
Strana: 112
Literaturnih citata: 122
Tabela: 25
Slika: 66

Naučna oblast:

NO Prehrambena biotehnologija

Naučna disciplina:

ND Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda

Predmetna odrednica/ključne reči:

PO fermentisani mlečni napitak, čajna gljiva, tehnologija, nutritivna vrednost, funkcionalne karakteristike, fizičko-hemijska svojstva, optimizacija

UDK:**Čuva se:**

ČU Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

Važna napomena:

VN Nema

Izvod/abstrakt:**IZ**

U okviru doktorske disertacije ispitana je mogućnost proizvodnje fermentisanog mlečnog napitka uz primenu različitih vrsta i koncentracija nekonvencionalnog startera čajne gljive: a) nativnog inokuluma-I (10% i 15%) b) koncentrovanog mikrofiltracijom - MFI (10% i 15%) i c) koncentrovanog uparavanjem - UPI (1,5%, 3,0%, 10% i 15%). Varijante fermentisanog mlečnog napitka dobijene su korišćenjem mleka sa 0,9% i 2,2% mlečne masti. Za poboljšanje fizičko-hemijskih i teksturalnih karakteristika proizvoda u mleko pre inokulacije dodato je 0,02% enzima transglutaminaze (aktiviran na 40°C, a posle 2 sata je inaktiviran na 80°C, 1 minut). Fermentacija mleka (pri temperaturi 42°C) uz korišćenje inokuluma čajne gljive praćena je do postizanja pH vrednosti 4,5.

Nakon proizvodnje analizirana je nutritivna vrednost fermentisanih mlečnih napitaka: sadržaj masti, proteina, laktoze, galaktoze, gluukoze, fruktoze, mlečne i sirćetne kiseline, etanola, vitamina (B₁, B₂, B₆ i C), minerala (Ca, Mg, K, Na, Pb, Cd, Cu, Zn) i masnih kiselina. Sadržaj odabranih komponenata u napicima praćen je tokom 10 dana skladištenja. Fizičko-hemijske osobine (kiselost, sinerezis i sposobnost vezivanja vode), teksturalne karakteristike (čvrstoća, konzistencija, kohezivnost i

indeks viskoziteta) i viskozitet uzoraka praćeni su nakon proizvodnje i posle 10 dana skladištenja. Ukupan broj bakterija sirćetne kiseline (BSK) i kvasaca u fermentisanim napicima analiziran je nakon proizvodnje i tokom skladištenja. Varijante fermentisanih mlečnih napitaka senzorno su ocenjene nakon proizvodnje.

Na osnovu rezultata ispitivanja utvrđeno je da fermentacija mleka uz primenu nekonvencionalnog startera čajne gljive predstavlja složen biohemijski proces pri čemu fermentacija traje od 9 do 12-sati i prosečno je dva puta duža od fermentacije mleka u proizvodnji probiotskog i tradicionalnog jogurta. Sadržaj laktoze tokom fermentacije mleka manji je prosečno za 19,6% u odnosu na sadržaj laktoze u mleku. Uzorci proizvedeni sa nativnim inokulumom uz primenu transglutaminaze i koncentrata proteina surutke imaju za 15% niži sadržaj laktoze, a uzorak 15% I za 2% niži sadržaj u odnosu na uzorak 10% I. Uzorci proizvedeni sa 10% MFI i 15% MFI imaju za 11%, odnosno 21% niži sadržaj laktoze nakon proizvodnje u poređenju sa odgovarajućim uzorcima proizvedenim uz primenu nativnog inokuluma. Sniženje sadržaja laktoze je praćeno povećanjem sadržaja galaktoze i L-mlečne kiseline u svim uzorcima. D-mlečna kiselina, sirćetna kiselina i etanol zastupljeni su u veoma malim koncentracijama.

Imajući u vidu značaj vitamina C u ishrani i količinu detektovanu u fermentisanom mlečnom napitku, konzumiranjem 500 g napitka dobijenog primenom čajne gljive mogu da se zadovolje dnevne potrebe za vitaminom C.

Tokom proizvodnje fermentisanih napitaka sadržaj vitamina B₁ poraste za 5,09%, vitamina B₂ za 2,65% i B₆ za 2,03% u odnosu na mleko. U fermentisanom mlečnom napitku iz mleka sa 2,2% masti sadržaj vitamina B₆ je povećan 24,76% u odnosu na sadržaj u polaznom mleku. Fermentisani mlečni napici proizvedeni primenom čajne gljive iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti sa dodatkom 10% inokuluma čajne gljive sadrže najviše vitamina B₂ koji iznosi 108 (µg/100g), odnosno 136 (µg/100g). Mikrobiološki sastav napitaka se razlikuje u zavisnosti od vrste i sastava korišćenog inokuluma. Najveći broj BSK ($4,5 \cdot 10^4$ ćelija/mL) i kvasaca ($9 \cdot 10^4$ ćelija/mL) je u uzorku 10% MFI, dok je manji u napitku 10% I (BSK: kvasci = $4,05 \cdot 10^4$; $4,5 \cdot 10^4$).

Dodatkom transglutaminaze u minimalnoj koncentraciji od 0,02% postižu se znatno bolje fizičko-hemijske i reološke karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 0,9% masti.

Generalno posmatrano, korišćenjem 10% nativnog inokuluma za proizvodnju napitaka iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti dobijaju se proizvodi optimalnih hemijskih, mikrobioloških i senzornih karakteristika. Funkcionalni fermentisani mlečni napici proizvedeni uz primenu različitih vrsta i koncentracija čajne gljive su proizvodi visoke nutritivne vrednosti namenjeni različitim kategorijama potrošača.

Datum prihvatanja teme od strane Nastavno-Naučnog Veća:

DP 11.06.2009.

Datum odbrane:

DO 2010. godina

Članovi komisije:
(Naučni stepen/Ime i prezime/Zvanje/Fakultet)
KO

Predsednik: Dr Marijana Carić, profesor emeritus Univerziteta u Novom Sadu
Član (mentor): Dr Spasenija Milanović, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu
Član: Dr Dragojlo Obradović, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu, Univerzitet u Beogradu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type:
DT **Monographic publication**

Type of record:
TR **Textual material, printed**

Contents code:
CC **Ph.D. thesis**

Author:
AU **Mirela D. Iličić, M.Sc.**
Mentor:
MN **Spasenija D. Milanović, Ph.D., Full Professor,
Faculty of Technology, Novi Sad**

Title:
TI **Optimisation of functional fermented dairy beverage technology**

Language of text:
LT **Serbian (roman)**

Language of abstract:
LA **Serbian (roman)/English**

Country of publication:
CP **Serbia**

Locality of publication:
LP **Vojvodina**

Publication year:
PY **2010**

Publisher:
PU **Author's reprint**

Publishing place:**PP** Bulevar Cara Lazara 1, 21 0000 Novi Sad, Serbia**Physical description:****PD** **Chapters:** 6
Pages: 112
References: 122
Tables: 25
Figures: 66**Scientific field:****SF** Food Biotechnology**Scientific discipline:****SD** Dairy Technology**Subject/key words:** Fermented milk beverage, tea fungus, technology, nutritive characteristics, functional properties, physico-chemical properties, optimisation
SKW**UC:****Holding data:****HD** Library of Faculty of Technology, Novi Sad,
Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia**Note:****N** Ph. D. Thesis = Doktorska disertacija
Faculty of Technology = Tehnološki fakultet**Abstract:****AB**

The possibility of fermented milk beverages manufacture by applying non-conventional starter culture - tea fungus inoculum: a) natural inoculum (10% and 15%); b) concentrated by microfiltration (10% i 15%); c) concentrated by evaporation (1.5% and 3.0%) have been investigated. All fermented milk samples were produced from milk of 0.9% and 2.2 % fat content. Improvement of rheological properties of low fat fermented milk products by addition of enzyme transglutaminase (TG) was achieved. Transglutaminase (Activa MP, Ajinomoto Co. Inc., Hamburg, Germany) was activated in milk at 40°C for 2 hours, then it was inactivated by high temperature (80°C for 1 minute) prior to fermentation. After cooling to optimal temperature (42°C), chosen starter culture was added in milk. In all cases fermentation stopped when the pH=4.5 was reached.

Nutritive characteristics of samples: content of proteins, lactose, galactose, glucose, fructose, lactic and acetic acid, ethanol, vitamins (B₁, B₂, B₆ and C), minerals (Ca, Mg, K, Na, Pb, Cd, Cu, Zn) and total fatty acids content were analysed after production. Selected components were determined after 10 days of storage. Physico-chemical characteristics (acidity, syneresis, water-holding capacity), textural characteristics (firmness, consistency, cohesiveness, and index of viscosity) and viscosity

were measured at 5°C after production and during 10 days of storage.

On the basis of the obtained results it can be concluded that milk fermentation lasted from 9 to 12 hours and is two times longer compared to fermentation during probiotic and traditional yoghurt production. Lactose content decreased during fermentation for 19.6% compared to milk. Higher transformation of lactose was determined in samples produced by using microfiltration inoculum. Decreasing of lactose content affected the increased galactose and L-lactic acid content. Content of D-lactic acid, acetic acid and ethanol were detected in low concentrations. High concentration of ascorbic acid in beverage contributed that 500 g fermented milk beverage could fulfill recommended daily intake for vitamin C. Sample produced from milk of 2.2% fat content using 10% natural inoculum contained the highest concentration of vitamin B₂ – 136 (µg/100g).

The highest total cell count of acetic acid bacteria was $4.5 \cdot 10^4$ cfu/ml and yeasts $9 \cdot 10^4$ cfu/ml in samples produced by using 10% microfiltrated inoculum. Sample produced from milk of 0.9% fat content by applying 10% natural inoculum had also high number of acetic acid bacteria and yeasts in ratio $4.05 \cdot 10^4 : 4.5 \cdot 10^4$.

The sample having tea fungus concentrated inoculum and transglutaminase had the best textural characteristics. Fermented dairy beverages produced by 0.02% TG application had much better textural characteristics than those without TG.

Generally, fermented dairy drinks produced from milk of 0.9 and 2.2% fat content with addition of natural inoculum in concentration of 10% showed optimal sensory, nutritive and rheological characteristics.

Therefore, fermented dairy drinks produced with tea fungus inoculum could be classified as high valuable functional food intended for all consumer categories.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB 11th June 2009

Defended on:

DE 2010

Thesis defend board:

(Names/Surname/Degree/Title/Faculty)

DB

President: Dr Marijana Carić, Professor Emeritus,
University of Novi Sad

Member (mentor): Dr Spasenija Milanović, Full Prof., Faculty of Technology,
University of Novi Sad

Member: Dr Dragojlo Obradović, Full Prof. Faculty of Agriculture,
Zemun, University of Belgrade

SADRŽAJ

UVOD	1
OPŠTI DEO	3
STARTER KULTURE U TEHNOLOGIJI FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA	3
Karakteristike bakterija mlečne kiseline.....	7
Faktori koji utiču na aktivnost bakterija mlečne kiseline.....	9
Uticaj prebiotika na aktivnost probiotskih bakterija	10
Karakteristike kefirnih zrna	11
Uticaj mikrobiološkog sastava kefirnih zrna na nutritivnu vrednost proizvoda.....	11
FERMENTACIJA MLEKA U PROIZVODNJI JOGURTA.....	12
Homofermentacija	13
Heterofermentacija	13
Produkcija mlečne kiseline.....	13
BIOHEMIJSKA TRANSFORMACIJA KOMPONENATA MLEKA	15
Metabolizam ugljenih hidrata.....	15
Transport šećera i hidroliza	15
Produkcija egzopolisaharida (EPS)	18
Produkcija aromatičnih komponenata	19
Metabolizam masti	19
Metabolizam vitamina	20
Biohemijske promene tokom proizvodnje kefira	21
STRUKTURNE PROMENE KAZEINSKE MICELE TOKOM FORMIRANJA GELA.....	23
REOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA	27
PRIMENA TRANSGLUTAMINAZE U TEHNOLOGIJI FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA	30
ČAJNA GLJIVA.....	35
Mikrobiološki sastav i osobine.....	35
Kultivacija i hemijski sastav.....	37
Zdravstveni efekti čajne gljive	40
NUTRITIVNA VREDNOST I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA	41
MATERIJAL I METODE RADA	45
MATERIJAL	45
Mleko.....	45
Starter kulture	45
Inokulum čajne gljive	45
Jogurtna kultura	46
Probiotska starter kultura.....	46
Transglutaminaza	46
Koncentrat proteina surutke.....	46

PROIZVODNJA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA	46
ANALIZE	47
Analize mleka	47
Analize inokuluma čajne gljive	47
Analiza fermentisanih mlečnih napitaka	48
Mikrobiološka analiza	51
Senzorna analiza	51
Mikrostruktura	52
Statistička analiza rezultata	52
REZULTATI I DISKUSIJA	53
KARAKTERISTIKE MLEKA	53
KARAKTERISTIKE STARTER KULTURE	53
PROCES FERMENTACIJE MLEKA	56
NUTRITIVNA VREDNOST FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA	60
Laktoza	60
Galaktoza	62
Glukoza i fruktoza	63
Mlečna kiselina	64
Sirćetna kiselina	65
Etanol	67
Minerali	68
Vitamini	68
Masne kiseline	71
PROMENA SADRŽAJA KOMPONENATA TOKOM SKLADIŠTENJA FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA	72
Laktoza	72
Galaktoza	73
Glukoza	73
Fruktoza	74
D-mlečna kiselina	75
L-mlečna kiselina	74
Sirćetna kiselina	75
Etanol	76
MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA	77
FIZIČKO-HEMIJSKA I REOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA	81
Kiselost, sinerezis i sposobnost vezivanja vode	81
Teksturalne karakteristike	86
Viskozitet	90
Senzorna svojstva	93
Mikrostruktura fermentisanih mlečnih napitaka	95

OPTIMIZACIJA	98
Optimizacija karakteristika proizvoda.....	98
Optimizacija hemijskog sastava proizvoda	99
Optimizacija fizičkih osobina proizvoda.....	100
Optimizacija teksturalnih osobina proizvoda	101
Optimizacija senzornih karakteristika proizvoda	101
Uticaj nezavisnopromenljivih veličina na karakteristike proizvoda.....	101
Optimizacija procesnih veličina	102
ZAKLJUČAK	103
LITERATURA	105

UVOD

Fermentisani mlečni napici predstavljaju veoma raznovrsnu grupu nutritivno visokovrednih proizvoda koji se dobijaju fermentacijom mleka uz korišćenje odgovarajuće starter kulture. Starter kulture su selekcionirani mikroorganizmi izolovani na osnovu različitih karakteristika koji složenim biohemijskim procesima proizvode dominantno mlečnu kiselinu (homofermentativni oblici – tipično za jogurt i fermentisane mlečne proizvode u tipu jogurta) ili pored mlečne kiseline laktozu transformišu u druge produkte: etanol, ugljen-dioksid (heterofermentativni tip – tipično za kefir i kumis). Pored tradicionalnih termofilnih startera (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) veliki napredak u savremenoj tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka postignut je razvojem nove vrste probiotskih bakterija najčešće iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Najnovije varijante fermentisanih mlečnih napitaka pored probiotika sadrže i prebiotike (dijetna vlakna – inulin, oligofruktoza i dr.) koji stimulišu rast i vijabilnost prisutnih startera. Fermentisani mlečni napici koji sadrže probiotike i/ili prebiotike pozitivno utiču na zdravstveni status ljudskog organizma i kao takvi predstavljaju jedan od najznačajnijih primera funkcionalne hrane.

Primena čajne gljive (nekonvencionalni starter) u tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka predstavlja veoma interesantnu oblast za istraživanje sa aspekta biohemijskih i strukturnih transformacija mleka.

Čajna gljiva je simbioza kvasaca (*Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Brettanomyces*, *Torulasporea* i *Candida*) i bakterija sirćetne kiseline (*Acetobacter* i *Gluconobacter*) koja se tradicionalno gaji na crnom čaju zaslađenom saharozom, a može da se kultiviše i na drugim supstratima kao što su: crno pivo, koka kola, vino (crno, belo), ekstrakt topinambura, ehinacea, menta i rtanjski čaj, surutka, laktoza i dr. Poznato je da simbioza bakterija sirćetne kiseline i kvasaca složenim biohemijskim transformacijama izaziva fermentaciju šećera i proizvode primarne metabolite: galaktozu, fruktozu, glukozu, sirćetnu kiselinu, mlečnu kiselinu, glukonsku kiselinu, glukuronsku kiselinu, glicerol, pojedine vitamine iz grupe B kompleksa i vitamin C, katehin i malu količinu etanola.

S obzirom da savremeni trend u ishrani predstavlja proizvodnja fermentisanih mlečnih napitaka sa smanjenim sadržajem mlečne masti, primena čajne gljive za fermentaciju delimično obranog mleka zahteva odgovarajuće modifikacije u tehnološkom procesu proizvodnje. U cilju postizanja odgovarajućih reoloških svojstava fermentisanih mlečnih napitaka uobičajen je dodatak mlečnih ingredijenata: mleko u prahu, surutka u prahu, koncentri proteina mleka, koncentri proteina surutke i dr. Međutim, poslednjih godina veliki broj naučnika ispituje mogućnost primene enzima transglutaminaze (TG) koji katališe stvaranje inter- i intramolekulskih veza unutar proteinskih lanaca i tako modifikuje fizička i funkcionalna svojstva proteina.

Imajući u vidu da je mleko veoma složen fizičko hemijski sistem, jer sadrži značajnu količinu proteina, masti i laktoze, inokulacija čajne gljive u mleko predstavlja specifičan tip fermentacije. Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku do sada nije bila predmet naučnih istraživanja. Stoga je važno definisati faktore i tehnološke parametre koji u procesu proizvod-

nje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka (dobijenog uz primenu inokuluma čajne gljive) izazivaju destabilizaciju kazeina i doprinose formiranju stabilne trodimenzionalne strukture gela optimalnih nutritivnih, reoloških i senzornih karakteristika.

Cilj doktorske disertacije je da se ispita uticaj vrste i koncentracije inokuluma čajne gljive: a) kultivisan na crnom čaju, b) koncentrovan primenom mikrofiltracije i c) koncentrovan uparavanjem, na proces i tok fermentacije mleka sa 0,9% i 2,2% mlečne masti. Posebna faza istraživanja obuhvatila je praćenje biohemijskih transformacija komponenata mleka pod dejstvom čajne gljive, reološke i strukturne promene funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka tokom skladištenja.

Na osnovu rezultata istraživanja definisani su optimalni parametri tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka. Primena čajne gljive u tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka omogućava kreiranje novog proizvoda visoke nutritivne vrednosti, izraženih terapijskih svojstava koji kao funkcionalna hrana može da se koristi za ishranu različitih populacija.

OPŠTI DEO

STARTER KULTURE U TEHNOLOGIJI FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

Savremena proizvodnja kvalitetnih fermentisanih mlečnih proizvoda zahteva upotrebu starter kultura koje najčešće sadrže kombinaciju različitih vrsta i sojeva mikroorganizama, uglavnom bakterija mlečne kiseline (BMK). To su prirodni izolati selekcionisani na osnovu fizioloških karakteristika tj. sposobnosti da stvaraju određene količine poželjnih komponenata (laktata, acetata, diacetila, acetaldehida, etanola, ugljendioksida), kao i na osnovu rezistentnosti na bakteriofage, sposobnosti da rastu u međusobnim kombinacijama, a u poslednjih nekoliko godina naglasak je dat na probiotskim svojstvima (Tamime i Robinson, 2004; Tamime, 2006).

Kada je u pitanju primena starter kultura u prehrambenoj industriji postoje opšti kriterijumi koji se odnose na sigurnost, tehnološke karakteristike i ekonomski aspekt primene (Buckenhusses, 1993; Nauth, 2006):

1. sigurnost:
 - neposedovanje patogene aktivnosti,
 - odsustvo toksičnog delovanja;
2. tehnološke karakteristike:
 - dominacija u odnosu na spontanu mikrofloru,
 - otpornost na kontaminaciju u toku tehnološkog procesa,
 - stabilna metabolička aktivnost;
3. ekonomski aspekt:
 - primena kulture mora biti rentabilna,
 - osnovna svojstva se ne smeju menjati u toku roka trajanja,
 - rukovanje mora biti krajnje jednostavno,
 - kulture moraju biti smrznute ili liofilizovane.

Poznato je da starter kulture imaju višestruku ulogu u formiranju fizičko-hemijskih i senzornih karakteristika fermentisanih mlečnih proizvoda:

- tokom procesa fermentacije formira se mlečna kiselina koja ima konzervišući efekat i doprinosi produžetku roka trajanja, tj. produžava trajnost proizvoda;
- produkuju se bakteriocini koji takođe mogu da imaju konzervišuće delovanje;
- poboljšavaju senzorne karakteristike usled produkcije organskih kiselina, karbonskih komponenata i delimične hidrolize proteina i masti;
- poboljšavaju reološka svojstva fermentisanih mlečnih proizvoda (viskozitet, čvrstoća i dr.);

- doprinose dijetetskim/funkcionalnim i nutritivnim svojstvima fermentisanih mlečnih proizvoda, posebno u proizvodima sa probioticima.

Različiti mikroorganizmi (bakterije, kvasci i plesni – pojedinačno ili u odabranim kombinacijama) mogu se koristiti za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda. Vrsta, udeo i odnos pojedinih grupa mikroorganizama u starter kulturi utiče na proces i tip fermentacije – homo- ili heterofermentacija. Stoga, fermentisani mlečni proizvodi se prema vrsti i sastavu implementiranog startera mogu podeliti na:

- proizvode u kojima je zastupljena mlečno kisela fermentacija usled prisustva bakterija mlečne kiseline (jogurt);
- proizvodi gde fermentaciju mleka izazivaju kvasci i bakterije mlečne kiseline (kefir i kumis) i
- proizvodi u kojima je fermentacija kombinacija plesni i bakterija mlečne kiseline (villi).

Navedene grupe mikroorganizama generalno se mogu podeliti na:

- tradicionalne bakterije mlečne kiseline i
- netradicionalne starter kulture.

Tradicionalne bakterije mlečne kiseline koje se najčešće koriste u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda čine mikroorganizmi iz rodova: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Na osnovu morfoloških karakteristika navedeni mikroorganizmi su u obliku koka ili štapića.

Bakterije mlečne kiseline koje se koriste kao starter kulture u odnosu na tolerantnost prema temperaturi generalno se dele na:

- mezofilne (optimalna temperatura rasta 20-30°C) – koriste se za proizvodnju maslaca, velikog broja sireva, sirnih namaza, fermentisanih mleka;
- termofilne (optimalna temperatura rasta 37-45°C) – koriste se za proizvodnju fermentisanih napitaka tipa jogurta i nekih sireva.

Savremeni aspekt primene startera razlikuje se od tradicionalnih kultura, jer starter kulture koje se plasiraju na tržište tj. u industriju mleka mogu da sadrže probiotike ili se kombinuju različite grupe mikroorganizama da bi se modifikovale tj. poboljšale fizičko-hemijske i senzorne karakteristike proizvoda.

Netradicionalnu mikrofloru čine različite bakterijske grupe mikroorganizama u okviru starter kulture čijom primenom se u tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda postižu specifične karakteristike proizvoda i pripadaju rodovima: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* (tabela 1). Netradicionalne grupe mikroorganizama kao što su laktobacili i kvasci obično se koriste da bi se proizveli fermentisani mlečni napici specifičnih senzornih karakteristika kao što su kefir i kumis. Navedeni proizvodi pored visoke nutritivne vrednosti veoma su značajni i sa zdravstvenog aspekata.

Rodovi mikroorganizama koji se najčešće koriste kao starter kulture za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka su:

- *Streptococcus* – najčešće se koriste vrste: *thermophilus*, *lactis*, *diacetylactis*. Navedeni mikroorganizmi uglavnom stvaraju mlečnu kiselinu i izazivaju intenzivnu acidifikaciju i razlaganje proteina što najčešće omogućuje rast bakterija koje stvaraju aromu.

Tabela 1. Odabrane karakteristike i produkti metabolizma mikroorganizama u fermentisanim mlečnim proizvodima (Tamime i sar., 2006)

Mikroorganizam	Produkt metabolizma	Tip fermentacije laktoze	Fermentisani mlečni proizvodi
I Bakterije mlečne kiseline			
Tradicionalna			
<i>Lactococcus</i> spp. ^a	L(+)-laktat	Homofermentativna	Mlaćenica, kisela pavlaka, ymer, Nordijska mleka
<i>Leuconostoc</i> spp. ^b	D(-)-laktat, diacetil	Heterofermentativna	Mlaćenica, kisela pavlaka, ymer, Nordijska mleka
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DL-laktat	Homofermentativna	Fermentisano mleko, kefir
<i>Streptococcus thermophilus</i>	L(+)-laktat, acetaldehid, diacetil	Homofermentativna	Jogurt, skyr, labneh, kisela pavlaka
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp.	D(-)-laktat, acetaldehid, diacetil	Homofermentativna	Jogurt, skyr, labneh
Netradicionalna			
<i>Lactobacillus</i> spp. ^c	DL-laktat	Homofermentative	Jogurt, kefir, mlaćenica, kisela pavlaka
<i>Lactobacillus</i> spp. ^d	DL-laktat	Heterofermentativna	Jogurt, kefir
<i>Bifidobacterium</i> spp. ^e	L(+)-laktat, acetat	Heterofermentativna	Jogurt, mlaćenica, kisela pavlaka
<i>Enterococcus</i> spp. ^f	L(+)-laktat	Homofermentativna	Fermentisano mleko
<i>Acetobacter acetii</i> i <i>rasens</i>	Acetat, CO ₂		Kefir
II Kvasci			
<i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Klyveromyces</i> spp. i <i>Debaromyces</i> spp.	Etanol, CO ₂ , aceton, amilalkohol, propanal		Skyr, kefir
III Plesni			
<i>Geotrichum candidum</i>	Plesan		Viili, kefir

^a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* proizvodi diacetil i CO₂.

^b *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* proizvodi etanol i CO₂.

^c *Lactobacillus acidophilus*, *gasserii*, *helveticus*, *johnsonii*, i.e. probiotik i *kefiranofaciens*.

^d *Lactobacillus casei*, *reuteri*, *plantarum* i *rhamnosus* (proizvodi L(+)), i.e. probiotik i *fermentum* i *kefir*.

^e *Bifidobacterium adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *infantis*, *lactis* i *longum*, i.e. probiotik.

^f *Enterococcus faecium* i *faecalis*, i.e. probiotik.

^d Ovi mikroorganizmi mogu biti prisutni u proizvodu.

- *Leuconostoc* – koriste se vrste: *mesenteroides* i *lactis*. Ovi mikroorganizmi su najčešće heterofermentativni i koriste se za stvaranje arome. Za ove vrste značajno je stvaranje gasa (CO₂), kao i diacetila i acetona.
- *Lactobacillus* – koriste se vrste: *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *acidophilus*, *brevis*, *casei*. Najčešće korišćeni mikroorganizam u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka je *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, koji poseduje proteolitičke osobine i odgovoran je za tipičnu aromu jogurta.
- *Lactococcus* – najčešće se koriste mezofilni mikroorganizmi: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* koji imaju dobru sposobnost za brzu acidifikaciju mleka.
- *Bifidobacterium* – ima sve veći značaj jer je dokazano da neke vrste ovoga roda naseljavaju creva dece i odraslih. Sojevi koje se koriste su: *bifidum*, *longum*, *infantis*, *brevis* i
- Kvasci – redovna su mikroflora u kefiru i kumisu, dok njihovo prisustvo u drugim proizvodima predstavlja kontaminaciju. Razmnožavanje kvasaca podstiče se u kise-

loj i u slatkoj sredini, a dobro se razmnožavaju i u mešanim kulturama. Kao starteri u kefirnom zrnju koriste se: *Torulospira delbrueckii*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Klyveromyces sp.*

Starter kulture koje se koriste u tehnologiji fermentisanih proizvoda, prema načinu proizvodnje mogu biti:

- uobičajene (tečne, osušene i liofilizirane) i
- koncentrovane (smrznute, osušene i liofilizirane).

Koncentrovane kulture se odlikuju nizom prednosti: lako se koriste, aktivnost je stabilna i kontrolisana u dužem vremenskom periodu, zahtevaju manje radno angažovanje, mogućnost promene u genotipu i infekcije svedene su na minimum (Obradović, 2008).

Razvoj i primena starter kultura izazvala je pravu revoluciju u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. Istraživanja započeta 60-tih godina rezultovala su komercijalnom proizvodnjom 1973. godine. Koncentrovane kulture predstavljaju startere koji su proizvedeni pod strogo kontrolisanim uslovima, a zatim koncentrovani do malih zapremina i na kraju liofilizovani ili smrznuti i upakovani u odgovarajuću ambalažu. U zavisnosti od stepena koncentrisanja ovi starteri se primenjuju bilo za proizvodnju radnih kultura ili se direktno dodaju mleku namenjenom za fermentaciju.

Da bi se postigle željene osobine proizvoda delovanjem startera, odnosno da bi mikroorganizmi ispoljili odgovarajuće dejstvo moraju se obezbediti optimalni uslovi sredine:

- optimalna temperatura;
- pH – u svežem mleku pH iznosi oko 6,55, što pogoduje razvoju većine mikroorganizama;
- vreme delovanja – značajan je momenat prekidanja fermentacije, obično na kraju logaritamske faze razvoja mikroorganizama i početku stacionarne faze, odnosno u trenutku postizanja optimalnih senzornih osobina proizvoda;
- količina inokuluma koju je potrebno dodati – na primer *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* sporije razlažu laktozu pa ih je potrebno dodati u većim količinama;
- ako se koristi mešana kultura treba ispitati u kom odnosu se postiže najbolji simbiotski odnos.

Efekti delovanja starter kultura na mleko kao supstrat su:

- redukcija sadržaja laktoze (20-30%) i produkcija mlečne kiseline. Snižavanjem pH vrednosti mleka koji ima konzervišući efekat, dolazi do približavanja izoelektrične tačke (IET) kazeina tako da kazeinska micela gubi stabilnost, koaguliše i uklapa ostale sastojke (iz sol stanja prelazi u gel stanje). Mlečna kiselina podstiče rad creva, poboljšava resorpciju Ca i P;
- produkcija diacetila i acetaldehida utiče na prijatan miris i ukus proizvoda;
- razgradnja proteina (delimična, do aminokiselina, lakša svarljivost);
- razgradnja masti (delimična, do slobodnih masnih kiselina i glicerola);
- mineralni sastojci ostaju gotovo nepromenjeni.

KARAKTERISTIKE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Jedan od najpopularnijih mlečnih napitaka je jogurt koji se dobija uz primenu termofilne starter kulture: *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Poznato je da navedena kombinacija mikroorganizama ima znatno bržu metaboličku aktivnost od aktivnosti pojedinačnih sojeva. Pored jogurtne kulture za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda mogu da se koriste i druge vrste i sojevi bakterija mlečne kiseline (tabela 2).

Tabela 2. Odabrane karakteristike mikroorganizama u jogurtu (Nauth, 2006)

	% mlečne kiseline u mleku	Izomer mlečne kiseline	temperatura rasta		Fermentisani ugljeni hidrati						
			15°C	45°C	Glukoza	Inulin	Galaktoza	Fruktoza	Laktoza	Saharoza	Riboza
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	1,8	D	-	+	+		-	+	+	+	-
<i>Lb. lactis</i>	1,8	D	-	+	+		a	+	+	+	+
<i>Lb. helveticus</i>	3,0	DL	-	+	+		+	a	+	-	-
<i>Lb. casei</i>	0,8	L	+	-	+		+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i>		DL	+	a	+		+	+	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i>		DL	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i>		DL	+	-	+		a	+	+	+	+
<i>Lb. acidophilus</i>		DL	-	+	+		+	+	+	+	-
<i>Str. thermophilus</i>	0,7	L	-	+	+		-	+	+	+	-
<i>Bb. bifidum</i>		L	-	-	+	-	+	+	+	a	-
<i>Bb. longum</i>		L	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Bb. infantis</i>		L	-	-	+	a	+	+	+	+	+
<i>Bb. breve</i>		L	-	-	+	a	+	+	+	+	+
<i>Bb. adolescentis</i>		L	-	-	+	a	+	+	+	+	+

a – 11 do 89% ispitanih sojeva su pozitivni.

Str. thermophilus – gram (+), anaerobna homofermentativna bakterija. Čelije su sfernog ili ovalnog oblika, prečnika manjeg od 1µm i formiraju lance ili se nalaze u paru, nepravilnog su oblika. Produkuju L(+)-mlečnu kiselinu, acetaldehid i diacetil iz laktoze. Neki sojevi produkuju egzopolisaharide i koriste vitamine B kompleksa i aminokiseline radi ubrzanog rasta. Navedene bakterije nisu vijabilne u metilensko plavom (0,1g/100g) ili pri pH=9,6. Čelijski zid sadrži peptidoglikan tip Lys-Ala2-3 i 16S rRNK koji je veoma sličan između sojeva.

Lb. bulgaricus – pripada grupi obligatnih homofermentativnih lactobacila čije su čelije štapićastog oblika zaobljenih krajeva, 0,5-0,8 · 2-9 µm i nalaze se pojedinačno ili formiraju kraće lance. Navedeni mikroorganizmi razlažu nekoliko šećera (tabela 2), laktozu do D (-) mlečne kiseline i acetaldehida, dok pojedini sojevi produkuju egzopolisaharide. Slabo rastu na temperaturama nižim od 10°C, a optimalna temperatura za većinu sojeva je 50-55°C. Čelijski zid je peptidoglikan Lys-dAsp.

Lb. acidophilus – takođe je iz grupe obligatnih homofermentativnih lactobacila kao i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Čelije su štapićaste zaobljenih krajeva, 0,6-0,9 · 1,5-6µm i nalaze se pojedinačno, u parovima ili kraćim lancima, čelije su nesporogene, a proteini u će-

lijskom zidu su važni pri vezivanju bakterija za zid u intestinalnom traktu. Navedeni mikroorganizmi koriste riboflavin, pantotensku kiselinu, folnu kiselinu i nijacin za rast, ali ne i druge B vitamine. Savremena istraživanja (elektroforeza celularnih proteina ili laktat dehidrogenaze i DNK-DNK reasocijacija) *Lb. acidophilus* ima 6 sojeva. Navedene bakterije rastu na temperaturama nižim od 15 °C, optimalna temperatura za većinu sojeva je 35-40 °C, a optimalna pH vrednost je 5,5-6,0. Čelijski zid je peptidoglikan tip Lys-D-Asp. Mogućnost pojedinih sojeva da koriste ugljene hidrate *in vitro* je prikazana u tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike odabranih sojeva bakterija mlečne kiseline u jogurtu (Tamime i Robinson, 2004)

Karakteristika	<i>Streptococcus</i> spp.		<i>L. delbrueckii</i> subsp.			<i>Lactobacillus</i> spp.		
	<i>thermophilus</i>	<i>salivarius</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	<i>lactis</i>	<i>acidophilus</i>	<i>helveticus</i>	<i>jugurti</i> ^b
G+C ^c srednja vrednost (%)	37-40	49-51	49-51	49-51	49-51	34-37	38-40	39
Izomeri mlečne kiseline	L(+)	L(+)	D(-)	D(-)	D(-)	DL	DL	DL
Temperatura rasta na 10/45°C	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/v
Potrebe za:								
Tiaminom			-	-	-	-	-	-
Riboflavinom			+	+	+	+	+	+
Piridoksalom			-	-	-	-	+	+
Folnom kis.			+	+	+	+	-	-
Tiamidinom			+	+	+	-	-	-
Vitamin B ₁₂			+	+	+	-	-	-
Korićenje ugljenih hidrata								
Eskulin	+	+	-	-	+	+	-	-
Amigdalinalin	+	-	-	-	+	+	-	-
Celubioza	+	-	d	-	d	+	-	-
Fruktoza	+	+	+	+	+	+	d	
Galaktoza	-	d	-	-	d	+	+	+
Laktoza	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltoza	+	-	d	-	+	+	d	-
Manoza			+	-	+	+	d	
Melezitoza			-	-	-	-	-	
Melibioza	-	d	-	-	-	d	-	-
Rafinoza	-	d	-	-	-	d	-	
Riboza	-	d	-	-	-	-	-	
Salicin	+	-	-	-	+	+	-	-
Saharoza			+	-	+	+	-	-
Trehaloza	d	-	d	-	+	d	d	d

^a Ni jedan mikroorganizam ne proizvodi gas iz glukonata i glukoze ili amonijak iz arginina.

^b *L. jugurti* je uključen u komparativne svrhe. ^c Srednja vrednost (%) guanina i citozina u DNA.

+, pozitivna reakcija u 90% i više sojeva; -, negativna reakcija u 90% i više sojeva;

d, pozitivna ili slaba reakcija u 11-89%; prazna mesta znače da nema dostupnih parametara.

Lb. acidophilus je dobro poznat zdravstveno koristan laktobacil, dok druge vrste mikroorganizama humanog intestinalnog porekla koriste se u fermentisanim mlečnim proizvodima i dokazano je da imaju značajne zdravstvene efekte na humani organizam. Pored toga, poznato

je da sojevi *Lb. acidophilus* koriste masne kiseline, minerale, peptide i aminokiseline, derivate nukleinskih kiselina i vitamine B-kompleksa za uspešan rast, ali je pronađeno da većina sojeva raste sporije u bivoljem mleku. Sadržaj mlečne kiseline kreće se od 3-19 g/kg, dok se neki sojevi mogu održavati pri visokim koncentracijama mlečne kiseline, dok je nekoliko sojeva intolerantno i otežano preživljava.

Bifidobacterium adolescentis, breve, bifidum, infantis, lactis i *longum* – probiotski mikroorganizmi izolovani iz humanog intestinalnog trakta takođe se koriste za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda. To su Gram (+), anaerobni heterofermentativni, nesporogeni štapići veličine $0,5-1,3 \cdot 1,5-8\mu\text{m}$. Čelije navedenih bifidobakterija rastu u anaerobnim uslovima na triptikaza-fiton kvaščevoj podlozi (TPY), imaju specifičan oblik (amfora, specifičan epitet, tanak i kratak, veoma izdužen, tanak sa slabim nepravilnim konturama i delimično razgranat). Čelijski zid je različitog peptidoglikanskog sastava u različitim sojevima, ali kompleksan materijal sadrži linearne lance N-acetilmuraminske kiseline i N-acetilglukozaminskog molekula duž celog lanca. Različite vrste koriste različite ugljene hidrate (saharoza, laktoza, fruktoza, galaktoza, pojedini sojevi glukonate) što se koristi za identifikaciju pojedinih mikroorganizama. Ključni enzim je fruktozo-6-fosfat fosfoketolaza (F6PPK) poznata kao "bifidus shunt", koja cepa molekul fruktoze na dve trioze, i može da se koristi za DNK identifikaciju mikroorganizama. Međutim, većina sojeva ne proizvodi dovoljnu količinu navedenog enzima tako da se ne mogu detektovati. Fermentacijom dva molekula glukoze nastaje 2 molekula laktata i tri molekula acetata. Guanin i citozin čine 54-67% DNK. Takođe, veliki broj komponenata je identifikovan kao bifidogeni stimulator rasta. Štapići bifidobakterija često su nepravilnog oblika, konkavno zaobljeni u centralnom delu i uvijenih krajeva. Uobičajeno je da su čelije različitog oblika: kokoidne, mogu da budu kratke ili duge, ili u V, Y ili X obliku u zavisnosti od sastava medijuma u kojem rastu. Veruje se da čelijski uslovi rasta menjaju morfologiju čelije i stvaraju se razgranate čelije. Stoga, u medijumu koji je deficitaran sa β -metil-D-glukozaminom, čelije postaju značajno razgranate, dok ih dodatak amino kiselina (serina, alanina i aspartatske kiseline) može transformisati u štapiće Y ili X oblika. Pojedini autori su potvrdili da se tokom fermentacije ugljenih hidrata menja morfologija čelija, što je najverovatnije posledica strukturnih promena u zidu pri čemu se menja permeabilnost membrane prema odgovarajućem šećeru.

Faktori koji utiču na aktivnost bakterija mlečne kiseline

Sredinom prošlog veka utvrđeno je da variranje aminokiselinskog sastava mleka (sadržaj valina, leucina, lizina, cisteina, histidina, glicina, izoleucina, tirozina, glutaminske kiseline i metionina) ima značajan uticaj na aktivnost pojedinih mikroorganizama jogurtne kulture. Danas je veoma dobro poznato da *Lb. bulgaricus* ima bolju proteolitičku aktivnost od *Str. thermophilus*. El-Soda i sar. (1986) su utvrdili da oslobođen čelijski ekstrakt lactobacila stimuliše rast *Str. thermophilus* i da dodatak peptona, hidrosolubilnih vitamina, purina i pirimidina poboljšava produkciju kiselina. Takođe je zaključeno da ako je obrano mleko medijum koji sadrži rastvorljivi azot može da inhibira rast *Str. thermophilus*. Druge aminokiseline koje nisu produkt proteolize jogurnog startera stimulišu rast *Str. thermophilus*: peptidi koji sadrže lizin; hepta- ili pentapeptidi koji sadrže histidin i slobodne nearomatične kiseline; tripeptidi koji sadrže histidin, metionin i glutaminske kiseline i dodatak magnezijuma. Transport razgranatih aminokiselina u *Str. thermophilus* energetski zavisi od optimalne temperature (30-45 °C za leucin, valin i izoleucin).

Intenzivan termički tretman mleka ima značajan uticaj na formiranje mravlje kiseline (koja predstavlja stimulativan faktor rasta, tj. povećava odnos štapića prema kokama u koncentraciji između $30-50 \gamma\text{ml}^{-1}$). Takođe, prisustvo natrijumove soli mravlje kiseline ubrzava proteolitičku aktivnost *Lb. bulgaricus-a* tako da dolazi do brže/veće hidrolize β -laktoglobu-

lina (β -Lg), α_{s1} i β -kazeina u poređenju samo sa β -kazeinom bez dodatka soli mravlje kiseline.

Ugljen-dioksid koji proizvodi *Str. thermophilus* stimuliše rast vrste *Lb. bulgaricus*, a nastaje kao produkt hidrolize uree.

Takođe, komponente koje proizvodi *Str. thermophilus* stimulišu rast vrste *Lb. bulgaricus*, a to su piruvat i HCO_3^- . Druge komponente koje stimulišu rast laktobacila su adenin, guanin, uracil, adozin, natrijum-fosfat, natrijum-trifosfat, oksalsirćetna i fumarna kiselina.

Str. thermophilus i *Lb. bulgaricus* imaju istu DNK osnovu i pripadaju istoj DNK homolognoj grupi. Takođe prisustvo probiotskih bifidobakterija stimulatивно deluje na jogurtu kulturu i aktivnost zavisi od sastava supstrata i parametara tehnološkog procesa.

Uticaj prebiotika na aktivnost probiotskih bakterija

Da bi se stimulisao rast i metaboličku aktivnost probiotskih bakterija, jogurtu se najčešće dodaju oligosaharidi kao prebiotici. Prebiotici se definišu kao nesvarljivi ingredijenti hrane, koji u neizmenjenom obliku dospevaju u debelo crevo, i povoljno deluju na rast i/ili aktivnost jedne ili više bakterijskih vrsta i time imaju povoljan zdravstveni efekat. Koncept prebiotika zasnovan je na saznanjima da inulin i oligosaharidi selektivno stimulišu bifidobakterije.

Da bi navedeni sastojak bio označen kao prebiotik potrebno je da poseduje sledeće karakteristike:

- ne sme biti hidrolizovan niti apsorbovan u gornjem delu gastrointestinalnog trakta;
- mora biti selektivna sredina za određenu grupu korisnih mikroorganizama;
- mora da dovede do izmene sastava mikroflore kolona u pravcu povećanja broja saharolitičkih mikroorganizama i smanjenja broja truležnih vrsta;
- mora imati pozitivan efekat na zdravlje "domaćina".

Mogući korisni efekti prebiotika su:

- poboljšanje pražnjenja creva;
- povećanje produkcije masnih kiselina sa manjim brojem C atoma;
- stimulacija rasta i aktivnost bifidobakterija;
- bolje usvajanje minerala;
- smanjenje serumskog holesterola i serumskih triglicerida;
- smanjenje rizika od kancera debelog creva;
- smanjenje egzogenih i endogenih intestinalnih infekcija (Tamime, 2002; Tamime i Robinson, 2004).

U najznačajnije prebiotike ubrajaju se: laktuloza, fruktooligosaharidi, inulin, galaktooligosaharidi, ostali nesvarljivi oligosaharidi i nesvarljiv skrob (Gregurek, 2001; Obradović i sar., 2001).

Kombinacija probiotskih mikroorganizama i prebiotskih sastojaka hrane poznata je pod imenom simbiotik.

KARAKTERISTIKE KEFIRNIH ZRNA

Pored najčešće korišćenih bakterija mlečne kiseline (*Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, probiotski mikroorganizmi), fermentisani mlečni proizvodi mogu da se proizvedu uz korišćenje kombinacije bakterija mlečne kiseline i kvasaca. Tipičan primer su proizvodi kefir i kumis.

Starter kultura za proizvodnju kefira su kefirna zrna. Kefirna zrna imaju kompleksan mikrobiološki sastav i čine ih 83-90% bakterije mlečne kiseline, kvasci 10-17%, bakterije sirćetne kiseline i neke plesni. U skladu sa Polish Nativom kefirna zrna čine 80% laktobacili, 12% kvasci i 8% *lactococi* (Wszolek i sar., 2006)

Bakterije mlečne kiseline u kefirnim zrnima čine sledeći mikroorganizmi: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus* i *Leuconostoc* spp. Utvrđeno je da se takođe *Lactococcus* spp. nalazi na površini kefirnih zrna, dok su laktobacili i kvasci prisutni u dubljim slojevima zrna.

Mnoge vrste kvasaca su takođe prisutne u kefirnom zrnu: *Klyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspicua* i *Candida maris*. Utvrđeno je prisustvo kvasca *Klyveromyces* spp. (fermentiše laktozu) u proizvodu kojem daje specifičnu aromu. Međutim, poznato je da većina prisutnih kvasaca ne razlaže laktozu. Kvasac *Saccharomyces turiscensis* (izolovan iz različitih kefirnih zrna) ima sposobnost razgradnje D-glukoze, D-galaktoze i saharoze, ali ne i laktoze.

Najčešće prisutne bakterije sirćetne kiseline u kefirnim zrnima su *Acetobacter aceti* i *Acetobacter rasens*, dok prisustvo plesni je *Geotrichum candidum* nema značajan uticaj na kvalitet proizvoda.

Uticaj mikrobiološkog sastava kefirnih zrna na nutritivnu vrednost proizvoda

Zahvaljujući veoma raznovrsnoj mikroflori i složenim biohemijskim reakcijama kefir pripada grupi nutritivno visokovrednih proizvoda. Prosečan hemijski sastav kefira izražen u g/kg je: 30-34 proteina, 15 masti, 20-35 laktoze (nakon fermentacije). Sadržaj mlečne kiseline kreće se od 6-10 mL⁻¹, a količina alkohola varira od 0-10 gL⁻¹ u kefiru proizvedenim prethodno pripremljenom starter kulturom ili 0,3-18 gL⁻¹ u kefiru dobijenim korišćenjem kefirnih zrna (Wszolek i sar., 2006).

Kneifel i Mayer (1991) konstatovali su da sadržaj vitamina u kefiru proizvedenom uz primenu kefirnih zrna uz korišćenje različitih vrsta mleka raste za 20% i to: tiamin (B₁) u kefiru iz ovčijeg mleka; piridoksin (B₆) u kefiru iz ovčijeg, kozjeg i magarećeg mleka; folna kiselina – u svim uzorcima kefira osim proizvedenog iz magarećeg mleka. Klamnaeva i sar. (2000) su utvrdili da se primenom mehaničke vibracije i injektovanjem atmosferskog kiseonika u medijumu tokom fermentacije sa kefirnim zrnima povećava biosinteza riboflavina (B₂) i askorbinske kiseline (vitamin C) u poređenju sa kontrolnim uzorkom.

Senzorne karakteristike kefira zavise od sastava mleka i startera kao i od tehnološkog procesa proizvodnje. Ukus kefira zavisi od sadržaja mlečne kiseline u proizvodu, koji se kreće od 0,8-0,9 mL 100 mL⁻¹. Najveći deo čini L(+)-mlečna kiselina, dok je D(-)-oblik neznatno zastupljen. Kefir može da sadrži i sledeće isparljive komponente: sirćetna kiselina je dominantno zastupljena, potom etanol i aldehidi, dok mravlja, orotična i propionska kiselina takođe mogu biti prisutne (Beshkova i sar. 2003; Tamime, 2006). Diacetil i acetaldehid su glavne aromatične komponente u kefiru, čiji sadržaj zavisi od sastava startera ili kefirnih zrna. Sadržaj alkohola zavisi od vrste kvasca i kreće se od 1-10 gL⁻¹. Kefir takođe sadrži i CO₂. Koncentracija kefirnih zrna nesumnjivo utiče na proces fermentacije i razgradnju laktoze, odnosno najveći sadržaj laktoze je u uzorku dobijenom sa 1% kefirnih zrna (Wszolek i sar., 2006).

Irigoyen i sar. (2005) takođe su ispitivali mikrobiološke i fizičko-hemijske karakteristike proizvoda dobijenog uz primenu kefirnih zrna i utvrdili da se tokom 24 sata fermentacije sadržaj laktoze smanji za 20-25% u odnosu na početnu koncentraciju laktoze u mleku.

Poslednjih nekoliko godina Papapostolou i sar. (2008) su istraživali uticaj tri postupka sušenja (konvencionalno, vakuum i konvektivno) kefirnih zrna na metaboličku aktivnost, odnosno na sposobnost produkcije etanola i mlečne kiseline tokom fermentacije laktoze i surutke. Utvrđeno je da se najbolji prinos etanola i mlečne kiseline dobija konvencionalnim sušenjem kefirnih zrna. Tokom skladištenja kefirne biomase utvrđeno je da sposobnost produkcije etanola opadne za 31%, a mlečne kiseline za oko 20% tokom 4 meseca. Navedeni autori su takođe konstatovali da visina temperature sušenja utiče na vreme fermentacije i produkciju etanola i mlečne kiseline. Ako je supstrat za fermentaciju 5%-tni (w/w) rastvor laktoze koji sadrži 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4% ekstrakta kvasca i 0,5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ vreme fermentacije traje oko 58 sati, dok je fermentacija na surutki pri istim temperaturnim uslovima duža i iznosi 66 sati. Prinos etanola na laktozi je veći nego na surutki pri istim uslovima sušenja i fermentacije, dok je sadržaj i prinos mlečne kiseline znatno veći ako je surutka supstrat za fermentaciju. Vijabilnost kefirnih zrna ista je i na laktozi i surutki.

Dimitrellou i sar. (2008) ispitivali su sposobnost preživljavanja i efikasnost fermentacije termički osušenog imobilisanog kefira na kazeinu. Stepem preživljavanja mikroorganizama posle 365 dana skladištenja je bio veoma visok i iznosio je 94%, dok je sposobnost produkcije etanola varirala od 0,3-1,4 gL^{-1} i 0,4-2,7 gL^{-1} , a sadržaj mlečne kiseline iznosio je 43,1 gL^{-1} . Navedeni autori su ispitivali i uticaj temperature fermentacije (5°C, 15°C i 30°C) kefirne kulture imobilisane na kazeinu na metaboličku aktivnost u surutki. Konstatovali su da pri nižim temperaturama fermentacija traje duže, produkcija etanola i mlečne kiseline je manja, a veća je koncentracija rezidualnog šećera nego pri višim temperaturama fermentacije. Takođe, fermentacija je intenzivnija na surutki, pri čemu nastaje veća količina etanola i mlečne kiseline, a zaostaje manje rezidualnog šećera nego pri fermentaciji u 5%-tnom rastvoru laktoze.

Starter kultura za proizvodnju kumisa nije jasno definisana, ali je poznato da sadrži sledeće mikroorganizme:

- *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* i laktoza fermentišuće kvasce (*Sacharomyces* spp., *Klyveromyces marxianus* var. *marxianus* i *Candida koumiss*;
- laktoza nefermentišuće kvasce *Saccharomyces cartilaginosus*;
- kvasce koji ne fermentišu ugljene hidrate (*Mycoderma* spp.).

Utvrđeno je prisustvo 43 vrste bakterija mlečne kiseline čiji broj se kreće od $1,6 \cdot 10^7$ ćelija mL^{-1} . Preko 20 vrsta kvasaca koji fermentišu laktozu je detektovano, a broj varira od 3,9 do $8 \cdot 10^6$ ćelija mL^{-1} . Količina alkohola u uzorcima varira od 5 do 22 g L^{-1} (Ishii 1999; Fang i sar., 2002; Lin Lin i Ming Sheng, 2003; Tamime, 2006).

FERMENTACIJA MLEKA U PROIZVODNJI JOGURTA

Biohemijske reakcije inicirane starter kulturom tokom fermentacije mleka imaju fundamentalni uticaj na kvalitet proizvoda. Starter kulture u tehnologiji mleka razgrađuju ugljene hidrate primarno laktozu kao dominantan šećer u mleku i to homofermentacijom (karakteristično za *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Lactobacillus acidophilus*) ili heterofermentacijom (*Bifidobacterium* spp.) (slika 1).

HOMO FERMENTACIJA

Katabolizam laktoze se odvija u ćeliji mikroorganizama i razgrađuje se metaboličkim putem tako što laktoza ulazi u ćeliju (slika 1). *Lb. acidophilus* poseduje sistem za transport laktoze pri čemu se vrši fosforilacija pomoću fosfoenol piruvata koji translocira fosfotransferazni sistem. Navedeni složeni sistem translocira laktozu iz spoljašnjeg u unutrašnji deo citoplazmine membrane i u ćeliji se formira laktoza-fosfat. Laktoza-6-fosfat se hidrolizuje pomoću β -fosfogalaktozidaze u monosaharide.

Galaktoza i glukoza se potom katabolizuju putem T-agatpose i EMP (slika 1). Defosforilovana galaktoza nepromenjena izlazi iz ćelije. U oba puta glukoza i galaktoza konvertuju se u dihidroksi aceton-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat, gde se 3 ugljenika od šećera oksiduju u fosfoenol piruvat, a potom u mlečnu kiselinu.

Homolitička fermentacija mleka korišćenjem *Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* i *Lb. acidophilus* odvija se EMP katabolizmom glukoze. Citoplazmatični proteini mikroorganizama transportuju laktozu bez hemijske modifikacije putem permeaze. Nefosforilovani disaharid se hidrolizuje putem β -galaktozidaze na nefosforilovanu glukozu i galaktozu. Glukoza se kataboličkim putem transformiše do piruvata, a galaktoza izlazi iz ćelije. Kada se glukoza potpuno istroši od strane 3 navedena mikroorganizma, galaktoza se razlaže Leloir putem. Neke vrste mikroorganizama mogu da metabolizuju galaktozu samo pri niskim koncentracijama (4mM) laktoze što je zbog antinosača protona, "proton motive force" (PMF) koji predstavlja transportni sistem i za galaktozu.

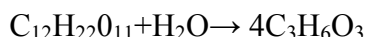
Prisustvo ugljen-dioksida tokom fermentacije mleka stimuliše rast *Lb. bulgaricus*, a *Str. thermophilus* metabolizuje galaktozu Leloir putem. CO₂ nastaje kao rezultat hidrolize uree (Tamime, 2006).

HETERO FERMENTACIJA

Probiotske bakterije *Bifidobacterium* spp. fermentišu laktozu i glukozu heterofermentacijom. Katabolizmom glukoze produkuje se CO₂ usled odvijanja procesa dekarboksilacije. Laktoza se prvo transportuje u ćeliju pomoću permeaze i hidrolizuje se u glukozu i galaktozu. Navedene heksoze se katabolizuju preko fruktoza-1,6-bifosfata, koji se razgrađuje pomoću fruktoza-bifosfat aldolaze. Krajnji produkti fermentacije su laktati i acetati, fermentacijom 2 mola glukoze nastaju 3 mola acetata i 2 mola laktata.

Produkcija mlečne kiseline

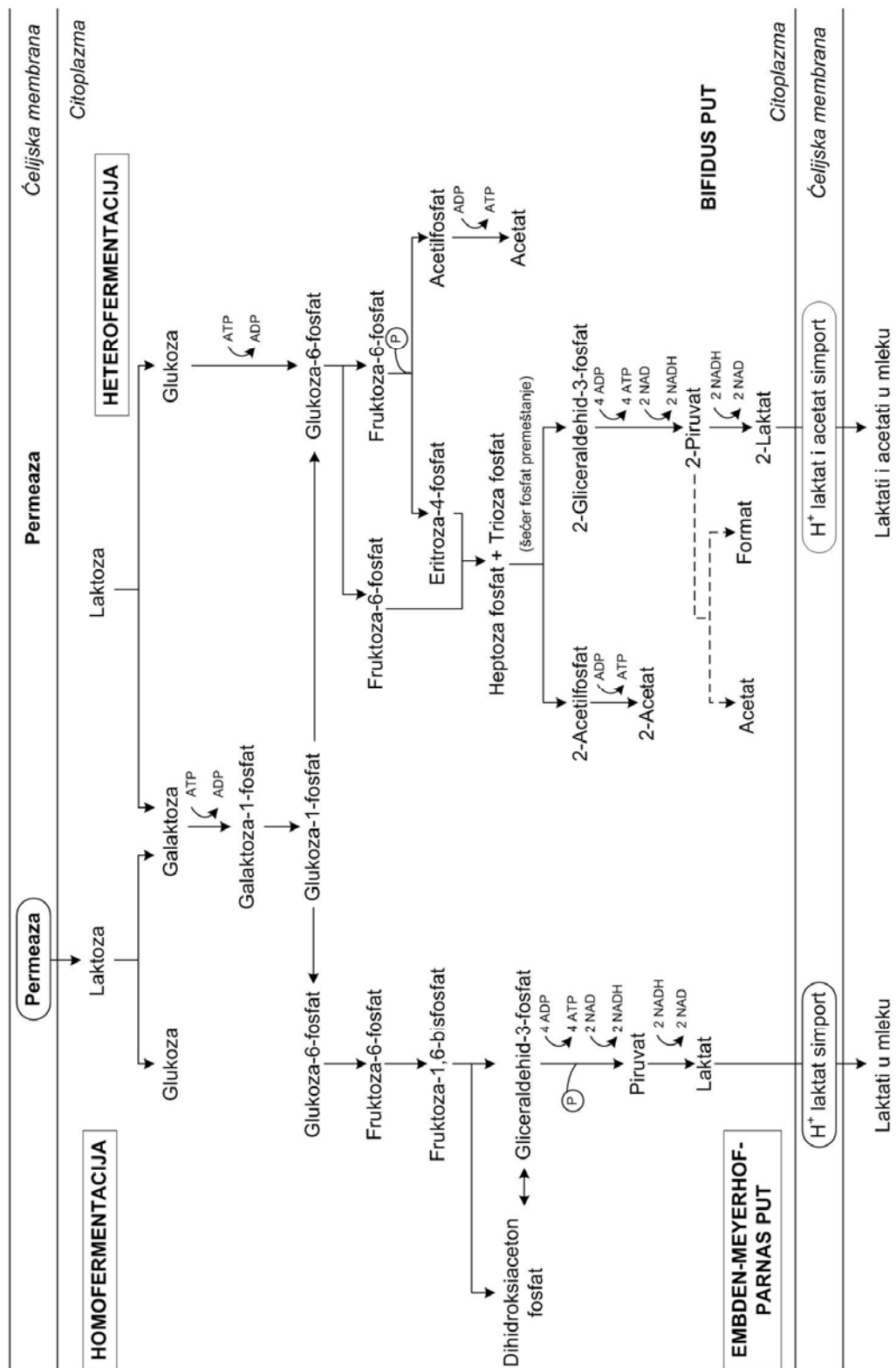
Složenim biohemijskim transformacijama laktoza se transformiše do mlečne kiseline.



Mlečna kiselina izaziva destabilizaciju kazeinske micle, konverzijom koloidnog kalcijum-fosfatnog kompleksa u rastvorljivi kalcijum-fosfat koji difunduje u tečnu fazu mleka. Postepeno izdvajanje kalcijuma izaziva koagulaciju kazeina pri pH 4,6-4,7, pri čemu se formira gel.

Mlečna kiselina takođe daje specifičnu aromu proizvodu, pošto mikroorganizmi poseduju enzim laktat dehidrogenazu koji sintetiše laktat iz piruvata. Laktat je stari naziv za mlečnu kiselinu koja može biti u obliku D(-)- i L(+)-izomera. *Str. thermophilus* uglavnom

LAKTOZA U MLEKU



Slika 1. Homofermentacija i heterofermentacija laktoze u jogurtu primenom jogurtne i probiotske starter kulture posle translokacije permeazom (Tamime, 2006).

produkuje L(+)-mlečnu kiselinu. Dok D(-)-mlečnu kiselinu produkuje *Lb. delbrueckii*. Enzim laktat dehidrogenaza se nalazi u citoplazmi bakterijske ćelije i aktivnost zavisi od odnosa NAD^+ i NADH . Koenzim se formira regeneracijom NADH tokom konverzije pirogroždane kiseline do mlečne kiseline.

Tokom proizvodnje jogurta *Str. thermophilus* raste brže od *Lb. delbrueckii* zbog čega je veća koncentracija L(+)- od D (-)-mlečne kiseline. Jogurt koji sadrži više od 70% L(+)-mlečne kiseline dominantno sadrži *Str. thermophilus*, ili je fermentacija vršena ispod 40°C , kiselost je manja i iznosi oko 8gL^{-1} mlečne kiseline. Dok jogurt koji sadrži dominantno D(-)-mlečnu kiselinu najčešće je inkubiran na višim temperaturama od 45°C .

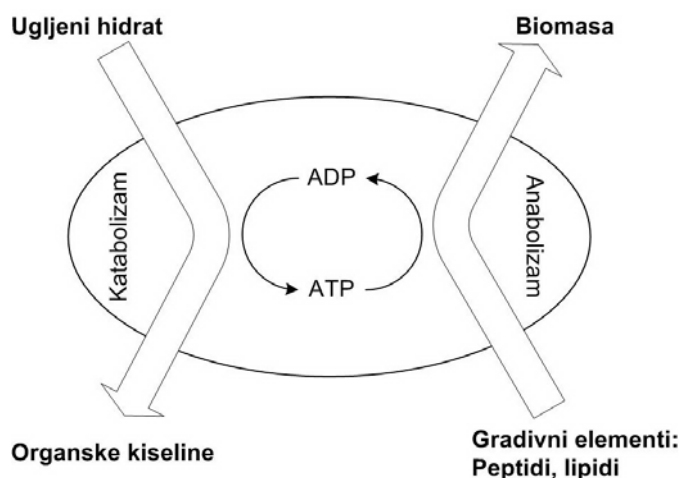
BIOHEMIJSKA TRANSFORMACIJA KOMPONENATA MLEKA

METABOLIZAM UGLJENIH HIDRATA

Jedna od osnovnih aktivnosti bakterija mlečne kiseline je razgradnja ugljenih hidrata mleka u mlečnu kiselinu pri čemu se generiše energija potrebna za sintezu pojedinih komponenata (slika 2). Ugljenik iz mikrobne biomase koji potiče iz energetski bogatih ugljenih hidrata, kao i aminokiselina i oligopeptida neophodan je za metaboličku aktivnost mikroorganizama. BMK ne sadrže enzime neophodne za proces disanja, tj. za oksidativnu fosforilaciju. Energija potrebna za taj proces dobija se iz ATP koja je znatno manja nego što je potrebno za odvijanje celokupnog procesa katabolizma.

Transport šećera i hidroliza

Poznata su dva transportna sistema za razgradnju glukoze. Prvi sistem je proton-gradijent permeaza koji translocira glukozu kroz ćelijsku membranu. U ovom procesu ne dolazi do promene na glukozu, već se vrši fosforilacija glukokinazom nakon ulaska u ćeliju, pri čemu nastaje glukoza-6-fosfat, koja se potom katabolizuje Embden-Meyerhof-ovim putem. Glukoza daje 2 molekula ATP i konvertuje se u 2 molekula piruvata. Proces dalje zahteva 1 molekul ATP radi PMF (dodatne energije), odnosno fosforilacije glukoze.



Slika 2. Šematski prikaz razgradnje ugljenih hidrata i iskorišćenje energije za sintezu biomase (Jensen, 1999).

Drugi sistem transformacije je manozna-fosfotransferazni sistem, pri čemu se glukoza transportuje u ćeliju i istovremeno se fosforiliše, odnosno nastaje glukoza-6-fosfat. Ovaj visokoenergetski fosfat se vezuje iz fosfoenol piruvata (PEP) koji se konvertuje u piruvat. Ovaj mehanizam je energetski povoljniji jer se konzervira određena količina energije u obliku PEP. Iz jednog molekula glukoze dobiju se 2 molekula ATP. Ovo je takođe potrebno za transport manoze (sa manje afiniteta nego za glukozu), i koristi se za metabolizam drugih prisutnih šećera. PEP fosforiliše glukozu unesene primenom PTS sistema što je katalisano enzimom piruvat kinazom.

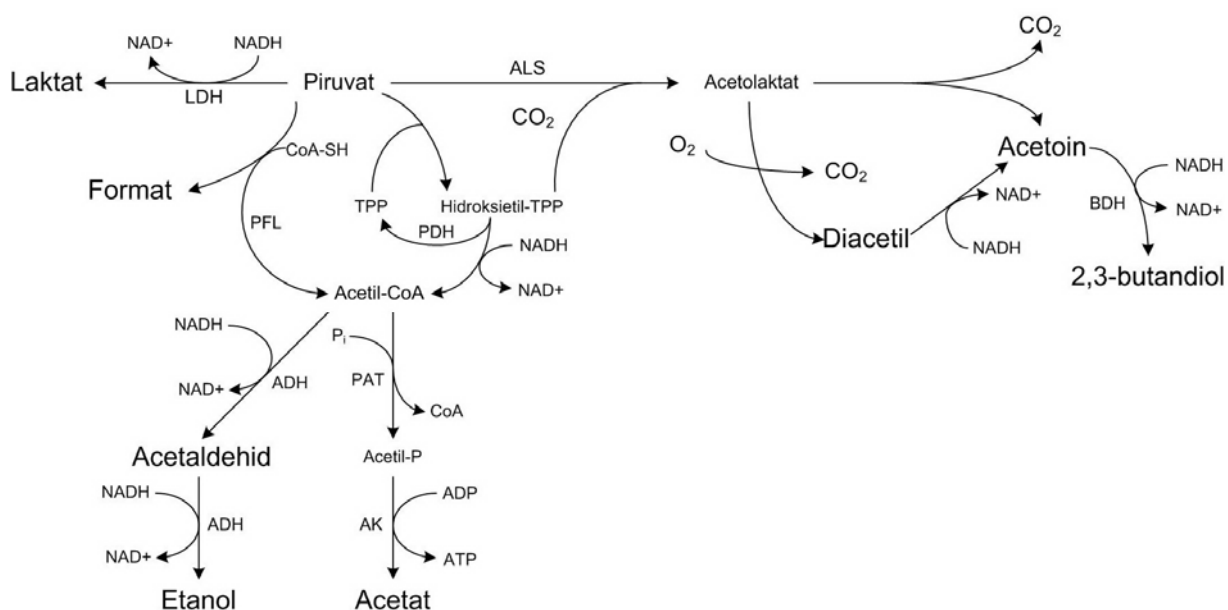
Jednostavno posmatrano transport laktoze kroz ćelijsku membranu ima dva puta: a) laktoza-PTS sistem iz manoze PTS i b) pomoću permeaznog sistema. Pre samog početka razgradnje laktoze EMP potrebno je nekoliko pripremnih faza. U cilju brze metaboličke transformacije laktoze u mleku neophodna je određena količina energije. Putevi razgradnje se razlikuju u zavisnosti od tipa fermentacije (homo- ili heterofermentacija) pri čemu se dobijaju i različiti produkti metabolizma.

U homofermentaciji, mlečna kiselina koja nastaje je iz 90% glukoznog ugljenika. Katabolizam glukoze se razlikuje ako je pod anaerobnim uslovima, pri čemu nastaju ekvimolarne količine laktata, etanola i CO₂:



Dalje razlike između dva puta EMP i fosfoketolaze su u bilansu energije. U prvom nastaje 2 mola, a u drugom 1 mol ATP-a po molu glukoze. Pojedine bakterije mogu da homofermentacijom ugljenih hidrata daju i druge komponente pored laktata, i to: acetaldehid, etanol, acetat, diacetil, acetoin, 2,3-butandiol (slika 3).

Citratni metabolizam kod BMK je veoma malo zastupljen. Karakterističan je samo za mezofilne mikroorganizme *Lactococcus* i *Leuconostoc* vrste, ali ne za termofilne kulture. Korišćenje citrata reguliše aktivnost citratne permeaze i u direktnoj je vezi sa pH vrednosti (optimalna pH=5-6) i temperaturom.



LDH-laktat dehidrogenaza; PFL-piruvat format liaza; ADH – alkohol dehidrogenaza; PAT – fosfotransacetil transferaza; acetat kinaza; ALS-acetolaktat sintaza; ADC – acetaldekarboksilaza; DR – diacetil reduktaza; BDH – butandiol dehidrogenaza; PDH – piruvat dehidrogenaza.

Slika 3. Alternativni krajnji produkti katabolizma piruvata (Jensen, 1999).

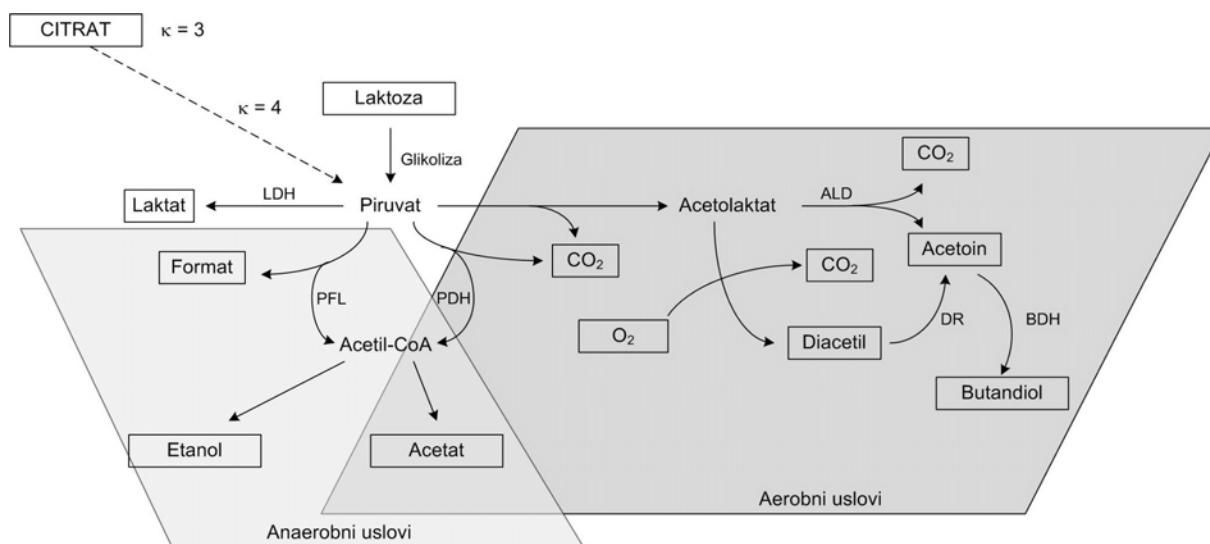
Aromatične komponente: acetat, diacetil, acetoin i 2,3-butandiol i CO₂ se takođe proizvode kroz metabolizam citrata.

Bakterije mlečne kiseline metabolišu ne samo citrate već i šećere razlažu brzo u prisustvu fermentišućih šećera. Citrati se prvo hidrolizuju pomoću citratne liaze i prelaze u acetat i oksal acetat koji se dekarboksilacijom pretvara u piruvat (slika 4).

Acetolaktat se formira iz piruvata, a dekarboksilacijom nastaje acetoin koji se dalje redukuje u butandiol pomoću butandiol dehidrogenaze. Acetoin se lako formira iz acetolaktata, dok se smatra da diacetil nastaje neenzimskim putem. Diacetil, acetoin i butandiol predstavljaju tri oksidacione faze u 4 ugljenom nizu. Diacetil se može redukovati u acetoin i butandiol uz prisustvo acetoin dehidrogenaze i butandiol dehidrogenaze.

Kombinacija mikroorganizama mezofilnih starter kultura proizvode znatno veće količine acetoina i diacetila nego citrata.

Promenljivi spoljašnji uslovi (prisustvo vazduha, smanjena količina energije, rast na slabo degradabilnim šećerima kao što su maltoza i galaktoza, dovode do preusmeravanja katabolizma piruvata do krajnjih produkata: acetata, acetaldehida i etanola (Čurić, 1998). Ove komponente formiraju acetyl-CoA koji je neophodan za sintezu masnih kiselina. Kada se redoks potencijal održava drugim reakcijama, NADH oksidaza, aktivna pod aerobnim uslovima, razlaže acetyl-CoA acetat kinazom proizvodeći acetat u reakciji gde se formira ATP.



Slika 4. Katabolizam citrata u homofermentaciji bakterija mlečne kiseline (Jensen, 1999).

Piruvat dehidrogenazni kompleks (PDC) čini NADH enzim kompleks i zahteva koenzim A, tiamin pirofosfat (TPP) i lipolnu kiselinu kao kofaktor (maksimalna aktivnost pod aerobnim uslovima).

Piruvat format liaza PFL je aktivna pod anaerobnim uslovima i katališe reakciju razgradnje piruvata u acetyl-CoA i format. Aktivna forma navedenog enzima je prisutna pod striktno anaerobnim uslovima i njena inaktivacija izazvana prisustvom kiseonika je ireverzibilna. Afinitet enzima prema piruvatu je visok, ali je kontrolisan glikolitičkom razgradnjom, dehidroksiaceton-fosfatom (DHAP) i gliceralhid-3-fosfatom (GAP). Visok fluks glikolitičkog puta rezultira visoku intercelularnu koncentraciju GAP i DHAP, inhibira PFL aktivnost i doprinosi pretvaranje piruvata u laktat. Step en glikolize utiče na aktivnost laktat dehidrogenaze, tako da je manje laktata, a više formata, acetaldehida i etanola.

Tokom mikrobiološkog rasta pod uobičajenim spoljašnjim uslovima piruvat može da se akumulira u ćeliji. Ove komponente se formiraju kondenzacijom dva molekula piruvata u reakciji katalizovanoj α -acetolaktat sintetazom sa tiamin pirofosfatom i Mg^{2+} jon kao ko-faktorom. Optimalna pH vrednost je 6, dok aktivnost ubrzano opada pri pH ispod 5,5. Sadržaj kiseonika ima pozitivan uticaj na specifičnu aktivnost ALS koja se rezultuje poboljšanjem fluksa piruvata pod aerobnim uslovima.

Diacetil se proizvodi uz pomoć *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetil lactis* i *Leuconostoc* tokom citratne fermentacije. Postoje dva puta sinteze diacetila iz acetyl-CoA i aktivacijom puta diacetil sintetaze ili hemijskom oksidativnom dekarboksilacijom α -acetolaktata. (Hassan i sar., 2003; Tamime, 2006)

Odnos L- i D- mlečne kiseline u jogurtu utiče na kvalitet proizvoda. Puhan i sar. (1973) su utvrdili da se odnos L- i D- mlečne kiseline kreće od 0,34 do 8,28. *Lb. acidophilus* proizvodi D- i L- mlečnu kiselinu, dok *Bifidobacterium* proizvodi L- mlečnu kiselinu tokom metabolizma i utiču na senzorne karakteristike proizvoda. Poznato je da se sadržaj nenedenaturisanih proteina surutke u obranom mleku smanjuje tokom inkubacionog perioda usled aktivnosti startera.

Produkcija egzopolisaharida (EPS)

Homopolisaharide čini jedna vrsta monosaharida D-glukoza ili D-fruktoza. Navedeni glukani ili fruktani imaju sličan oblik i sintetizuju se ekstracelularnom transglikozidazom korišćenjem saharoze kao glikozilnog donora. Heteropolisaharidi koji se formiraju u jogurtu sadrže tri jedinice koje čini tri do osam monosaharida. D-galaktoza, D-glukoza i/ili L-ramnoza su najčešće prisutni u različitim odnosima. Molekulska masa EPS se kreće od $1 \cdot 10^4$ do $6 \cdot 10^6$, a sadržaj varira od 50 mgL^{-1} do 600 mgL^{-1} i zavisi od BMK i uslova fermentacije kao što su pH, temperatura inkubacije, dodatak komponentata i prisustvo jona. Egzopolisaharidi (EPS) nastaju polimerizacijom ponavljanjem jediničnih prekursora koji se formiraju u citoplazmi. Posle kompletno ponovljenih umnoženih jedinica, prolaze kroz ćelijsku membranu i polimerizuju se u finalni EPS. Nekoliko enzima i/ili proteina je uključeno u biosintezu i sekreciju hetero-EPS. Hemijski sastav, enzimske i genetičke modifikacije na EPS direktno utiču na teksturu i reološka svojstva finalnog fermentisanog mlečnog proizvoda. Poznato je da su EPS produkti fermentacije koji poboljšavaju viskozitet proizvoda i smanjuju sinerezis u poređenju sa proizvodima bez EPS kultura. Tipovi EPS se razlikuju u molekulskoj masi. Jogurt koji sadrži EPS zahteva manju silu penetracije nego jogurt bez EPS. Takođe je utvrđeno da je niži modul elastičnosti i viskoznosti pri oscilatornom merenju kod EPS jogurta nego kod jogurta bez EPS zbog indikacija inicijalne neelastičnosti koja je niža kod uzoraka koji sadrže EPS (Hassan i sar., 2003).

Pojedine vrste bakterija koriste ugljene hidrate za rast, kao i za produkciju EPS, kao što su: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus baris* i *Leuconostoc mesenteroides* koji imaju sposobnost produkcije ekstracelularnih dekstrana koji su povezani α -1,6- glikozidnim vezama.

Vrste *Lactococcus* i termofilne bakterije mlečne kiseline se intenzivno koriste za produkciju EPS u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka tj. utiču na konzistenciju i teksturu proizvoda.

EPS se proizvodi tokom aktivnosti startera pri čemu se formira glukan nakon hidrolize glukoze. Tamime i sar. (2006) smatraju da se EPS formiraju kao rezultat aktivnosti *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, dok količina EPS zavisi od temperature inkubacije, kiselosti i tempa rasta. Prosečna količina u jogurtu kreće se od $0,4 \text{ gL}^{-1}$ do $0,6 \text{ gL}^{-1}$ za *Lb. acidophilus*.

PRODUKCIJA AROMATIČNIH KOMPONENATA

Starter kulture su primarno odgovorne za formiranje aromatičnih komponenata u jogurtu. Komponente se mogu podeliti na:

- neisparljive kiseline (mlečna, pirogroždana i oksalna);
- isparljive komponente (mravlja, sirćetna i propionska) i
- karbonilna jedinjenja (acetaldehid, aceton, acetoin i diacetil).

Produkcija acetaldehida je evidentna tokom fermentacije i raste maksimalno pri pH=4,2, a stabilizuje se pri pH=4. Povećanje suve materije mleka i termički tretman mleka utiču na količinu acetaldehida. Takođe, sadržaj karbonilnih jedinjenja (diacetila i acetaldehida) je veći na temperaturi od 50°C nego na 30°C, i veći je u jogurtu proizvedenom iz svežeg mleka nego iz rekonstituisanog (Tamime, 2006).

Promena sadržaja acetaldehida u jogurtu tokom 24 sata zavisi od tipa mleka odnosno u punomasnom mleku je neznatna, dok se u obranom mleku sadržaj acetaldehida smanjuje. Kravlje mleko sadrži 14,1mgkg⁻¹, dok kozije ima 4,7-5,5 mgkg⁻¹ acetaldehida (Tamime, 2006).

Tokom skladištenja jogurta menja se sadržaj aromatičnih komponenata:

- a) acetaldehida, etilacetata i diacetila opada, dok se sadržaj acetona i etanola u uzorcima proizvedenim iz ovčijeg mleka ne menja tokom fermentacije i skladištenja;
- b) acetaldehida se smanjuje obogaćivanjem obranim mlekom u prahu i ultrafiltriranim mlekom;
- c) acetaldehid opada, dok etanol i diacetil rastu tokom 10 dana skladištenja.

Druge komponente koje se proizvode tokom metaboličke aktivnosti mikroorganizama u mleku su:

- isparljive masne kiseline (sirćetna, propionska, buterna, izovalerijanska, kapronska i kaprilna);
- aminokiseline (serin, glutein, prolin, valin, leucin, izoleucin i lizin);
- produkti termičke denaturacije (80-90 °C, 15-30 min). Iz masti nastaju ketokiseline (aceton, butanon i heksanon), hidroksi kiseline (valerolakton) i micelarne komponente (2-heptanon, 2-nonanon, 2-undekanon). Termičkom degradacijom laktoze nastaju furfural, furfuralni alkohol, metil furfural, 2-pentifuran). Iz masti i/ili laktoze (benzaldehid, metilbenzoat); iz proteina (metionin, valin i fenilalanin – slobodne masne kiseline (Tamime i Robinson, 2004).

METABOLIZAM MASTI

Acilgliceroli čine 96-98% masti mleka dok su ostatak steroli, rastvorljive masti, vitamini, masne kiseline i skvalen. Trigliceridne lipaze u jogurtu potiču ili iz startera ili iz mikrobnih kontaminanata koji preživljavaju termički tretman. Sve trigliceridne lipaze se nalaze u citoplazmi i veoma mali deo je na ćelijskoj membrani.

Promena sadržaja slobodnih i esterifikovanih masnih kiselina u različitim tipovima jogurta zavisi primarno od metaboličke aktivnosti starter kultura.

Fermentacija punomasnog mleka uz primenu *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ili *Lb. acidophilus* ima različit uticaj na mast po rezultatima i poznate su sledeće

promene:

- značajno povećanje zasićenih masnih kiselina i oleinske kiseline,
- smanjenje sadržaja linolne i linolenske kiseline u gliceridnoj frakciji,
- povećanje sadržaja slobodnih masnih kiselina, ali ne značajno stearinske i oleinske kiseline,
- monogliceridne frakcije se gube tokom fermentacije,
- promene sadržaja holesterola nisu značajne,
- značajna korelacija je između stepena kiselosti i sadržaja slobodnih masnih kiselina.

Na osnovu dugogodišnjih istraživanja utvrđena je veća produkcija masnih kiselina od strane *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kao rezultat prisustva endopeptidaza i/ili egzopeptidaza više nego samih lipaza (tabela 4).

Tabela 4. Promena sadržaja masnih kiselina u punomasnom i obranom mleku fermentisanom na 37°C primenom jogurtnih starter kultura (Tamime i Deeth, 1980)

Masne kiseline	Mleko ^a		<i>Str. thermophilus</i>		<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		Kombinovan starter	
			24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Ukupno IMK ^b (mg/100 g)	P	3,20	6,05	6,26	4,90	4,19	6,88	7,55
	O	2,97	5,89	6,32	4,88	3,79	6,80	7,20
C ₂	P	0,21	0,55	1,26	0,51	0,45	0,57	0,48
	O	0,20	1,95	1,36	0,45	0,37	0,12	0,20
C ₃	P	Tr	Tr	Tr	0,05	0,03	0,22	0,11
	O	-	0,05	0,05	0,03	0,03	Tr	Tr
i-C ₄	P	0,03	0,03	0,05	0,05	0,04	0,13	0,14
	O	0,03	0,04	0,61	0,05	0,05	0,03	0,06
n-C ₄	P	0,39	0,74	0,94	1,21	0,97	1,05	1,44
	O	0,38	0,50	0,96	1,20	0,90	0,66	1,08
i-C ₅	P	0,05	0,21	0,21	0,14	0,10	0,15	0,06
	O	0,03	0,13	0,18	0,11	0,09	0,07	0,17
n-C ₅	P	-	-	-	-	-	-	-
	O	-	Tr	Tr	-	-	-	-
n-C ₆	P	1,09	1,73	1,24	1,24	1,05	1,56	2,57
	O	1,13	1,72	1,35	1,25	1,07	2,40	2,04
C ₈	P	0,97	1,44	0,99	0,74	0,53	1,78	1,64
	O	0,96	1,30	1,18	0,87	0,56	2,26	2,36
C ₁₀	P	1,21	1,59	1,30	0,91	1,10	2,65	2,22
	O	1,10	1,81	1,74	1,06	0,68	3,11	2,92

^a P: Punomasno mleko; O: obrano mleko; Tr: Tragovi; (-) – nije detektovano; Prazna polja – nisu određivane test kulture; ^b IMK – isparljive masne kiseline.

METABOLIZAM VITAMINA

Mleko sadrži liposolubilne i hidrosolubilne vitamine čiji sadržaj varira u zavisnosti od sastava mleka, primarno sadržaja masti. Sadržaj vitamina se menja tokom proizvodnje i skladištenja fermentisanih mlečnih proizvoda (tabela 5).

U slučaju viška nerastvornog kiseonika i/ili termičkog tretmana mleka može se redukovati sadržaj vitamina C, B₆ i B₁₂. Termički tretman, npr. 5 min na temperaturi ključanja, prouzokuje znatno veće smanjenje vitamina tako da sadržaj vitamina B₁₂ iznosi 1,78μL⁻¹.

Jogurtne starter kulture koriste vitamine prisutne u mleku tokom fermentacije jer su neophodni za odvijanje osnovnih metaboličkih aktivnosti.

Tokom skladištenja opada sadržaj vitamina B₁₂ i folne kiseline, biotina, niacina i pantotenske kiseline.

Sadržaj folne kiseline koji proizvodi *Str. thermophilus* raste posle 3,5 sata fermentacije i nakon toga ubrzano opada. To znači da se *Lb. delbruecki* spp. *bulgaricus* razvija koristeći vitamine koje je proizveo *Str. thermophilus*. Neki mikroorganizmi iz roda *Lactobacillus* imaju sposobnost sinteze vitamina B₁₂. Sadržaj folne kiseline u komercijalnom jogurtu se kreće od 37 do 240 µgkg⁻¹. Mikroorganizmi koji sintetišu folnu kiselinu zahtevaju folacin koji ima ulogu koenzima u različitim biohemijskim reakcijama za koje su neophodni purin, pirimidin i ostatak glutaminske kiseline.

Aktivan niacin sadrži nikotinska kiselina i nikotinamid. Biosinteza niacina ima nekoliko faza: prva je sinteza šećera, a druga sinteza pirimidina i purina. Nikotinska kiselina nastaje usled degradacije triptofana, a put koji zahteva sposobnost sinteze vitamina (tiamin, riboflavin i vitamin B₆) je neophodan za aktivaciju potrebnih enzima. Pošto *Str. thermophilus* i *Lb. delbruecki* spp. *bulgaricus* koriste navedene vitamine, triptofan ne mogu da skladište tokom proizvodnje jogurta. Stoga, navedeni mikroorganizmi koriste vitamine za sintezu niacina.

Aktivnost vitamina B₆ je na piridoksinu, piridoksalu i piridoksaminu. Osnovna struktura navedenih komponenti je jednostavna i čini je prsten i radialno raspoređene komponente.

Tabela 5. Sadržaj vitamina u različitim vrstama mleka i nativnog jogurta^a
(Holland i sar., 1989)

Vitaminski / koncentracija	Kravlje		Kravlje		Kozije		Ovčije		Sojino ^f	
	Mleko ^b	Jogurt ^c	Mleko ^d	Jogurt ^e	Mleko	Jogurt	Mleko	Jogurt	Mleko	Jogurt
I. (µg/100 g)										
Retinol	1	8	52	28	44	N	88	86	0	23
Karoten	Tr	5	21	21	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
Vitamin D	Tr	0,01	0,03	0,04	0,11	N	0,18	0,24	0	0
Vitamin B ₁₂	0,4	0,2	0,4	0,2	0,1	Tr	0,6	0,2	0	0
Folati	5	17	6	18	1	7	5	3	19	-
Biotin	1,9	2,9	1,9	2,6	3	0,5	2,5	-	-	-
II. (mg/100 g)										
Vitamin E	Tr	0,01	0,09	0,05	0,03	0,03	0,11	0,73	0,74	1,49
Tiamin	0,04	0,05	0,03	0,06	0,04	0,04	0,08	0,05	0,06	-
Riboflavin	0,17	0,25	0,17	0,27	0,13	0,17	0,32	0,33	0,27	-
Niacin	0,09	0,15	0,08	0,18	0,31	0,27	0,41	0,23	0,11	-
Triptofan 60	0,78	1,20	0,75	1,33	0,73	0,83	1,27	1,03	0,52	0,88
Vitamin B ₆	0,06	0,09	0,06	0,10	0,06	0,06	0,08	0,08	0,07	N
Pantotenat	0,32	0,45	0,35	0,50	0,41	0,23	0,45	-	-	-
Vitamin C	1	1	1	1	1	1	1	Tr	0	0

^a Nativni jogurt; ^b Delimično obrano mleko (1,6 g masti/100 g); ^c Niskomasni jogurt (0,8 g masti/100g);

^d Punomasno mleko (3,9 g masti/100 g); ^e Punomasni jogurt (3,0 g masti/100g); ^f Proizvod obogaćen retinolum i vitaminom E; Tr – Tragovi.

BIOHEMIJSKE PROMENE TOKOM PROIZVODNJE KEFIRA

Marshall i Tamime (1997) su ispitali mehanizam razgradnje komponenta mleka tokom proizvodnje kefira za produkciju aromatičnih komponenta. Primarnu ulogu u razgradnji ugljenih hidrata i azotnih materija imaju bakterije mlečne kiseline što je već detaljno opisano.

Međutim, metabolizam kvasaca u proizvodnji kefira može takođe da izaziva degradaciju komponenata mleka, što potencijalno doprinosi aromi proizvoda.

Lipoliza masti u mleku rezultuje dobijanjem slobodnih masnih kiselina, koje mogu biti prekursori u formiranju arome kefira pri čemu se produkuju komponente: metil ketoni, alkoholi, laktoni i estri. Lipolizom i dekarboksilacijom slobodnih masnih kiselina formiraju se metil ketoni, posebno 2-nonanon i 2-heptanon. Kvasci i plesni fermentacijom mleka daju metil ketone, dok neke vrste *Lactobacillus* (*Lb. helveticus*) mogu takođe da proizvode velike količine 2-nonanona i 2-heptanona.

Kvasci razlažu kazein do malih peptida ili slobodnih aminokiselina koji se potom konvertuju u alkohole, aldehide, isparljive kiseline, estre i jedinjenja koja sadrže sumpor (posebno metionin, koji je prekursor isparljivih aromatičnih komponenata). *Geotrichum candidum* je odgovoran za produkciju jedinjenja koja sadrže sumpor.

Razgranate aminokiseline su prekursori aromatičnih komponenata, kao što su izobutirat, izovalerijat, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal i 2-metilpropanal. Poslednja istraživanja su pokazala da je zastupljen visok stepen hidrolize kazeina u proizvodnji kefira (Tamime, 2006).

Beshkova i sar. (2003) su utvrdili da fermentisani mlečni proizvodi imaju viši sadržaj karbonilnih jedinjenja proizvedenih sa jogurtnom starter kulturom nego uz primenu kefirnih zrna, uključujući i količinu etanola i CO₂ (3,98 μgkg⁻¹ i 1,8 μgkg⁻¹, respektivno).

Fermentacija mleka uz primenu kvasaca uključuje složene biohemijske procese asimilacije (anaerobne puteve, potrošnju energije i redukcione procese koji doprinose sintezi novih komponenata) i disimilacije (kataboličke puteve-oksidativne procese, čime se uklanjaju elektroni iz medijuma i koriste za energiju) odnosno nutrijenata kvašćevih ćelija. Slično kao i kod drugih mikroorganizama za oksido-redukcione procese kvasci koriste enzime dehidrogenazu, dominantno NADP⁺ i NAD⁺, respektivno kao redoks kofaktori.

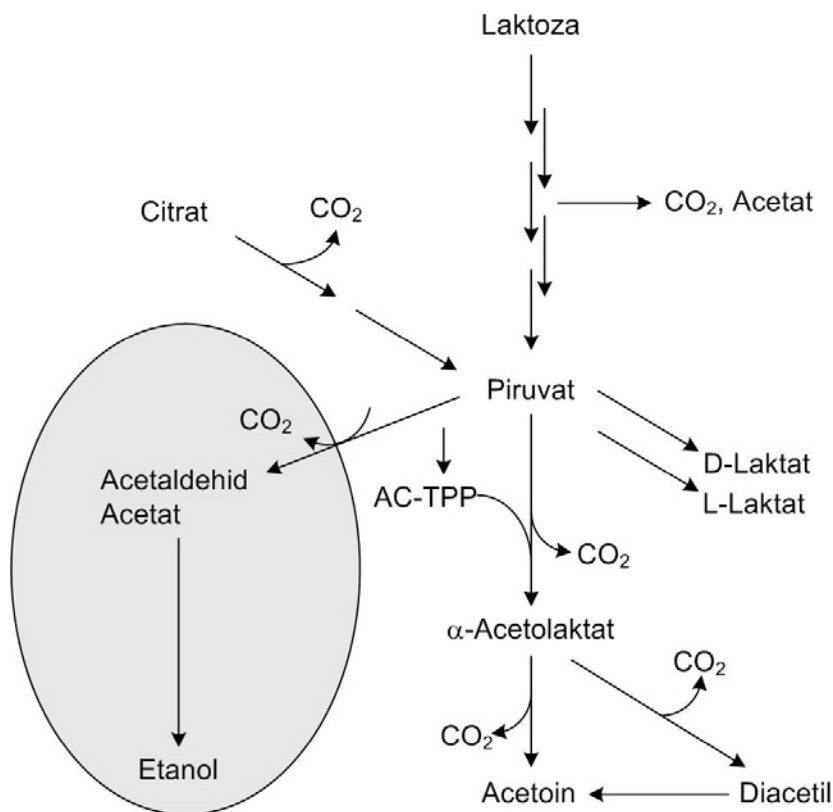
Većina kvasaca metaboliše šećer kao osnovni izvor ugljenika za energiju npr. *S. cerevisiae* metaboliše glukozu glikolitičkim putem pri čemu se dobija 2 piruvata + 2ATP + 2NADH + H⁺ (Walker, 1998).

Složen proces biohemijskih transformacija prikazan je na slici 5 (Tamime, 2006). Slika 5 prikazuje 10 koraka fosforilacije pri čemu nastaje piruvat iz glukoze, i u alkoholnoj fermentaciji šećera, kvasci reoksiduju NADH u NAD⁺ u završnoj fazi gde piruvat prelazi u acetaldehid (uz pomoć piruvat dekarboksilaze), koji se zatim redukuje u etanol putem enzima alkohol dehidrogenaze (ADH).



Pored toga kvasac može da katabolizuje piruvat u mitohondrijalnom matriksu gde se oksidativnom dekarboksilacijom dobija acetyl-CoA primenom piruvat dekarboksilaze. *Sacharomyces* (aerobnom ili anaerobnom fermentacijom) i *Klyveromyces* (anaerobnom fermentacijom) takođe mogu da metabolišu veliki broj ugljenih hidrata: pored glukoze, laktozu, galaktozu, melibiozu i fruktozu. Principijelni katabolizam *Candida*, *Pichia* i *Torulopsis* vrsta pripada grupi anaerobne fermentacije. *Candida*, *Saccharomyces* i *Klyveromyces* vrste imaju ograničenu sposobnost ekstracelularne proteolitičke aktivnosti, dok *Candida* i *Torulopsis* vrste poseduju ekstracelularnu lipaznu aktivnost (Walker, 1998), što doprinosi aromi proizvoda usled hidrolitičke aktivnosti mlečnih komponenata.

Mikroflora kefirnih zrna je inkorporirana u proteinski matriks i ugljene hidrate. Poznato je da neki sojevi BMK produkuju ekstracelularne polisaharide (EPS) koji utiču na teksturu zrna i fermentaciju. Jedan od EPS je poznat pod nazivom kefiran. Kefiran je rastvorljiv u vodi i čini ga razgranati glukogalaktan koji sadrži jednake delove D-glukoze i D-galaktoze. Kefiran kao i EPS koji nastaju kao produkt metabolizma BMK poboljšava biološka svojstva proizvoda zbog multifunkcionalnog uticaja na humani organizam, a takođe poboljšava i reološka svojstva proizvoda (Tamime, 2006; Piermaria, 2008).



Slika 5. Produkcija etanola usled metaboličke aktivnosti kvasaca (Tamime, 2006).

STRUKTURNE PROMENE KAZEINSKE MICELE TOKOM FORMIRANJA GELA

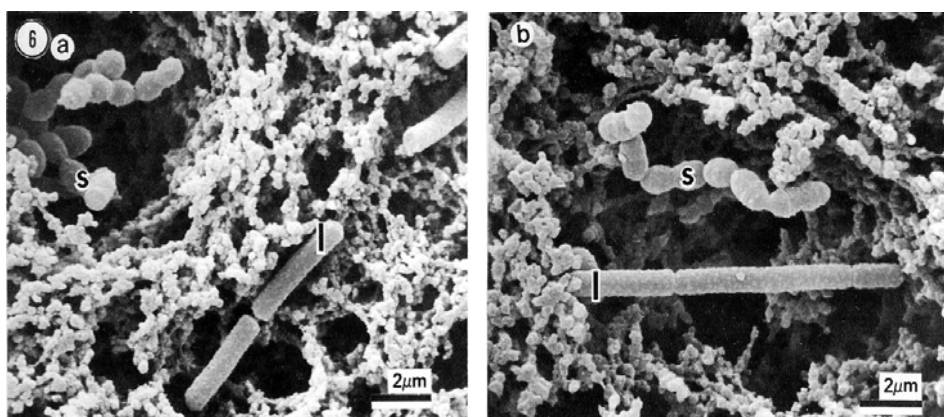
Tokom proizvodnje jogurta, termički tretirano i ohlađeno mleko na odgovarajuću temperaturu inokuliše se sa odabranom starter kulturom. Optimalna temperatura tokom fermentacije mleka uz primenu startera: *Str. thermophilus* i *Lb. bulgaricus* je 40-45°C. Formiranje gela tokom procesa fermentacije nastaje usled složenih biohemijskih reakcija odnosno destabilizacijom kazeinske micelle. Poznato je da kazeinske micelle čine različite proteinske frakcije koje su povezane preko kalcijum-fosfatnih mostova. Tokom fermentacije mleka micelarni ili koloidni kalcijum povećava se u serumu kao rezultat solubilizacije micelnog kalcijum-fosfata pri nižim pH vrednostima (smanjuje se rastojanje sa magnezijumom i citratima). Promena prirodnog oblika kazeinske micelle ima važan uticaj na proces formiranja gela. Mehanizam disocijacije i agregacije kazeinske micelle zavisi od: disocijacije β -kazeina pri nižim pH vrednostima i disocijacije drugih kazeinskih frakcija (κ , α_1 , α_2). Većina autora je utvrdila da količina i odnos disociranog kazeina u serumu zavisi od pH vrednosti i temperature. Pri pH vrednosti 5,6, sve kazeinske frakcije su disocirale uglavnom u spoljašnjem sloju submicela. Solubilizacija micelnog kalcijuma odvija se pri pH nižem od 5,3, pri čemu se gradi linearna veza između Ca^{2+} i Mg^{2+} i neorganskog fosfata i citrata. Povezivanje jonskog kalcijuma i magnezijuma sa kazeinom postaje nezavisno pri pH=5,6-6,7. Kalcijum vezan za micelu uključuje karboksilne grupe, iako smanjenje pH vrednosti takođe utiče na promenu svojstava zbog elektrostatičkih interakcija između pozitivno i negativno naelektrisanih grupa. Niža pH vrednost redukuje odbojne sile i doprinosi hidrofobnim interakcijama izazivajući koagulaciju kazeinskih micela.

Ove promene se mogu podeliti na dve grupe:

- 1) promene koje vode ka destabilizaciji kazeinske micelle, a koje se dešavaju u intervalu pH od 6,7-5,3;
 - rastvaranje koloidnog kalcijum-fosfata (CCP);
 - disocijacija pojedinih molekula kazeina iz micelle;
 - povećanje hidratisanosti (usled bubrenja) i poroznosti kazeinskih micela u pH intervalu 6,7-5,3, usled prethodne dve promene;
- 2) promene koje vode ka agregaciji kazeinskih micela, koje se dešavaju u pH intervalu 5,3-4,6:
 - sniženje negativnog naelektrisanja i zeta potencijala, i povećanje hidrofobnosti kazeinskih micela u pH intervalu 6,7-4,6
 - smanjenje hidratacije u pH intervalu 5,4-4,6
 - povećanje jonske snage mlečnog seruma usled rastvaranja CCP
 - reasocijacija β -kazeina sa kazeinskom micelom pri pH= 5,2.

Na osnovu fizičko-hemijskih promena koje se dešavaju tokom acidifikacije, može se zaključiti da do nastajanja gela dolazi usled agregiranja kazeinskih micela u grozdove i lance, odnosno u trodimenzionalni proteinski matriks. Najveći uticaj na agregaciju ima neutralizacija površinskog naelektrisanja i sniženje zeta potencijala kazeinskih micela, čime su omogućene interakcije između pojedinih micela kazeina. Takođe, veoma je značajan uticaj rastvaranja CCP na disocijaciju kazeina iz micelle i agregaciju izmenjenih kazeinskih micela, jer kao što je ranije navedeno, pri pH=5,2-5,3 dolazi do potpunog rastvaranja CCP, a pri pH=5,1 dolazi do pojave prvih agregata. Agregacija individualnih molekula kazeina vodi ka formiranju malih agregata, koji dalje agregiraju i formiraju veće agregate koji predstavljaju metastabilne čestice. Formirani agregati dalje agregiraju u grozdove i konglomerate, od kojih se formira trodimenzionalna mreža (slika 6).

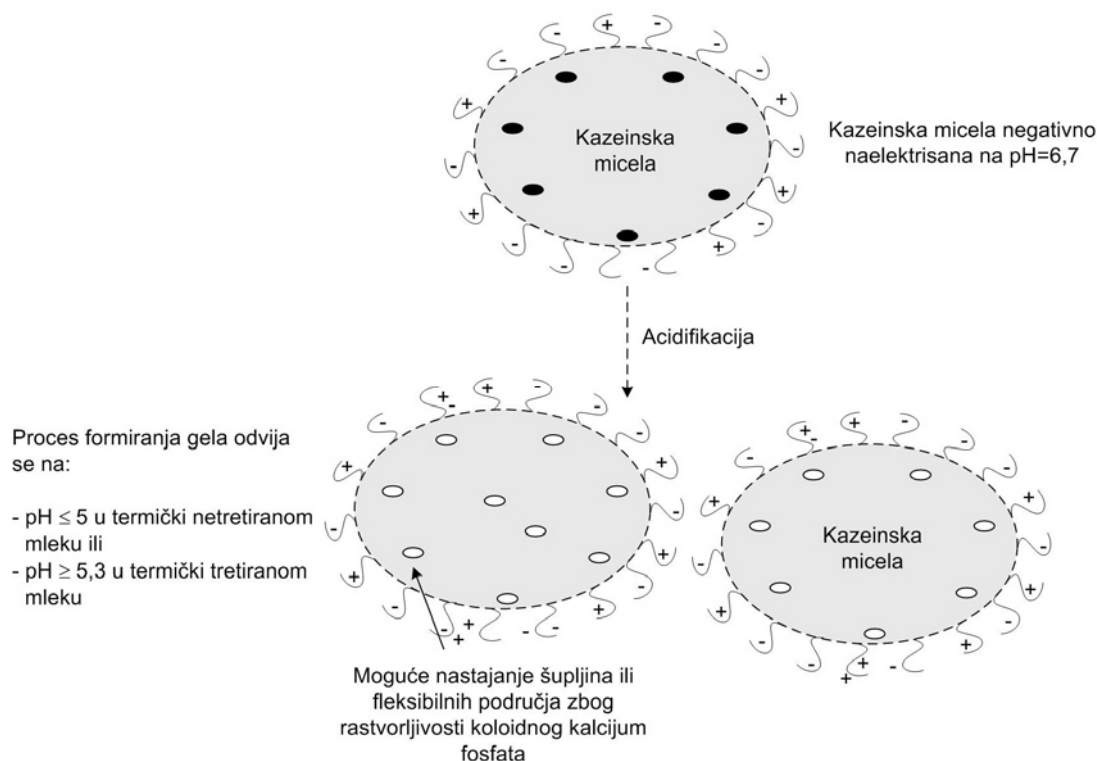
Evidentno je da je formiranje gela rezultat složenih biohemijskih i fizičkih transformacija mleka, koje se odvijaju kao rezultat dodatka ingradijenata za povećanje suve materije (primarno sadržaja proteina) mleka, homogenizacije, termičkog tretmana i katabolizma laktoze u mleku usled metaboličke aktivnosti startera koji uz korišćenje određene količine energije proizvodi mlečnu kiselinu i druge komponente.



Slika 6. Tipična mikrostruktura jogurta u kojoj su vidljivi mikroorganizmi inkorporirani unutar proteinskog matriksa l-laktobacili, s-streptokoke: a) jogurt sa dodatkom obranog mleka u prahu; b) jogurt iz ultrafiltriranog mleka (Tamime i Robinson, 1985).

Generalno posmatrano, sniženjem pH vrednosti izaziva se destabilizacija mleka, koja se odvija u četiri sledeće faze (slika 7):

- 6,6-5,9 – nije evidentna promena kazeinske micela (prosečna veličina 0,1 μ m) i homogena je distribucija micela u mleku;
- 5,5-5,2 – delimična micelarna dezintegracija; kazeinske micelle agregiraju i formiraju strukturu sa prazninama;
- 5,2-4,8 – porast kazeinskih micela pri čemu partikule postaju veće od nativnih micela;
- ispod 4,5, odvija se reorganizacija i agregacija kazeinskih partikula koja dovodi do formiranja proteinskog matriksa koji sadrži micelarne lance i nakupine.



Slika 7. Šematski dijagram fizičkih transformacija kazeinske micelle tokom acidifikacije mleka (Tamime, 2006).

Fizičko hemijske promene kazeinske micelle tokom acidifikacije utiču na reološke osobine gotovog proizvoda.

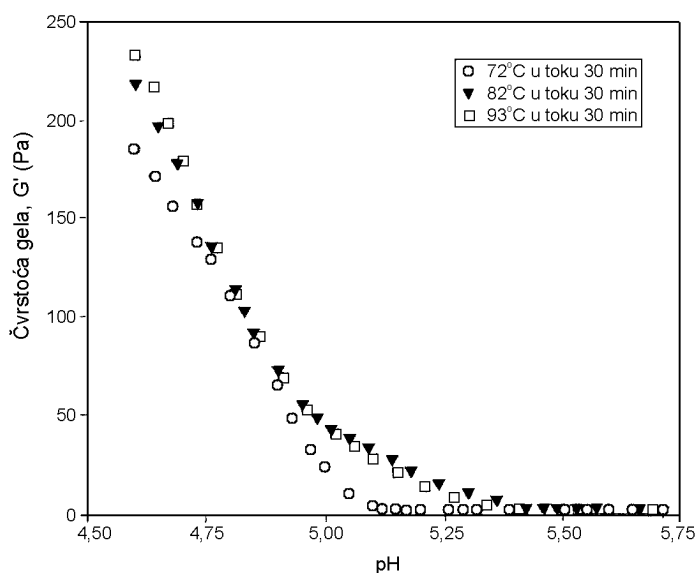
Promene viskoziteta mleka tokom procesa fermentacije odnosno formiranja gela mogu se podeliti u četiri faze sa različitom zavisnošću od viskoziteta (Tamime, 2006):

- 1) Faza indukcije – nema promene viskoziteta. Ova faza traje do momenta disocijacije kazeina iz micelle, kada je zabeležena i najveća koncentracija jonskog kalcijuma;
- 2) Faza flokulacije – maksimalno povećanje viskoziteta. U ovoj fazi dolazi do agregacije izmenjenih kazeinskih micela u manje agregate;
- 3) Faza metastabilne ravnoteže – zadržava se konstantan viskozitet. Ova faza se poklapa sa nastajanjem trodimenzionalne mreže i očvršćavanjem gela.
- 4) Faza sinerezisa – smanjuje se viskozitet u kasnijoj fazi inkubacionog perioda, i u postacidifikacionom periodu.

Trajanje svake faze zavisi od sastava i kiselosti mleka, vrste starter kulture i visine temperature.

Lagano zagrevanje kazeinskog rastvora napravljenog sa rekonstituisanim obranim mlekom u prahu ili Na-kazeinatom, i acidifikacija na temperaturi od 0 do 2°C produkuje fizički stabilnu suspenziju kazeinskih čestica. Proces formiranja gela preko 10 °C i sniženje temperature do 4 °C posle formiranja gela ima sledeći uticaj: kazeinske čestice formiraju kompleks ireverzibilne strukture; kiselo formirani gel aktivira Gibsovu energiju koja se snižava povećanjem temperature; ako je gel dobrih osobina, na temperaturi preko 10 °C dinamički moduli (G' i G'') linearno rastu sa logaritmom vremena; formirana mreža gela sadrži velike i male agregate u formi kazeinskih agregatnih čestica sa šupljinama oko 1-10 μm koje pokazuju da su navedene forme napravljene od koncentrata proteina (oko 25%) sa modulom od 10^5N^{-1} (Tamime, 2006).

Tokom procesa acidifikacije mleka čvrstoća gela tj. moduo G' raste najintenzivnije nakon pada pH vrednosti ispod 5. Takođe, čvrstoća gela pri nižim pH vrednostima mleka tokom fermentacije je viša ako je mleko prethodno termički tretirano na višim temperaturama (slika 8).



Slika 8. Uticaj različitih termičkih tretmana mleka na čvrstoću gela jogurt (Lee i Lucey, 2003).

Proces formiranja gela se odvija u nekoliko faza. Prva faza ili inicijalni lag je period niskog viskoziteta, potom sledi faza brze promene i na kraju faza visokog viskoziteta. Navedeni autori su takođe utvrdili da se na kraju disocijacija kazeinske micelle odvija pri $\text{pH}=5,1$ i smatraju da utiče na konverziju koloidnog kalcijuma u Ca^{2+} . Pri $\text{pH}=4,8$ kazeinske submicelle reasociraju i formiraju veće kazeinske agregate bez specifičnog oblika i dimenzija.

Generalno se može zaključiti da $\alpha\text{-La}/\beta\text{-Lg}$ gradi kompleks sa $\kappa\text{-kazeinom}$ (vezujući –SH i –SS mostove) i delimično štite micelu; iako je pH vrednost mleka niža, destabilizacija ili raskidanje micela počinje da se odvija. Kao rezultat toga mreža gela ili proteinskog matriksa sastoji se od micelarnih nakupina u koje su inkorporirani i drugi konstituenti mleka uključujući i vodu (Tamime i Robinson, 2004).

REOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

Reologija se može koristiti za karakterizaciju strukturnih karakteristika, kao i za proticanje, organskih i neorganskih materijala. Na osnovu reoloških merenja može se predvideti ponašanje ili stabilnost sistema tokom proizvodnje i skladištenja ili promena parametara skladištenja: vlažnost i temperatura. Karakteristike proticanja, koeficijent konzistencije, kriva proticanja, sposobnost isticanja, tekstura, lepljivost, viskozitet, plastičnost, prinosni napon, doprinose olakšanju pri transportu, komercijalnom procesu kao i poboljšanju prihvatanja proizvoda od strane potrošača. Viskoelastične karakteristike, kao što su modul elastičnosti i viskoznosti pomažu da se bolje razume struktura supstrata, uticaj temperature, interakcije komponenata i fazna transformacija (Velez-Ruiz, 2008).

Fizička svojstva jogurta kao što su konzistencija, čvrstoća, kohezivnost, proticanje, viskoelastičnost, tekstura i generalno posmatrano sve reološke karakteristike povezane su sa senzornim osobinama i zavise od više faktora: sastav mleka, procesa proizvodnje (hlađenje, zagrevanje, homogenizacija), sadržaj suve materije, tip startera kiselost, stepen proteolize i finalnih operacija (agitacija, mešanje, pumpanje i hlađenje).

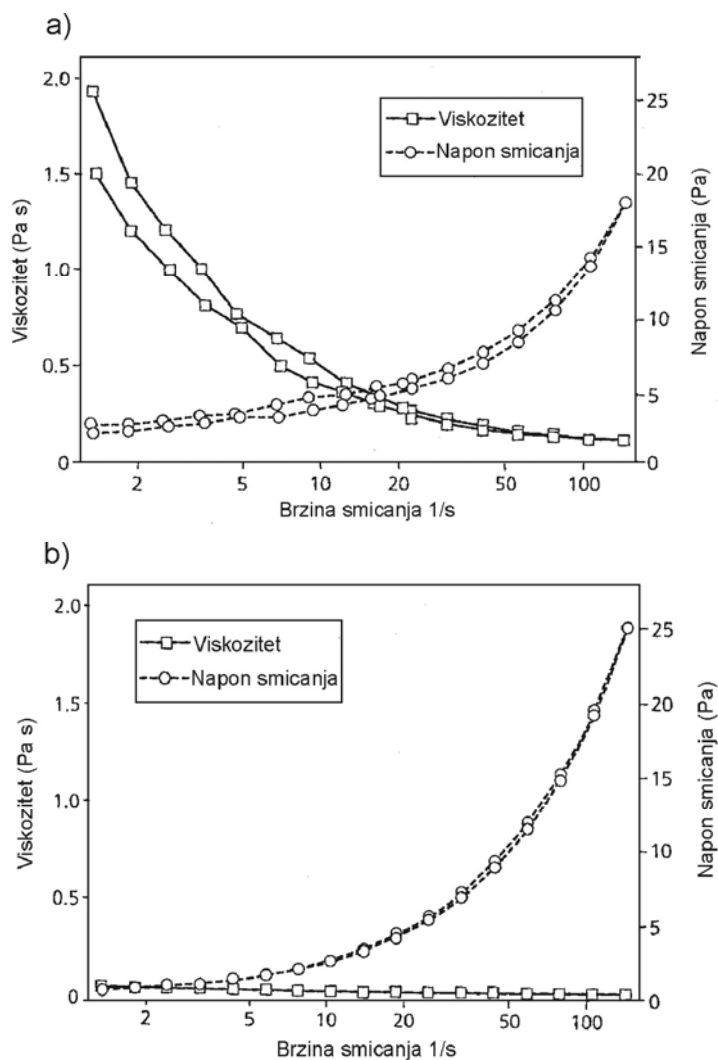
Namirnice su složeni sistemi i najčešće ne pripadaju ni tečnostima ni čvrstim materijalima, već su viskoelastični sistemi. To su materijali koji predstavljaju kombinaciju viskoznih (tečnosti) i elastičnih (čvrstih) svojstava, a jogurt je tipičan primer slabog viskoelastičnog gela. Dinamička reološka merenja direktno su povezana sa viskoznim i elastičnim svojstvima. Dinamička merenja uključuju analizu materijala pri malim oscilatornim naponima mereći rezultat napona u materijalu. Oscilatorni napon pri istim frekvencama smicanja, ali izvan faze, i napon može da se odrazi na komponente u materijalu u funkciji od napona. Postoje dva modula koja definišu navedeni oblik G' i G'' . G' je "storage moduo" i povezan je sa elastičnim karakteristikama materijala, dok G'' je "loss moduo" i u korelaciji je sa viskoznim svojstvima materijalima.

Elastični moduo (unutar sistema) naziva se "storage" jer istiskuje energiju tokom cikličnih deformacija, dok G'' (na površinskom spoljašnjem delu sistema) i povezan je sa gubitkom energije usled zagrevanja. Odnos između $G''/G' = \tan \delta$ naziva se "loss tangenta".

Navedena vrednost pruža informaciju o strukturi materijala u određenom testu. Kada se materijal ponaša kao čvrsto telo (deformacija je elastična), G' je veće od G'' odnosno $\tan \delta$ je manje od 1. Međutim, kada se materijal ponaša kao tečnost, ima viskozni karakter i $\tan \delta$ je veće od 1.

Merenjem viskoziteta može se predvideti stabilnost fermentisanih mlečnih napitaka. Ako viskozitet ostaje nepromenjen sa povećanjem brzine smicanja, pri niskim pH vrednostima, može se opisati kao Njutnovsko ponašanje (slika 9). Smatra se da su sistemi koji imaju Njutnovsko ponašanje stabilni tokom skladištenja. Međutim, ako viskozitet opada sa povećanjem brzine smicanja pripada grupi pseudoplastičnih sistema, i nije stabilan tokom skladištenja ukoliko se ne primeni stabilizator.

Od 90-tih godina ispitivane su reološke osobine i modelovanje Nenjutnovskih i/ili viskoelastičnih sistema kao što je jogurt. Postoje studije koje opisuju dinamičko ponašanje jogurta, i u nekima od njih je prikazana tiksotropna priroda fermentisanih mlečnih proizvoda. Zbog toga struktura jogurta, ima važno mesto kod viskoelastičnih mlečnih proizvoda, dinamički testovi su se pokazali da imaju odličnu primenu u definisanju želiranja i strukturnih fenomena proizvoda.



Slika 9. Kriva proticanja tečnog jogurta: a) izraženih pseudoplastičnih svojstava; b) približno Njutnovskih karakteristika (Tamime, 2006).

Pored uobičajenih operacija koje se primenjuju u tehnološkom procesu proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda (slika 10), postoji veliki broj postupaka i tehnika koje se koriste u cilju poboljšanja fizičko-hemijskih, reoloških i senzornih karakteristika proizvoda:

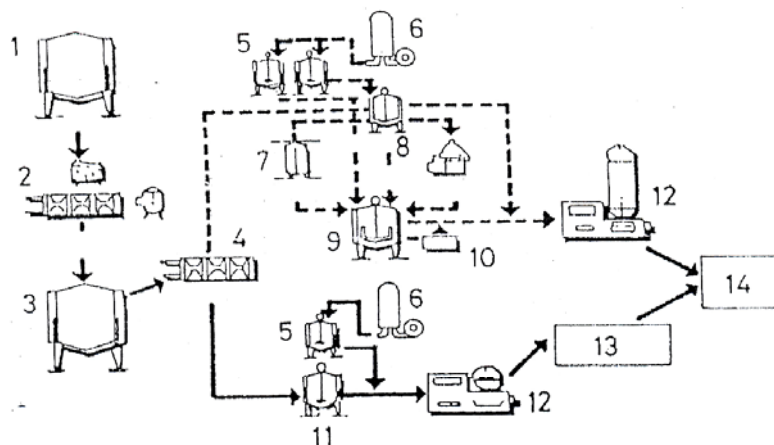
- primena membranskih tehnika koncentrisanja koja otvara nove mogućnosti u tehnologiji fermentisanih (RO 1-6 MPa, NF – 2-3 MPa, UF – 0,1-1MPa i MF – 0,01-0,05 MPa i separira čestice veće od 10 μ m);
- odvojena kultivacija omogućuje kombinovanje mikroorganizama koji zahtevaju razne uslove za razvoj npr. mezofila i termofila;
- primena sistema za automatsku kontrolu pH vrednosti do kraja fermentacije obezbeđuje proizvod ujednačenog kvaliteta;
- postavljanjem hladnjaka na vrh mašine za punjenje, postiže se veći viskozitet kod tečnih fermentisanih mlečnih proizvoda;
- proizvodnja čvrstih fermentisanih proizvoda postaje fleksibilnija primenom “in line” inokulacije i
- nadpritisk gasom pokazao se veoma efikasnim u zaštiti startera od kontaminacije drugim mikroorganizmima i bakteriofagima (Puhan i sar., 1994; Tamime i Robinson, 2004) ili

- korišćenje dodataka kao što su: obrano mleko u prahu, mlaćenica u prahu, surutka u prahu, koncentrat proteina surutke, kazein u prahu, nemlečni proteini (soje, krompira, suncokreta), stabilizatori/emulgatori i voćnih ingredijenata radi povećanja sadržaja proteina, suve materije bez masti i poboljšanja teksturalnih karakteristika i stabilnosti proizvoda (Tamime, 2006).

Ovim dostignućima, pored klasičnog - nativnog jogurta, razvijen je niz fermentisanih mlečnih proizvoda u tipu jogurta, koji poseduju i druge karakteristike. Njih je danas u svetu veliki broj i mogli bi se uslovno svrstati u nekoliko grupa:

- Dijetalni jogurti - jogurti sa smanjenom energetskom vrednošću, smanjenim sadržajem masti ili sa 0,0% masti ("non fat yoghurt"). U proizvodima ove grupe dobro se pokazala supstitucija masti biljnim uljem;
- Aromatizovani jogurt - danas se proizvodi širok asortiman jogurta modifikovanog ukusa, sa dodatkom voća, čokolade i drugih aromatičnih dodataka. Ovi proizvodi takođe mogu biti dijetalnog karaktera sa smanjenim sadržajem mlečne masti;
- Trajni jogurt – naknadni termički tretman posle fermentacije obezbeđuje produženu trajnost ovoj grupi proizvoda. Ovakav tretman uništava živu mikrofloru jogurta što je u nekim zemljama zabranjeno, a u drugim se mora deklarirati ili proizvodima dati drugi komercijalni naziv;
- Zamrznuti jogurt – posebna grupa proizvoda na bazi jogurta. Postoje dve vrste i to: meki zamrznuti jogurt i čvrsti zamrznuti jogurt (Carić, 1997; Chandan i Shandani, 1993; Tamime i Robinson, 2004).

Postupci proizvodnje savremenih vrsta fermentisanih mlečnih proizvoda dati su na slici 10 (Puhan i sar., 1994; Tamime, 2006).



- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. standardizovano mleko | 8. koncentrisana mlečna kultura |
| 2. tretman mleka | 9. inkubacija |
| 3. mleko za fermentaciju | 10. pH-kontrola |
| 4. temperiranje | 11. inokulacija |
| 5. starter kultura | 12. punjenje |
| 6. nadpritisak sa steril. vazduhom | 13. inkubacija |
| 7. specijalne kulture | 14. skladištenje 3-5°C |

Slika 10. Postupci proizvodnje savremenih vrsta fermentisanih mlečnih proizvoda (Puhan i sar., 1994; Tamime, 2006).

Navedene modifikacije u tehnološkom procesu proizvodnje fermentisanih napitka imaju značajan uticaj i na reološke karakteristike finalnog proizvoda. Poznato je da se reologija definiše kao nauka o proticanju i deformaciji materijala, i da predstavlja interdisciplinarnu nauku koja je sve više interesantna za istraživanje hrane. Brojne karakteristike namirnica su u korelaciji sa reologijom:

- senzorni kvalitet,
- razvoj novih proizvoda i reformulacija,
- kontrola kvaliteta intermedijarnih proizvoda i finalnih proizvoda,
- struktura namirnice i
- procesno inženjerstvo, oprema i procesni dizajn.

Sinerezis, konzistencija, sposobnost vezivanja vode, sposobnost proticanja, viskoelastične karakteristike senzorne karakteristike i mikrostruktura proizvoda su osnovne karakteristike jogurta koje zavise od nekoliko faktora: nativizacije suve materije, sadržaja proteina, dodataka, i parametara tehnološkog procesa (sastav starter kulture, sa ili bez sposobnosti produkcije EPS, homogenizacija i visina pritiska, konačna pH vredost, termički tretman i stepen denaturacije proteina – interakcija između κ -kazeina, β -laktoglobulina i α -laktalbumina koji poboljšavaju hidrofилna svojstva koaguluma i stabilnost jogurnog gela). Poznato je da se primenom termičkog tretmana od 137°C postiže veći viskozitet nego pri korišćenju temperature od 65 °C.

Starter kulture takođe značajno mogu da poboljšaju reološke karakteristike proizvoda. *Ropy kulture* imaju sposobnost produkcije EPS, za razliku od *non-ropy* kultura. Takođe, primena i inkorporiranje probiotika u starteru takođe može da utiče na tok fermentacije, proces formiranja gela i reološke karakteristike finalnog proizvoda.

Pored navedenih tehnoloških operacija jogurt se može proizvesti koncentrisanjem mleka primenom ultrafiltracije (UF) što utiče na molekularnu strukturu proteina, pri čemu se dobija veoma viskozan i stabilan proizvod. Takođe, UF se uspešno može primeniti u proizvodnji Labneha.

U tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda u cilju postizanja željenih reoloških karakteristika proizvoda koriste se kao dodaci sledeće komponente:

1. obrano mleko u prahu,
2. surutka u prahu,
3. koncentrat proteina surutke,
4. biljne komponente (obogaćivanje biljnim proteinima ili biljnim mastima),
5. starter kulture koje imaju sposobnost produkcije EPS,
6. enzim transglutaminaza.

Korišćenje biljnih dodataka može da predstavlja supstituciju pojedinih mlečnih komponenta.

PRIMENA TRANSGLUTAMINAZE U TEHNOLOGIJI FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

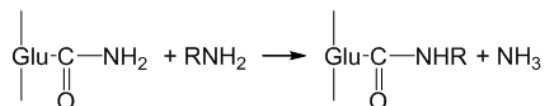
Transglutaminaza (TG, EC 2.3.2.13) je enzim koji katališe reakcije formiranja inter- i intramolekularnih veza unutar proteinskih lanaca, što otvara mogućnosti primene TG u prehrambenoj industriji.

Enzim TG katališe acil-transfer reakcije između γ -karboksiamidne grupe aminokiselinskog ostatka glutamina, kao acil-donora i primarnih amina, kao akceptora (Fox i Kelly, 2004).

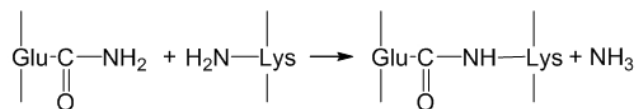
Kada je acil akceptor rezidua lizina, TG formira intra- i intermolekularne ϵ -(γ -glutamil) lizin izopeptidne veze. TG su prisutne u većini životinjskih tkiva i telesnih tečnosti, i uključene su u nekoliko bioloških procesa, kao što su zgrušavanje krvi, zarastanje rana, keratinizacija epiderma i očvršćavanje membrana eritrocita.

Na slici 11 prikazane su reakcije koje katališe transglutaminaza (Yokoyama i sar., 2004).

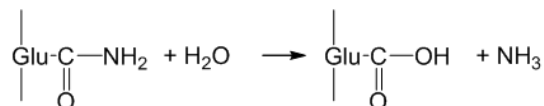
a) acil-transfer reakcija:



b) reakcija povezivanja:



c) deaminacija:



Slika 11. Reakcije koje katališe transglutaminaza (Yokoyama i sar., 2004):

a) acil-transfer reakcija; b) reakcija povezivanja; c) deaminacija.

Prednost transglutaminaze ogleda se u polimerizaciji proteinskih molekula, za razliku od većine industrijskih enzima (proteaze, amilaze) koji supstrat razgrađuju na manje komponente. Enzim transglutaminaza je široko rasprostranjen u prirodi.

Izvori transglutaminaze u prirodi su:

- jetra i krv sisara;
- riba;
- biljke;
- mikroorganizmi.

U odnosu na transglutaminaze drugog porekla, transglutaminaza mikrobiološkog porekla (MTG) dobijena pomoću sojeva *Streptovercillium*-a kao što su *S. griseocarneum*, *S. cinnamoneum* subsp. *cinnanoneum* i *S. morbaraense*, zbog nižih troškova proizvodnje može uspešno da se primenjuje u prehrambenoj industriji.

TG izolovana iz jetre sisara je zavisna od koncentracije Ca^{2+} jona, za razliku od transglutaminaze mikrobiološkog porekla čija aktivnost ne zavisi od koncentracije Ca^{2+} jona, što olakšava njenu upotrebu u proizvodnji hrane.

Kompanija "Ajinomoto" iz Japana lansirala je na svetsko tržište komercijalni preparat mikrobiološke transglutaminaze izolovane iz soja *Streptovercillium morbaraense*, (ACTIVA MP). Primarna struktura mikrobiološke TG je u vidu jednostrukog polipeptidnog lanca koji obuhvata 331 aminokiselinski ostatak, molekulske mase oko 38 000 (slika 12).



*Active center

Ala (Alanin)	A	Leu (Leucin)	L
Arg (Arginin)	R	Lys (Lizin)	K
Asn (Asparagin)	N	Met (Metionin)	M
Asp (Aspar. kis.)	D	Phe (Fenilalanin)	F
Cys (Cistein)	C	Pro (Prolin)	P
Gln (Glutamin)	Q	Ser (Serin)	S
Glu (Glut. kis.)	E	Thr (Treonin)	T
Gly (Glicin)	G	Trp (Tryptofan)	W
His (Histidin)	H	Tyr (Tirozin)	Y
Ile (Izoleucin)	I	Val (Valin)	V

Slika 12. Primarna struktura MTG ("Ajinomoto", 2003).

Aktivni centar transglutaminaze je rezidua cisteina, koji se nalazi na 64. poziciji u redosledu aminokiselina u proteinskom lancu. Inhibicija enzima moguća je dodatkom reagenasa koji modifikuju SH- grupu cisteina. Npr. oksidacija SH- grupe dovodi do inaktivacije transglutaminaze, pa je u celokupnom procesu od proizvodnje do pakovanja potrebno sprečiti i minimalan kontakt kiseonika sa proizvodom.

Specifičnost MTG prema proteinima koji su najčešće prisutni u hrani prikazana je u tabeli 6.

Primenom TG modifikuju se fizička i funkcionalna svojstva proteina kao što su: sposobnost hidratacije, stepen želiranja, reološka i emulgujuća svojstva i termička stabilnost.

Međutim, efekat polimerizacije proteina delovanjem TG zavisi od strukture makromolekula svakog proteinskog supstrata (O' Sullivan i sar., 2001).

Među proteinima mleka kazein se pokazao kao odličan supstrat, verovatno zahvaljujući niskom stepenu posedovanja tercijerne neglobularne strukture, ostavljajući reaktivne grupe slobodne i izložene dejstvu enzima (Motoki i Seguro, 1998; Tolkach i Kulozik, 2005; Bönisch i sar., 2007a).

Poslednjih nekoliko godina postoje brojna istraživanja o primeni TG u tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka (Ikura i sar., 1992; O'Sullivan i sar., 2001; Kuraishi i sar., 2001; Jaros i sar., 2006). Postoje dva načina primene TG – simultano tokom ili pre fermentacije (Færgemand i sar., 1999; Lorenzen i sar., 2002; Bönisch i sar., 2007b). Primena TG simultano zahteva dodatak TG istovremeno sa starter kulturom. Dodatak TG pre inkubacije zahteva dodatno vreme i termičku inaktivaciju i da je pH vrednost konstantna tokom procesa aktivacije. U slučaju da dođe do acidifikacije mleka enzim se može delimično inaktivirati što može da doprinese produžetku vremena fermentacije (Lorenzen i sar., 2002; Ozer i sar., 2007, Bönisch i sar., 2007c).

Tabela 6. Reaktivnost transglutaminaze prema različitim proteinima u namirnicama ('Ajinomoto', 2003)

PROTEIN	REAKTIVNOST	PROTEIN	REAKTIVNOST
Mleko		Meso	
kazein	■	mioglobin	Δ
Na- kazeinat	■	kolagen	□
α- laktoalbumin	Δ	želatin	■
β- laktoglobulin	Δ	miozin	■
Jaja		aktin	x
proteini belanca	Δ		
proteini žumanca	□	Sojino zrno	
		11S globulin	■
		7S globulin	■
■: reaguje vrlo dobro		Pšenica gliadin	□
Δ: reaguje u zavisnosti od uslova		gluten	□
□: reaguje dobro			
x: uglavnom ne reaguje			

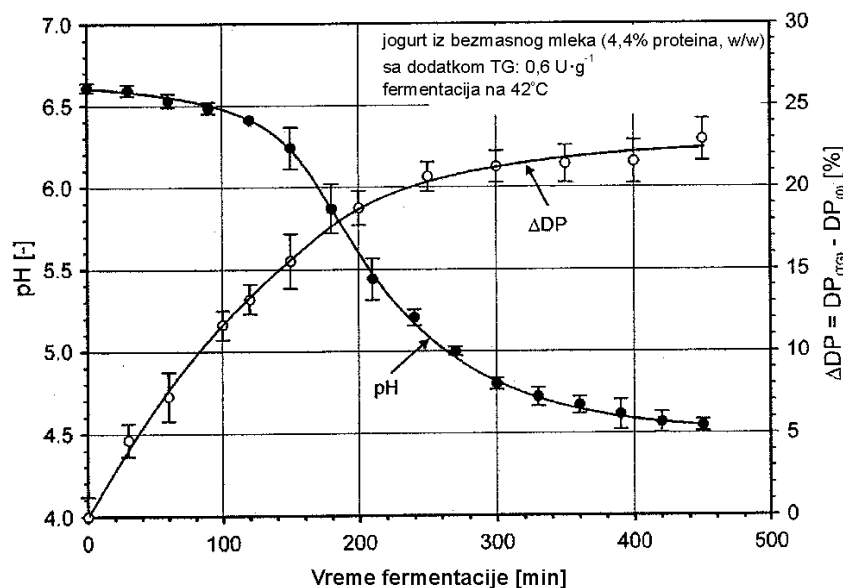
Termički tretman mleka pre procesa umrežavanja značajno poboljšava reaktivnost TG, dok temperatura aktivacije može biti od 25°C do 40°C (Lauber i sar., 2000; Lorenzen i sar. 2002; Rodriguez-Nogales, 2006; Antunes i sar., 2004). Optimalna temperatura zavisi od karakteristika sistema. Savremena istraživanja su pokazala da UHT tretman suspenzije micelnog kazeina značajno poboljšava umrežavanje u mlečnom serumu (Bönisch i sar., 2004). Takođe, Bönisch i sar. (2008) su utvrdili da se pri pH vrednostima višim od 5,7 vrši preko 80% umrežavanja proteina mleka, dok daljim sniženjem pH vrednosti mleka aktivnost TG opada.

Ispitivanjem uticaja TG na stepen polimerizacije i promenu pH vrednosti tokom fermentacije mleka u koje je simultano dodata transglutaminaza utvrđeno je da stepen polimerizacije proteina mleka raste sa povećanjem vremena skladištenja (slika 13, Bönisch i sar., 2007b).

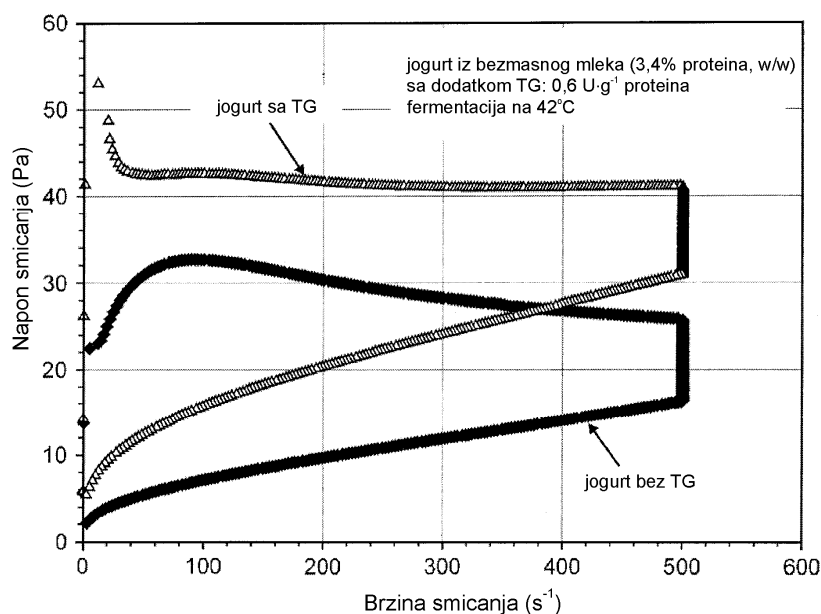
Bönisch i sar. (2007b) su takođe analizirali reološke karakteristike jogurta proizvedenog sa i bez TG. Nakon 7 dana skladištenja napon smicanja pri maksimalnoj brzini smicanja je za 68% veći kod jogurta sa TG u poređenju sa jogurtom bez TG (slika 14).

Nasuprot kazeinu, proteini surutke u nativnoj formi nisu pogodan supstrat za primenu transglutaminaze, zbog globularne konformacije stabilizovane disulfidnim vezama (Nonaka i sar., 1989; Kuraishi i sar., 2001). Iako je dodatak koncentrata proteina surutke veoma poznata operacija u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda, jer povećava sadržaj suve materije i pozitivno utiče na čvrstoću gela, neznatna je od aktivnosti enzima transglutaminaze (Lorenzen i sar., 2002). Međutim proteinski kompleks koji potiče iz surutke može da pospeši proces želiranja primenom termičkog tretmana. Tokom procesa zagrevanja proteini surutke međusobno reaguju i formiraju agregate proteina surutke (Kulozik i sar., 2003). Dodatak koncentrata proteina surutke (KPS) menja odnos kazeina i proteina surutke, odnosno utiče na veličinu formiranih čestica unutar proteinskog gela.

Kad se dodaje surutka u prahu za supstituciju delimično obranog mleka u prahu za proizvodnju jogurta postižu se bolje karakteristike i manji sinerezis u jogurtu (González-Martínez i sar, 2002). Pojedini autori su istraživali karakteristike jogurta sa različitim odnosima kazeina i proteina surutke (Puvanenthiran i sar., 2002; Bönisch i sar., 2007b) i utvrdili su da smanjenjem odnosa raste čvrstoća formiranog gela, smanjuje se sinerezis, i gel je manje viskoznan, dok je struktura finija sa pravilno raspoređenim porama u proteinskom matriksu.



Slika 13. Uticaj transglutaminaze na stepen polimerizacije proteina i proces fermentacije tokom proizvodnje tečnog jogurta iz obranog mleka uz simultani dodatak TG (Bönisch i sar., 2007b).



Slika 14. Histerezisna petlja jogurta iz obranog mleka dobijenog umrežavanjem proteina sa i bez simultanog dodatka TG tokom procesa fermentacije posle 7 dana skladištenja na 4°C (Bönisch i sar., 2007b).

Korišćenjem probiotske starter kulture ABT-4 (CHR Hansen's, Denmark) u proizvodnji jogurta iz mleka sa 0,5% i 1% mlečne masti uz dodatak TG u koncentracijama od 0,07%; 0,10% i 0,12% dobijeni su uzorci poboljšanih fizičkih karakteristika u odnosu na kontrolne, bez dodatka TG (Carić i sar., 2006).

Na osnovu rezultata brojnih istraživanja vezanih za pozitivne efekte delovanja TG na osobine proteina i kvalitet proizvoda mogućnost primene TG u tehnologiji jogurta regulisana je u zemljama EU zakonskim propisima iz 1997 godine (EC Regulation, 1997).

Na osnovu utvrđene kristalne strukture TG (Kashiwagi i sar., 2002), dobijene osnovne strukturne informacije su u saglasnosti sa do sada poznatim karakteristikama enzima. U novije vreme razvijen je metod za proizvodnju ekstracelularne mikrobiološke transglutaminaze korišćenjem *Corynebacterium glutamicum*-a. Dosadašnji rezultati istraživanja ukazuju da se može očekivati široka primena mikrobiološke transglutaminaze ne samo u prehrambenoj tehnologiji već i u drugim industrijama (Yokoyama i sar., 2004).

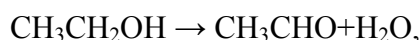
ČAJNA GLJIVA

MIKROBIOLOŠKI SASTAV I OSOBINE

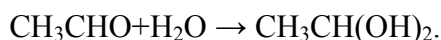
Pojam čajne gljive ili kombuhe vezuje se za plutajuću mikrobiološku zajednicu sastavljenu od bakterija sirćetne kiseline (*Acetobacter* i *Gluconobacter*) i kvasaca (*Pichia* i *Zygosaccharomyces*). Kvasci su u simbiozi čajne gljive zastupljeni u mnogo većem broju vrsta u odnosu na bakterije. U različitim kulturama čajne gljive identifikovane su različite vrste kvasaca iz rodova *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* i *Candida* (Sievers i sar., 1995).

Uloga kvasaca u navedenoj simbiozi je da enzimom invertazom (saharaze, β -fruktoosidaza) hidrolizuju saharozu u podlozi za kultivaciju čajne gljive. Potvrđeno je da invertazu neki kvasci izlučuju u podlogu, a da se kod većine ona nalazi sa spoljašnje strane ćelijske membrane. Potom je hidrolizovana saharoza dostupna bakterijama sirćetne kiseline, pošto bakterije u nedostatku odgovarajućih enzima, saharozu kao takvu ne mogu da usvoje, odnosno molekul saharoze ne mogu da transportuju u ćeliju, niti ga mogu ekstracelularno hidrolizovati. Tokom kultivacije čajne gljive ćelije kvasaca fermentativno metabolišu glukozu i fruktozu (Embden – Meyerhof Parnasov put), a nastali etanol bakterije sirćetne kiseline enzimi oksiduju u sirćetnu kiselinu. Glukoza i fruktoza se dalje metabolišu u ćelijama bakterija sirćetne kiseline u niz biološki vrednih jedinjenja. U aerobnim uslovima, kada je krajnji akceptor elektrona kiseonik, razlaganje ugljenih hidrata se odvija kao respiracija, a nastala pirogroždana kiselina preko acetyl-CoA, kao intermedijera ulazi u ciklus trikarbonskih kiselina (Krebs-ov ciklus). U anaerobnim uslovima pirogroždana kiselina se transformiše u etanol i CO₂ (Fugelsang i Edvaras, 2007). Kao što je navedeno, čajnu gljivu pored kvasaca čine i bakterije sirćetne kiseline (BSK) koje su sposobne da oksiduju različite vrste ugljenih hidrata i alkohola. Po priručniku Bergey-eva (1984) BSK su sistematizovane u dva roda: *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Osnovni kriterijum za razlikovanje rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter* je sposobnost bakterija roda *Acetobacter* da oksiduju acetat ili laktat do ugljendioksida i vode. Izvesno je da taksonomija BSK još uvek nije u potpunosti utvrđena.

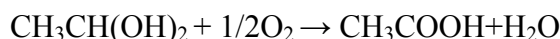
Tipična fiziološka karakteristika bakterija sirćetne kiseline je sposobnost enzimske oksidacije etanola u sirćetnu kiselinu. Navedeni proces se odvija u dve faze: u prvoj fazi sirćetne fermentacije odvija se oksidacija etanola u acetaldehid u prisustvu enzima etanol dehidrogenaze:



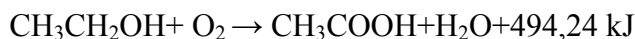
da bi zatim iz acetaldehida nastao hidrat acetaldehida:



Dehidrogenacijom hidratisanog acetaldehida u prisustvu acetaldehid dehidrogenaze nastaje sirćetna kiselina:



Kod većine BSK aktiviranje vodonika obavljaju dehidrogenaze zavisne od koenzima NAD^+ i NADP^+ . Do konačne oksidacije (NADH i NADPH) dolazi gotovo uvek pomoću citrohrom sistema respiratornog lanca, pri čemu po molu sirćetne kiseline nastaje šest molova ATP-a. Zbirna jednačina oksidacije etanola bakterijama sirćetne kiseline ima sledeći oblik:



Ovaj proces je najupečatljiviji primer tzv. delimične oksidacije ugljenih hidrata tokom koje se u fermentisanoj tečnosti nagomilavaju nepotpuno oksidovana organska jedinjenja. Pojava nepotpune oksidacije je u direktnoj vezi sa visokom koncentracijom ugljenih hidrata koja je na raspolaganju ćelijama mikroorganizama (Rouz, 1975).

Da bi oksidacija etanola tekla optimalno sojevi bakterija sirćetne kiseline zahtevaju dovoljne količine kiseonika u podlozi. Pored kiseonika, za optimalan rast *Acetobacter* vrsta neophodno je prisustvo sirćetne kiseline i etanola. Ukoliko je sadržaj etanola u podlozi manji od 0,2% (w/w) broj odumrlih ćelija raste. BSK su veoma otporne prema kiselinama, tako da rastu i pri $\text{pH}=4,5$. Pretpostavlja se da je ćelijska membrana bogata zasićenim masnim kiselinama, što je čini relativno nepropusnom za sirćetnu kiselinu (Entani i sar., 1985).

BSK mogu kao izvore ugljenika i energije da koriste veći broj organskih jedinjenja: ugljene hidrate (manji broj sojeva BSK usvaja saharozu, rafinozu i dekstrin), primarne i sekundarne alkohole (etanol, n-propanol, D-manitol, ali ne i metanol), organske kiseline i poliol (De Ley i sar., 1984; Cvetković, 2008).

Glukoza se u ćelijama BSK uglavnom razgrađuje glikolizom, ali se pored toga jedan deo na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, ili unutar ćelije enzimi oksiduje u glukonsku kiselinu.

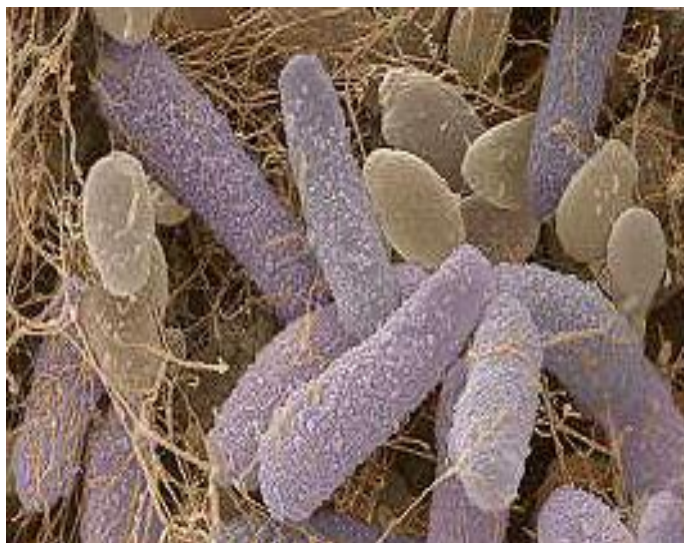
Bakterije roda *Acetobacter* sposobne su da potpuno oksiduju acetat ciklusom trikarbonskih kiselina, do čega dolazi nakon što je utrošen celokupan etanol iz sredine. U prisustvu etanola, a putem inhibicije enzima, onemogućena je dalja oksidacija sirćetne kiseline. Pored toga, sirćetna kiselina pri višim koncentracijama, odnosno $\text{pH}>3$ inhibira sopstvenu oksidaciju (Divies i Cachon, 1998). Za razliku od roda *Acetobacter*, vrste roda *Gluconobacter* su striktni aerobi, nemaju kompletiran ciklus trikarbonskih kiselina jer nedostaju enzimi α -ketoglutarat dehidrogenaza i sukcinat dehidrogenaza. Ovo je razlog da bakterije roda *Gluconobacter* ne mogu u potpunosti da oksiduju acetat, odnosno posledica je stehiometrijska oksidacija etanola u sirćetnu kiselinu.

Specifična karakteristika BSK je sposobnost sinteze ekstracelularnih polisaharida. Sintaza celuloze je dokazana za *Acetobacter oxydans*, dok drugi sojevi stimulišu levane i dekstane.

Celulozna navlaka koju stvara *Acetobacter xylinum* tokom kultivacije čajne gljive je debela, kožasta, laminarne strukture, sa dijametrom fibrila od oko 25 nm. Ustanovljeno je da količina ugljenika u podlozi za kultivaciju direktno utiče na sintezu celuloze tokom kombuha fermentacije.

Celuloza u vidu pelikule formirana po površini tečnosti za kultivaciju (slika 15), održava CO_2 nastao fermentativnom aktivnošću kvasaca (Divies i Cachon, 1998). Mikroskopskom analizom celulozne pelikule utvrđeno je da se po površini nalazi veliki broj štapićastih bakterija, koje kao striktni aerobi zauzimaju položaj prema atmosferskom kiseoniku, dok se sa donje strane pelikule mogu videti nakupine ćelija kvasaca (slika 15) (Greenwalt i sar., 2000). Po nekim podacima, u mikrobim populacijama čajne gljive mogu se naći i bakterije mlečne kiseline rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Steels i sar., 2002). Prisustvo ovih bakterija je

od posebne važnosti zbog stimulativnog delovanja mlečne kiseline na crevne populacije mikroorganizama i organizam konzumenta.



Slika 15. Mikroskopski prikaz ćelija kvasaca i bakterija sirćetne kiseline u celuloznoj pelikuli kombuhe (Greenwalt i sar., 2000).

Kvasci se u čajnoj gljivi nalaze uključeni u skramu koju stvara *Bacterium xylinum*, a delom se nalaze kao talog u kultivacionoj tečnosti. To su kvasci koji obavljaju biosintezu alkohola, zatim kvasci koji oksidišu alkohol i organske kiseline, kao i kvasci koji obavljaju inverziju šećera šećerne trske, i vrste koje nemaju sposobnost delovanja na ovaj šećer. Kvasci dakle ne učestvuju u znatnoj meri u formiranju kiselina, ali su rezistentni na velike koncentracije kiselina.

Pored poželjnih mikroorganizama, u čajnoj gljivi je utvrđeno prisustvo nekih mikroorganizama koji su štetni jer gljivu prekrivaju zasebnom skramom ili izazivaju loš ukus tečnosti. Kao nepoželjni mikroorganizmi javljaju se plesni, vinski kvasci i strane bakterije sirćetne kiseline, npr. *Bacterum ascendens*.

KULTIVACIJA I HEMIJSKI SASTAV

Uobičajeni supstrat za gajenje čajne gljive je crni čaj (izvor azota i mineralnih materija), zaslađen saharozom (veoma dobar izvor ugljenika) u koncentraciji od 5 do 8% (Petrović i Lončar., 1996; Greenwelt, 2000; Malbaša i sar., 2008). Sudovi za kultivaciju treba da su od stakla ili porcelana. Kultivacija čajne gljive se odvija na temperaturi od 25°C do 30°C u aerobnim uslovima, zbog čega se koriste sudovi sa širokim otvorom, jer je potrebno obezbediti potpuniji aktivni kontakt sa kiseonikom. Sudovi se pokrivaju gazom radi zaštite od prašine i sirćetnih mušica koje se nakupljaju na svakoj tečnosti u kojoj ima sirćeta.

Kultivacija čajne gljive je moguća i na crnom čaju zaslađenom glukozom, fruktozom ili laktozom (Reiss, 1994).

Kada je kao supstrat korišćen crni čaj zaslađen sa 30-100 gL⁻¹ laktoze ustanovljeno je da:

1. Sadržaj laktoze nema veliki uticaj na količinu proizvedenog etanola, maksimum se dostiže nakon 6 dana fermentacije (0,35 - 0,40 gL⁻¹). Produženje inkubacije rezultira uglavnom brzim opadanjem količine etanola.

2. Transformacijom laktoze pod dejstvom čajne gljive nastaju minimalne količine mlečne kiseline u odnosu na druge ispitane šećere.
3. pH vrednost tokom inkubacije opada od početne prosečne vrednosti 6,1 na prosečnu vrednost 4,8 nakon 17 dana. Između različitih koncentracija dodatog šećera i krajnje pH vrednosti nije konstatovana bilo kakva veza.

Simbioza kvasaca i plesni je sposobna da, u inkubacionom periodu od 7 do 10 dana, transformiše veoma jednostavan supstrat, pod aerobnim uslovima, u blago gazirani, nakiseo osvežavajući napitak koji sadrži šećere, glukonsku, glukuronsku, L-mlečnu, sirćetnu, jabučnu, vinsku, limunsku i oksalnu kiselinu, etanol, 14 aminokiselina, u vodi rastvorne vitamine, anti-biotski aktivne materije, neke hidrolitičke enzime i dr. (Konovalov i Semenova, 1955; Dani-elova, 1954; Petrović i Lončar, 1996; Reiss, 1994).

Pored navedenih parametara na hemijski sastav napitka čajne gljive utiče poreklo i sastav kulture, uslovi kultivacije i čuvanja i metode analiziranja. Cvetković (2008) je utvrdio da je broj ćelija kvasca izolovanih iz autohtone čajne gljive (kao starter kulture) u podlozi za kultivaciju od 10^5 ćelija/mL dovoljan za uspešnu fermentaciju zaslađenog čaja. Međutim navedeni broj BSK je nedovoljan za efikasnu transformaciju podloge u napitak. Minimalan broj bakterijskih ćelija u podlozi za uspešnu kombuha fermentaciju je 10^6 ćelija/mL.

Sadržaj saharoze ($5-10 \text{ gL}^{-1}$) i crnog čaja ($3-4 \text{ gL}^{-1}$) nije odlučujući za efikasnu fermentaciju zaslađenog čaja, već su značajnije fiziološke karakteristike inokuluma čajne gljive i inicijalni broj ćelija kvasaca i bakterija sirćetne kiseline u podlozi za kultivaciju. Međutim, porast zapremine supstrata u reaktoru za kultivaciju čajne gljive, tj. smanjenje faktora Vsuda/Vpodloge doprinosi smanjenju količine sintetisanih kiselina i produžetku procesa fermentacije, što je najverovatnije rezultat smanjenja rastvorljivog kiseonika po jedinici zapremine, kao jednog od limitirajućih faktora kombuha fermentacije (Cvetković i sar., 2008). Značajan uticaj na produkte metabolizma ima vrsta i odnos mikroorganizama prisutnih u napitku čajne gljive. Uticaj sloja tečnosti na sadržaj pojedinih komponenata u napitku prikazan je u tabeli 7 (Cvetković, 2008).

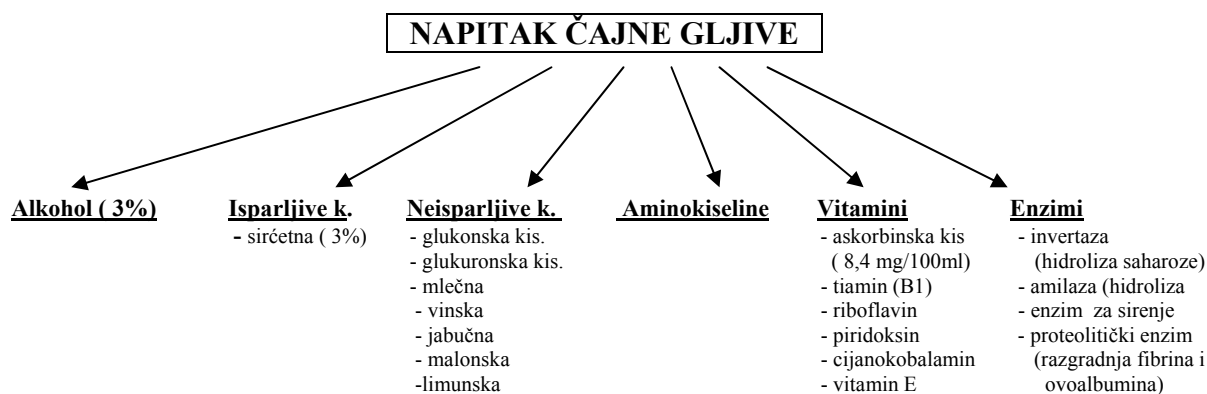
Tabela 7. Hemijski sastav napitka od čajne gljive (gL^{-1}) (Cvetković, 2008)

Uzorak	Saharoza	D-glukoza	D-fruktoza	Sirćetna kiselina	D-glukonska kiselina	Etanol
Gornji sloj	0,7987	16,6684	14,4315	3,6587	0,3501	10,1151
Srednji sloj	0,8183	16,7548	14,6053	3,5943	0,3406	12,1279
Donji sloj	0,8206	17,9283	14,5526	3,6192	0,3292	10,6134
S	0,8161	17,1866	14,6053	3,6314	0,3122	10,9646

S – nativizovana čajna gljiva.

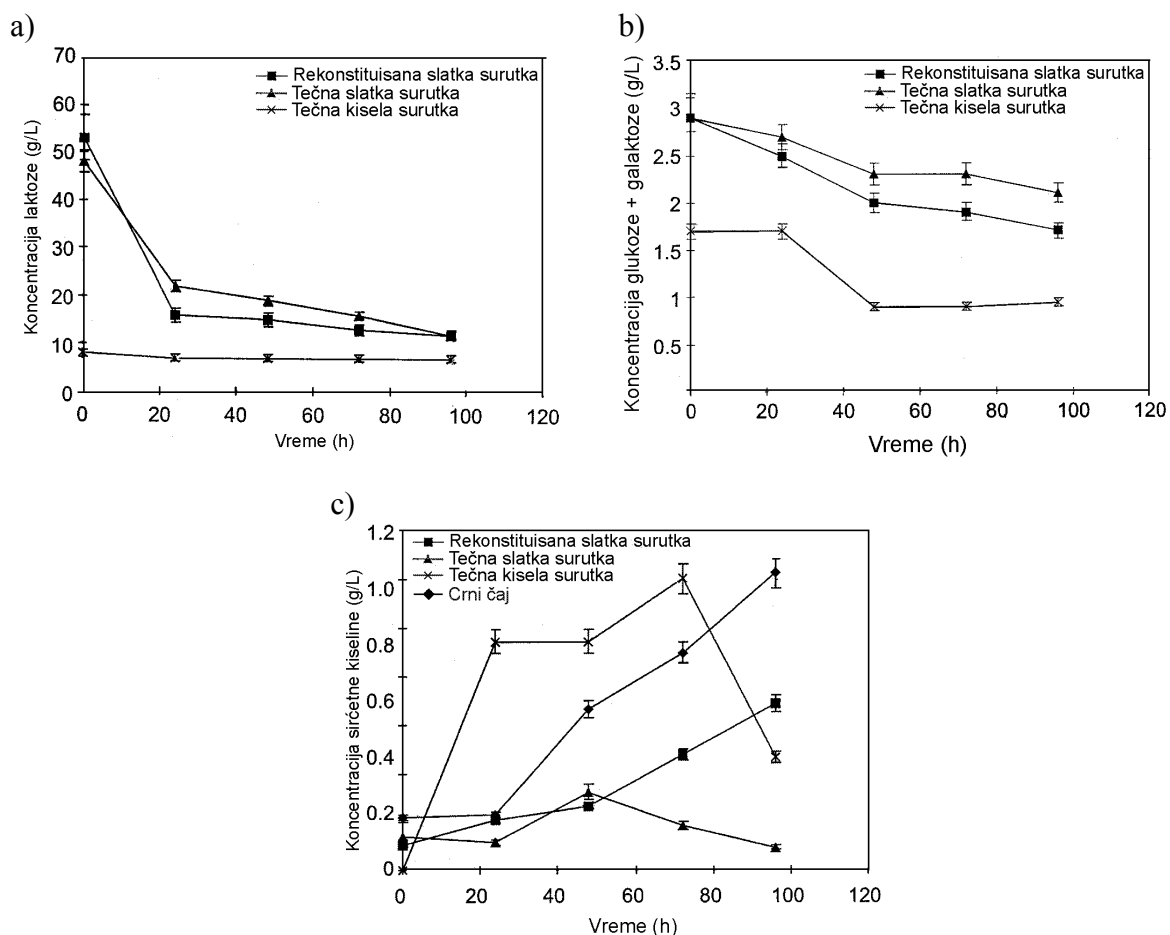
Pregled dosadašnjeg ispitivanja sastava napitka od čajne gljive prikazan je na slici 16. Čajna gljiva može se kultivirati i na drugim supstratima kao što su crno pivo, koka kola, vino (crno, belo), ekstrakt topinambura, ehinacea, menta, rtanjski čaj, laktoza, surutka i dr. (Reiss, 1994; Malbaša, 2009).

U dosadašnjim ispitivanjima različitih autora utvrđeno je da simbioza bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u fermentisanom napitku složenim biohemijskim transformacijama izaziva fermentaciju šećera i produkuje primarne metabolite: galaktozu, fruktozu, glukozu, sirćetnu kiselinu, mlečnu kiselinu, glukonsku kiselinu, glukuronsku kiselinu, glicerol, pojedine vitamine iz grupe B kompleksa i vitamin C, katehin i malu količinu etanola.



Slika 16. Produkti metabolizma čajne gljive (Malbaša, 2004)

Prema navodima mnogih autora, sadržaj etanola u čajnom napitku, ne prelazi 0,5% i ubraja se u grupu osvežavajućih bezalkoholnih napitaka (slika 16). Obzirom na veliki broj detektovanih nutritivno vrednih metabolita čajne gljive, značajan broj autora je dokazao antioksidativna svojstva i antimikrobno delovanje kombuha napitka, kao i širok spektar profilaktičkih i terapijskih efekata na humani organizam (Malbaša, 2009).



Slika 17. Metabolička aktivnost čajne gljive tokom fermentacije crnog čaja, tečne slatke surutke, slatke rekonstituisane surutke i tečne kisele surutke i promena sadržaja: a) laktoze b) glukoze + galaktoze i c) sirćetne kiseline (Bellosio-Morales i Hernandez-Sanches, 2003).

Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku do sada nije bila predmet naučnih istraživanja, osim preliminarnih istraživanja autora Lončar i sar., (2001), Milanović i sar., (2002) koji su proizveli fermentisane mlečne napitke dodatkom različitih koncentracija inokuluma čajne gljive kultivisane na različitim supstratima: crni čaj, zeleni čaj i topinambur. Bellosso-Morales i Hernandez-Sanches (2003) publikovali su rezultate ispitivanja primene kombuhe u proizvodnji fermentisanog mlečnog napitka od surutke. Napici dobijeni fermentacijom slatke, kisele i rekonstituisane surutke u prahu dodatkom inokuluma čajne gljive sadržali su etanol, mlečnu i sirćetnu kiselinu. Takođe, Bellosso-Morales je analizirao promene navedenih komponenata tokom 100 sati fermentacije (slika 17). Sadržaj laktoze u rekonstituisanoj slatkoj suruci i svežoj slatkoj suruci maksimalno opadne tokom prvih 20 sati fermentacije, dok se u kiseloj suruci neznatno menja i niži je od 10gL^{-1} . Sadržaj glukoze i galaktoze zbirno u svežoj i rekonstituisanoj slatkoj suruci opadne za 100% opadne tokom 100 sati fermentacije. U navedenim uzorcima sadržaj mlečne i sirćetne kiseline raste tokom fermentacije.

Jaziri i sar. (2009) ispitivali su uticaj dodatka crnog i zelenog čaja na aktivnost jogurtne starter kulture. Utvrđeno je da dodatak čaja u proizvodnji jogurta ne inhibira aktivnost bakterija mlečne kiseline, već značajno poboljšava antimikrobna i antioksidativna svojstva, i nutritivnu vrednost funkcionalnog mlečnog napitka usled prisustva fenolnih komponenata: epigalokatehina, katehina i galokatehingalata.

ZDRAVSTVENI EFEKTI ČAJNE GLJIVE

Zahvaljujući sadržaju nutritivno viskovrednih komponenata konzumiranjem kombuha napitka postižu se značajna profilaktička i terapijska svojstva. Farmakološki efekti kombuhe interesantni su za istraživanje sa naučnog i praktičnog aspekta. Prva naučna istraživanja lekovitih svojstava kombuhe urađena su u Rusiji početkom prošlog veka po kojima napitak pomaže kod glavobolja, gastričnih oboljenja i regulisanja intestinalne aktivnosti (Sievers i sar., 1995). Nekoliko medicinskih studija je potvrdilo antibiotska svojstva kombuhe, sposobnost regulacije gastro-intestinalne i glandularne aktivnosti, olakšavanja tegoba osobama obolelim od artritisa i hemoroida, kao i pozitivno delovanje na nivo holesterola u krvi i arteriosklerozu. Neke od studija su potvrdile i detoksikaciona svojstva čajne gljive, takođe ima blagotvorno delovanje na nervni sistem i usporavanje procesa starenja (Allen, 1998). Centar za onkološka istraživanja iz Moskve i Ruska akademija nauka su 1951. godine objavili rezultate obimnog istraživanja koji potvrđuju da dnevno konzumiranje kombuhe obezbeđuje visoku rezistenciju na kancer, što je posledica detoksikacije organizma i jačanja imunog sistema. Većina terapijskih efekata kombuhe se objašnjava antioksidativnom aktivnošću i organskim kiselinama prisutnim u napitku – pre svih glukuronskom kiselinom. Glukuronska kiselina je poznati detoksikacioni agens jer je sposobna da veže molekule toksina i da obezbedi ekskreciju iz organizma. S druge strane, bolesti kao što su kostobolja, reumatizam, artritis i kamen u bubregu nastaju kao posledica akumulacije toksina u organizmu. I pored činjenice da se mlečna kiselina u napitku nalazi u relativno malim količinama, njeno prisustvo je od velike važnosti za terapijske efekte kombuhe. L-mlečna kiselina je veoma važna za prevenciju kancera. L-mlečna kiselina potpomaže cirkulaciju krvi, sprečava truljenje u crevima i konstipaciju, podstičući rad creva. Utiče na kiselobaznu ravnotežu i podržava dejstvo vitamina C u organizmu, čime je ojačana prirodna rezistencija na infekcije. Takođe podstiče funkciju pankreasa što stimuliše sekreciju svih digestivnih organa. Celulozna masa koja se sintetiše tokom kultivacije čajne gljive primenjuje se za tretman opekotina i povrede kože (Malbaša, 2009).

NUTRITIVNA VREDNOST I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

Nutritivna vrednost fermentisanih mlečnih proizvoda sastoji se, kao i kod mleka, u osnovnim sastojcima potrebnim ljudskom organizmu za rast, reprodukciju, održavanje, obnavljanje i zadovoljenje energetske potrebe. Fermentisani mlečni proizvodi sadrže, kao i mleko, laktozu, mlečnu kiselinu, proteine, mast, mineralne materije i vitamine (tabela 8 i 9). Fermentacijom pomoću mikroorganizama, dolazi do promene nekih sastojaka mleka i stvaranja novih, tako da fermentisani proizvodi dobijaju nove karakteristike u odnosu na mleko (Milanović, 1997).

Jogurtna kultura proizvodi enzim β -galaktozidazu (laktazu), kao i druge enzime, što omogućava bolju apsorpciju laktoze za osobe čiji organizam ne proizvodi laktozu ("lactose intolerant"). Laktaza razlaže laktozu na sastavne delove – glukozu i galaktozu, koji se lakše usvajaju. Enzimi bakterija mlečne kiseline omogućavaju bolju apsorpciju kazeina. Pored fermentacione uloge, starter kultura, tzv. "friendly bacterial cultures", pospešuje varenje i deluje terapijski na digestivni trakt usled čega je jogurt svarljiviji nego mleko. Većina ljudi koji ne mogu da konzumiraju mleko zbog alergije na proteine ili laktozu, konzumiraju jogurt i na taj način obezbeđuju ravnotežu mikroflore u intestinalnom traktu.

Sadržaj mlečne kiseline u jogurtu, nastale transformacijom laktoze iznosi 0,85-0,95% u blago kiselom jogurtu, odnosno 0,95-1,2% u jogurtu izražene kiselosti. Aminokiselinski sastav jogurta se ne razlikuje značajno u odnosu na mleko. *Str. thermophilus* pokazuje slabu proteolitičku aktivnost, dok proteolitički enzimi *Lb. bulgaricus* izrazitije hidrolizuju proteine, pri čemu se oslobađaju niskomolekularni peptidi i aminokiseline. Tako npr. koncentracija prolina u jogurtu se povećava i iznosi od 300-500 mgkg⁻¹. Nasuprot tome, sadržaj uree opada u jogurtu za oko 10% od inicijalne vrednosti u mleku, zbog aktivnosti *Str. thermophilus* koji za svoj metabolizam koristi neke aminokiseline (Renner, 1983). Generalno posmatrano, proteolitička aktivnost starter kulture u jogurtu zavisi od brojnih faktora: vrste mikroorganizama, temperature, pH i perioda skladištenja jogurta.

Tabela 8. Hemijski sastav i energetska vrednost mleka i jogurta (Tamime i Robinson, 2004).

Sastojak jedinica/100g	Mleko	Jogurt		
		punomasni	sa niskim sadržajem masti	voćni
Proteini (g)	3,5	3,9	4,5	5,0
Mast (g)	4,25	3,4	1,6	1,25
Ugljeni hidrati (g)	4,75	4,9	6,5	18,6
Ca (mg)	119	1,45	150	176
P (mg)	94	114	118	153
Na (mg)	50	47	51	-
K (mg)	152	186	192	544
Energetska vrednost (kcal/100 g)	67,5	72	64	98

Proces fermentacije neznatno utiče na promenu sadržaja mineralnih materija u jogurtu u odnosu na nativno mleko (tabela 9).

Koncentracija liposolubilnih vitamina u direktnoj je vezi sa sadržajem masti u produktu. Nivo tiamina, riboflavina, nikotinske kiseline, pantotenske kiseline i biotina je isti ili veći u jogurtu nego u polaznom mleku. Koncentracija folne kiseline povećana je u jogurtu skoro 100%, ali je sadržaj vitamina B₁₂ niži nego u mleku. Povećanje sadržaja folne kiseline kao i

holina, posledica je njihove sinteze od strane starter kulture, posebno streptokoka. Gubitak vitamina B₁₂ u jogurtu i drugim fermentisanim proizvodima može se redukovati korišćenjem bakterija iz roda *Leuconostoc* ili *Propionibacterium shermani* (tabela 9).

Tabela 9. Sadržaj vitamina i minerala u različitim fermentisanim mlečnim proizvodima (Renner i sar., 1989)

Komponenta	Vrsta proizvoda			
	Jogurt	UHT jogurt	Jogurt za specijalne namene	Fermentisana mlečenica
<i>Vitamini (µg/100g)</i>				
Vitamin A	29/8 ^b	-	-	-
Karoten	21/23 ^b	-	-	-
Vitamin D	0,07/0,03 ^b	-	-	-
Vitamin E	50/130	-	-	-
Vitamin C	690-860	0	580	1500
Tiamin	40-69	25	39	30
Riboflavin	190-270	159	199	180
Vitamin B ₆	68-100	47	45	48
Vitamin B ₁₂	0,17-0,22	0,17	0,14	0,1
Nikotinska kis.	120-190	85	92	102
Pantotenska kis.	300-460	195	251	320
Biotin	2-2,9	0,9	1,4	2,1
Folna kiselina	10-19	12	11	8,7
<i>Mineralne materije (µg/100g)</i>				
Ca	131-200	106	138	125
Mg	14-22	11	14	14
Na	70-91	51	71	66
K	161-276	123	140	145
P	101-165	83	107	96
Fe	0,09	-	0,12	0,02
Zn	0,6	-	0,43	0,37
Cu	<0,01	-	<0,01	<0,01

Profilaktična i terapijska svojstva jogurta poznata su od davnina, zahvaljujući pre svega dobroj svarljivosti i lekovitim osobinama. Mnogi naučnici su dokazali da fermentisana mleka pomažu u lečenju, dijetoterapiji i profilaksi mnogih bolesti. Antibakterijsko dejstvo jogurta se pripisuje nedisosovanoj mlečnoj kiselini prema: *Salmonella enteritidis*, *E.coli* i *Yersinia enterocolitica*. U novije vreme ustanovljeno je prisustvo 22 antibakterijske supstance, nastale kao produkt metabolizma raznih vrsta kiselomlečnih organizama (Chandan i Shandani, 1993).

Fermentisanom mleku mogu se dodati različite supstance u cilju poboljšanja konzistencije, biološke vrednosti, ukusa, mirisa, izgleda, i dr. Starteri, stabilizatori, vitamini, soli, zaslađivači i aromatični dodaci po međunarodnoj klasifikaciji (FAO-WHO), pripadaju aditivima.

Jedan od najizraženijih trendova kada su u pitanju fermentisana mleka jeste nagla ekspanzija takozvanih „pogodnih“ proizvoda koji mogu da predstavljaju ceo obrok, a odlikuju se lakoćom rukovanja pri čemu se štedi energija i vreme. Ovde spadaju brojne "drink" forme jogurta u plastičnim bočicama, proizvodi u automatima i "drive in" restoranima, koji su u velikoj meri sastavni deo dnevne ishrane je ono što karakteriše tržište fermentisanih napitaka jeste velika segmentacija. Naime, mlekare sada prave proizvode koji su namenjeni ciljanim grupama potrošača kao što su deca, tinejdžeri, odrasli, starije osobe pa čak i striktno namenjene ženskoj populaciji. Tako npr. fermentisani proizvodi namenjeni deci su u originalnim

atraktivnim pakovanjima, koja često promovišu neku dečiju igricu, ne sadrže veštačke ingredijente, a mogu sadržati multivitamine, minerale, probiotike, žitarice itd. (Gregurek i Tonković, 2008; Obradović, 2008).

Novi proizvodi u prehrambenoj industriji koncipiraju se sa visoko postavljenim zahtevima o očuvanju i unapređenju zdravlja. Poslednje godine obeležene su konceptom "funkcionalne hrane". Proizvod se smatra funkcionalnom hranom, ako pored nutritivne vrednosti sadrži komponente koje pozitivno deluju na zdravstveno, fizičko i psihičko stanje humanog organizma. Funkcionalna hrana je stoga pozicionirana iznad tradicionalne hrane. Funkcionalna hrana je zakonski za sada prihvaćena jedino u Japanu, gde je nazivaju FOSHU (Food for Specific Health Use).

Među najznačajnije primere funkcionalne hrane sigurno spadaju fermentisani mlečni proizvodi koji sadrže probiotske bakterije i prebiotike. Fermentisano mleko sadrži brojne mikronutritivne komponente, koji mogu individualno ili u kombinaciji da utiču na održavanje ili čak poboljšanje zdravlja čoveka (Milanović, 1997; Tamime, 2006).

Postojanje bakterija sa ulogom u ljudskom zdravlju izučavao je ruski biolog i nobelovac Mečnikov (Metchnikoff) koji je početkom XX veka u pariskom institutu "Luis Pasteur" počeo proučavati zašto u Bugarskoj ima najviše ljudi koji dožive duboku starost. Zapazio je da u svakodnevnoj ishrani poljoprivrednog stanovništva prevladava tzv. kiselo mleko. Kroz svoja istraživanja Mečnikov je primetio da mikroflora bugarskog kiselog mleka suzbija patogene bakterije, koje u organizmu proizvode štetne materije kao što su skatol, indol, fenol. Takođe je primetio da bakterije (roda *Lactobacillus*) iz ispitivanog jogurta stvaraju neke antibiotike koji deluju na patogene bakterije. Za svoj rad je dobio Nobelovu nagradu a navedena ispitivanja doprinela su popularizaciji jogurta u svetu. Od tada su se mnogi instituti bavili izučavanjem mikroflore jogurta. Takođe na Pasterovom Institutu, Henry Tissier je prvi izolovao probiotske bifidobakterije u periodu 1899 – 1900.

Ogroman napredak u savremenom razvoju tehnologije fermentisanih mlečnih napitaka postignut je lansiranjem nove vrste proizvoda za specijalne namene, inkorporiranjem probiotskih mikroorganizama u sartere za fermentaciju ili u već fermentisano mleko (Milanović, 1997). U proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka sa probiotskim mikroorganizama (tzv. proizvodi „treće generacije“) najčešće se koriste iz roda *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Ove bakterije vode poreklo iz intestinalnog trakta čoveka. Za uspešno probiotsko delovanje potrebne su tačno određene vrste tih rodova koje imaju dokazano terapeutsko delovanje. Laktobacili i bifidobakterije su ekstremno retki uzročnici infekcija ljudi, stoga se probiotski proizvodi baziraju na bakterijama tih rodova.

Najčešće korišćeni funkcionalni ingredijenti u mlečnim proizvodima su probiotske starter kulture. Probiotici su selekcionirani mikroorganizmi iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, izolovani iz intestinalne mikroflore čoveka i imaju širok spektar profilaktičkih i terapeutskih svojstava. Mehanizam i način kojim intestinalne bakterije doprinose zdravlju ljudi posledica su složenosti gastrointestinalnog sistema svakog pojedinca, varijacije sojeva, sposobnosti probiotika da se adsorbuje na crevni epitel domaćina. Pored zdravstvenih efekata, aktivnost probiotika zavisi od vrste proizvoda – tehnološki značaj. Funkcionalne karakteristike zavise od: soja, sastava supstrata, načina dobijanja (proizvodnje), stabilnosti, prisustva prebiotika, tipa fermentacije, tehnike sušenja, vijabilnosti mikroorganizama. Aktivnost probiotika zavisi od pH supstrata, sastava supstrata, redoks potencijala, O₂, itd. Na osnovu dosadašnjih istraživanja našli su primenu u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka, svežih sireva, kao i sireva sa zrenjem, sladoleda i mlečnih dezerata. Međutim, poznato je da se bolja vijabilnost postiže u proizvodima sa višom pH vrednosti kao što su određene grupe sireva, nego u fermentisanim proizvodima.

U tehnologiji mleka i mlečnih proizvoda pored probiotika često se dodaju prebiotici. Prebiotici su nesvarljivi sastojci hrane koji u neizmenjenom obliku dospevaju u debelo crevo,

gde stimulišu određene grupe mikroorganizama čime se postižu povoljni efekti na zdravlje konzumenta. Kao ingredijenti hrane koji u neizmenjenom obliku dospevaju u debelo crevo sigurno doprinose poboljšanju karakteristika proizvoda.

Aktuelan trend u tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka je korišćenje funkcionalnih dodataka: omega-3-masne kiseline. U brojnim radovima je dokumentovano višestruko korisno delovanje grupe jedinjenja koja su našla primenu i u proizvodnji mleka gde se dodaju u obliku emulzije masnih kiselina iz ribljeg ulja. Pozitivni efekti na zdravlje su sniženje LDL holesterola, šećerna bolest, astma i gojaznost.

Biljni steroli/fitosteroli potiču iz žitarica, voća, povrća i biljnih ulja, nesvarljivi su za ljudski organizam i koriste se kao funkcionalni dodaci. Osnovne namirnice za obogaćivanje su biljna ulja i margarin, ali i mleko, fermentisani mlečni proizvodi i sirevi, obzirom da navedeni ingredijenti imaju veliki potencijal kao suplementi u industriji hrane.

U pojedinim evropskim zemljama proizvode se fermentisani mlečni napici sa dodatkom bioaktivnih peptida koji snižavaju krvni pritisak i snižavaju LDL holesterol.

Generalno posmatrano, korišćenje funkcionalnih ingredijenata u tehnologiji mleka i mlečnih proizvoda nesumnjivo poboljšava nutritivnu vrednost proizvoda i zdravstvene efekte kod populacije. Međutim, značajan napredak se postiže i sa tehnološkog aspekata jer dodatak najčešće korišćenih funkcionalnih dodataka u industriji mleka probiotika i prebiotika utiče na tehnološki proces, ali i na kvalitet, trajnost i stabilnost funkcionalnog mlečnog proizvoda. Imajući u vidu da su funkcionalni mlečni proizvodi nutritivno i energetski izbalansirani, imaju širok spektar profilaktičkih i terapijskih svojstava namenjenih posebnim grupama potrošača, dalji razvoj tehnologije ove grupe proizvoda je opravdan sa ekonomskog, tehnološkog i nutritivnog aspekta.

Zbog sve većeg interesovanja potrošača za zdravom hranom i višeg nivoa znanja potrošača na području ishrane, menja se i marketinško pozicioniranje prehrambenih proizvoda, kod kojih se naglašava unapređenje zdravlja i uključivanje funkcionalnih ingredijenata u ishrani. Najvažniji faktori koji utiču na zdravlje su ishrana, fizička aktivnost i genetika. Istraživanja su pokazala da potrošači pridaju ishrani veću važnost nego ostalim faktorima. Zaista se čini da je funkcionalna hrana, hrana budućnosti, a time se otvara nov izazov u industriji mleka (Hilliam, 1998).

MATERIJAL I METODE RADA

MATERIJAL

MLEKO

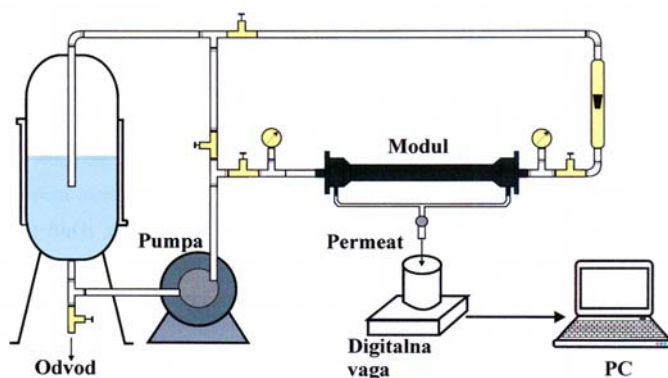
Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 0,1%, 0,9% i 2,2% mlečne masti (proizvođača AD IMLEK ogranak „Novosadska mlekar“ Novi Sad), hemijskog i mikrobiološkog sastava u skladu sa Pravilnikom o kvalitetu mleka (Sl. list SRJ, 26/2002).

STARTER KULTURE

Inokulum čajne gljive

Čajna gljiva je kultivisana na crnom čaju (1,5 g/L) sa saharozom koncentracije 70 g/L. U čaj ohlađen na sobnu temperaturu dodato je 10% inokuluma iz prethodne fermentacije. Inkubacija je vršena na temperaturi 29,5 °C, 7 dana. Za inokulaciju u mleko korišćen je:

- 1) inokulum čajne gljive (I);
- 2) inokulum čajne gljive koncentrisan membranskom filtracijom (MFI) – stepen koncentrisanja 2,3, korišćenjem aparature koja sadrži modul sa keramičkom membranom (200 nm) u obliku cevi i pri parametrima procesa (temperatura 25°C, nadpritisak na ulazu i izlazu modula 40 kPa i protoku 5 L/min) (slika 18) i
- 3) inokulum čajne gljive koncentrisan uparavanjem (UPI). Koncentrisanje inokuluma čajne gljive (suve materije 6,5%) vršeno je pod vakuumom na temperaturi 40°C, 10 puta do suve materije 68%.



Slika 18. Šematski prikaz laboratorijske aparature za membransku filtraciju.

Jogurtna kultura

Klasični jogurt je proizveden dodatkom jogurtne kulture B3 (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, Chr. Hansen, Danska).

Probiotska starter kultura

Pored inokuluma čajne gljive za proizvodnju probiotskog jogurta korišćena je starter kultura (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 i *Bifidobacterium* sp. LAFTI B94, B94 (DIRECT-SET™ DELVO-YOG® MY-721, DSM Food Specialities, Holandija) u koncentraciji od 0,0094%ww⁻¹.

TRANSGLUTAMINAZA

Transglutaminaza (TG) mikrobiološkog porekla (*Streptoverticillium mobaraense*) preparat Activa MP, deklarisan aktivnosti 100 jedinica po gramu praha (U/g), proizvođača Ajinomoto Co. Inc. (Hamburg, Nemačka), dodata je u koncentraciji 0,02%.

KONCENTRAT PROTEINA SURUTKE

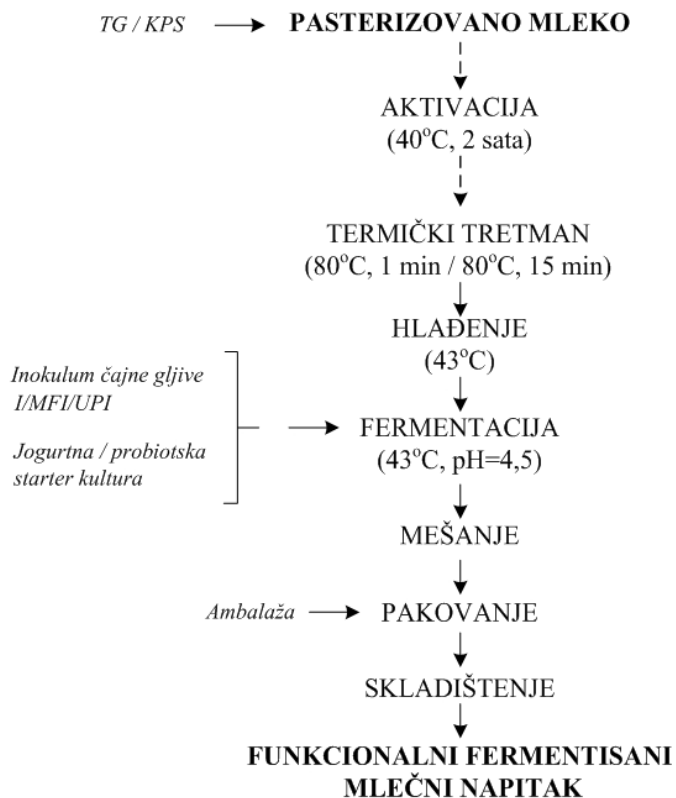
Koncentrat proteina surutke (KPS) Lactomin 80S proizvođača LACTOPROT, Aplenandisch Milchindustrie und Handels - GMBH, Nemačka, sledećeg sastava: 78,5% w/w proteina, 4,5%w/w pepela, 4,0% w/w mlečne masti i 5,0% w/w vode, korišćen je u koncentraciji 0,3%.

PROIZVODNJA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA

U 1000 mL mleka (sa 0,9% mlečne masti) zagrejanog na 42°C dodato je tri vrste različito pripremljenog inokuluma: a) 10% i 15% inokuluma čajne gljive uzetog odmah nakon kultivacije, b) 10% i 15% inokuluma čajne gljive koncentrovanog mikrofiltracijom, c) 1,5%; 3%; 10% i 15% inokuluma koncentrovanog uparavanjem, d) probiotska starter kultura i e) jogurtna starter kultura. Fermentacija je trajala do postizanja pH=4,5, nakon čega je gel ohlađen na temperaturu od 8°C i homogenizovan električnom mešalicom. Postupak proizvodnje identičan je i za fermentisane mlečne napitke proizvedene iz mleka sa 2,2% mlečne masti.

Pored navedenih uzoraka radi poboljšanja reoloških karakteristika proizvedene su i varijante fermentisanog mlečnog napitka uz dodatak transglutaminaze ili koncentrata proteina surutke. U mleko zagrejano na 40°C dodato je 0,02% TG. Nakon 2 sata aktivacije TG je inaktivirana termičkim tretmanom na 80°C, 1 minut. Koncentrat proteina surutke dodat je u mleko u koncentraciji od 0,3% i mleko sa KPS je termički tretirano na 80°C, 15 minuta. Nakon termičkog tretmana u uzorke mleka sa transglutaminazom, odnosno uzorak sa koncentratom proteina surutke, ohlađene na 42°C, dodat je odgovarajući inokulum čajne gljive. Tehnološki proces proizvodnje prikazan je na slici 19, a opis uzoraka u tabeli 10.

Proizvodi su skladišteni 10 dana u frižideru na 4°C. Proizvodnja uzorka je ponovljena 3 do 5 puta.



Slika 19. Tehnološki proces proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka

ANALIZE

ANALIZE MLEKA

pH vrednost i oksido-redukциони potencijal (Eh) mleka meren je korišćenjem laboratorijskog pH metra (VARIO pH SET, Nemačka).

Analiza hemijskog kvaliteta mleka korišćenog za proizvodnju varijanti fermentisanog mlečnog napitka izvršena je primenom nativnih metoda analize: suva materija (SM) (IDF/ISO 21A:1982); mlečna mast (MM) po Gerberu (IDF 105:1985); ukupni proteini (UP) (IDF 20:1962); pepeo (Pe) – metodom žarenja na temperaturi 550°C (IDF 90:1979) i kiselost titracionom metodom po Soxhlet-Henkel-u (°SH) (Carić i sar., 2000).

Sadržaj D-mlečne kiseline i L-mlečne kiseline (K-DLATE 11/05), laktoze i D-galaktoze (K-LACGAR 12/05) u uzorcima mleka analiziran je korišćenjem enzimskih testova (Megazyme, Irska).

ANALIZE INOKULUMA ČAJNE GLJIVE

pH vrednost i oksidoredukциони potencijal (Eh) inokuluma čajne gljive meren je korišćenjem laboratorijskog pH metra (VARIO pH SET, Nemačka).

U različitim inokulumima čajne gljive korišćenim za proizvodnju funkcionalnih napitaka analiziran je sadržaj: D-fruktoze i D-glukoze (K-FRUGL 11/05); sirćetne kiseline (K-ACETAT 11/05) i etanola (K-ETOH 03/06) korišćenjem odgovarajućih enzimskih testova Megazyme, Irska (Bergmeyer, 1988). Sadržaj suve materije inokuluma čajne gljive određen je refraktometrijski (Abbeov refraktometar, Carl Zeiss).

Tabela 10. Varijante fermentisanog mlečnog napitka

	Opis uzorka	Oznaka uzorka
Fermentisani mlečni napici iz mleka sa 0,9% mlečne masti		
1	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive	10% I
2	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive i 0,02% transglutaminaze	10% I+ TG
3	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive i 0,3% koncentrata proteina surutke	10%I+KPS
4	Uzorak sa 15% inokuluma čajne gljive	15% I
5	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive koncentrovanog membranskom filtracijom	10% MFI
6	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive koncentrovanog membranskom filtracijom i 0,02% transglutaminaze	10% MFI+TG
7	Uzorak sa 15% inokuluma čajne gljive koncentrovanog membranskom filtracijom	15% MFI
8	Uzorak sa 15% inokuluma čajne gljive koncentrovanog membranskom filtracijom i 0,02% transglutaminaze	15% MFI+TG
9	Uzorak sa 1,5% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem	1,5% UPI
10	Uzorak sa 1,5% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem i 0,02% transglutaminaze	1,5% UPI+TG
11	Uzorak sa 3,0% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem	3,0 %UPI
12	Uzorak sa 3,0% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem i 0,02% transglutaminaze	3,0% UPI+TG
13	Uzorak sa dodatkom probiotske starter kulture- probiotski jogurt	PJ
14	Uzorak sa dodatkom probiotske starter kulture i 0,02% transglutaminaze	PJ +TG
Fermentisani mlečni napici iz mleka sa 2,2% mlečne masti		
15	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive	10% I
16	Uzorak sa 15% inokuluma čajne gljive	15% I
17	Uzorak sa 10% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem	10% UPI
18	Uzorak sa 15% inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem	15% UPI
19	Uzorak sa dodatkom jogurtne kulture	J

ANALIZA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Fizičko-hemijske karakteristike

Hemijski i fizičko-hemijski kvalitet proizvedenih varijanti fermentisanog mlečnog napitka ispitan je posle proizvodnje i nakon 5 i 10 dana skladištenja, korišćenjem sledećih metoda: suva materija (SM) (IDF/ISO 21A:1982); mlečna mast (MM) po Gerberu (IDF 105:1985); ukupni proteini (UP) (IDF 20:1962); pepeo (Pe) (IDF 90:1979); D-fruktoza i D-glukoza (K-FRUGL 11/05); sirćetna kiselina (K-ACETAT 11/05), etanol (K-ETOH 03/06); D-mlečna i L-mlečna kiselina (K-DLATE 11/05); laktoza i D-galaktoza (K-LACGAR 12/05).

- Ukupni šećeri (UŠ) izračunati su računskim putem: $U\check{S}=SM-(UP+MM+Pe)$.
- Saharoza, računskim putem.

- Mineralne materije

Sadržaj mineralnih materija u ispitivanim uzorcima surutke određivan je primenom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), atomske emisije spektroskopije (AES) i spektrofotometrijske metode.

U proizvedenim varijantama napitaka analiziran je sadržaj: Mg, Ca, K, Na, Pb, Cd, Zn i Cu. Za razaranje uzoraka korišćena je metoda suvog postupka. Razaranje je vršeno spaljivanjem na 550°C. Suvi ostatak je rastvaran u hloridnoj kiselini. U daljoj analizi Mg, Ca, Zn i Cu korišćena je AAS-metoda, a za K i Na AES metoda, merenjem na aparatu GBC 932 plus. Određivanje koncentracije se vrši konstruisanjem kalibracione krive, merenjem apsorbancije serije nativnih rastvora. Pod istim uslovima rada se izmeri apsorbancija ispitivanog uzorka i očita nepoznata koncentracija sa kalibracione krive.

- Vitamini

Vitamin C

Za analizu vitamina C korišćen je HPLC sistem "Agilent 1100", SAD, sa petljom injektora od 20 μ L, C-18 kolonom, prečnika čestica 5 μ m, i UV-DAD detektorom. Kao nativ je korišćen vitamin C proizvođača J.T. Baker (Holandija). Nativ i uzorci su ekstrahovani 3%-tnim rastvorom meta-fosforne kiseline (Riedel-de Haën, Nemačka) koja je rastvarana u 8%-nom rastvoru sirćetne kiseline (Zorka, Šabac, Srbija). Rastvor amonijum-acetata (Kemika, Zagreb, Hrvatska), koncentracije 0,1 mol/L, pH 5,1 korišćen je kao pokretna faza u HPLC analizi. Rastvori su pripremani u bidestilovanoj vodi, koja je odgovarala HPLC kvalitetu. Protok pokretne faze je bio 0,4mL/min, a temperatura kolone 37 °C. Analize su trajale 4 minuta i ponovljene su tri puta (Malbaša i sar., 2009).

Vitamini B₁, B₂ i B₆

Sadržaj vitamina B₁, B₂ i B₆ analiziran je primenom reverzno-fazne tečne hromatografije uz fluorescentni detektor-metod HCTM-01, HCTM-02, HCTM-03.

HPLC sistem je sledećih karakteristika:

pumpa: Waters M600, izokratsko eluiranje; injektor: Rheodyne 7125, petlja 20 μ L; analitička kolona: RADIAL-PAK™ cartridge 5NVC 184; detektor: RF-535 Shimadzu, Fluorescence HPLC monitor; akvizicija/obrada podataka: Shimadzu C-R4A, CROMATOPAC; špric filter: hidrofилни špric filter, koji nije sterilan sa veličinom pora od 0,45 μ m.

Uslovi merenja su: mobilna faza (300 mL CH₃OH+770mL 5mM CH₃COONH₄); protok: 1,0mL/min; temperatura kolone: \approx 20°C; Energija: E_{ex}=370nm, E_{em}=430nm za vitamin B₁, za vitamin B₂ E_{ex}=450nm, E_{em}=530 i E_{ex}=286nm, E_{em}=392nm za vitamin B₆.

- Masne kiseline

U levak za odvajanje sipano je 17 mL uzorka mleka i dodato 30 mL izopropanola. Smeša je snažno promućkana. Zatim je dodato 22,5 mL heksana i mućkano 3 min. Mešavina je zatim centrifugirana na 2520 g u toku 5 minuta na 5°C, a onda je gornji sloj prebačen u drugi levak za odvajanje. Donji sloj se ponovo ekstrahovao sa 22,5 mL heksana i supernatant spojio sa prethodnim heksanskim slojem. Nakon dodatka 15 mL 0,47M vodenog rastvora Na₂SO₄, heksanski sloj je prebačen u balon, a zatim uparen na vakum uparivaču na 30°C.

Masne kiseline ekstrahiranih lipida mleka prevedene su u metil-estre postupkom transmetilacije zbog visokog sadržaja lako isparljivih nižih masnih kiselina, a prema metodi (ISO 5509, 2000).

Metil-estri su podvrgnuti gasno-hromatografskoj analizi radi identifikacije masnih kiselina i određivanja njihovog relativnog odnosa.

Ispitivanje sastava masnih kiselina vršeno je na aparatu VARIAN, model 1400, sa plamenom-jonizacionim detektorom. Korišćene su metalne kolone dimenzija 300 x 0,32 cm. Uslovi određivanja bili su sledeći: stacionarna faza je LAC-3R-728 (20%); nosač stacionarne faze je *Chromosorb W/AW, 80-100 mesha*; mobilna faza: azot, protok 24 mL/min; temperatura kolone: 180 °C; temperatura detektora: 200 °C i temperatura injektorskog bloka: 200 °C.

Kao referentni rastvor korišćena je smeša metil estara miristinske, palmitinske i stearinske kiseline (30+30+40). Injektiran je u gasni hromatograf po 1 µL referentnog rastvora i test rastvora. Na osnovu podataka dobijenim hromatografijom referentnog rastvora izračunat je broj teorijskih polja i efikasnost razdvajanja kolone. Broj teoretskih polja je 3457, a efikasnost razdvajanja 1,27 (izračunata na osnovu rastojanja između pikova metil-stearata i metil-oleata). Prema zahtevima Evropske farmakopeje (*European Pharmacopoeia*, 3rd edition, 1997) najmanji broj teoretskih polja za određivanje masnih kiselina na pakovanim kolonama je 2000, a minimalna efikasnost razdvajanja 1.25.

Identifikacija masnih kiselina test rastvora vršena je upoređivanjem sa retencionim vremenom metil-estara iz referentnog rastvora.

Relativan sadržaj masnih kiselina je izračunat kao procenat pojedinačnih masnih kiselina u ukupnim masnim kiselinama prema formuli:

$$A / S \times 100,$$

gde je A= površina pika pojedinih masnih kiselina, S = suma površina svih pikova prisutnih na hromatogramu masnih kiselina test rastvora.

- pH vrednost i oksidoredukcioni potencijal (Eh) fermentisanih mlečnih napitaka meren je korišćenjem laboratorijskog pH metra (VARIO pH SET, Nemačka).
- Kiseloš je određena titracijom metodom po Soxhlet-Henkel-u (°SH) (Carić i sar., 2000).
- sinerezis surutke - (izražen u mL) određen je nakon 3 sata filtracije 50g uzorka na sobnoj temperaturi (Atamer i sar., 1996).
- sposobnost vezivanja vode (SVV) - količina surutke (%) izdvojene nakon centrifugiranja 20g uzorka 30min na sobnoj temperaturi (Guzman-Gonzales i sar., 1999). $SVV = (20 - Mis) / 20$ (%); Mis – masa izdvojene surutke.
- *Teksturalne osobine* varijanti fermentisanih mlečnih napitaka ispitane su primenom uređaja Texture analyser TA.XPplus (Micro Stable System, Engleska) na temperaturi +4°C. Sila kompresije je merena korišćenjem diska A/BE prečnika 35 mm i ekstenzionog tega čije je opterećenje 5kg. Korišćena je opcija "Return to Start". Brzina pomeranja diska pre i tokom testa je iznosila 1,0 mm/s. Disk je prelazio rastojanje od 30 mm.
- *Viskozitet* uzoraka je meren pri temperaturi 5°C korišćenjem viskozimetra High Performance HAAKE RheoStress 600 (Karlsruhe, Nemačka) Z20 pri različitim brzinama obrtaja od 0 do 500 . Promene viskoziteta uzoraka FMN praćene su tokom fermentacije, nakon proizvodnje i tokom 5, odnosno 10 dana skladištenja.
- Energetska vrednost fermentisanih mlečnih napitaka u 100 grama proizvoda izračunata je na sledeći način:
 $EV = (\% \text{ proteina} \times 4,4 + \% \text{ mlečne masti} \times 9,3 + \% \text{ ukupni šećeri} \times 4,1) \times 4,186$ (kJ/100g).

Mikrobiološka analiza

Izvršena je izolacija i identifikacija sirćetnih bakterija i kvasaca iz tri različita inokuluma čajne gljive (čajni napitak, retentat dobijen ultrafiltracijom i koncentrat dobijen uparavanjem). Izolacija i određivanje broja ćelija sirćetnih bakterija i kvasaca izvršena je zasejavanjem na odgovarajućim selektivnim podlogama. Za rast sirćetnih bakterija korišćena je GYC podloga sledećeg sastava: 10 g kvašćevog ekstrakta, 50 g glukoze, 30 g CaCO₃, 25 g agar agara. Za rast kvasaca primenjena je selektivna podloga Saburov maltozni agar („Torlak“) koji sadrži 10 g peptona i 40 g maltoze. Za izolaciju čistih kultura bakterija i kvasaca izvršeno je zasejavanje na odgovarajućim selektivnim podlogama i inkubacija na 30°C. Pojedinačne kolonije su pikirane i presejane na Saburov maltoznom agar za kvasce, a na GYC agaru samo one koje daju prosvetljene zone oko nastalih kolonija. Bojenjem po Gramu je proverena čistoća izolovanih kultura. Za karakterizaciju sirćetnih bakterija, ispitano je prisustvo enzima katalaze, katalaza testom, sposobnost rasta u anaerobnim uslovima, sposobnost oksidacije etanola do sirćetne kiseline (De Ley, 1984), oksidacije acetata do CO₂ i H₂O, (Swings, 1992) kao i sposobnost korišćenja Na-acetata, metanola i etanola kao izvora ugljenika (De Ley, 1984). Za identifikaciju sirćetnih bakterija primenjen je biohemijski niz API 20 NE sistem (Bio Merieux France), za Gram negativne štapićaste bakterije. Izolati su pripremljeni prema protokolu proizvođača, a očitavanje je izvršeno primenom API LAB PLUS softverskog sistema.

Za preliminarnu identifikaciju kvasaca za svaki izolat je ispitana sposobnost stvaranja lažnih micelija zasejavanjem na krompirovom agaru (Lodder, 1974), a zatim je identifikacija izvršena na osnovu biohemijskog niza primenom API 20C AUX sistema za kvasce (Bio Merieux France), pri čemu su izolati pripremljeni i zasejani u stripove prema protokolu koje je preporučio proizvođač. Posle inkubacije stripova na 30°C, izvršeno je očitavanje stripova, a i identifikacija je utvrđena primenom softverskog sistema API LAB PLUS.

Promene broja prisutnih kvasaca i sirćetnih bakterija u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka, čuvanih na 4°C u toku 15 dana, utvrđene su primenom klasične metode razređenja i već pomenutih selektivnih podloga.

Broj ćelija bakterija mlečne kiseline se određivao na odgovarajućim selektivnim podlogama i to:

- *Lactococcus* sp. na M17 agaru u aerobnim uslovima na 30°C u toku 48h;
- *Lactobacillus* sp. na MRS agaru u fakultativno anaerobnim uslovima na 30°C u toku 48 h;
- *Lb. acidophilus* na MRS-IM agaru sa 2% maltoze na 37°C u toku 48 h;
- *Str. thermophilus* na M17 agaru uz dodatak 0,2% laktoze u aerobnim uslovima na 42 °C, 48 sati i
- *Bifidobacterium* na MRS-IM agaru sa 2% glukoze i dikloksalinom, LiCl i cistein hidrohloridom.

Senzorna analiza

Fermentisane mlečne napitke analizirala je stručna komisija metodom petobalnog bod sistema (Radovanović i Popov-Raljić, 2001) i opisnom metodom. Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1 do 5. Obzirom da reprezentativna svojstva nemaju jednak uticaj na kvalitet za svako odabrano svojstvo kvaliteta određen je koeficijent važnosti (KV) pomoću kojeg je vršena korekcija (množenjem) date ocene. Ispitivani parametri kvaliteta sa određenim koeficijentima važnosti su obuhvatili sledeće: izgled – 1, boja – 2, konzistencija – 4, miris – 3, ukus – 10. 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.

Mikrostruktura

Mikrostruktura uzoraka fermentisanih mlečnih napitaka ispitana je primenom "scanning" elektronske mikroskopije (SEM), korišćenjem elektronskog mikroskopa *Joel, JSM-6460LV* Scanning Electrone Microscope (Oxford, Instruments). Priprema uzorka funkcionalnih fermentisanih napitaka za SEM analizu obuhvatila je: fiksiranje u 2,8% rastvoru glutraldehida, dehidraciju u rastvoru etanola različitih koncentracija, ekstrakciju pomoću CHCl_3 , dehidraciju u apsolutnom etanolu tokom 24 časa, sušenje primenom uređaja (CPD 030 "Critical Point Dryer ", BAL-TEC, Nemačka) u toku 1 časa i prevlačenje uzorka slojem zlata (BAL-TEC, SCD 005, Sputter coater) (Kalab, 1993; Gavarić i sar., 1989; Sandoval-Castilla i sar., 2004). Pripremljeni uzorci posmatrani su elektronskim mikroskopom primenom SEM tehnike pri naponu od 25 kV.

Statistička analiza rezultata

Statistička analiza je vršena sa ciljem da se utvrdi uticaj parametara tehnološkog procesa proizvodnje na kvalitet fermentisanih mlečnih napitaka. Svaki eksperiment je ponavljen najmanje tri puta. Analiza varijanse (ANOVA) izvršena je primenom programskog softvera Statistica 08 (StatSoft, USA). Razlika između srednjih vrednosti je određena na nivou 5% statističke značajnosti korišćenjem Dankanovog testa (Akhnazarova i sar., 1982).

REZULTATI I DISKUSIJA

KARAKTERISTIKE MLEKA

Hemijski sastav i karakteristike mleka korišćenog za proizvodnju funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka prikazan je u tabeli 11.

Sadržaj suve materije raste sa povećanjem sadržaja mlečne masti, dok je sadržaj proteina u uzorcima sa 0,1% i 0,9% masti ujednačen i prosečno iznosi 3,15%. Sadržaj proteina u mleku sa 2,2% masti je 3,27%. Koncentracija laktoze u uzorcima mleka opada sa povećanjem sadržaja mlečne masti i prosečno iznosi: 4,53% (uzorak sa 2,2% masti), 4,74% (uzorak sa 0,9% masti) i 5,08% (uzorak sa 0,1% masti).

Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka mleka (tabela 11) u skladu su sa važećim Pravilnikom o kvalitetu mleka (Sl.list SRJ, 26/2002).

Tabela 11. Kvalitet mleka (n > 4)

Hemijski sastav (g/100g)	Uzorak mleka		
	I	II	III
Mlečna mast	0,1	0,9	2,2
Suva materija	9,12±0,35	9,85±0,33	11,6±0,21
Proteini	3,15±0,22	3,15±0,04	3,27±0,06
Laktoza	5,08±0,2	4,74±0,15	4,53±0,21
Pepeo	0,79±0,02	0,78±0,04	0,85±0,01
Fizičko-hemijske karakteristike			
pH	6,52±0,03	6,63±0,17	6,7±0,12
Eh (mV)	-	16±3	12±4
Kiselost (°SH)	6,7±0,45	6,6±0,01	6,5±0,05

KARAKTERISTIKE STARTER KULTURE

Fizičko-hemijske i tehnološke karakteristike tri vrste inokuluma prikazane su u tabeli 12.

pH vrednost i oksido-redukcioni potencijal zavise od vrste inokuluma. Sadržaj suve materije i analiziranih šećera je najveći u inokulumu koncentrovanom uparavanjem i iznosi 65,96 i 12,11%, respektivno. Najniži sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze je u inokulumu koncentrovanom mikrofiltracijom, dok je u nativnom inokulumu čajne gljive sadržaj saharoze viši za 30%, a ostalih šećera prosečno za 22%.

Tabela 12. Fizičko-hemijske karakteristike tri različita inokuluma čajne gljive

Uzorci	Karakteristike							
	pH	Eh (mV)	Suva materija (g/100g)	Saharoza (g/100g)	Glukoza (g/100g)	Fruktoza (g/100g)	Sirćetna kiselina (g/100g)	Etanol (g/100g)
Inokulum čajne gljive (I)	3,07± 0,2	226± 19	6,68± 0,07	1,65± 0,25	0,92± 0,13	0,52± 0,25	0,34± 0,17	0,04± 0,02
Inokulum koncentrovan uparavanjem (UPI)	2,57± 0,35	256± 10	65,96± 0,25	12,11± 5,00	6,37± 0,3	5,16± 5,10	0,18± 0,01	0,06± 0,03
Inokulum koncentrovan mikrofiltracijom (MFI)	3,17± 0,3	201,6± 5,82	6,41± 0,16	1,27± 0,62	0,75± 0,31	0,50± 0,34	0,12± 0,06	0,04± 0,01

Evidentno je da je sadržaj glukoze i fruktoze značajno viši u uparenom inokulumu nego u mikrofiltriranom i polaznom inokulumu čajne gljive. Sadržaj glukoze je niži u svim uzorcima u poređenju sa sadržajem fruktoze. Navedeni rezultati su u skladu sa istraživanjima autora Malbaša (2009), gde je takođe konstatovano da mikroorganizmi prisutni u čajnoj gljivi koriste više fruktozu tokom metaboličkih procesa nego glukožu.

Sirćetna kiselina je najzastupljenija u nativnom inokulumu čajne gljive (0,34 g/100g), dok je u inokulumu koncentrovanom uparavanjem sadržaj sirćetne kiseline niži i iznosi 0,18 g/100g. Sadržaj sirćetne kiseline u crnom čaju tokom 18 dana fermentacije čajne gljive pratili su Jajabalan i sar. (2007). Rezultati istraživanja navedenih autora pokazuju da se sadržaj sirćetne kiseline kreće od 0,132 g/100g šestog dana fermentacije do 0,244 g/100g devetog dana skladištenja. Rezultati iz tabele 13 pokazuju da je sadržaj sirćetne kiseline u inokulumu čajne gljive sedmog dana prosečno niži za 41,72% u poređenju sa rezultatima autora Jajabalan i sar. (2007), što je potvrda da sastav i osobine čajne gljive zavise od podneblja tj. geografskog porekla.

Sadržaj etanola takođe varira u inokulumu čajne gljive i kreće se od 0,04% (MFI) do 0,06% (UPI). U nativnom inokulumu sadržaj etanola iznosi 0,04%.

U tabeli 13 prikazani su rezultati mikrobiološke analize: a) inokuluma čajne gljive i b) probiotske starter kulture.

Inokulum čajne gljive korišćen za koncentrovanje uparavanjem i mikrofiltracijom ima znatno veći broj kvasaca od broja BSK (za oko 10^3). Koncentrovanjem inokuluma uparavanjem broj kvasaca se smanji za oko 100 puta, a broj BSK je nešto veći, ali odnos BSK i kvasaca je 1:1. Broj kvasaca se koncentriše 2 puta primenom mikrofiltracije, a broj BSK za oko 20 puta. Evidentno je da su u nativnom inokulumu čajne gljive i inokulumu koncentrovanom mikrofiltracijom zastupljeni isti sojevi BSK (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter xylinus*) i kvasci (*Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Kloeckera* sp.), dok su u inokulumu koncentrovanom uparavanjem prisutni isti kvasci i samo 2 identifikovana soja bakterija sirćetne kiseline (*Acetobacter aceti*, *Gluconobacter xylinus*).

Ukupan broj bakterija i kvasaca tokom fermentacije čajne gljive pratili su Jajabalan i sar. (2007). Broj bakterija i kvasaca bio je najveći 9 dana i iznosio je redom: $25 \cdot 10^3$ ćelija/mL

i $35 \cdot 10^6$ ćelija/mL. Rezultati pokazuju da su navedeni autori dobili 10 puta veći sadržaj bakterija i kvasaca nego što sadrži inokulum čajne gljive prikazan u tabeli 13. Takođe, autori su prikazali da je sadržaj mlečne kiseline znatno niži od sadržaja sirćetne kiseline i devetog dana iznosi 0,25 g/L. Na osnovu rezultata mikrobiološke i hemijske analize čajne gljive može se zaključiti da veći broj kvasaca doprinosi bržoj razgradnji prisutnih ugljenih hidrata do sirćetne kiseline.

Tabela 13. Mikrobiološki sastav inokuluma čajne gljive i probiotske starter kulture

Uzorci inokuluma	Bakterije sirćetne kiseline (BSK)		Kvasci	
	Broj ćelija/mL	Identifikovani sojevi	Broj ćelija/mL	Identifikovani sojevi
Inokulum čajne gljive (I)	$1,13 \cdot 10^2$	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Gluconobacter xylinus</i>	$3,9 \cdot 10^5$	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Kloeckera</i> sp.
Inokulum koncentrovan uparavanjem (UPI)	$1,0 \cdot 10^3$	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Gluconobacter xylinus</i>	$1,0 \cdot 10^3$	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Kloeckera</i> sp.
Inokulum koncentrovan mikrofiltracijom (MFI)	$2 \cdot 10^3$	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Gluconobacter xylinus</i>	$8 \cdot 10^5$	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Kloeckera</i> sp.
	Broj bakterija mlečne kiseline (broj ćelija/mL)			
	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>		<i>Bifidobacterium</i>
starter kultura DELVO-YOG MY-721	$8,8 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$		$2,1 \cdot 10^8$

Broj bakterija mlečne kiseline korišćenih za proizvodnju funkcionalnog probiotskog mlečnog napitka iznosi: $8,8 \cdot 10^9$ (ćelija/mL) *Str. thermophilus*, $3,1 \cdot 10^9$ (ćelija/mL) *Lb. acidophilus*; $2,1 \times 10^8$ (ćelija/mL) *Bifidobacterium*.

Izdvojene čiste kulture bakterija sirćetne kiseline i kvasaca proverene su preparatom po Gramu, pri čemu su utvrđene i morfološke karakteristike izolovanih ćelija. Karakteristike bakterija sirćetne kiseline koje su značajne za njihovu identifikaciju date su u tabeli 14.

Identifikacijom bakterija sirćetne kiseline primenom API 20 NE sistema, u sva tri uzorka inokuluma utvrđeno je prisustvo tri vrste sirćetnih bakterija: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter xylinum* (tabela 14).

Mikrobiološki sastav bakterija sirćetne kiseline može da varira zavisno od geografskog porekla. Međutim rodovi *Acetobacter* i *Gluconobacter* su najrasprostranjeniji u kulturama čajne gljive. Mnoga istraživanja su potvrdila da je *Gluconobacter xylinum* primarna bakterija u ovoj simbiozi (Sievers i sar., 1995), a takođe i prisustvo vrste *Acetobacter aceti* (Zahoor i sar., 2006).

Na osnovu identifikacije kvasaca koja je obuhvatala sposobnost stvaranja pseudomicelija i fermentacije različitih šećera, na kojoj je bazirana determinacija API 20 C AUX sistemom, utvrđeno je prisustvo rodova: *Saccharomyces*, *Candida* i *Kloeckera*.

Tabela 14. Karakteristike bakterija sirćetne kiseline izolovanih iz čajne gljive

KARAKTERISTIKE	<i>Gluconobacter xylinus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
Bojenje po Gramu	-	-	-
Katalaza	+	+	+
Odnos prema O ₂	Aerobna bak.	Aerobna bak.	Aerobna bak.
Oksidacija etanola do sirćetne kis.	+	+	+
Oksidacija acetata do CO ₂ i H ₂ O	+	+	+
Na-acetat kao izvor C	-	+	+
Etanol kao izvor C	-	+	+
Metanol kao izvor C	-	+	+

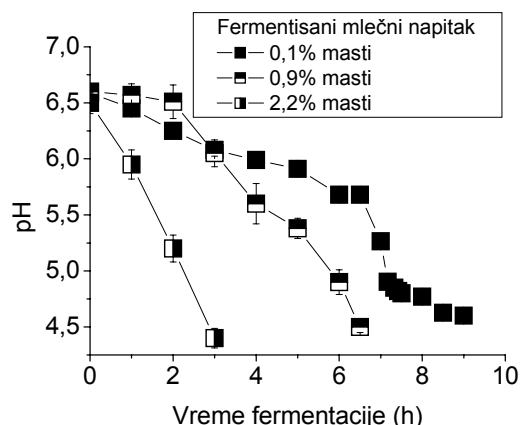
Mikroflora kvasaca je mnogo raznovrsnija u odnosu na sirćetne bakterije, tako da se u istraživanjima različitih autora pojavljuje veliki broj različitih rodova (Harrera i Calderon-Villagomez, 1989). Ai Leng Teoh i sar., (2004) utvrdili su prisustvo *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces*, *Candida*. Mayers i sar., (1995) pokazali su da su najčešći rodovi kvasaca koji se javljaju u sastavu uzoraka kombuhe sakupljenih iz različitih regiona Nemačke, najčešće *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces*. Steels i sar. (2002) su utvrdili specifičnost vrste *Zygosaccharomyces kombuchaensis* koja se svojim fiziološkim karakteristikama značajno razlikovala od sličnih vrsta *Zygosaccharomyces bailii* i *Zygosaccharomyces lentus*.

PROCES FERMENTACIJE MLEKA

Proces fermentacije mleka tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda predstavlja veoma važnu operaciju za formiranje optimalnih fizičko-hemijskih i senzornih osobina proizvoda. Promena pH vrednosti u uzorcima fermentisanog mlečnog napitka proizvedenim uz primenu probiotske starter kulture zavisi od različitih faktora: hemijski sastav mleka (sadržaja mlečne masti, proteina i dr), fizičko-hemijskih svojstava mleka (pH i kiselost), vrste startera i temperature inokulacije. Poznato je da mlečna mast ima značajan uticaj na tok fermentacije i kvalitet fermentisanog mlečnog proizvoda.

Na slici 20 prikazan je proces fermentacije u tri uzorka mleka sa različitim sadržajem mlečne masti (0,1%, 0,9% i 2,2%) uz korišćenje probiotske starter kulture. Evidentno je da sa sniženjem sadržaja mlečne masti u mleku brzina fermentacije opada, odnosno traje 3 sata (u mleku sa 2,2% masti), 6,5 sati (mleko sa 0,9% masti) i 9,3 sata (mleko sa 0,1% masti).

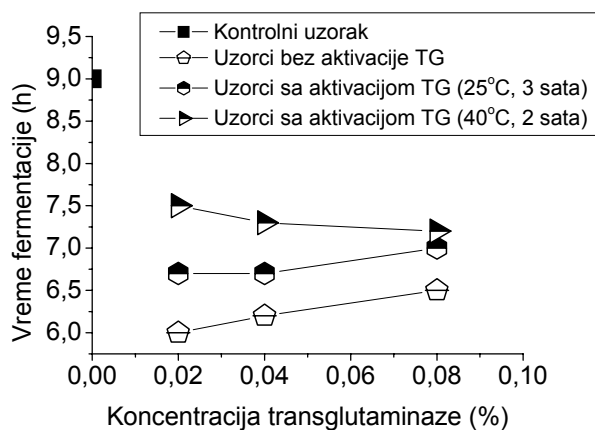
Pored uticaja sadržaja mlečne masti, dodatak različitih ingradijenata tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda ima značajan uticaj na tok i vreme fermentacije mleka. Dodatak transglutaminaze, pojedinačno i/ili u kombinaciji sa koncentratom proteina surutke (KPS) u mleko sa 0,1% masti skraćuje vreme fermentacije tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka. Vreme fermentacije je kraće sa povećanjem sadržaja koncentrata proteina surutke. Navedeni rezultati su u skladu sa istraživanjima Gustaw i sar. (2000) koji su kontatovali da dodatak obranog mleka u prahu i proteina surutke skraćuje vreme fermentacije za oko 100 minuta.



Slika 20. Fermentacija mleka sa 0,1%, 0,9% i 2,2% mlečne masti uz primenu probiot-ske starter kulture.

Rezultati autora Gonzales-Martinez (2002) pokazuju da korišćenje surutke u prahu usporava acidifikaciju tokom proizvodnje jogurta. Takođe, Lucey i sar. (1999) su utvrdili da dodatak proteina surutke u termički tretirano mleko skraćuje vreme fermentacije, dok dodatak koncentrata proteina surutke u mleko posle termičkog tretmana ima suprotan efekat.

Na slici 21 prikazan je uticaj koncentracije TG i temperature aktivacije (25° i 40°C) na vreme fermentacije mleka. Na slici se vidi da povećanjem koncentracije enzima raste vreme fermentacije (uzorci bez aktivacije i uz aktivaciju na 25 °C). U uzorcima u kojima je TG aktivirana na 40°C, 2 sata vreme fermentacija opada sa povećanjem koncentracije enzima.



Slika 21. Uticaj koncentracije enzima transglutaminaze i temperature aktivacije enzima na vreme fermentacije mleka sa 0,1% masti.

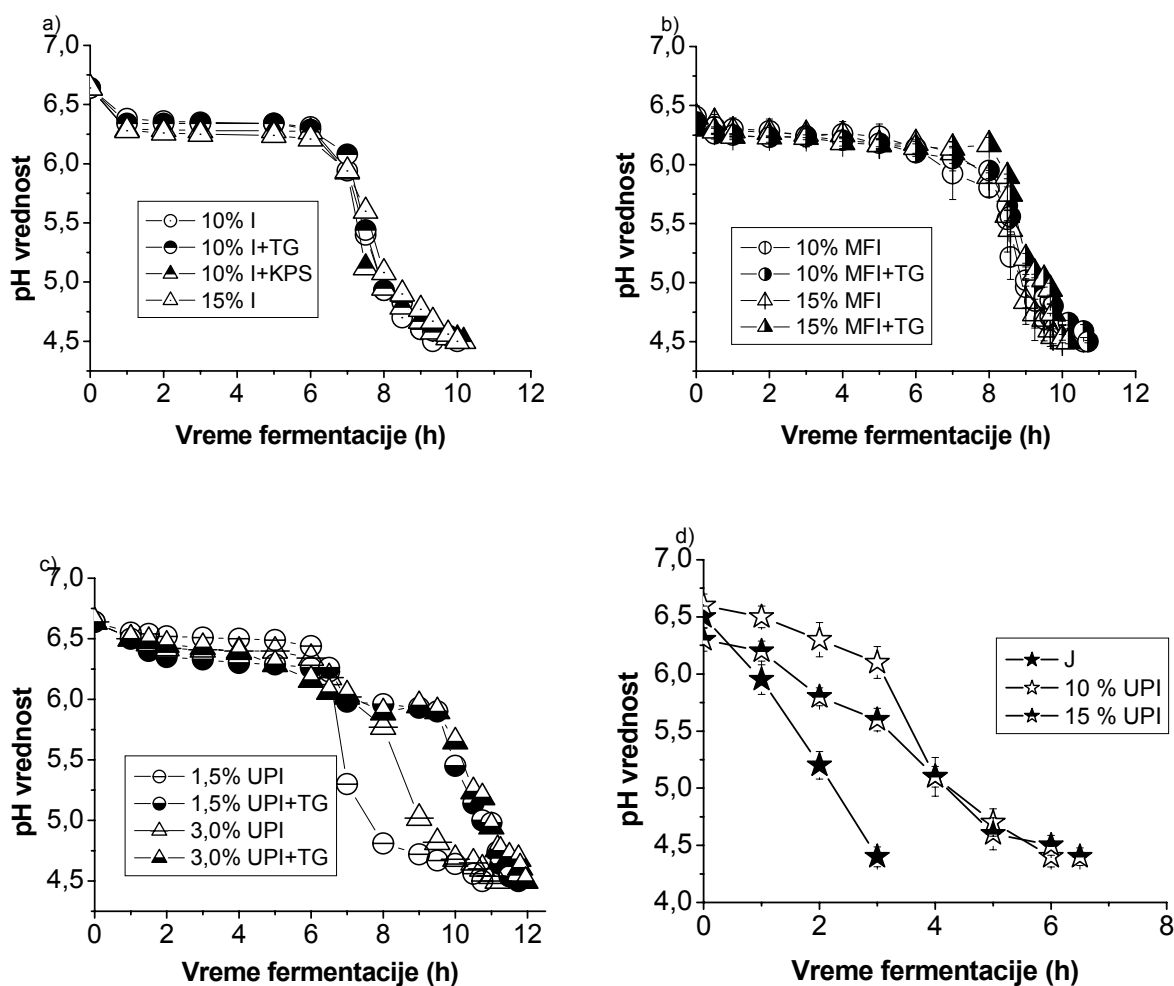
Uzimajući u obzir fizičko-hemijske karakteristike varijanti probiotskog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenih uz primenu TG, za proizvodnju funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka uz primenu čajne gljive odabrana je kao optimalna koncentracija transglutaminaze od 0,02% (Djurić i sar., 2008).

Na osnovu dobijenih rezultata praćenja toka fermentacije mleka uz korišćenje TG i KPS, za nastavak ispitivanja optimizacije tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka uz korišćenje tri vrste inokuluma čajne gljive korišćeno je mleko sa 0,9% mlečne masti. U odabranim uzorcima u mleko je dodato 0,02% transglutaminaze (prethodno aktivisane 2 sata na 40°C, a potom inaktivisane termičkim tretmanom od

80°C, 1 minut) ili 0,3% koncentrata proteina surutke radi poboljšanja reoloških karakteristika proizvoda.

Fermentacija mleka uz primenu inokuluma čajne gljive prosečno traje od 9,5 do 10 sati i nije utvrđena značajna razlika između uzoraka proizvedenih sa 10% i 15% inokuluma i uzoraka proizvedenih uz primenu TG i KPS (slika 22). Proizvodnja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka uz primenu inokuluma koncentrovanog mikrofiltracijom je trajala 30 minuta duže nego u uzorcima proizvedenim sa nativnim inokulumom. U uzorcima proizvedenim uz primenu inokuluma koncentrovanog uparavanjem fermentacija mleka je za 60 do 90 minuta duža u odnosu uzorke proizvedene uz korišćenje običnog inokuluma čajne gljive.

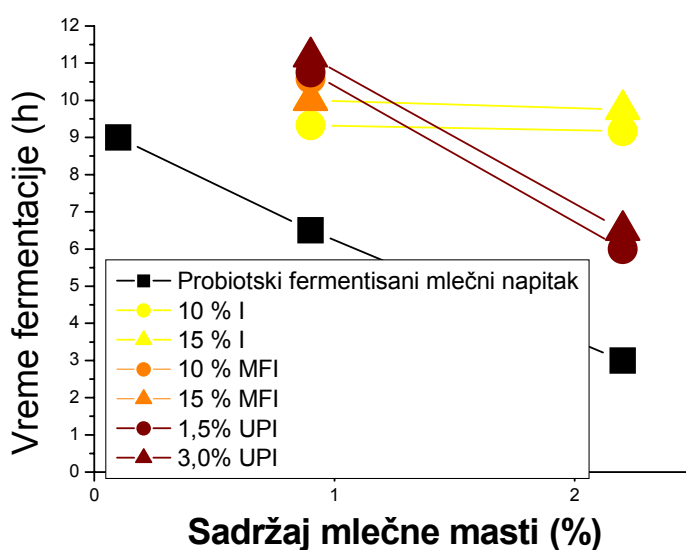
Fermentacija mleka sa 2,2% masti uz primenu koncentrovanog inokuluma u koncentraciji od 10% UPI i 15% UPI je prosečno tri sata kraća u poređenju sa fermentacijom mleka koje sadrži 0,9% masti, a dva puta duže traje u odnosu na fermentaciju mleka primenom jogurtne kulture (slika 22d)



Slika 22. Fermentacija mleka sa 0,9% mlečne masti primenom tri vrste čajne gljive: a) nativni inokulum; b) inokulum koncentrovan mikrofiltracijom; c) inokulum koncentrovan uparavanjem i d) mleka sa 2,2% masti sa inokulumom koncentrovanim uparavanjem.

Razlike u toku fermentacije mleka između uzoraka proizvedenih sa tri različite vrste inokuluma čajne gljive rezultat su različitog hemijskog sastava (sadržaj saharoze, glukoze i fruktoze) i mikrobioloških karakteristika (ukupan broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca) korišćenih inokuluma (tabela 12 i 13).

Na slici 23 prikazan je uticaj sadržaja mlečne masti i vrste inokuluma čajne gljive na vreme fermentacije. Evidentno je da u napicima proizvedenim sa probiotskom starter kulturom i uzorcima čajne gljive vreme fermentacije opada sa povećanjem sadržaja mlečne masti. Međutim, fermentacija mleka uz primenu inokuluma čajna gljiva je znatno sporija nego sa probiotskom kulturom, jer je potrebno izvesno vreme da se čajna gljiva adaptira na mleko kao veoma složen supstrat. Najveća razlika je utvrđena između uzoraka sa 0,9 i 2,2% masti proizvedenim uz primenu inokuluma koncentrovanog uparavanjem, dok kod uzoraka proizvedenih korišćenjem različitih koncentracija nativnog inokuluma sadržaj mlečne masti minimalno utiče na vreme fermentacije. Kao što je prethodno konstatovano fermentacija je za oko 30 minuta sporija u uzorcima sa 15% inokuluma nego sa 10% inokuluma (nativnog i koncentrovanog uparavanjem). Navedeni trend je suprotan uzorcima u kojima je korišćen mikrofiltrirani inokulum čajne gljive.



Slika 23. Uticaj sadržaja mlečne masti i vrste inokuluma čajne gljive na vreme fermentacije mleka.

Proces fermentacije (do postizanja $\text{pH}=3,3$) različitih vrsta surutke (slatka, kisela, rekonstituisana) i crnog čaja sa dodatkom čajne gljive pri temperaturi 32°C pratili su Bellosso-Morales i sar. (2003). Iz navedenih rezultata je evidentno da pH vrednost u navedenim supstratima opada različitom dinamikom ali značajno sporije nego kod uzoraka funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka (slika 23). pH vrednost crnog čaja inokulisanog sa čajnom gljivom najbrže opadne do pH 3,3 i to za 50 sati, dok je u uzorcima surutke pad pH vrednosti sporiji i posle 50 sati fermentacije iznosi 4. Vreme fermentacije mleka uz primenu čajne gljive je značajno kraće jer temperatura fermentacije iznosi 42°C za mleko, odnosno za 10°C je niža u odnosu na ispitivanu fermentaciju surutke. Razlika između fermentacije mleka i surutke inokulisane kombuhom rezultat je različitog hemijskog sastava surutke i mleka, kao i odnosa prisutnih sojeva kvasaca i BSK (Bellosso-Morales i sar., 2003).

NUTRITIVNA VREDNOST FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Prosečan hemijski sastav i energetska vrednost funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka sa 0,9% mlečne masti proizvedenih uz korišćenje tri vrste inokuluma čajne gljive prikazan je u tabeli 15.

Sadržaj suve materije u funkcionalnim fermentisanim napicima se statistički razlikuje između uzoraka proizvedenih sa istom i različitom vrstom inokuluma. U uzorcima proizvedenim uz primenu mikrofiltriranog inokuluma najniži je prosečan sadržaj suve materije i ukupnih šećera, dok je neznatno veći sadržaj u uzorcima proizvedenim uz primenu inokuluma čajne gljive. U uzorcima dobijenim uz primenu inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem sadržaj suve materije i saharoze je 20 % veći u odnosu na uzorke proizvedene uz korišćenje standardnog i mikrofiltriranog inokuluma.

Tabela 15. Prosečan hemijski sastav i energetska vrednost varijanti funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenih iz mleka sa 0,9% i 2,2% mlečne masti

Napitak	SADRŽAJ KOMPONENTE (g/100g)					Energetska vrednost (kJ/100g)
	Suva materija	Mlečna mast	Ukupni proteini	Ukupni šećeri	Pepeo	
Iz mleka sa 0,9% mlečne masti						
10% I	10,92±0,33	0,8	2,56±0,22	6,78±0,19	0,68±0,02	198,55
10% I+TG	10,57±0,21	0,8	3,25±0,09	5,72±0,11	0,72±0,04	192,72
10% I+KPS	10,17±0,27	0,8	3,25±0,01	5,12±0,10	0,63±0,01	187,74
15% I	10,17±0,30	0,8	2,93±0,01	6,27±0,14	0,57±0,02	187,4
10% MFI	9,63±0,18	0,8	2,78±0,10	5,27±0,10	0,68±0,03	176,69
10% MFI+TG	9,57±0,20	0,8	2,48±0,23	5,46±0,15	0,73±0,01	174,42
15% MFI	9,42±0,42	0,8	2,36±0,25	5,5±0,23	0,66±0,02	172,9
15% MFI+TG	9,25±0,38	0,8	2,36±0,20	5,31±0,21	0,71±0,05	169,64
1,5% UPI	11,38±0,45	0,8	3,19±0,06	6,57±0,18	0,72±0,04	206,55
1,5% UPI+TG	10,61±0,35	0,8	3,2±0,05	5,74±0,15	0,77±0,05	192,49
3,0% UPI	11,72±0,40	0,8	3,13±0,03	6,98±0,15	0,71±0,02	212,48
3,0% UPI+TG	10,55±0,25	0,8	3,32±0,04	5,55±0,35	0,78±0,06	191,44

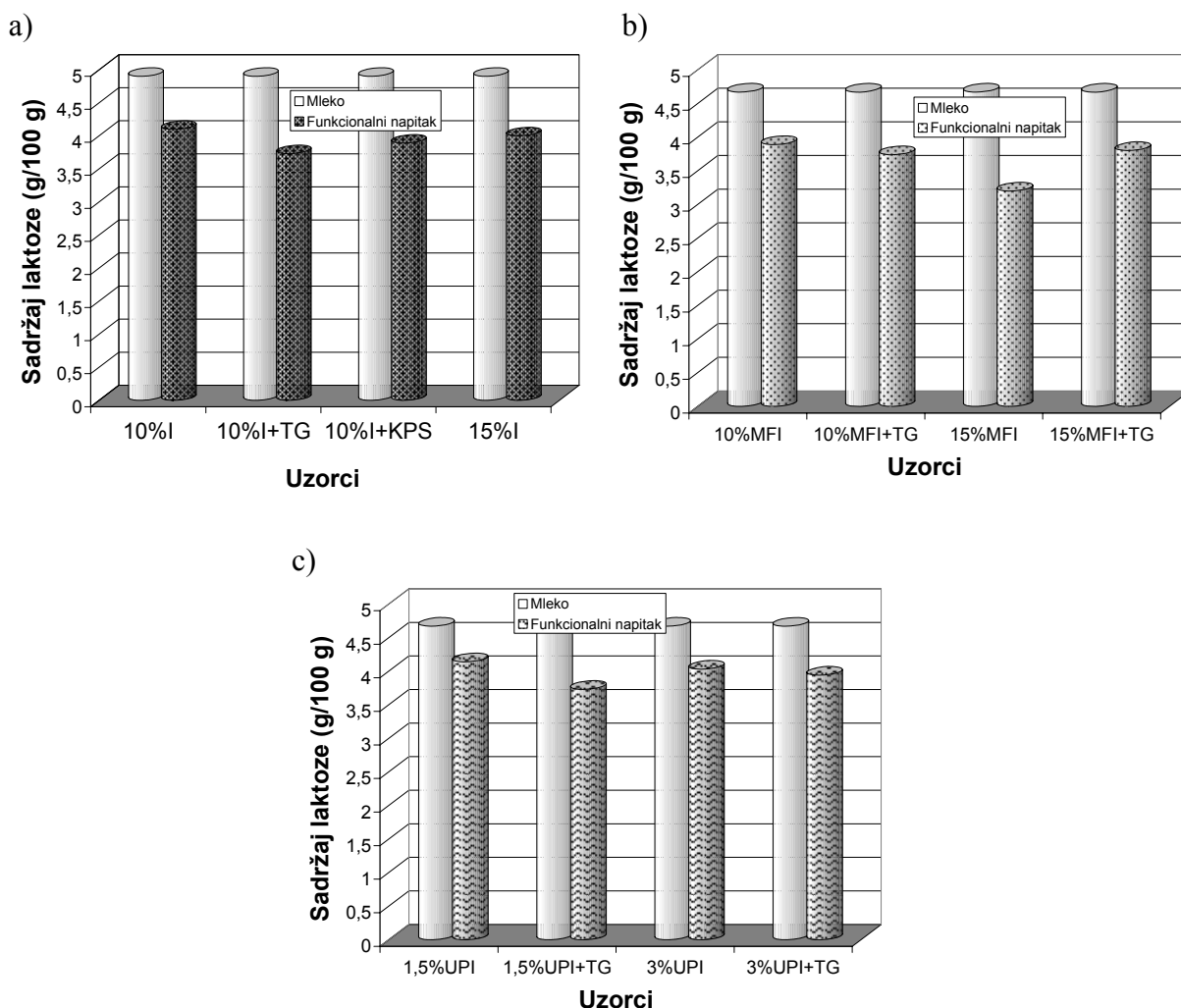
LAKTOZA

Sadržaj laktoze u varijantama funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka prikazan je na slici 24. Sadržaj laktoze varira unutar grupe proizvedene sa istom vrstom inokuluma čajne gljive, kao i između uzoraka proizvedenih sa inokulumom koncentrovanim mikrofiltracijom i uparavanjem. Uzorak proizveden sa 10% inokuluma čajne gljive sadrži 4,10% laktoze, odnosno 19,6% manje od sadržaja u mleku korišćenom za proizvodnju napitka. Obzirom da se

dodatkom 10% inokuluma u mleko sadržaj laktoze smanji za oko 4,5% (odnosno na 4,67 g/100g), može se zaključiti da se tokom fermentacije mleka transformiše 14,92% laktoze. Ostali uzorci proizvedeni sa nativnim inokulumom uz primenu transglutaminaze i koncentrata proteina surutke imaju za 15% niži sadržaj laktoze, a uzorak 15% I za 2% niži sadržaj u odnosu na uzorak 10% I.

Uzorci proizvedeni sa 10% MFI i 15% MFI imaju za 11%, odnosno 21% niži sadržaj laktoze nakon proizvodnje u poređenju sa odgovarajućim uzorcima proizvedenim uz primenu nativnog inokuluma (slika 23 a i b). Transformacija laktoze tokom fermentacije je intenzivnija u funkcionalnim napicima proizvedenim uz primenu transglutaminaze, obzirom da nakon proizvodnje sadrže manje laktoze od uzoraka bez TG.

Fermentisani mlečni napici proizvedeni uz primenu 1,5% i 3% inokuluma koncentrovanog uparavanjem imaju približno jednak sadržaj laktoze kao i uzorci dobijeni uz korišćenje mikrofiltriranog inokuluma. Takođe, napici proizvedeni primenom uparenog inokuluma čajne gljive i dodatkom TG imaju niži sadržaj laktoze u odnosu na uzorke koji ne sadrže TG (slika 23 c).



Slika 24. Sadržaj laktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima dobijenim korišćenjem: a) nativnog inokuluma; b) mikrofiltriranog inokuluma; c) inokuluma dobijenog uparavanjem.

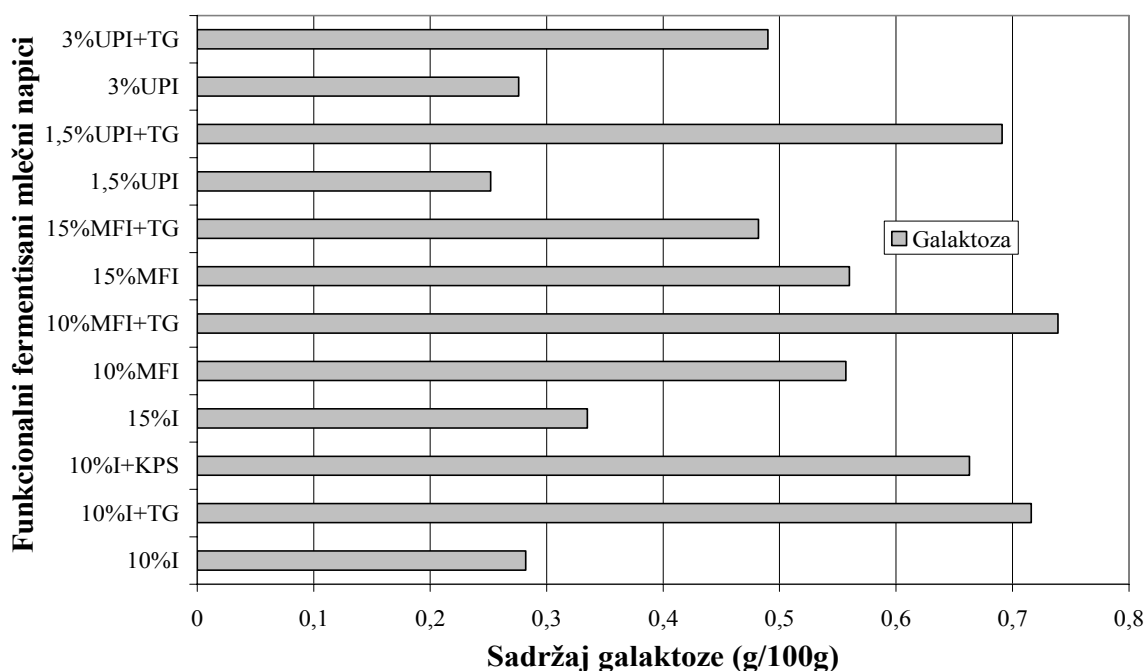
Generalno posmatrano, razlike između uzoraka proizvedenih sa tri vrste inokuluma čajne gljive uz primenu TG ili KPS rezultat su složenih biohemijskih transformacija, odnosno mikrobioloških karakteristika korišćenih inokuluma, kao i odnosa bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u inokulumu i finalnom proizvodu.

Komparacijom sadržaja laktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima tokom fermentacije sa rezultatima istraživanja Bellosso-Morales i sar. (2003) i Irigoyen (2005) koji su pratili promenu sadržaja laktoze u surutki (sa čajnom gljivom), odnosno u mleku uz primenu kefirnih zrna uočavaju se značajne razlike u dinamici promene sadržaja tokom procesa fermentacije. Sadržaj laktoze u slatkoj surutki tokom prvih 22 sata fermentacije sa čajnom gljivom opadne sa 53 g/L do 18 g/L, dok su nešto veće promene u rekonstituisanoj slatkoj surutki. Po završetku fermentacije sadržaj laktoze u slatkoj i rekonstituisanoj surutki iznosi oko 15g/L.

GALAKTOZA

Galaktoza, kao monosaharidna jedinica u sastavu laktoze je neznatno zastupljena u mleku (prosečno 0,018 g/100g). Tokom procesa fermentacije laktoza se složenim metaboličkim transformacijama razlaže do galaktoze i drugih metabolita: L- i D-mlečna kiselina, glukoza, sirćetna kiselina i dr.

Sadržaj galaktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima je veoma neujednačen, i u direktnoj je zavisnosti sa sadržajem laktoze u uzorku (slika 25).



Slika 25. Sadržaj galaktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

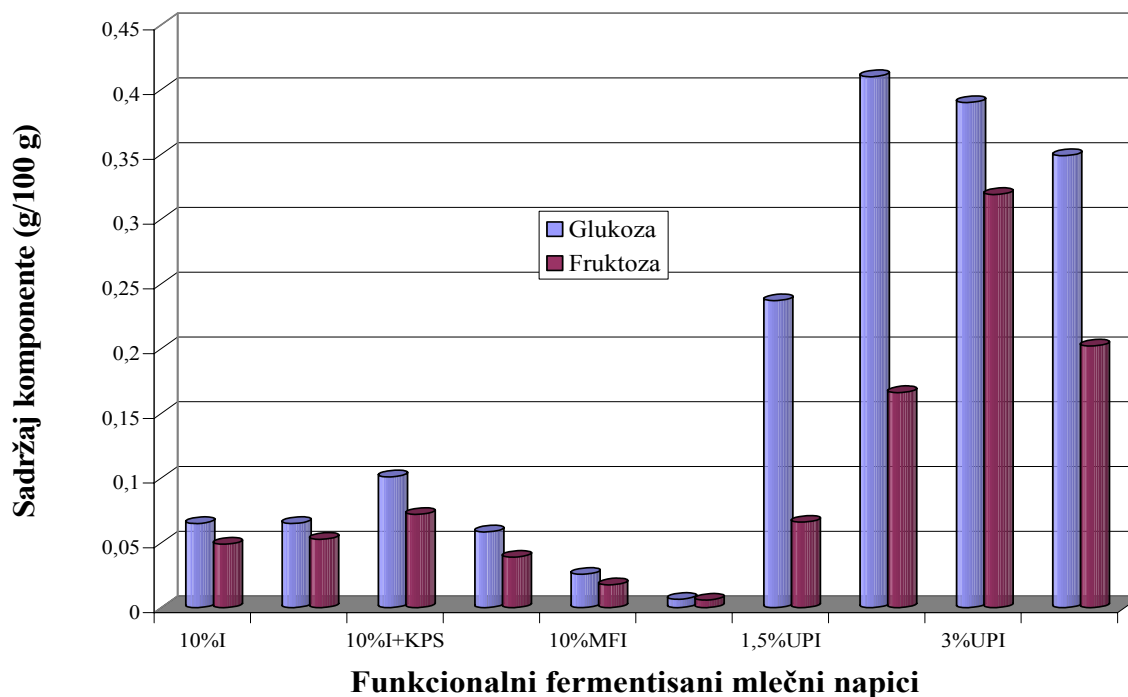
Sadržaj galaktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje kreće se od 0,28 g/100g (10% I) do 0,72 g/100g (10% I+TG) (slika 25). Uzorci proizvedeni sa 10% i 15% MFI imaju viši sadržaj galaktoze u odnosu na uzorke sa nativnim inokulumom, kao rezultat intenzivnije razgradnje laktoze. Dodatak TG u mleko tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka uz primenu mikrofiltriranog inokuluma doprinosi intenziv-

nijoj razgradnji laktoze, odnosno većem sadržaju galaktoze u poređenju sa odgovarajućim uzorcima bez TG. Fermentisani mlečni napici 1,5 % UPI i 3,0% UPI sadrže 0,25 g/100g i 0,28 g/100g galaktoze, respektivno, dok odgovarajući uzorci proizvedeni uz primenu transglutaminaze imaju galaktoze redom: 0,69 g/100g (uzorak 1,5% UPI+TG) i 0,49 g/100g (uzorak 3,0% UPI+TG).

GLUKOZA I FRUKTOZA

Pored galaktoze, produkti metabolizma inokuluma čajne gljive u mleku su monosaharidi: glukoza i fruktoza. D-glukoza i D-fruktoza su monosaharidi koji uobičajeno nastaju fermentacijom kombuhe na crnom čaju zaslađenom saharozom (Dufresne i Farnworth, 2000; Greenwalt, 2000; Jaybalan i sar., 2007). Tokom fermentacije nastaje izvesna količina D-glukoze i neznatne količine D-fruktoze. Sadržaj navedenih monosaharida je najviši u fermentisanom mlečnom napitku sa 1,5% UPI+TG.

Sa slike 26 vidi se da sadržaj glukoze varira od 0,06 g/100g (uzorak 10% I) do 0,39% (3% UPI), dok se sadržaj fruktoze kreće 0,04 g/100g (uzorak 15%I) do 0,32 g/100g (uzorak 3% UPI). Sadržaj glukoze je veći u uzorcima proizvedenim uz primenu TG i KPS u poređenju sa odgovarajućim uzorcima dobijenim uz korišćenje nativnog inokuluma bez dodatka. Takođe, funkcionalni napici proizvedeni sa uparenim inokulumom sadrže znatno veću količinu glukoze i fruktoze u odnosu na napitke dobijene primenom nativnog i mikrofiltriranog inokuluma. Dominantna zastupljenost glukoze u odnosu na fruktozu može se objasniti činjenicom da se glukoza dobija iz dva šećera: laktoze i saharoze, dok fruktoza samo iz saharoze. Broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u polaznom inokulumu za proizvodnju napitka takođe ima značajan uticaj na transformacije pojedinih komponenata. Manji sadržaj glukoze u napicima proizvedenim uz primenu inokuluma koncentrovanog mikrofiltracijom rezultat je korišćenja inokuluma koji sadrži veću količinu BSK i kvasaca od nativnog inokuluma i uparenog inokuluma što je doprinelo intenzivnijoj razgradnji glukoze.



Slika 26. Sadržaj glukoze i fruktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

Belloso-Morales i sar. (2003) su pratili promenu sadržaja glukoze i galaktoze tokom fermentacije napitaka od surutke dodatkom čajne gljive. Ukupna koncentracija glukoze i galaktoze je opadala u svim varijantama fermentisanog napitka od surutke inokulisanog čajnom gljivom. Početna koncentracija sadržaja glukoze i galaktoze u napitku od rekonstituisane slatke i sveže surutke iznosila je 0,3 g/100g, dok je posle 100 sati fermentacije opala za 33%, a u napitku od kisele surutke sadržaj glukoze i galaktoze se smanjio od 0,175 g/100g do 0,075 g/100g. Generalno posmatrano, ukupan sadržaj glukoze i galaktoze u napitku od surutke inokulisanom čajnom gljivom je viši pre i na početku fermentacije u odnosu na sadržaj u mleku, ali je niži posle 100 sati fermentacije u poređenju sa fermentisanim mlečnim napitkom proizvedenim sa čajnom gljivom.

MLEČNA KISELINA

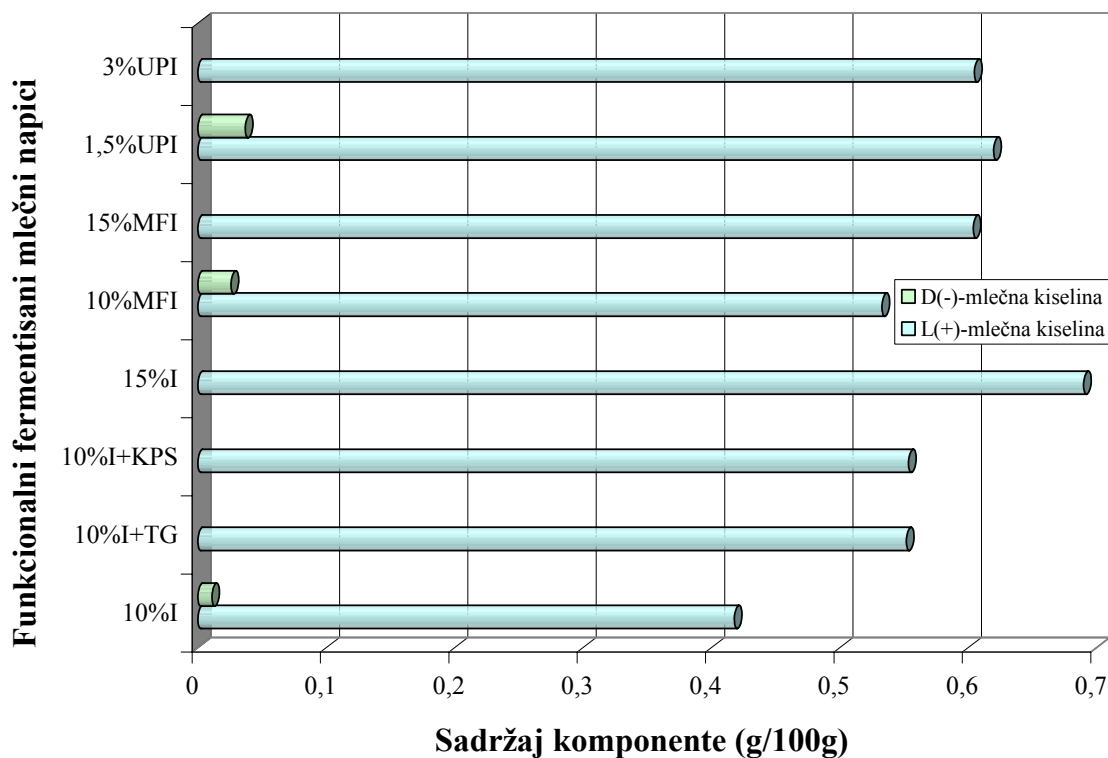
L-mlečna kiselina nastaje kao rezultat razgradnje laktoze. Sadržaj L-mlečne kiseline varira u uzorcima od 0,42 g/100g (10% I) do 0,69 g/100g (15% I) (slika 27). Sadržaj L-mlečne kiseline najniži je u uzorcima proizvedenim primenom nativnog inokuluma (10%I i 15%I). Uzorci proizvedeni primenom mikrofiltriranog inokuluma imaju različit sadržaj mlečne kiseline, odnosno uzorak 15% MFI ima veći sadržaj od uzorka proizvedenog uz primenu 10% MFI. Fermentisani mlečni napici sa uparenim inokulumom imaju veoma ujednačen sadržaj L-mlečne kiseline i nešto viši u odnosu na uzorke sa mikrofiltriranim inokulumom. Funkcionalni mlečni napici proizvedeni uz primenu TG imaju viši sadržaj L-mlečne kiseline u poređenju sa odgovarajućim bez TG. Sadržaj L-mlečne kiseline je u visokoj korelaciji sa sadržajem laktoze u napicima nakon proizvodnje.

Generalno posmatrano sadržaj L-mlečne kiseline je u uzorcima proizvedenim primenom nativnog i mikrofiltriranog inokuluma za oko 50% niži, a u uzorcima dobijenim uparenim inokulumom čajne gljive je za 44% niži u poređenju sa probiotskim jogurtom. Dodatak transglutaminaze u mleko pre proizvodnje funkcionalnog napitka značajno doprinosi transformaciji laktoze u mlečnu kiselinu, čime se razlika u krajnjem sadržaju L-mlečne kiseline u napicima i probiotskom jogurtu smanji za 38%.

Viši sadržaj L-mlečne kiseline u uzorcima mleka fermentisanih dodatkom čajne gljive je izuzetno bitan i veoma koristan za kvalitet ovako proizvedenih napitaka. Evidentno je da fermentisani mlečni napitak sa 15%I ima veći sadržaj L-mlečne kiseline, odnosno D-mlečne kiseline u poređenju sa kontrolnim uzorkom i funkcionalnim fermentisanim mlečnim napitkom proizvedenim sa 10%I. Osim toga, metabolizam čajne gljive tokom fermentacije laktoze kao primarnog šećera u mleku pomen je u pravcu produkcije L-mlečne kiseline.

Tokom proizvodnje napitka od surutke sa dodatkom čajne gljive (Belloso-Morales i sar., 2003) sadržaj L-mlečne kiseline raste različitom dinamikom u zavisnosti od vrste supstrata. Najveća koncentracija L-mlečne kiseline je postignuta u napitku od kisele surutke i kretala se od 3,75g/L do 6g/L (posle 100 sati fermentacije) što približno odgovara prosečnom sadržaju L-mlečne kiseline u ispitanim funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima. Belloso-Morales i sar. (2003) su konstatovali da se sadržaj L-mlečne kiseline u slatkoj surutki i slatkoj rekonstituisanoj surutki tokom fermentacije čajnom gljivom kreće od 0,09 g/100g do 0,3 g/100g, što je znatno niže nego u proizvedenim funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima. Sadržaj L-mlečne kiseline u napitku od čajne gljive tokom fermentacije je najniži i kreće se od 0,05 g/100g do 0,1 g/100g posle 100 sati fermentacije na 32°C.

Sadržaj D-mlečne kiseline analiziran u odabranim uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka je nizak i prosečno iznosi 0,03 g/100g.



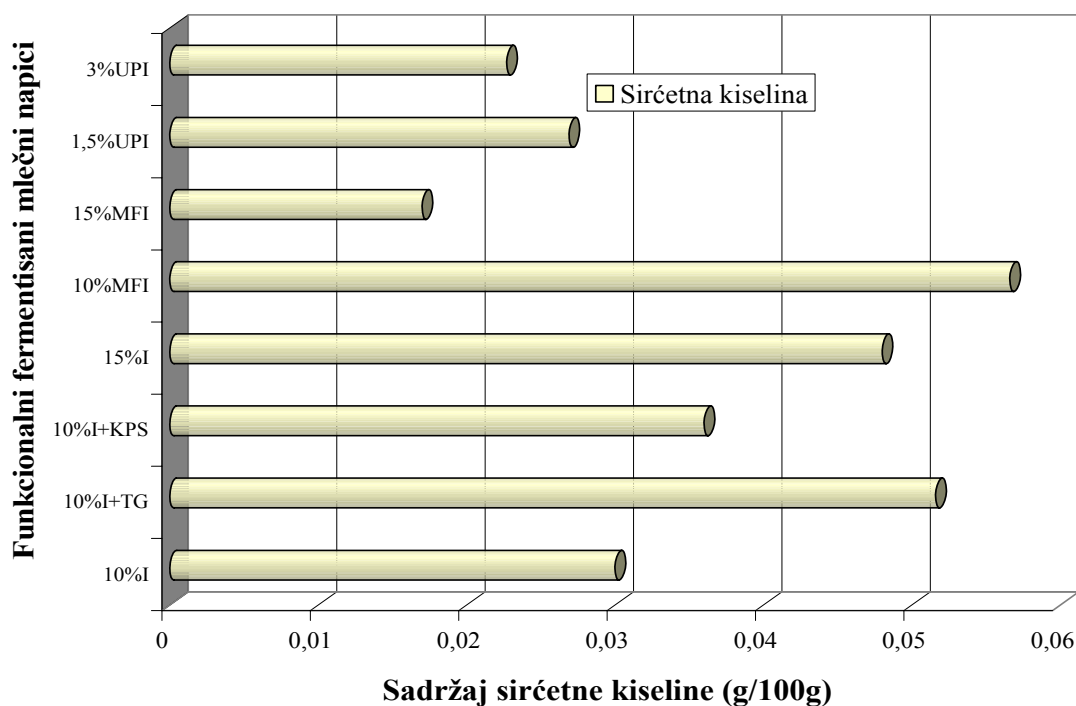
Slika 27. Sadržaj L- i D-mlečne kiseline u odabranim funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

SIRČETNA KISELINA

U fermentaciji čajne gljive sirćetna kiselina nastaje iz etanola, koga u sirćetnu kiselinu prevode bakterije sirćetne kiseline. Iako su u čajnoj gljivi bakterije sirćetne kiseline veoma značajne, zapaža se da prilikom fermentacije mleka uz korišćenje čajne gljive nastaje veoma mali sadržaj sirćetne kiseline. Nizak sadržaj sirćetne kiseline u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima može se objasniti činjenicom da je fermentacija mleka mnogo kraća u odnosu na fermentaciju čajne gljive na crnom čaju sa saharozom, odnosno da je sirćetnim bakterijama potreban duži period za adaptaciju.

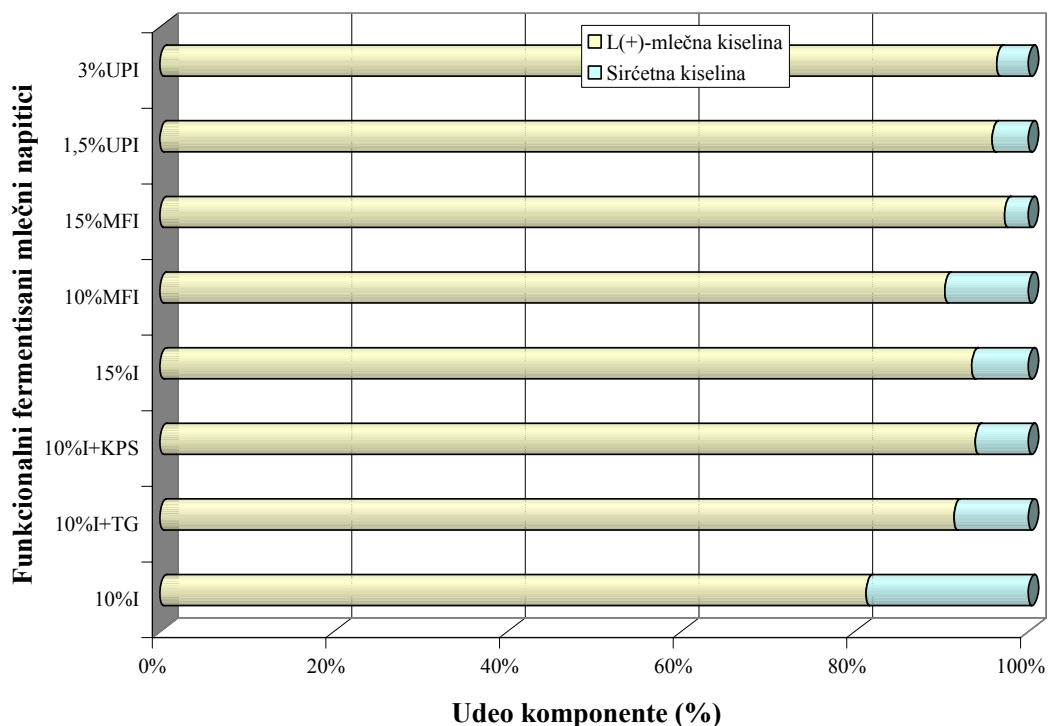
Bez obzira na veoma nizak sadržaj sirćetne kiseline u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima sa slike 28 se vidi neujednačenost između uzoraka. Sadržaj sirćetne kiseline je najviši u napitku 10% I – 0,095 g/100g, dok uzorak 15% MFI ima najniži sadržaj – 0,015 g/100g. Generalno posmatrano, uzorci sa nižom koncentracijom inokuluma (10% I, 10% MFI i 1,5% UPI) imaju veću količinu sirćetne kiseline od uzoraka sa većom koncentracijom odgovarajućeg inokuluma čajne gljive.

Generalno posmatrano, sadržaj sirćetne kiseline u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima je niži od rezultata autora Beloso – Morales i sar. (2003) koji su ispitali sadržaj sirćetne kiseline u fermentisanim napicima od surutke sa čajnom gljivom.



Slika 28. Sadržaj sirćetne kiseline u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

Navedeni autori su konstatovali da sadržaj sirćetne kiseline u crnom čaju inokulisanom čajnom gljivom najbrže raste tokom 100 sati fermentacije i kreće se od 0,015 g/100g do 0,1 g/100g, dok u uzorcima slatke i kisele surutke trend promene L-mlečne kiseline je nepravilan odnosno u početku raste, a potom opada do 0,03 g/100g.



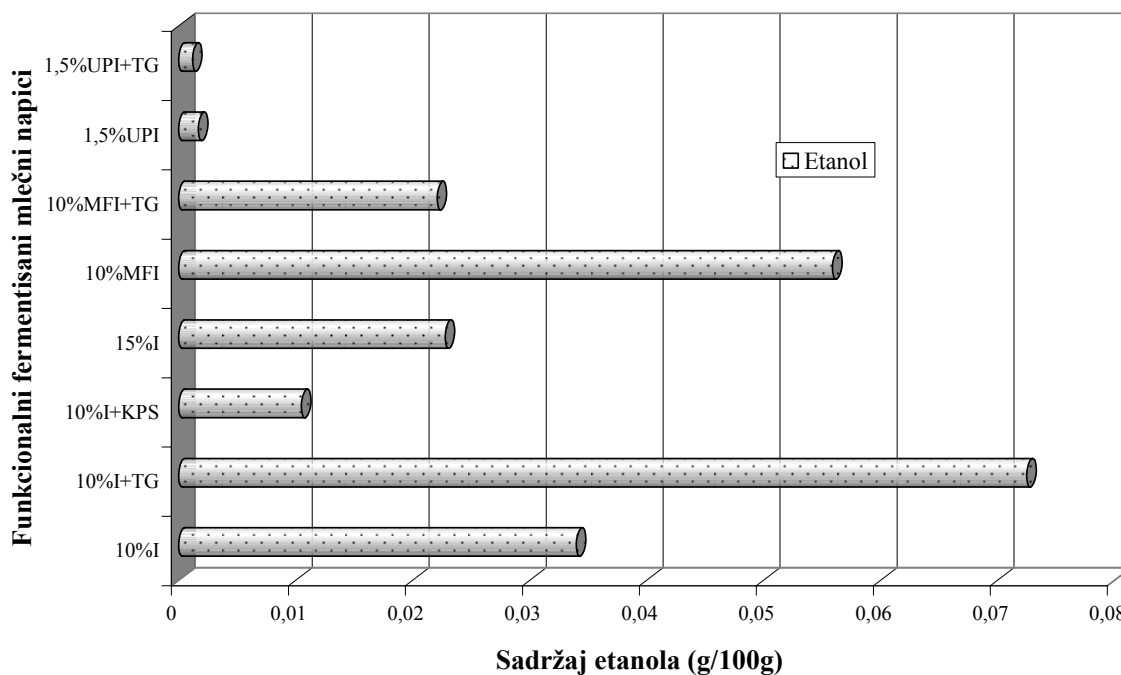
Slika 29. Udeo L-mlečne kiseline i sirćetne kiseline u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

Vrednosti sadržaja sirćetne kiseline u crnom čaju sa čajnom gljivom posle 96 sati fermentacije maksimalno iznose 0,105 g/100g, odnosno vrednosti su niže u poređenju sa rezultatima Blanc (1996) koji su utvrdili da posle 5 dana fermentacije sadržaj sirćetne kiseline iznosi 0,5 g/100g, dok je nakon 10 dana fermentacije 0,21 g/100g. Funkcionalni fermentisani mlečni napici sadrže preko 90% L-mlečne kiseline, ostatak čini sirćetna kiselina, dok je D-mlečna prisutna u tragovima (slika 29).

ETANOL

Etanol je takođe jedna od komponenata nastalih razgradnjom fruktoze usled metaboličke aktivnosti kvasaca. Rezultati sa slike 30 pokazuju da je u svim proizvodima sadržaj etanola neznatan odnosno detektovan je samo zahvaljujući veoma osetljivoj enzimskoj metodi. Sadržaj etanola je najveći u uzorku proizvedenom uz primenu 10% I i uz korišćenje TG i iznosi 0,072 g/100g, a najniži je u uzorcima proizvedenim sa inokulumom koncentrovanim uparavanjem (prosečno iznosi 0,009 g/100g). Sadržaj etanola je za 35% niži u uzorku sa 15% I u poređenju sa uzorkom 10% I. Funkcionalni fermentisani mlečni napici proizvedeni sa čajnom gljivom sadrže znatno manje etanola u poređenju sa literaturnim podacima, odnosno crnom čaju sa čajnom gljivom gde se sadržaj etanola kreće od 0,134 g/100g do 0,811 g/100g (Belloso-Morales i sar., 2003).

Razlike u sadržaju etanola između funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka rezultat su različitog sadržaja saharoze (tabela 12) i ukupnog broja i odnosa bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u polaznom inokulumu (tabela 13). Broj BSK:broj kvasaca je 1:400 u mikrofiltriranom inokulumu; 1:4000 u nativnom inokulumu, dok je u inokulumu koncentrovanom uparavanjem odnos BSK:kvasci = 1:1 što je značajno doprinelo razgradnji komponenata tokom proizvodnje napitaka različitim metaboličkim putevima, odnosno neujednačenom sadržaju produkovanih metabolita u finalnom proizvodu.



Slika 30. Sadržaj etanola u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje.

MINERALI

Sadržaj minerala u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima prikazan je u tabeli 16.

U navedenim uzorcima najzastupljeniji je kalcijum čije vrednosti variraju od 1154 mg/kg (10% I, 2,2% masti) do 1447 mg/kg (3,0% UPI). Drugi mineral po zastupljenosti u napicima je kalijum, a potom su natrijum i magnezijum. Ostali analizirani minerali: Pb, Cd, Zn i Cu zastupljeni su u napicima u veoma malim koncentracijama. Rezultati sadržaja minerala su u skladu sa literaturnim podacima Renner i sar. (1989). Imajući u vidu značaj minerala u ishrani može se reći da funkcionalni fermentisani mlečni napici predstavljaju veoma bogat izvor kalcijuma i kalijuma.

Tabela 16. Sadržaj minerala u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima

Sadržaj (mg/kg)	Fermentisani mlečni napici					
	iz mleka sa 0,9% masti					iz mleka sa 2,2% masti
	10% I	10% MFI	15% MFI	1,5% UPI	3,0% UPI	10% I
Mg	125	132	133	144	166	122
Ca	1210	1211	1178	1243	1477	1154
K	794	898	969	1009	1292	846
Na	721	692	617	662	709	661
Pb	3,80	2,29	2,23	2,24	2,36	1,93
Cd	0,31	0,18	0,18	0,18	0,19	0,16
Zn	4,25	4,10	4,05	4,29	4,97	3,54
Cu	0,06	0,18	0,18	0,13	0,20	0,04

VITAMINI

Sadržaj vitamina C u inokulumu čajne gljive, mleku sa 0,9% i 2,2% masti i u odgovarajućim napicima prikazan je u tabeli 17. Evidentno je da inokulum čajne gljive sadrži značajno veću količinu vitamina C nego mleko. Sadržaj vitamina C u inokulumu čajne gljive je u skladu sa literaturnim podacima (Malbaša, 2009). Međutim tokom fermentacije mleka primenom čajne gljive proizvodi se značajna količina vitamina C koja iznosi 11,06 mg/100g (uzorak 10% I iz mleka sa 0,9% mlečne masti), odnosno 8,84 mg/100g (uzorak 10% I iz mleka sa 2,2% mm). U literaturi je poznato da prosečan sadržaj vitamina C u jogurtu iznosi 1,0 mg/100g (Tamime i Robinson, 2004), odnosno značajno je niži u poređenju sa sadržajem vitamina C u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim korišćenjem inokuluma čajne gljive. Sadržaj vitamina C u fermentisanim mlečnim napicima dobijenim primenom čajne gljive je u skladu sa rezultatima autora Malbaša i sar. (2009) koji su utvrdili da prosečan sadržaj vitamina C u fermentisanom mlečnom proizvodu sa čajnom gljivom prosečno iznosi 13,47 mg/100g i predstavlja jedan od pokazatelja boljeg kvaliteta u poređenju sa jogurtom i kefirom. Takođe, navedeni autori su utvrdili da sadržaj mlečne masti nije drastično uticao na sadržaj vitamina C, što je evidentno i iz tabele 17.

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 tireoideje 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 oksigene molekule pri čemu sprečava pro-

mene u imunom sistemu, strukturi i funkciji pojedinih organa u humanom organizmu (Smolin i Grosvenor, 2000).

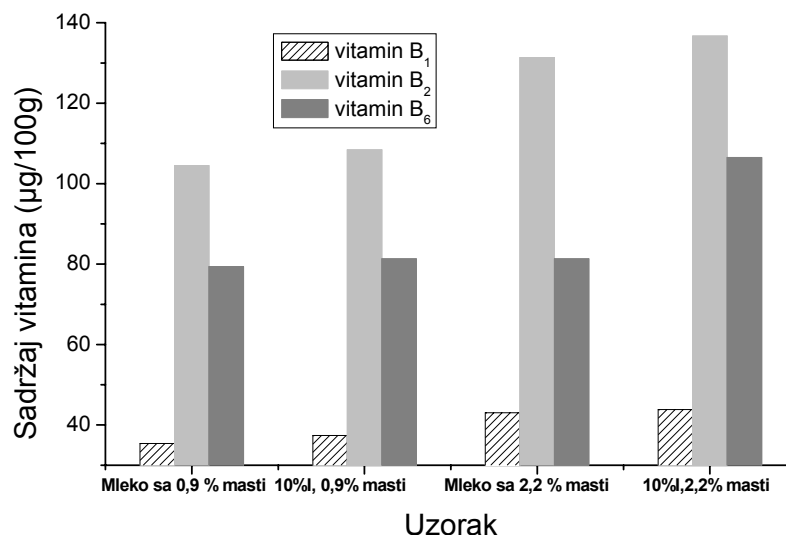
Imajući u vidu značaj vitamina C u ishrani, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se konzumiranjem 500 g fermentisanog mlečnog napitka dobijenog primenom čajne gljive mogu da se zadovolje dnevne potrebe za vitaminom C (tabela 17).

Tabela 17. Sadržaj vitamina C u inokulumu čajne gljive, mleku i funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima

Uzorak		Sadržaj vitamina C (mg/100g)
Inokulum čajne gljive		4,25
Mleko	sa 0,9% masti	0,06
	sa 2,2% masti	0,04
Napitak	10% I, 0,9% masti	11,06
	10% I, 2,2% masti	8,84

Sadržaj vitamina B kompleksa je značajno veći u mleku nego u inokulumu čajne gljive, pri čemu mleko sa 2,2% masti ima veći sadržaj vitamina B₁, B₂ i B₆ nego mleko sa 0,9% masti (slika 31).

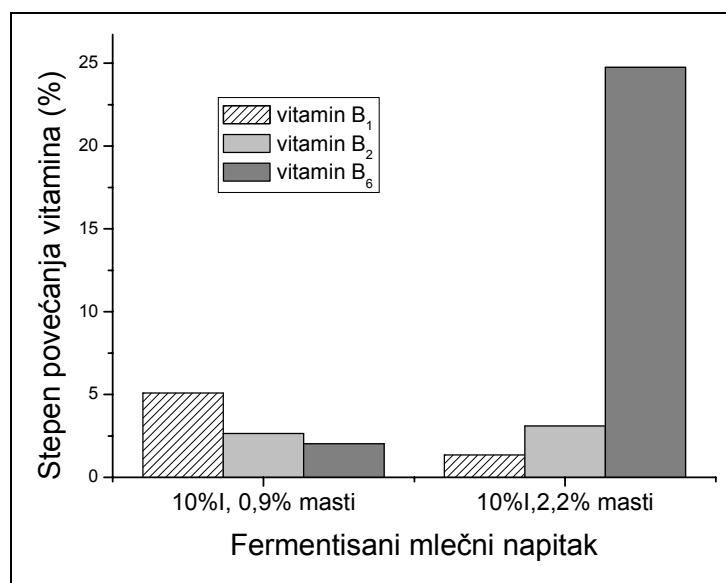
Na slici 31 prikazan je stepen povećanja sadržaja vitamina B₁, B₂ i B₆ u ispitivanim mlečnim napicima sa čajnom gljivom u odnosu na sadržaj u mleku. Tokom proizvodnje sadržaj vitamina B₁ poraste za 5,09%, vitamina B₂ za 2,65% i B₆ za 2,03%. U fermentisanom mlečnom napitku iz mleka sa 2,2% masti sadržaj vitamina B₆ je povećan za 24,76% u odnosu na sadržaj u polaznom mleku.



Slika 31. Sadržaj vitamina B₁, B₂ i B₆ u odabranim funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima.

Generalno posmatrano fermentisani mlečni napici proizvedeni primenom čajne gljive iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti sa dodatkom 10% inokuluma čajne gljive sadrže najviše vitamina B₂ koji iznosi 108 (µg/100g), odnosno 136(µg/100g). Dobijene vrednosti su za 94% odnosno

84% niže u odnosu na sadržaj navedenog vitamina u odnosu na literaturne podatke – jogurt proizveden primenom tradicionalne starter kulture (Tamime i Robinson, 2004).



Slika 32. Stepen povećanja sadržaja vitamina B₁, B₂ i B₆ u odabranim funkcionalnim fermentisanim napicima u odnosu na sadržaj u mleku.

Povećanje sadržaja vitamina B kompleksa u odnosu na sadržaj u mleku može se povezati sa mikrobiološkim sastavom napitka nakon proizvodnje (slika 32). Broj BSK i BMK je znatno veći u odnosu na broj kvasaca, što je i doprinelo produkciji vitamina.

Tabela 18. Zadovoljenje dnevnih potreba vitamina B₁, B₂, B₆ i vitamina C kod dece i odraslih konzumiranjem funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka

Vitamins	DRI ^{ab} (mg/dan)		Konzumiranje napitka 10% I, 0,9% masti (g/dan)		Konzumiranje napitka 10% I, 2,2% masti (g/dan)		Udeo dnevnih potreba koje zadovolji 100g 10% I, 0,9% masti (%)	Udeo dnevnih potreba koje zadovolji 100g 10% I, 2,2% masti (%)
	Deca	Odrasli	Deca	Odrasli	Deca	Odrasli	Odrasli	Odrasli
C	40	50	362	452	453	566	22	18
B₁	0,5	1,1	150	294	112,5	251	40	34
B₂	0,5	1,2	50	110	36,57	88	113	90
B₆	0,5	1,4	65	172	47	132	76	58

^a Smolin i Grosvenor (2000)

^b DRI (Dietary Reference Intakes) – set nativa za unos nutrijenata radi planiranja i ocene dijete za zdrave ljude u SAD i Kanadi.

Poznato je da vitamin B₁ predstavlja veoma važan element u procesu razgradnje glukoze; B₂ je bitan u ciklusu trikarbonskih kiselina gde se formira FAD koji se koristi za transport elektrona, a B₆ je neophodan za metabolizam i sintezu esencijalnih aminokiselina u humanom organizmu. Nedostatak vitamina B kompleksa izaziva brojne poremećaje u orga-

nizmu čoveka koji se primarno odražavaju na nervni i kardiovaskularni sistem i praćeno je padom imuniteta (Smolin i Grosvenor, 2000).

Konзумiranjem 150g napitka 10% I (iz mleka sa 0,9% masti) i 112,5g napitka 10% I (iz mleka sa 2,2% masti) mogu da se zadovolje dnevne potrebe dece za vitaminima B₁, B₂ i B₆.

Kod odraslih je potreba za navedenim vitaminima značajno veća i trebalo bi dnevno uneti oko 300g napitka (tabela 18).

MASNE KISELINE

Komparativni prikaz sastava masnih kiselina u fermentisanim napicima iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti dat je u tabeli 19.

Tabela 19. Sastav masnih kiselina u uzorcima fermentisanih mlečnih proizvoda izražen kao udeo (%) u ukupnom sadržaju masnih kiselina

Masna kiselina	10% I, 0,9 % masti	10% I, 2,2 % masti
4:0 (buterna)	4,2	3,8
6:0 (kapronska)	3,1	4,0
8:0 (kaprilna)	1,7	2,3
10:0 (kaprinska)	3,3	3,3
neidentifikovana	-	0,5
12:0 (laurinska)	3,3	3,3
neidentifikovana	0,8	0,5
neidentifikovana	6,6	3,3
14:0 (miristinska)	11,7	12,1
14:1	0,6	1,2
15:0	0,6	1,2
16:0 (palmitinska)	29,9	29,3
16:1 (cis+trans)	2,4	1,9
17:0	-	0,2
18:0 (stearinska)	8,5	8,5
18:1 (cis+trans) (oleinska)	20,1	22,1
18:2 (linoleinska) (cis+trans+konjug.)	2,1	1,7
18:3 (linolenska)	0,6	0,3
20:0 (arahidonska)	0,4	0,4

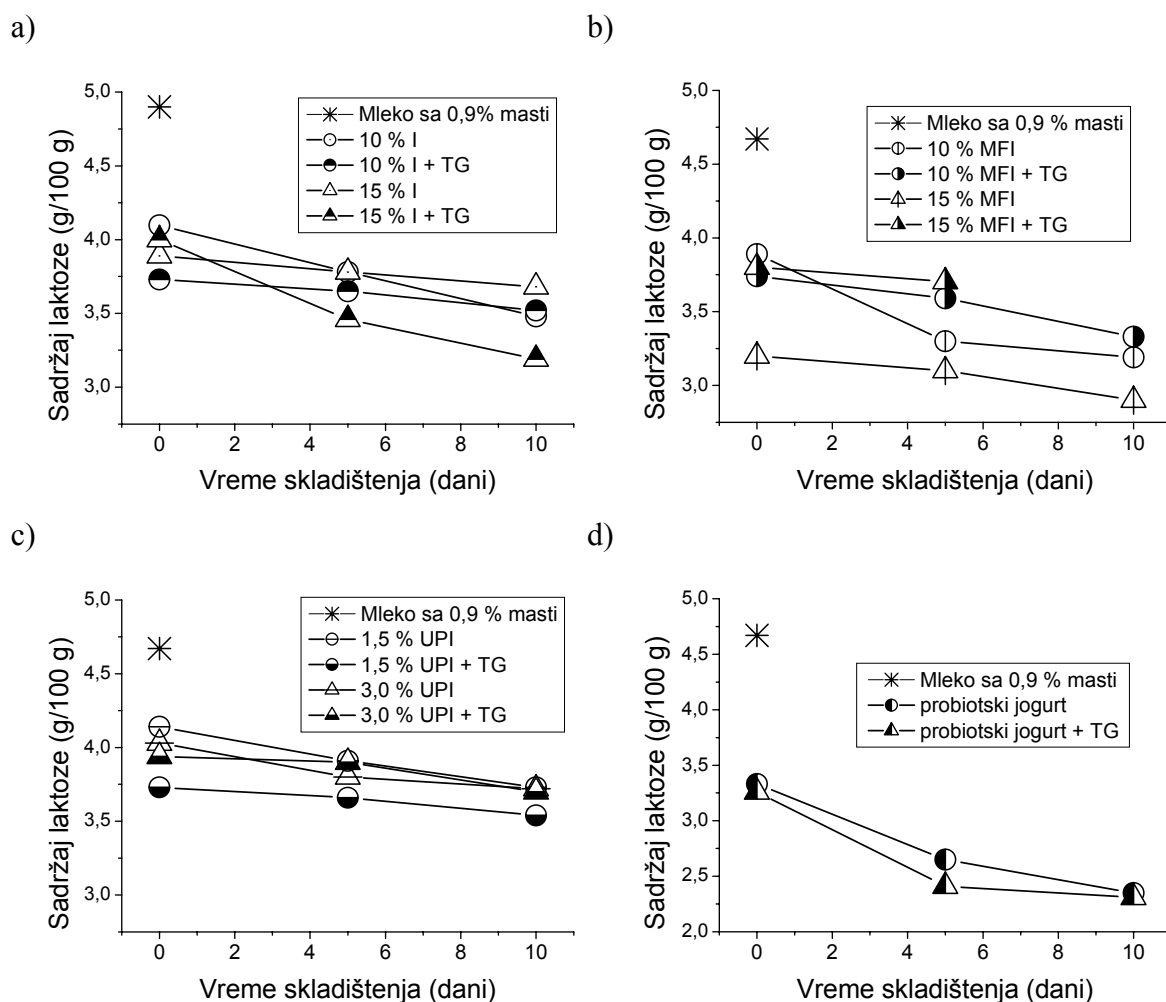
Evidentno je da je u oba uzorka najzastupljenija palmitinska kiselina C16:0 (cis+trans) čiji udeo iznosi 29,9% (uzorak 10% I iz mleka sa 0,9 % mm), odnosno 29,3 % (uzorak 10% I iz mleka sa 2,2 % mm). Udeo nižih masnih kiselina u uzorcima je veoma ujednačen. Rezultati udela masnih kiselina u fermentisanim mlečnim napicima mogu se porediti sa istraživanjima autora Guler (2008). U navedenom radu je ispitivan stepen lipolize u čvrstom jogurtu dobijenom iz mleka sa 3,5% mlečne masti primenom tri različite starter kulture: YC-350, YF-3331 i CH-1. Poređenjem ukupnog sadržaja slobodnih masnih kiselina u mleku i uzorcima jogurta utvrđeno je da najveći stepen lipolize masti se postiže pri proizvodnji jogurta primenom starter kulture YC-350 (ukupan sadržaj SMK iznosi 539µg/100g). U čvrstom jogurtu dobijenom primenom starter kulture YC-350 najzastupljenije su palmitinska i oleinska kiselina čiji udeo u ukupnim masnim kiselinama iznosi 33%, odnosno 36%. Navedene vrednosti su za 44% više u poređenju sa udelom masnih kiselina u fermentisanom mlečnom

napitku proizvedenom sa 10% inokuluma čajne gljive dobijenom iz mleka sa 2,2 % masti, što se može objasniti činjenicom da je čvrsti jogurt proizveden iz mleka sa većim sadržajem masti tj. 3,5% masti.

PROMENA SADRŽAJA KOMPONENATA TOKOM SKLADIŠTENJA FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

LAKTOZA

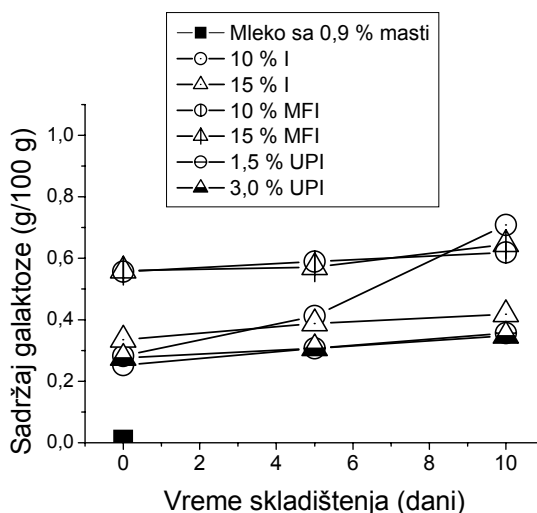
Sadržaj laktoze u svim uzorcima opada tokom skladištenja, pri čemu se dinamika razlikuje u zavisnosti od vrste korišćenog inokuluma. Najveće razlike u koncentraciji laktoze su desetog dana (najniža vrednost laktoze je u probiotskim napicima sa MFI, a najmanji trend promena je u uzorcima sa UPI) (slika 33). Navedene razlike su rezultat ukupnog broja i odnosa BSK i kvasaca u korišćenim inokulumima, kao i sadržaja ugljenih hidrata.



Slika 33. Promena sadržaja laktoze tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom: a) nativnog inokuluma; b) inokuluma koncentrovanog mikrofiltracijom; c) inokuluma koncentrovanog uparavanjem; d) probiotske starter kulture.

GALAKTOZA

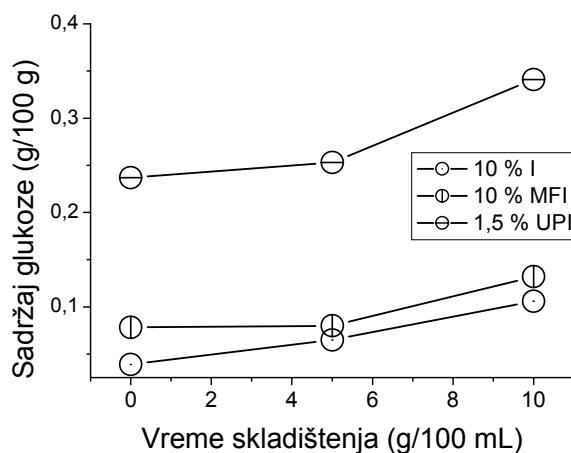
Sadržaj galaktoze raste u svim uzorcima i u skladu je sa sadržajem laktoze, čijom razgradnjom nastaje (slika 34).



Slika 34. Promena sadržaja galaktoze tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive.

GLUKOZA

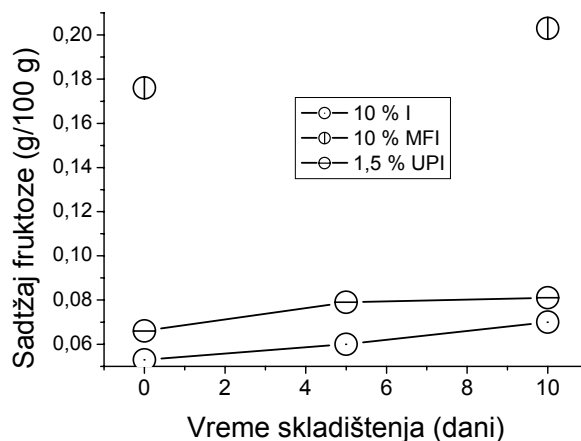
Sadržaj glukoze u odabranim funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima raste tokom skladištenja i najveći je u uzorku proizvedenom uz primenu uparenog inokuluma čajne gljive – 0,25 g/100g (slika 35).



Slika 35. Promena sadržaja glukoze tokom skladištenja odabranih funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive.

FRUKTOZA

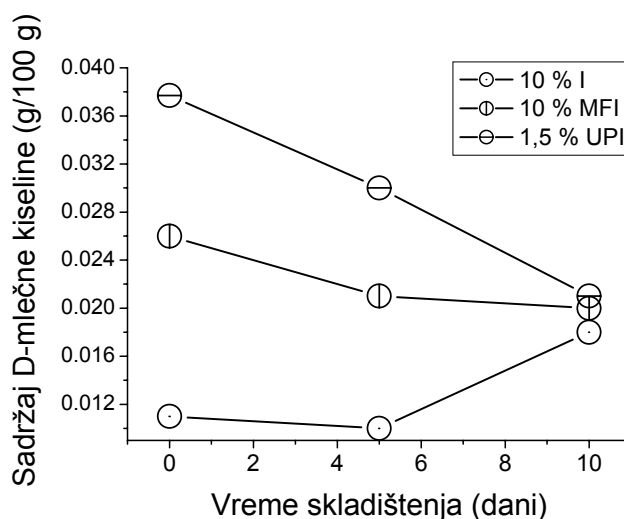
Sadržaj fruktoze u funkcionalnim fermentisanim napicima ima isti trend kao i sadržaj glukoze tokom skladištenja uzoraka. Međutim, vrednosti su znatno niže i kreću se od 0,01 do 0,07 g/100g, odnosno oko 0,18 g/100g (napitak 1,5% UPI) (slika 36).



Slika 36. Promena sadržaja fruktoze tokom skladištenja odabranih funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive.

D-MLEČNA KISELINA

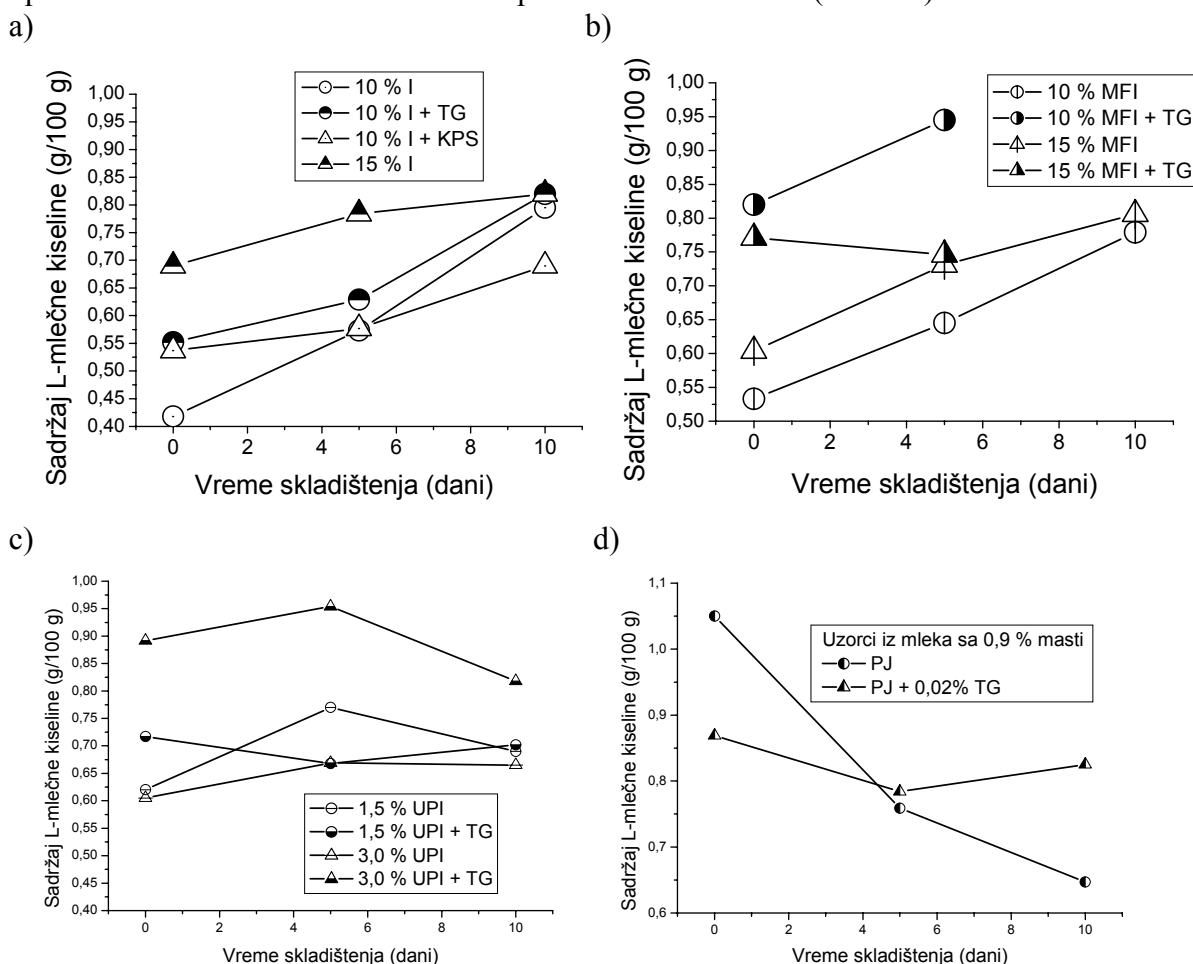
Sadržaj D-mlečne kiseline je znatno niži od sadržaja L-mlečne kiseline i opada u funkcionalnim fermentisanim napicima MFI i UPI, dok blago raste u uzorku 10% I (slika 37).



Slika 37. Promena sadržaja D-mlečne kiseline tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive.

L-MLEČNA KISELINA

Sadržaj L-mlečne kiseline raste u uzorcima sa inokulumom čajne gljive (I) i MFI, dok opada u uzorcima sa UPI i uzorcima sa probiotskom kulturom (slika 38).

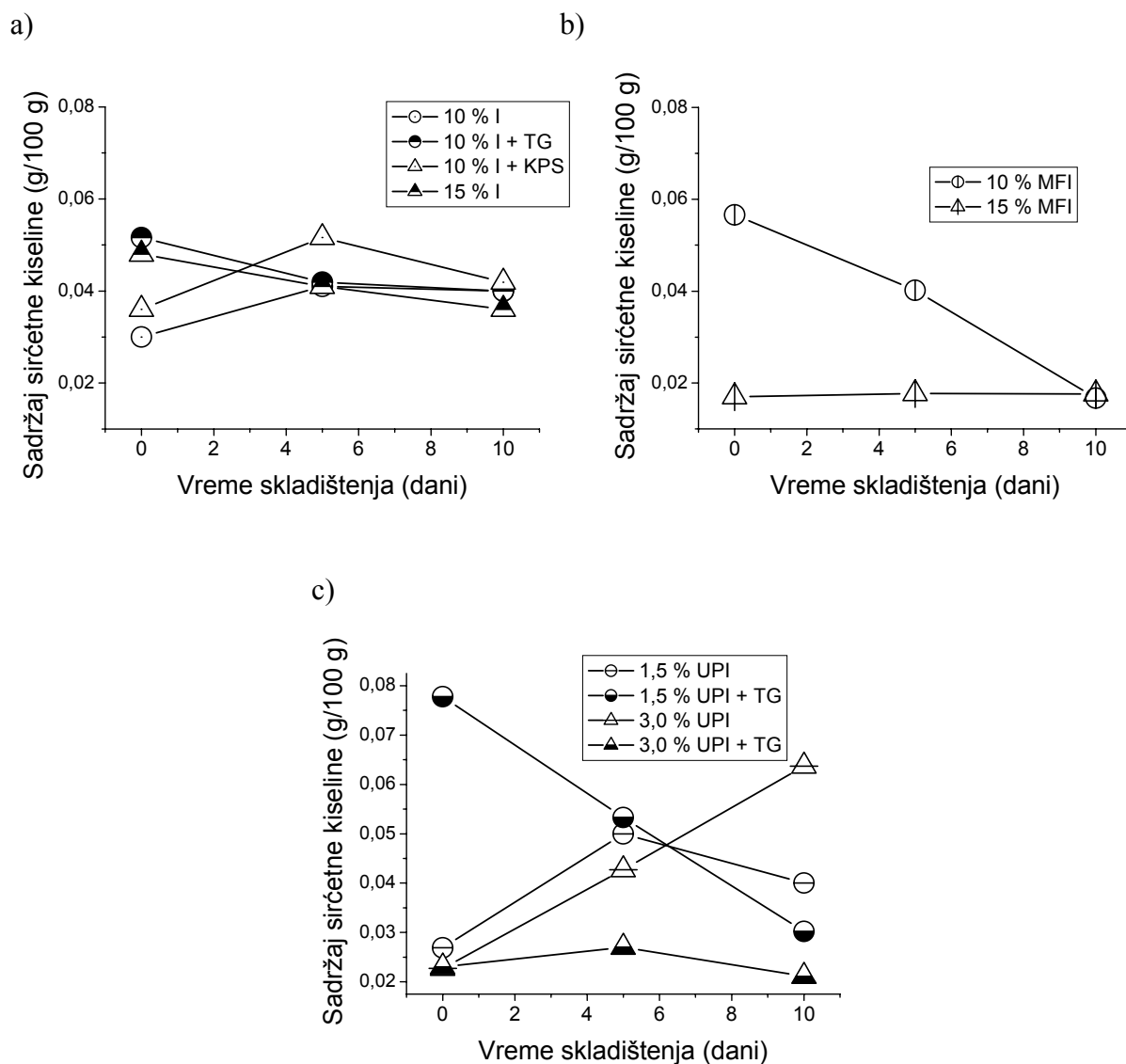


Slika 38. Promena sadržaja L-mlečne kiseline tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom: a) nativnog inokuluma; b) inokuluma koncentrovanog mikrofiltracijom; c) inokuluma koncentrovanog uparavanjem; d) probiotske starter kulture.

Poznato je da odnos D- i L-mlečne kiseline varira u zavisnosti od sastava starter kulture i obično jogurt sadrži 45-60% L-mlečne kiseline i 40-55% D-mlečne kiseline (Tamime, 2006). Puhan i sar. (1973) su ispitivanjem 269 uzoraka komercijalnog jogurta utvrdili da se odnos D- i L-mlečne kiseline kreće od 0,34 do čak 8,28 (gde je dominantno zastupljena L-mlečna kiselina).

SIRČETNA KISELINA

Sadržaj sirčetne kiseline prikazan ja na slici 39. Evidentno je da sadržaj sirčetne kiseline opada tokom skladištenja, a posle 10 dana je najveći u uzorku 3% UPI. Broj i vrsta mikroorganizama u korišćenom inokulumu imaju direktan uticaj na metaboličke transformacije komponenata mleka tokom skladištenja funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka.

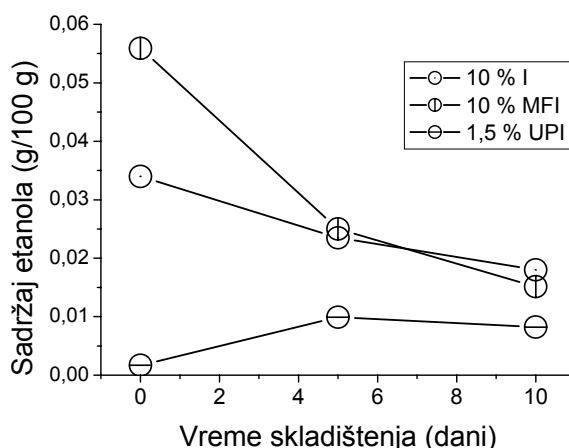


Slika 39. Promena sadržaja sirćetne kiseline tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primeenom inokuluma čajne gljive: a) kultivisane na crnom čaju zaslađenom saharozom; b) koncentrovanog mikrofiltracijom; c) koncentrovanog uparavanjem.

ETANOL

Sadržaj etanola (slika 40), u uzorku 1,5% UPI je manji nego u uzorcima 10% I i 10% MFI, obzirom da uzorak inokuluma UPI ima znatno manji broj kvasaca od inokuluma I i MFI koji produkuju etanol iz sirćetne kiseline.

Sadržaj etanola tokom skladištenja opada u uzorcima I i MFI, a raste u uzorcima sa UPI.



Slika 40. Promena sadržaja etanola tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive.

MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Sve do sada navedene karakteristike funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka (hemijski sastav, sadržaj metabolita, fizičko-hemijske karakteristike proizvoda) primarno zavise od sastava i osobina inokuluma čajne gljive i mleka. Sastav inokuluma je direktno povezan sa prethodnim tretmanom tako da je utvrđeno da nativni inokulum čajne gljive (pre koncentrisanja) sadrži $1 \cdot 10^2$ ćelija/mL BSK i $4,05 \cdot 10^5$ ćelija/mL kvasaca, dok se koncentrisanjem (MF ili uparavanjem) navedeni odnos menja. Inokulum koncentrovan mikrofiltracijom ima $2 \cdot 10^3$ ćelija/mL BSK i $8 \cdot 10^5$ ćelija/mL kvasaca, odnosno broj bakterija se koncentriše 20 puta, a kvasaca 2 puta i odnos BSK:kvasci = 1:100. Koncentrisanjem inokuluma uparavanjem broj kvasaca se smanji za oko 100 puta tako da je odnos BSK:kvasci = 1:1 (tabela 13). To znači da ukupan broj i odnos BSK i kvasaca direktno utiče na tok fermentacije i definiše karakteristike finalnog proizvoda nakon proizvodnje i skladištenja.

U tabeli 20 prikazan je ukupan broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka.

Funkcionalni fermentisani mlečni napitak sa 10% I sadrži $2 \cdot 10^2$ ćelija/mL BSK i $5,6 \cdot 10^3$ ćelija/mL kvasaca, dok uzorak 15% I sadrži $2,7 \cdot 10^3$ ćelija/mL BSK i $9,0 \cdot 10^3$ ćelija/mL kvasaca. Uzorci fermentisanog mlečnog napitka proizvedeni sa KPS i TG imaju 3,5-4 puta veći sadržaj BSK i kvasaca nego uzorak bez TG i KPS.

Uzorak 10% MFI sadrži više BSK i kvasaca od uzorka proizvedenog sa većom koncentracijom inokuluma 15% MFI.

Funkcionalni napici proizvedeni uz primenu uparenog inokuluma imaju veći broj BSK i kvasaca koji redom iznosi: $6 \cdot 10^4$ ćelija/mL BSK i $3,3 \cdot 10^4$ ćelija/mL kvasaca (uzorak 1,5% UPI) i $7,6 \cdot 10^4$ BMK i $1,0 \cdot 10^5$ kvasaca (3,0% UPI).

Uzorci sa inokulumom imaju veći broj kvasaca nego BSK. Uzorci sa MFI imaju isti odnos BMK i kvasaca, dok najveći broj kvasaca i BMK imaju uzorci sa UPI. Dodatkom TG i KPS postiže se veći broj BMK i kvasaca. Takođe povećanjem sadržaja mlečne masti se povećava i broj mikroorganizama.

Tabela 20. Ukupan broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima

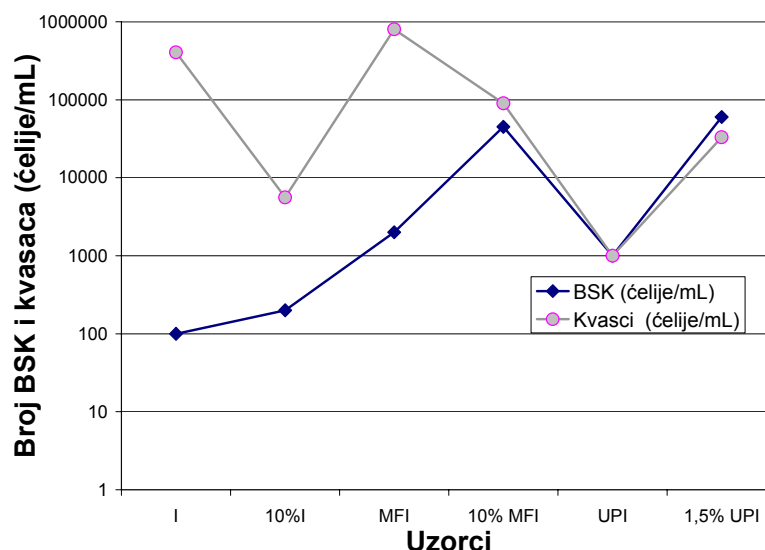
UZORAK	Broj ćelija/ml	
	Bakterije sirćetne kiseline	Kvasci
FERMENTISANI MLEČNI NAPICI iz mleka sa 0,9% mlečne masti		
10% I	2×10^2	$5,6 \times 10^3$
10% I+ TG	7×10^2	$1,6 \times 10^4$
10% I+KPS	$7,4 \times 10^2$	$6,7 \times 10^4$
15%I	$2,7 \times 10^3$	9×10^3
10% MFI	$4,5 \times 10^4$	9×10^4
15% MFI	$1,7 \times 10^4$	9×10^4
1,5% UPI	6×10^4	$3,3 \times 10^4$
3% UPI	$7,6 \times 10^4$	1×10^5
FERMENTISANI MLEČNI NAPICI iz mleka sa 2,2% mlečne masti		
10% I	7×10^3	$1,3 \times 10^4$
15% I	$2,5 \times 10^4$	5×10^4

Ukupan broj odabranih mikroorganizama u probiotskom jogurtu je znatno veći nego u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim sa čajnom gljivom. Prosečan broj analiziranih BMK u probiotskom jogurtu iznosi $4,04 \cdot 10^9$ ćelija/mL. Navedeni rezultati su u skladu sa istraživanjima autora Jaziri i sar. (2009) koji su ispitivali vijabilnost mikroorganizama tokom proizvodnje jogurta sa dodatkom crnog i zelenog čaja. Ispitivanja su pokazala da čaj nema značajan uticaj na ponašanje mikroorganizama tokom proizvodnje i skladištenja jogurta.

Takođe, Belloso-Morales i sar. (2003) su ispitivali udeo pojedinih grupa mikroorganizama u napitku proizvedenom iz rekonstituisane slatke surutke i utvrdili da 60% populacije pripada kvascu *Bretanomyces bruxelensis* koji fermentiše laktozu, 20% kvascu koji takođe fermentiše laktozu *Klyveromyces marxianus* i 20% kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. U slatkoj surutki, 75% populacije činilo je *Saccharomyces cerevisiae* i 25% *Klyveromyces cerevisiae*, dok je u kiseloj surutki 87,5% *Saccharomyces cerevisiae* i 12,5% *Klyveromyces marxianus*. Posle 4 dana fermentacije čajna gljiva kultivisana na crnom čaju imala je ukupan broj kvasaca $1,34 \cdot 10^7$ ćelija/mL, a ukupan broj bakterija iznosio je $6 \cdot 10^5$ ćelija/mL, tj. odnos kvasaca i BSK je bio 23:1. Rekonstituisani napitak od slatke surutke imao je ukupan broj mikroorganizama $9 \cdot 10^6$, tj. odnos kvasaca i bakterija je bio 5:1. Isti odnos je bio nakon 4 dana fermentacije u slatkoj i kiseljoj suruci.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da su kvasci dominantno prisutni u napicima proizvedenim pomoću čajne gljive na različitim supstratima: surutka (slatka i kisela) i rekonstituisana slatka surutka u odnosu na BSK, kao što je slučaj i u proizvedenim funkcionalnom fermentisanom mlečnom napitku (slika 41).

Probiotski jogurt (kontrolni uzorak) sadrži $2,6 \cdot 10^8$ ćelija/mL *Str. thermophilus*, $8 \cdot 10^7$ ćelija/mL *Lb. acidophilus* i $3,2 \cdot 10^7$ ćelija/mL *Bifidobacterium* (tabela 21).



Slika 41. Broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u inokulumu i funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti.

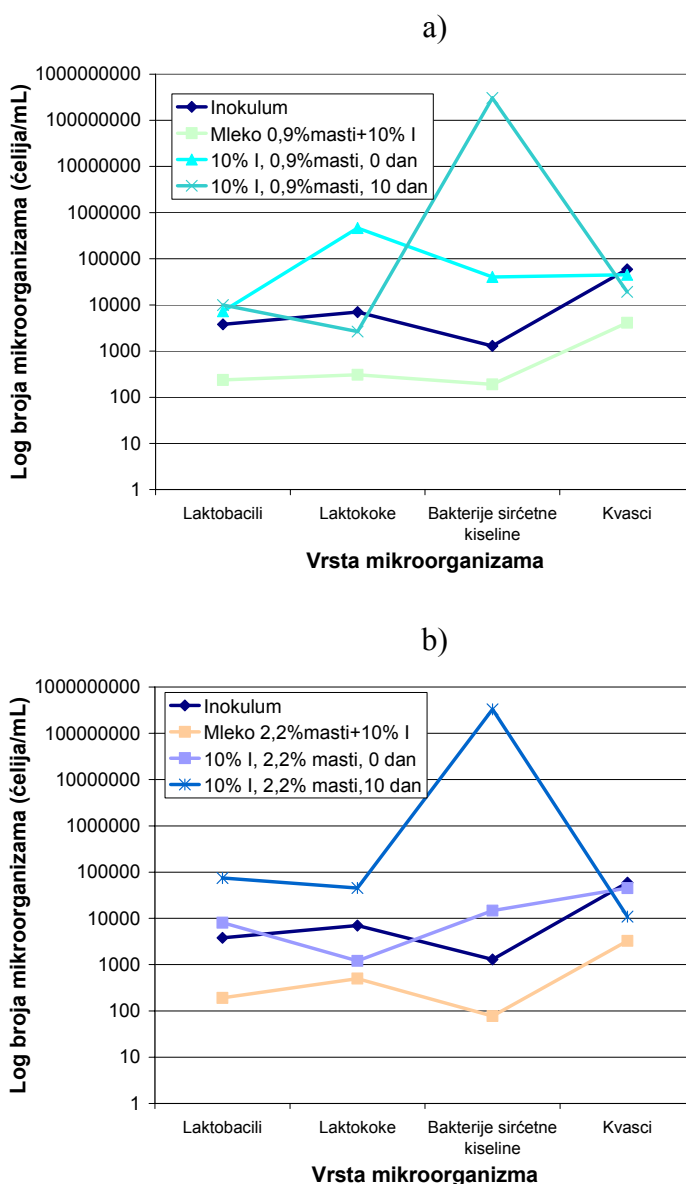
Tabela 21. Ukupan broj bakterija mlečne kiseline u probiotskom fermentisanom mlečnom napitku

Uzorak	Mikroorganizmi (broj ćelija/mL)		
	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Probiotski jogurt	$2,6 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$

Poređenje ukupnog broja mikroorganizama između uzoraka proizvedenih iz mleka sa 0,9% mlečne masti i 2,2% mlečne masti uz primenu 10% inokuluma čajne gljive (10% I) prikazano je na slici 42.

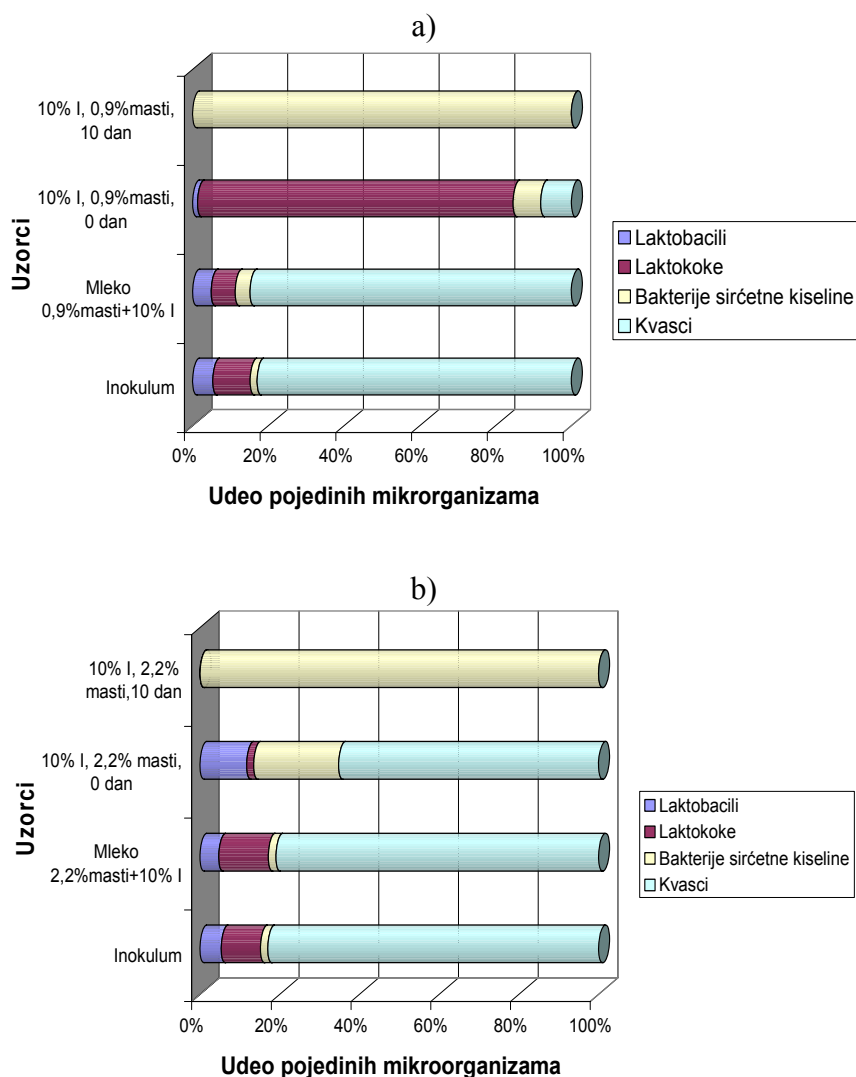
Broj analiziranih mikroorganizama (laktobacili, laktokoke, kvasci i BSK) je najniži na početku fermentacije (mleko sa dodatkom 10% inokuluma). Tokom fermentacije mleka primenom inokuluma čajne gljive povećava se broj svih mikroorganizama i značajno je veći u poređenju sa brojem u polaznom inokulumu. Nakon 10 dana skladištenja funkcionalnog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% masti broj laktobacila se neznatno menja, broj laktokoka opada, dok broj bakterija sirćetne kiseline značajno raste. Ukupan broj kvasaca se neznatno menja tokom skladištenja.

Između uzoraka fermentisanih napitaka proizvedenih sa 0,9 i 2,2% masti nema značajne razlike u trendu promene BSK i kvasaca, pri čemu je veći broj mikroorganizama u fermentisanom napitku iz mleka 0,9% masti. Broj laktobacila, laktokoka, BSK i kvasaca praćen je tokom proizvodnje i nakon 10 dana skladištenja fermentisanih mlečnih napitaka iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti. Evidentno je da je broj bakterija mlečne i sirćetne kiseline veoma ujednačen između uzoraka sa 0,9% i 2,2% masti, međutim broj kvasaca je veći u uzorku iz mleka sa 2,2% masti. Nakon 10 dana skladištenja broj laktobacila i laktokoka u fermentisanim napicima se veoma malo menja, dok broj bakterija mlečne kiseline poraste 10^4 puta.



Slika 42. Poređenje ukupnog broja mikroorganizama između uzoraka proizvedenih iz mleka sa: a) 0,9% mlečne masti i b) 2,2% mlečne masti.

Sa slike 43 evidentno je da su u inokulumu i mleku sa dodatkom inokuluma na početku fermentacije dominantno prisutni kvasci (prosečno 80%). Proizvedeni funkcionalni napitak iz mleka sa 0,9% masti nakon proizvodnje ima oko 10% kvasaca i 10% BSK, a ostatak čine BMK. Nakon 10 dana skladištenja dominantno su prisutne BSK. Inokulum i mleko sa 2,2% masti nakon dodatka inokuluma ima isti odnos mikroorganizama, dok je u fermentisanim mlečnim napicima nakon proizvodnje prisutan veći broj kvasaca (70%) i oko 20% BSK. Nakon 10 dana skladištenja takođe su dominantno prisutne BSK.



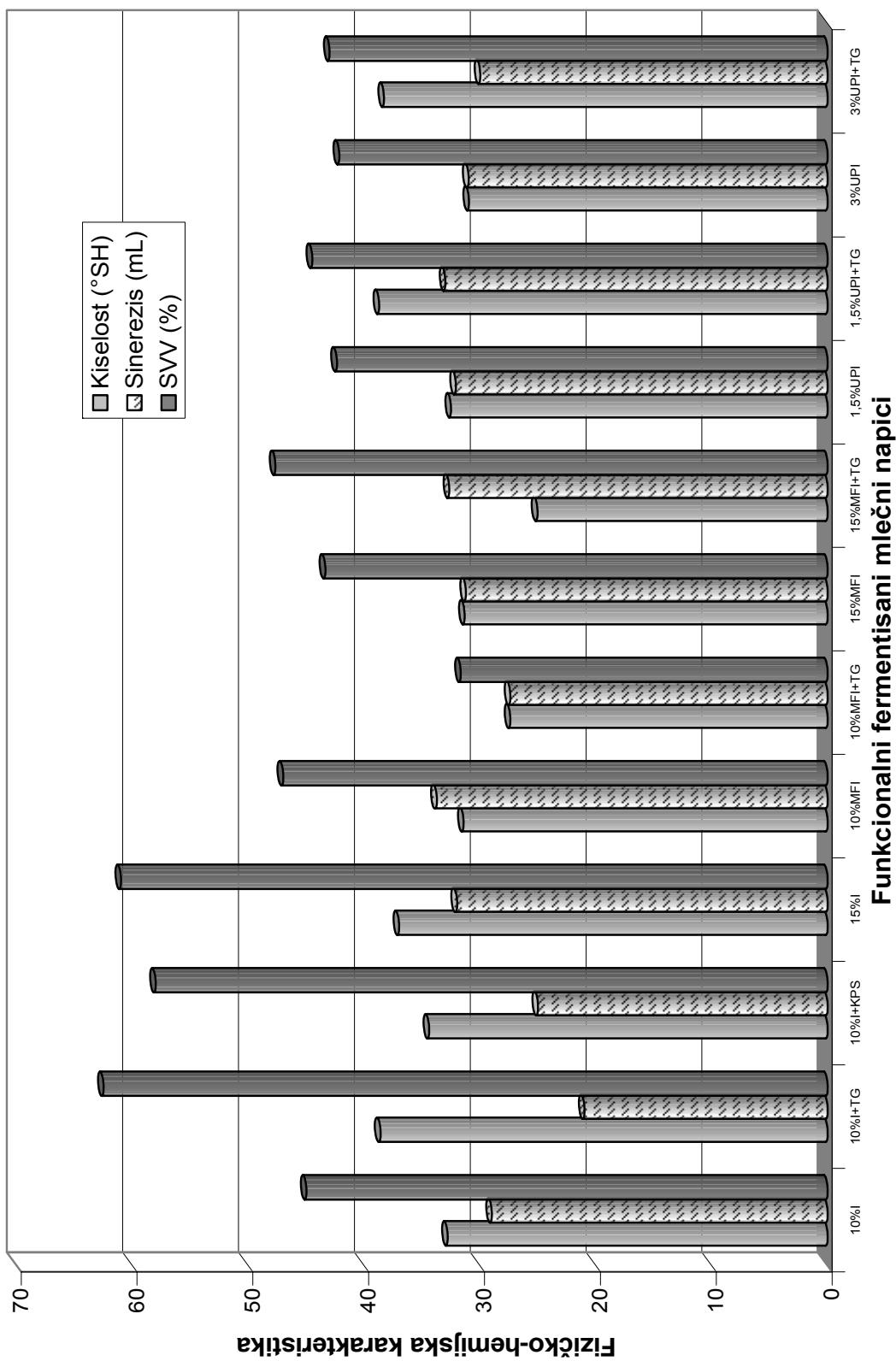
Slika 43. Udeo pojedinih grupa mikroorganizama u fermentisanom mlečnom napitku proizvedenom iz mleka sa: a) 0,9% mlečne masti i b) 2,2% mlečne masti.

FIZIČKO-HEMIJSKA I REOLOŠKA SVOJSTVA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

KISELOST, SINEREZIS I SPOSOBNOST VEZIVANJA VODE

Fizičko-hemijske karakteristike: kiselost, sinerezis i sposobnost vezivanja vode funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka veoma je značajan parametar kvaliteta sa aspekta održivosti i stabilnosti trodimenzionalne strukture gela.

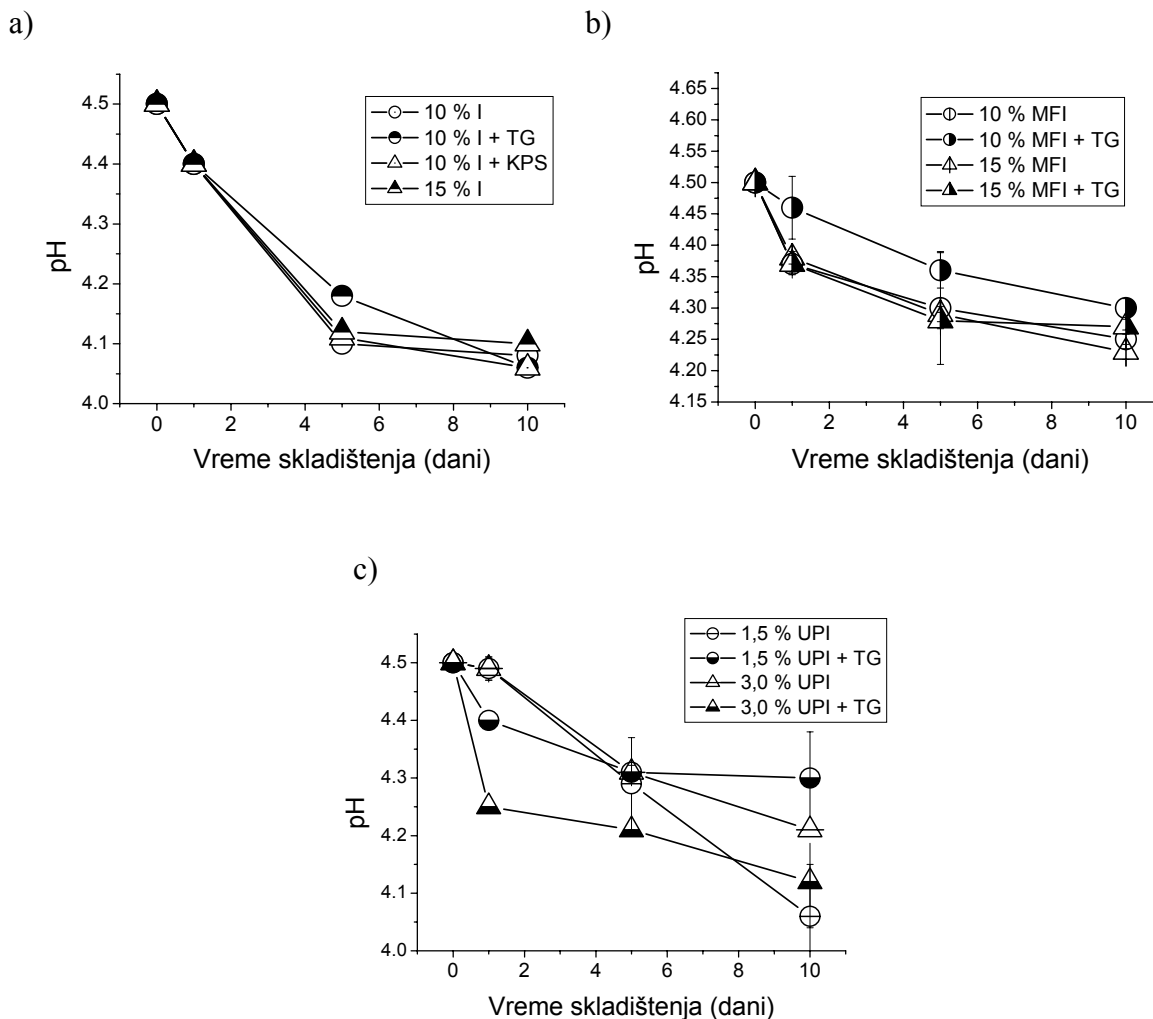
Sa slike 44 vidi se da kiselost uzoraka varira u zavisnosti od vrste inokuluma i kreće se od 30,97°SH (uzorak 3% UPI) do 37°SH (uzorak 1,5% UPI), dok kod uzoraka sa transglutaminazom varira od 25,06°SH (uzorak 15% MFI+TG) do 38,6°SH (uzorak 10% I+TG).



Slika 44. Kiselost, sinerezis i sposobnost vezivanja vode funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive nakon proizvodnje.

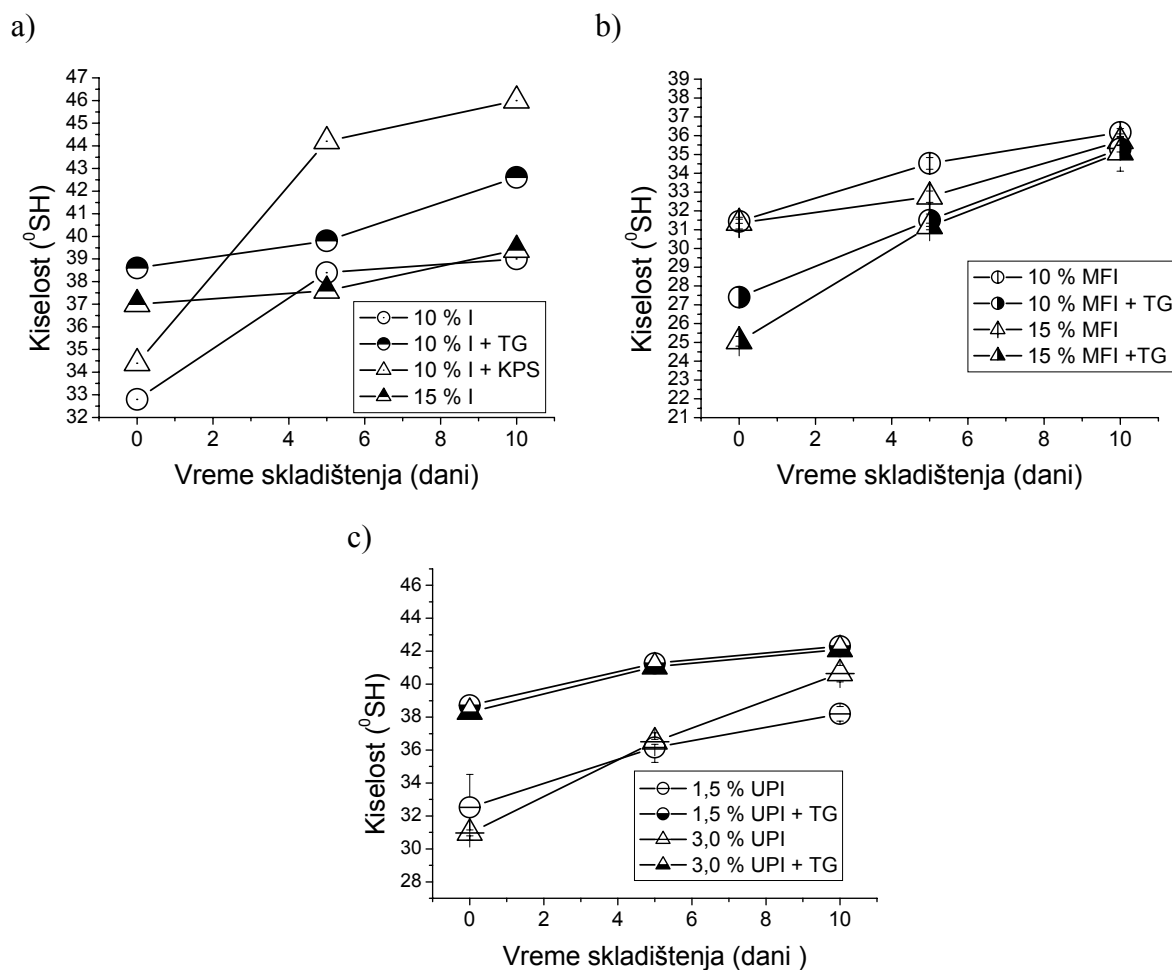
Vrednosti sinerezisa značajno variraju između uzoraka i kreću se minimalno od 21 mL (uzorak 10% I+TG) do 33,75 mL (uzorak 10% MFI). Sposobnost vezivanja vode funkcionalnih napitaka takođe veoma varira i vrednosti su u korelaciji sa sinerezisom.

pH vrednost uzoraka tokom 10 dana skladištenja opada i veoma je ujednačena u svim fermentisanim mlečnim proizvodima proizvedenim sa istom vrstom inokuluma. pH vrednost najbrže opada u uzorcima proizvedenim uz primenu inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparavanjem (slika 45).



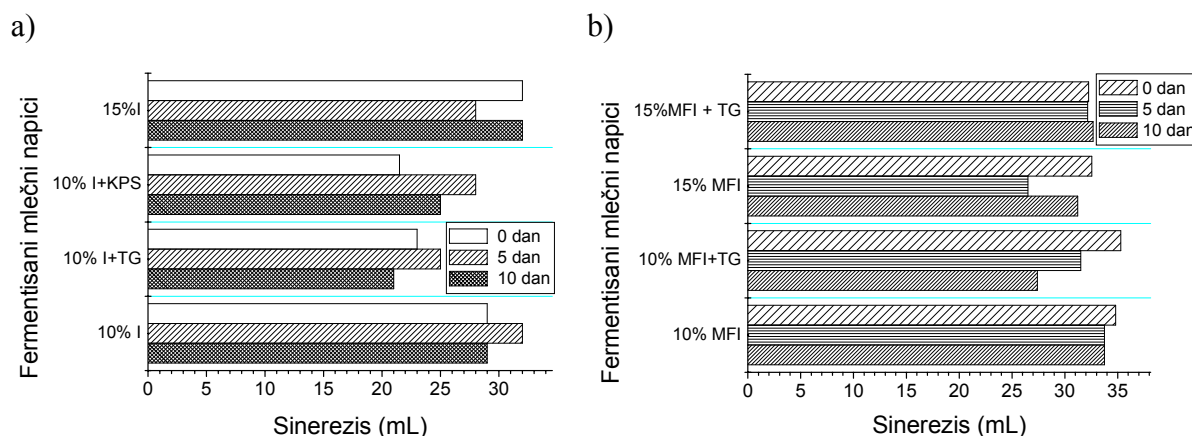
Slika 45. Promena pH vrednosti tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive: a) nativnog inokuluma; b) koncentrovanog mikrofiltracijom i c) koncentrovanog uparavanjem.

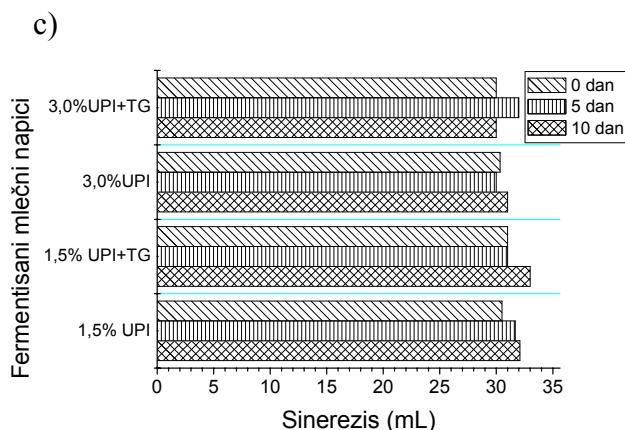
Kiselost uzoraka raste tokom skladištenja i veoma je ujednačena između uzoraka proizvedenih sa MFI i TG. Međutim, značajna razlika je zabeležena između uzoraka proizvedenih primenom nativnog inokuluma čajne gljive sa TG i KPS. Najveća vrednost kiselosti je kod uzorka sa 10% I proizvedenog uz primenu KPS (slika 46).



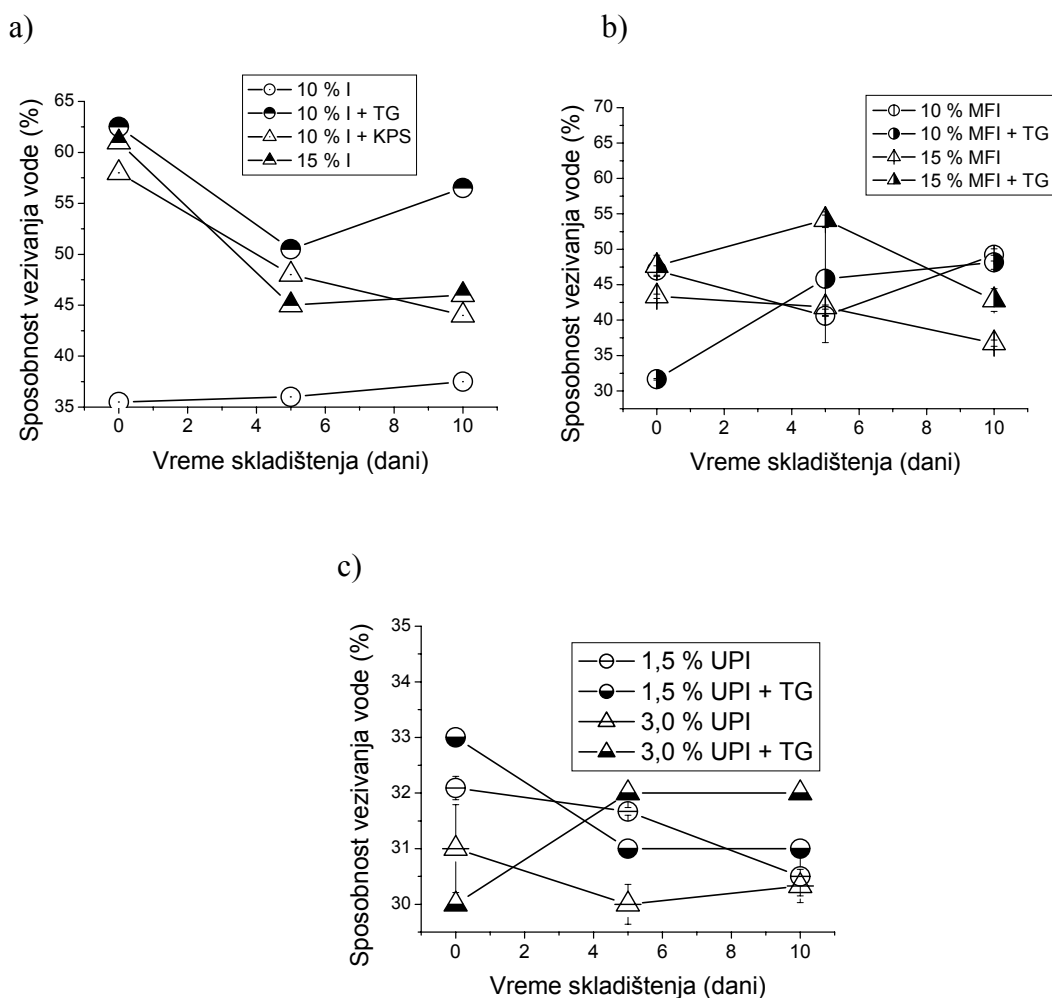
Slika 46. Promena kiselosti tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive: a) nativnog inokuluma; b) koncentrovanog mikrofiltracijom i c) koncentrovanog uparavanjem.

Sinerezis unutar grupe sa istim inokulumom je neujednačen tokom skladištenja. Veći je kod uzoraka sa MFI i UPI nego kod uzoraka proizvedenih sa običnim inokulumom (slika 47). Veća količina izdvojene surutke rezultat je formiranja slabih veza u proteinskom matriksu pri čemu se dobija nehomogen i netipičan gel jogurta.





Slika 47. Promena sinerezisa tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive: a) nativnog inokuluma; b) koncentrovanog mikrofiltracijom i c) koncentrovanog uparavanjem.



Slika 48. Promena sposobnosti vezivanja vode tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive: a) kultivisane na crnom čaju zaslađenom saharozom; b) koncentrovanog mikrofiltracijom i c) koncentrovanog uparavanjem.

Sposobnost vezivanja vode, prikazana je na slici 48 i veća je kod uzoraka sa TG, ali u svim uzorcima opada tokom skladištenja. Uzorci proizvedeni sa MFI imaju veću sposobnost vezivanja vode u poređenju sa uzorcima 10% I i sa TG i KPS.

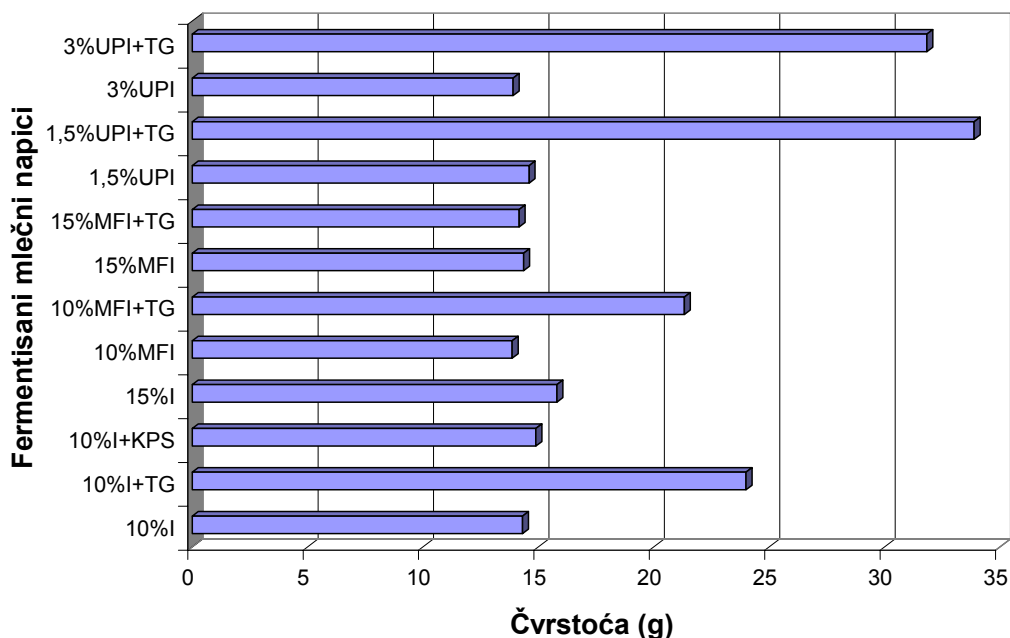
TEKSTURALNE KARAKTERISTIKE

Teksturalne karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka: čvrstoća, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta direktno zavisi od fizičko-hemijskih osobina proizvoda i prikazane su na slikama 49 – 52.

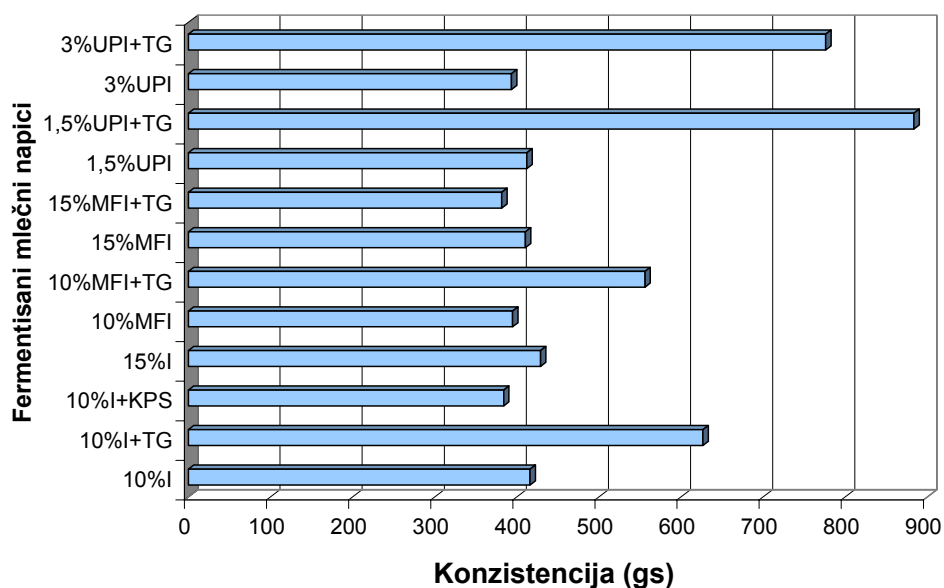
Uzorak proizveden sa 10% I+TG ima najveću čvrstoću (23,99g) (slika 49), dok uzorak bez TG ima najnižu vrednost – 14,33g. Prosečna vrednost za čvrstoću funkcionalnih napitaka proizvedenih primenom MFI je niža u poređenju sa odgovarajućim uzorcima dobijenim primenom nativnog inokuluma. Funkcionalni napici proizvedeni uz korišćenje uparenog inokuluma čajne gljive i sa dodatkom transglutaminaze imaju veću čvrstoću od uzorka 10% I+TG, što je najverovatnije direktno povezano sa većim sadržajem ugljenih hidrata u uparenom inokulumu, metaboličkom aktivnošću prisutnih mikroorganizama i biohemijskim interakcijama koje su doprinele formiranju čvršćih veza.

Konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta su prikazani na slikama 50-52 i u direktnoj su vezi sa čvrstoćom uzoraka.

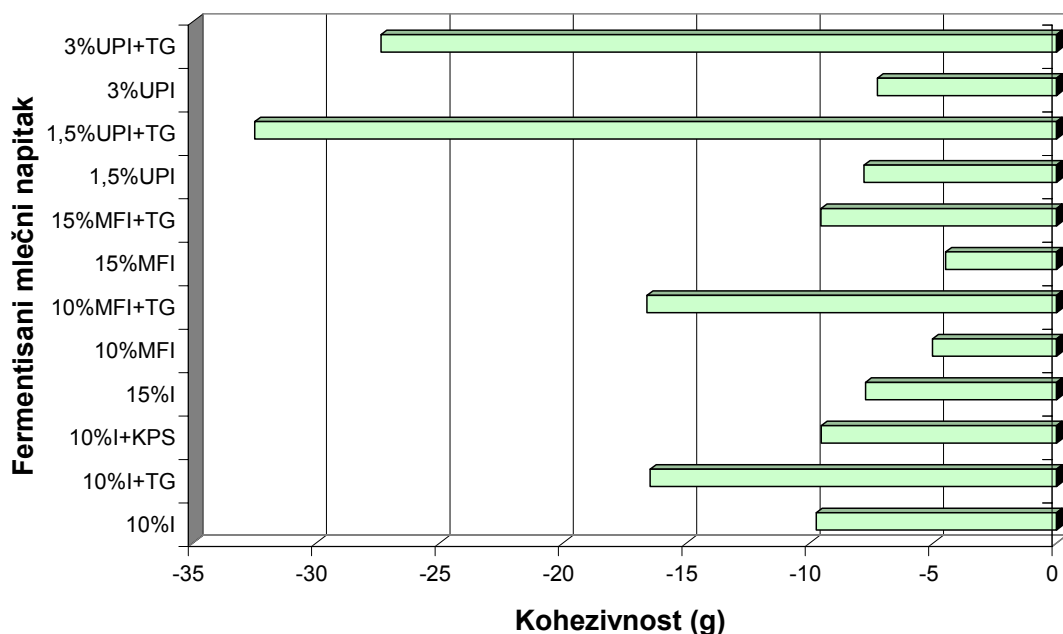
Teksturalne karakteristike uzoraka 10% I+TG i uzorka 1,5% UPI su znatno bolje u poređenju sa teksturalnim karakteristikama probiotskog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog sa TG. Čvrstoća varijanti probiotskog jogurta proizvedenog sa različitim količinama koncentrata proteina surutke kretala se od 29,6g do 39,7g, odnosno prosečno je za 30% viša u poređenju sa čvrstoćom funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka dobijenog sa 10% čajne gljive i 0,02% transglutaminaze iz mleka sa 0,1% masti.



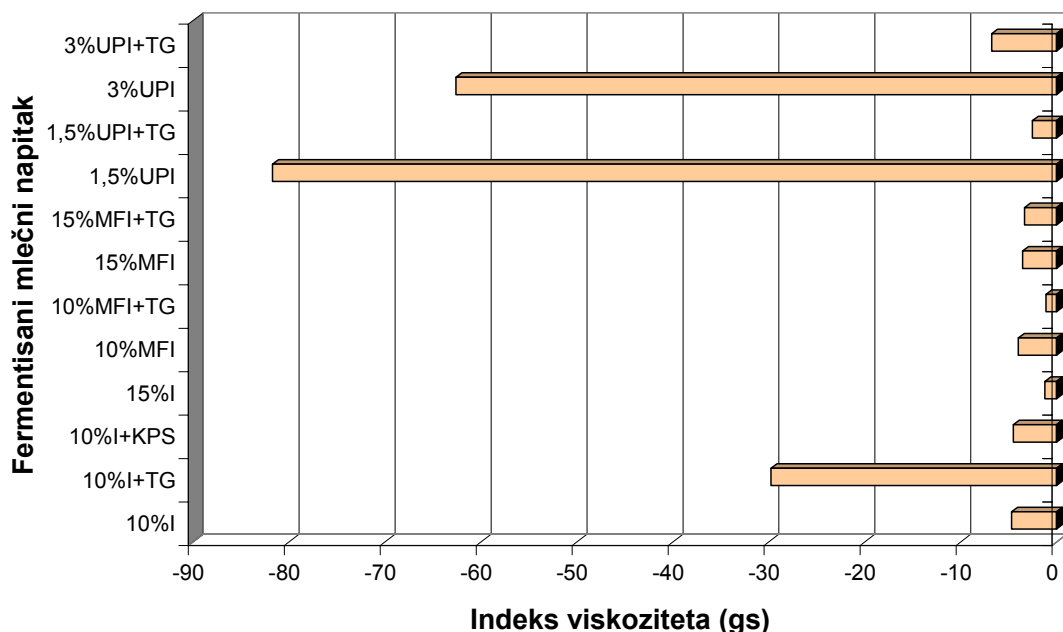
Slika 49. Čvrstoća funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive nakon proizvodnje.



Slika 50. Konzistencija funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive nakon proizvodnje.



Slika 51. Kohezivnost funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive nakon proizvodnje.

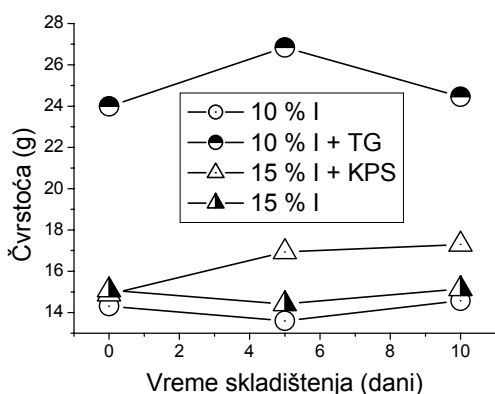


Slika 52. Indeks viskoziteta funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje različitih inokuluma čajne gljive nakon proizvodnje.

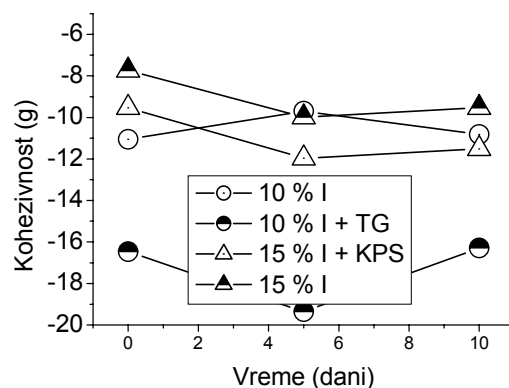
Generalno posmatrano, rezultati teksturalnih karakteristika fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih sa 1,5% i 3,0% UPI su najveće, zbog netipične grudvičaste strukture formirane tokom procesa fermentacije.

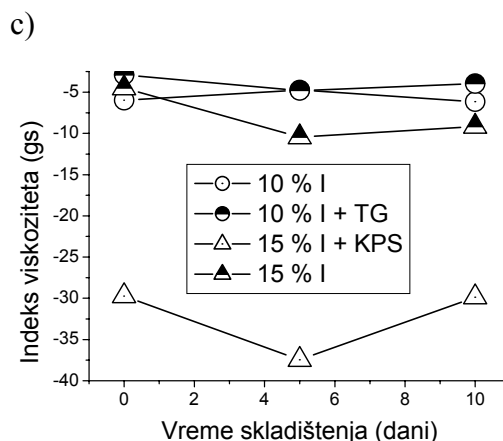
Teksturalne karakteristike rastu tokom skladištenja u svim uzorcima osim u uzorku sa TG, gde su vrednosti nakon 10 dana skladištenja približno jednake vrednostima nakon proizvodnje (slika 53).

a)



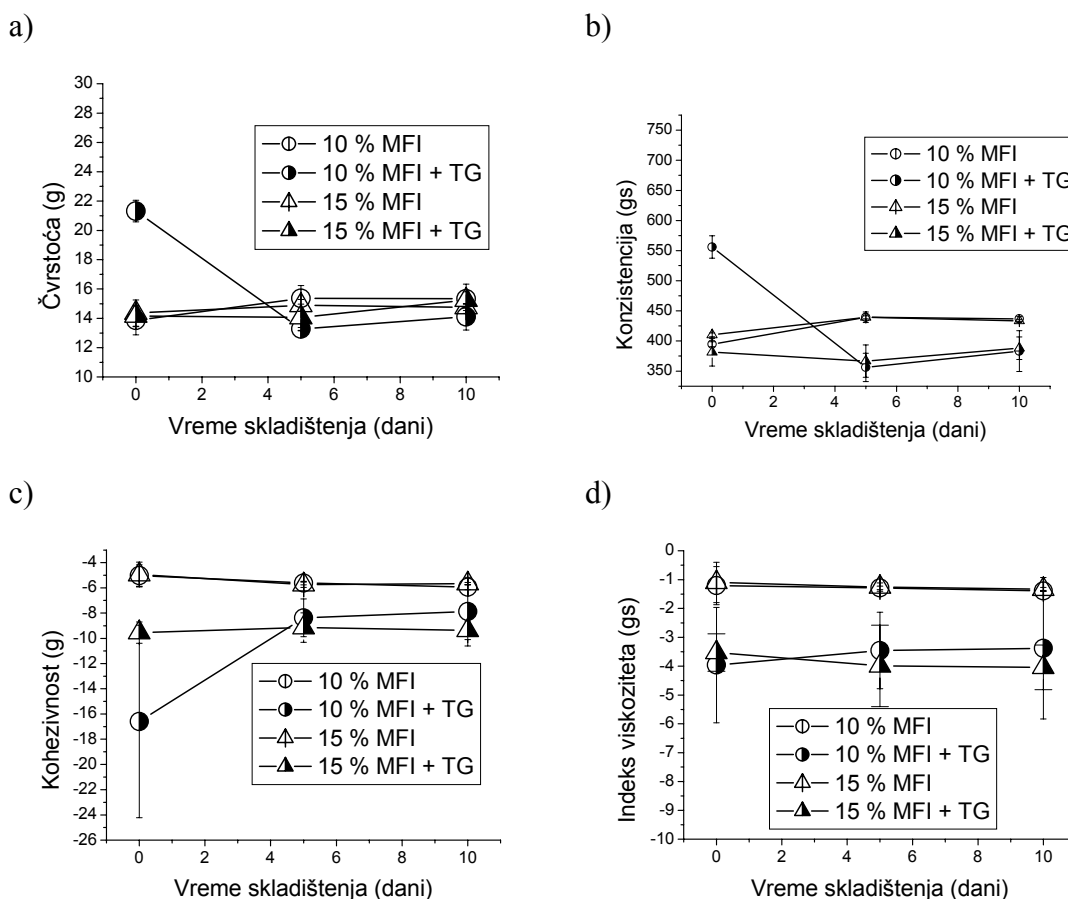
b)





Slika 53. Promena teksturalnih karakteristika tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje nativnog inokuluma: a) čvrstoća b) konzistencija c) indeks viskoziteta.

Teksturalne karakteristike u uzorcima sa MFI su dosta ujednačene između uzoraka sa i bez TG, ali su nešto niže nego u uzorcima proizvedenim sa nativnim inokulumom (slika 54).



Slika 54. Promena teksturalnih karakteristika tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje inokuluma čajne gljive koncentrovanog mikrofiltracijom: a) čvrstoća; b) konzistencija; c) kohezivnost i d) indeks viskoziteta.

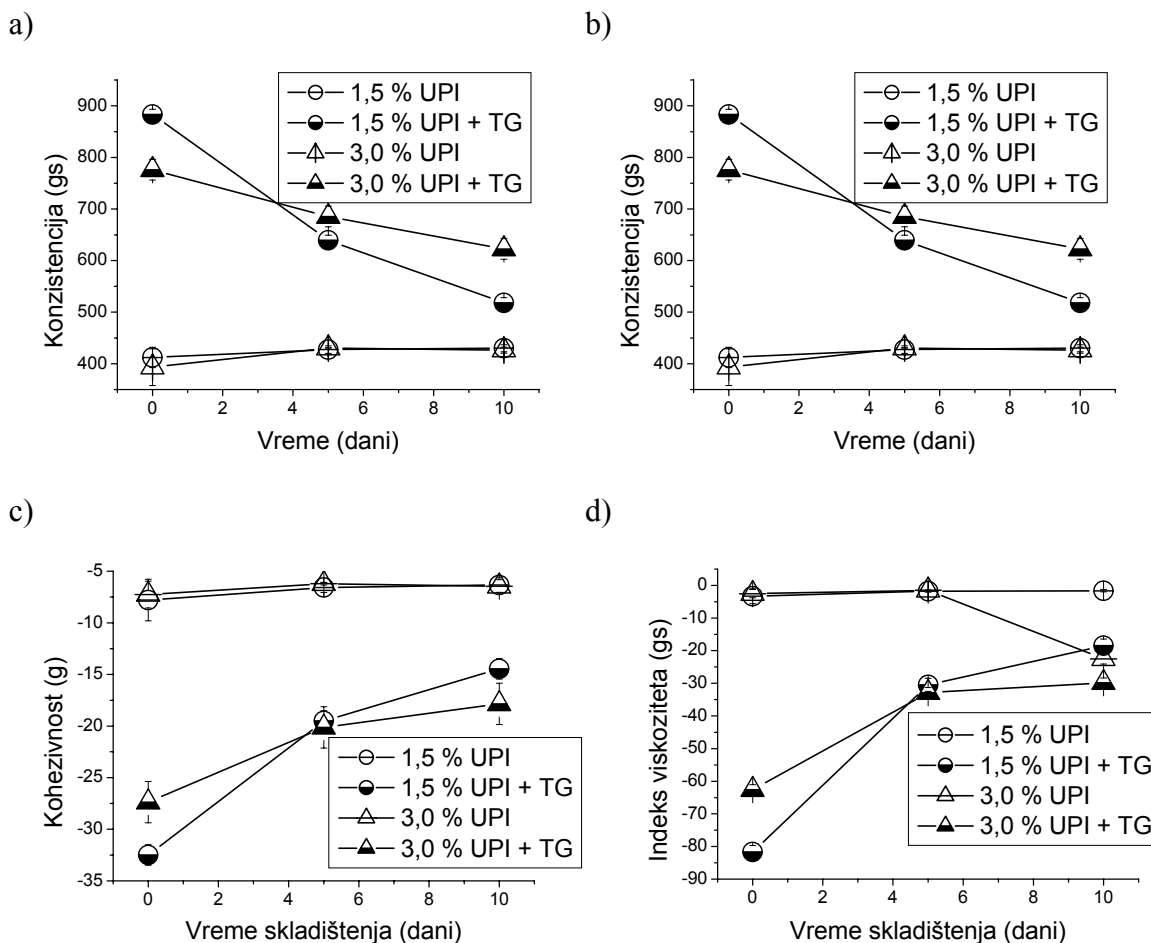
Vrednosti teksturalnih karakteristika fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih uz primenu inokuluma koncentrovanog uparavanjem su veće kod uzoraka sa TG nego bez TG, kao i u odnosu na odgovarajuće uzorke sa MFI i I. U uzorcima sa TG vrednosti teksturalnih karakteristika opadaju, dok su ujedanačene i veoma niske u uzorcima bez TG (slika 55).

VISKOZITET

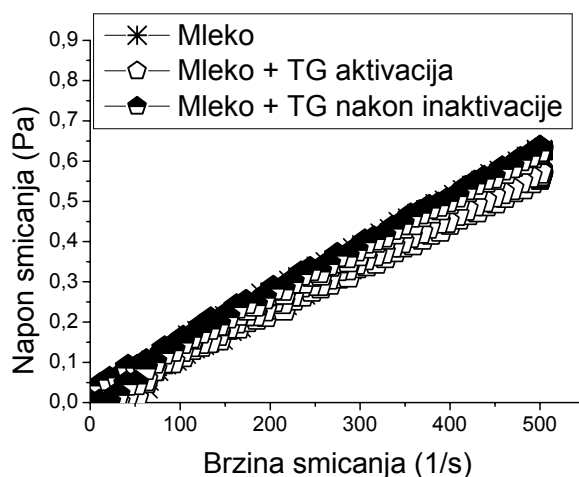
U cilju detaljnijeg definisanja reoloških karakteristika funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka analiziran je viskozitet mleka korišćenog za proizvodnju različitih napitka.

Promena napona smicanja mleka i mleka sa TG (nakon aktivacije i inaktivacije) u funkciji od brzine smicanja tokom proizvodnje fermentisanog mlečnog napitka prikazana je na slici 56. Uočljiva je minimalna razlika u promeni napona smicanja nakon dodatka TG u mleko.

Napon smicanja raste u mleku i smeši mleka sa TG sa povećanjem brzine smicanja.

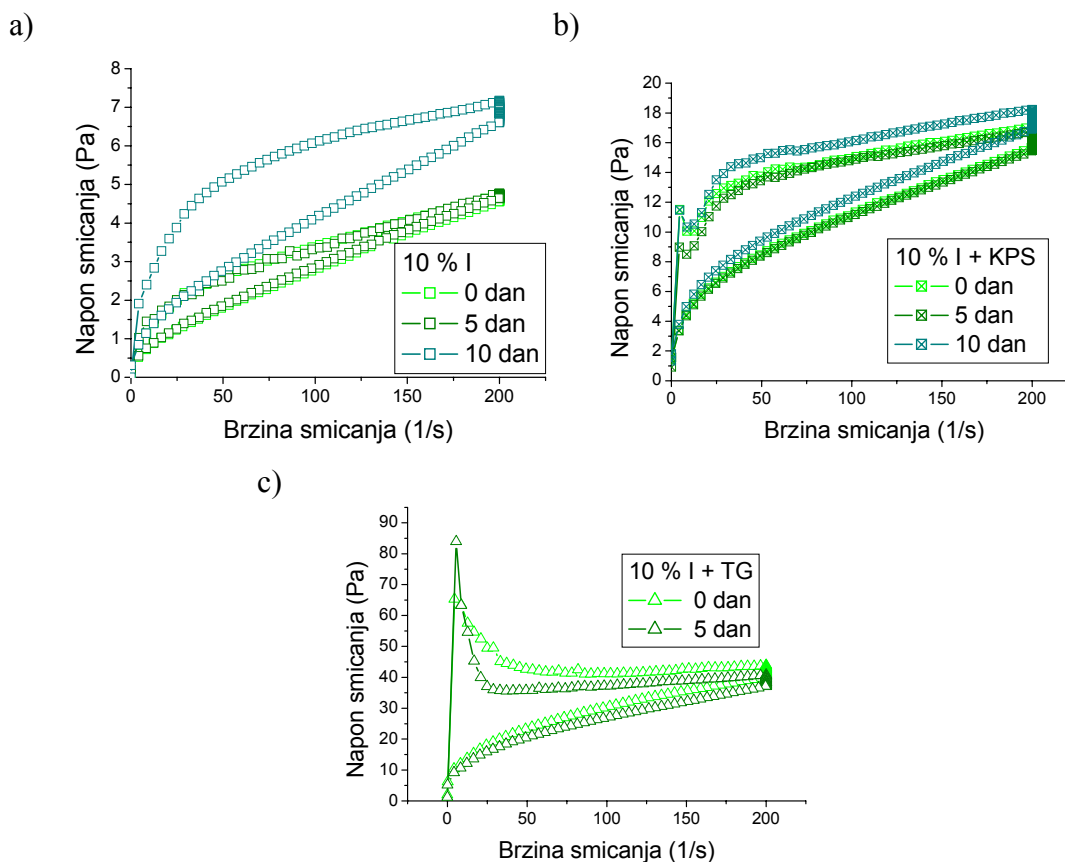


Slika 55. Promena teksturalnih karakteristika tokom skladištenja funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti uz korišćenje inokuluma čajne koncentrovanog mikrofiltracijom: a) čvrstoća; b) konzistencija; c) kohezivnost i d) indeks viskoziteta.

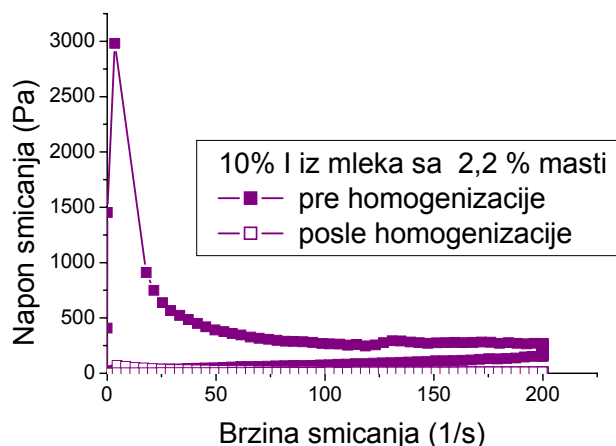


Slika 56. Promena napona smicanja u mleku i uzorcima (sa 0,9% masti) i transglutaminazom (sa i bez aktivacije) tokom proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlecnog napitka.

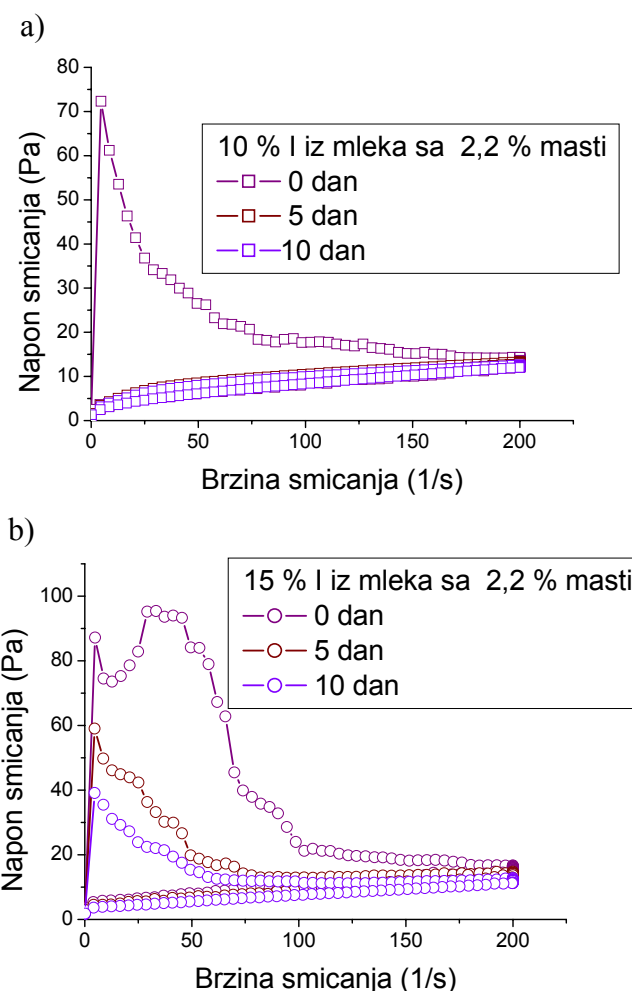
Vrednosti napona smicanja (slika 57) su najveće kod uzorka 10% I + TG, dok su znatno niže kod uzoraka bez TG. Tokom skladištenja uzorka 10% I+KPS napon smicanja se neznatno menja i manji je nego u uzorku sa TG. Napon smicanja u uzorku 10% I raste tokom skladištenja. Nakon proizvodnje uzorak 10% I+TG ima najveće vrednosti napona smicanja u funkciji od brzine smicanja i neznatne su promene tokom skladištenja.



Slika 57. Promena napona smicanja tokom skladištenja funkcionalnog fermentisanog mlecnog napitka iz mleka sa 0,9% masti: a) 10% I; b) 10% I+KPS; c) 10% I+TG.



Slika 58. Promena napona smicanja pre i posle homogenizacije fermentisanog mlečnog napitka 10% I proizvedenog iz mleka sa 2,2 % mlečne masti.

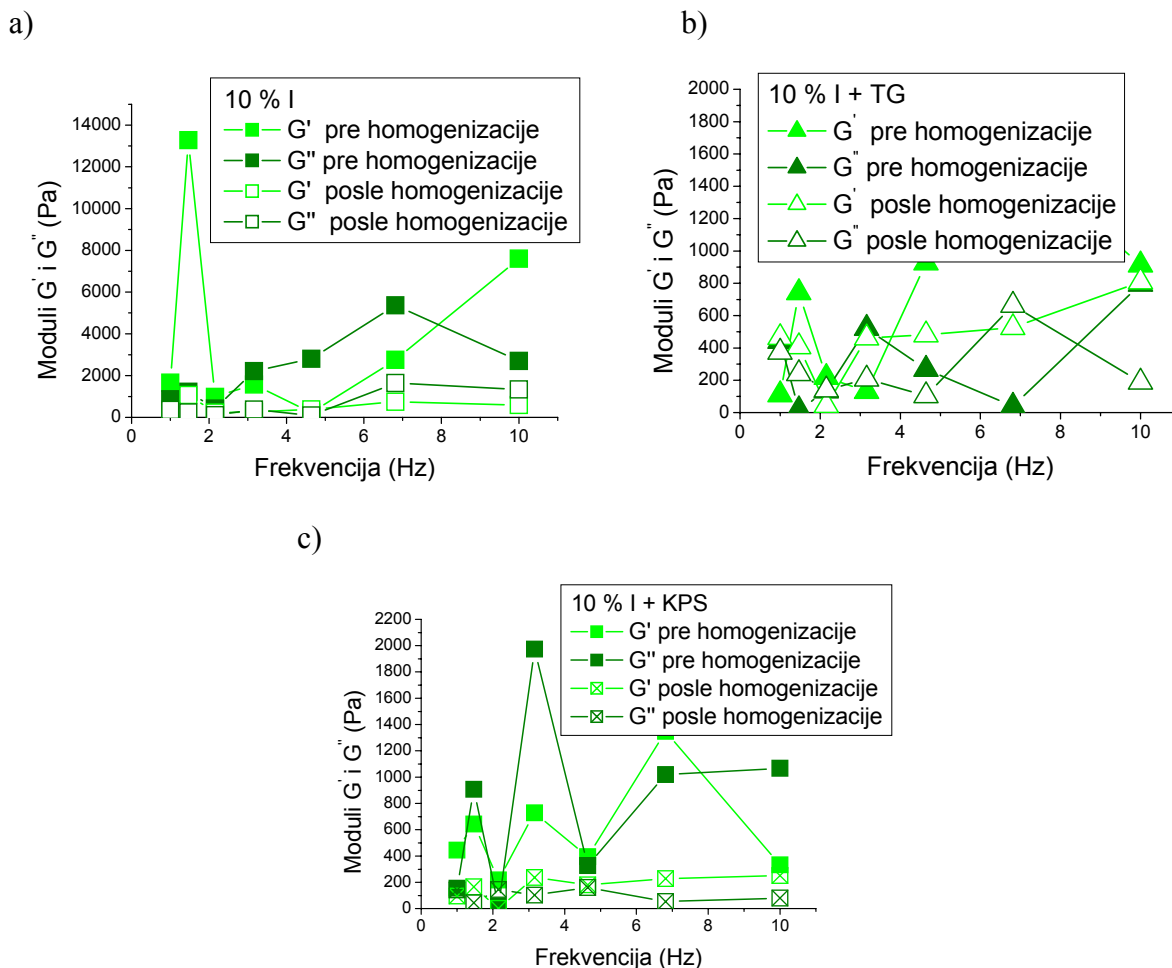


Slika 59. Promena napona smicanja tokom skladištenja fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 2,2 % mlečne masti: a) 10% I; b) 15% I.

Razlike između vrednosti napona smicanja pre i posle homogenizacije u uzorku 10%I proizvedenom iz mleka sa 2,2% masti prikazana je na slici 58. Napon smicanja u uzorcima proizvedenim iz mleka sa 2,2% masti (slika 59) je veći u poređenju sa odgovarajućim uzorcima iz mleka sa 0,9% masti i opada tokom 10 dana skladištenja (slika 57).

Moduli elastičnosti su takođe mereni u odabranim uzorcima pre i posle homogenizacije. Sa slike 60 se vidi da su moduli elastičnosti veoma promenljivi u funkciji od frekvencije pre homogenizacije proizvoda, nakon čega se dobija kompaktnija struktura gela i veoma su mala variranja modula elastičnosti i viskoziteta.

Dodatkom koncentrata proteina surutke ojačava se veza unutar kazeinskih micela i dobija se nepravilna zavisnost od frekvencije (maksimalna vrednost modula viskoziteta je 2000 Pa), dok kod uzorka sa 10% I (bez KPS) maksimalna vrednost iznosi 12000 Pa.



Slika 60. Moduli G' i G'' pre i posle homogenizacije funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% masti: a) 10% I; b) 10% I+KPS; c) 10% I+TG.

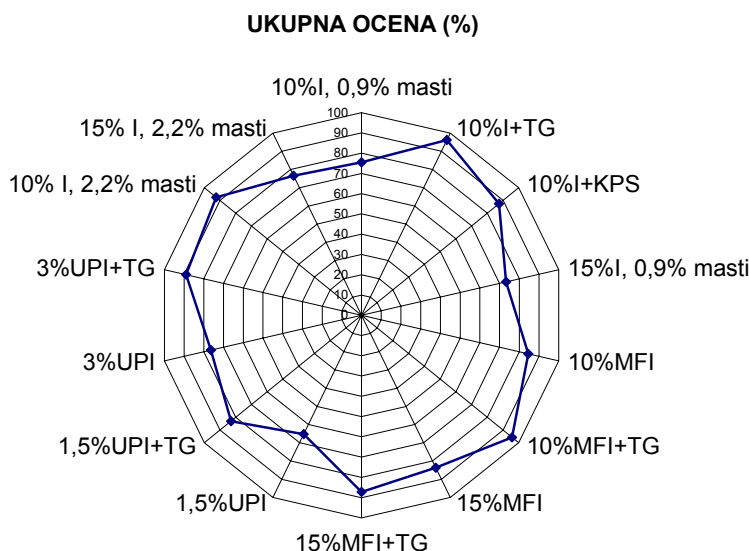
SENZORNA SVOJSTVA

Senzorna svojstva funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka prikazana su na slici 61 i 62. Uzorci proizvedeni primenom mikrofiltriranog inokuluma su lošijih senzornih karakteristika od uzoraka proizvedenih korišćenjem nativnog inokuluma. Najlošije senzorne osobine su imali uzorci dobijeni primenom inokuluma čajne gljive koncentrovanog uparivanjem.

Ukupna senzorna ocena izražena u procentima u odnosu na maksimalan broj bodova prikazana je na slici 61. Najbolje senzorne karakteristike ima uzorak 10% I+TG – 95,15%, potom 10% MFI+TG – 94,72. Uzorak 10% I+KPS je nešto slabijih senzornih karakteristika

(86,33%) u poređenju sa prethodno navedenim uzorcima zbog netipičnog ukusa koji nastaje usled dodatka koncentrata proteina surutke (slika 61).

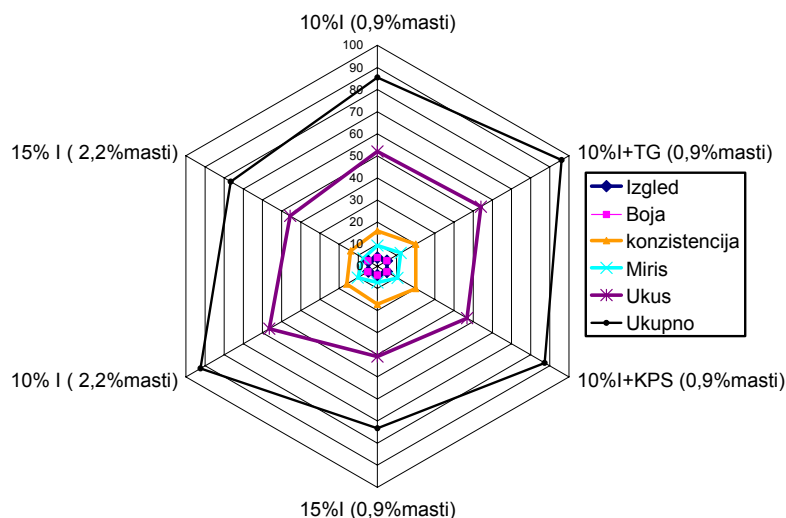
Generalno posmatrano, dodatak transglutaminaze (u koncentraciji od 0,02%) u mleko značajno poboljšava konzistenciju i ukus proizvoda, i doprinosi da ukupna senzorna ocena uzorka proizvedenog iz mleka sa 0,9% mlečne masti odgovara senzornoj oceni uzoraka proizvedenih iz mleka sa većim sadržajem mlečne masti (2,2%) (slika 60).



Slika 61. Komparativna senzorna ocena fermentisanih mlečnih napitaka iz mleka sa 0,9% masti (izražena u %).

Izgled, boja i miris proizvoda je tipičan i neznatno se razlikuju između analiziranih uzoraka (slika 62). Najveće razlike između funkcionalnih napitaka su u konzistenciji i ukusu. Najbolju konzistenciju i ukus imaju uzorci 10% I+TG (iz mleka sa 0,9% masti) i uzorak 10% I (iz mleka sa 2,2% masti). Napitak 10% I (iz mleka sa 2,2% masti) ima nešto tečniju konzistenciju, ali je dobrog ukusa.

Generalno posmatrano, uzorci 10% I+TG (iz mleka sa 0,9% masti) i 10% I (iz mleka sa 2,2% masti) imaju najveći broj bodova i značajno su boljih senzornih karakteristika od ostalih varijanti fermentisanih mlečnih napitaka.



Slika 62. Poređenje senzornih karakteristika funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih iz mleka sa 0,9% i 2,2% mlečne masti.

MIKROSTRUKTURA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Sposobnost proteina mleka da formira gel osnova je tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda i proizvodnje sira. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da strukturu gela čine kazeinske micelle međusobno povezane tako da formiraju proteinske lance i nakupine. Međutim, postoje razlike u formiranju kiselomlečnog gela i gela dobijenog koagulacijom proteolitičkim enzimima (Kalab i Carić, 1990; Milanović i sar., 2009).

Osnovne strukturne promene tokom procesa proizvodnje jogurta odvijaju se na kazeinskoj miceli koja usled sniženja pH vrednosti disagregira, pri čemu se izdvajaju kalcijumovi joni, potom se odvija agregacija i formira se trodimenzionalna struktura gela.

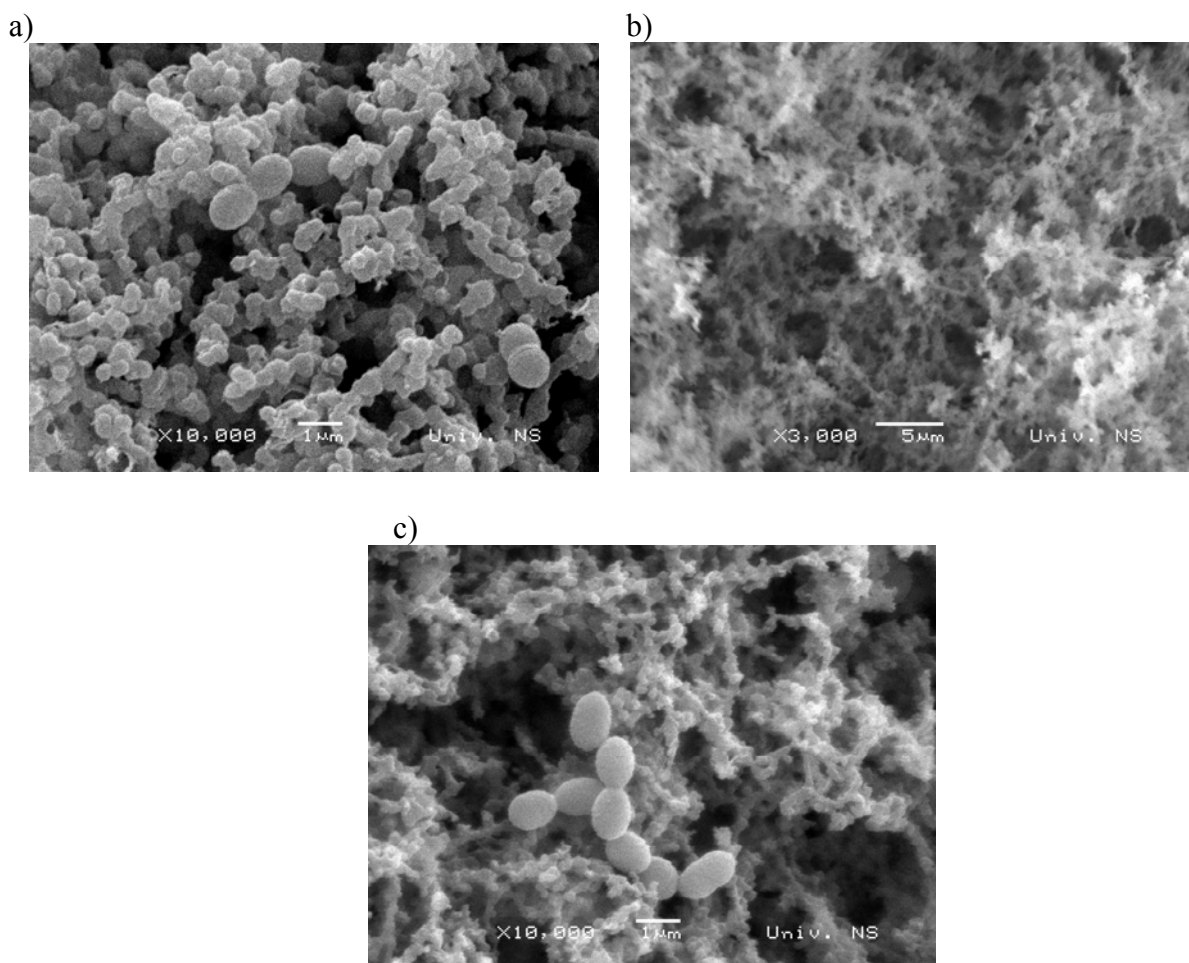
Osnovne karakteristike gela su odgovarajuća čvrsta i homogena konzistencija, dobra sposobnost vezivanja vode -sinerezis i svojstvena mikrostruktura. Čvrstoća gela i smanjenje sinerezisa se postiže termičkim tretmanom i/ili dodatkom pojedinih ingredijenata. Navedene karakteristike se mogu poboljšati dodatkom obranog mleka u prahu, proteina surutke ili koncentrata proteina surutke. U novijim istraživanjima Bhullar i sar. (2002) dokazali su da se najbolje karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda postižu dodatkom koncentrata proteina surutke (KPS), obzirom da se formira gusto isprepleten proteinski matriks sa veoma malim porama između lanaca manje podložan sinerezisu. Međutim gel proizveden uz primenu proteina surutke i obranog mleka u prahu je osetljiviji na sinerezis u poređenju sa uzorcima u kojima je dodavan KPS (Bhullar i sar., 2002).

Antunes i sar. (2004) ispitivali su uticaj KPS i obranog mleka u prahu na fizičko-hemijske karakteristike jogurta. Potvrđeno je da dodatak koncentrata proteina surutke poboljšava čvrstoću i kohezivnost, smanjuje sinerezis, poboljšava puforni kapacitet i vreme fermentacije u poređenju sa jogurtom dobijenim uz primenu obranog mleka u prahu. Mikrostruktura jogurta u koji su dodati koncentracije proteina surutke je kompaktna i pravilan je raspored proteinskih lanaca. Pojedine karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda mogu se poboljšati i dodatkom skroba ili nekih drugih stabilizatora.

Mikrografija funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka 10% I prikazuje jasno izdiferencirane proteinske lance sa pravilno raspoređenim šupljinama prosečne veličine oko 1 μm (slika 63a). Takođe je uočljivo prisustvo mikroorganizama koje predstavljaju bakterije mlečne kiseline u parovima ili lancima (dužine 1 do 2 μm).

Funkcionalni fermentisani mlečni napitak iz mleka sa 0,9% masti, 10%I+KPS ima gusto upakovanu strukturu bez uočljivog prisustva mikroorganizama (slika 63b). Šupljine unutar proteinskih lanaca su pravilno raspoređene i manje su u odnosu na uzoraka bez KPS. Mikrostruktura uzorka 10% I+KPS je u direktnoj korelaciji sa fizičko – hemijskim karakteristikama (sinerezis i SVV) navedenog uzorka (slika 44). Evidentno je da se dodatkom KPS u mleko za proizvodnju fermentisanog napitka značajno poboljšavaju sposobnost vezivanja vode, pri čemu se smanjuje sinerezis (Patočka i sar., 2004; Antunes i sar., 2004).

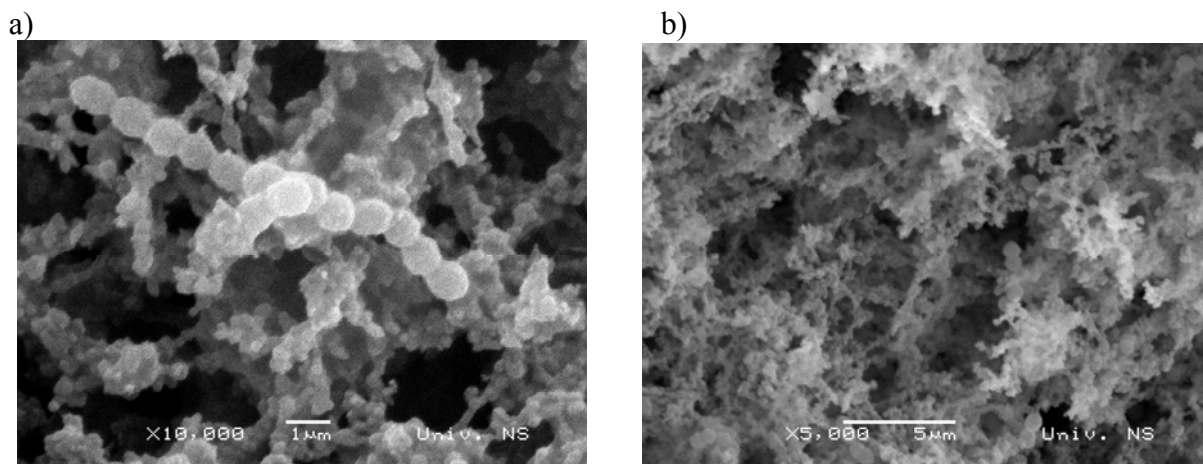
Mikrostruktura funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% masti uz primenu 10% inokuluma čajne gljive i 0,02% TG je gusto upakovana struktura proteinskog matriksa sa uočljivim prisustvom mikroorganizama (slika 63c). Veličina mikroorganizama prisutnih u lancima ili pojedinačno kreće se od 1 μm do 1,5 μm . Mikrografija uzorka 10%+0,02%TG je direktno povezana sa rezultatima dobijenim za sinerezis i sposobnost vezivanja vode. Navedeni uzorak ima najbolju sposobnost vezivanja vode koja iznosi 62,5% i sinerezis 22 mL.



Slika 63. Mikrostruktura funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% mlečne masti uz primenu 10% inokuluma čajne gljive: a) uzorak 10% I b) uzorak 10% I+KPS c) 10% I+TG.

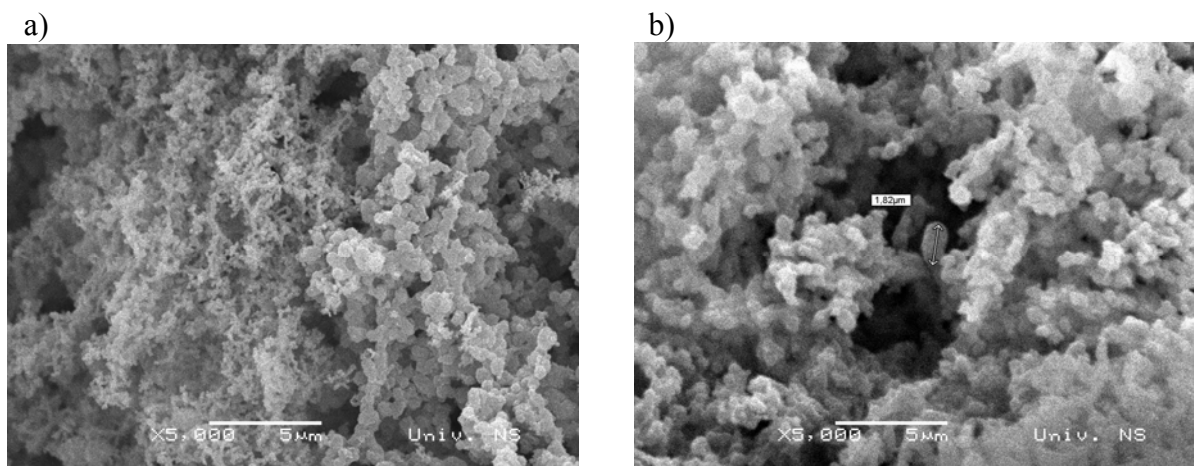
Uzorci proizvedeni sa mikrofiltriranim koncentratom čajne gljive imaju izdiferenciranu strukturu proteinskog matriksa u kome je veoma dobro uočljivo prisustvo bakterije u vidu lanaca (slika 64a). Trodimenzionalna struktura funkcionalnog fermentisanog napitka proizvedenog sa 15% mikrofiltriranog inokuluma čajne gljive se razlikuje od funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka sa 10% inokuluma čajne gljive, po obliku i veličini šupljina unutar proteinskog matriksa koje iznose do 2 μm . Takođe, veoma je uočljivo prisustvo nakupina mikroorganizama.

Dodatkom transglutaminaze u koncentraciji od 0,02% u funkcionalnom fermentisanom mlečnom napitku proizvedenom sa 15% mikrofiltriranog inokuluma čajne gljive postiže se gušća trodimenzionalna struktura gela i manje je uočljivo prisustvo mikroorganizama u poređenju sa uzorcima dobijenim bez transglutaminaze (slika 64b).



Slika 64. Mikrostruktura funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% mlečne masti uz primenu 15% mikrofiltriranog inokuluma čajne gljive: a) 15% MFI b) 15% MFI+TG.

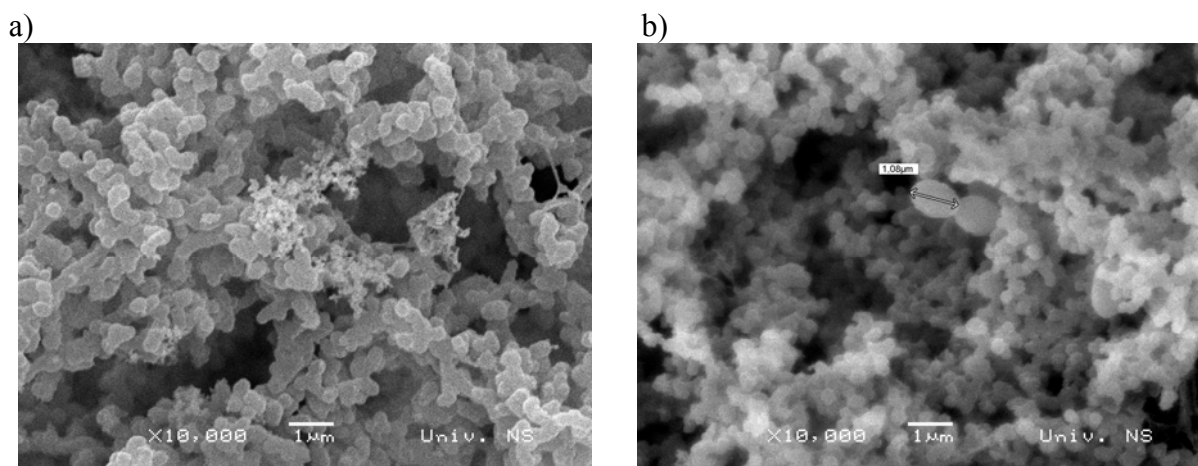
Proteinski lanci unutar trodimenzionalne strukture gela dobijenog iz mleka sa 0,9 mm i 1,5% uparenog koncentrata čajne gljive nepravilno su raspoređeni, i postoji razlika u veličini i debljini formiranih lanaca (slika 65b). Funkcionalni fermentisani mlečni napitak proizveden sa 3% UPI ima veoma neujednačenu strukturu tj. nepravilan raspored proteinskih lanaca unutar matriksa i nepravilnu zatupljenost šupljina. Veličine pora variraju i znatno su manje u poređenju sa uzorkom dobijenim primenom mikrofiltriranog inokuluma čajne gljive. Rastresita struktura proteinskog matriksa je povezana sa veoma visokom vrednosti sinerezisa i smanjenom sposobnosti vezivanja vode (slika 44).



Slika 65. Mikrostruktura funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% mlečne masti uz primenu: a) 1,5% uparenog koncentrata čajne gljive; b) 3% uparenog koncentrata čajne gljive.

Fermentisani mlečni napitak proizveden iz mleka sa 2,2% masti i 10% I ima kompaktnu strukturu sa pravilnim rasporedom šupljina (slika 66a). Poređenjem mikrostrukture funkcionalnog napitka proizvedenog iz mleka sa 2,2% masti i sa 0,9% masti uočavaju se razlike u rasporedu, broju i veličini šupljina unutar proteinskih lanaca. Evidentno je da se sa poveća-

njem sadržaja masti u mleku postiže bolja kompaktnost proteinskih lanaca, a na taj način se poboljšavaju i fizičko-hemijska svojstva proizvoda (sinerezis i sposobnost vezivanja vode i senzorne karakteristike proizvoda).



Slika 66. Mikrostruktura funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka proizvedenog iz mleka sa 2,2% mlečne masti uz primenu inokuluma čajne gljive: a) 10% I i b) 15% I.

OPTIMIZACIJA

OPTIMIZACIJA KARAKTERISTIKA PROIZVODA

U cilju optimizacije tehnološkog procesa proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih primenom čajne gljive analizirane su sledeće karakteristike: nutritivna vrednost, reološke i senzorne osobine, kao i mikrobiološki sastav. Na osnovu rezultata istraživanja utvrđene su značajne razlike između proizvoda dobijenih primenom tri različite vrste inokuluma čajne gljive (nativni, koncentrovan upravljanjem i koncentrovan mikrofiltracijom). Obzirom da su korišćeni inokulumi različitog mikrobiološkog i hemijskog sastava prva značajna razlika između varijanti napitaka je u toku fermentacije.

U tabeli 22 pored vremena fermentacije tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka dat je komparativni prikaz karakteristika proizvoda: stepen transformacije sadržaja laktoze, čvrstoća, prinosni napon i viskozitet nakon proizvodnje funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka.

Evidentne su značajne razlike u vremenu fermentacije i procentu transformisane laktoze između probiotskog jogurta i varijanti funkcionalnih fermentisanih napitaka proizvedenih primenom različitih vrsta inokuluma čajne gljive. Proces fermentacije najkraće traje tokom proizvodnje probiotskog jogurta – 6,5 sati pri čemu se transformiše najveća količina laktoze (prosečno 46,3%). Uzorak 10% I ima 2 sata duži proces fermentacije, dok je u svim ostalim varijantama fermentisanog napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% masti fermentacija mleka duža prosečno 4 sata u poređenju sa probiotskim jogurtom. Vreme fermentacije probiotskog jogurta se statistički značajno razlikuje u poređenju sa vremenom fermentacije svih varijanti fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih primenom čajne gljive.

Tabela 22. Komparativni prikaz parametara tehnološkog procesa proizvodnje i karakteristika fermentisanih mlečnih napitaka

Uzorak	Parametri				
	Vreme fermentacije (h)	Transformacija laktoze (%)	Čvrstoća (g)	Prinosni napon (Pa)	Viskozitet (Pas)
Fermentisani mlečni napici proizvedeni iz mleka sa 0,9 % masti					
PJ	6,5±0,50 ^a	46,3	16,03	1,46	97,68
10%I	8,6±0,55 ^{ac}	16,75	15,86	1,45	97,68
10% I+TG	10±0,56 ^a	26,2	23,99	2,00	125,35
10% I+ KPS	10,2±0,30 ^a	22,8	14,89	1,53	33,03
15% I	10,5±0,25 ^{ad}	19,74	15,08	1,39	125,50
10% MFI	10,5±0,35 ^a	24,53	15,02	2,70	84,34
10% MFI+TG	10,8±0,20 ^a	27,94	21,32	5,98	109,5
15% MFI	10±0,25 ^a	33,4	15,28	1,57	369,5
15% MFI+TG	10,2±0,35 ^a	33,4	14,16	1,92	403
1,5% UPI	11,0±0,5 ^{ab}	28,1	33	2,35	11,5
1,5% UPI+TG	11,8±0,2 ^a	21,5	15,65	-	-
3,0% UPI	11,2±0,25 ^{ab}	21,5	15,65	1,25	4,97
3,0% UPI+TG	12±0,25 ^a	24,7	31	-	-
Fermentisani mlečni napici proizvedeni iz mleka sa 2,2 % masti					
10% I	9,4±0,30 ^{ce}	22,7	15,01	1,13	227
15% I	10,±0,2 ^{de}	25,8	15,93	2,38	198

^{abcde} - statistički značajna razlika u vremenu fermentacije između uzoraka ($p < 0,05$).

Iz tabele 22 se vidi da su najveće vrednosti navedenih reoloških karakteristika (čvrstoća, prinosni napon i viskozitet) zabeležene u proizvodima: 10% I+TG, 10% MFI+TG i 15% MFI+TG, odnosno u uzorcima proizvednim uz primenu transglutaminaze.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja (Bönish i sar., 2007c; Milanović i sar., 2009) poznato je da dodatak transglutaminaze uz prethodnu aktivaciju značajno poboljšava strukturu i stabilnost jogurta proizvedenog iz obranog ili delimično obranog mleka. Primena transglutaminaze u proizvodnji funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka uz korišćenje inokuluma čajne gljive takođe značajno poboljšava teksturalne i reološke karakteristike finalnog proizvoda. Vrednosti pojedinih parametara (čvrstoća, prinosni napon i viskozitet) se statistički značajno razlikuju između uzorka 10% I+TG i ostalih varijanti proizvedenih iz mleka sa 0,9%, bez dodatka transglutaminaze.

Optimizacija hemijskog sastava proizvoda

Imajući u vidu da se radi o proizvodu koji mora da poseduje čitav niz karakteristika (hemijskih, reoloških, mikrostrukturnih, nutritivnih, mikrobioloških, senzornih itd.), odabrane optimalne karakteristike proizvoda prikazane su u tabeli 23.

Jedan od ciljeva konzumiranja novog napitka je unošenje određenog broja mikroorganizama u digestivni trakt, gde oni mogu povoljno da utiču na zdravstveni status konzumenta. Radi toga, procenjeno je da uravnotežen unos bakterija sirćetne kiseline i kvasaca sadržanih u proizvodu predstavlja poželjan cilj.

Analizom eksperimentalno dobijenih podataka prikazanih u tabeli 20, može se zaključiti da je najveći broj bakterija sirćetne kiseline i kvasaca u uzorcima proizvedenim primenom inokuluma koncentrovanog mikrofiltracijom (odnos BSK:kvasaca = 1:2), dok je nešto manji odnos kod uzorka dobijenog primenom 10% nativnog inokuluma (BSK:kvasaca = 1:1,1) iz mleka sa 0,9% mlečne masti.

Tabela 23. Optimalan sastav proizvoda

Broj	Tip ekstrema	Funkcija cilja	Sadržaj komponente (g/100g)	Optimalna starter kultura
1	minimum	laktoza	3,7	10% MFI+TG
2	maksimum	galaktoza	0,72	10% MFI+TG
3	maksimum	glukoza	0,41	1,5% UPI+TG
4	maksimum	fruktoza	0,17	1,5% UPI+TG
5	maksimum	L-mlečna kiselina	0,65	15% I
6	minimum	sirćetna kiselina	0,0015	15% MFI
7	minimum	etanol	0,001	1,5% UPI
			Sadržaj minerala (mg/100g)	
8	maksimum	Mg	16,6	3% UPI
9	maksimum	Ca	147,7	3% UPI
10	maksimum	K	129,2	3% UPI
11	maksimum	Na	72,1	10% I, 0,9% masti
			Sadržaj vitamina (µg/100g)	
12	maksimum	B ₁	43	10% I, 2,2% masti
13	maksimum	B ₂	130	10% I, 2,2% masti
14	maksimum	B ₆	115	10% I, 2,2% masti
15	maksimum	C	11,06×10 ³	10% I, 0,9% masti

Optimizacija fizičkih osobina proizvoda

Što se tiče fizičkih osobina proizvoda, analiza eksperimentalnih podataka, prikazanih na slici 44, omogućila je da se dođe do zaključaka datih u tabeli 24. Očigledno je da se najboljom pokazala originalna starter kultura – nativni inokulum najniže koncentracije, kojoj je dodata transglutaminaza. Primena ove kulture u kombinaciji sa TG garantovala je dobijanje proizvoda sa minimalnim sinerezisom, a koji, istovremeno, poseduje najveću sposobnost vezivanja vode. Dobijeni rezultat je u potpunosti u skladu sa očekivanjima.

Tabela 24. Optimalne starter kulture za postizanje željenih fizičkih osobina proizvoda

Broj	Tip ekstrema	Funkcija cilja	Vrednost	Optimalna starter kultura
1	minimum	sinerezis	20 mL (23mL) ^a	10% I+TG; (10% I+KPS) ^a
2	maksimum	sposobnost vezivanja vode	63%	10% I+TG

Napomena: a- alternativna veličina vrlo bliska optimalnoj veličini

Optimizacija teksturalnih osobina proizvoda

I u slučaju analize teksturalnih svojstava proizvoda, došlo se do zaključka da postoji jedinstvena kultura (1,5% UPI+TG) koja obezbeđuje proizvod optimalnih reoloških svojstava (čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i indeksa viskoziteta), kao što je prikazano u tabeli 25. Za izvođenje zaključka poslužile su eksperimentalno izmerene vrednosti prikazane na slikama 49-52. Sasvim je logično da dodatak TG poboljšava teksturu proizvoda, ali je, takođe, veoma značajno naglasiti da poboljšanju teksture doprinosi i koncentrisanje inokuluma uparavanjem. Za objašnjenje ovog rezultata bila bi korisna dodatna ispitivanja.

Tabela 25. Optimalne starter kulture za postizanje željenih teksturalnih osobina proizvoda

Broj	Tip ekstrema	Funkcija cilja	Vrednost	Optimalna starter kultura
1	maksimum	čvrstoća	34g (32g) ^a	1,5%UPI+TG; (3%UPI+TG) ^a
2	maksimum	konzistencija	850gs (776gs) ^a	1,5%UPI+TG; (3%UPI+TG) ^a
3	minimum	kohezivnost	-33g (-27g) ^a	1,5%UPI+TG; (3%UPI+TG) ^a
4	minimum	indeks viskoziteta	-80gs	1,5%UPI+TG

Napomena: a- alternativna veličina vrlo bliska optimalnoj veličini

Optimizacija senzornih karakteristika proizvoda

Najbolju ukupnu ocenu (24 boda) dobili su uzorci fermentisanog mlečnog napitka proizvedeni primenom startera 10% I+TG. Ovim uzorcima po kvalitetu su veoma bliski (ukupno bodova 23,5) oni proizvedeni primenom 10% MFI+TG i između njihovih ocena ne postoji statistički značajna razlika.

Uticaj nezavisnopromenljivih veličina na karakteristike proizvoda

Na osnovu prikazane analize rezultata može se zaključiti sledeće:

- Niža koncentracija inokuluma (10% nativnog inokuluma, odnosno 1,5% inokuluma koncentrovanog uparavanjem) pokazala se sveukupno povoljnijom od više koncentracije (15%, odnosno 3% inokuluma koncentrovanog uparavanjem);
- Dodatak TG poboljšao je fizičke i teksturalne osobine, pa čak i ukupnu senzornu ocenu,
- Dodatak KPS nije uticao na poboljšanje nijedne praćene osobine proizvoda;
- Način pripreme inokuluma imao je uticaj u sledećem smislu: koncentrisanje uparavanjem pozitivno je uticalo na fizičke, a mikrofiltracija na hemijske osobine proizvoda.

Optimizacija procesnih veličina

Pored dobijanja proizvoda optimalnih osobina, istraživanja u okviru doktorske disertacije bavila su se i optimizacijom samog tehnološkog procesa proizvodnje, u čijoj osnovi se nalazi fermentacija mleka različitog sadržaja masti (0,9% i 2,2%) uz primenu selektovanih starter kultura. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se korišćenjem nativnog inokuluma čajne gljive u koncentraciji 10% postižu optimalne karakteristike fermentisanog mlečnog napitka.

ZAKLJUČAK

Primenom inokuluma čajne gljive za fermentaciju mleka: kultivisanog na crnom čaju zaslađenim saharozom, koncentrisanog primenom mikrofiltracije i koncentrovanog uparavanjem, uz korišćenje odabranog tehnološkog procesa dobijene su varijante funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka odgovarajućih senzornih, mikrobioloških, fizičko-hemijskih i reoloških karakteristika. Varijante fermentisanog mlečnog napitka dobijene su korišćenjem mleka sa 0,9% mlečne masti, dok su iz mleka sa 2,2% masti proizvedeni napici primenom nativnog inokuluma.

Proces fermentacije mleka sa 0,9% masti uz primenu čajne gljive traje od 9 sati (uzorak 10% nativnog inokuluma) do 11,5 sati (uzorak proizveden sa 3,0% inokuluma koncentrovanog uparavanjem) i prosečno je dva puta duži od fermentacije mleka u proizvodnji probiotskog jogurta.

Dominantni produkti složenih biohemijskih transformacija laktoze su galaktoza i L-mlečna kiselina, a nastaju i sledeći metaboliti: glukoza, fruktoza, D-mlečna kiselina, sirćetna kiselina i etanol. Transformacija laktoze je najintenzivnija u uzorcima gde je odnos bakterija sirćetne kiseline i kvasaca 1:1. Sadržaj laktoze tokom fermentacije mleka manji je prosečno za 19,6% u odnosu na sadržaj laktoze u mleku. Uzorci proizvedeni sa nativnim inokulumom uz primenu transglutaminaze i koncentrata proteina surutke imaju za 15% niži sadržaj laktoze, a uzorak 15% I za 2% niži sadržaj u odnosu na uzorak 10% I. Uzorci proizvedeni sa 10% MFI i 15% MFI imaju za 11%, odnosno 21% niži sadržaj laktoze nakon proizvodnje u poređenju sa odgovarajućim uzorcima dobijenim uz primenu nativnog inokuluma. Sniženje sadržaja laktoze je praćeno povećanjem sadržaja galaktoze i L-mlečne kiseline u svim uzorcima. U fermentisanim mlečnim napicima dominantno je zastupljena L-mlečna kiselina (preko 80%). Funkcionalni fermentisani mlečni napici imaju prosečno 10 puta viši sadržaj L-mlečne kiseline od sadržaja sirćetne kiseline. Sadržaj etanola je najviši u uzorku 10% MFI, a najniži u uzorku 1,5% UPI, i direktno je povezan sa većim brojem kvasaca u odnosu na broj bakterija sirćetne kiseline u inokulumu. Tokom skladištenja sadržaj laktoze u svim uzorcima opada, dok sadržaj galaktoze, glukoze, fruktoze i L-mlečne kiseline raste.

Fermentisani mlečni napici predstavljaju i bogat izvor minerala, pri čemu je dominantno zastupljen kalcijum – prosečan sadržaj iznosi 1245,5 mg/kg.

Sadržaj vitamina C prosečno iznosi 110,6 g/kg. Konzumiranjem 500 g napitka mogu da se zadovolje dnevne potrebe odraslih za vitaminom C.

Sadržaj vitamina B kompleksa (B₁, B₂ i B₆) u napitku je niži od sadržaja vitamina C. Fermentisani mlečni napici proizvedeni primenom čajne gljive iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti sa dodatkom 10% inokuluma čajne gljive sadrže najviše vitamina B₂ – 108 µg/100g, odnosno 136 µg/100g. Potrebe humanog organizma za navedenim vitaminima B kompleksa su manje, tako da se konzumiranjem 150 g fermentisanog mlečnog napitka sa čajnom gljivom mogu zadovoljiti potrebe dece, a dnevnom unosom 300 g napitka zadovoljile bi se potrebe odraslih za vitaminima B kompleksa.

U analiziranim uzorcima najzastupljenija je palmitinska kiselina C16:0 (cis+trans) čiji udeo iznosi 29,9% (uzorak 10% I iz mleka sa 0,9 % masti), odnosno 29,3 % (uzorak 10% I iz mleka sa 2,2 % masti).

Na osnovu izolacije i identifikacije kvasaca i bakterija sirćetne kiseline iz čajne gljive, utvrđeno je da mikrofloru bakterija sirćetne kiseline sačinjavaju vrste *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter xylinum*. Od kvasaca utvrđeno je prisustvo vrsta koje pripadaju rodovima *Saccharomyces*, *Candida* i *Kloeckera*. Tokom fermentacije mleka primenom inokuluma čajne gljive povećava se broj svih mikroorganizama i značajno je veći u poređenju sa brojem u polaznom inokulumu. Mikrobiološki sastav napitaka se razlikuje u zavisnosti od vrste i sastava korišćenog inokuluma. Najveći broj BSK ($4,5 \cdot 10^4$ ćelija/mL) i kvasaca ($9 \cdot 10^4$ ćelija/mL) je u uzorku 10% MFI, dok je manji u napitku 10% I i iznosi BSK:kvasci = $4,05 \cdot 10^4$: $4,5 \cdot 10^4$.

Uzorci proizvedeni uz dodatak 0,02% transglutaminaze bez obzira na vrstu korišćenog inokuluma imaju bolje fizičko-hemijske, reološke (tekstura i viskozitet) i senzorne karakteristike. Najbolje teksturalne karakteristike imaju uzorci: 1,5% UPI+TG i 10% I+TG. Tokom 10 dana skladištenja minimalne su promene teksturalnih karakteristika kod uzoraka sa nativnim inokulumom i mikrofiltriranim inokulumom, dok opadaju kod uzoraka proizvedenih primenom inokuluma koncentrovanog uparavanjem.

Funkcionalni fermentisani mlečni napici proizvedeni iz mleka sa 0,9% masti uz primenu 10% inokuluma čajne gljive i 0,02% TG imaju gusto isprepleten proteinski matriks sa uočljivim prisustvom mikroorganizama. Veličina mikroorganizama prisutnih u lancima ili pojedinačno kreće se od 1 μm do 1,5 μm . Mikrografija uzorka 10%+0,02%TG je direktno povezana sa rezultatima dobijenim za sinerezis i sposobnost vezivanja vode. Uzorci proizvedeni sa mikrofiltriranim koncentratom čajne gljive imaju izdiferenciranu strukturu proteinskog matriksa u kome je veoma dobro uočljivo prisustvo bakterija u vidu lanaca.

Generalno posmatrano, proizvodnja napitka iz mleka sa 0,9% i 2,2% masti uz primenu 10% nativnog inokuluma daje proizvod optimalnih hemijskih, mikrobioloških i senzornih karakteristika, dok se dodatkom transglutaminaze značajno poboljšavaju fizičko-hemijske i reološke osobine proizvoda.

Funkcionalni fermentisani mlečni napici proizvedeni uz primenu čajne gljive su proizvodi visoke nutritivne vrednosti namenjeni različitim kategorijama potrošača.

LITERATURA

1. Akhnazarova, S., Kafarov, V. (1982): *Experimental Optimization In Chemistry And Chemical Engineering*, Mir Pub. Moscow, p. 54
2. Allen, C. M. (1998): Past research on kombucha tea, The Kombucha, FAQ Part 6, Research and Test results, <http://persweb.direct.com/changen/kombucha-faq-part06.html>.
3. Antunes, A.E.C., Antunes, A.J., Cardello, H.M.A.B. (2004): Chemical, physical, microstructural and sensory properties of set fat-free yogurts stabilized with whey protein concentrate. *Milchwissenschaft*, 59 (3/4), 161-165.
4. Atamer, M., Carić, M., Milanović, S., Gavarić, D. (1996): Kvalitet jogurta proizvedenog iz UF mleka, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, Matica srpska Novi Sad, No 91, 19-26.
5. Bellosa–Morales, G., Hernandez–Sanches, H. (2003): Manufacture of a beverage from cheese whey using a tea fungus fermentation, *Revista Latinoamericana Microbiologia*, 45 (1–2), 5–11.
6. Bergmeyer, H. U. (1988): *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 rd ed., Vol. VI, pp. VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge UK, 1150.
7. Beshkova, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I., Simov, Z.I., Dimitrov, Z.P. (2003): Production of volatile compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 13, 529-535.
8. Bhullar, Y.S. Uddin, M.A. Shah, N.P. (2002): Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. *Milchwissenschaft*, 57 (6), 328-332.
9. Bergey, D.H., Krieg, N.R., Holt, J.H. (1984): *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, 9th ed., Baltimore, London, Williams & Wilkins, p. 2648.
10. Blanc, P.J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* 18:139-142.
11. Bönisch, M.P., Huss, M., Lauber, S., Kulozik, U. (2007a): Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids*, 21, 585-595.
12. Bönisch, M.P., Huss, M., Weitzl, K., Kulozik, U. (2007b): Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal*, 17, 1360–1371.

13. Bönisch, M.P., Lauber, S., Kulozik, U. (2007c): Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition. *International Dairy Journal*, 17, 3-11.
14. Bönisch, M.P., Lauber, S., Kulozik, U. (2004): Effect of ultra high temperature treatment on the enzymatic crosslinking of micellar casein and sodium caseinate by transglutaminase. *Journal of Food Science*, 69, 398 – 404.
15. Buckenhusses, H. J.(1993): FEMS Microbiol. Rev. 12, 253-272.
16. Carić, M. (1997): Savremeni razvoj tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda u monografiji: Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda, Jugoslovenski mlekarski simpozijum, Zlatibor, 26-55 .
17. Carić, M., Milanović, S., Đurić, M., Tekić, M., Iličić, M., Duraković, K.(2006): Primena transglutaminaze u tehnologiji mleka, *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 17, 1-2, 43-47.
18. Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D. (2000): Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad, p. 202.
19. Chandan, C.R., Shandani, K. M. (1993): Yogurt, in Dairy Science And Technology Handbook, Volume 2: Product Manufacturing, Ed.: Y.H. Hui, New York, pp. 1-56.
20. Cvetković, D. (2008): Kombuha od lekovitog bilja – biološka aktivnost i parametri fermentacije, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, p.86.
21. Cvetković, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski A. (2008): Specific interfacial area as a key variable in scaling –up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*, 85, 387-392.
22. Čurić, M. (1998): Improving and Stabilising the Aroma in Fermented Dairy Products. PhD Thesis, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.
23. Danielova, L.T. (1954): K morfologii "chainogo gryba". Trudy Erevanskogo zooveterinarnogo Instituta 17, 201-206.
24. De Lay J. (1984): Family VI Acetobacteriaceae. In Bargeys manual of systematic bacteriology (Ed. Kreig R.N., Holt, G.J.), Williams&Wilkins Co., Baltimore, 267-278.
25. Dimitrellou, D., Tsasousi K., Korkoutas, Y., Panas, P., Kanellaki, M., Koutinas, A. (2008): Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture. *Process Biochemistry*, 43, 1323-1329.
26. Divies, C., Cachon, R. (1998): Alterations par les bacteries acetiques - in Oenologic Fondaments scientifiques et technologiques, C. Flanzly (ed.), Londres, Paris-New York, 539-552.
27. Djurić, M., Milanović, S., Carić, M., Iličić, M., Duraković, K. (2008): Optimization of transglutaminase activation for production of probiotic yoghurt, International Conference on Science and Technique in the Agri-food Business, ICoSTAF2008, PROCEEDINGS on CD, November 5-6, Szeged, , 2008, 115.
28. Dufresne, C., Farnworth, E. (2000): Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International* 33(6), 409-421.
29. EC Regulation (1997): No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997, concerning novel foods and novel food ingredients, OJ L 43, 14.2.1997.
30. El-Soda, M.A., Korayem, M., Ezzat, N. (1986): *Milchwissenschaft*, 41, 353.

31. Entani, E., Ohmuri, S., Masai, H., Suzuki, K.I. (1985): *Acetobacter polyoxogenus* sp. nov. a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *General Applied Microbiology*, 31, 475-490.
32. Færgemand, M., Sørensen, M., Jørgensen, U., Budolsfen, G., Qvist, K.B. (1999): Transglutaminase: Effect of instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*, 54, 563-566.
33. Fang, Q, QingNing, M., Feng Yi, W. (2002): Study on fermented milk komiss. *China Dairy Industry*, 30, 98-99.
34. Fox, P. F., Kelly, A. L. (2004): Milk proteins: Technological aspects, International Dairy Symposium » Recent Developments in Dairy Science and Technology«, Isparta – Turkey, 24- 28 May, 2004, Proceedings, p.17.
35. Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007): *Wine microbiology – Practical Application and Procedures*, Second Edition, Springer, 19-22.
36. Gavarić, D.Đ., Carić, M., Kalab, M. (1989): Effects of protein concentration in ultra-filtration milk retentates and type of protease used for coagulation on the microstructure of resulting gels. *Food Microstructure*, vol. 8, 53-66.
37. González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot J.M., Chiralt, A. (2002): Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 334–340
38. Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A. (2000): Kombucha, the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63 (7), 976-981.
39. Gregurek, Lj. (2001): Nova generacija prebiotika. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, vol. 12, 1-2, p. 4.
40. Gregurek, Lj., Tonković, K. (2008): Jogurt-potrošnja i trendovi. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, vol. 19, 1-2, 7-9.
41. Guler, Z. (2008): Evaluation of lypolysis in set-type fermented milks made with different commercial yoghurts starter cultures during storage. *Milchwissenschaft*, 63 (1), 73-77.
42. Gustaw, W., Glibowski, P., Mleko, S. (2006): The rheological properties of yoghurt with incorporated whey protein aggregates/polymers. *Milchwissenschaft*, 61(4) 415-419.
43. Guzman-Gonzalez, M., Morais, F., Ramons, M., Amigo, L. (1999): *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117-1122.
44. Harrera, T., Calderon-Villagomez, A. (1989): Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus. *Rev. Mex. Microbiol.*, 5 205-210.
45. Hassan, A.N., Ipsen, R., Janzen, T., Qvist, K.B. (2003): Microstructure and rheology of yoghurt made with cultures differing in the ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86, 4632-4638.
46. Hilliam, M. (1998): The Market for functional foods. *International Dairy Journal* 8, 349-353.
47. Holland, B. Unwin, I.D., Buss D.H. (1989): Milk products and egg, 4th Supplement to McCance & Widdowson's *The composition of foods*, 4th Edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

48. IDF 105:1985: Determination of fat content of milk (Reference method). Brussels, Belgium.
49. IDF 20:1962. Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. Brussels, Belgium.
50. IDF 90:1979. Rennet caseins and caseinates – Determination of ash (Reference method). Brussels, Belgium.
51. IDF/ISO 21A:1982: Milk, cream and evaporated milk. Determination of the total solids content (Reference Method). Brussels, Belgium.
52. Ikura, K., Sasaki, R., Motoki, M. (1992): Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. *Comments Agric. Food Chem.*, 2, 389-407.
53. Irigoyen, A., Arana, I., Casteilla, M., Torre, P. Ibáñez, F.C. (2005): Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry* 90, 613-620.
54. Ishii, S. (1999): Survey of Koumiss (airag) of Mongolian nomads. *Milk Science*, 48 (1), 21-27.
55. *ISO 5509:2000, Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids.*
56. Jajabalan, R., Marimuthu, S., Swaminthan, K. (2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* 102, 392-398.
57. Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., Rohm, H. (2006): Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113–155.
58. Jaziri, I., Ben Slama, M., Mhadhbi, H., Urdaci, M., Hamdi, M. (2009): Effect of green and black teas (*Camelia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yoghurt during fermentation and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 112, 614-620.
59. Jensen, N.B. (1999): Influence of Oxygen on Growth and Products Formation in Lactic Acid Bacteria. PhD Thesis, Technical, University of Denmark, Lyngby, Denmark.
60. Kalab, M. (1993): Practical aspects of electron microscopy in dairy research. *Food Structure*, 12, 95-114.
61. Kalab, M., Carić, M. (1990): Food Microstructure - Evaluation of Interactions of Milk Components in Food Systems, Proceeding of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Canada, J 1457-1480.
62. Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matui, H., Suzuki, E. (2002): Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*, *J. Biol. Chem.* 27746, 44252-44260.
63. Klamnaeva, N.I., Tsyrenov, V.Z. Gongorova, V.S., Shalygina, A.M. (2000): Biosynthesis of biologically active substances in kefir grains. *Mlochnaya Promyshlennost*, 4, 49-53.
64. Kneifel, W., Mayer, H.K. (1991): Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. *International Journal of Food Science and Technology*, 26, 423-428.
65. Konovalov, I. N., Semenova, M. N. (1955): K fiziologii »čajnogo griba«. *Bot. Žurnal (Moskva)*, 40 (4), 567-570.

66. Kulozik, U., Tolkach, A., Bulca, S., Hinrichs, B. (2003). The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production - a survey. *International Dairy Journal*, 13, 621–630.
67. Kuraishi, C., Yamazaki, K., Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221–246.
68. Lauber, S., Henle, T., Klostermeyer, H. (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210, 305–309.
69. Lee, W., Lucey, J.A. (2003): Rheological properties, whey separation and microstructure in set-style yoghurt: effect of heating temperature and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 34, 515-536.
70. Lin Lin, X., Ming Sheng, D. (2003): Screening and cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* KM-16. *China Dairy Industry*, 31 (6), 7-10.
71. Lodder, J. (1974): The yeasts. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
72. Lončar, E., Milanović, S., Carić, M., Malbaša, R., Panić, M. (2001): Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija–Mleko i mlečni proizvodi*, 12 (1-2) 13-17.
73. Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A., Schlimme, E. (2002): Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
74. Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, 9, 275-279.
75. Malbaša, R. (2004): Istraživanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
76. Malbaša, R. (2009): Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe, Monografija, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, p. 93.
77. Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M, Došenović, I. (2008): Effect of sucrose concentration on kombucha fermentation. *Food Chemistry*, 108, 926-932.
78. Malbaša, R., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2009): Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, vol.20, 1-2, 31-34.
79. Marshall, V.M.E., Tamime, A.Y. (1997): Physiology and biochemistry of fermented milks. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk (ed. B.A, Law), 2nd edn, pp.152-192, Blackie Academic & Professional, London.
80. Milanović, S. (1997): Fermentisani mlečni napici za specijalne namene, Monografija “Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda”, ed. D. Obradović i sar., Beograd, Jugoslovenski mlekarski simpozijum, Zlatibor, 49-55.
81. Milanović, S., Carić, M., Ilić, M. (2009): Pregled istraživanja mikrostrukture mlečnih proizvoda. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, vol. 20, 1-2, 100-105.
82. Milanović, S., Carić, M., Lončar, E., Panić, M., Malbaša, R., Dobrić, D. (2002): Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka, *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, 13, 1-2, 8-13,.

83. Motoki, M., Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends Food Science Technology*, 9, 204-210.
84. Nauth, K. R. (2006): Yogurt, u Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Volume 4, Ed.: Hui, Y. H. i sar., Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 152-1 – 152-15.
85. Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., Matsuura, A. (1989): Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from Microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2619–2623.
86. O'Sullivan, M., Lorenzen, P.C., O'Connell, J.E., Kelly, A.L., Schlimme, E., Fox, P.F. (2001). Short Communication: Influence of transglutaminase on the heat stability of milk. *J. Dairy Sci.* 84, 1331-1334.
87. Obradović, D. (2008): Fermentisana mleka - Savremeni trendovi, Biotehnologija u stočarstvu, 101.
88. Obradović, D., Ristić, G., Karić, A. (2001): Perspektive primene probiotika u industriji mleka, Jugoslovenski mlekarski simpozijum – Savremeni trendovi u mlekarstvu, Vrnjačka Banja, 98.
89. Ozer, B., Kirmaci, H.A., Oztekin, S., Hayaloglu, A., Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
90. Papapostolou, H., Bosnea, L. A. Koutinas, A.A., Kanellaki M. (2008): Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresource Technology* 99, 6949-6956.
91. Patočka, G., Cervenková, R., Jelen, P. (2004): Textural effects of soluble whey protein isolate in stirred yogurt. *Milchwissenschaft*, 59 (1/2) 37-41.
92. Petrović, S., Lončar, E. (1996): Content of water-soluble vitamins in fermentative liquids of tea fungus. *Mikrobiologija*, 33 829, 101-106.
93. Piermaria, J., Mariano de la Canal, Abraham, A. (2008): Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22, 1520-1527.
94. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture (2002): Sl. list SRJ br. 26.
95. Prospektni materijal kompanije "Ajinomoto" (2003).
96. Puhan, Z. (1973): Einige auslaendische Suermilcherzeugnisse. *Schweizerische-Milchzeitung*, 99 (20), 149-151.
97. Puhan, Z., Driessen, F. M., Jelen, P., Tamime, A. Y. (1994): Fresh product-yoghurt, fermented milks, Quark and fresh cheese, Proceeding of the »24th Int. Dairy Congress«, Melbourne, 1-11.
98. Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W., Augustin, M.A. (2002): Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios, *International Dairy Journal*, 12, 383-391.
99. Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakulte, Beograd i Tehnološki fakultet, Novi Sad.
100. Reiss, J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters Forsch* 198, 258-261.

101. Renner, E. (1983): Milk and Dairy Products in Human Nutrition, W-GmbH, Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen, p. 450.
102. Renner, E., Schaafsma, G., Scott, K. J. (1989): Micronutrients in Milk and Milk Based Food Products, E. Renner, Ed. Elsevier Applied Science, London, 1-9.
103. Rodriguez-Nogales, J. M. (2006): Enhancement of transglutaminase –induced protein cross-linking by preheat treatment of cow’s milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, 16, 26-32.
104. Rouz, H.A. (1975): Hemijska mikrobiologija, ICS, Beograd, 121.
105. Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E.J. (2004): Microstructure and texture of yoghurt as influenced by fat replacers, *International Dairy Journal* 14, 151-159.
106. Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid U., Teuber, M. (1995): Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:590-594.
107. Smolin, L., Grosvenor, M. (2000): Nutrition, Science and Applications, Saunders College Publishing, A Division of Harcourt College Publishers, Third edition, p. 597.
108. Steels, H., James, A. J., Bond, C. J., Roberts, N. I., Stratfore, M. (2002): *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast research*, 2(2) 113-121.
109. Swings, J. (1992): The Prokaryotes, 2nd ed, eds. By A. Ballows, Springer-Verlag, p. 2268-2286.
110. Tamime, A., Deeth, H.C. (1980): *Journal of Food Protection*, 43,939.
111. Tamime, A.Y. (2002): Probiotics fermented milks, a Critical Review, Zbornik sažetaka, 35. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran, Hrvatska mljekarska udruga Zagreb, 38-41.
112. Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (1985): *Yoghurt-Science and Technology*, Pergamon Press, Oxford, England, p.431.
113. Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2004): *Yoghurt, Science and Technology*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, p.619.
114. Tamime, A.Y. (2006): *Fermented Milks*, Blackwell Science Ltd, UK, p. 262.
115. Tamime, A.Y., Skriver, A., Nilsson, L.E. (2006): Starter culture, ed. by A. Tamime, *Fermented Milks*, Blackwell Science, Ayr, UK, 11- 52.
116. Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004): Yeast ecology of Kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 95, Issue 2, 119-126.
117. Tolkach, A., Kulozik, U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation by means by enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. *Journal of Food Engineering*, 67, 13-20.
118. Vélez-Ruiz, J. F. (2008): Rheological properties of yoghurt, ch. 6 in *Progress in Food Engineering Research and Development*, ed.by Jerrod M. Cantor, Nova Science Publishers, Inc. New York, 223-242.

119. Walker, G.M. (1998): *Yeast Physiology and Biotechnology*, pp.203-264, John Wiley & Sons, Chichester.
120. Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Guldager, H., Tamime, A.Y. (2006): Production of Kefir, Koumiss and other related products, ed. by. Tamime u: *Fermented milks*, Blackwell, Science, 175-203.
121. Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y. (2004): Properties and applications of microbial transglutaminase, *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 447-454.
122. Zahoor, T., Siddique, F., Farooq, U. (2006): Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *British Food Journal*, 109 (6) 429-439.