



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

**PROMENE KOMPONENATA I STRUKTURE MLEKA
TOKOM FERMENTACIJE DODATKOM
NEKONVENCIONALNOG STARTERA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Spasenija Milanović

Kandidat: Dipl. Inž. Katarina Kanurić

Novi Sad, 2014.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji dobijeni su u okviru istraživanja na projektu III 46009 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Spaseniji Milanović na svesrdnoj pomoći, potpunoj i iskrenoj posvećenosti i predanosti ovom radu. Njena nesebična pomoć, podrška i prijateljstvo doprineli su lakšem i jednostavnijem savladavanju svih prepreka koje su se javile tokom izrade ovog rada i pomogle mi da ga uspešno privedem kraju.

Zahvaljujem se dr. Marijani Carić, prof. emeritusu koja je prva prepoznala moj nastavno–naučni potencijal i ukazala mi izuzetno poverenje i čast izabravši me za svog saradnika.

Zahvaljujem se prof. dr Mirjani Đurić na neizmernoj pomoći i divnoj saradnji.

Zahvaljujem se prof. dr Evi Lončar na stručnim savetima i sugestijama tokom izrade ovog rada.

Srdačno se zahvaljujem na saradnji prof. dr Ognjenu Maćeju, koji mi je učinio čast da bude član komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Katarina Kanurić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Spasenija Milanović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	PROMENE KOMPONENATA I STRUKTURE MLEKA TOKOM FERMENTACIJE DODATKOM NEKONVENCIONALNOG STARTERA
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja 6, stranica 128, slika 62, tabela 31, referenci 209
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Fermentacija mleka, kombuha, produkti, reologija, mikrostruktura, kinetika fermentacije
UDK	

<p>Čuva se: ČU</p>	<p>Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1</p>
<p>Važna napomena: VN</p>	<p>Nema</p>
<p>Izvod: IZ</p>	<p>Promene komponenata i strukture mleka ispitane su tokom fermentacije korišćenjem inokuluma kombuhe kultivisane na crnom čaju zaslađenom saharozom u koncentraciji 10%. Fermentacija mleka sa 2,2% mlečne masti izvršena je na dve različite temperature (37°C i 42°C) i uzorci su analizirani pri sledećim pH vrednostima: 6,1; 5,8; 5,4; 5,1; 4,8 i 4,6. Urađeno je određivanje i identifikacija produkata fermentacije laktoze kao što su: šećeri, organske kiseline i masne kiseline. Ispitane su teksturalne i reološke karakteristike i mikrostruktura uzoraka. Pored toga, utvrđene su sličnosti i razlike uticaja inokuluma kombuhe na proces fermentacije mleka u poređenju sa delovanjem jogurtne, odnosno probiotske starter kulture.</p> <p>Tokom fermentacije mleka u različitim fazama procesa pri odabranim pH vrednostima na 42°C transformiše se 14,6% laktoze odnosno 18,2% na 37°C. Sadržaj galaktoze i glukoze koje nastaju fermentacijom i hidrolizom laktoze raste između prve i druge tačke fermentacije (pH=6,07 i pH=5,8). Dominantne organske kiseline tokom fermentacije su L-mlečna kiselina i sirćetna kiselina. Nije utvrđena značajna razlika u sadržaju masnih kiselina tokom fermentacije mleka kombuhom na 37°C i 42°C. Sadržaj palmitinske kiseline u mleku i uzorcima tokom fermentacije je najveći, zatim slede miristinška, stearinška i oleinska kiselina.</p> <p>Praćenjem procesa fermentacije mleka uz primenu kombuhe na 37°C i 42°C od početne pH vrednosti 6,07 do završne 4,6, najznačajnije promene teksturalnih karakteristika (čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i indeksa viskoziteta) i reoloških svojstava zabeležene su između pH=5,4 i 5,1, što je u korelaciji sa mikrostrukturom dobijenih proizvoda.</p> <p>Promene viskoziteta u svim fermentisanim uzorcima pokazuju istu regresionu liniju, sa različitim koeficijentima i visokom vrednošću r^2, osim uzorka proizvedenog primenom jogurtne kulture na pH 5,4. Uzorak dobijen korišćenjem inokuluma kombuhe imao je najveće vrednosti kompleksnog modula, što je rezultiralo boljim reološkim karakteristikama gotovog proizvoda.</p> <p>Da bi se definisao empirijski model procesa fermentacije laktoze u mleku delovanjem kombuhe formulisana su prethodno dva matematička modela</p>

	<p>za kinetiku fermentacije saharoze u tradicionalnom kombuha napitku (na crnom čaju) – jedan koji opisuje promenu koncentracije saharoze tokom fermentacije, i drugi koji opisuje brzinu fermentacije. Promena koncentracije laktoze na ispitivanim temperaturama 37°C i 42°C sastoji se od dve lag faze između kojih je faza izraženog pada koncentracije. Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku na nižim koncentracijama laktoze, ukazujući na kompleksni ne-Michaelis-Mentenov tip kinetike.</p> <p>Generalno može se istaći da su primenom inokuluma kombuhe tokom fermentacije mleka u različitim fazama procesa ustanovljene specifične promene komponenata i strukture u poređenju sa efektima delovanja jogurtne odnosno probiotske starter kulture.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	12.07.2012.
Datum odbrane: DO	
<p>Članovi komisije:</p> <p>predsednik:</p> <p>član (mentor):</p> <p>član:</p> <p>član:</p>	<p>dr Marijana Carić, profesor emeritus, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>dr Spasenija Milanović, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>dr Eva Lončar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>dr Ognjen Maćej, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Katarina Kanurić
Mentor: MN	Dr. Spasenija Milanović, full professor, Faculty of Technology Novi Sad
Title: TI	CHANGES OF MILK COMPONENTS AND STRUCTURE DURING FERMENTATION PROCESS BY NON-CONVENTIONAL STARTER
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	Chapters 6, pages 128, figures 62, tables 31, references 209
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Dairy technology
Subject, Key words SKW	Milk fermentation, kombucha, products, rheology, microstructure, fermentation kinetics
UC	

Holding data: HD	Faculty of Technology (library), 21 000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Changes of milk components and structure were examined during fermentation by kombucha inoculum cultivated on black tea switened with saccharose in a concentration of 10%. The fermentation of milk with 2.2% of milk fat was carried out at two different temperatures (37°C i 42°C) and samples were analyzed at the following pH values: 6.1; 5.8; 5,4; 5.1; 4.8 and 4.6. Determination and identification of the lactose fermentation products, such as: sugars, organic acids and fatty acids were carried out. Textural and rheological characteristics and microstructure of the samples were investigated. Furthermore, the effect of kombucha on the milk fermentation process was compared with the effect of yoghurt and probiotic starter culture.</p> <p>During milk fermentation at various stages of the process 14.6% of lactose content was transformed at 42°C and 18.2% at 37°C. The galactose and glucose content, which are formed by lactose hydrolyses and fermentation, increased between first and second pH point of fermentation (pH = 6.07 and pH = 5.8). Dominant organic acids during fermentation are L-lactic acid and acetic acid. There is no significant difference between samples in fatty acids content during fermentation on 37°C and 42°C. The level of palmitic acid in milk and samples was the highest of all fatty acids, followed by myristic, stearic, and oleic acid.</p> <p>The most significant changes in textural properties (firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index) and viscosity during milk fermentation by kombucha at 37°C and 42°C, from the initial pH value 6.07 to a final 4.6, were recorded between pH=5.4 and 5.1, which is in correlation with microstructure.</p> <p>Viscosity changes in all samples showed the same regression line with the different coefficients and a rather high r^2 except for the sample produced with standard yoghurt culture at the pH 5.4. Samples produced with kombucha had the highest values of the complex modulus, which indicates better rheological characteristics of the final product.</p> <p>In order to define an empirical model of lactose fermentation process in milk by kombucha, two mathematical models (one for the change of saccharose concentration, during its fermentation by kombucha, and the other for the rate of the mentioned fer-</p>

	<p>mentation) were formulated previously. Change of lactose concentrations at 37°C and 42°C consists of two retaining stages and very steep descend in-between. Saturation curves show a sigmoidal kinetics at low lactose concentrations, indicating a complex non-Michaelis–Menten type kinetics.</p> <p>Generally it can be concluded that specific changes in the components and structure of milk by application of kombucha inoculum during fermentation at different stages of the process were established in comparison with the effects of probiotic vs yoghurt starter culture.</p>
Accepted on Senate on: AS	12.07.2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB president: member (mentor): member: member:	<p>Dr. Marijana Carić, professor emeritus, University of Novi Sad</p> <p>Dr. Spasenija Milanović, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>Dr. Eva Lončar, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad</p> <p>Dr. Ognjen Maćej, full professor, Faculty of Agriculture, University of Belgrade</p>

SADRŽAJ

UVOD	1
OPŠTI DEO	3
FERMENTISANI MLEČNI PROIZVODI	3
Starter kulture u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda.....	5
Mezofilne starter kulture.....	7
Termofilne starter kulture.....	7
Faktori koji inhibiraju starter kulture.....	9
Formiranje egzopolisaharida.....	10
Vrste fermentisanih mlečnih proizvoda	11
Mlečno kisela fermentacija mleka	11
Fermentacija kvascima i bakterijama mlečne kiseline	18
Plesni u mlečno kiseloj fermentaciji.....	20
BIOHEMIJSKE TRANSFORMACIJE KOMPONENATA MLEKA	21
Metabolizam ugljenih hidrata.....	21
Transport ugljenih hidrata i hidroliza	22
Produkcija aromatičnih komponenata	26
Organske kiseline.....	29
Metabolizam masti	35
Promena strukture kazeinske micela i mehanizam formiranja gela	39
KOMBUHA	47
Mikrobiološki sastav	47
Primena kombuhe u proizvodnji napitaka.....	49
MATERIJAL I METODI RADA	56
MATERIJAL	56
Mleko.....	56
Starter kulture	56
Inokulum kombuhe	56
Jogurtna kultura	57
Probiotska starter kultura	57
PROIZVODNJA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA	57
I eksperiment	57
II eksperiment.....	58
III eksperiment.....	58
IV eksperiment	59
ANALIZE	60
Fizičko–hemijski kvalitet mleka i fermentisanih mlečnih napitaka	60
Masne kiseline	61
Organske kiseline	61
Viskozitet.....	62
Teksturalne karakteristike	62
Mikrostruktura.....	62
Statistička analiza rezultata	63
REZULTATI I DISKUSIJA	64
PRVI EKSPERIMENT	64
Fermentacija laktoze u model sistemu	64
Fermentacija laktoze u mleku.....	65

Karakteristike dobijenih fermentisanih mlečnih napitaka.....	66
Sadržaj makrokomponentata u fermentisanim mlečnim napicima.....	66
Primarni i sekundarni produkti fermentacije.....	67
Fizičke i teksturalne karakteristike.....	68
DRUGI EKSPERIMENT.....	71
Tok fermentacije i hemijski sastav.....	71
Fizičke karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka.....	72
Uticaj temperature, vrste čaja i perioda skladištenja na kvalitet proizvoda.....	73
TREĆI EKSPERIMENT.....	78
Hemijski sastav mleka sa inokulumom kombuhe.....	78
Hemijski sastav fermentisanog mlečnog napitka.....	78
Promena vrednosti pH tokom fermentacije mleka.....	79
Promena sadržaja šećera tokom fermentacije.....	80
Promena sadržaja organskih kiselina tokom fermentacije.....	81
Promena sadržaja masnih kiselina tokom fermentacije.....	83
Viskozitet.....	86
Teksturalne karakteristike.....	87
Mikrostruktura.....	89
Komparativno ispitivanje toka fermentacije mleka.....	92
Kriva fermentacije.....	92
Viskozitet.....	93
Teksturalne karakteristike.....	96
ČETVRTI EKSPERIMENT.....	100
Kinetika fermentacije saharoze.....	100
Model koncentracije saharoze.....	102
Model brzine reakcije.....	104
Model fermentacije laktoze.....	107
ZAKLJUČAK.....	109
LITERATURA.....	112

UVOD

Tehnološki razvoj i metabolička aktivnost tradicionalnih i nekonvencionalnih starter kultura omogućili su, na različitim tržištima, postojanje širokog asortimana fermentisanih mlečnih proizvoda. Visoka nutritivna vrednost, terapijska svojstva, primena probiotika i prebiotika doprinose stalnom povećanju potrošnje fermentisanih mlečnih napitaka u svetu i kod nas. Rast ekonomske vrednosti ovih proizvoda u svetu odraz je prihvaćenosti od strane potrošača. Posebno su traženi fermentisani proizvodi koji unapređuju zdravlje zahvaljujući prisustvu funkcionalnih sastojaka. Osim toga, ovi proizvodi su visoko profitabilni i veoma važni u industriji mleka širom sveta. Razvojem tehnologije fermentisanih mlečnih napitaka inovira se i proširuje asortiman visokokvalitetne funkcionalne hrane.

Laktoza je dominantni ugljeni hidrat koji se dejstvom starter kultura u tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda složenim biohemijskim procesima transformiše u dominantno mlečnu kiselinu (homofermentacija–tipično za jogurt i fermentisane mlečne proizvode u tipu jogurta), odnosno pored mlečne kiseline i u druge produkte kao što su etanol i ugljenik (IV)–oksid (heterofermentacija–tipično za kefir i kumis). Laktoza je izvor energije za bakterije u starter kulturi, dok je kazein zajedno sa kalcijumom i fosforom odgovoran za formiranje strukture gela tokom fermentacije. Osnovne karakteristike gela jogurta su odgovarajuća tekstura, viskozitet i mikrostruktura. Glavne strukturne promene tokom proizvodnje jogurta dešavaju se na kazeinskim micelama, zbog promene pH vrednosti. Poznato je da kazeinske micelle čine različite proteinske frakcije koje su povezane preko kalcijum–fosfatnih mostova. Tokom fermentacije mleka usled snižavanja pH vrednosti dolazi do disagregacije kazeinskih micela, pri čemu se izdvajaju kalcijumovi joni, potom se odvija agregacija i formira se trodimenzionalna struktura gela. Na osnovu fizičko–hemijskih promena koje se dešavaju tokom acidifikacije, može da se zaključi da do nastajanja gela dolazi usled agregiranja kazeinskih micela u grozdove i lance, odnosno u trodimenzionalni proteinski matriks.

Sve je veći broj fundamentalnih naučnih istraživanja o tradicionalnim i novim formama starter kultura. Poznato je da tip starter kulture određuje nutritivne, reološke i senzorne osobine fermentisanog mlečnog proizvoda. Detaljno je istražena uloga jogurtne i probiotske starter kulture u razvoju brojnih i raznovrsnih fermentisanih mlečnih proizvoda. Dosadašnja istraživanja mogućnosti primene kombuhe–nekonvencionalnog startera, u tehnologiji fermentisanih mlečnih

proizvoda bila su usmerena na ispitivanje tehnoloških i nutritivnih karakteristika proizvoda. Međutim, efekat kombuha startera na konverziju mleka u gel tokom procesa fermentacije do sada nije ispitivan. Do nedavno se smatralo da kombuha predstavlja simbiotsku zajednicu bakterija sirćetne kiseline i autohtonih vrsta kvasaca. Bakterije uglavnom pripadaju rodovima *Acetobacter* i *Gluconobacter*. Primarna bakterija u ovoj simbiozi je *Acetobacter xylinum*. U kulturama kombuhe, zavisno od geografskog porekla, identifikovane su različite vrste kvasaca iz rodova *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Brettanomyces*, *Torulaspota* i *Candida*. Najnovija istraživanja potvrđuju prisustvo i bakterija mlečne kiseline, roda *Lactobacillus* u mikrobnim populacijama kombuhe. S obzirom na specifičnost kombuhe kao starter kulture, važno je da se objasne mehanizmi reakcija tokom procesa fermentacije mleka koje izazivaju destabilizaciju kazeina i doprinose formiranju stabilne trodimenzionalne strukture gela optimalnih nutritivnih, reoloških i senzornih karakteristika.

Stoga je cilj ove disertacije da se ispituju promene komponenata i strukture mleka tokom fermentacije dodatkom inokuluma kombuhe i da se definiše empirijski model transformacije laktoze. Na osnovu rezultata dobijenih fermentacijom mleka sa različitim sadržajem masti i koncentracije i vrste primenjenog inokuluma, za ispitivanje promena komponenata i strukture mleka korišćena je kombuha kultivisana na crnom čaju zaslađenom saharozom u koncentraciji 10%. Fermentacija mleka sa 2,2% mlečne masti izvršena je na dve različite temperature (37°C i 42°C) i uzorci su analizirani pri sledećim pH vrednostima: 6,1; 5,8; 5,4; 5,1; 4,8 i 4,6. Takođe, urađena je determinacija i identifikacija produkata fermentacije laktoze kao što su: šećeri, organske kiseline i masne kiseline. Pored toga, utvrđene su sličnosti i razlike uticaja inokuluma kombuhe na proces fermentacije mleka u poređenju sa delovanjem jogurtne, odnosno probiotske starter kulture.

OPŠTI DEO

FERMENTISANI MLEČNI PROIZVODI

Prvobitno, primarna funkcija fermentacije bila je produženje trajnosti mleka. Sa ovim su došle brojne prednosti kao što su poboljšanje ukusa i digestibilnosti mleka, kao i proizvodnja širokog spektra proizvoda. Istorijski posmatrano fermentacija mleka može da se prati unazad do oko 10 000 god. p.n.e., kada je ljudski rod prestao samo da sakuplja hranu već je počeo i da je proizvodi (Pederson, 1979). Najverovatnije je fermentacija nastala spontano, delovanjem prisutne mikroflore u mleku.

Veliki broj različitih fermentisanih mlečnih proizvoda (od kojih je najpopularniji jogurt), za koje postoji oko 400 naziva, proizvodi se širom sveta. Potrošnja ovih proizvoda, po glavi stanovnika u svetu, izuzetno je porasla tokom poslednjih nekoliko decenija. Različiti tipovi fermentisanih mlečnih proizvoda klasifikuju se prema vrsti fermentacije i/ili proizvodnje koja je povezana sa vrstama mikroorganizama koji se pri tome koriste. Postoje brojne podele ovih proizvoda, od kojih se mnoge, manje ili više preklapaju. Tamime i Deeth (1980) predložili su klasifikaciju koja razvrstava tipove jogurta u četiri kategorije u zavisnosti od njihovih fizičkih karakteristika. Takav pristup može se primeniti i na ostale fermentisane mlečne proizvode (tabela 1).

Tabela 1. Klasifikacija proizvoda u tipu jogurta (Tamime, 2006)

Kategorija	Fizičke osobine	Proizvod
I	tečno/viskozno	jogurt (čvrst, tečan, "drinking")
II	polučvrsto	koncentrovani
III	čvrsto	smrznuti jogurt
IV	praškasto	sušeni (jogurt u prahu)

Klasifikacija fermentisanih mlečnih proizvoda može se izvršiti i prema drugim kriterijumima:

- poreklu sirovine – mleko krave, ovce, koze, bivolice, kamile i dr.;
- hemijskom sastavu mleka – punomasno, mleko standardizovano na određeni procenat masti, mlaćenica;
- načinu obrade mleka – pasterizovano, homogenizovano ili nehomogenizovano mleko;

- vrsti fermentacije – homofermentativna ili heterofermentativna;
- dodacima – proteini, vitamini, mineralne materije, arome, voće, povrće i dr.

Fermentacija mleka podrazumeva konverziju laktoze u mlečnu kiselinu delovanjem bakterija mlečne kiseline. Fermentisani mlečni proizvodi dobijaju se fermentacijom mleka korišćenjem odgovarajućih mikroorganizama (tabela 2). Ovi mikroorganizmi treba da su u proizvodu prisutni u dovoljnom broju, da budu vijabilni i aktivni.

Tabela 2. Tipovi fermentisanih mlečnih proizvoda i njihove starter kulture (Suroño i Hosono, 2011a)

Proizvod/poreklo	Starter kultura
Acidofilno mleko	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Biogarde ^R	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Bioghurt ^R	<i>Sc. thermophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i>
Bifighurt ^R	<i>Bif. bifidum</i> <i>Sc. thermophilus</i>
Mlaćenica (Bugarska)	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Mlaćenica (kultivisana)	Komercijalna starter kultura ili kombinacija: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , i <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Cultura	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Bif. bifidum</i>
Cultured cream	Kao za kultivisanu mlaćenicu, ali najčešće bez <i>Leuconostoc</i> spp.
Dahi	<i>Sc. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ili <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> (krajnji izbor zavisi od zemlje u kojoj se proizvodi)
Dadih	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> (zavisi od zemlje u kojoj se proizvodi)
Filmjölkk	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Kefir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp.
Nemački kefir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Candida kefir</i>
Kumis	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces lactis</i> , <i>Torula koumiss</i>
Tätmjölkk	Kao za Filmjölkk
Viili	Kao za Filmjölkk plus <i>Geotrichum candidum</i>
Yakult	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>
Jogurt (uključujući labneh i slične proizvode)	<i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Pažljiva selekcija mikroorganizama prisutnih u starter kulturi važna je za formiranje osnovnih i specifičnih karakteristika svakog fermentisanog mlečnog proizvoda uz temperaturu kao važan faktor. Tabela 2 pokazuje primere poznatih fermentisanih mlečnih proizvoda, sa mikroorganizmima koji se koriste kao starter kulture pri njihovoj proizvodnji.

Starter kulture u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda

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).

Starter kulture su bile nepoznate do 1878. godine, kada je Joseph Lister izolovao čistu kulturu bakterija mlečne kiseline. Početkom XX veka komercijalna proizvodnja i upotreba starter kultura doživela je ekspanziju.

Savremena proizvodnja kvalitetnih fermentisanih mlečnih proizvoda zahteva upotrebu starter kultura koje najčešće sadrže kombinaciju različitih vrsta i sojeva mikroorganizama, uglavnom bakterija mlečne kiseline. 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 (Buchenskes, 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 metabolitska 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, karbonilnih 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 da se koriste za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda. Vrsta, udeo i odnos pojedinih grupa mikroorganizama u starter kulturi utiče na proces i tip fermentacije – homo- ili heterofermentacija.

Tabela 3. Starter kulture koje se primarne koriste za fermentaciju mleka (Surono i Hosono, 2011b)

Mezofilne	Termofilne
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Lb. helveticus</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.

Bakterije mlečne kiseline koje se koriste kao starter kulture u odnosu na tolerantnost prema temperaturi (tabela 3) generalno se dele na:

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

Mezofilne starter kulture

Mezofilne starter kulture su široko rasprostranjene u industriji fermentisanih mlečnih proizvoda kao što su "filmjölkk" i "lactofil" (u Švedskoj) i "ymer" (u Danskoj). Mezofilna starter kultura gotovo sigurno sadrži *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ali će retko ova vrsta biti sama. Mlaćenica, "långfil", i "villi", koji su popularni u Norveškoj, Švedskoj i Finskoj, pored *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sadrže i vrste roda *Leuconostoc*. Ostali fermentisani mlečni proizvodi sa mezofilnim starter kulturama su i kisela pavlaka, kefir i dr.

Termofilne starter kulture

Termofilne starter kulture (tabela 4) koriste se u proizvodnji jogurta i čitavog niza proizvoda koji se dobijaju delovanjem intestinalnih bakterija, primarno laktobacila i bifidobakterija. Termofilne starter kulture se dele u dve osnovne grupe, sa nedefinisanim i definisanim vrstama mikroorganizama u svom sastavu. Primeri definisanih termofilnih starter kultura su: *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, gde su njihov rast i produkcija mlečne kiseline poboljšani uzajamnim odnosom ove dve vrste; *Lb. acidophilus*, koristi se u proizvodnji acidofilnog mleka i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* koristi se u proizvodnji "yakulta".

Tabela 4. Karakteristike termofilnih starter kultura (Surono i Hosono, 2011b)

Karakteristika	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Oblik ćelija i konfiguracija	Sferičan do ovalan, parovi do dugih lanaca	Štapići sa okruglim krajevima, pojedinačni, kratki lanci, metahromatske granule	Štapići sa okruglim krajevima, pojedinačni, parovi, kratki lanci, bez metahromatskih granula	Štapići sa kvadratnim krajevima, kratki/dugi lanci	Zakrivljeni štapići sa račvastim krajevima (Y oblik); mogu imati više grana
Temperatura rasta (°C)					
Optimum	40–45	40–45	37	37	37
Minimum	20	22	20–22	15–20	22
Maksimum	50	52	45–48	40–45	48
Temperatura inkubacije (°C)	40–45	42	37	37	37
Toplotna tolerancija (60°C, 30 min.)	++	+			
Izomeri mlečne kiseline	L(+)	L(-)	DL	L(+)	L(+)
Produkcija mlečne kiseline u mleku (%)	0,6–0,8	1,7–1,8	0,3–2,0	1,2–1,5	0,1–1,4
Produkcija sirćetne kiseline (%)	U tragovima	U tragovima	+	+	+++
Produkcija CO ₂					
Proteolitička aktivnost	±	+	±	±	+
Lipolitička aktivnost	±	±	±	±	±
Citratna fermentacija					
Komponente ukusa/arome	++	++	+	±	++
Produkcija mukopolisaharida	±	++	-	±	++
Produkcija hidrogen peroksida	±	+	+	+	+
Produkcija alkohola		U tragovima	U tragovima	U tragovima	U tragovima
Tolerancija soli (% max.)	2,0	2,0	6,5	2,0	2,0

Faktori koji inhibiraju starter kulture

Brojni faktori mogu negativno da utiču na aktivnost starter kultura i dovedu do lošeg kvaliteta fermentisanog mlečnog proizvoda. Kad se mlečna kiselina ne proizvodi željenom brzinom i u potrebnim količinama, starter se naziva "sporim". Sporost u delovanju startera može biti izazvana genetskim sklopom ili spoljašnjim faktorima. Spoljašnji faktori, između ostalog, uključuju: bakteriofage, rezidue antibiotika i agenasa za sanitaciju, inhibitorne supstance prirodno prisutne u mleku, varijacije u sastavu mleka zbog mastitisa ili sezonskih faktora, i metabolite bakterija koje izazivaju kvar.

Bakteriofagi su virusi koji napadaju bakterije i izazivaju autolizu ćelije. Nije moguće eliminisati ulaz bakteriofaga u mlekaru ali njihov rast može biti kontrolisan efikasnom sanitacijom. Generalno, termofilne starter kulture su manje ugrožene od mezofilnih. U proizvodnji jogurta, fermentacija traje relativno kratko (3–4h). Malo je verovatno da će bakteriofagi simultano delovati na sve komponente starter kulture. U slučaju delovanja bakteriofaga na jednu vrstu u starter kulturi, produkcija kiseline od strane vrste na koju bakteriofagi ne deluju će se nastaviti uzrokujući malo ili nimalo problema u proizvodnji. Mere koje se preduzimaju da bi se minimalizovao rizik od delovanja faga su: upotreba starter kultura koje sadrže više vrsta mikroorganizama (mešane kulture), striktno pridržavanje aseptičnih tehnika, i odgovarajući termički tretman medijuma za rast startera (npr. na 85°C, 30 min.).

Rezidue antibiotika i agensi za sanitaciju kao što su kvaternerna amonijumova jedinjenja, hipohloriti i vodonik–peroksid takođe inhibiraju rast starter kultura. Oni mogu kontaminirati mleko kao rezultat ljudske greške. Antibiotici se koriste u tretiranju mastitisa dok se deterdženti i dezificijenti koriste za čišćenje i sanitaciju pogona. Starter kulture koje su u upotrebi razlikuju se prema osetljivosti na ove agense.

Inhibitorne supstance prirodno prisutne u sirovom mleku, kao što su laktenini, laktoperoksidaza/vodonik–peroksid/tiocijanat sistem (LPS), aglutinini, i lizozim se generalno uništavaju odgovarajućim termičkim tretmanom mleka koji prethodi proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda.

Sezonske varijacije u sastavu mleka rezultiraju u nižem sadržaju mikronutrienata (elementi u tragovima, neproteinska azotna jedinjenja) i utiču na aktivnost starter kultura.

Progresivna inhibicija produkcije kiseline i opadanje stope produkcije kiseline od strane starter kulture ispitana je u jogurtu proizvedenom uz dodatak saharoze, koja podiže osmotski pritisak u sistemu. Sposobnost produkcije kiseline dejstvom jogurtne starter kulture je sasvim uobičajeno u sistemu koji sadrži 4–7% saharoze. Komercijalni starteri koji su relativno osmoto-

lerantni mogu omogućiti viši nivo korišćenja saharoze bez kašnjenja u produkciji kiseline tokom proizvodnje jogurta (Marshall, 1993; Frank i Hassan, 1998).

Formiranje egzopolisaharida

Egzopolisaharidi (EPS) su metaboliti koje između ostalih sintetišu i bakterije mlečne kiseline koji imaju značajnu ulogu u proizvodnji jogurta, sira, fermentisane pavlake, deserta na bazi mleka i dr. Analiza strukture ovih jedinjenja kombinovana sa reološkim ispitivanjima pokazala je da postoje značajne razlike između EPS u pogledu karakteristika kao što su: hemijski sastav, veličina molekula, naelektrisanje, prisustvo bočnih lanaca, i krutost molekula. Veoma važne karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda za potrošače su čvrstoća i kremasta struktura. EPS mogu zameniti ulogu stabilizatora i poboljšati teksturu, pre svega povećanjem viskoziteta krajnjeg proizvoda, kao i vezivanjem vode i interakcijom sa drugim sastojcima mleka. Kao posledica sinteze EPS smanjuje se sinerezis i poboljšava stabilnost proizvoda. Takođe, ne treba zanemariti ni pozitivan efekat koji EPS imaju na zdravlje intestinalnog trakta (Duboc and Mollet, 2001).

Veliki broj različitih egzopolisaharida proizvode bakterije mlečne kiseline koje se koriste u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda. Polisaharidi se mogu podeliti u dve grupe: homopolisaharide i heteropolisaharide. Homopolisaharidi sastavljeni su od D–glukoze ili D–fruktoze a heteropolisaharidi od D–galaktoze i D–glukoze i/ili L–ramnoze. Tokom fermentacije, bakterije mlečne kiseline mogu proizvesti između 50 i 600 mg/L egzopolisaharida, u zavisnosti od sastava startera i uslova fermentacije (pH, temperatura) (De Vuyst i sar., 2003; Vaningelgem i sar., 2004).

Bakterije za koje je poznato da sintetišu EPS su: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lb. helveticus*, *Lb. sake*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*. Neke studije pokazuju da egzopolisaharidi imaju probiotska svojstva budući da mogu da doprinesu zdravlju ljudi kao nesvarljivi sastojci hrane ili zbog dokazane anti–tumorne aktivnosti (Oda i sar., 1983). Industrijska vrednost egzopolisaharida zavisi od njihove sposobnosti da modifikuju reološke karakteristike vodenih rastvora. Oni se tradicionalno koriste u prehrambenoj industriji kao sredstva za zgušnjavanje, želiranje ili stabilizaciju.

Najvažnije funkcije koje se pripisuju egzopolisaharidima su:

- unapređenje adhezije za oralne površine i formiranje biofilmova;

- poboljšanje viabilnosti nakon adhezije;
- unapređenje otpornosti nespecifičnog imuniteta domaćina.

Vrste fermentisanih mlečnih proizvoda

Fermentisani mlečni proizvodi do sada dostupni na tržištu se prema vrsti i sastavu implementiranog startera mogu sumarno 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").

Mlečno kisela fermentacija mleka

Mlečno kisela fermentacija mleka u zavisnosti od temperature inkubacije može biti mezofilna (dejtvom mezofilnih starter kultura) i termofilna (dejtvom termofilnih starter kultura).

Kultivisana mlaćenica, kisela pavlaka, "lactofil", "filmjök", nordijska fermentisana mleka, "ymer", "shrikhand" i "chakka" su proizvodi dobijeni mezofilnom fermentacijom mleka dok su jogurt, "laban", "zabady", "labneh", "skyr", "yakult", acidofilno mleko i bugarska mlaćenica proizvodi dobijeni kao rezultat termofilne fermentacije mleka.

Mezofilna fermentacija

Kultivisana mlaćenica

Kultivisana mlaćenica dobrog kvaliteta ima blago kiseo ukus sa aromatičnim tonom koji potiče od diacetila i glatku viskoznu teksturu. Bele je boje, bez izdvajanja surutke i ima rok trajanja najmanje deset dana na 5°C. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* subsp. *lactis* su odgovorni za produkciju kiseline, dok su citratno pozitivni sojevi *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* primarni izvori ukusa i arome, zbog njihove sposobnosti da produkuju diacetil, važnu isparljivu komponentu koja proizvodu daje

specifičnu aromu. Većina kultivisanih mlaćenica se proizvodi dejstvom mešanih kultura. Fermentacija se odvija na 22°C dok se ne dostigne titraciona kiselost od 0,9%.

Kisela pavlaka

Kisela pavlaka je ekstremno viskoznan proizvod sa ukusom i aromom mlaćenice. Krajnji pH pri proizvodnji iznosi 4,5. Najčešće ne sadrži manje od 18% masti. Starter kultura je ista kao kod kultivisane mlaćenice sa dominacijom *Lc. lactis*. Temperatura inkubacije iznosi 21–24°C.

Nordijska fermentisana mleka

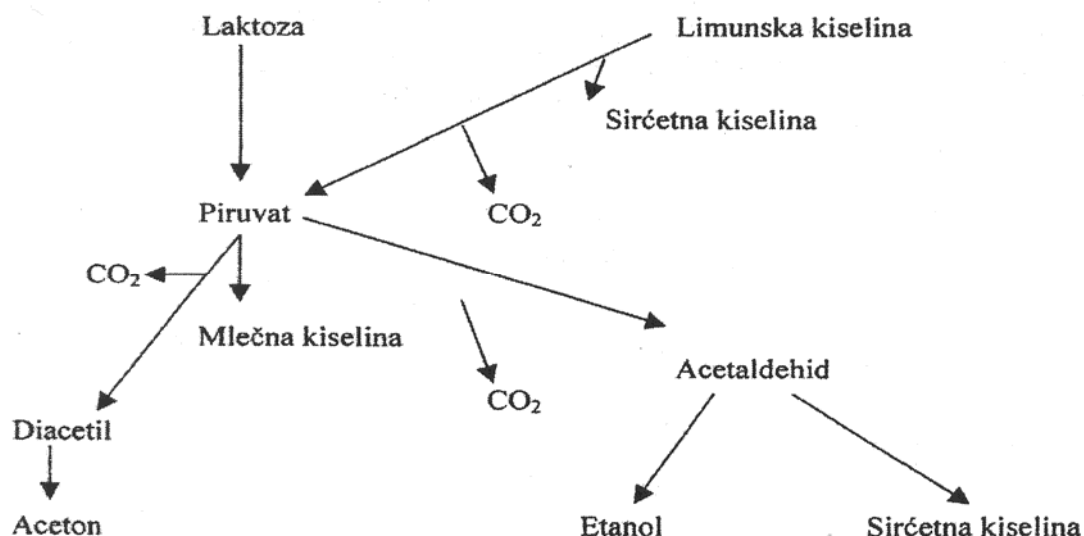
Glavne karakteristike nordijskih fermentisanih mleka su visok viskozitet i tegljiva struktura. One su rezultat snažnog rasta kapsularnih laktokoka prevashodno *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Tegljiva struktura je posledica formiranja egzopolisaharida od strane laktokoka.

Termofilna fermentacija

Jogurt

Jogurt je proizvod koji se dobija mlečno kiselom fermentacijom i dejstvom bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, iz mleka ili proizvoda od mleka (pasterizovano mlekao, koncentrovano mleko, pasterizovano delimično obrano mleko, koncentrovano delimično obrano mleko, pasterizovana pavlaka i kombinacija dva ili više napred navedenih proizvoda sa dodacima ili bez). Karakteriše ga glatka, viskozna struktura i delikatan orašast ukus. Inkubacija se odvija na 42–45°C dok se ne dostigne titraciona kiselost od 0,9–1,2% (pH oko 4,5).

Prepoznatljiv ukus jogurta se postiže uzajamnim odnosom štapića i koka a zavisi i od temperature fermentacije i produkcije kiseline. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produkuje amino kiseline i peptide koji su neophodni za rast *Streptococcus thermophilus*, dok folate produkuje *Sc. thermophilus* da podrži rast *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Isparljive komponente arome uključuju male količine sirćetne kiseline, diacetila i acetaldehida koje produkuje *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (slika 1).



Slika 1. Šematski prikaz formiranja komponenata arome u jogurtu (Chr. Hansen, 1999).

Jogurt i proizvodi u tipu jogurta proizvode se širom Mediterana, Azije, Afrike i centralne Evrope. Sinonimi za jogurt i slične proizvode u različitim zemljama prikazani su u tabeli 5. "Zabady" ili egipatski jogurt se tradicionalno proizvodi od ovčijeg mleka. Mleko bizona se često koristi u proizvodnji ovih proizvoda, pretežno u kombinaciji sa kravljim mlekom.

Tabela 5. Proizvodi u tipu jogurta u različitim zemljama (Surono i Hosono, 2011a)

Sinonim	Zemlja
Dahi	Indija
Dadih	Indonezija
Katyk	Kazahstan
Leben, leben	Irak, Liban, Egipat
Leben, rayeb	Saudijska Arabija
Mast	Iran, Irak, Avganistan
Matzoon, madzoon	Armenija
Roba, rob	Egipat, Sudan, Irak
Tarho	Mađarska
Tiaourti	Grčka
Yaourt	Rusija, Bugarska
Zabady, zabade	Egipat, Sudan

Probiotski fermentisani mlečni proizvodi

Inkorporiranjem probiotskih mikroorganizama u startere za fermentaciju ili u već fermentisano mleko, stvorena je nova vrsta proizvoda koji pokazuju brojna profilaktička i/ili tarapeutska svojstva (Milanović, 1997). Probiotici su živi mikroorganizmi izolovani iz humanog intestinalnog trakta koji kada se unesu u ljudski organizam putem fermentisanog mlečnog proizvoda u adekvatnom iznosu doprinose zdravlju istog (FAO/WHO, 2002). Kriterijume izbora probiotskih mikroorganizama za komercijalnu proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda detaljno su opisali Marshal i Tamime (1997), a neki aspekti uključuju: otpornost na želudačnu kiselinu i proteolitičke enzime; stabilnost na prilično brzu promenu pH vrednosti tokom proizvodnje i tokom perioda skladištenja; otpornost prema žučnim kiselinama; da ne utiču negativno na ukus i teksturu proizvoda. S obzirom da potiču iz humanog probavnog trakta, probiotskim bakterijama mleko često nije pogodan supstrat za rast, pa su brzina rasta i proizvodnja kiseline veoma spori te se javlja nepoželjan ukus, kao na primer pri proizvodnji velike količine sirćetne kiseline (Mattila-Sandholm i sar., 2002). Da bi se to izbeglo, probiotske bakterije u komercijalnoj upotrebi često se kombinuju sa tradicionalnim kulturama kao što je jogurtna ili kulturama za proizvodnju sireva (Van de Castele i sar., 2006).

Zdravstveni značaj probiotskih mikroorganizama se prema literaturnim podacima ogleda u (Tamime, Robinson, 2004; Tamime, 2006):

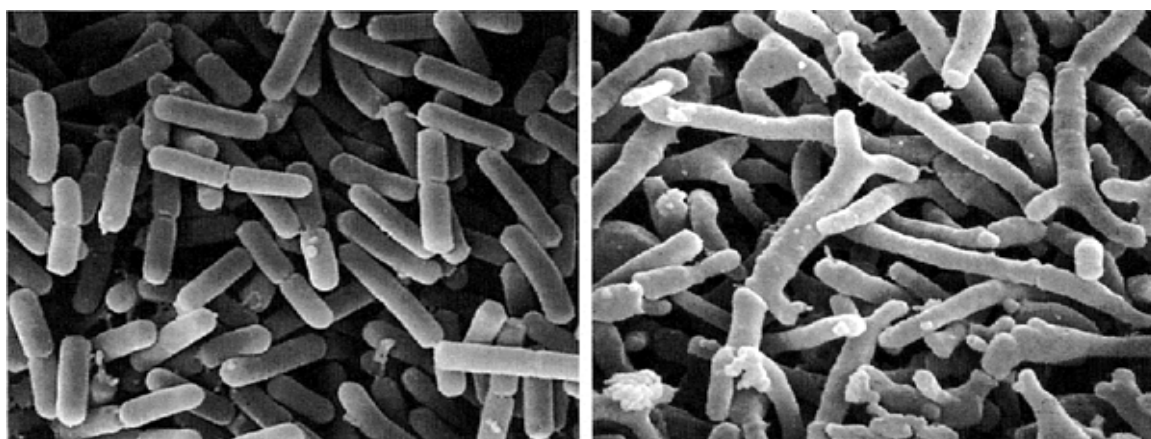
- aktivnom delovanju protiv *Helicobacter pylori* i povećanju digestibilnosti laktoze;
- stimulaciji probavnog imuniteta i crevne peristaltike;
- poboljšanju ravnoteže između mikrobne populacije;
- smanjenju fekalne enzimske aktivnosti i mogućnosti rasta *Salmonella* spp.;
- prevenciji/tretmanu akutnih, virusnih dijareja, kao i dijareja uzrokovanih antibioticima;
- poboljšanju imuniteta prema različitim bolestima;
- smanjenju povišenog pritiska;
- stabilnosti intestinalne mikroflore;
- sniženju sadržaja holesterola.

Veoma je značajno napomenuti da samo svakodnevno konzumiranje može imati uticaja na sastav crevne flore jer vijabilnost ćelija iznosi oko 7 dana nakon kolonizacije (Obradović i sar., 2001).

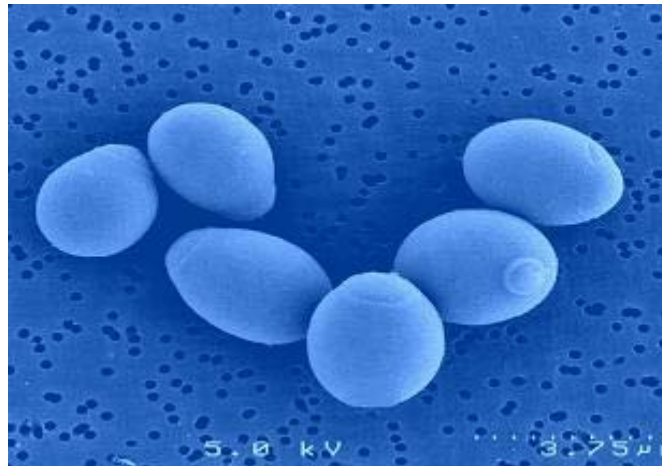
Primeri probiotskih mikroorganizama dati su u tabeli 6. Najčešće korišćeni probiotici su različiti sojevi rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (slika 2).

Tabela 6. Primeri probiotskih mikroorganizama (Milanović, 1997)

Naziv mikroorganizma	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	

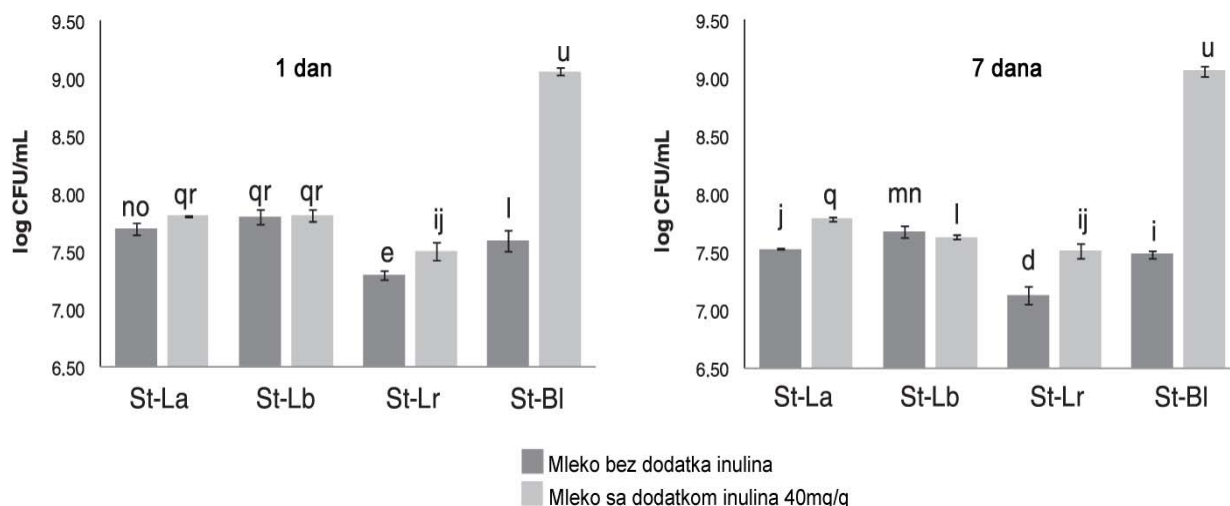
**Slika 2.** *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Saccharomyces boulardii (slika 3) je jedina vrsta kvasaca za koju je dokazano da poseduje svojstva probiotika. Francuski naučnik Anri Boulard ju je izolovao 1923. godine u francuskoj Indokini. Odlikuje se sposobnošću prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Temperaturni optimum je 37°C. Deluje inhibitory na brojne patogene mikroorganizme. Navedena vrsta nađena je u kulturama kombuhe i kefira, pa su učinjeni prvi pokušaji u pogledu primene ove vrste u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka u zajednici sa bakterijama mlečne kiseline. Iako nije u stanju da koristi laktozu, *Saccharomyces boulardii* je koristio prisutne organske kiseline, galaktozu i glukozu nastalu u toku metabolizma bakterija mlečne kiseline. Glavni problem za dalju primenu ove vrste predstavlja pojava gasa i alkohola, ali istraživanja treba nastaviti jer se potencijalno mogu dobiti proizvodi sa visokom nutritivnom vrednošću (Obradović i sar., 2009).



Slika 3. *Saccharomyces boulardii*
(www.optibacprobiotics.co.uk).

Da bi se stimulisao rast i metabolička aktivnost probiotskih bakterija, fermentisanim mlečnim proizvodima se dodaju prebiotici. Danas, koncept prebiotika podrazumeva nevijabilne i nesvarljive ingredijente hrane koji stimulišu crevnu mikrofloru (Aryana i sar., 2007). Prema Tamime (2005) prebiotici su generalno oligosaharidi, polimeri sa dva do dvadeset monomera, koji povoljno deluju na rast i/ili aktivnost jedne ili više bakterijskih vrsta i time stimulišu humani imuni sistem da se bori protiv patogenih organizama. U najznačajnije prebiotike ubrajaju se: laktuloza, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, ostali nesvarljivi oligosaharidi i nesvarljivi skrob (Gregurek, 2001; Obradović i sar., 2001). Nedavna istraživanja pokazala su da suplementacija obranog mleka inulinom, čak i u malim koncentracijama, značajno poboljšava rast i viabilnost *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium lactis* u nemasnom fermentisanom mleku (slika 4) (Oliveira i sar., 2011). Na ovaj način, inulin može zameniti mast u nemasnom funkcionalnom mlečnom proizvodu, dajući mu gotovo identične senzorne karakteristike (tabela 7) (Akin i sar., 2007; Cruz i sar., 2010).



Slika 4. Viabilni broj u obranom mleku fermentisanom binarnom ko-kulturom *S. thermophilus* sa *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) i *B. lactis* (St-BI), nakon jednog dana i sedam dana skladištenja na 4°C. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između vrednosti ($p < 0,05$) (Oliveira i sar., 2011).

Tabela 7. Senzorne karakteristike probiotskog sladoleda^A (Akın i sar., 2007)

Uzorci ^B	Boja i izgled (1–5)	Tekstura (1–5)	Aroma i izgled (1–10)	Ukupno (1–20)
<i>Senzorne karakteristike/rezultati</i>				
A1	4,21 ± 0,026 ^c	4,43 ± 0,020 ^b	8,43 ± 0,062 ^d	17,07 ± 0,069 ^d
A2	4,18 ± 0,050 ^c	4,38 ± 0,040 ^b	8,45 ± 0,050 ^d	17,01 ± 0,123 ^d
A3	4,20 ± 0,020 ^c	4,40 ± 0,056 ^b	8,50 ± 0,050 ^d	17,10 ± 0,104 ^d
B1	4,50 ± 0,030 ^a	4,53 ± 0,000 ^a	9,13 ± 0,030 ^a	18,16 ± 0,030 ^a
B2	4,45 ± 0,052 ^{ab}	4,55 ± 0,017 ^b	9,10 ± 0,108 ^{ab}	17,99 ± 0,087 ^{bc}
B3	4,40 ± 0,070 ^b	4,40 ± 0,070 ^a	9,15 ± 0,026 ^a	18,10 ± 0,144 ^{ab}
C1	4,35 ± 0,070 ^b	4,56 ± 0,036 ^a	8,95 ± 0,060 ^c	17,91 ± 0,098 ^c
C2	4,44 ± 0,053 ^{ab}	4,58 ± 0,098 ^a	9,03 ± 0,030 ^c	18,05 ± 0,111 ^{abc}
C3	4,45 ± 0,070 ^{ab}	4,55 ± 0,020 ^a	9,00 ± 0,000 ^c	18,00 ± 0,056 ^{abc}

^{a-c} Vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima pokazuju statistički značajne razlike ($p < 0,01$).

^A Srednja vrednost deset panelista.

^B A1: 15% šećera bez inulina; A2: 15% šećera i 1% inulina; A3: 15% šećera i 2% inulina; B1: 18% šećera bez inulina; B2: 18% šećera i 1% inulina; B3: 18% šećera i 2% inulina; C1: 21% šećera bez inulina; C2: 21% šećera i 1% inulina; C3: 21% šećera i 2% inulina.

Acidofilno mleko

Acidofilno mleko je proizvod blagog ukusa, tečne konzistencije i sadrži 1,5–2% mlečne kiseline. Fermentacija se odvija dejstvom *Lactobacillus acidophilus* kao kulture. S obzirom da ovaj mikroorganizam raste sporo i razlaže laktozu, a pri tome je osetljiv na prisustvo drugih mikroorganizama, vrši se sterilizacija mleka (ili visoka pasterizacija). Fermentacija se odvija na 37°C uz dodatak 2–5% kulture i proces traje 8–10h do postizanja pH 4,5. Proizvod se zatim bez mešanja puni u ambalažu i čuva na 4–5°C. U toku skladištenja kiselost proizvoda ne raste, jer se *Lactobacillus acidophilus* ne razvija na temperaturama nižim od 5°C. U nekim zemljama, lekari preporučuju acidofilno mleko pacijentima sa različitim poremećajima gastrointestinalnog trakta koji uključuju konstipaciju, neulcerativni kolitis i dijareu.

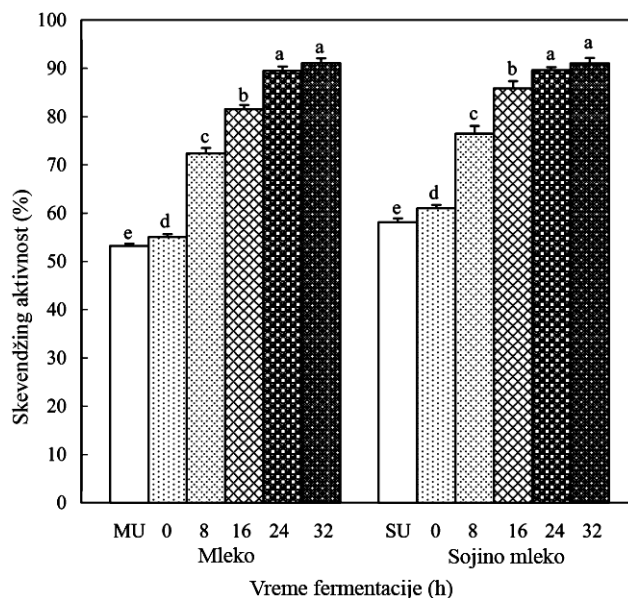
Fermentacija kvascima i bakterijama mlečne kiseline

Kefir

Kefir je poreklom sa Kavkaza. Ovaj penušavi napitak specifičnog ukusa sadrži 0,9–1,1% mlečne kiseline i 0,3–1% alkohola i veoma je popularan u istočnoj Evropi dok je njegova potrošnja u drugim delovima sveta ograničena zbog problema sa pakovanjem i distribucijom (ukoliko nije obezbeđena niska temperatura, kvasci prisutni u kefiru će nastaviti da produkuju alkohol i ugljen–dioksid tokom skladištenja). Kefir se uobičajeno proizvodi od punomasnog mleka koje se podvrgava termičkom tretmanu na 95°C u trajanju od 5 min. da bi se izvršila denaturacija proteina surutke i time poboljšao viskozitet krajnjeg proizvoda. Takozvana kefirna zrna, mešavina bakterija (sirćetne i mlečne kiseline) i kvasaca okruženi polisaharidnim matriksom (kefiran), čine inokulum. Starter kultura se priprema iz kefirnih zrna, *Lactobacillus kefiri*, i vrste rodova *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Acetobacter* rastu u snažnoj međusobnoj povezanosti. Kefirna zrna sadrže kvasce (*Kluyveromyces marxianus*) koji fermentišu i koji ne fermentišu laktozu (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*) (Tamime, 2006).

Kefir se može smatrati izvorom probiotika jer, pored dobrog nutritivnog sastava povoljno utiče na čitav niz zdravstvenih stanja. Postoje brojne studije koje ispituju imunomodulatorni, anti–neoplastični i digestivni efekat uzrokovan konzumiranjem kefira (Schneedorf i Anfiteatro, 2004). Digestivne benefite kefira istraživali su Cardoso i sar. (2003) koji su dokazali poboljšanje peristaltičke aktivnosti u intestinalnom traktu pacova tretiranih šećernim kefirom 15 dana. Liu i sar. (2005) su pokazali da kefir (dobijen iz mleka) poseduje značajnu DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal skevendžing aktivnost (slika 5). Kefir takođe, pokazuje anti–mikrobnu aktivnost protiv širokog spektra bakterija i gljiva. Patogena barijera stvorena od strane kefira

potvrđena je u više studija na pilićima i ljudima, uključujući rezistentnost na enterohemoragičnu *Escherichia coli* (Ota, 1999), *Helicobacter pylory* (Bohmler, 1996) i *Staphylococcus aureus* (Rodrigues i sar., 2005). Stimulacija imunog sistema konzumiranjem kefira i izolacija sfingomielina iz njegovih lipida takođe je demonstrirana (Osada, 1993).



Slika 5. Efekat vremena fermentacije na DPPH radikal skevendžing aktivnost mleka i sojinog mleka fermentisanih dejstvom kefirnih zrnaca. MU i SU predstavljaju mleko i sojino mleko neinkulisano kefirnim zrcima, respektivno. Vertikalni barovi predstavljaju standardnu devijaciju svake eksperimentalne tačke. Položaji označeni istim slovima ne pokazuju značajne razlike ($n=3$, $p<0,05$) (Liu i sar., 2005).

Kumis

Kumis je sličan kefiru jer se pri njegovoj proizvodnji pored mlečne odvija i alkoholna fermentacija. Tradicionalno se proizvodi od mleka kobile. Ovaj proizvod je rezultat fermentacije mleka dejstvom *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i kvasaca koji fermentišu laktozu kao npr. *Saccharomyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*. Ugljen–dioksid je odgovoran za penušav izgled proizvoda i doprinosi ukusu. Prilikom proizvodnje kumisa povećava se nivo azotnih komponenata u prvom redu slobodnih esencijalnih amino kiselina što doprinosi nutritivnoj vrednost krajnjeg proizvoda. Mikroflora starter kulture kumisa pokazuje bakteriocidno i bakteriostatsko dejstvo protiv mnogih patogena, kao što su *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* i *Mycobacterium* spp (Tamime, 2006).

Plesni u mlečno kiseloj fermentaciji

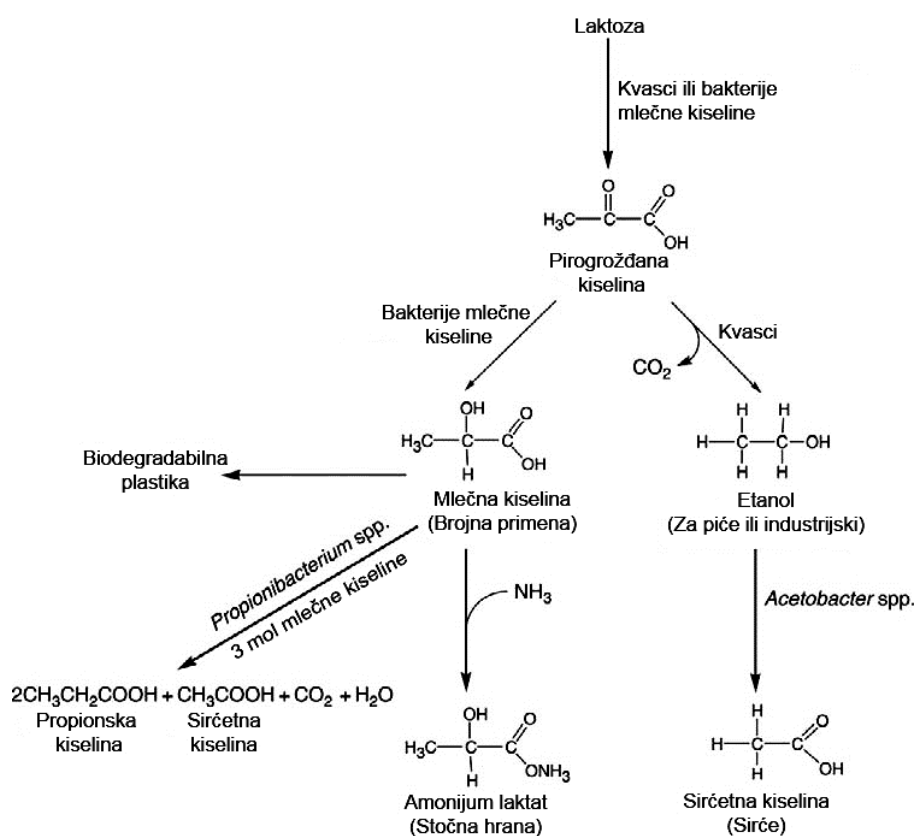
"Viili"

Generalno, fermentisani mlečni proizvodi se ne proizvode dejstvom plesni kao komponentom starter kulture. Izuzetak je finski proizvod "viili". Starter kultura za njegovu proizvodnju uključuje citrat–pozitivne bakterije *Lc. lactis* i *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, zajedno sa plesni *Geotrichum candidum*. Karakteristična tegljiva struktura ovog proizvoda rezultat je formiranja kapsula od strane laktokoka.

BIOHEMIJSKE TRANSFORMACIJE KOMPONENATA MLEKA

Metabolizam ugljenih hidrata

Laktoza (4- β -D-galaktopiranozil-D-glukopiranoza, C₁₂H₂₂O₁₁) je dominantni ugljeni hidrat u mleku i mlečnim proizvodima. Ovaj disaharid koji se sastoji od glukoze i galaktoze dejstvom starter kultura biva složenim biohemijskim procesima transformisan dominantno u mlečnu kiselinu (homofermentacija–tipično za jogurt i fermentisane mlečne proizvode u tipu jogurta) ili pored mlečne kiseline i u druge produkte kao što su etanol i ugljenik (IV)–oksid (heterofermentacija–tipično za kefir i kumis) (slika 6). Laktoza je izvor energije za bakterije u starter kulturi.



Slika 6. Fermentacioni produkti laktoze (Fuquay i sar., 2011).

Najvažnija aktivnost bakterija mlečne kiseline je razgradnja ugljenih hidrata prisutnih u mleku do mlečne kiseline, u cilju obezbeđenja energije neophodne za sintezu biomolekula. Ugljenik neophodan za izgradnju biomolekula potiče od energetski bogatih ugljenih hidrata i gradivnih jedinjenja–aminokiselina ili oligopeptida. Bakterije mlečne kiseline ne poseduju enzime potrebne za proces disanja te stoga ne mogu da vrše oksidativnu fosforilaciju. Energetske potrebe se, zbog

toga, zadovoljavaju iz adenzin–trifosfata (ATP) ili njegovih ekvivalenata. Prinos ATP–a kroz fermentaciju glukoze je znatno manji u odnosu na oksidativnu fosforilaciju tj. potpuno sagorevanje glukoze. Bakterije ipak održavaju visoku stopu priraštaja ($> 0,70 \text{ h}^{-1}$), za šta je neophodan efikasan sistem za unos šećera kroz ćelijsku membranu (Tamime, 2006).

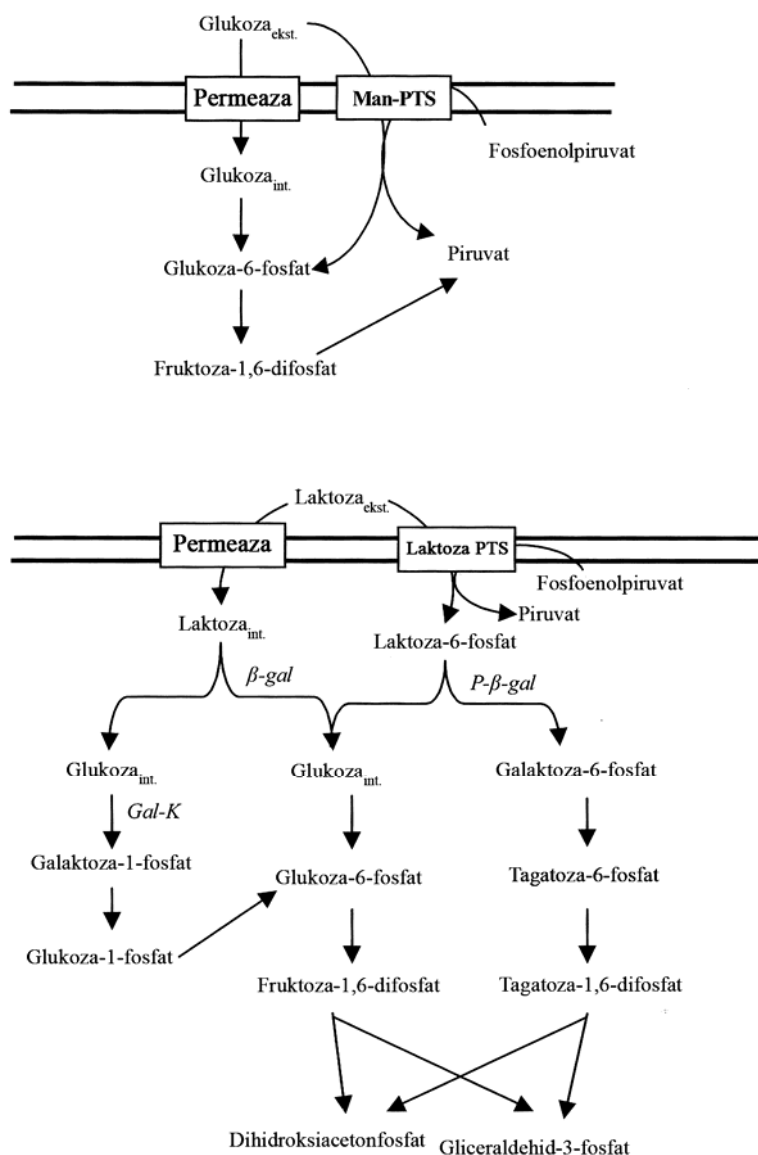
Transport ugljenih hidrata i hidroliza

Poznata su dva transportna mehanizma za unos glukoze u unutrašnjost ćelije. Prvi mehanizam je proton–gradijentna permeaza, koji transportuje glukozu kroz ćelijsku membranu. Nakon ulaska u ćeliju dolazi do fosforilacije glukoze (enzim glukokinaza) u glukozu–6–fosfat koja se potom katabolizuje Embden–Meyerhoff–Parnas–ovim (EMP) putem. Glukoza daje dva molekula ATP–a u svojoj konverziji u piruvat. Proces zahteva određenu količinu ATP–a radi održavanja protonske pokretačke sile transportnog sistema, kao i za fosforilaciju glukoze.

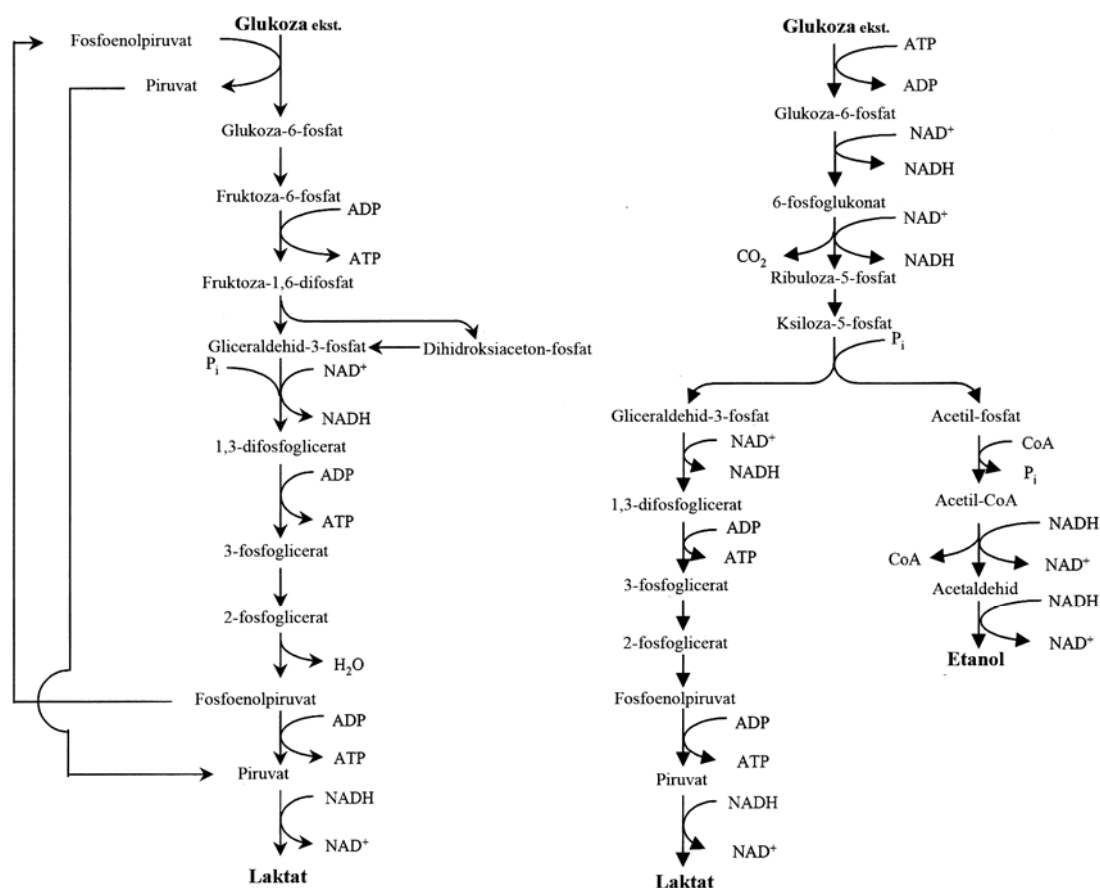
Drugi mehanizam je manoza–fosfotransferazni sistem (Man–PTS), kojim se glukoza u isto vreme transportuje u ćeliju i fosforiliše u glukozu–6–fosfat. Visokoenergetska fosfatna veza potiče od fosfoenolpiruvata (PEP) koji se konvertuje u piruvat. Ovaj mehanizam je energetski povoljniji od permeaze jer se translokacija i fosforilacija odvijaju na račun energije samo jednog molekula PEP. Ukupan energetski prinos jednog molekula ekstracelularne glukoze je dva molekula ATP–a. Isti ovaj mehanizam se koristi za transport manoze i drugih šećera. PEP, koji predstavlja supstrat za enzim piruvat kinazu, značajan je regulator metaboličkog puta jer učestvuje u fosforilaciji glukoze uvedene u ćeliju fosfotransferaznim sistemom (PTS) (slika 7).

Transport laktoze kroz bakterijsku ćelijsku membranu može da se odvija na dva načina: laktoza–fosfotransferaznim sistemom i permeaza sistemom (Tamime, 2006). Pre početka katabolizma laktoze EMP–ovim putem, funkcionalne grupe ugljenih hidrata moraju da prođu nekoliko dodatnih koraka kao što je prikazano na slici (slika 7).

Brza metabolička razgradnja ugljenih hidrata od strane mikroorganizama praćena je oslobađanjem energije neophodne za rast. Po ulasku u ćeliju, dolazi do razgradnje laktoze. Putevi razgradnje se razlikuju u zavisnosti od tipa fermentacije (homo– ili heterofermentacija) i prikazani su na slici 8 (Tamime, 2006).



Slika 7. Permeazni i fosfotransferazni sistem za glukožu i laktozu. β -gal, β -galaktozidaza; P- β -gal, fosfo- β -galaktozidaza; Gal-K, galaktokinaza. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 nema gen nošen plazmidom kodiran za laktoza-PTS, ostavljajući samo manje efikasnu permeazu kao uzimajući sistem (Tamime, 2006; Jensen, 1999).



Slika 8. Homo- i heterofermentacija laktoze (Tamime, 2006; Jensen, 1999).

Homolitička fermentacija mleka korišćenjem *Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* i *Lb. Acidophilus* odvija se EMP katabolizmom glukoze. Nakon ulaska laktoze u ćeliju fosfoenol-piruvat zavisnim fosfotransferaznim sistemom, laktoza-6-fosfat se razlaže na galaktozu-6-fosfat i glukozu dejstvom enzima β -D-galaktozidaze. Galaktoza-6-fosfat se dalje transformiše tagatoznim putem u tagatoza-6-fosfat, koji se fosforiliše u tagatoza-1,6-difosfat, uz utrošak energije jednog molekula ATP-a. Tagatoza-1,6-difosfat se razlaže na dihidroksiaceton-fosfat i glicerinaldehid-3-fosfat koji imaju mogućnost prelaska jedan u drugi. Glicerinaldehid-3-fosfat se dalje metabolizuje EMP putem, što uslovljava prelazak sve veće količine dihidroksiaceton-fosfata u glicerinaldehid-3-fosfat. Glukoza, nastala razlaganjem laktoze u bakterijskoj citoplazmi, dejstvom enzima heksokinaze prelazi u glukoza-6-fosfat (uz utrošak jednog molekula ATP-a), koja se dalje dejstvom glukoza-fosfat izomeraze prevodi u fruktoza-6-fosfat. Daljom fosforilacijom, dejstvom enzima fosfofruktokinaze nastaje fruktoza-1,6-difosfat (uz utrošak jednog molekula ATP-a). Druga reakcija fosforilacije destabilizuje molekul fruktoze, koji se potom, delovanjem aldolaze razlaže

na dve trioze: gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton-fosfat (trioza-fosfat izomeraza omogućava prelazak jedne trioze u drugu). Dva nastala trioza-3-fosfata dejstvom piruvat-kinaze daju dva molekula piruvata, koja u anaerobnim uslovima prelaze u mlečnu kiselinu. Neki sojevi *Lactococcus lactis* imaju sposobnost defosforilacije galaktoza-6-fosfata, koja potom izlazi iz ćelije, dok *Str. thermophilus* i *Lb. acidophilus* pokazuju sposobnost razgradnje galaktoze kada je utrošena celokupna količina glukoze (Leloir put):

Galaktoza → galaktoza-1-fosfat → glukoza-1-fosfat → glukoza-6-fosfat → EMP put.

Prisustvo ugljen-dioksida tokom fermentacije mleka stimuliše rast *Lb. bulgaricus*, a *Str. thermophilus* metabolizuje galaktozu Leloir putem. Neki homofermentativni sojevi bakterija mogu fermentacijom ugljenih hidrata da, pored laktata, daju i druge proizvode kao što su: acetaldehid, etanol, acetat, diacetil, acetoin i 2,3-butandiol (Tamime, 2006).

Probiotske bakterije *Bifidobacterium* spp. fermentišu laktozu i glukozu heterofermentacijom. Ulazak laktoze u bakterijsku ćeliju odvija se laktoza-permeaznim transportnim sistemom. U citoplazmi, glukoza nastala razlaganjem laktoze, razgrađuje se pentoza-fosfatnim putem (fosfoketolazni put). Katabolizmom glukoze ne nastaje ugljen-dioksid jer dekarboksilacija nije uključena u početnoj fazi razgradnje. Aldolaza i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza nisu zastupljene kod probiotskih bakterija. Heksoze bivaju katabolisane dejstvom fruktoza-6-fosfatketolaza. Fermentacijom dva molekula glukoze dobijaju se tri molekula acetata i dva molekula laktata.

Razlika između EMP i fosfoketolaznog metaboličkog puta je u energetskom bilansu. EMP put daje dva mola, dok fosfoketolazni daje jedan mol ATP-a po molu glukoze.

Iako se smatra da je citratni metabolizam veoma slabo zastupljen u bakterijskoj ćeliji, za pojedine mezofilne sojeve on predstavlja značajnu odliku. Citrat metabolišu mikroorganizmi vrsta *Lactococcus* i *Leuconostoc*. Sposobnost *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* kao i nekih *Leuconostoc* vrsta da metabolišu citrat potiče od prisustva enzima citrat-permeaze. Aktivnost citrat-permeaze zavisi od pH vrednosti (enzim je aktivan u uskom opsegu pH=5-6) i temperature. Kada citrat dospe u ćeliju, odvija se njegova razgradnja u oksalacetat i acetat. Ovaj proces katalizuje citrat-liaza. Oksalacetat se dalje konvertuje u piruvat i ugljen-dioksid delovanjem enzima oksalacetat-dekarboksilaze.

Određena karbonilna jedinjenja poput acetata, diacetila, acetoina, 2,3-butandiola i ugljen-dioksida, takođe nastaju u citratnom metabolizmu tokom fermentacije mleka. Promenom uslova sredine, kao što je prisustvo vazduha, deficit energije i/ili rast na teško razgradivim ugljenim hidratima (maltoza, galaktoza), katabolizam piruvata biva preusmeren ka gradnji acetata, acetaldehida i etanola. Ova jedinjenja su proizvedena putem zajedničkog intermedijera acetil-CoA koji može da se formira od piruvata putem dva nekonkurentna procesa:

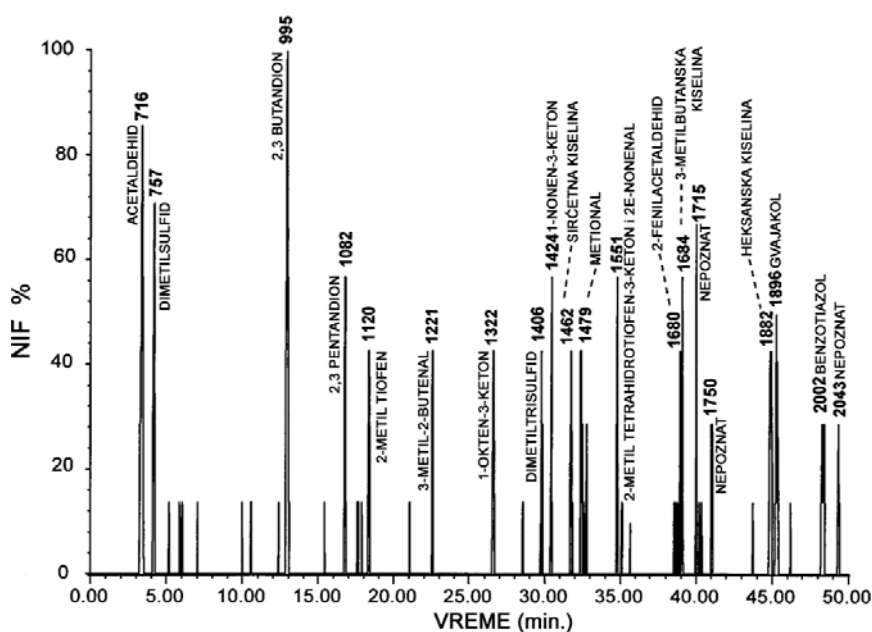
- dejstvom piruvat dehidrogenaznog kompleksa koji je aktivan u prisustvu kiseonika;
- dejstvom piruvat format liaze koja je aktivna u strogo anaerobnim uslovima.

Koji će proizvod nastati od acetil–CoA prvenstveno zavisi od unutarćelijskog redoks potencijala. Acetil–CoA je neophodan i za sintezu masnih kiselina. Formiranje acetaldehida i etanola povezano je sa regeneracijom NAD^+ pod anaerobnim uslovima. Kada se redoks potencijal održava drugim reakcijama, npr. delovanjem NADH oksidaze, koja je aktivna u aerobnim uslovima, acetil–CoA se razlaže dejstvom acetat kinaze, proizvodeći acetat. Ovom reakcijom se stvara ATP (Tamime, 2006).

Produkcija aromatičnih komponenata

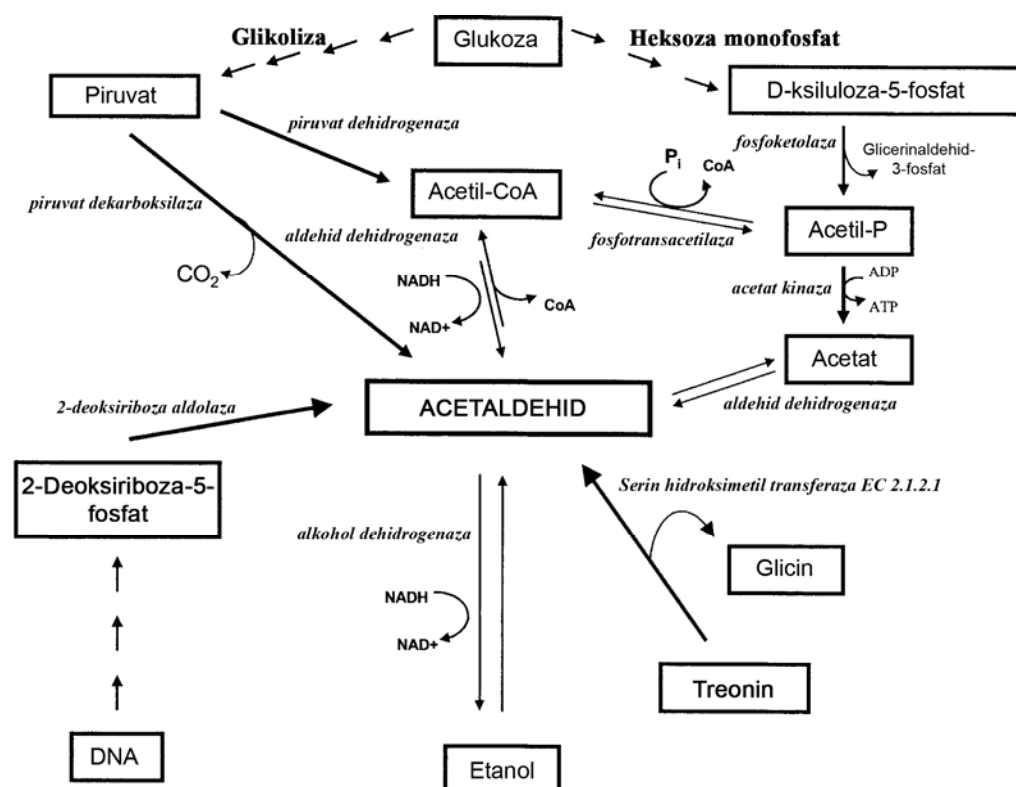
Aroma jogurta se formira kao posledica kombinovanog efekta različitih komponenata. Ott i sar. (1997) identifikovali su 21 isparljivu komponentu (slika 9) koje imaju značajan efekat na formiranje arome jogurta od 91 koliko je determinisano. Aromatične komponente mogu se podeliti na:

- neisparljive kiseline (mlečna, pirogroždana, oksalna, ćilibarna);
- isparljive kiseline (mravlja, sirćetna, propionska, buterna);
- karbonilna jedinjenja (acetaldehid, aceton, acetoin, diacetil);
- ostale komponente (pojedine amino kiseline i/ili konstituenti formirani termičkom degradacijom proteina, masti ili laktoze).



Slika 9. NIF profil arome jogurta izolovane prema proceduri retencionih indeksa na piku; NIF– nazalni uticaj frekvencije (Ott i sar., 1997).

Acetaldehid, čija količina u jogurtu ide do 40 mg/kg, smatra se osnovnom komponentom arome koja jogurtu daje tipičnu, prepoznatljivu aromu (Tamime i Robinson, 2004). Poželjni nivo acetaldehida u jogurtu je 25 ppm (Ray, 1996). Količina produkovanog acetaldehida, kada je inokulacija mleka izvršena *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus*, je značajno veća nego kada se dodaju vrste pojedinačno. Takođe je pokazano da količina acetaldehida u jogurtu tokom skladištenja na 4°C opada ili se održava na istom nivou zavisnosti od kulture koja je primenjena. Različiti putevi produkcije acetaldehida od strane bakterija mlečne kiseline prikazi su na slici 10.

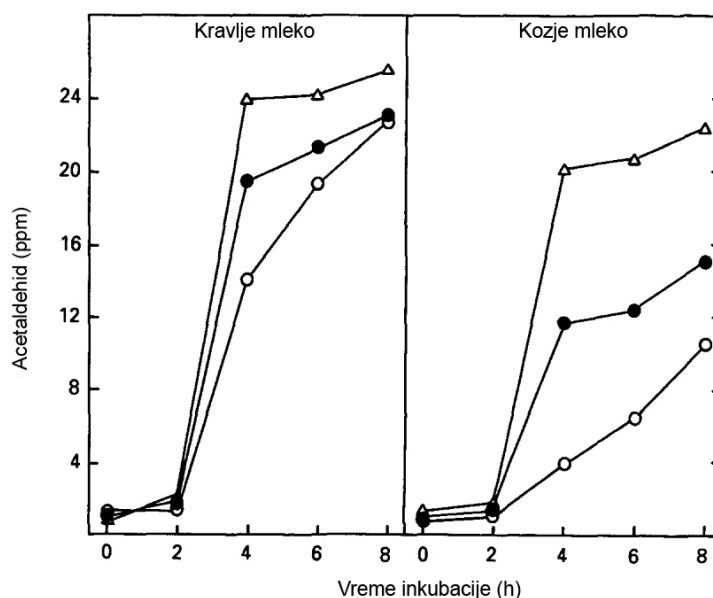


Slika 10. Različiti metabolički putevi bakterija mlečne kiseline koji mogu da vode do formiranja acetaldehida (Chaves i sar., 2002).

Tokom fermentacije u jogurtu, acetaldehid može biti proizveden od:

- glukoze direktno putem piruvata;
- glukoze preko formiranja piruvata a zatim acetil-CoA;
- glukoze preko formiranja D-ksiluloze-5-fosfata, acetil-fosfata i na kraju acetata;
- razgradnjom timidina;
- treonina.

Učešće više od jednog metaboličkog puta je takođe moguće (Chaves i sar., 2002). Treonin je rezultat proteolize u mleku. Treonin aldolaza katališe reakciju nastanka acetaldehida i glicina iz treonina i ovo je direktni metabolički put odgovoran za produkciju acetaldehida od strane bakterija mlečne kiseline. Niži nivo acetaldehida u kozjem jogurtu u poređenju sa kravljim posledica je višeg sadržaja glicina koji inhibira treonin aldolazu (Rysstad i sar., 1990). U radu Rysstad i sar. (1990) pokazano je da je brzina produkcije i sadržaj acetaldehida nakon osam sati inkubacije veći u kravljem (22,8 ppm) nego u kozjem mleku (10,6 ppm). Dodatak treonina u oba mleka rezultira povećanjem produkcije acetaldehida, koje je izraženije u kozjem mleku (slika 11). U jogurtu su dobijeni kontradiktorni rezultati prilikom poređenja aktivnosti treonin aldolaze i nivoa acetaldehida produkovanog od strane *Str. thermophilus* i *Lb. bulgaricus*. Konverzija treonina u acetaldehid je moguća produkcijom treonin aldolaze katalisane jedino u *Lb. bulgaricus* (Raya i sar., 1986). Robinson (1997) je pokazao da je aktivnost ovog enzima u *Str. thermophilus* temperaturno zavisna i da opada na temperaturama višim od 30°C, dok isti enzim u *Lb. bulgaricus* nije osetljiv na više temperature tokom proizvodnje jogurta. Stoga je *Lb. bulgaricus* prikazan kao glavni proizvođač acetaldehida tokom proizvodnje jogurta u mnogim studijama. Međutim, kasnija produkcija acetaldehida kao posledica aktivnosti treonin aldolaze pronađena je u obe jogurtne kulture (Ott i sar., 2000). Chaves i sar. (2002) označili su da serin hidrosimetiltransferaza, koji ispoljava treonin aldolaza aktivnost kao sekundarnu, konstituentom glavnog metaboličkog puta za formiranje acetaldehida u *Str. thermophilus* (slika 10).



Slika 11. Formiranje acetaldehida dejstvom jogurtne starter kulture u kravljem i kozjem mleku, bez dodatka treonina (○), i sa dodatkom 5 mg (●) i 10 mg (Δ) treonina/100 g mleka, respektivno (Rysstad i sar., 1990).

Diacetil je glavni nosilac arome maslaca. Citrat se konvertuje u diacetil putem metabolizma piruvata. Diacetil je prisutan u jogurtu u količini od 0,5 ppm. Postoje neslaganja među autorima da li je *Str. thermophilus* ili *Lb. bulgaricus* odgovoran za produkciju diacetila u jogurtu. U radu Beshkova i sar. (1998) zaključeno je da sposobnost *Str. thermophilus* da produkuje acetaldehid i diacetil, mada u malim iznosima, ne utiče na njegov opšti obrazac sinteze acetaldehida i diacetila u kombinovanoj kulturi sa *Lb. bulgaricus*.

Organske kiseline

Organske kiseline su prisutne u mlečnim proizvodima kao rezultat:

- hidrolize mlečne masti (slobodne masne kiseline kao što su sirćetna i buterna);
- direktnog dodatka regulatora kiselosti (limunska i mlečna kiselina);
- normalnog biohemijskog metabolizma mleka (sirćetna, orotična i urinska kiselina) ili
- rasta bakterija (mlečna, sirćetna, pirogroždana, propionska i mravlja kiselina.)

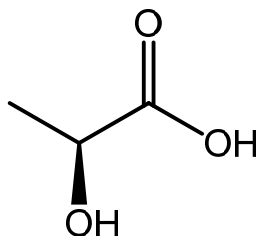
Takođe, organske kiseline su glavni produkti katabolizma ugljenih hidrata od strane bakterija mlečne kiseline. One su značajne kao prirodni konzervansi koji sprečavaju razvoj štetnih i patogenih mikroorganizama (Fernandez–Garcia i McGregor, 1994), poboljšavajući higijenski kvalitet proizvoda. Takođe, važno je napomenuti da sposobnost bakterija mlečne kiseline da inhibiraju rast nepoželjnih bakterija ne zavisi samo od redukcije pH vrednosti već i od vrste produkovane organske kiseline (Fox i sar., 1993). Orotična kiselina je faktor rasta za laktobacile (Suzuki i sar., 1986) i identifikovana je kao mogući faktor u mleku koji pomaže redukciji učestalosti holesterolemija kod ljudi (Robinson i sar., 1983). Kvantitativno određivanje organskih kiselina je važno za praćenje rasta i aktivnosti bakterija kao i sa nutritivnog aspekta. Organske kiseline igraju važnu ulogu kao prirodni konzervansi u fermentisanim mlečnim proizvodima i doprinose senzornim karakteristikama istih (González de Llano i sar., 1996; Reis i sar., 2012).

Organske kiseline u prvom redu sačinjavaju zasićene alifatične monokarbosilne kiseline. Derivati ovih organskih kiselina mogu biti nezasićene, hidroksilne, fenolne i polikarbosilne kiseline. Često se organske kiseline nazivaju i masne kiseline, isparljive masne kiseline, slabe kiseline ili karboksilne kiseline (Ricke, 2003). Organske kiseline nisu članovi homologog niza jer se razlikuju u broju karboksilnih i hidroksilnih grupa, kao i dvostrukih veza između C atoma (Hsiao i Siebert, 1999; Permpasert i Devahastin, 2005), a mogu se klasifikovati po:

- tipu ugljenikovog lanca (alifatični, aciklični, aromatični i heterociklični);
- zasićenosti i nezasićenosti;
- supstituisanosti i nesupstituisanosti;
- broju funkcionalnih grupa (mono-, di-, trikarbosilne itd.) (Gomis, 1992).

Mlečna kiselina

Mlečna kiselina (slika 12) je organska kiselina sa širokim spektrom primene u industriji. To je hidroksilna kiselina klasifikovana kao GRAS (Generally Recognized As Safe) od strane FDA (Food and Drug Administration – Organizacija za hranu i lekove u Sjedinjenim Američkim Državama) i često se koristi u hrani kao regulator kiselosti, pufer i konzervans (Valli i sar., 2006). Mlečna kiselina nije prirodno prisutna u hrani, nego nastaje fermentacijom hrane (mleko, sirevi, kiseli kupus, kiseli krastavci, masline i neke mesne prerađevine) koju vrše bakterije mlečne kiseline (Barbosa–Canovas i sar., 2003). Ona je značajan finalni produkt fermentacije ugljenih hidrata koju vrše bakterije mlečne kiseline (Tormo i Izco, 2004). Međutim, mlečna kiselina može da se proizvede komercijalno hemijskom sintezom ili fermentacijom. U prirodi, mlečna kiselina postoji u obliku dva optička izomera: D(-)- i L(+)-mlečna kiselina, s tim da je drugi oblik zastupljeniji u prehrambenoj industriji (Zhang i sar., 2007). L(+)-mlečna kiselina je veoma važna u prevenciji kancerogenih oboljenja, potpomaže cirkulaciju krvi, sprečava procese truljenja i konstipaciju podstičući peristaltiku creva. Ona takođe utiče na kiselobaznu ravnotežu i podržava dejstvo vitamina C u organizmu, čime ojačava prirodnu rezistenciju na infekcije. Mlečna kiselina podstiče funkciju pankreasa što stimuliše sekreciju svih digestivnih organa (Frank, 1995).

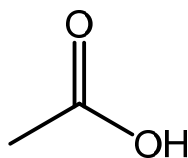


Slika 12. Strukturna formula mlečne kiseline.

Sirćetna kiselina

Sirćetna kiselina (slika 13) je jedna od najstarijih organskih komponenata koja je poznata ljudima od davnina. Prirodno nastaje tokom kvarenja voća i neke druge hrane usled aktivnosti bakterija sirćetne kiseline, najčešće roda *Acetobacterium* (prisutan u hrani, vodi i zemljištu) (Gonzales i sar., 2005). Kao i mlečna kiselina ima GRAS status i njeno korišćenje kao prehrambenog aditiva i konzervansa prihvaćeno je širom sveta (Smulders i Greer, 1998). Poznato je da daje jak ukus i povećava efikasnost drugih aditiva, naročito u hlebu (Šimšek i sar., 2006). Sirćetna kiselina naziva se još i "etanoična kiselina" ili "glacijalna sirćetna kiselina" i predstavlja stabilnu supstancu (Ricke, 2003). Rastvara se u lipidima i ima sposobnost da brzo difunduje kroz plazma membranu, što je

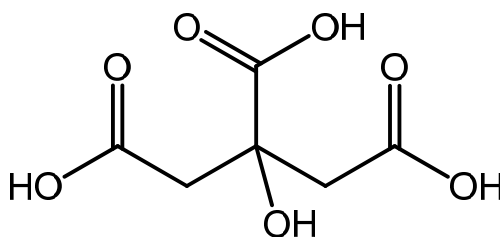
faktor koji utiče na pH ćelije (Greenacre i sar., 2003). Sirćetna kiselina je najzastupljenija organska kiselina u sirovom mleku (Tormo i Izco, 2004). Veći deo citrata (90%) u mleku, nalazi se u surutki, formirajući relativno stabilne komplekse sa Ca i Mg, dok se ostatak nalazi u micelama kazeina (Walstra i sar., 1999).



Slika 13. Strukturna formula sirćetne kiseline.

Limunska kiselina

Limunska kiselina (slika 14) standardno se upotrebljava u velikom broju konzervisane hrane (Marz, 2002). Zajedno sa svojim solima, jedna je od najčešće korišćenih organskih kiselina u prehrambenoj ali i farmaceutskoj industriji (Couto i Sanroman, 2006). Ima tri COOH grupe i pripada hidroksilnim kiselinama (Fite i sar., 2004). Sadrži dva puta više hidrofilnih grupa nego hidrofobnih, ima jak afinitet prema vodi i ne može se adsorbovati na površini (Permprasert i Devahastin, 2005). Limunska kiselina je jedna od najzastupljenijih organskih kiselina koju sintetiše *Aspergillus niger* fermentacijom niskomolekularnih ugljenohidratnih rastvora (Nikbakht i sar., 2007).



Slika 14. Strukturna formula limunske kiseline.

Određivanje organskih kiselina u fermentisanim mlečnim proizvodima

Organske kiseline se najčešće određuju i razdvajaju hromatografskim tehnikama kao što su:

- Tečna hromatografija pod visokim pritiskom – HPLC (high–performance liquid chromatography);
- Gasna hromatografija – GC (gas chromatography);
- Tankoslojna hromatografija – TLC (thin–layer chromatography) i
- Jonoizmenjivačka hromatografija – IC (ion–exchange chromatography).

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom i gasna hromatografija najviše su korišćene za razdvajanje i detekciju organskih kiselina u fermentisanim mlečnim proizvodima. Međutim, izbor većine iztraživača bila je HPLC metoda. Jednostavnija priprema uzoraka, ekološka prihvatljivost i reproduktibilnost neke su od prednosti HPLC u odnosu na GC (Paavilainen i Korpela, 1993; Mulin i Emmons, 1997).

Fernandez–Garcia i McGregor (1994) razdvojili su i kvantifikovali nivoe orotične, limunske, pirogroždane, mlečne, urinske, sirćetne, propionske i hipurne kiseline u jogurtu pomoću izokratske HPLC metode. U studiji Samona i sar. (1996) pokazano je da nivo mlečne i sirćetne kiseline, određen tokom fermentacije i skladištenja, ostaje stabilan tokom 21 dana skladištenja. Dave i Shah (1997) zabeležili su povećanje nivoa mlečne kiseline u jogurtu proizvedenom dejstvom različitih starter kultura tokom skladištenja. Povećanje je bilo značajnije tokom prvih pet dana skladištenja. Oni su takođe u tom radu pokazali da je u jogurtu koji je sadržao bifidobakterije u starter kulturi dolazilo do znatno većeg povećanja nivoa sirćetne kiseline tokom fermentacije u poređenju sa jogurtom proizvedenom dodatkom klasične jogurtne kulture. Poznato je da bifidobakterije proizvode značajnu količinu sirćetne kiseline pored mlečne kiseline (Rašić i Kurmann, 1983).

U radu Tormo i Izco (2004) prikazan je sadržaj oksalne, mravlje, pirogroždane, mlečne, sirćetne, orotične, limunske, ćilibarne, urinske, propionske i buterne kiseline, HPLC metodom na obrnutim fazama, u sirovom mleku i dva tipa jogurta: jogurtu jednu nedelju pre isteka roka trajanja i jogurtu kome je istekao rok trajanja za jednu nedelju (tabela 8). Najzastupljenija kiselina u jogurtu bila je mlečna (14.601,5 mg/100 g suve materije). Koncentracija sirćetne kiseline u jogurtu bila je u skladu sa ranije publikovanim podacima (Fernandez–Garcia i McGregor, 1994).

Papadakis i Polychroniadou (2005) utvrdili su da je, u tradicionalnom jogurtu od kozjeg mleka, najzastupljenija mlečna kiselina (15,124 µg/g jogurta) a zatim slede limunska (1700 µg/g jogurta), sirćetna (279 µg/g jogurta), pirogroždana (26 µg/g jogurta) i orotična kiselina (6,4 µg/g jogurta). Analiza je izvršena HPLC jonoizmenjivačkom metodom.

Tabela 8. Koncentracija (mg/100g suve materije) organskih kiselina u sirovom mleku i nekim komercijalnim uzorcima (jogurt jedna nedelja pre isteka roka trajanja, jogurt jedna nedelja posle isteka roka trajanja) (Tormo i Izco, 2004)

Organska kiselina	Sirovo mleko	Jogurt u roku trajanja	Jogurt sa isteklim rokom trajanja
Oksalna kiselina	–	73,0 ± 22,7	78,6 ± 1,9
Mravlja kiselina	–	–	–
Pirogroždana kiselina	6,4 ± 0,6	52,5 ± 10,2	48,0 ± 2,8
Mlečna kiselina	145,2 ± 19,1	14509,8 ± 234,8	15411,7 ± 23,2
Sirćetna kiselina	86,0 ± 5,0	469,0 ± 122,0	430,0 ± 44,1
Orotična kiselina	87,0 ± 2,0	76,1 ± 1,1	82,0 ± 1,1
Limunska kiselina	1233,0 ± 21,0	1938,1 ± 22,1	2102,0 ± 22,0
Čilibarna kiselina	–	–	–
Urinska kiselina	67,4 ± 0,7	67,1 ± 7,9	69,31 ± 0,4
Propionska kiselina	–	–	–
Buterna kiselina	–	–	–

Cilj rada Omae i sar. (2008) bio je da se izvrši senzorna ocena i odrede komponente ukusa fermentisanog mlečnog proizvoda (FM) dobijenog dejstvom dve vrste bakterija mlečne kiseline, *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus*, i da se dobijeni rezultati uporede sa jogurtom (YG) proizvedenim dejstvom klasične jogurte kulture iz istog rekonstituisanog mleka. Zaključeno je sledeće: sadržaj mlečne kiseline veći je u YG nego u FM; orotična kiselina nema uticaja na različit intenzitet kiselog ukusa u YG i FM; sadržaj ostalih komponenata ukusa kao što su limunska kiselina, urinska kiselina, laktoza, slobodne amino kiseline i peptidi suviše je nizak da bi mogao da doprinese ukusu FM (tabela 9). U jogurtu, sadržaj mlečne kiseline značajno utiče na ukus (Yuguchi i sar., 1989). U ovom radu takođe je pokazano da mlečna kiselina ima značajan uticaj na intenzitet kiselosti fermentisanih mlečnih proizvoda.

Tabela 9. Sadržaj organskih kiselina u FM (fermentisano mleko) i YG (jogurt) (Omae i sar., 2008)

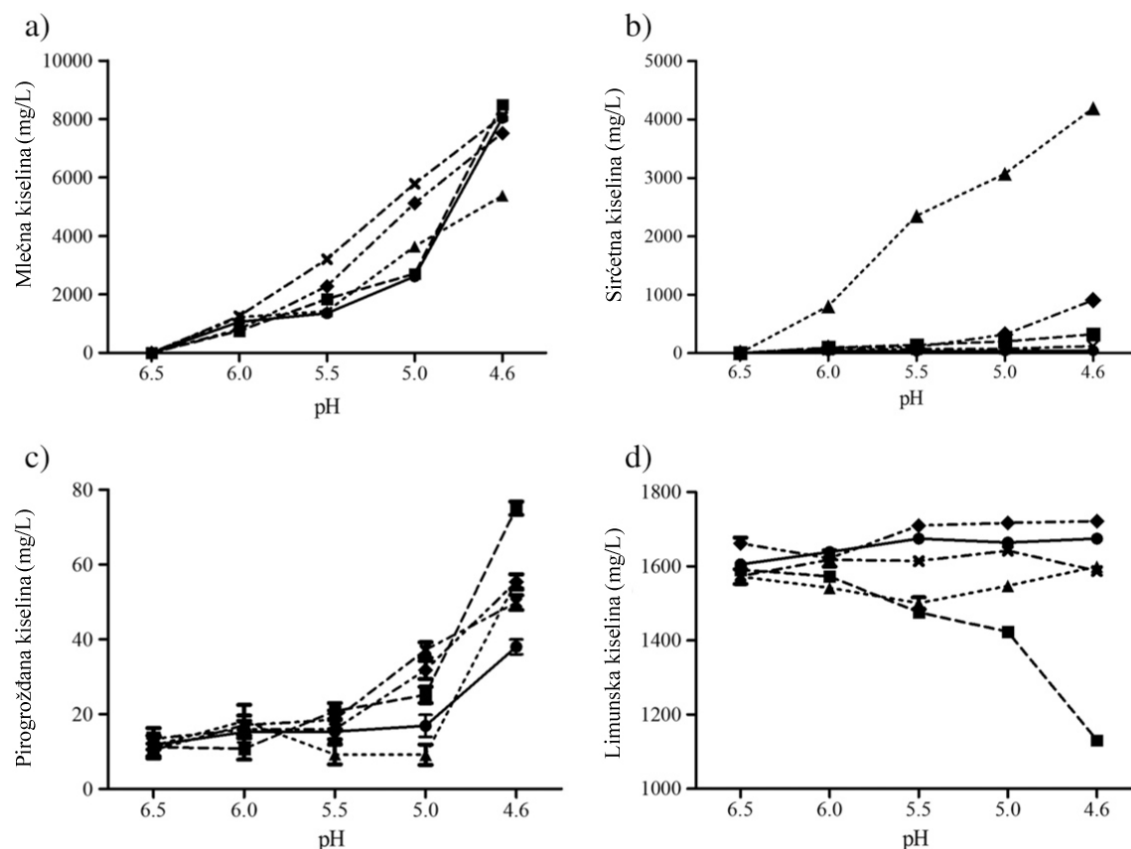
	Organske kiseline (mg/100g)				
	Mlečna kiselina	Orotična kiselina	Urinska kiselina	Limunska kiselina	Ukupno
FM	710 ± 0,029*	202 ± 8,2*	4,03 ± 0,150	1,97 ± 0,081	918,0 ± 8,46
YG	780 ± 0,031	164 ± 6,3	4,08 ± 0,059	2,00 ± 0,082	950,1 ± 10,49

Sve vrednosti su date u obliku srednja vrednost ± standardna devijacija tri ponavljanja.

*Značajna razlika (p<0,05).

Casarotti i sar. (2014) ispitivali su uticaj čistih kultura *Lactobacillus acidophilus* – La i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* – Bb kao i u kombinaciji sa *Streptococcus thermophilus* – St, na sadržaj organskih kiselina (mlečne, sirćetne, pirogroždane i limunske kiseline) tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka. Sadržaj mlečne kiseline na kraju procesa fermentacije zavisi od vrste primenjenog startera i kretao se od 5072 do 8495 mg/L (slika 15a). Homofermentativne bakterije *S. thermophilus* i *L. acidophilus* u čistoj kulturi ili u kombinovanoj proizvode najveću količinu mlečne kiseline koristeći Embden–Meyerhoff–Parnas–ov put (glikoliza), dok primena čiste kulture *B. animalis* subsp. *lactis* rezultira u najnižem sadržaju mlečne kiseline. Sadržaj sirćetne kiseline se kretao od 44,82 do 4189 mg/L (slika 15b). *S. thermophilus* je inhibirao heterofermentativne karakteristike *B. animalis* subsp. *lactis* u kombinovanoj kulturi, dajući nižu koncentraciju sirćetne kiseline u poređenju sa količinom proizvedenom primenom čiste Bb kulture. Ovaj fenomen doprinosi razvoju proizvoda sa boljim senzornim karakteristikama, jer visok sadržaj sirćetne kiseline uzrokuje ukus na sirće u fermentisanom mlečnom proizvodu što čini proizvod neprivlačnim za potrošače (Rodrigues i sar., 2011). Koncentracija pirogroždane kiseline raste tokom fermentacije (slika 15c) i na kraju procesa kreće se od 37 do 75 mg/L. Početna koncentracija limunske kiseline u mleku je bila približno 1600 mg/L (slika 15d), što je u saglasnosti sa iznosom utvrđenim u mleku (Helland i sar., 2004). Samo *L. acidophilus* u čistoj kulturi može da metabolizuje citrate na značajnom nivou (260 mg/L). Sirćetnu kiselinu mogu da proizvode lactobacilli kroz proces razgradnje limunske kiseline (Østlie i sar., 2003).

Tokom proizvodnje kefira utvrđeno je da dolazi do blagog opadanja sadržaja orotične, limunske i pirogroždane kiseline (Güzel–Seydim i sar., 2000). Sadržaj hipurne i urinske kiseline takođe opada tokom fermentacije. Nakon pet sati sadržaj hipurne kiseline značajno opadne ($P < 0,05$) i ne može biti detektovan na kraju fermentacije. Slično opadanje sadržaja hipurne kiseline dešava se tokom fermentacije jogurta (Fernandez–Garcia i McGregor, 1994). Nishimoto i sar. (1969) objavili su da je hipurna kiselina prekursor sinteze benzojeve kiseline dejstvom bakterija mlečne kiseline. Stoga, moguće je da hipurna kiselina nestaje kao posledica rasta bakterija mlečne kiseline, naročito u poslednjih deset sati fermentacije.

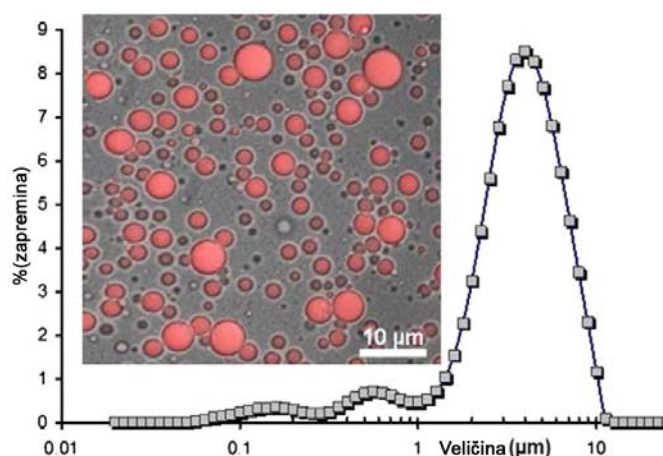


Slika 15. Sadržaj (mg/L) mlečne keseline (a), sirćetne kiseline (b), pirogroždane kiseline (c), i limunske kiselina (d) tokom fermentacije primenom različitih kultura na 42°C. St fermentacija (●), La fermentacija (■), Bb fermentacija (▲), StLa fermentacija (×) i StBb fermentacija (◆) (Casarotti i sar., 2014).

Metabolizam masti

Mleko sadrži 3,5–5% mlečne masti, koja se sastoji od preko 400 različitih masnih kiselina, uglavnom u obliku triacilglicerola, što daje mlečnoj masti širok spektar funkcionalnih i nutritivnih karakteristika. Mlečna mast je dobar izvor esencijalnih masnih kiselina i vitamina rastvorljivih u mastima. Takođe, mlečna mast ima povoljne fizičke i hemijske karakteristike kao i senzorni kvalitet. Negativan nutritivni imidž mlečne masti, posebno zbog sadržaja zasićenih masnih kiselina dugog lanca, podstakla je razvoj metoda za proizvodnju frakcija mlečne masti sa različitim fizičko-hemijskim ili nutritivnim karakteristikama (Kontkanen i sar., 2011).

Najveći deo mlečne masti nalazi se u obliku malih globula (prosečan dijametar ~ 4 μm , slika 16), koje su zaštićene membranom koja se sastoji od fosfolipida, holesterola, lipoproteina, glikoproteina i proteina, npr., ksantin oksidaze, butirofilina i γ -glutamil transpeptidaze (Dewettinck i sar., 2008; Jiménez-Flores i Brisson, 2008; Rombaut i Dewettinck, 2006; Evers, 2004).



Slika 16. Globule mlečne masti; raspodela veličina i suprastruktura određeni optičkom i konfokalnom mikroskopijom (Lopez, 2011).

Lipidna frakcija mlečne masti veoma je heterogena. Glavne lipidne grupe mlečne masti date su u tabeli 10, a sadržaj masnih kiselina u tabeli 11. Najzastupljenija lipidna grupa u mleku su triacilgliceroli (TAGs). To su triacilestri glicerola i masnih kiselina i čine 97–98% svih lipida. Slika 17 predstavlja šematski hemijsku strukturu molekula TAG, koji je triacilestar glicerola i oleinske (C18:1), palmitinske (C16:0) i buterne kiseline (C4:0). Takođe je na slici 17 dat primer sistema stereospecifičnog označavanja ("sn" broj) preporučeno od strane Internacionalne unije za čistu i primenjenu hemiju – Internacionalne unije za biohemiju (1967). Na slici 18 prikazana je najverovatnija "sn"– pozicija (distribucija % > 33,3%) glavnih masnih kiselina u mlečnoj masti.

Tabela 10. Glavne klase lipida mlečne masti (Jensen, 2002)

Klasa lipida	Prosečan sadržaj, % (w/w)
Triacilgliceroli	97–98
Diacilgliceroli	0,28–0,59
Monoacilgliceroli	0,16–0,38
Slobodne masne kiseline	0,10–0,44
Fosfolipidi	0,20–1,00
Holesterol	0,42
Holesterol estri	tragovi

Tabela 11. Glavne masne kiseline mlečne masti (Jensen, 2002)

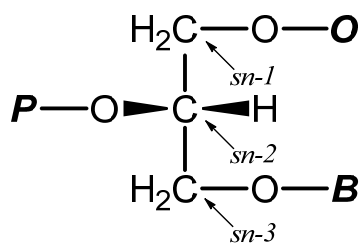
Masna kiselina	CN:DB ^a	w/w (%) ^b	w/w (%) ₁₀₀ ^c	mol (%) ^d
Buterna	4:0	3,79	4,19	10,93
Kaprnska	6:0	2,10	2,32	4,59
Kaprilna	8:0	1,19	1,31	2,10
Kaprinska	10:0	2,44	2,70	3,60
Laurinska	12:0	2,98	3,29	3,78
Miristinska	14:0	9,75	10,77	10,85
Miristoleinska	14:1	1,08	1,19	1,21
Pentadekanska	15:0	1,35	1,49	1,41
Palmitinska	16:0	23,46	25,92	23,24
Palmitoleinska	16:1	2,00	2,21	2,00
Margarinska	17:0	0,72	0,80	0,68
Stearinska	18:0	10,58	11,69	9,45
Oleinska	18:1	19,44	21,48	17,48
Druge C18:1 kiseline	18:1	6,85	7,57	6,16
Linolna	18:2	2,17	2,40	1,97
Linoleinska	18:3	0,61	0,67	0,56
Ukupno		90,51	100,00	100,00

^a CN:DB = broj ugljenikovih atoma:broj dvostrukih veza

^b Podaci adaptirani iz Jensen (2002)

^c w/w (%) preračunato na 100%

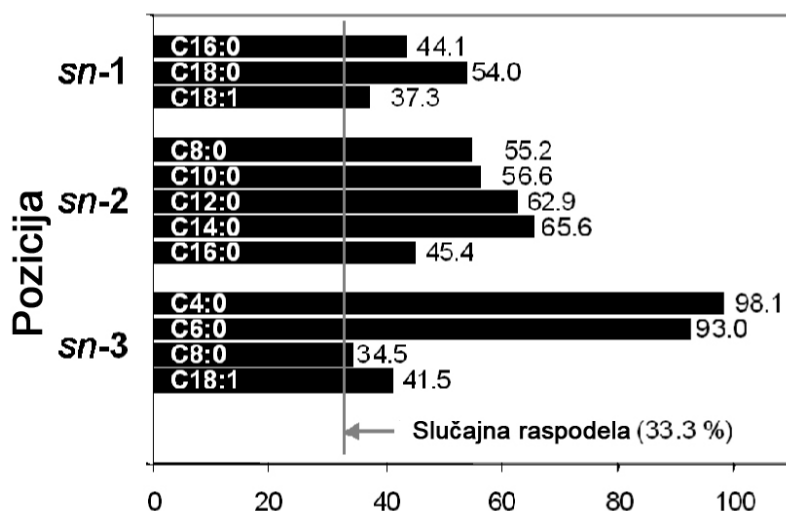
^d mol (%) izračunato na bazi w/w (%)₁₀₀

**Slika 17.** Šematska Fišerova projekciona formula triacilglicerola

O, P i B su esterifikovane masne kiseline

O = oleinska, P = palmitinska i B = buterna

(Kontkanen i sar., 2011).



Slika 18. Najverovatnija "sn"- pozicija (distribucija % > 33,3%) glavnih masnih kiselina u mlečnoj masti (Parodi, 1979; Jensen, 2002).

Triacilglicerol lipaze EC 3.1.1.3 (Anon., 1992) su enzimi koji izazivaju hidrolizu mlečne masti u jogurtu i mogu poticati iz starter kulture ili iz mikrobioloških kontaminanata koji preživljavaju termički tretman mleka. Pojednostavljeno, hidroliza lipida se može predstaviti na sledeći način:



Lipaze koje su prirodno prisutne u mleku bivaju inaktivirane uobičajenim temperaturama pasterizacije. Stoga, bilo koja redukcija sadržaja masti, ili povećanje sadržaja masnih kiselina (slobodnih ili esterifikovanih) ili isparljivih masnih kiselina u jogurtu može biti pripisan metabolizmu lipida od strane mikroorganizama primenjene starter kulture (Tamime i Robinson, 2004).

Hidroliza mlečne masti dejstvom starter kulture odigrava se u ograničenom stepenu ali je to i dalje dovoljno da doprinese formiranju ukusa krajnjeg proizvoda. Fermentacija punomasnog mleka dejstvom *Sc. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ili *Lb. acidophilus* ima različite efekte na lipide i prema Rao i Reddy (1984) neki od njih su:

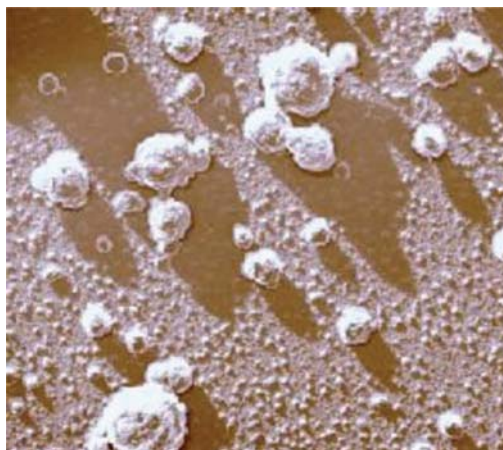
- značajno povećanje sadržaja zasićenih masnih kiselina i oleinske kiseline;
- smanjenje sadržaja linolne i linolenske kiseline u gliceridnoj frakciji;
- umereno povećanje sadržaja slobodnih masnih kiselina ali značajno povećanje sadržaja stearinske i oleinske kiseline;

- monogliceridna frakcija kompletno se gubi tokom fermentacije;
- promene u sadržaju holesterola nisu značajne;
- značajna korelacija ($r=0,711$) utvrđena je između stepena kiselosti i nivoa slobodnih masnih kiselina.

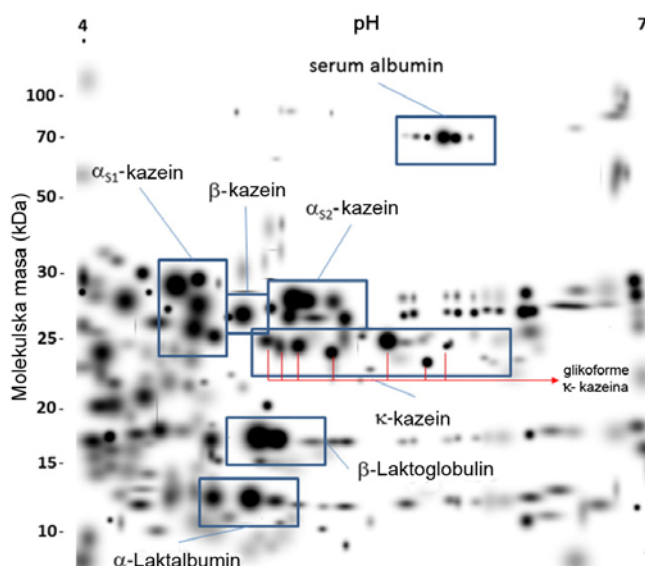
Coskun i Ondul (2004) objavili su da dodatak mezofilnih bakterija mlečne kiseline mleku može da doprinese produkciji slobodnih masnih kiselina spontanom hidrolizom tokom skladištenja. Tokom fermentacije mleka, neki sojevi bakterija, kao rezultat rasta i metabolizma, sposobni su da promene profil masnih kiselina mleka i proizvode funkcionalne masne kiseline (Yadav i sar., 2007; Ekinci i sar., 2008). Među funkcionalnim masnim kiselinama prisutnim u mleku izdvaja se konjugovana linolna kiselina (CLA). Primećeno je da polinezasićene masne kiseline dugog lanca kao što su α -linolenska kiselina i konjugovana linolna kiselina, ne samo što podstiču adheziju nekih laktobacila za mukozne površine u crevima, nego i ublažavaju simptome kod crevnih upala (Kankaanpää i sar., 2001; Das i Fams, 2002). CLA u mleku je međuprodukt biohidrogenacije linolne u stearinsku kiselinu, metabolizma bakterija u buragu (Kim i Liu, 2002). Oh i sar. (2003) i Ogawa i sar. (2005) objavili su da preko 250 sojeva bakterija iz 14 rodova kao što su: *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* proizvode CLA iz linolne kiseline.

Promena strukture kazeinske micelle i mehanizam formiranja gela

Glavnu proteinsku frakciju u mleku čini kazein (slika 19), sa koncentracijom od oko 25g/L što odgovara 78% od ukupnih proteina mleka. Kazein je poslednjih godina dodatno proučen upotrebom dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE). Na slici 20 moguće je videti individualne glikoforme κ -kazeina. Stepem glikozilacije κ -kazeina pomera izoelektričnu tačku sa leva (više kiselo) na desno (više bazno).



Slika 19. Kazeinske micelle u mleku (Yildiz, 2010).

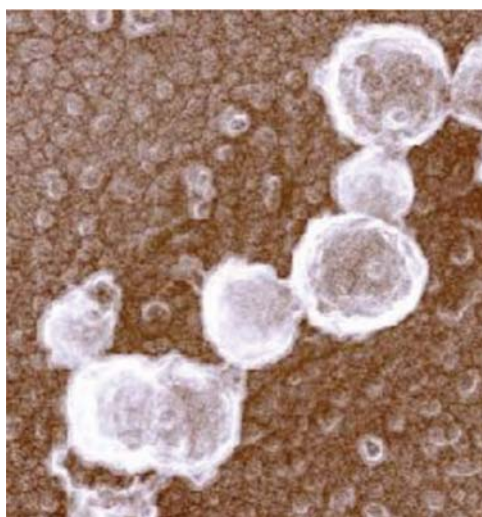


Slika 20. Master mapa 2–DE proteina mleka (D'auria i sar., 2005; Holland i sar., 2004; Holland i sar., 2005; Roncada i sar., 2012).

Jogurti gel sastoji se od makromolekula, pretežno kazeina i masnih globula. Analizirajući istraživanja dostupna u literaturi na model sistemu kazeinskog gela i mikrostrukтури jogurta, rezultati ukazuju da u jogurtu postoji permanentna mreža koja se sastoji od kovalentnih (–SH/S–S) i nekovalentnih proteinskih interakcija (hidrofobnih, elektrostatičkih i dr.) (Rohm i Kovac, 1994). Jogurt je viskoelastičan i tiksotropan sistem (Steventon i sar., 1990; Benezech i Maingonnat, 1994; De Lorenzi i sar., 1995). Glavne strukturne promene tokom proizvodnje jogurta dešavaju se na ka-

zeinskim micelama, zbog promene pH vrednosti (Roefs i sar., 1985; Van Hooydonk i sar., 1986). Poznato je da kazeinske micelle čine različite proteinske frakcije koje su povezane preko kalcijum–fosfatnih mostova. Tokom fermentacije mleka usled snižavanja pH vrednosti dolazi do disagregacije kazeinskih micela, pri čemu se izdvajaju kalcijumovi joni, potom se odvija agregacija i formira se trodimenzionalna struktura gela (Kalab i sar., 1995). 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 (slika 21), odnosno u trodimenzionalni proteinski matiks (Dalglish i sar., 2004). Formiranje gela u jogurtu može se ukratko opisati na sledeći način:

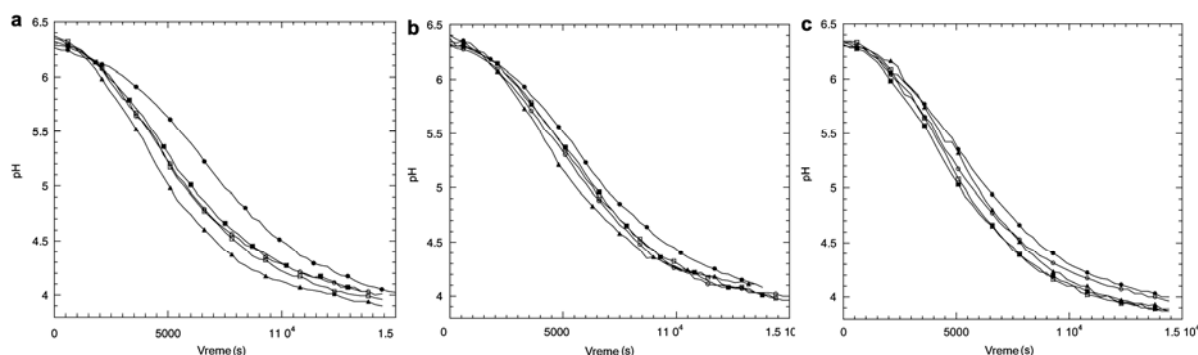
1. Jogurtne starter kulture koriste laktozu kao izvor energije. Rezultat metaboličke aktivnosti startera je konverzija laktoze pretežno u mlečnu kiselinu.
2. Povećanje koncentracije mlečne kiseline izaziva destabilizaciju kompleksa kazeinske micelle/denaturisani proteini surutke. Koloidni kalcijum fosfat u micelama igra glavnu ulogu u ovom mehanizmu.
3. Pri pH vrednosti 5,5–5,1 (izoelektrična tačka β –kazeina) započinje agregacija, i pri pH vrednosti 4,6–4,7 se završava.
4. Interakcija α –laktalbumina i β –laktoglobulina sa κ –kazeinom preko tiol–disulfidnih mostova sprečava formiranje grube strukture gela i omogućava formiranje fine strukture jogurnog gela u koju su uklopljene voda i druge komponente mleka.



Slika 21. Kazeinske micelle formiraju lance u jogurtu pre koagulacije (Yildiz, 2010).

Tokom porasta koncentracije mlečne kiseline kalcijum–fosfat se potpuno oslobađa iz micela pri pH vrednosti 5,0–5,1. Stoga, njegova uloga u objedinjavanju individualnih kazeinskih molekula u formi micela je redukovana, i κ -kazein i β -kazein počinju da disociraju iz micela (Heertje i sar., 1985). U ovoj disocijaciji, zeta potencijal micela igra važnu ulogu. Zeta potencijal micela u mleku (pH 6,7) iznosi oko -13 mV, i hidratacija, sterično odbijanje, i negativno površinsko naelektrisanje štiti micelu od agregiranja. Kada se pH spusti na 5,2 zeta potencijal je minimalan ali, na nižim pH vrednostima, zeta potencijal počinje ponovo da raste. Glavni razlog fluktuacije vrednosti zeta potencijala je neuobičajeno ponašanje β -kazeina. Pri pH 5,2 β -kazein celokupno prelazi u serum fazu; u ovoj tački, zeta potencijal je minimalan. Između pH 4,8 i 5,2 β -kazein, koji je pozitivno naelektrisan u ovom opsegu pH, reaguje sa α_s -kazeinom, koji je negativno naelektrisan u ovom opsegu pH, dejstvom elektrostatičkih veza (Heertje i sar., 1985).

Drugi važan faktor koji utiče na stabilnost kazeinskih micela je termički tretman (slika 22). Nakon termičkog tretmana, dešavaju se interakcije između κ -kazeina i proteina surutke (pretežno β -laktoglobulina) pri pH vrednosti 6,4. Ove interakcije dovode do povećanja hidrofobnosti, obzirom da je hidrataciona barijera koja sprečava agregaciju kazeinskih micela redukovana. Kao posledica toga, micelarna agregacija i formiranje gela počinju na pH 5,2. Drugi mogući razlog za početak formiranja gela na pH 5,2 može biti promena sastava kazeinske micela na ovoj pH vrednosti. Pri višim pH vrednostima, koncentracija termički tretiranog micelnog α -kazeina se povećava i, zbog veće osetljivosti α_s -kazeina nego drugih frakcija kazeina prema kalcijumu, osetljivost micela prema kalcijumu se povećava.



Slika 22. Promena pH vrednosti kao funkcija vremena jogurtnog gela fermentisanog na 45°C iz pasterizovanog mleka

(a) obrano mleko; (b) mleko sa 1,5% mlečne masti; (c) punomasno mleko (3,5% mlečne masti). Gel je formiran iz nezagrevanog mleka (●) ili mleka zagrevanog 1 min. na 80°C (○), 85°C (■), 90°C (□) ili 95°C (▲) (Xu i sar., 2008).

Formiranje jogurnog gela može se opisati kao višefazni proces:

- inicijalna faza niskog viskoziteta;
- faza brze promene viskoziteta koja je uslovljena brzim umnožavanjem bakterija starter kulture, i početak formiranja gela;
- faza konstantno visokog viskoziteta (skoro završeno formiranje gela)
- faza sinerezisa (letalna faza za starter kulturu) (Parnell–Clunies i sar., 1988).

Period fermentacije je pod velikim uticajem brojnih faktora kao što su temperatura inkubacije, sadržaj suve materije mleka, vrste bakterija u starter kulturi i mehaničkog tretmana fermentisanog mleka. Kapacitet produkcije kiseline i stopa inokulacije starter bakterija naročito su važni u kinetici formiranja gela (Kristo i sar., 2003; Hardi i Slacanac, 2000).

Početna tačka gela i razvojna stopa gela (k) su dva parametra koja se koriste za determinisanje inkubacionih uslova.

Razvojna stopa gela (k) izražava se kao:

$$2,303/t \log (G_{\infty}^* - G_{t_1}^* / G_{\infty}^* - G_{t_2}^*)$$

gde je:

G^* – čvrstoća gela (kompleksni moduo)

G_{∞}^* – čvrstoća gela na kraju inkubacije

$G_{t_1}^*$ – čvrstoća gela na početku inkubacije

$G_{t_2}^*$ – čvrstoća gela u fazi visokog viskoziteta

t – vreme (s)

Kompleksni moduo izražava se na sledeći način:

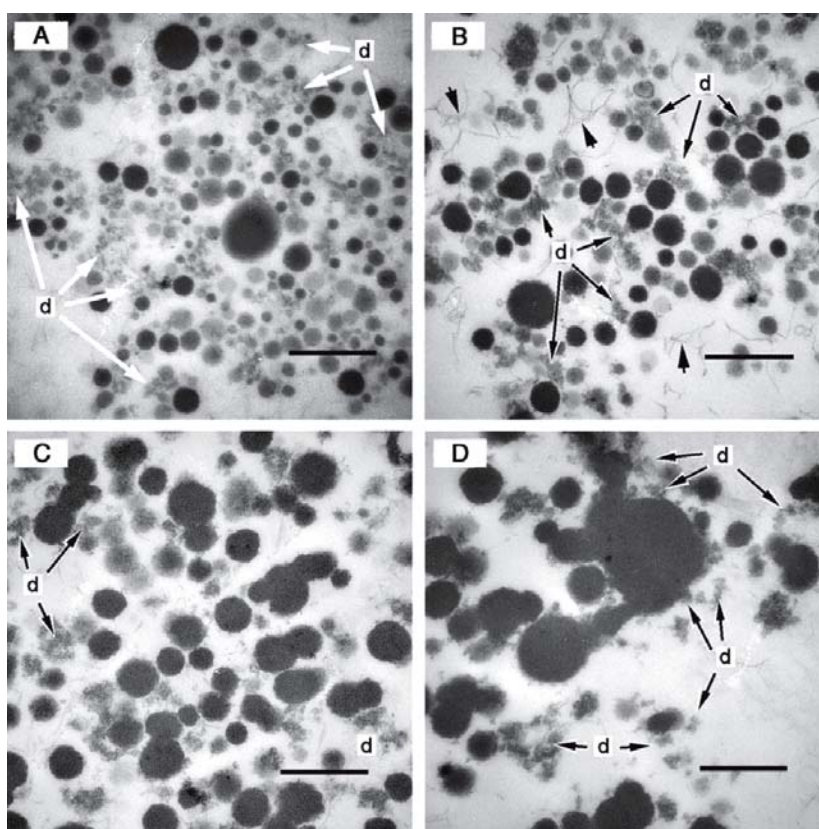
$$|G^*| = |G' + iG''|^2)^{1/2} \text{ gde je:}$$

G' – elastični moduo (elastična karakteristika gela) (m Nm)

G'' – viskozni moduo (viskozna karakteristika gela) (m Nm)

Istraživanja mikrostrukture jogurta primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) pokazala je da se struktura gela sastoji od kazeinskih micela inkorporiranih u proteinske

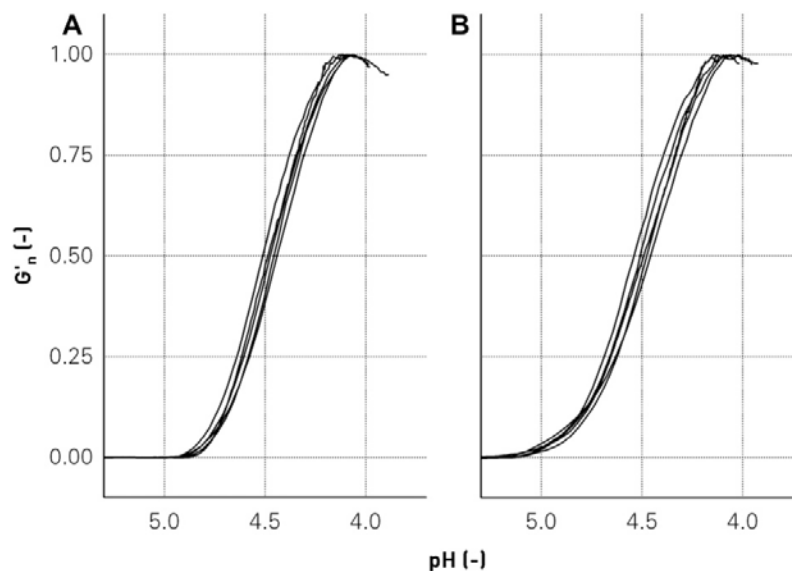
lance i klastere (Evanhuis i Vries, 1959; Tamime i sar., 1984; Visser i sar., 1986). Kazeinske micelle su proteinske globule veličine od 50–500 nm, sa prosečnim prečnikom od 200 nm, dok su najmanje vidljive čestice u mleku kazeinske submicelle prečnika od 10–20 nm (Dalgleish i sar., 2004; Karlsson i sar., 2007). McMahon i sar. (2009) ispitivali su promene u mikrostrukturi (slika 23) tokom fermentacije mleka transmissionom elektronskom mikroskopijom (TEM). Njihovi rezultati pokazuju agregaciju kazeinskih micela i kompaktne sferične makromolekule na 40°C upotrebom glukono- δ -laktona.



Slika 23. Transmission elektronska mikroskopija obranog mleka (glutaraldehyd-fiksiranog i agar-učvršćenog) tokom tople acidifikacije na 40°C dodatkom 1,2% starter kulture na (A) pH 5,4; (B) pH 5,0; (C) pH 4,75 i (D) pH 4,6 (d = labavo umreženi proteini; kratke strelice = vlakna agara; bar = 500 nm) (McMahon i sar., 2009).

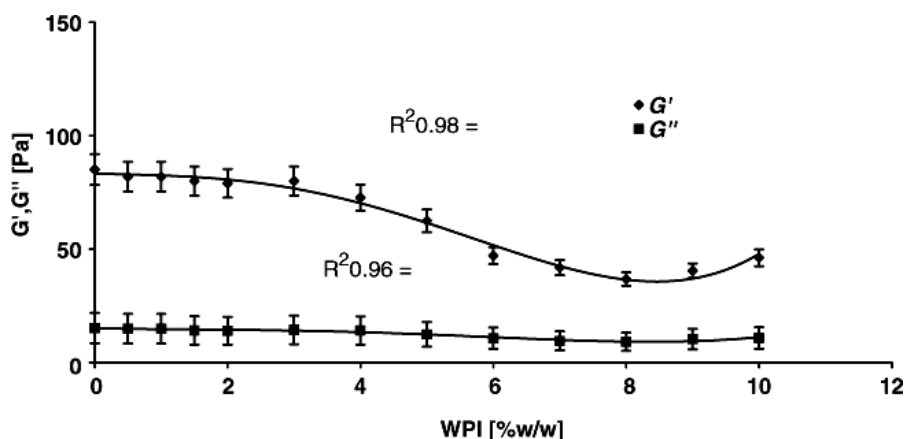
Harwalker i Kalab (1980) su utvrdili razlike u mikrostrukturi između uzoraka jogurta proizvedenog sa i bez prethodnog termičkog tretmana mleka koristeći SEM. Uzorci jogurta sa prethodnim termičkim tretmanom imali su finiju proteinsku mrežu, čvršći i kompaktniji proteinski matriks i niže vrednosti sinerezisa od uzoraka jogurta bez prethodnog termičkog tretmana.

Brojni autori su utvrdili značajnu korelaciju između pH vrednosti i reoloških karakteristika jogurnog gela tokom fermentacije. Kako se formira gel, vrednost elastičnog modula G' raste (slika 24) (Horne, 1999; Xu i sar., 2008; Jacob i sar., 2011).



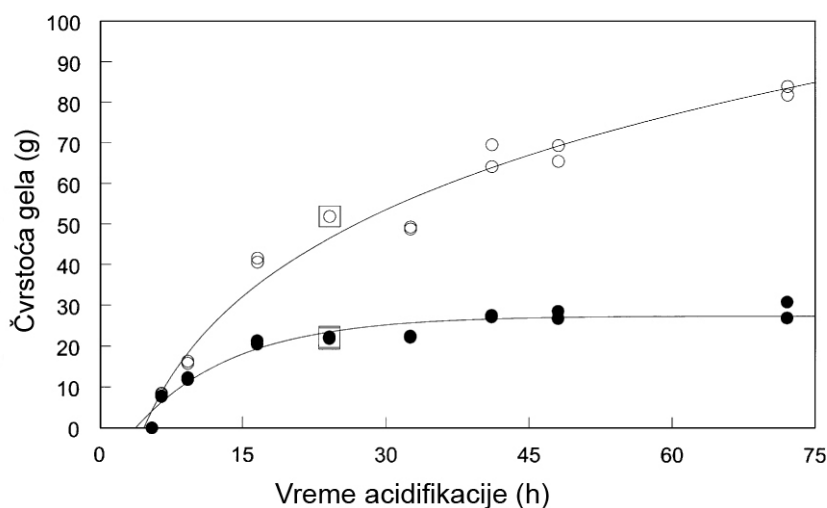
Slika 24. Promena elastičnog modula normalizovanog do maksimalne čvrstoće (G'_n). (A) 12% rekonstituisano obrano mleko, (B) 12% rekonstituisano obrano mleko tretirano mikrobiološkom transglutaminazom i 3, 4, 5, 6 ili 7% glukono- δ -laktinom (Jacob i sar., 2011).

Generalno, reološke karakteristike jogurnog gela zavise od niza faktora: sastava mleka, termičkog tretmana, sastava i količine starter kulture, temperature fermentacije, dodatka i uslova skladištenja (Patočka i sar., 2006; Tamime i sar., 2007). U radu Patočka i sar. (2006) ispitivane su reološke karakteristike vodenih rastvora izolata proteina surutke (WPI–whey protein isolate) i nekoliko mlečnih sistema sa dodatim izolatima proteina surutke. Dodatak do 10% WPI snižava viskozitet komercijalnih uzoraka jogurta. Originalni viskozitet je obnovljen dodatkom 15% WPI. U mlaćenici, minimalni viskozitet dobijen je dodatkom 6% WPI a originalna vrednost je obnovljena nakon dodatka 12% WPI. Dodatak WPI komercijalnim uzorcima jogurta doveo je do snižavanja vrednosti elastičnog modula G' (slika 25). Snižavanjem pH vrednosti mleka tokom fermentacije teksturalne karakteristike (čvrstoća, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta) rastu kao rezultat agregacije kazeinskih micela (Vasbinder i sar., 2003).



Slika 25. Promena elastičnog (G') i viskoznog modula (G'') komercijalnih uzoraka jogurta sa dodatkom različitih koncentracija WPI (izolata proteina surutke). Linije pokazuju optimalnu polinomnu regresiju podataka (za G' , $R^2=0,98$; za G'' , $R^2=0,96$). Rezultati su dati u obliku: srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=6$) individualnih uzoraka jogurta. (Patocka i sar., 2006).

U radu Vasbinder i sar. (2003) pokazano je da formiranje disulfidnih veza tokom i nakon acidifikacije zagrejanog mleka snažno doprinosi mehaničkim karakteristikama gela jogurta (slika 26).

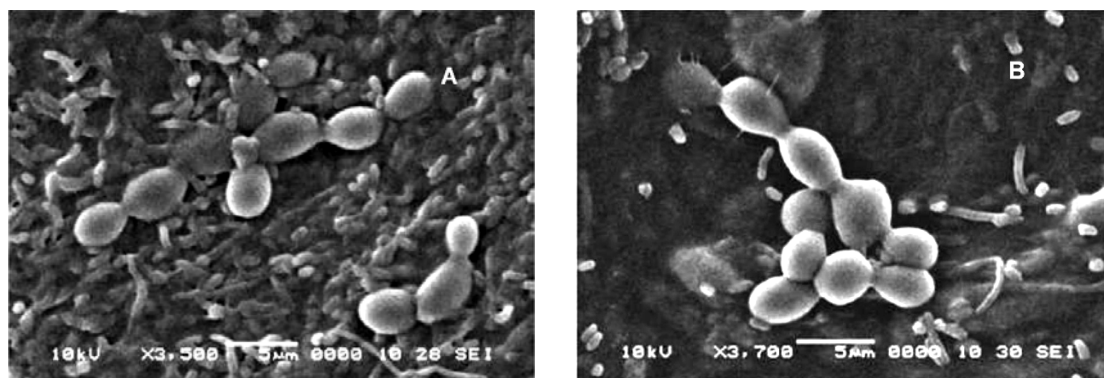


Slika 26. Razvoj čvrstoće gela tokom acidifikacije svežeg obranog mleka u odsustvu (otvoreni simboli) i prisustvu (popunjeni simboli) N-etilmaleimida (tiol blokirajući agens) (Vasbinder i sar., 2003).

KOMBUHA

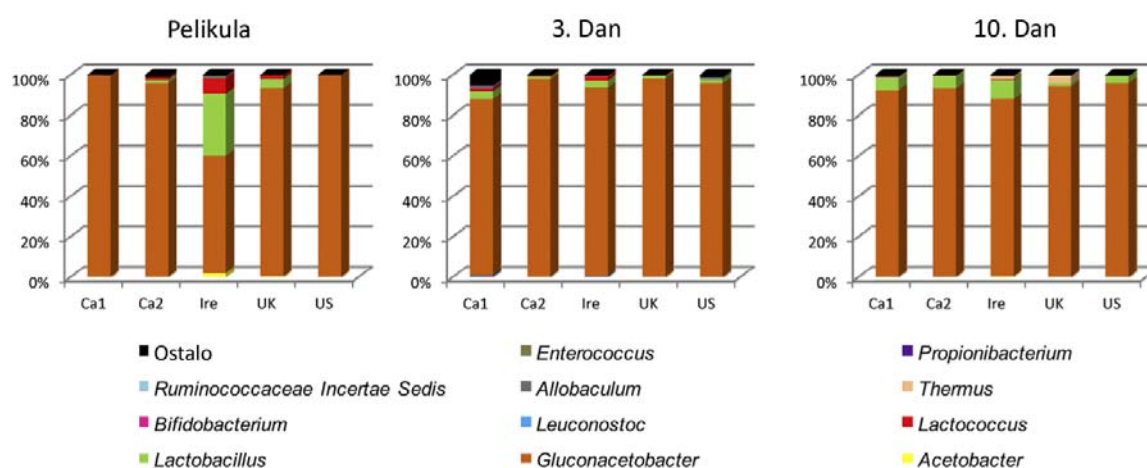
Mikrobiološki sastav

Do sada se smatralo da kombuha predstavlja simbiotsku zajednicu bakterija sirćetne kiseline (BSK) i autohtonih vrsta kvasaca. Samo nekoliko rodova BSK izolovano je iz kombuhe i to najčešće *Acetobacter* (Hesseltine, 1965; Liu i sar., 1996; Sievers i sar., 1996; Chen i Liu, 2000; Dutta i Gachhui, 2006; Zhang i sar., 2011; El-Salam, 2012), dok su vrste *Gluconacetobacter* i *Lactobacillus* takođe identifikovane (Yamada i sar., 1997; Wu i sar., 2004; Yang i sar., 2010; Trovatti i sar., 2011; Zhang i sar., 2011). Najbolje proučena vrsta je *Komagataeibacter xylinus* koji je ujedno i najefikasniji proizvođač bakterijske celuloze koja se u vidu pelikule formira po površini tečnosti za kultivaciju kombuhe (Mikkelsen i sar., 2009; Strap i sar., 2011). *Komagataeibacter xylinus* je nedavno reklasifikovan iz *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada i sar., 2012), takođe, ranije poznat kao *Acetobacter xylinum* (Yamada i sar., 1997). Mikroskopskom analizom (slika 27) celulozne pelikule utvrđeno je da se po njenoj 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, fakultativno anaerobnih mikroorganizama (Greenwalt i sar., 2000). Populacija kvasaca u kombuhi je raznovrsnija u sastavu (Mayser i sar., 1995; Teoh i sar., 2004). Identifikovane su vrste rodova *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces* and *Saccharomycoides* (Chen i Liu, 2000; Hesseltine, 1965; Janković i Stojanović, 1994; Liu i sar., 1996; Markov i sar., 2001; Mayser i sar., 1995; Teoh i sar., 2004). Uloga kvasaca je da konvertuju saharozu u organske kiseline, ugljen dioksid i etanol, koje će zatim upotrebiti BSK za proizvodnju acetaldehida i sirćetne kiseline. BSK takođe koriste glukozu (ćelije kvasaca fermentativno metabolišu glukozu i fruktozu) za sintezu celuloze i glukonske kiseline (Greenwalt i sar., 1998; Dufresne i Farnworth, 2000). Ukupan broj bakterija i kvasaca dostiže 10^4 – 10^6 cfu/mL u kombuhi nakon otprilike deset dana fermentacije. Broj kvasaca blago nadmašuje broj bakterija (Chen i Liu, 2000; Teoh i sar., 2004; Goh i sar., 2012). Utvrđeno je da broj mikroorganizama polako opada tokom procesa fermentacije zbog nedostatka kiseonika i ekstremno kiselih (pH 2,5) uslova sredine (Chen i Liu, 2000).



Slika 27. Skening elektronska mikroskopija konzorcijuma kvasaca i bakterija u kombuhi (uvećanje 27A = 3500x i 27B = 3700) (Jayabalan i sar., 2014).

U radu Radulović i sar. (2010) utvrđeno je prisustvo laktobacila ($3,8 \times 10^3$) i laktokoka (7×10^3) u inokulumu kombuhe. Najnovija istraživanja potvrđuju prisustvo bakterija mlečne kiseline, roda *Lactobacillus* (slika 28) u mikrobnim populacijama kombuhe (Marsh i sar., 2014). Marsh i saradnici (2014) su utvrdili u analiziranim uzorcima kombuha napitka da je dominantan rod bakterija *Gluconacetobacter* (>85%) sa tragovima populacije *Acetobacter* (<2%). Što se populacije kvasaca tiče, pomenuti autori su ustanovili da je rod *Zygosaccharomyces* dominantan (>95%).



Slika 28. 16S filogenetski sastav populacije bakterija u: (A) pelikuli; (B) čaju nakon 3 dana fermentacije i (C) čaju nakon 10 dana fermentacije, na nivou roda (Marsh i sar., 2014).

Primena kombuhe u proizvodnji napitaka

Metaboličkom aktivnošću kombuhe na različitim supstratima (Reiss, 1994; Malbaša i sar., 2008a; Malbaša i sar., 2008c) naročito crnom čaju zaslađenom saharozom dobija se blago gazirani, blago kiseo i blago karbonizovan napitak, nutritivno i biološki veoma vredan (Greenwalt i sar., 2000; Iličić, 2010). Postoji mogućnost kultivacije kombuhe i na supstratima kao što su: koka–kola, pivo, vino, razni aromatični napici, ekstrakti biljnih mešavina, ekstrakt topinambura, melasa, mleko i dr. (Malbaša, 2000; Belloso–Morales, Hernandez–Sanches, 2003; Malbaša i sar., 2008a; Malbaša i sar., 2008b; Malbaša i sar., 2008c; Malbaša i sar., 2009a; Malbaša i sar., 2012). Kombuha se kultiviše u aerobnim uslovima na temperaturi od 25–30°C u posudi od stakla ili porcelana sa širokim otvorom, kako bi se obezbedilo dovoljno kiseonika iz vazduha.

Kvalitativni i kvantitativni sastav napitka od kombuhe varira u zavisnosti od porekla kombuhe, klimatskih faktora, kao i prisutnih sojeva kvasaca i bakterija. Glavni metaboliti identifikovani u napitku od kombuhe su:

- šećeri (saharoza, glukoza, fruktoza),
- kiseline (glukonska, glukuronska, mlečna, vinska, ćilibarna, jabučna, limunska, oksalna, malonska, sirćetna),
- vitamini (C, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂),
- enzimi (invertaza, amilaza, katalaza, citohrom–oksidaza),
- alkoholi (etanol),
- joni esencijalnih elemenata (Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺).

Osim nabrojanih, utvrđeno je i prisustvo 14 aminokiselina, biogenih amina, vitamina E u tragovima, kofeina, antibiotski aktivnih materija, usniske kiseline, fenolnih kao i drugih jedinjenja (Malbaša, 2009b). Od fenolnih jedinjenja najzastupljeniji su flavonoidi, posebno epigalokatehin galat (EGCG), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG) i epikatehin (EC) (Friedman i sar., 2005). Sadržaj i sastav fenolne frakcije u kombuha napitku značajno varira u zavisnosti od vrste čaja i postupka njegove prerade. Tokom proizvodnje crnog čaja, katehin grupa podleže oksidaciji i drugim hemijskim reakcijama formirajući dimere teaflavina (TFs) i oligomere tearubigina (TRs) (Peterson i sar., 2004). Kombinacija jedinjenja TFs i TRs kao rezultat ima tipičan opor i pun ukus kao i boju crnog čaja (Obanda i sar., 2004).

U tabeli 12 prikazan je sadržaj primarnih hemijskih komponenata u kombuha napitku, proizvedenom fermentacijom zaslađenog crnog čaja. Rezultati prikazani u tabeli 12 odnose se na fermentacioni period od 10 dana i početni sadržaj saharoze od 70 g/L, osim za rezultate koje je

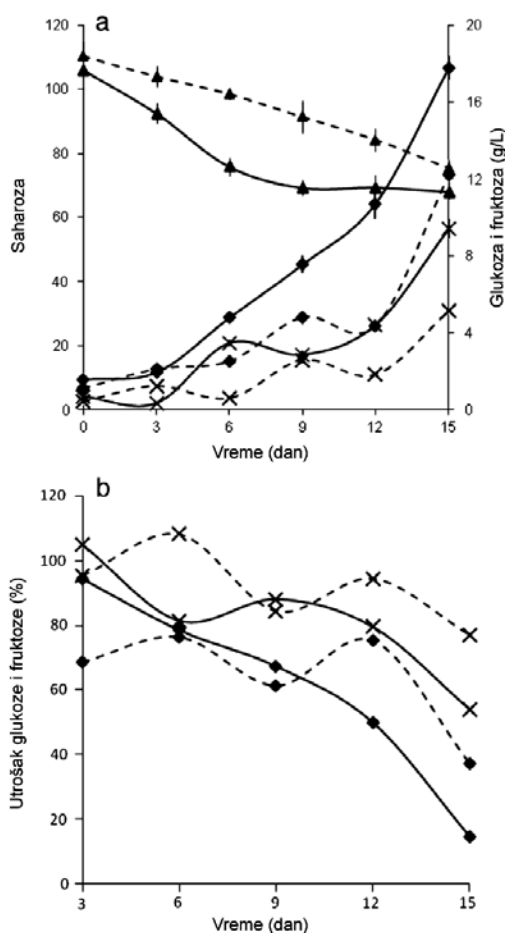
objavio Reiss (1987), a odnose se na period fermentacije od 14 dana i sadržaj saharoze od 50 g/L.

Tabela 12. Sadržaj primarnih hemijskih komponenata u kombuha napitku, proizvedenom fermentacijom zaslađenog crnog čaja (Malbaša, 2014)

Literaturni citat	Saharoza (g/L)	Glukoza (g/L)	Fruktoza (g/L)	Glukonska kiselina (g/L)	Etanol (g/L)	Sirćetna kiselina (g/L)
Sievers i sar. (1995)	18,2	28,8	16,4	2,8	3,6	2,1
Blanc (1996)	17	–*	–	12	< 1	3
Roussin (1996)	–	–	25	3,1	–	2
Reiss (1987)	–	–	–	2,52	1,07	0,08

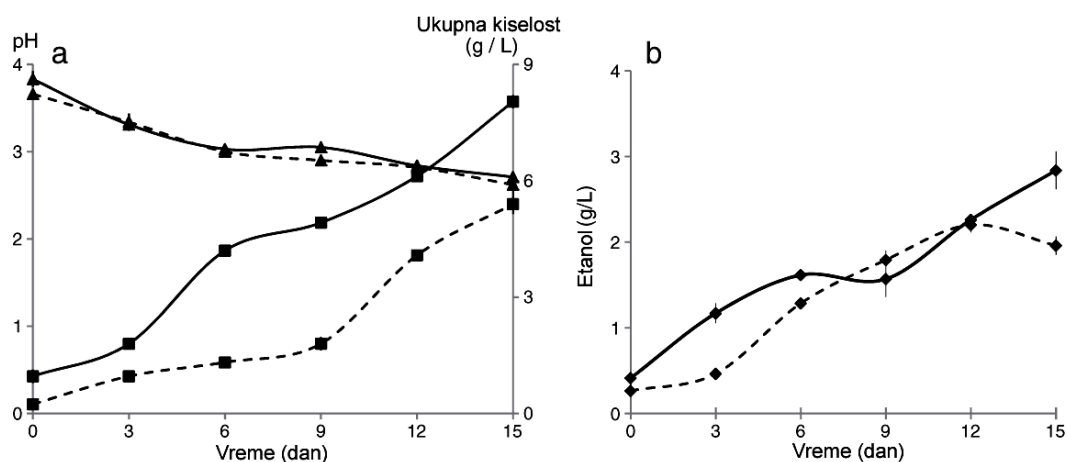
–* nije mereno

Kallel i sar. (2014) pratili su razgradnju saharoze tokom fermentacije kombuhe na crnom i zelenom čaju 15 dana (slika 29). Sadržaj saharoze kontinualno se smanjivao tokom dve nedelje fermentacije i brzina nestajanja saharoze bila je niža u zelenom čaju u poređenju sa crnim što je u skladu istraživanjima drugih autora (Chen i Liu, 2000). Ovo se može objasniti smanjenom aktivnošću invertaze u zelenom nego u crnom čaju što je posledica delimične ili potpune eliminacije inhibitora invertaze tokom proizvodnje crnog čaja. Koncentracija glukoze i fruktoze bila je viša u crnom nego u zelenom čaju tokom dve nedelje fermentacionog perioda. Takođe, brzina smanjivanja sadržaja glukoze i fruktoze opada s vremenom. Mikroflora kombuhe preferira glukozu kao izvor ugljenika, osim ako se u fermentacionom medijumu ne desi substancijalna izomerizacija glukoze u fruktozu (Seto i sar., 1997).



Slika 29. Promene sadržaja saharoze, glukoze i fruktoze tokom fermentacije kombuhe na zelenom (isprekidana linija) i crnom čaju (puna linija):
 a) nestajanje saharoze (▲) i pojavljivanje fruktoze (■) i glukoze (×);
 b) frakcija (%) glukoze i fruktoze utrošena tokom fermentacije kombuhe (Kallel i sar., 2012).

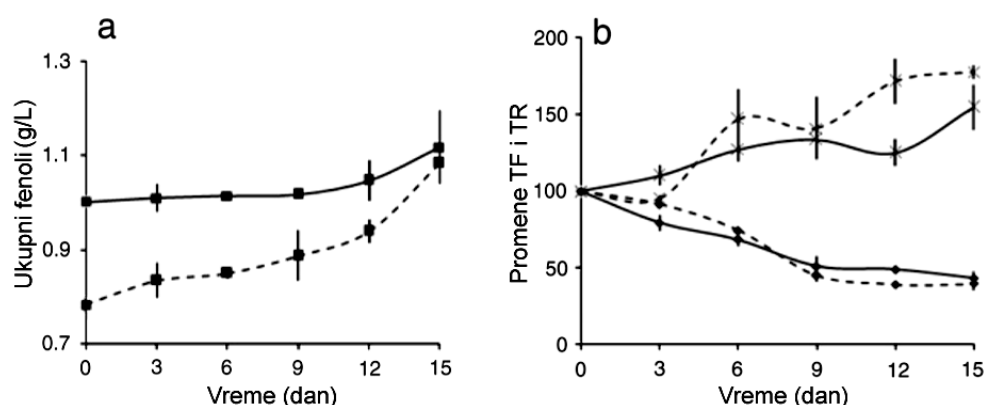
Tokom fermentacije pH vrednost napitka opada, a najznačajnije su promene izražene do trećeg dana fermentacije (slika 30a). Nakon toga, do kraja fermentacije, ukupna promena pH vrednosti je za 0,46 pH jedinica, što ukazuje na to da ugljenik (IV) – oksid koji se stvara tokom fermentacije može imati puforni efekat (Kallel i sar., 2014). Ukupna kiselost, izražena u g/L sirćetne kiseline raste tokom procesa fermentacije (slika 30a). U radu Jayabalan i sar. (2007) koncentracija sirćetne kiseline bila je viša u zelenom čaju fermentisanom kombuhom nego u crnom (9,5 i 6,2 g/L, respektivno, 15. dana fermentacije). Sadržaj sirćetne kiseline varira od 5 do 10 g/L u fermentacionim tečnostima (zeleni ili crni čaj fermentisan kombuhom) i zavisi od sastava i/ili aktivnosti prisutnih bakterija sirćetne kiseline.



Slika 30. Promene pH vrednosti i ukupne kiselosti (a) i etanola (b) tokom fermentacije kombuhe na zelenom (isprekidana linija) i crnom čaju (puna linija) (Kallel i sar., 2012).

Koncentracija etanola naglo raste nakon trećeg dana u fermentisanim napicima, ranije i brže u crnom čaju u poređenju sa zelenim, kao posledica intenzivnog metabolizma kvasaca (slika 30b). Dosadašnja istraživanja pokazala su da je pod sličnim eksperimentalnim uslovima koncentracija etanola između 1,7 i 5,5 g/L (Blanc, 1996; Chen i Liu, 2000; Lončar i sar., 2006).

Fenolne frakcije u kombuha napicima na crnom i zelenom čaju su istražene na različitim strukturnim nivoima: ukupne, oligomeri, dimeri i monomeri (slika 31). Nisu utvrđene značajnije razlike u sadržaju ukupnih fenola i detektovanih monomera na kraju fermentacionog perioda između crnog i zelenog čaja (Jayabalan i sar., 2008; Kallel i sar., 2012). Nasuprot tome, sadržaj teaflavina umereno raste a tearubigina izrazito opada tokom fermentacije kombuhe (Peterson i sar., 2005; Jayabalan i sar., 2007; Kallel i sar., 2012).



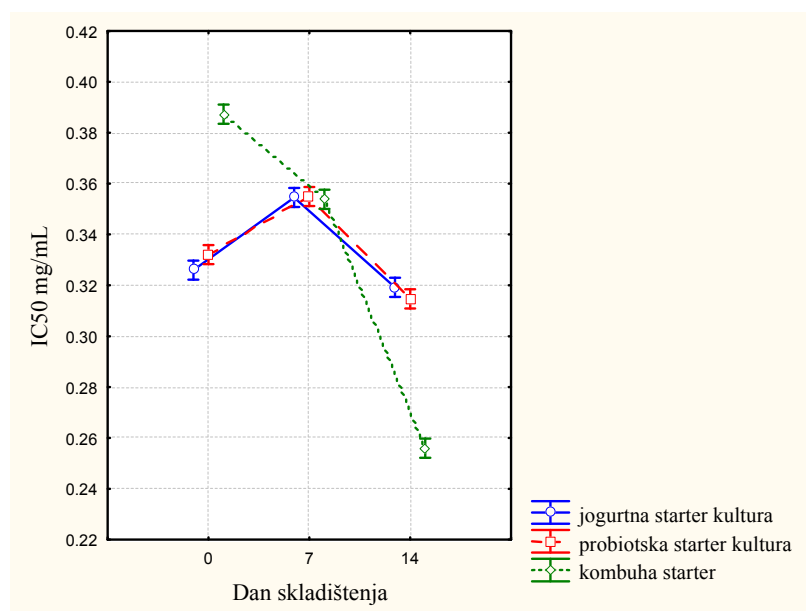
Slika 31. Promene sadržaja fenolnih komponenti tokom fermentacije kombuhe na zelenom (isprekidana linija) i crnom čaju (puna linija):

- sadržaj ukupnih fenola;
- promene sadržaja teaflavina (x) i tearubigina (■) (Kallel i sar., 2012).

Malbaša (2004) objavio je prve rezultate istraživanja antioksidativne aktivnosti kombuha napitka praćenjem sposobnosti transformacije i stabilizacije slobodnih radikala. Uzroci antioksidativne aktivnosti kombuha napitka mogu biti dvojaki. Jedan od uzroka je uticaj flavonoidnih antioksidanata, koji potiču iz crnog i zelenog čaja u prvom redu polifenolnih komponenata (EGCG, EGC, ECG, EC, TFs i TRs). Drugi uzrok antioksidativne aktivnosti kombuha napitka je nastanak metabolita, koji imaju svojstva antioksidanata, prvenstveno vitamina C, vitamina B grupe (naročito B₂ i B₆), zatim purina i pirimidina, katalaze i nekih organskih kiselina itd. Jaya-balan i sar. (2008) takođe su utvrdili visoku antioksidativnu aktivnost kombuha napitka na hidrokso (OH) i 1,1–difetil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikale kao i dejstvo na superoksid radikal i uticaj na anti–lipidnu peroksidaciju. Malbaša i sar. (2011) objavili su rezultate istraživanja uticaja starter kulture kombuhe na antioksidativnu aktivnost tradicionalnog kombuha napitka na hidrokso i DPPH radikale. Za proizvodnju uzoraka korišćene su tri različite starter kulture: a) fermentaciona tečnost native lokalne kombuhe nakon 7 dana fermentacije (kontrola); b) starter kultura sačinjena od izolata lokalne kombuhe: *Saccharomyces cerevisiae* i mešana kultura bakterija sirćetne kiseline (starter 1); c) starter kultura sačinjena od izolata lokalne kombuhe: *Zygosaccharomyces* sp. i mešana kultura bakterija sirćetne kiseline (starter 2). Kontrola, starter 1 i starter 2 kultivisani su na dva različita supstrata, na crnom i zelenom čaju zaslađenom sa 7% saharoze. Kombuha napici proizvedeni sa starterom 1 na crnom čaju ispoljili su najveću antioksidativnu aktivnost prema obe vrste radikala, dok je na zelenom čaju to postignuto sa kontrolom. Prilikom ispitivanja antioksidativne aktivnosti, meren je sadržaj vitamina C u svim uzorcima i on pokazuje kontinualan rast. Razlike u antioksidativnoj aktivnosti između proizvedenih napitaka tumače se pored razlike u hemijskom sastavu čaja i različitom produkcijom vitamina C i organskih kiselina između ispitivanih sistema.

Vitas i sar. (2013) ispitivali su antioksidativnu aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe kultivisane na čaju od koprive i rtanjskom čaju. Ustanovljen je sinergistički efekat mlečne masti i temperature fermentacije za antioksidativnu aktivnost prema hidrokso radikalima za oba tipa dobijenih fermentisanih mlečnih proizvoda.

U radu Hrnjez i sar. (2014) analiziran je antioksidativni kapacitet, aktivnost inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) i stepen proteolize fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe i upoređen je sa fermentisanim mlečnim proizvodima dobijenim primenom probiotske i jogurtne starter kulture. Fermentisani mlečni proizvodi dobijeni primenom kombuhe imali su najvišu ACE aktivnost (63,43%) na kraju perioda skladištenja od 14 dana u poređenju sa fermentisanim mlečnim proizvodima dobijenim primenom probiotske i jogurtne starter kulture (slika 32).



Slika 32. Promena vrednosti ACE inhibicije (IC_{50}) tokom skladištenja fermentisanih mlečnih proizvoda (Hrnjez i sar., 2014).

Antimikrobna aktivnost kombuhe ispitana je prema velikom broju patogenih mikroorganizama (Sreeramulu i sar., 2000). Utvrđeno je da su: *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* i *Listeria monocytogenes* osetljivi na kombuhu. Prema brojnim radovima, sirćetna kiselina se smatra odgovornom za inhibični efekat prema mikroorganizmima (Greenwalt i sar., 1998; Sreeramulu i sar., 2000; Steinkraus i sar., 1996). Međutim, Sreeramulu i sar. (2000, 2001) su utvrdili da kombuha ima antimikrobni efekat prema *E. coli*, *S. sonnei*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, i *C. jejuni* čak i pri neutralnoj pH vrednosti i nakon termičke denaturacije kombuhe. Ovo ukazuje na prisustvo i drugih antimikrobnih komponenti u kombuha napitku osim sirćetne kiseline i proteina velike molekulske mase.

Sreeramulu i sar. (2001) izvršili su dalju karakterizaciju antimikrobnih komponenata u kombuha napitku. Tokom procesa fermentacije kombuhe na crnom čaju u trajanju od 14 dana, analizirali su nekoliko metabolita svaka dva dana. Utvrdili su da se nivo sirćetne kiseline i glukonske kiseline povećava sa vremenom tokom fermentacije. Ni mlečna kiselina ni etanol nisu detektovani.

Battikh i sar. (2012) ispitivali su i poredili antibakterijsku i antifungalnu aktivnost kombuhe fermentisane na crnom čaju prema Gram (+) i Gram (–) patogenim bakterijama i kandida kvascima koristeći agar difuzioni metod sa kombuha analogima proizvedenim fermentacijom kombuhe na biljnim ekstraktima: *Thymus vulgaris* L., *Lippia citriodora*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare* i *Mentha piperita*. Utvrđeno je snažno antifungalno dejstvo kombuha analoga, naročito onih proizvedenih fermentacijom na *L. citriodora* i *F. vulgare* i to prema *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida sake*, *Candida dubliniensis* i *Candida albicans*, kao i antibakterijsko dejstvo prema nekim patogenim bakterijama.

Sistematsko ispitivanje antimikrobne aktivnosti kombuha napitka potvrdilo je prisustvo, pored organskih kiselina i proteina (enzima) ili tanina izvorno prisutnih u čaju, i drugih antimikrobnih komponenti produkovanih tokom fermentacije. Sinergija antimikrobnih komponenata i niske pH vrednosti (zahvaljujući produkciji organskih kiselina) verovatno pojačava inhibitorni efekat kombuha napitka.

MATERIJAL I METODI RADA

MATERIJAL

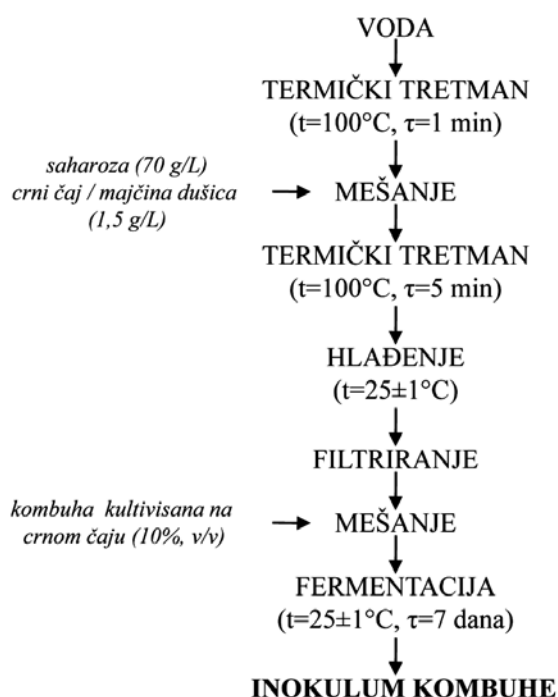
Mleko

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 0,9%, 1,6%, 2,0% i 2,2% mlečne masti (proizvođača AD IMLEK ogranak „Novosadska mlekar“ Novi Sad), hemijskog i mikrobiološkog sastava u skladu sa Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Službeni glasnik Republike Srbije, 33/2010 i 69/2010).

Starter kulture

Inokulum kombuhe

Priprema inokuluma kombuhe data je na slici 33. Voda sa dodatkom saharozom, koncentracije 70 g/L, zagreva se do ključanja. Potom se dodaje crni čaj (*Camellia sinensis*) ili majčina dušica (*Thymus serpyllum*), u koncentraciji 1,5 g/L, i ostavi se da ključa još 5 minuta. Čaj se ohladi na sobnu temperaturu i nakon ceđenja dodaje se 10% (100 mL/L) inokuluma kombuhe iz prethodne fermentacije. Posuda u kojoj se obavlja inkubacija kombuhe prekriva se tkaninom propusnom za vazduh (gazom). Inkubacija se obavlja na temperaturi od 25°C tokom 7 dana.



Slika 33. Šematski prikaz proizvodnje inokuluma kombuhe.

Jogurtna kultura

Klasični jogurt proizveden je dodatkom jogurtne kulture YF-L812 (Yo-Flex[®], *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Chr. Hansen, Danska) u koncentraciji od 0,05 g/L.

Probiotska starter kultura

Pored inokuluma čajne gljive, u pojedinim uzorcima, korišćena je i probiotska starter kultura ABT-7-Probio-Tek[®] (LA-5[®] *Lactobacillus acidophilus*, BB-12[®] *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus*, Chr. Hansen, Danska) u koncentraciji od 0,0935 g/L (eksperiment 2) odnosno 0,05 g/L (eksperiment 4).

PROIZVODNJA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Eksperimenti su bili podeljeni u četiri odvojene ali povezane celine označene kao I, II, III i IV eksperiment.

I eksperiment

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka u prvom eksperimentu korišćeno je pasterezovano, homogenizovano mleko sa 0,9% mlečne masti (9,80% w/w suve materije, 3,20% w/w proteina, 4,74% w/w laktoze, 0,82% w/w pepela, pH=6,58) i 2,2% mlečne masti (11,10% w/w suve materije, 3,20% w/w proteina, 4,54% w/w laktoze, 0,85% w/w pepela, pH=6,59). Proizvedeni uzorci prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Plan prvog eksperimenta

Uzorci	Materijal	Koncentracija inokuluma kombuhe
Model sistem	Crni čaj	10% v/v
M1K10	Mleko sa 0,9% w/w mlečne masti	10% v/v
M1K15	Mleko sa 0,9% w/w mlečne masti	15% v/v
M2K10	Mleko sa 2,2% w/w mlečne masti	10% v/v
M2K15	Mleko sa 2,2% w/w mlečne masti	15% v/v

U mleko sa 0,9% w/w odnosno, 2,2% w/w mlečne masti, zagrejano na temperaturu 42°C, dodato je 10% v/v odnosno 15% v/v inokuluma kombuhe iz prethodne fermentacije. Fermentacija mleka trajala je do postizanja pH vrednosti 4,5, nakon čega je gel ohlađen na 8°C, homogenizovan električnom mešalicom i pakovan u odgovarajuću ambalažu (polipropilenske čaše). Uzorci su čuvani do trenutka analize u frižideru na 4°C. Model sistem – crni čaj sa laktozom, pripremljen je sa 46 g/dm³ laktoze, umesto saharoze, po ranije opisanoj proceduri pripreme inokuluma kombuhe. Proizvodnja uzorka ponovljena je 3 puta.

II eksperiment

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka u drugom eksperimentu korišćeno je pasterezovano, homogenizovano mleko sa 1,6% w/w mlečne masti (10,60% w/w suve materije, 3,30% w/w proteina, 4,88% w/w laktoze, 0,75% w/w pepela, pH=6,84). Uzorci su proizvedeni dodatkom 90 mL inokuluma kombuhe (kultivisane na crnom čaju odnosno čaju od majčine dušice) i 0,0935 g/L probiotske starter kulture u 900 mL mleka na tri različite temperature: 37°C, 40°C i 43°C. Fermentacija mleka trajala je do postizanja pH vrednosti 4,5, nakon čega je gel ohlađen na 8°C, homogenizovan električnom mešalicom i pakovan u odgovarajuću ambalažu (polipropilenske čaše). Uzorci su čuvani do trenutka analize u frižideru na 4°C. Proizvedeni su sledeći uzorci: BT37, BT40, BT43, TT37, TT40, TT43. BT i TT označavaju crni čaj i čaj od majčine dušice dok 37, 40 i 43 označavaju temperaturu fermentacije. Proizvodnja uzorka ponovljena je 3 puta.

III eksperiment

Za treći eksperiment odabrano je mleko sa 2% w/w mlečne masti (10,59% w/w suve materije, 3,30% w/w proteina, 4,60% w/w laktoze, 0,69% w/w pepela, pH=6,52). Za inokulaciju mleka, zagrejanog na temperaturu 37°C odnosno 42°C, korišćen je inokulum kombuhe u koncentraciji 10% v/v. Kombuha je kultivisana na crnom čaju koncentracije 1,5 g/L sa dodatkom saharoze koncentracije 70 g/L. Fermentacija mleka trajala je do postizanja pH vrednosti 4,6, nakon čega je gel ohlađen na 8°C, homogenizovan električnom mešalicom i pakovan u odgovarajuću ambalažu. Uzorci su čuvani do trenutka analize na -18°C.

Tokom fermentacije mleka (na 37°C odnosno 42°C) dodatkom kombuhe uzorci za analizu uzimani su pri sledećim pH vrednostima:

- Uzorak 0₃₇, uzorak 0₄₂ – pH=6,07
(mleko sa dodatkom 10% v/v inokuluma kombuhe pre fermentacije);

- Uzorak 1₃₇, uzorak 1₄₂ – pH=5,8;
- Uzorak 2₃₇, uzorak 2₄₂ – pH=5,4;
- Uzorak 3₃₇, uzorak 3₄₂ – pH=5,1;
- Uzorak 4₃₇, uzorak 4₄₂ – pH=4,8;
- Uzorak 5₃₇, uzorak 5₄₂ – pH=4,6.

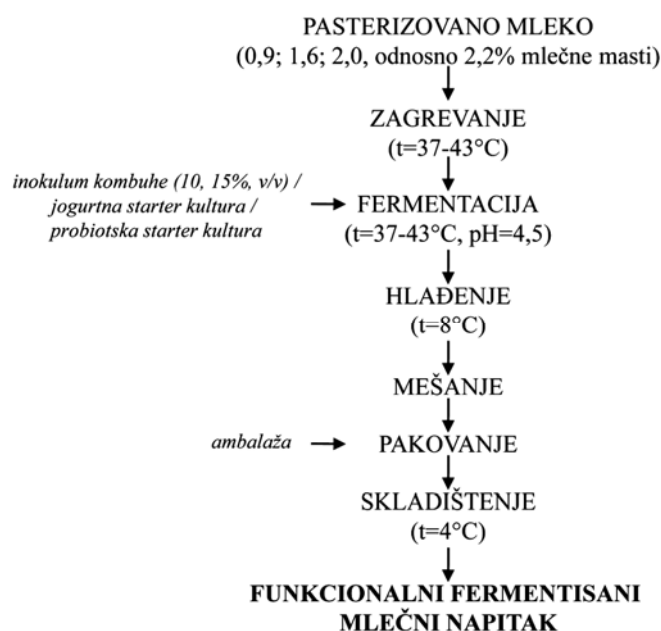
Proizvodnja fermentisanog mlečnog napitka izvršena je u 3 ponavljanja.

U cilju poređenja proizvedeni su uzorci fermentacijom mleka klasičnom jogurtnom kulturom (J) i probiotskom kulturom (P) pod istim uslovima kao i sa kombuhom na 42°C. Komercijalni starteri dodati su u količini od 0,05 g/L prema proizvođačkoj specifikaciji.

IV eksperiment

U četvrtom eksperimentu analizirana je kinetika fermentacije saharoze kombuhom. Kombuha je kultivisana na crnom čaju (1,5 g/L) sa saharozom koncentracije 66,47 g/L. U čaj ohlađen na sobnu temperaturu dodato je 10% v/v odnosno 15% v/v inokuluma kombuhe iz prethodne fermentacije. Inkubacija je vršena na dve različite temperature: 22°C i 30°C, 10 dana. Uzorci su analizirani nakon 0, 3, 4, 5, 6, 7, i 10 dana.

Generalna šema tehnološkog procesa proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka data je na slici 34.



Slika 34. Tehnološki proces proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka.

ANALIZE

Fizičko–hemijski kvalitet mleka i fermentisanih mlečnih napitaka

Analiza fizičko–hemijskog kvaliteta mleka korišćenog za proizvodnju varijanti fermentisanog mlečnog napitka, uzoraka tokom fermentacije pri definisanim pH vrednostima kao i fermentisanog mlečnog napitka izvršena je primenom standardnih metoda analize:

- pH vrednost – merena je korišćenjem laboratorijskog pH metra (VARIO pH SET, Nemačka);
- Suva materija (SM) – sadržaj suve materije određen je direktnom metodom sušenja na temperaturi $102 \pm 1^\circ\text{C}$ (IDF/ISO 21A:1982);
- Mlečna mast (MM) – sadržaj mlečne masti određen je metodom po Gerberu (IDF 105:1985);
- Ukupni proteini (UP) – sadržaj proteina određen je metodom po Kjeldahl-u (IDF 20:1962);
- Pepeo (Pe) – sadržaj pepela određen je metodom žarenja na temperaturi 550°C (IDF 90:1979);
- Sinerezis surutke (mL) – određen je nakon 3 h filtracije 50 g uzorka na sobnoj temperaturi (Atamer i sar., 1996);
- Sposobnost vezivanja vode (SVV) – količina surutke (%) izdvojene nakon centrifugiranja 20 g uzorka 30 minuta na sobnoj temperaturi (Guzman–Gonzales i sar., 1999):

$$\text{SVV} = (20 - \text{Mis}) / 20 (\%)$$

Mis – masa izdvojene surutke (g).

Određivanje šećera

Sadržaj laktoze, D-galaktoze, D-fruktoze i D-glukoze određen je korišćenjem enzimskih testova proizvođača Megazyme, Irska (Bergmeyer, 1988):

- Laktoza – enzimski test K-LACGAR 12/05;
- D-galaktoza – enzimski test K-LACGAR 12/05;
- D-fruktoza – enzimski test K-FRUGL 11/05;
- D-glukoza – enzimski test K-FRUGL 11/05.

Sadržaj proizvoda enzimske reakcije meren je spektrofotometrijski na spektrofotometru tip T 80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd, Engleska).

Masne kiseline

Mast je ekstrahovana iz uzoraka (4 mL) dodavanjem metanola (4 mL) i hloroforma (4 mL). Smeša je energično mućkana 1 minut, a zatim centrifugirana 10 minuta. Donja faza koja sadrži lipidnu frakciju je izolovana i evaporisana do suva u struji azota (Havemose i sar., 2004).

Ekstrahovana mast rastvorena je u heksanu (2,4 mL). Dodat je alikvot (0,6 mL) 2 mol/L rastvora KOH u metanolu. Epruveta je zatvorena, energično mućkana 20 s, uronjena u vodeno kupatilo zagrejano na 70°C i držana jedan minut, mereno od momenta kada rastvor u epruveti počne da ključa. Nakon mućkanja u trajanju od 20 s dodato je 1,2 mL rastvora HCl u metanolu (1 mol/L) i blago promućkano. Nakon razdvajanja faza, gornja faza koja sadrži metil–estre masnih kiselina dekantovana je i 1 µL korišćen je za dalje analize (Kravić i sar., 2011).

Analiza metil–estara masnih kiselina izvedena je na gasnom hromatografu (Hewlett–Packard (HP) 5890) u kombinaciji sa HP 5971A masenim spektrometrom. Korišćena je kapilarna kolona SP–2560 (dužina x unutrašnji prečnik: 100 m x 0,25 mm; materijal: Fused Silica; debljina filma stacionarne tečne faze: 0,20 µm; SUPELCO, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Temperatura injektora bila je 230°C sa odnosom razdeljivanja 1:40, dok je gas nosač bio helijum sa konstantnim protokom od 0,58 mL/min. Početna temperatura od 100°C održavana je 5 minuta i povećavana 6°C/min do krajnje temperature od 240°C. Maseni spektrometar radio je u tehnici jonizacije elektronima sa kvadrupolnim analizatorom, temperature 180°C. Maseni spektri snimani su SCAN tehnikom, u intervalu m/z 50–400 a.m.u. Kvalitativno određivanje masnih kiselina izvedeno je na osnovu masenih spektara i retencionih vremena. Kvantitativno određivanje izvedeno je u skladu sa AOAC metodom (Official Methods of Analysis 28.067, 1984), pri čemu je za definisanje korekcionih faktora korišćen standardni rastvor smeše 37 metilestara proizvođača Supelco (37 component FAME Mix, 47885–U).

Organske kiseline

Organske kiseline (mlečna kiselina, sirćetna kiselina, jabučna kiselina i ćilibarna kiselina) određene su primenom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) po modifikovanoj metodi objavljenoj u radu Jayabalan i sar. (2007). U normalni sud od 25 mL odmereno je tačno 4 g uzorka, dodato je 5 mL bidestilovane vode a zatim je normalni sud dopunjen do crte

acetonitrilom (Mallinckrodt Baker B. V, Holandija). Nakon ručnog mućkanja i filtracije kroz membranski filter prečnika pora 0,45 μm (Econofilter, Agilent, SAD), pripremljen uzorak je injektovan u HPLC (Agilent 1100, SAD) sa petljom injektora od 20 μL , C-8 kolonom i UV-DAD detektorom. Mobilna faza bila je smeša 97% 20 mM K-dihidrogenfosfata (pH=2,4) i 3% metanola pri protoku od 1 mL/min. i temperaturi kolone 28°C. Detekcija je izvedena na 220 nm. Analize su trajale 4 minuta i ponavljene su tri puta. Organske kiseline su identifikovane na osnovu upoređivanja njihovih retencionih vremena sa standardnim rastvorima sledećih kiselina: glukonske, glukuronske, limunske, mlečne, vinske, ćilibarne, jabučne, malonske, sirćetne, oksalne i laktobionske.

Viskozitet

Viskozitet uzoraka tokom i nakon fermentacije mleka meren je pri temperaturi od 5°C korišćenjem viskozimetra High Performance HAAKE RheoStress 600HP (Karlsruhe, Nemačka) sa senzorom PP60Ti (razmak 1 mm.). Elastični (G') i viskozni (G'') modul mereni su u LVT režimu sa intervalom frekvencije 1–10 Hz, pri naponu smicanja $\tau=0,015$ Pa. Krive proticanja određene su metodom histerezisnih petlji u opsegu brzine smicanja 0–40 rpm.

Teksturalne karakteristike

Teksturalne karakteristike: čvrstoća, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta uzoraka tokom i nakon fermentacije mleka ispitane su primenom uređaja Texture Analyser TA.HD^{plus} (Micro Stable System, Engleska) na temperaturi +4°C. Sila kompresije merena je korišćenjem diska A/BE (prečnik: 35 mm, rastojanje koje prelazi disk: 30 mm, brzina: 0,001 m/s) i ekstenzionog tega čije je opterećenje 5 kg. Korišćena je opcija *Return to Start*. Aktivaciona sila bila je 10 g.

Mikrostruktura

Mikrostruktura uzoraka tokom i nakon fermentacije ispitana je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), korišćenjem elektronskog mikroskopa Joel, JSM-6460LV Scanning Electrone Microscope (Oxford, Instruments). Priprema uzorka za SEM analizu obuhvatila je: fiksiranje u 2,8% rastvoru glutraldehida, dehidrataciju u rastvoru etanola različitih

koncentracija, ekstrakciju pomoću CHCl_3 , dehidrataciju u apsolutnom etanolu tokom 24 časa, sušenje primenom uređaja (CPD 030 Critical Point Dryer, BAL–TEC, Nemačka) u toku jednog časa i prevlačenje uzorka slojem zlata (BAL–TEC, SCD 005, Sputter coater) (Kalab, 1995; Kalab i sar., 1995; Sandoval–Castilla i sar., 2004). Pripremljeni uzorci posmatrani su elektronskim mikroskopom primenom SEM tehnike pri naponu od 25 kV.

Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rezultata izvršena je primenom programskog softvera "Statistica 9" i rezultati su izraženi kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta sa standardnom devijacijom.

Faktorijalna analiza varijanse ANOVA za poređenje nekoliko prosečnih vrednosti primenjena je za određivanje razlika između teksturalnih karakteristika kao i komponenata različitih uzoraka. Izračunat je uticaj sledećih faktora i njihovih interakcija: Temperatura; Vrsta čaja; Dan skladištenja; Temperatura*Vrsta čaja; Vrsta čaja*Dan skladištenja; Temperatura*Dan skladištenja; Temperatura*Vrsta čaja*Dan skladištenja.

T test je primenjen za određivanje razlika između teksturalnih svojstava i viskoziteta ($P < 0,05$). Takođe je određena i jednačina regresije sa koeficijentom korelacije. Modelovanje teksturalnih karakteristika u zavisnosti od elastičnog modula G' i tačke fermentacije izvedeno je upotrebom programskog softvera OriginPro 8.5.1 (kriging korelacija).

Četiri parametra koja definišu empirijski model kinetike fermentacije saharoze kombuhom (A_1 , A_2 , t_0 i Δt) određena su primenom Levenberg–Marquardtove metode (ORIGIN 6.1).

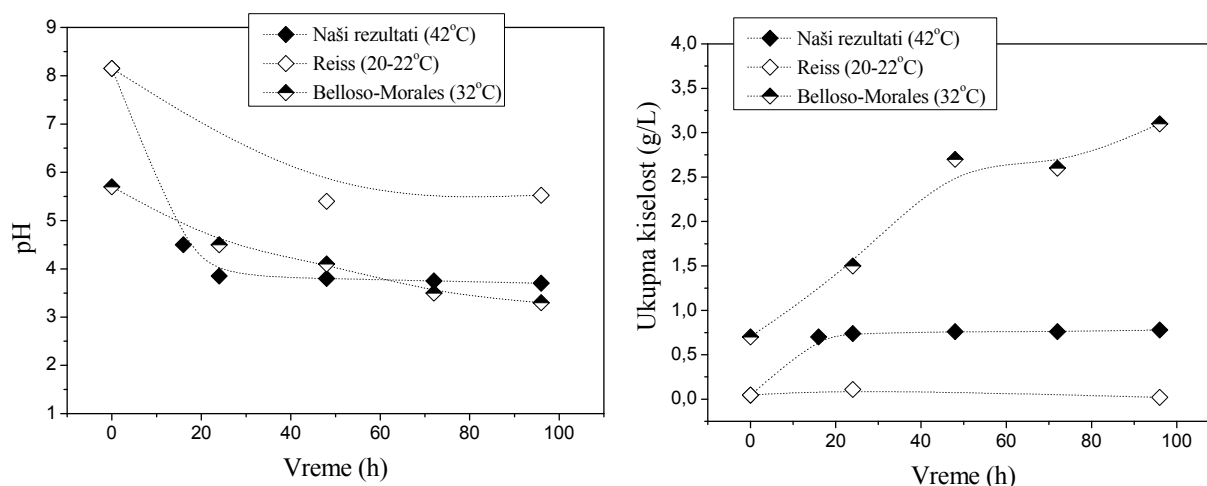
REZULTATI I DISKUSIJA

PRVI EKSPERIMENT

U cilju da se uporedi fermentacija crnog čaja zaslađenog laktozom u model sistemu i fermentacija mleka, procesi su izvedeni u oba sistema, prema planu eksperimenta datog u tabeli 13.

Fermentacija laktoze u model sistemu

Crni čaj sa 46 g/L laktoze inokulisan je sa 10% v/v inokuluma kombuhe i podvrgnut fermentaciji na 42°C (model sistem). Koncentracija laktoze odabrana je tako da odgovara količini laktoze u mleku, dok je temperatura fermentacije odabrana kao tipična za proizvodnju jogurta budući da nema literaturnih podataka o optimalnoj temperaturi za fermentaciju laktoze dejstvom kombuhe. Efikasnost fermentacije praćena je stopom smanjenja pH vrednosti i povećanjem ukupne kiselosti izražene kao sadržaj mlečne kiseline (slika 35). Fermentacija je praćena 96 sati mada je željena kiselost (pH=4,5) dostignuta posle 16 sati.



Slika 35. Promene pH vrednosti i ukupne kiselosti tokom fermentacije u model sistemu.

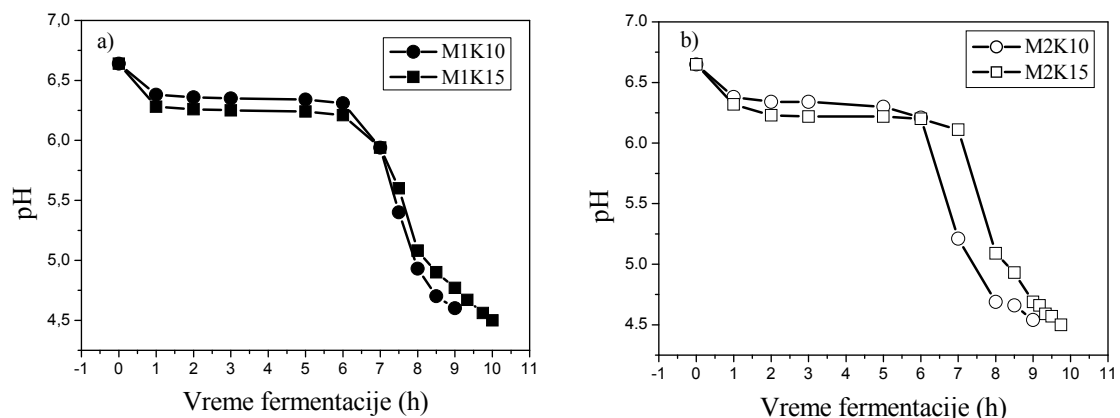
Evidentno je sa slike 35 da pH vrednost opada eksponencijalno (do pH=3,8) a odgovarajuća ukupna kiselost raste takođe eksponencijalno (do 0,79 g/L). Ova rastuća kiselost najverovatnije potiskuje metaboličku aktivnost postojećih kultura, uzrokujući slabljenje reakcije u daljim fazama fermentacije.

Rezultati eksperimenta u model sistemu komparirani su sa rezultatima koje su dobili Reiss (1994) (zeleni čaj, 50 g/L laktoze, 10% v/v inokuluma kombuhe, 20–22°C) i Beloso–Mo-

rales i Hernández–Sánchez (2003) (slatka surutka, 47 g/L laktoze, 8% w/v inokuluma kombuhe, 32°C). Pored etanola čija je količina zanemarljiva u našem i Reiss–ovom sistemu, njegovi rezultati značajno se razlikuju od rezultata prvog eksperimena naročito kad je kinetika fermentacije u pitanju. U eksperimentima Reiss–a (1994), opadanje pH vrednosti i povezano povećanje ukupne kiselosti dešavaju se sporo, uglavnom zbog znatno niže temperature fermentacije, budući da su ostali parametri (eksperimentalni uslovi) i sistemi (crni i zeleni čaj) veoma slični. Nasuprot tome, Belloso–Morales i Hernández–Sánchez (2003) ispitivali su fermentaciju slatke surutke, što je veoma različito od našeg model sistema. U početku, u istraživanjima navedenih autora pH vrednost je niska a ukupna kiselost visoka kao rezultat prethodne fermentacije. Mlečna kiselina dominira, njena količina je sedam puta veća od količine sirćetne kiseline. Nakon fermentacije dejstvom kombuhe, razlike postaju još izraženije (3 g/L mlečne kiseline prema 0,1 g/L sirćetne kiseline). Za surutku je karakterističan puferni efekat prisutnih proteina (0,67%); iako količina kiselina značajno raste, pH vrednost se menja sporo. Nakon 96 sati fermentacije slatke surutke, količina etanola je iznosila 5 g/L.

Fermentacija laktoze u mleku

Rezultati dobijeni na model sistemu sugerišu da se inokulum kombuhe može upotrebiti za fermentaciju laktoze. U sledećem koraku istraživanja, dva uzorka mleka (sa 0,9% w/w i 2,2% w/w mlečne masti), koja su sadržala 4,74% w/w i 4,54% w/w laktoze, inokulisana su kombuha kulturom i podvrgnuta fermentaciji na 42°C. Promena pH vrednosti tokom fermentacije prikazana je na slici 36.



Slika 36. Promena pH vrednosti tokom fermentacije mleka
a) mleko sa 0,9% w/w mlečne masti; b) mleko sa 2,2% w/w mlečne masti.

Oblici krivih fermentacije su veoma slični, što upućuje na zaključak da se slične pojave dešavaju u oba sistema (mleko i model sistem). Pojava lag faze evidentna je u svim uzorcima na približno $\text{pH}=6,2$ tokom prvih 6–7 sati fermentacije. Nakon toga, fermentacija postaje intenzivna u svim uzorcima sve do kraja procesa (slika 36). Fermentacija je završena ($\text{pH}=4,5$) nakon 9–10 sati.

Analiza krivih fermentacije pokazala je da koncentracija inokuluma kombuhe (10% v/v vs 15% v/v) ne utiče značajno na brzinu fermentacije u ispitivanim sistemima. Takođe, ovo istraživanje je pokazalo da inokulum kombuhe ne samo da može da se koristi za fermentaciju laktoze već i da može da se koristi niža koncentracija (10% v/v). Rezultati su u skladu sa istraživanjima fermentacije saharoze (Lončar i sar., 2006). Vreme fermentacije kod uzoraka sa 2,2% w/w masti bilo je nešto kraće (15 minuta) nego kod uzoraka sa 0,9% w/w masti. Mleko sa 2,2% w/w masti je neznatno bolji supstrat u poređenju sa mlekom sa 0,9% w/w masti. Kada se uporedi trajanje procesa fermentacije da bi se dostigao $\text{pH}=4,5$ u uzorcima sa crnim čajem i u uzorcima sa mlekom, može se zaključiti da je fermentacija brža u mleku (9–10 h) nego u model sistemu (16 h), što je i očekivano jer je mleko složeniji supstrat.

Karakteristike dobijenih fermentisanih mlečnih napitaka

Sadržaj makrokomponentata u fermentisanim mlečnim napicima

Sadržaj makrokomponentata u uzorcima proizvedenih fermentisanih mlečnih napitaka prikazan je u tabeli 14. Fermentisani mlečni napici proizvedeni iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti imaju neznatno niži sadržaj suve materije (u proseku 10,55% w/w) u poređenju sa fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti (u proseku 10,70% w/w). Takođe, uzorci proizvedeni iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti imaju niži sadržaj ukupnih proteina (u proseku 2,75% w/w) u poređenju sa uzorcima proizvedenim iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti (u proseku 2,85% w/w). U slučaju sadržaja mlečne masti, on se smanjio za približno 10% u uzorcima proizvedenim iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti odnosno za približno 5% u uzorcima proizvedenim iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti. Neznatno veći je sadržaj mineralnih materija u uzorcima proizvedenim iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti u poređenju sa uzorcima proizvedenim iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti. Na kraju procesa fermentacije, veći sadržaj laktoze ostao je u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti (u proseku 3,83% w/w) u poređenju sa fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti (u proseku 3,16% w/w). Prema tome, kombuha je is-

koristila približno 20% laktoze iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti odnosno, približno 30% laktoze iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti. Veći sadržaj mlečne masti u mleku najverovatnije doprinosi efikasnijoj fermentaciji laktoze dejstvom kombuhe.

Tabela 14. Sadržaj makrokomponentata fermentisanih mlečnih napitaka

UZORAK ^a	Sadržaj makrokomponentata (% w/w)				
	Suva materija	Mlečna mast	Ukupni proteini	Pepeo	Laktoza
M1K10	10,9±0,33	0,800±0,026	2,56±0,022	0,680±0,020	3,96±0,010
M1K15	10,2±0,27	0,800±0,019	2,93±0,010	0,570±0,020	3,70±0,020
M2K10	10,9±0,14	2,10±0,040	2,71±0,026	0,590±0,020	3,10±0,010
M2K15	10,6±0,13	2,10±0,035	2,98±0,021	0,570±0,016	3,22±0,015

a) Oznake proizvoda su u skladu sa planom eksperimenta datom u tabeli 13.

Razlike u sadržaju suve materije, ukupnih proteina i pepela između mleka sa 0,9% w/w i 2,2% w/w mlečne masti analizirane su primenom Dankanovog testa (Akhnazarova i Kafarov, 1982). Dankanov test je pokazao da se upoređivane vrednosti značajno razlikuju u većini slučajeva.

Primarni i sekundarni produkti fermentacije

Za bolje razumevanje procesa fermentacije, određen je sadržaj primarnih i sekundarnih produkata fermentacije u svim uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka (tabela 15). Glukoza i galaktoza su primarni produkti hidrolize laktoze (Tamime i Robinson, 2004). Na osnovu iskorišćenja laktoze (približno 20% i 30%, kao što je pomenuto) mogu se očekivati sledeće prosečne količine glukoze/galaktoze oslobođenih hidrolizom: 4,5 g/L u metabolitima iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti odnosno 6,9 g/L u metabolitima iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti. Analiza dobijenih količina glukoze (tabela 15) pokazala je da je približno 85% glukoze u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti i 90% glukoze u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti pretrpeo dalje transformacije. Sasvim suprotno, samo približno 25% odnosno približno 10% galaktoze reaguje dalje, respektivno. Dominantni sekundarni produkti fermentacije su mlečna kiselina zajedno sa sirćetnom kiselinom čija je količina značajno manja. Vrlo verovatno je da glukoza za-

jedno sa malom količinom galaktoze prelazi u L–mlečnu kiselinu (4,9 g/L u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti i 7,6 g/L u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti) homofermentacijom. Minimalna količina etanola je utvrđena u svim uzorcima; u opsegu od 0,08 g/L do 0,3 g/L. Razlog za malu količinu etanola može biti njegova konverzija u sirćetnu kiselinu dejstvom bakterija sirćetne kiseline roda *Acetobacter* prisutnih u kombuhi.

Tabela 15. Primarni i sekundarni produkti fermentacije mleka dodatkom inokuluma kombuhe

UZORAK ^a	Sadržaj mikrokomponentata (% w/w)			
	D–glukoza	D–galaktoza	L–mlečna kiselina	Sirćetna kiselina
M1K10	0,065±0,001	0,30±0,01	0,42±0,009	0,030±0,004
M1K15	0,060±0,001	0,35±0,008	0,56±0,007	0,046±0,005
M2K10	0,067±0,007	0,67±0,009	0,82±0,01	0,041±0,007
M2K15	0,062±0,008	0,65±0,008	0,71±0,005	0,042±0,005

a) Oznake proizvoda su u skladu sa planom eksperimenta datom u tabeli 13.

Glavna razlika između metabolita u model sistemu sa laktozom i mleka je u sadržaju kiselina. Na pH=4,5, fermentisani crni čaj sadrži 0,71 g/L ukupnih kiselina, dok fermentisano mleko sa 0,9% w/w mlečne masti ima sedam puta veći sadržaj kiselina a fermentisano mleko sa 2,2% w/w mlečne masti čak dvanaest puta. Takođe, sirćetna kiselina prevlađuje u uzorcima kombuha napitka, dok veći deo ukupnih kiselina u fermentisanim mlečnim napicima čini mlečna kiselina. Slični rezultati dobijeni su u radu Malbaša i sar. (2009a) (mleko sa 2,2% w/w mlečne masti, 46,5 g/L laktoze, 10% v/v koncentrovanog inokuluma kombuhe, na 42°C). Sadržaj ukupnih kiselina bio je 5,2 g/L, od kojih 4,5 g/L pripada mlečnoj kiselini. Sličan rezultat utvrđen je i na slatkoj surutki (Belloso–Morales i Hernández–Sánchez, 2003). Pri pH=4,5 proizvodi fermentacije slatke surutke sadržali su 1,5 g/L mlečne kiseline, ali samo 0,1 g/L sirćetne kiseline.

Fizičke i teksturalne karakteristike

Fizičke karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda prikazane su u tabeli 16. Nisu utvrđene značajnije razlike u vrednostima sinerezisa i u proseku iznose 1%. Najnižu vrednost sinerezisa (30 mL/50 mL) imao je uzorak dobijen iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti dodatkom

10% v/v inokuluma kombuhe (M2K10). Sposobnost vezivanja vode između uzoraka takođe je bila približno ista, prosečna razlika je oko 2%. Uzorci fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih iz mleka sa 0,9% w/w mlečne masti imaju nešto nižu sposobnost vezivanja vode (43,2% w/w prosečno) u odnosu na fermentisane mlečne napitke dobijene iz mleka sa 2,2% w/w mlečne masti (45,2% w/w prosečno). Na osnovu rezultata kiselosti (34,8 °SH – 37,4 °SH), može se zaključiti da su fermentisani mlečni napici proizvedeni uz primenu kombuhe manje kiseli u poređenju sa tradicionalnim fermentisanim proizvodima tipa jogurt.

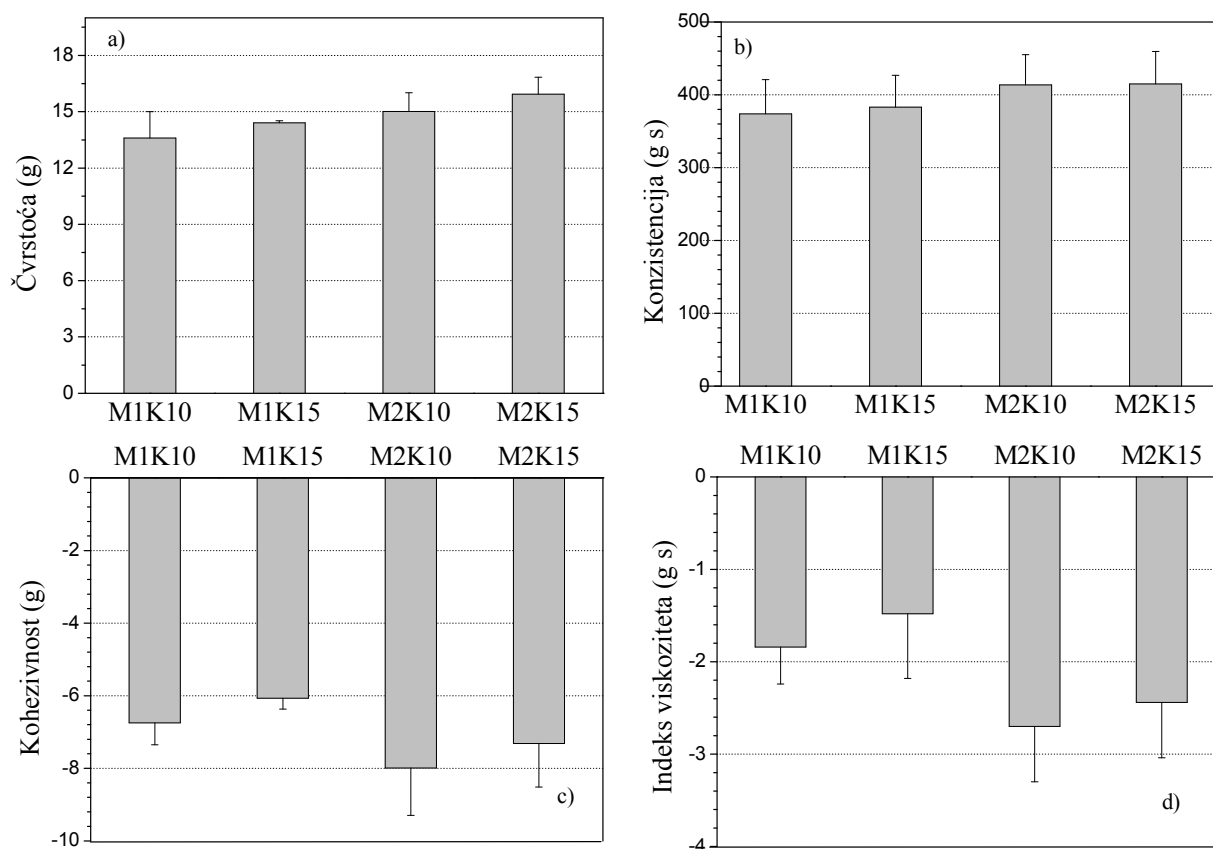
Tabela 16. Fizičke karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka

UZORAK ^a	Fizičke karakteristike		
	Sinerezis (mL/50 mL)	SVV ^b (% w/w)	Kiselost (°SH)
M1K10	32,0±1,2	45,5±1,6	37,4±1,7
M1K15	33,0±1,3	41,0±1,9	37,0±1,8
M2K10	30,0±1,0	46,0±0,92	37,2±1,7
M2K15	31,0±1,6	44,5±1,1	34,8±0,95

a) Oznake proizvoda su u skladu sa planom eksperimenta datom u tabeli 13.

b) SVV – sposobnost vezivanja vode.

Teksturalne karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka prikazane su na slici 37. Određene su sledeće karakteristike: čvrstoća, konzistencija, kohezivnost i indeks viskoziteta. Prema primenjenom metodu, kohezivnost i indeks viskoziteta izražene su kao negativne vrednosti (niža vrednost ukazuje na povoljnije svojstvo). Potpuno očekivano, uzorci M2K10 i M2K15, koji imaju veću vrednost sadržaja i mlečne masti i proteina, pokazali su bolje teksturalne karakteristike u poređenju sa uzorcima M1K10 i M1K15. Optimalnu teksturu imao je uzorak M2K10, koji ima najbolju vrednost kohezivnosti (-8 g) i indeksa viskoziteta (-2,7 g s), a konzistenciju (410 g s) jednaku kao i uzorak M2K15. Još jednom je potvrđeno da koncentracija primenjenog inokuluma kombuhe ima zanemarljiv uticaj na teksturalne karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda u poređenju sa uticajem drugih faktora kao što su sadržaj mlečne masti i proteina.



Slika 37. Teksturalne karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda
a) čvrstoća; b) konzistencija; c) kohezivnost i d) indeks viskoziteta.

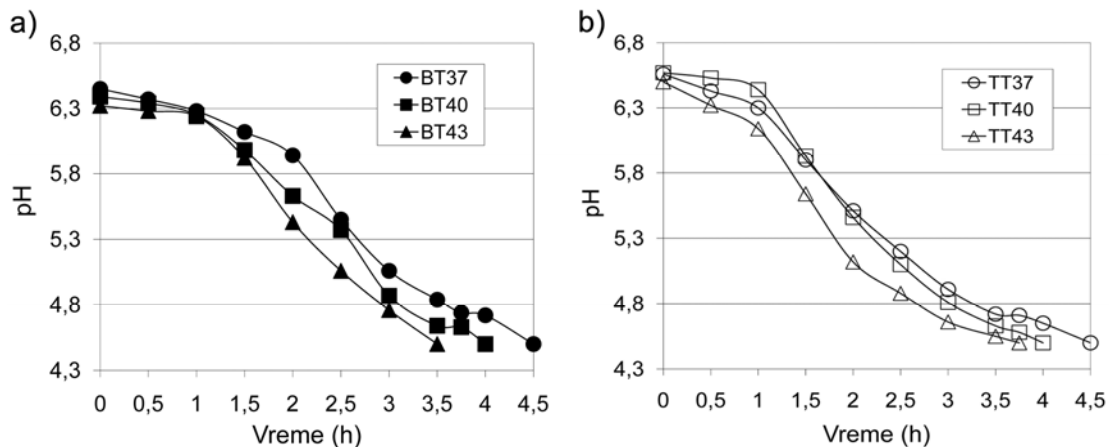
Rezultati dobijeni tokom ovog istraživanja ukazuju da se tradicionalna kombuha može upotrebiti kao starter kultura za fermentaciju laktoze u mleku bez prethodnog koncentrisanja. Dodatak 10% v/v inokuluma kombuhe je optimalna količina za fermentaciju mleka. Količina mlečne masti u mleku značajno utiče na fermentaciju i karakteristike dobijenih metabolita. Primarni produkti fermentacije prolaze dalje transformacije, glukoza mnogo brže od galaktoze, što je potvrda ranijih istraživanja fermentacije mleka običnim i koncentrisanim inokulumom kombuhe (Malbaša i sar., 2009). Glavni sekundarni produkti fermentacije su mlečna kiselina i sirćetna kiselina.

DRUGI EKSPERIMENT

U drugom eksperimentu ispitana je mogućnost ubrzanja procesa fermentacije mleka primenom inokuluma kombuhe kultivisane na supstratima crni čaj i majčina dušica, u kombinaciji sa probiotskom starter kulturom. Fermentacija je izvedena na temperaturama 37, 40 i 43°C.

Tok fermentacije i hemijski sastav

Fermentacija mleka delovanjem kombuhe i probiotske starter kulture ABT-7 trajala je od 3,5 do 4,5 h (slika 38a i b), odnosno oko 2,5–3 puta kraće u odnosu na fermentaciju mleka samo kombuhom (slika 36). Oblik fermentacione krive je sigmoidalan i veoma sličan za obe grupe uzoraka (BT – crni čaj, *Camellia sinensis* i TT – čaj od majčine dušice, *Thymus serpyllum*). Povećanje temperature fermentacije dovelo je do skraćanja vremena fermentacije. Uzorak BT43 imao je najkraće fermentaciono vreme (3,5 h) što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Duraković i sar., 2008). Takođe, rezultati ovog eksperimenta ukazuju da se inokulum kombuhe kultivisan na različitim vrstama čaja može koristiti u kombinaciji sa probiotskom starter kulturom u tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda.



Slika 38. Promena pH vrednosti tokom fermentacije mleka sa različitim starter kulturama na 37°C, 40°C i 43°C

- a) kombuha kultivisana na crnom čaju i probiotska starter kultura;
b) kombuha kultivisana na čaju od majčine dušice i probiotska starter kultura.

Hemijski sastav svih kombuha fermentisanih mlečnih proizvoda prikazan je u tabeli 17. Uzorci proizvedeni primenom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice i probiotske starter kulture imaju neznatno viši nivo suve materije i pepela nego uzorci proizvedeni primenom

kombuhe kultivisane na crnom čaju i probiotske starter kulture. Svi uzorci imaju sličan sadržaj mlečne masti i ukupnih proteina.

Tabela 17. Sadržaj makrokomponentata fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih kombinacijom starter kultura na različitim temperaturama

UZORAK	Sadržaj makrokomponentata (% w/w)			
	Suva materija	Mlečna mast	Ukupni proteini	Pepeo
BT37	10,12 ± 0,11	1,55 ± 0,03	3,03 ± 0,13	0,64 ± 0,10
BT40	10,07 ± 0,11	1,55 ± 0,03	2,92 ± 0,80	0,63 ± 0,10
BT43	9,93 ± 0,80	1,55 ± 0,02	2,88 ± 0,17	0,61 ± 0,03
TT37	10,24 ± 0,05	1,55 ± 0,02	3,03 ± 0,05	0,69 ± 0,01
TT40	10,22 ± 0,07	1,55 ± 0,04	3,01 ± 0,11	0,68 ± 0,14
TT43	10,23 ± 0,02	1,55 ± 0,02	2,85 ± 0,03	0,71 ± 0,05

Fizičke karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka

Fizičke karakteristike uzoraka fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih kombinacijom starter kultura prikazane su u tabeli 18. Uzorci proizvedeni sa kombuhom kultivisanom na crnom čaju imali su znatno bolju sposobnost vezivanja vode za $\approx 19\%$ u poređenju sa uzorcima proizvedenim sa kombuhom kultivisanom na čaju od majčine dušice. Temperatura fermentacije nema značajniji uticaj na sposobnost vezivanja vode. Kod vrednosti sinerezisa nije posebno izražena razlika u vrsti inokuluma, a takođe ni uticaj temperature. Prosečna vrednost sinerezisa za sve uzorke je oko 32 mL/50 mL. Dakle, dobijeni rezultati ukazuju da vrsta čaja za kultivaciju kombuhe ima veći uticaj na sposobnost vezivanja vode uzoraka, dok je uticaj temperature mali i na ovu osobinu i na sinerezis.

Tabela 18. Fizičke karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih kombinacijom starter kultura na različitim temperaturama

UZORAK	Fizičke karakteristike	
	Sinerezis (mL/50 mL)	SVV (% w/w)
BT37	34,00 ± 0,00	39,25 ± 0,35
BT40	32,50 ± 0,87	38,50 ± 0,71
BT43	32,20 ± 0,82	39,67 ± 1,04
TT37	31,50 ± 1,26	30,50 ± 1,02
TT40	31,75 ± 1,06	32,75 ± 0,35
TT43	33,00 ± 0,06	32,00 ± 1,52

a) SVV – sposobnost vezivanja vode.

Uticaj temperature, vrste čaja i perioda skladištenja na kvalitet proizvoda

Analiza uticaja temperature fermentacije i vrste čaja za kultivaciju kombuhe na sadržaj laktoze, galaktoze i L–mlečne kiseline pokazala je da temperatura ima značajan uticaj na sadržaj L–mlečne kiseline (tabela 19). Takođe, vrsta čaja za kultivaciju kombuhe ima značajan uticaj na sadržaj laktoze i L–mlečne kiseline, a interakcija faktora Temperatura*Vrsta čaja ima značajan uticaj samo na sadržaj L–mlečne kiseline (slika 39).

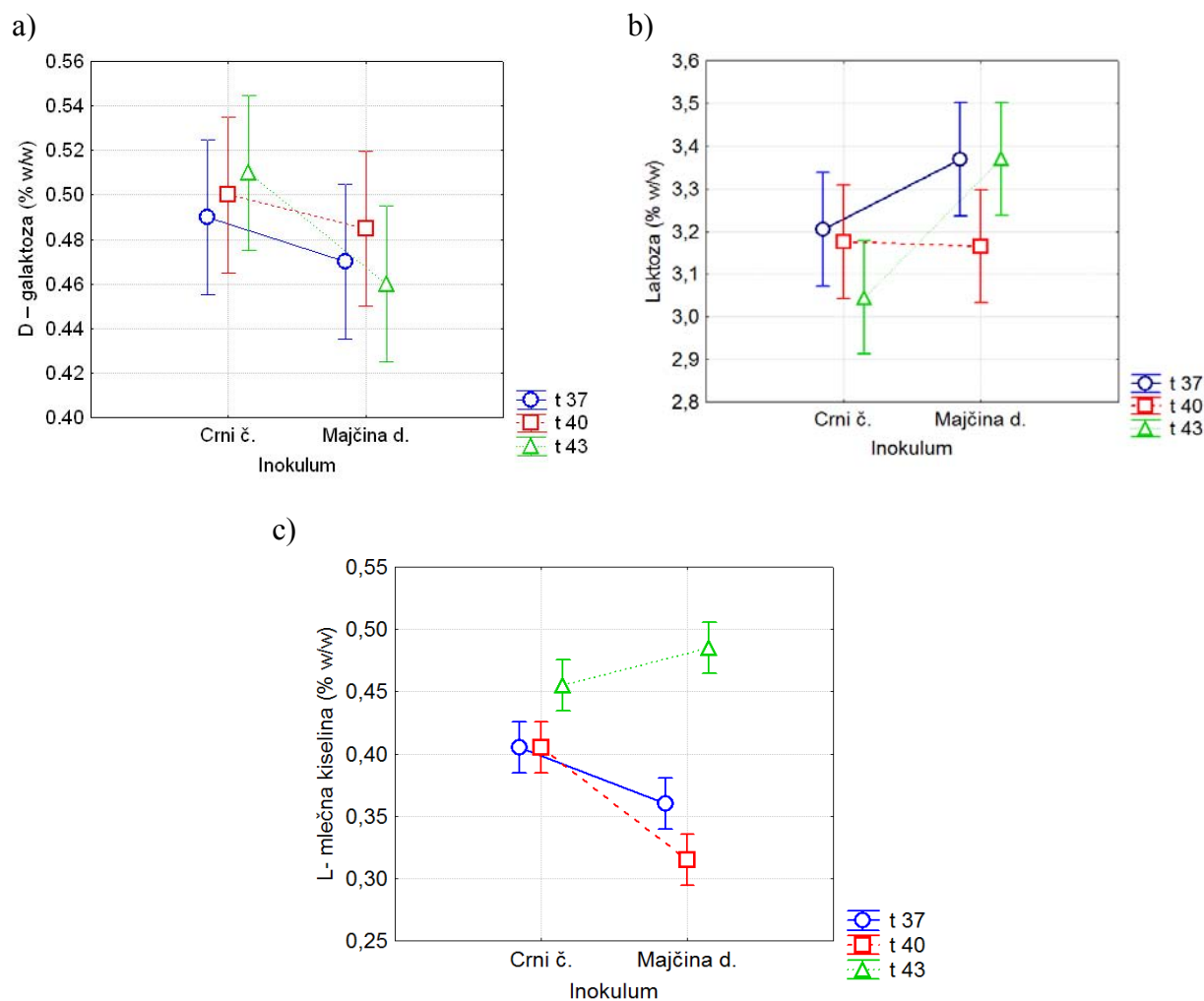
Tabela 19. Uticaj temperature i vrste čaja na sadržaj laktoze, galaktoze i L–mlečne kiseline

Parametar	Laktoza			D–galaktoza			L–mlečna kiselina		
	DF	MS	P	DF	MS	P	DF	MS	P
Temperatura	2	0,0142	0,1624	2	0,0002	0,6726	2	0,0135	0,0001*
Vrsta čaja	1	0,0763	0,0128*	1	0,0024	0,0508	1	0,0037	0,0031*
Temperatura*Vrsta čaja	2	0,0281	0,0586	2	0,0004	0,4397	2	0,0037	0,0018*

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

MS – mean of square / sredina kvadrata;

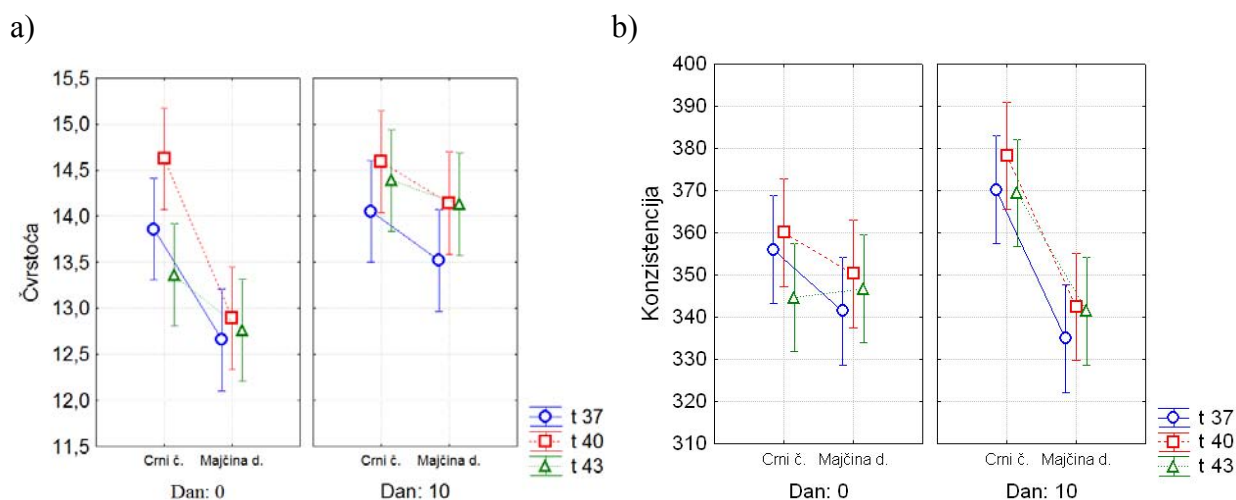
p = p vrednost, *p<0,05.



Slika 39. Uticaj temperature i vrste čaja na proizvode fermentacije dejstvom kombuhe: a) D–galaktoza; b) laktoza; c) L–mlečna kiselina.

Vrsta čaja i temperatura fermentacije mleka imaju značajan uticaj na čvrstoću proizvedenih uzoraka fermentisanih mlečnih napitaka (slika 40a). Takođe, veoma važan uticaj na čvrstoću ima dan skladištenja, naročito na uzorke kod kojih je fermentacija izvedena na 43°C, što je u skladu sa predhodno objavljenim rezultatima (Iličić i sar., 2010). Rezultati su pokazali da interakcija faktora Vrsta čaja*Dan skladištenja ima značajan uticaj na čvrstoću fermentisanih mlečnih napitaka. Uzorci proizvedeni sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice imali su manju čvrstoću nakon proizvodnje i nakon deset dana skladištenja na svim temperaturama proizvodnje (37°C, 40°C i 43°C) u poređenju sa uzorcima proizvedenim sa inokulumom kombuhe kultivisane na crnom čaju. Statistička analiza konzistencije pokazala je značajan uticaj vrste čaja (tabela 20). U slučaju uzoraka sa inokulumom kombuhe kultivisane na crnom čaju, vrednosti konzistencije značajno rastu tokom skladištenja uzorka BT43. Uzorci proizvedeni sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice nisu pokazali

značajne promene u konzistenciji tokom skladištenja (slika 40b). Interakcija faktora Temperatura*Dan skladištenja ima značajan uticaj na konzistenciju.



Slika 40. Uticaj vrste čaja i dana skladištenja na a) čvrstoću fermentisanih mlečnih napitaka i b) konzistenciju fermentisanih mlečnih napitaka.

Tabela 20. Uticaj različitih faktora na čvrstoću i konzistenciju fermentisanih mlečnih napitaka

Faktor	Čvrstoća			Konzistencija		
	DF	MS	P	DF	MS	P
Temperatura	2	0,630	0,028*	2	136	0,178
Vrsta čaja	1	3,791	0,000*	1	2457	0,000*
Dan skladištenja	1	3,621	0,000*	1	235	0,089
Temperatura* Vrsta čaja	2	0,228	0,211	2	82	0,334
Vrsta čaja* Dan skladištenja	1	0,874	0,023*	1	983	0,003*
Temperatura* Dan skladištenja	2	0,268	0,167	2	19	0,756
Temperatura* Vrsta čaja* Dan skladištenja	2	0,113	0,437	2	11	0,850

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

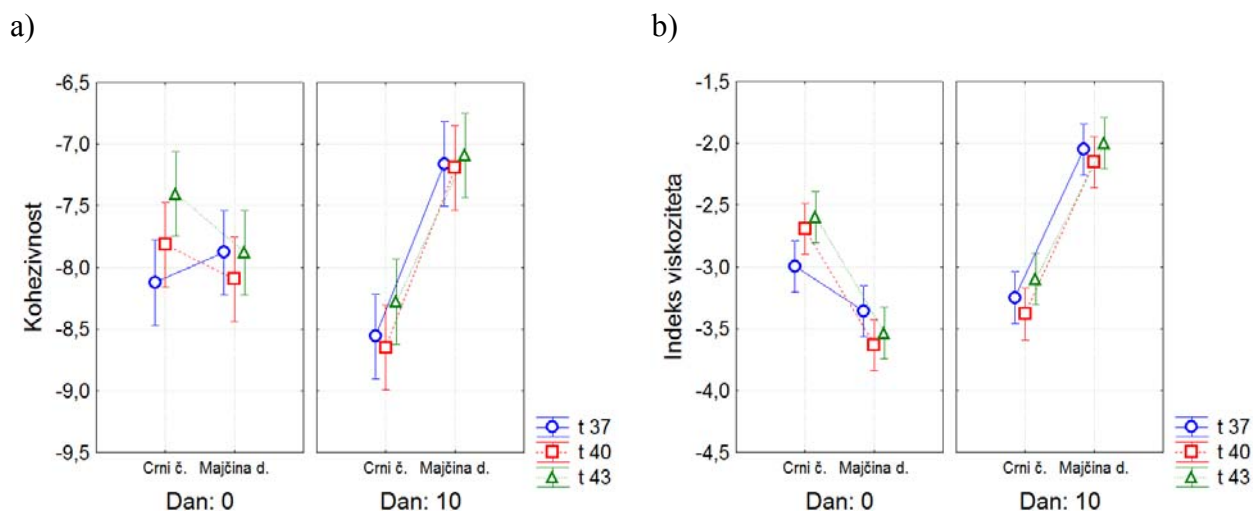
MS – mean of square / sredina kvadrata;

p = p vrednost, *p<0,05.

Utvrđen je značajan uticaj vrste čaja na kohezivnost uzoraka (slika 41a). Ove razlike su naročito izražene tokom skladištenja. Naime, u svim uzorcima proizvedenim sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice kohezivnost raste tokom skladištenja. Nasuprot tome, kohezivnost uzoraka proizvedenih sa inokulumom kombuhe kultivisane na crnom čaju tokom deset dana skladištenja opada. Interakcija faktora Vrsta čaja*Dan skladištenja pokazala je veliki uticaj na kohezivnost dok faktor Dan skladištenja pojedinačno nema značajan uticaj (tabela 21).

Kao i na kohezivnost, vrsta čaj je imala značajan uticaj na indeks viskoziteta (tabela 21). Indeks viskoziteta bio je veći u uzorcima proizvedenim sa inokulumom kombuhe kultivisane na crnom čaju u poređenju sa uzorcima proizvedenim sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice. Tokom deset dana skladištenja indeks viskoziteta promenio se u korist uzoraka proizvedenih sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice (slika 41b).

Analiza teksture nakon skladištenja pokazala je značajno bolje teksturalne karakteristike uzoraka proizvedenih sa inokulumom kombuhe kultivisane na crnom čaju u poređenju sa uzorcima proizvedenim sa inokulumom kombuhe kultivisane na čaju od majčine dušice. Ovi rezultati ukazuju na pozitivan uticaj komponenata crnog čaja na teksturalne karakteristike gela fermentisanih mlečnih napitaka tokom skladištenja.



Slika 41. Uticaj vrste čaja i dana skladištenja na:
a) kohezivnost fermentisanih mlečnih napitaka;
b) indeks viskoziteta fermentisanih mlečnih napitaka.

Tabela 21. Uticaj različitih faktora na kohezivnost i indeks viskoziteta fermentisanih mlečnih napitaka

Faktor	Kohezivnost			Indeks viskoziteta		
	DF	MS	P	DF	MS	P
Temperatura	2	0,197	0,048*	2	0,052	0,097
Vrsta čaja	1	2,075	0,000*	1	0,276	0,002*
Dan skladištenja	1	0,012	0,635	1	1,384	0,000*
Temperatura* Vrsta čaja	2	0,108	0,155	2	0,065	0,062
Vrsta čaja* Dan skladištenja	1	3,449	0,000*	1	5,546	0,000*
Temperatura* Dan skladištenja	2	0,017	0,714	2	0,011	0,572
Temperatura* Vrsta čaja* Dan skladištenja	2	0,051	0,384	2	0,051	0,099

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

MS – mean of square / sredina kvadrata;

p = p vrednost, *p<0,05.

Dobijeni rezultati pokazali su da inokulum kombuhe kultivisan na crnom čaju odnosno čaju od majčine dušice u kombinaciji sa probiotskom starter kulturom dvostruko skraćuje vreme fermentacije mleka u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. Vrsta čaja upotrebljena za fermentaciju ima značajan uticaj na sposobnost vezivanja vode proizvedenih fermentisanih mlečnih napitaka, a nema na sinerezis. Različite temperature fermentacije mleka nemaju značajan uticaj na fizičko-hemijske karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka. Rezultati faktorijalne analize ANOVA pokazali su da interakcija faktora Temperatura*Vrsta čaja ima značajan uticaj na sadržaj L–mlečne kiseline.

Vrsta čaja upotrebljena za kultivaciju kombuhe značajno utiče na teksturalne karakteristike proizvedenih fermentisanih mlečnih napitaka naročito nakon deset dana skladištenja. U zavisnosti od vrste čaja čvrstoća, konzistencija i indeks viskoziteta pokazuju veće razlike među uzorcima nakon deset dana skladištenja. Dakle, na teksturalne karakteristike interakcija faktora Vrsta čaja*Dan skladištenja je od značaja.

TREĆI EKSPERIMENT

S obzirom na specifičan tip fermentacije mleka dodatkom kombuhe u trećem eksperimentu izvršena je determinacija i identifikacija produkata fermentacije laktoze i utvrđena korelacija između mikrostrukture i teksturalnih i reoloških svojstava gela tokom fermentacije mleka primenom kombuhe, jogurtne i probiotske starter kulture na dve temperature (37°C i 42°C).

Hemijski sastav mleka sa inokulumom kombuhe

Mleko korišćeno za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka imalo je pH=6,52, a nakon dodavanja 10% v/v inokuluma kombuhe kultivisane na crnom čaju pH je iznosio 6,07. Hemijski sastav mleka sa dodatim inokulumom kombuhe prikazan je u tabeli 22.

Tabela 22. Hemijski sastav mleka sa dodatim 10% v/v inokulumom kombuhe

Hemijske karakteristike (g/100 g)	37°C i 42°C
	pH=6,07
Suva materija	10,34±0,02
Mlečna mast	2,00±0,00
Ukupni proteini	3,12±0,12
Pepeo	0,69±0,69

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je kvalitet mleka u skladu sa važećim Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010).

Hemijski sastav fermentisanog mlečnog napitka

Hemijski sastav proizvedenog fermentisanog mlečnog napitka na temperaturama 37°C i 42°C prikazan je u tabeli 23.

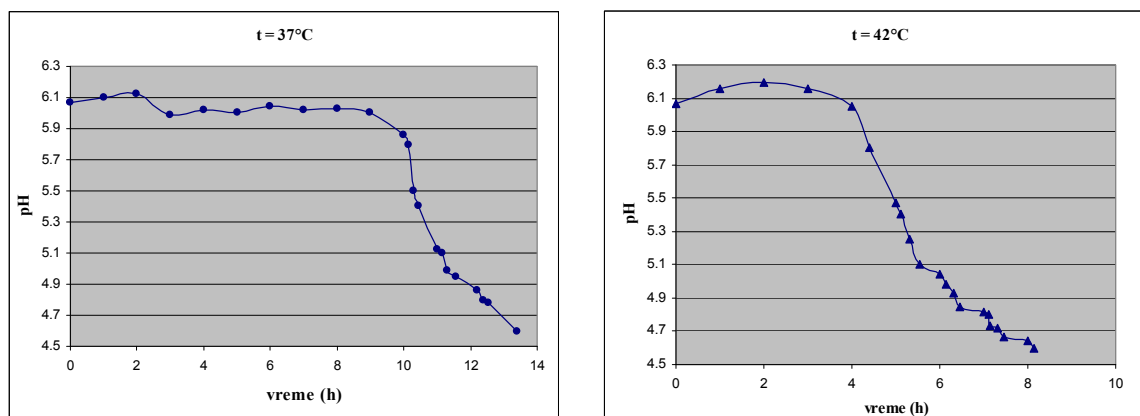
Tabela 23. Hemijski sastav fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih sa inokulumom kombuhe na različitim temperaturama

Hemijske karakteristike (g/100 g)	37°C	42°C
	pH=4,6	
Suva materija	9,98±0,24	10,34±0,03
Mlečna mast	1,98±0,00	1,98±0,00
Ukupni proteini	2,82±0,17	3,14±0,08
Pepeo	0,62±0,05	0,68±0,01

Iz rezultata prikazanih u tabeli 23 vidi se da je sadržaj suve materije, mlečne masti, ukupnih proteina i pepela fermentisanog mlečnog napitka, proizvedenog fermentacijom mleka uz dodatak 10% inokuluma kombuhe na 37°C i 42°C, neznatno manji od sadržaja pomenutih hemijskih karakteristika pre fermentacije mleka usled dodatka inokuluma kombuhe (tabela 22). Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da tokom proizvodnje fermentisanog mlečnog napitka uz primenu 10% inokuluma kombuhe ne dolazi do bitnih promena ovih hemijskih karakteristika proizvoda što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja (Iličić i sar., 2009; Vitas i sar., 2010). Takođe, dobijeni rezultati ne pokazuju značajne razlike u sadržaju suve materije, mlečne masti, ukupnih proteina i pepela između uzoraka proizvedenim na 37°C i 42°C.

Promena vrednosti pH tokom fermentacije mleka

Proces fermentacije mleka tokom proizvodnje fermentisanih mlečnih proizvoda predstavlja veoma važnu operaciju za formiranje optimalnih fizičko–hemijskih i senzornih osobina proizvoda. Promena vrednosti pH zavisi od različitih faktora: hemijskog sastava i fizičko–hemijskih svojstava mleka, vrste startera, temperature inokulacije i dr (Tamime, Robinson, 2004; Tamime, 2006). Na slici 42 prikazana je promena pH vrednosti tokom fermentacije mleka sa 2% mlečne masti na 37°C i 42°C pri proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka primenom inokuluma kombuhe.



Slika 42. Promena vrednosti pH tokom fermentacije mleka na 37°C i 42°C.

Sa grafika se uočava da fermentacija mleka (početne pH vrednosti 6,52) pomoću 10% inokuluma kombuhe (početne pH vrednosti 3,17) do postizanja pH=4,6 na 37°C traje 13h:40min a na 42°C 8h:15min. Fermentacija mleka na 42°C trajala je dakle značajno kraće (oko 5,5h) u poređenju sa fermentacijom na 37°C. Nakon devet sati od početka fermentacije na 37°C pH

vrednost počinje ubrzano da opada, skoro linearno i nakon tri sata postiže vrednost pH=4,95. Krivu fermentacije na 42°C karakteriše blagi porast pH vrednosti prva dva sata (od početne pH=6,07 do pH=6,2). Naredna dva sata pH vrednost postepeno opada. Dalji pad pH na obe temperature odvija se do postizanja krajnje vrednosti pH=4,6. Dobijeni rezultati u skladu su sa dosadašnjim ispitivanjima promene pH vrednosti tokom fermentacije mleka uz primenu kombuhe kultivisane na crnom čaju (Milanović i sar., 2002; Milanović i sar., 2008).

Promena sadržaja šećera tokom fermentacije

Tokom fermentacije mleka dodatkom 10% inokuluma kombuhe delovanjem mikroorganizama prisutnih u kulturi dolazi do snižavanja pH vrednosti kao posledica transformacije laktoze. Na početku procesa sadržaj laktoze iznosio je 4,39 g/100g i tokom fermentacije postepeno opada. Najprimetniji je pad sadržaja laktoze između prve i druge fermentacione tačke (pH=6,07 i pH=5,8) na obe temperature. Sadržaj laktoze je niži u uzorcima proizvedenim na 37°C (3,5931 g/100g) u poređenju sa uzorcima proizvedenim na 42°C (3,7483 g/100g) na kraju procesa fermentacije, tj. na pH=4,6 (tabele 24 i 25). Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da se tokom fermentacije mleka na 42°C transformiše 14,6% laktoze odnosno 18,2% na 37°C. Ovo se može objasniti dužim vremenom fermentacije na 37°C praćenom daljom razgradnjom laktoze. Prema podacima Tamime i Robinson (2004) u proizvodnji jogurta korišćenjem tradicionalne starter kulture (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) tokom homofermentacije transformiše se oko 30% laktoze što je očekivano više nego primenom inokuluma kombuhe.

Tabela 24. Promena sadržaja šećera u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim na 37°C

Sadržaj šećera (g/100g)	pH					
	6,07	5,8	5,4	5,1	4,8	4,6
Laktoza	4,3900± 0,000	3,8523± 0,0881	3,8210± 0,0478	3,7713± 00563	3,6105± 0,1006	3,5931± 0,1388
Galaktoza	0,0068± 0,0045	0,4097± 0,0534	0,3801± 0,0344	0,3947± 0,0213	0,3272± 0,0295	0,3188± 0,1863
Glukoza	0,0155± 0,0155	0,3371± 0,1384	0,2206± 0,0388	0,1948± 0,0518	0,1318± 0,0186	0,0817± 0,041
Fruktoza	0,0125± 0,0125	0,0964± 0,0145	0,0762± 0,0234	0,1043± 0,0066	0,0752± 0,0077	0,0865± 0,0057

Tabela 25. Promena sadržaja šećera u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim na 42°C

Sadržaj šećera (g/100g)	pH					
	6,07	5,8	5,4	5,1	4,8	4,6
Laktoza	4,3900± 0,000	3,9607± 0,0279	3,7910± 0,0080	3,7826± 0,0558	3,7526± 0,0652	3,7483± 0,0254
Galaktoza	0,0068± 0,0045	0,2017± 0,0075	0,2760± 0,0137	0,2793± 0,0057	0,2890± 0,0095	0,2576± 0,0040
Glukoza	0,0155± 0,0155	0,1460± 0,0030	0,1527± 0,0056	0,1536± 0,0020	0,1326± 0,0041	0,0840± 0,0093
Fruktoza	0,0125± 0,0125	0,0276± 0,0276	0,0232± 0,0034	0,0109± 0,0037	0,0129± 0,0001	0,0233± 0,0035

Sadržaj galaktoze i glukoze raste između prve i druge tačke fermentacije (pH=6,07 i pH=5,8) zbog fermentacije laktoze i njene hidrolize na glukozu i galaktozu.

Dalja promena sadržaja galaktoze i glukoze posledica je metaboličke aktivnosti starter kulture, tj. inokuluma kombuhe i u skladu je sa prethodnim istraživanjima (Iličić i sar., 2009).

Sadržaj fruktoze na pH=4,6 veći je u uzorcima proizvedenim na 42°C u poređenju sa onima proizvedenim na 37°C, što ukazuje na veći afinitet kombuhe prema fruktozi na nižoj temperaturi.

Trend promene sadržaja laktoze, galaktoze, glukoze i fruktoze tokom fermentacije mleka primenom inokuluma kombuhe na dve različite temperature (37°C i 42°C) veoma je sličan odnosno bez značajnijih razlika.

Promena sadržaja organskih kiselina tokom fermentacije

Sadržaj organskih kiselina u inokulumu je sledeći: 0,0142 g/100g mlečne kiseline; 0,2681 g/100g sirćetne kiseline; 0,1580 g/100g jabučne kiseline i 0,0232 g/100g ćilibarne kiseline. Dominantna kiselina je sirćetna kiselina što je u skladu sa istraživanjima drugih autora. U kombuha napicima proizvedenim kultivacijom kombuhe na crnom i zelenom čaju pored sirćetne kiseline identifikovane su i D–glukuronska kiselina, mlečna kiselina i limunska kiselina čija koncentracija je u funkciji vrste korišćenog čaja (Jayabalan i sar., 2007).

Produkcija organskih kiselina tokom fermentacije mleka dodatkom inokuluma kombuhe na 37 i 42°C prikazana je u tabelama 26 i 27. Koncentracija mlečne kiseline postepeno raste tokom fermentacije do dostizanja maksimalne vrednosti na kraju procesa od 0,1764 g/100g na

37°C, odnosno 0,1680 g/100g na 42°C. U poređenju sa sadržajem mlečne kiseline u jogurtu (Omae i sar., 2008) njen sadržaj u fermentisanom mlečnom napitku je četiri puta niži i u skladu je sa očekivanjima. Sadržaj sirćetne kiseline porastao je između pH 6,07 i 5,8 sa 0,0051 na 0,0158 g/100g tokom fermentacije na 42°C, dok pri ostalim pH vrednostima nije detektovan.

Tabela 26. Promena sadržaja organskih kiselina u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim na 37°C

Sadržaj organske kiseline (g/100g)	pH					
	6,07	5,8	5,4	5,1	4,8	4,6
Mlečna kiselina	0,0142± 0,0003	0,1292± 0,0003	0,1625± 0,0050	0,1655± 0,0046	0,1687± 0,0014	0,1764± 0,0031
Sirćetna kiselina	0,0051± 0,0024	nd	nd	nd	nd	nd
Jabučna kiselina	0,1815± 0,3070	0,0547± 0,0106	0,0539± 0,0158	0,0560± 0,0034	0,0508± 0,0103	0,0568± 0,0052
Čilibarna kiselina	nd	0,0178± 0,0081	0,0239± 0,0159	0,0235± 0,0073	0,0184± 0,0022	nd

nd – nije detektovano

Tabela 27. Promena sadržaja organskih kiselina u fermentisanim mlečnim napicima proizvedenim na 42°C

Sadržaj organske kiseline (g/100g)	pH					
	6,07	5,8	5,4	5,1	4,8	4,6
Mlečna kiselina	0,0142± 0,0003	0,1288± 0,0015	0,1574± 0,0006	0,1592± 0,0089	0,1596± 0,0020	0,1680± 0,0013
Sirćetna kiselina	0,0051± 0,0024	0,0158± 0,0025	nd	nd	nd	nd
Jabučna kiselina	0,1815± 0,3070	0,0633± 0,0099	0,0579± 0,0182	0,0595± 0,0032	0,0533± 0,0303	0,0555± 0,0011
Čilibarna kiselina	nd	nd	0,0212± 0,0010	0,0109± 0,0012	0,0196± 0,0021	0,0130± 0,0003

nd – nije detektovano

Sadržaj jabučne kiseline sa početne vrednosti (0,1815 g/100g) opada do pH 5,4 da bi se do kraja procesa fermentacije minimalno promenio i na kraju fermentacije iznosio 0,0568 g/100g na 37°C odnosno 0,0555 g/100g na 42°C. Maksimalnu koncentraciju čilibarna kiselina dostiže na pH 5,4 i ona iznosi na 37 i 42°C, 0,0239 g/100g i 0,0212 g/100g, respektivno.

Promena sadržaja masnih kiselina tokom fermentacije

Relativni sadržaj masnih kiselina u mleku i uzorcima tokom fermentacije na 37°C i 42°C prikazan je u tabeli 28. Sadržaj palmitinske kiseline (C16:0) u mleku i uzorcima bio je najveći u poređenju sa sadržajem ostalih masnih kiselina. U mleku je iznosio 27,31 g/100g ukupnih masnih kiselina dok je u fermentisanim mlečnim napicima na 37°C i 42°C pri pH=4,60 bio 24,69 g/100g i 25,07 g/100g, respektivno. Pored palmitinske kiseline tri masne kiseline (C18:1, C14:0 i C18:0) bile su dominantne u mleku i fermentisanim mlečnim napicima. Njihov ukupan sadržaj iznosio je u mleku 45,27 g/100g; u fermentisanom mlečnom proizvodu (pH=4,60) na 37°C i 42°C, 46,61 g/100g odnosno 49,52 g/100g, respektivno.

Nije utvrđena značajna razlika u sadržaju masnih kiselina tokom fermentacije na 37°C i 42°C. Sadržaj miristinske kiseline (C14:0) u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka proizvedenih na 37°C bio je 12,02 g/100g (pH=6,07), 12,68 g/100g (pH=5,10) i 12,37 g/100g (pH=4,60) dok je na uzorcima proizvedenim na 42°C iznosio 11,52 g/100g (pH=6,07), 11,41 g/100g (pH=5,10) i 11,57 g/100g (pH=4,60).

Prema podacima nekih istraživanja, u mlečnoj masti identifikovano je preko 437 različitih masnih kiselina (Collins i sar., 2003). Mlečna mast obično sadrži visok procenat zasićenih masnih kiselina (saturated fatty acids – SFA; 70–75 g/100g) i mononezasićenih masnih kiselina (monounsaturated fatty acids – MUFA; 20–25 g/100g) i mali procenat polinezasićenih masnih kiselina (polyunsaturated fatty acids – PUFA; 5 g/100g) (Lock i Shingfield, 2004). Dobijeni rezultati su u skladu sa tim podacima. Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke kovalentne veze ili druge funkcionalne grupe u molekulskom lancu. One formiraju ravne lance atoma, i kao rezultat toga mogu se skladištiti u organizmu, što povećava količinu energije po jedinici zapremine. Nezasićene masne kiseline su kiseline sličnog oblika, osim što postoji jedna ili više alken-skih funkcionalnih grupa unutar lanca gde svaki alken zamenjuje jednostruku ugljenikovu vezu, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, u delu lanca sa dvostrukom vezom, $-\text{CH}=\text{CH}-$. Takve dvostruke veze mogu biti formirane u *cis* ili *trans* konfiguraciji. Ove razlike u geometriji između *cis* i *trans* oblika nezasićenih masnih kiselina, te između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina igraju veoma značajnu ulogu u biološkim procesima i izgradnji bioloških struktura u ljudskom organizmu (Marenjak i sar., 2006).

Zasićene masne kiseline srednje dužine lanca (npr., C12:0, C14:0 i C16:0), koje čine veći deo zasićenih masnih kiselina u mlečnoj masti, učestvuju u povećanju ukupnog i LDL holesterola (tzv. lošeg holesterola) (Williams, 2000). Smatra se da je stearinska kiselina (C18:0) neutralna

po ovom pitanju. Mononezasićene masne kiseline i određene polinezasićene masne kiseline imaju važnu ulogu u prevenciji i lečenju kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, dijabetesa, artritisa i drugih inflamatornih i autoimunih bolesti i tumora (Shengua i sar., 2011). Generalno posmatrano, preovlađujuće mišljenje je da su mononezasićene i polinezasićene masne kiseline korisne za zdravlje ljudi. U ovim ispitivanjima mleko je pokazalo najveći sadržaj zasićenih masnih kiselina dok su fermentisani mlečni napici proizvedeni na 37°C i 42°C (pH=4,60) imali veći sadržaj mononezasićenih masnih kiselina kao i polinezasićenih masnih kiselina. Ovo povećanje sadržaja mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina može se pripisati delovanju kombuhe. Zbog toga je moguće proizvesti fermentisane mlečne napitke primenom kombuhe sa potencijalnim pozitivnim efektom na zdravlje ljudi.

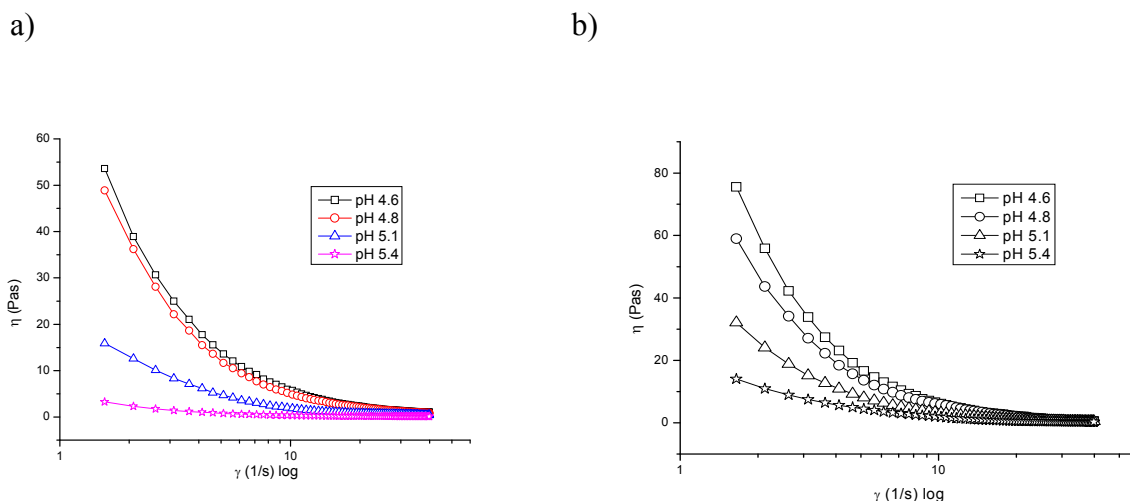
Tabela 28. Relativni sadržaj masnih kiselina (g/100g) u mleku i uzorcima tokom fermentacije na 37°C i 42°C

Relativni sadržaj masnih kiselina	Mleko	Uzorcima					
		pH=6,07		pH=5,10		pH=4,60	
		37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
C4:0	2,05±0,19	1,96±0,20	1,56±0,14	2,15±0,28	1,90±0,15	2,11±0,30	1,90±0,27
C6:0	1,81±0,13	1,57±0,17	1,23±0,17	1,51±0,19	1,31±0,09	1,54±0,21	1,29±0,16
C8:0	1,19±0,14	1,10±0,03	0,73±0,06	1,03±0,32	0,70±0,13	0,97±0,09	0,72±0,09
C10:0	3,06±0,27	2,60±0,30	2,21±0,14	2,81±0,32	2,09±0,21	2,68±0,30	2,23±0,18
C12:0	4,16±0,33	3,45±0,14	3,05±0,13	3,46±0,16	2,78±0,15	3,51±0,13	2,91±0,11
C14:0	13,95±0,33	12,02±0,43	11,52±0,36	12,68±0,41	11,41±0,21	12,37±0,17	11,57±0,41
C15:0i	0,21±0,03	0,23±0,03	0,29±0,03	0,24±0,03	0,25±0,03	0,30±0,04	0,25±0,04
C15:0a	0,54±0,07	0,54±0,07	0,60±0,07	0,53±0,02	0,54±0,07	0,60±0,04	0,50±0,05
C14:1	1,28±0,13	1,14±0,08	1,06±0,08	1,10±0,05	0,91±0,09	1,19±0,08	0,90±0,04
C15:0	2,06±0,16	2,00±0,18	2,03±0,17	2,04±0,08	1,88±0,24	2,17±0,16	1,82±0,09
C16:0i	0,39±0,04	0,40±0,04	0,52±0,07	0,40±0,04	0,45±0,05	0,49±0,06	0,41±0,06
C16:0	27,31±0,52	24,51±0,43	23,87±0,88	25,09±0,54	25,41±0,64	24,69±0,35	25,07±0,74
C17:0i	0,50±0,07	0,55±0,06	0,61±0,08	0,59±0,09	0,61±0,09	0,66±0,09	0,58±0,09
C16:1	3,32±0,22	3,53±0,25	3,52±0,23	3,59±0,10	3,20±0,25	3,72±0,20	3,34±0,16
C17:0	1,29±0,06	1,36±0,12	1,39±0,16	1,42±0,15	1,33±0,15	1,57±0,19	1,38±0,14
C17:1	0,45±0,06	0,53±0,06	0,51±0,06	0,52±0,07	0,43±0,07	0,52±0,05	0,41±0,07
C18:0	10,75±0,56	12,97±0,21	14,04±0,22	12,61±0,47	13,84±0,16	12,80±0,20	13,80±0,16
C18:1t	1,73±0,13	2,01±0,12	2,47±0,09	1,96±0,14	2,19±0,13	1,98±0,16	2,25±0,25
C18:1c	18,84±0,81	20,26±0,26	21,48±0,26	19,79±0,29	21,89±0,21	19,46±0,37	21,90±0,39
C18:2c	3,51±0,20	4,82±0,23	4,37±0,30	4,34±0,22	4,35±0,40	4,28±0,24	4,35±0,25
C20:0	0,32±0,05	0,46±0,06	0,34±0,03	0,35±0,03	0,32±0,04	0,34±0,06	0,35±0,05
C20:1	0,32±0,04	0,39±0,05	0,52±0,08	0,42±0,06	0,41±0,08	0,46±0,06	0,40±0,06
C20:2	0,95±0,12	1,58±0,12	2,09±0,27	1,38±0,19	1,81±0,18	1,59±0,16	1,66±0,25
SFA	69,60	65,74	63,99	66,91	64,81	66,81	64,78
MUFA	25,94	27,85	29,55	27,38	29,03	27,32	29,21
PUFA	4,46	6,41	6,46	5,71	6,16	5,86	6,02

SFA – saturated fatty acids / zasićene masne kiseline;
 MUFA – monounsaturated fatty acids / mononezasićene masne kiseline;
 PUFA – polyunsaturated fatty acids / polinezasićene masne kiseline;
 i – *iso* struktura (račvanje na prethodnjem C atomu);
 a – *anteizo* struktura (račvanje na prethodnjem C atomu);
 c – *cis* konfiguracija;
 t – *trans* konfiguracija

Viskozitet

Dobijeni rezultati određivanja viskoziteta ukazuju da su proizvedeni uzorci tiksotropni sistemi (slika 43). Na početnoj brzini smicanja ($1,65 \text{ s}^{-1}$) vrednosti viskoziteta bile su: 53,62 Pas (uzorak 5₃₇), 48,87 Pas (uzorak 4₃₇), 15,90 Pas (uzorak 3₃₇) i 3,235 Pas (uzorak 2₃₇) za uzorke proizvedene na 37°C odnosno 75,53 Pas (uzorak 5₄₂), 58,95 Pas (uzorak 4₄₂), 32,13 Pas (uzorak 3₄₂) i 14,07 Pas (uzorak 2₄₂) za uzorke proizvedene na 42°C. Upoređujući iste brzine smicanja evidentno je da uzorci sa nižim pH vrednostima imaju veće vrednosti viskoziteta, što je posledica umrežavanja kazeinskih micela tokom procesa fermentacije. Primetno je sniženje viskoziteta sa povećanjem napona smicanja, zbog destrukcije kazeinskih micela. Najveće smanjenje viskoziteta konstatovano je u uzorcima 5₃₇ i 5₄₂ (pH=4,6) kao posledica potpuno formiranog gela.

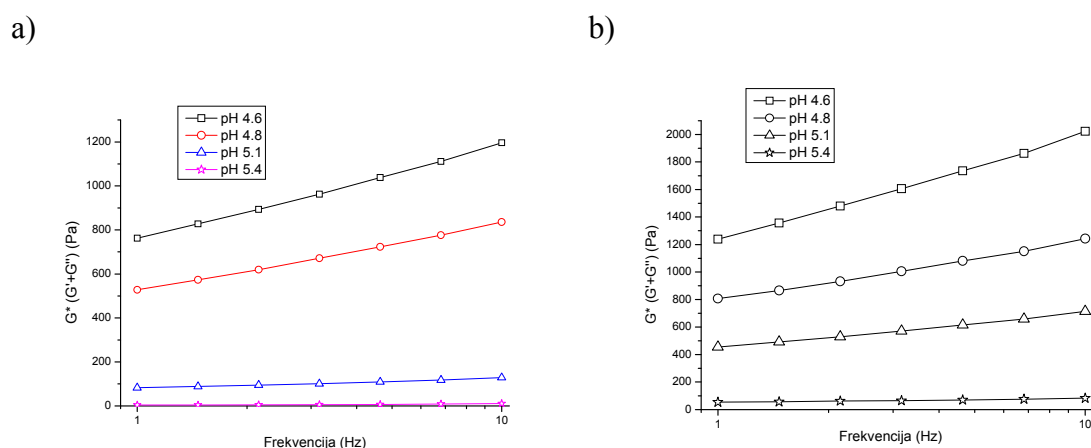


Slika 43. Promena viskoziteta tokom fermentacije mleka dejstvom inokuluma kombuhe kao funkcija brzine smicanja

a) uzorci proizvedeni na 37°C, b) uzorci proizvedeni na 42°C.

Umrežavanje kazeinskih micela povećava vrednosti elastičnog (G') i viskoznog (G'') modula tokom fermentacije, što rezultira u povećanju kompleksnog modula (G^*) (slika 44). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima (Xu i sar., 2008; Jacob i sar., 2011). Srednja vrednost $\tan \delta$ (odnos viskoznog i elastičnog modula $\tan \delta = G''/G'$) iznosile su kod uzoraka proizvedenim na 37°C: 0,2991 (uzorak 5₃₇), 0,3039 (uzorak 4₃₇), 0,2771 (uzorak 3₃₇) i 0,3993 (uzo-

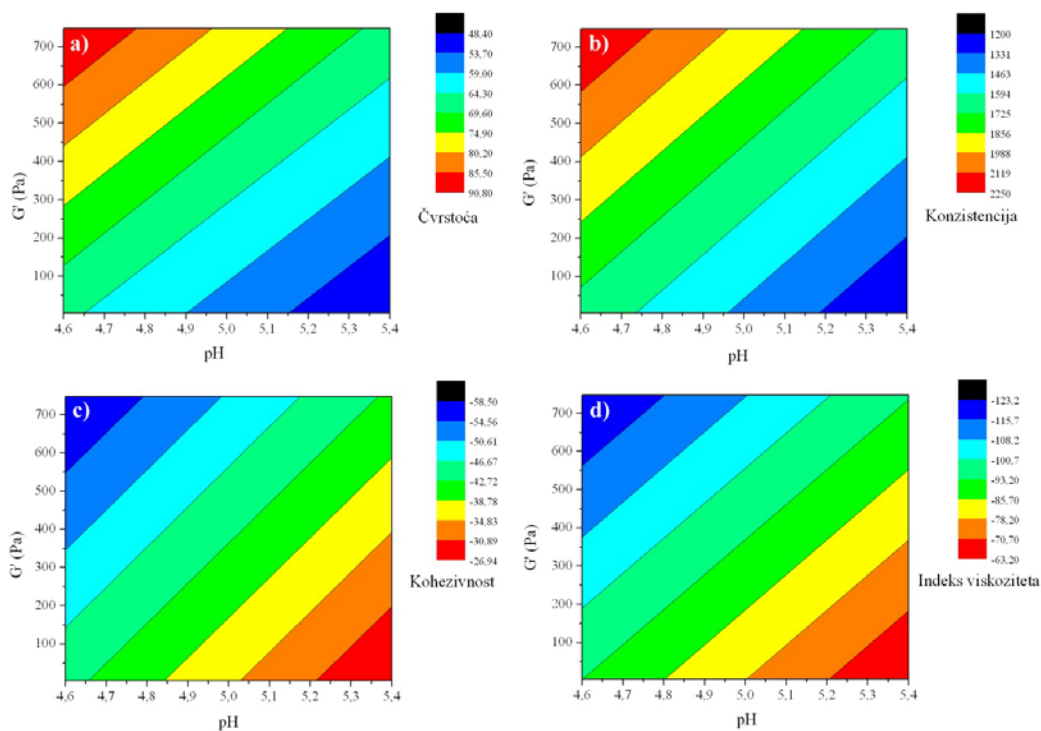
rak 2₃₇) dok su kod uzoraka proizvedenim na 42°C bile: 0,2932 (uzorak 5₄₂), 0,3004 (uzorak 4₄₂), 0,2997 (uzorak 3₄₂) i 0,2868 (uzorak 2₄₂). Dobijene vrednosti ne pokazuju statistički značajne razlike ($P < 0,05$), što ukazuje na homogen i kompaktan gel na svim pH vrednostima na obe analizirane temperature. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su najveće promene viskozi-teta i vrednosti modula (elastičnog, viskozog i kompleksnog), tokom fermentacije mleka delovanjem kombuhe, na početku procesa umrežavanja kazeinskih micela. Kako fermentacija odmiče, vrednost pH opada i promene viskozi-teta su manje izražene zbog približavanja kazeina izoelektričnoj tački.



Slika 44. Promena kompleksnog modula tokom fermentacije mleka dejstvom inokuluma kombuhe kao funkcija frekvencije
a) uzorci proizvedeni na 37°C, b) uzorci proizvedeni na 42°C.

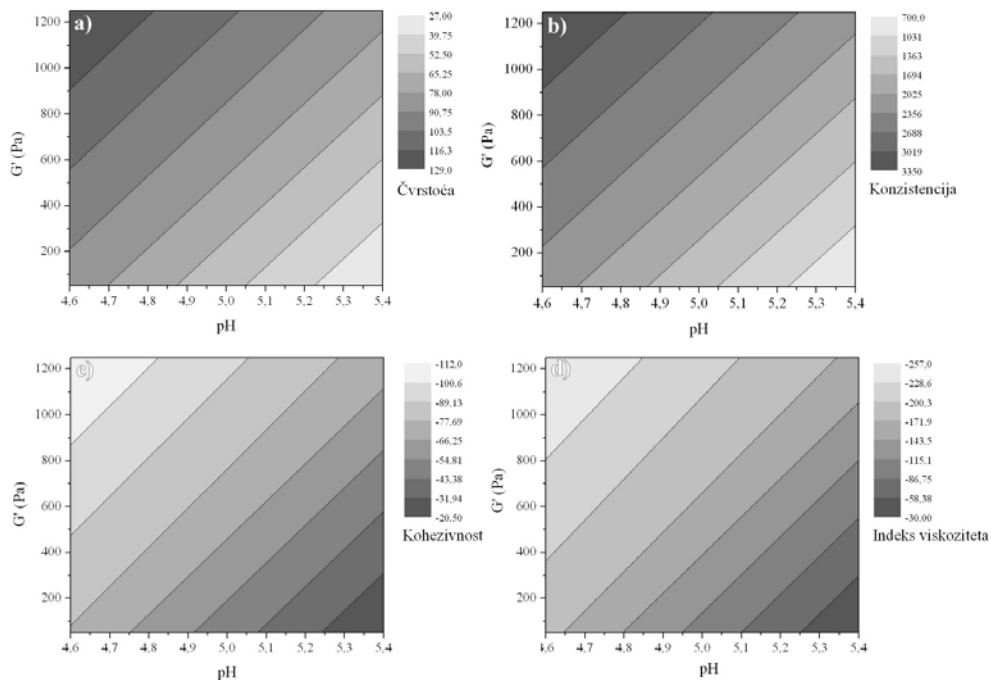
Teksturalne karakteristike

Analiza teksturalnih karakteristika uzoraka (slike 45 i 46) pokazuje smanjenje njihovih vrednosti tokom fermentacije i statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između fermentacionih tačaka, osim između pH=4,8 i 4,6, na obe temperature (37 i 42°C). Značajne razlike između pH=4,8 i 4,6 nisu utvrđene jer se iznos neistaloženog kazeina smanjuje na nulu pri pH 4,8, i kazein je u potpunosti inkorporiran u mrežu gela, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Dalglish i sar., 2005; Vasbinder i sar., 2003). Najveće promene u teksturi utvrđene su između pH=5,4 i 5,1, što je u skladu sa vrednostima viskozi-teta. Promene elastičnog modula G' uzoraka su u korelaciji sa vrednostima njihovih teksturalnih svojstava. Ova korelacija je linearna i jasno uočljiva na slikama 45 i 46.



Slika 45. Teksturalne karakteristike i elastični modul (G') uzoraka proizvedenim na 37°C kao funkcija pH vrednosti:

a) čvrstoća, b) konzistencija, c) kohezivnost i d) indeks viskoziteta.

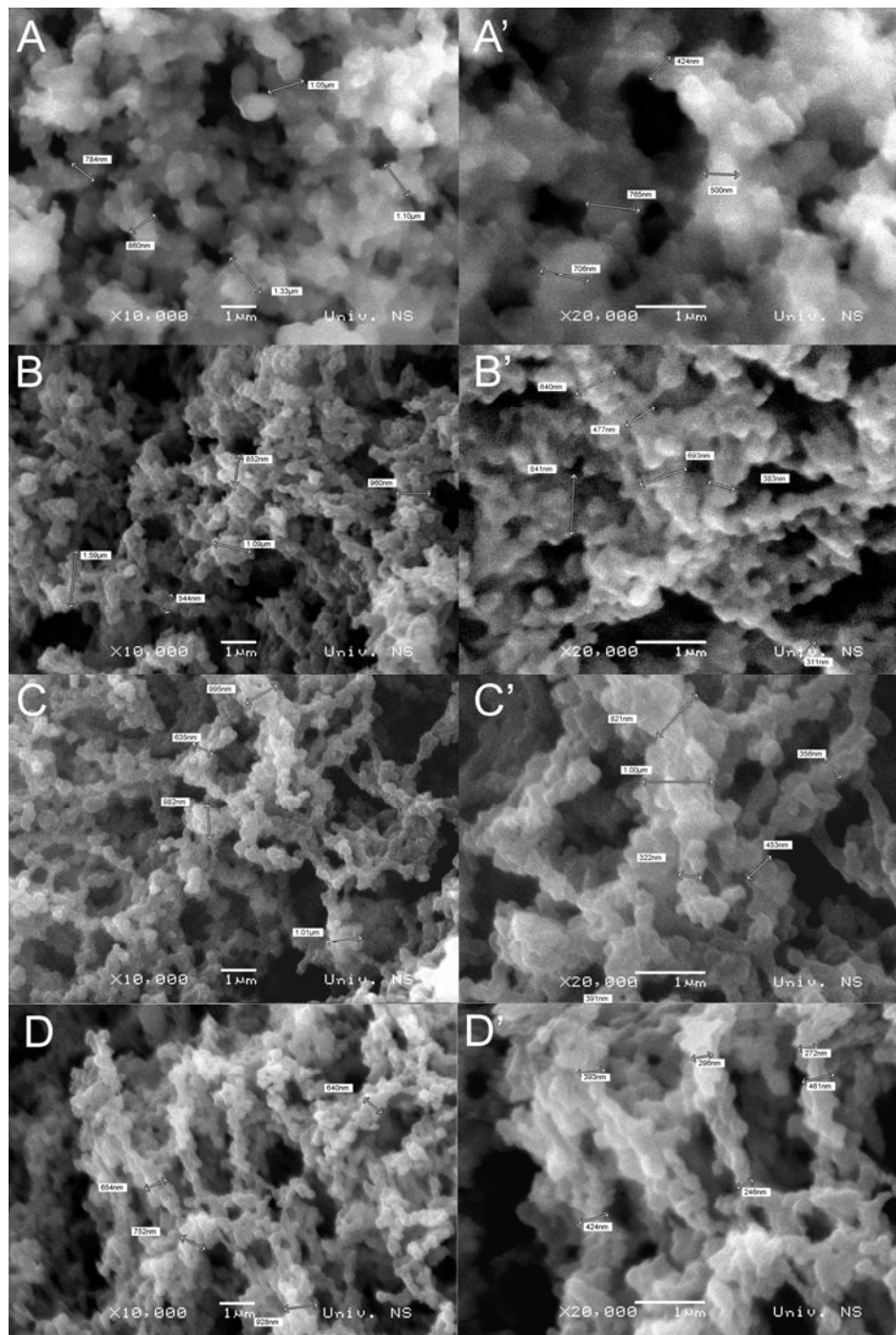


Slika 46. Teksturalne karakteristike i elastični modul (G') uzoraka proizvedenim na 42°C kao funkcija pH vrednosti:

a) čvrstoća, b) konzistencija, c) kohezivnost i d) indeks viskoziteta.

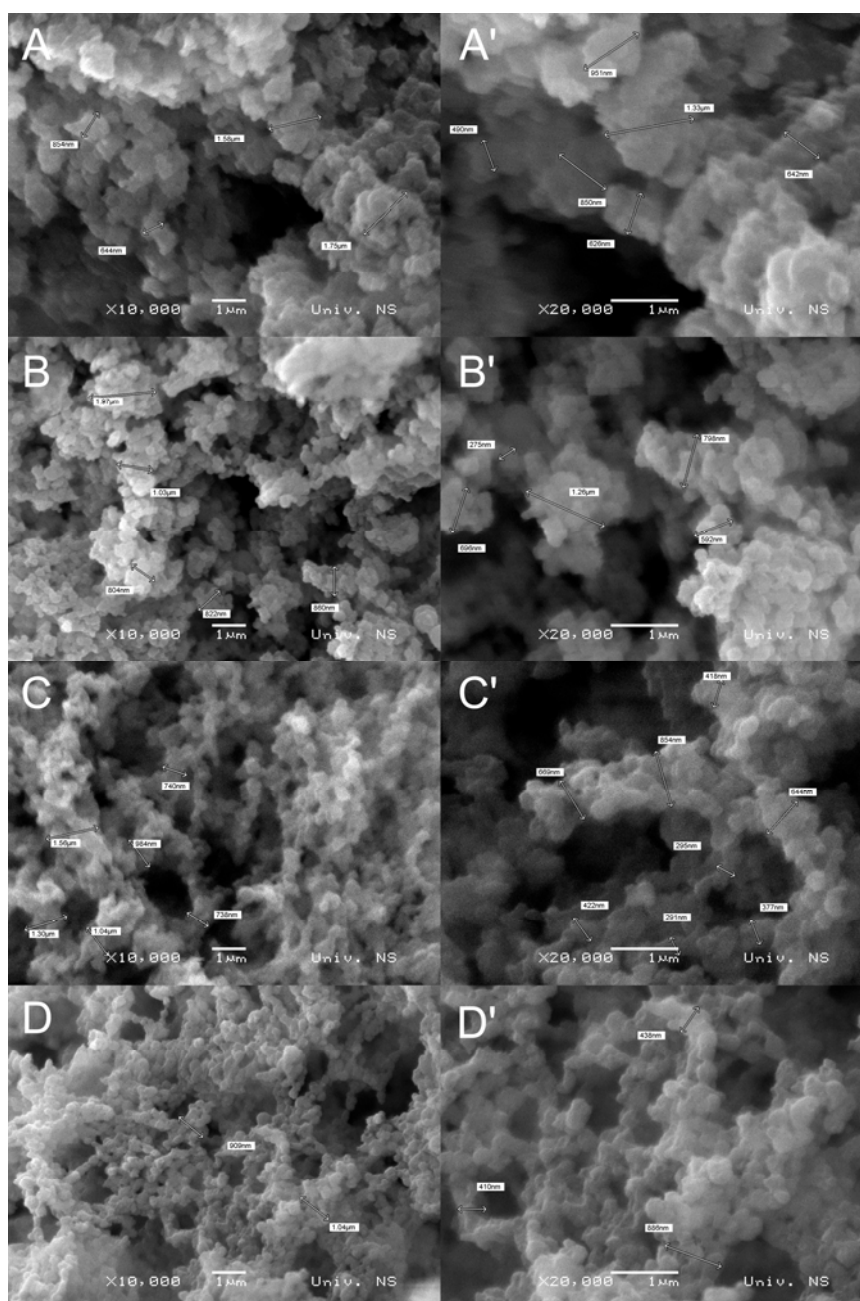
Mikrostruktura

Analiza mikrostrukture uzoraka (slike 47 i 48) pokazuje značajne razlike u strukturi gela tokom procesa fermentacije. Tokom fermentacije, pad vrednosti pH i destabilizacija κ -kazeina dovodi do agregacije kazeinskih micela koje formiraju klasterne. Pri vrednosti pH=5,4 kazeinske micelle su jasno uočljive jer se pakuju u grube klasterne i formiraju velike pregrade. Pri vrednosti pH=5,1 grubi klasteri su još uvek vidljivi, dok kazeinske micelle formiraju manje pregrade koje su uočljivije i počinju da čine mrežu unutar klastera. Dalji tok fermentacije (pH=4,8) dovodi do formiranja mreže micela, koje su jasno vidljive kao i šupljine između njih. Pri vrednosti pH=4,6 kazeinske micelle formiraju finu mrežu unutar klastera, koji su, iako prisutni, izgubili prethodnu grubu strukturu i postali manje vidljivi. Dijametar kazeinskih micela je između 250 i 400 nm, što je u skladu sa literarnim podacima za jogurt (Dalglish i sar., 2004; Karlsson i sar., 2007; Tamime i sar., 2007). Mikrostruktura je homogena, sa pravilnim rasporedom kazeinskih micela i šupljina između njih. Iako su kazeinske micelle prisutne, gruba struktura njihovog matriksa pri višim vrednostima pH dovodi do nižih vrednosti teksturalnih karakteristika i viskoziteta. Formiranje fine micelarne mreže (sa imobilizacijom tečne faze unutar nje) poboljšava i teksturalna svojstva i viskozitet gela. Najveće promene u mikrostrukturi uočene su između pH=5,4 i 5,1, dok su te promene najmanje između pH=4,8 i 4,6, što je u korelaciji sa viskozitetom i teksturalnim karakteristikama uzoraka. Nepostojanje značajnih razlika u mikrostrukturi između vrednosti pH=4,8 i 4,6 može se objasniti formiranjem gela pre dostizanja izoelektrične tačke kazeina. Opisani trendovi tokom fermentacije veoma su slični i važe za obe temperature (37°C i 42°C).



Slika 47. Mikrostruktura uzoraka tokom fermentacije mleka delovanjem inokuluma kombuhe na 37°C

- A) pH=5,4 – 10000x, A') pH=5,4 – 20000x;
- B) pH=5,1 – 10000x, B') pH=5,1 – 20000x;
- C) pH=4,8 – 10000x, C') pH=4,8 – 20000x;
- D) pH=4,6 – 10000x, D') pH=4,6 – 20000x.

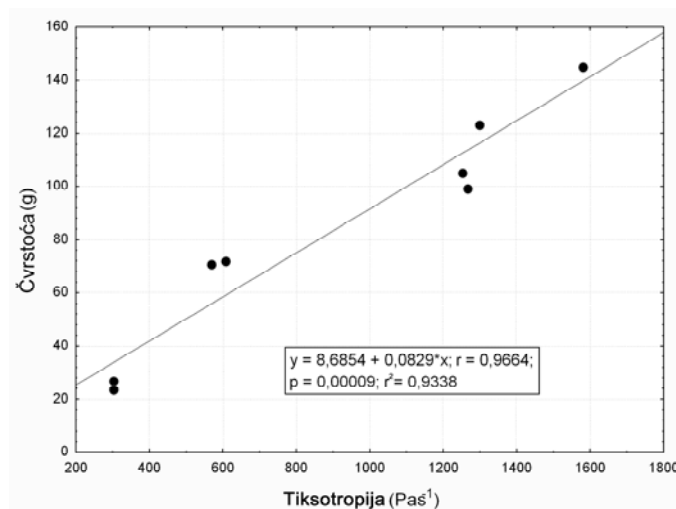


Slika 48. Mikrostruktura uzoraka tokom fermentacije mleka delovanjem inokuluma kombuhe na 42°C

- A) pH=5,4 – 10000x, A') pH=5,4 – 20000x;
 B) pH=5,1 – 10000x, B') pH=5,1 – 20000x;
 C) pH=4,8 – 10000x, C') pH=4,8 – 20000x;
 D) pH=4,6 – 10000x, D') pH=4,6 – 20000x.

Korelaciona analiza (slika 49) čvrstoće i tiksotropije pokazala je visoku korelaciju između tih parametara ($r^2=0,93$, $p=0.0001$), što je u skladu sa brojem kazeinskih micela odvojenih od grubih klastera i njihovog finog umrežavanja vidljivog na slikama 47 i 48. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su promene u mikrostrukturi u korelaciji sa promenama teksturalnih karakteristika i viskoziteta formiranog gela. Zavisnost viskoziteta i teksturalnih svojstava uzora-

ka pomoću njihove mikrostrukture može se objasniti brojem, vrstom i jačinom veza između kazeinskih micela i njihovog sastava.



Slika 49. Korelaciona i regresiona analiza čvrstoće i tiksotropije uzoraka tokom fermentacije mleka delovanjem inokuluma kombuhe na 42°C.

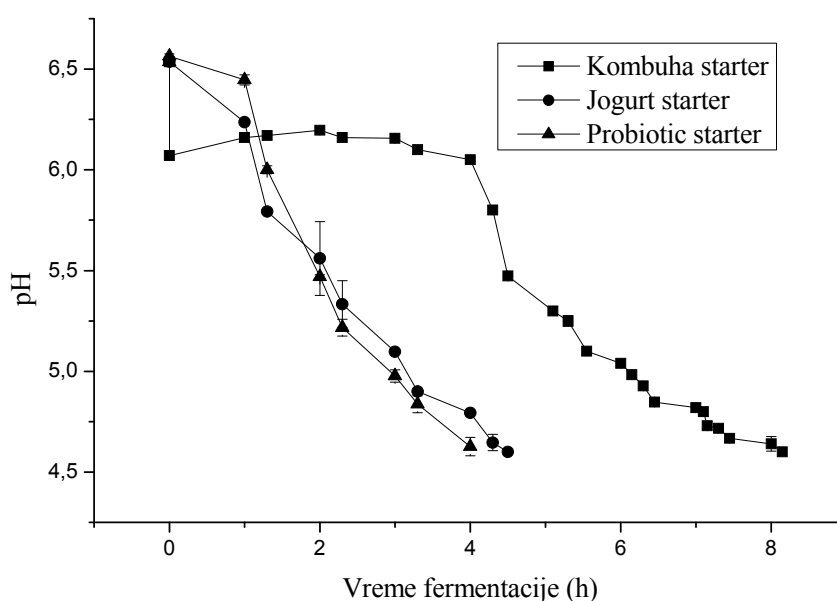
Generalno, može se reći da su glavne promene reoloških svojstava između uzoraka na različitim vrednostima pH na početku procesa geliranja kazeina i povećavaju se tokom procesa fermentacije mleka. Najznačajnije promene u teksturalnim karakteristikama i viskozitetu zabeležene su između pH=5,4 i 5,1, što je u korelaciji sa mikrostrukturom. Analiza mikrostrukture pokazala je nestajanje grube klusterske strukture i pojavu fine mreže kazeinskih micela tokom procesa fermentacije. Postoji visoka korelacija između čvrstoće i tiksotropije ($r^2=0,93$, $p=0,0001$), što je u skladu sa promenama koje se dešavaju finijim umrežavanjem kazeinskih micela. Utvrđena je i korelacija između ispitivanih svojstava i mikrostrukture gela.

Komparativno ispitivanje toka fermentacije mleka

Kriva fermentacije

Promene pH vrednosti tokom fermentacije mleka prikazane su na slici 50. Sa slike se jasno vidi da je fermentacija dva puta brža u uzorcima proizvedenim jogurtnom i probiotskom starter kulturom u poređenju sa onima dobijenim primenom inokuluma kombuhe. U prethodna dva slučaja pH brzo opada nakon inokulacije i pokazuje linearan trend opadanje do postizanja pH=4,6. U uzorku sa inokulumom kombuhe, pH opada momentalno nakon inokulacije (za 0,5 pH jedinica), zbog sirćetne kiseline prisutne u inokulumu. Naredna 4h pH vrednost gotovo se ne

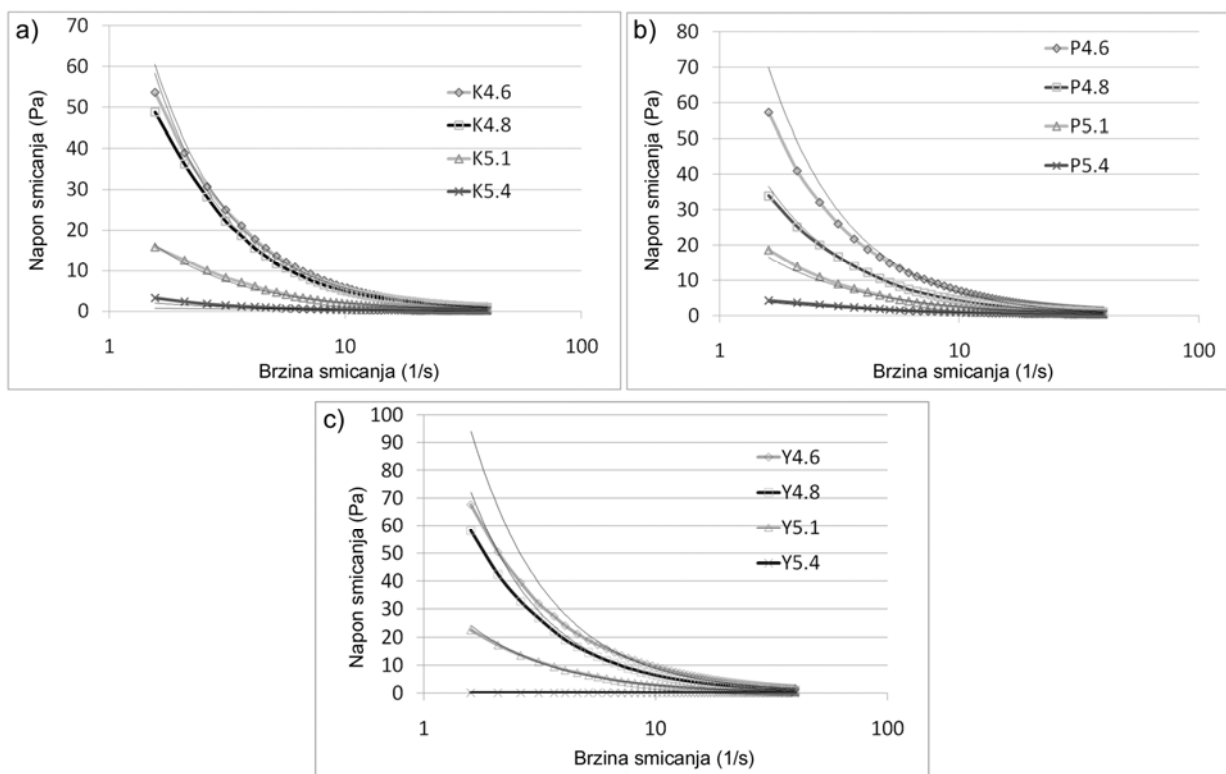
menja a zatim naglo opada u narednih 30 minuta i polako dostiže $\text{pH}=4,6$ u poslednjoj fazi procesa. Različiti oblici krive fermentacije, linearan za uzorke jogurta i probiotskog fermentisanog mlečnog napitka i sigmoidalan za kombuha uzorak, ukazuju na razlike u fiziologiji i metabolizmu primenjenih startera. Pored toga, razlikuje se i vreme pojave gela kod ova tri uzorka. Kod jogurta gel počinje da se formira pri $\text{pH}=5,39$, kod probiotskog jogurta pri $\text{pH}=5,42$ dok kod fermentisanog napitka dodatkom kombuhe najkasnije, pri $\text{pH}=5,80$. Ovi rezultati su u skladu sa publikovanim rezultatima (Malbaša i sar., 2009c; Iličić i sar., 2013). Dalja biohemijska i analitička istraživanja potrebna su za odgovarajuće objašnjenje opisanih razlika.



Slika 50. Krive fermentacije proizvedenih uzoraka.

Viskozitet

Najmanje razlike u promeni viskoziteta uzoraka (slika 51) izmerene su između $\text{pH}=4,8$ i $4,6$ što se može objasniti činjenicom da se pri $\text{pH}=4,6$ količina neprecipitovanog kazeina približava nuli, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Vasbinder i sar., 2003; Dalgleish i sar., 2005).

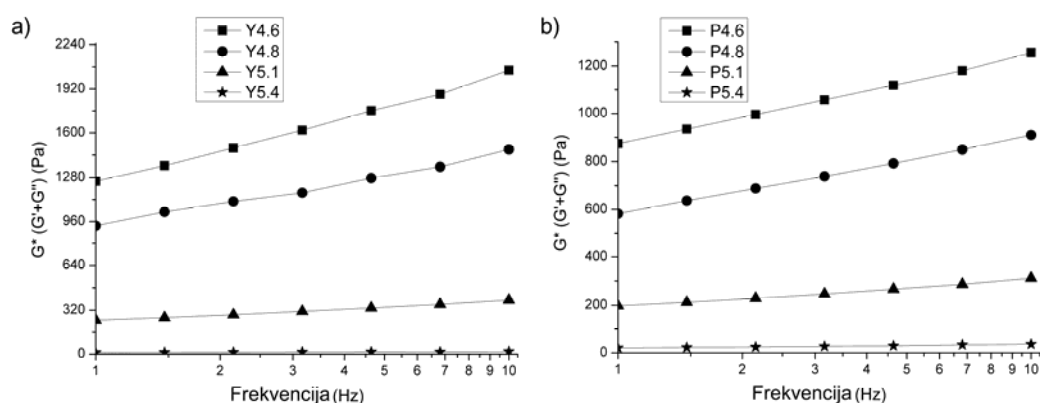


Slika 51. Viskozitet proizvedenih uzoraka različitim starter kulturama
 a) kombuha ($y_{K5,4}=3,104x^{-0,91}$, $y_{K5,1}=27,11x^{-1,13}$, $y_{K4,8}=105,70x^{-1,32}$, $y_{K4,6}=107,20x^{-1,28}$);
 b) probiotik ($y_{P5,4}=5,22x^{-0,73}$, $y_{P5,1}=26,95x^{-1,02}$, $y_{P4,8}=161,85x^{-1,15}$, $y_{P4,6}=123,20x^{-1,26}$);
 c) jogurt ($y_{J5,4}=0,05x^{-0,039}$, $y_{J5,1}=41,43x^{-1,15}$, $y_{J4,8}=134,20x^{-1,33}$, $y_{J4,6}=171,90x^{-1,29}$).

Kao se može zaključiti sa slike 51 ponašanje uzoraka proizvedenih dodatkom tri različite starter kulture sledi isti regresioni model. Ovi rezultati ukazuju da inokulum kombuhe primenjen kao starter za fermentaciju mleka ima sličan uticaj na obrazac umrežavanja kazeina kao jogurtna i probiotska starter kultura. Svi uzorci pokazuju istu regresionu liniju ($y=ax^b$) sa različitim koeficijentima (a, b) i visok koeficijent determinacije ($R^2 > 0,98$). Izuzetak je uzorak proizveden dodatkom jogurtne kulture na pH=5,4 koji ima veoma nisku vrednost viskoziteta. Jasno je vidljiva sličnost viskoziteta (koeficijent b) za uzorke proizvedene dodatkom inokuluma kombuhe i jogurtne starter kulture dok uzorci proizvedeni dodatkom probiotske starter kulture pokazuju drugačije vrednosti što je naročito izraženo kod uzorka na pH=4,8. Na početnoj brzini smicanja ($1,60 \text{ s}^{-1}$), vrednosti viskoziteta za uzorke proizvedene primenom jogurtne starter kulture bile su 67,55 Pas (pH 4,6), 58,25 Pas (pH 4,8), 22,55 (pH 5,1), 0,09 (pH 5,4) odnosno za uzorke proizvedene primenom probiotske starter kulture 57,29 Pas (pH 4,6), 33,92 Pas (pH 4,8), 18,59 (pH 5,1), 4,28 (pH 5,4). Ukoliko se poređenje vrši na istoj brzini smicanja očigledno je da uzorci

sa nižom pH vrednosti imaju više vrednosti viskoziteta, što je posledica umrežavanja kazeinskih micela tokom procesa fermentacije. Pored toga, navedeni rezultati pokazuju smanjenje viskoziteta sa povećanjem brzine smicanja kao rezultat odvajanja kazeinskih micela.

Na slici 52 prikazana je promena kompleksnog modula tokom fermentacije mleka dejstvom jogurtne i probiotske starter kulture kao funkcija frekvencije. Uzorci proizvedeni dodatkom inokuluma kombuhe (slika 44b) imaju najveće vrednosti kompleksnog modula, što ukazuje na bolje reološke karakteristike gotovog proizvoda. Uzorci dobijeni primenom probiotske i jogurtne starter kulture pokazuju veće vrednosti odnosa viskoznog i elastičnog modula ($\tan \delta = G''/G'$) u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom inokuluma kombuhe na pH=5,4 (0,34; 0,37 i 0,29 Pa, respektivno). Na istoj vrednosti pH vrednosti tiksotropije (27,98; 9,51 i 302,40 1/Pas, respektivno) ukazuju na viskozniiju strukturu i progresivniju fazu formiranja gela. Pored toga, elastični moduo (G') ima viši nagib frekvencije za uzorak dobijen primenom inokuluma kombuhe u poređenju sa uzorkom dobijenim primenom probiotske kulture na pH vrednostima: 5,1; 4,8 i 4,6, kao i sa uzorkom dobijenim primenom jogurtne kulture na pH 5,4. Iz svega navedenog može se zaključiti da se najveće promene viskoziteta i modula tokom fermentacije primenom inokuluma kombuhe dešavaju u prvim fazama umrežavanja kazeinskih micela, što je u skladu sa promenama na uzorcima proizvedenim primenom druga dva startera. Kako se proces fermentacije nastavlja, pH vrednost opada i promene viskoziteta su manje izražene zbog približavanja kazeina izoelektričnoj tački. Različit tip starter kulture indukuje različitu brzinu formiranja gela i viskozitet gotovog proizvoda.



Slika 52. Promena kompleksnog modula uzoraka tokom fermentacije mleka različitim starter kulturama kao funkcija frekvencije
a) jogurtna starter kultura; b) probiotska starter kultura.

Istraživanja nekoliko autora potvrdila su da viskozitet fermentisanih mlečnih proizvoda zavisi od vrste proteina upotrebljenog za fortifikaciju mleka. Akalin i Ünal (2010) pokazali su da fermentisani mlečni proizvod koji sadrži koncentrat proteina surutke ima niže vrednosti viskozi-teta u poređenju sa uzorkom obogaćenim obranim mlekom u prahu. Isti autori su takođe ukazali da nivo fortifikacije ima značajan uticaj na viskozitet uzoraka (Ünal i Akalin, 2013).

Teksturalne karakteristike

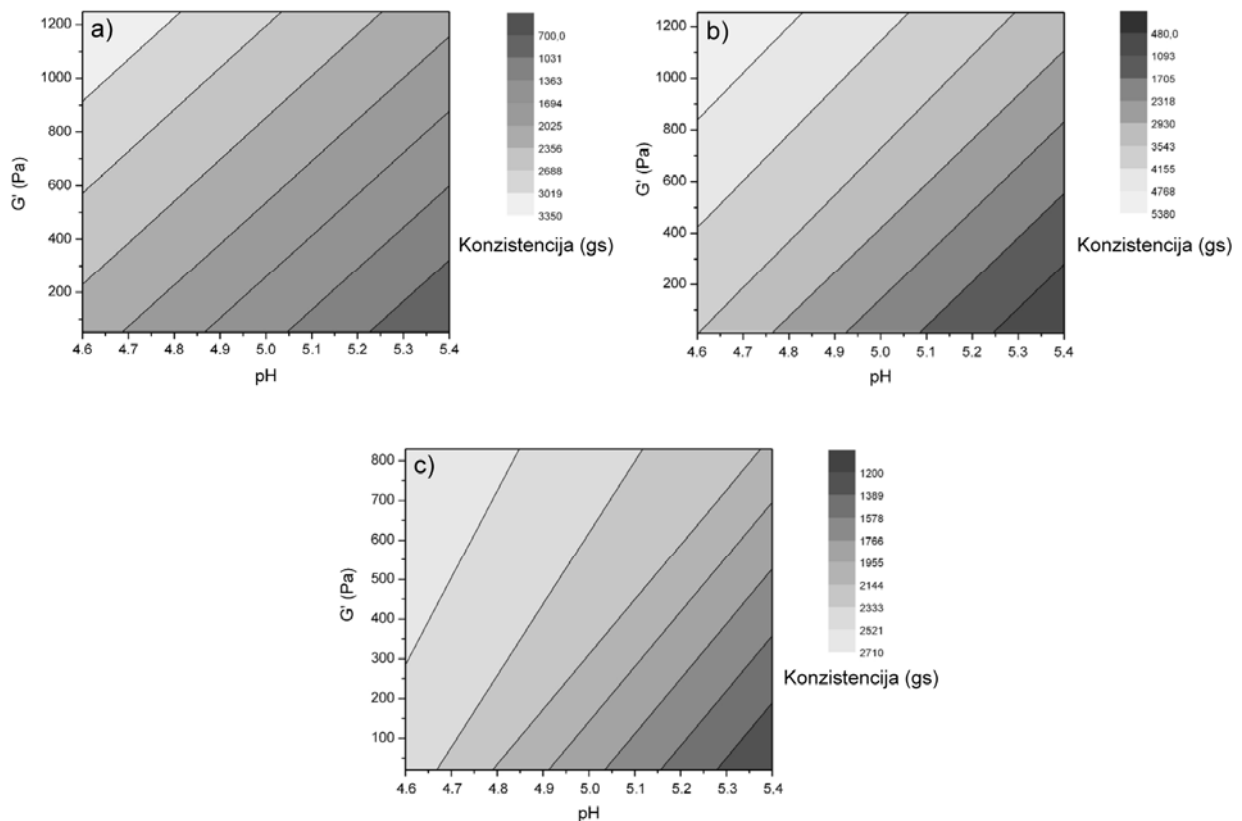
Teksturalne karakteristike uzoraka date su u tabeli 29. Najveće promene u teksturi svih uzoraka utvrđene su između pH 5,4 i 5,1 što je u saglasnosti sa analiziranim reološkim karakteristikama. Uzorak dobijen primenom jogurtne kulture na pH 5,4 ima najniže vrednosti čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i indeksa viskozi-teta što je u korelaciji sa rezultatima viskozi-teta (slika 51) i kompleksnog modula (slika 52). Na toj vrednosti pH još nije došlo do formiranja gela. Međutim, kako se fermentacija nastavila, odnos izmerenih vrednosti se promenio i na kraju procesa, na pH 4,6, pomenuti uzorak ima najveće vrednosti čvrstoće (204,01 g) i konzistencije (5377,62 gs). Uzorak dobijen primenom kombuhe na pH 4,6 ima veću vrednost konzistencije u poređenju sa uzorkom dobijenim primenom probiotske kulture, ali nižu u poređenju sa uzorkom dobijenim primenom jogurtne kulture, pri istoj pH vrednosti.

Tabela 29. Teksturalne karakteristike uzoraka dobijenih fermentacijom mleka različitim starter kulturama

	Starter	Jogurt	Probiotik	Kombuha
	pH			
Čvrstoća (g)	5,4	23,19 ± 2,01 ^b	24,08 ± 1,16 ^b	28,44 ± 2,45 ^a
	5,1	116,09 ± 10,62 ^a	103,47 ± 12,34 ^a	72,61 ± 2,38 ^b
	4,8	191,11 ± 7,71 ^a	118,47 ± 8,46 ^b	106,59 ± 8,23 ^b
	4,6	204,01 ± 1,98 ^a	123,70 ± 14,28 ^b	128,73 ± 3,45 ^b
Konzistencija (gs)	5,4	501,08 ± 46,78 ^b	533,34 ± 29,31 ^b	710,00 ± 70,24 ^a
	5,1	2756,15 ± 419,63 ^a	2384,67 ± 418,22 ^{ab}	1927,19 ± 9,88 ^b
	4,8	4843,82 ± 149,70 ^a	2730,02 ± 318,67 ^b	2692,84 ± 251,99 ^b
	4,6	5377,62 ± 89,87 ^a	2706,30 ± 111,56 ^c	3341,91 ± 319,84 ^b
Kohezivnost (g)	5,4	-11,61 ± 0,25 ^a	-12,47 ± 1,13 ^a	-20,86 ± 1,09 ^b
	5,1	-115,01 ± 11,08 ^b	-88,48 ± 13,16 ^{ab}	-65,89 ± 6,51 ^a
	4,8	-187,80 ± 6,91 ^b	-114,48 ± 7,48 ^a	-99,42 ± 6,34 ^a
	4,6	-193,26 ± 10,53 ^b	-117,91 ± 8,81 ^a	-111,63 ± 15,44 ^a
Indeks viskozi-teta (gs)	5,4	-5,47 ± 1,12 ^a	-12,17 ± 2,80 ^a	-30,69 ± 10,43 ^a
	5,1	-266,80 ± 31,15 ^a	-209,73 ± 12,55 ^a	-162,52 ± 10,55 ^a
	4,8	-386,29 ± 8,85 ^b	-268,65 ± 9,40 ^a	-239,17 ± 20,51 ^a
	4,6	-432,92 ± 33,11 ^b	-247,86 ± 37,05 ^a	-256,93 ± 10,02 ^a

abcd – Vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima pokazuju statistički značajne razlike ($p < 0,01$).

Promene vrednosti elastičnog modula (G') svih uzoraka su u korelaciji sa vrednostima konzistencije (slika 53).



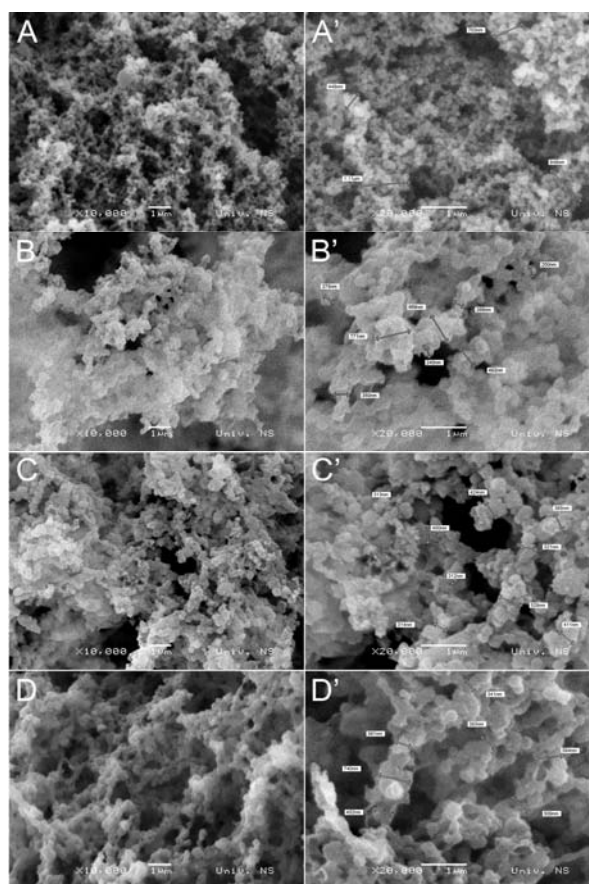
Slika 53. Korelacija G' i konzistencije uzoraka proizvedenih dodatkom različitih startera a) inokulum kombu; b) jogurtna kultura; c) probiotska kultura.

Čvrstoća proizvedenih uzoraka je manja nego u fermentisanim mlečnim proizvodima koji sadrže koncentrate proteina surutke, fruktooligosaharide i obrano mleko u prahu. Ovo se može objasniti činjenicom da čvrstoća gela zavisi od suve materije polaznog mleka kao i od sadržaja i vrste korišćenog proteina (Akalin i Ünal, 2010; Ünal i Akalin, 2013).

Mikrostruktura

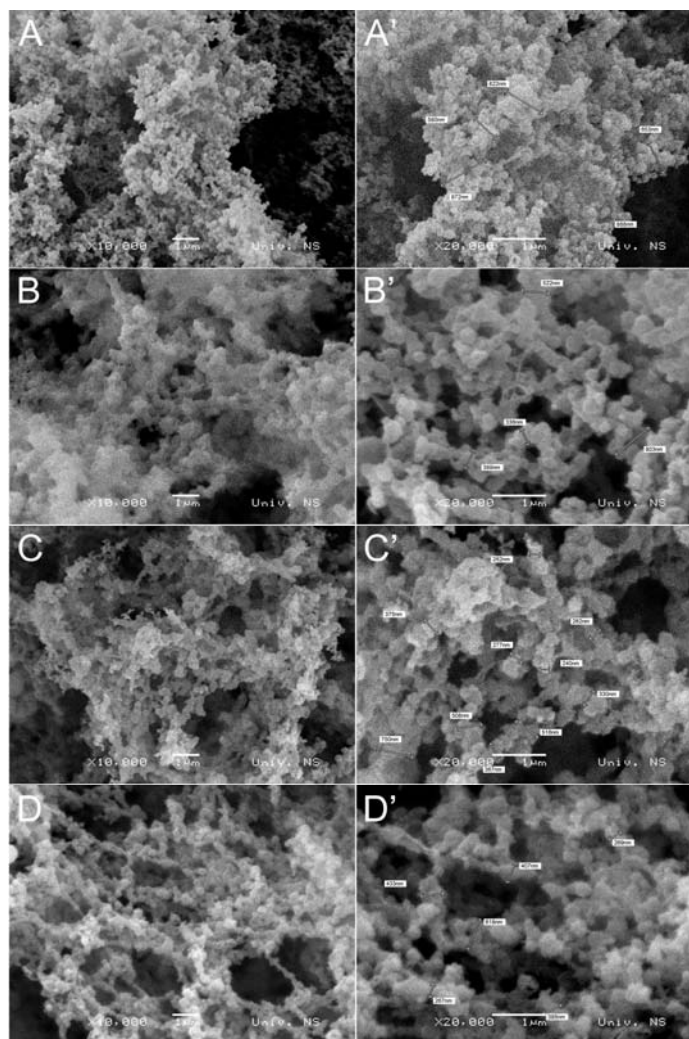
Mikrostruktura uzoraka proizvedenih primenom inokuluma kombu (K), jogurtne (J) i probiotske (P) starter kulture prikazana je na slikama 48, 54 i 55. Brojne vrednosti uz oznake odnose se na pH vrednosti tokom fermentacije. Može se jasno videti da uzorke J5,4 i P5,4

karakteriše jače izražena granularna mikrostruktura u poređenju sa uzorkom K5,4. U uzorku J5,4 kazeinske micelle nisu još precipitovane i nije počeo proces umrežavanja. Ovi rezultati su u skladu sa vrednostima viskoziteta, $\tan \delta$ i tiksotropije. U uzorku P5,4 proces formiranja gela je započet i formirani klasteri su jasno vidljivi. Proces formiranja gela u uzorku K5,4 je više napredovao, kazeinske micelle su jasno vidljive jer su u formi grubih klastera. Formirani klasteri u uzorcima J5,4 i P5,4 su zrnasti, povezani slabijim hidrofobnim vezama nego u uzorku K5,4. Na pH 5,1 proces formiranja gela je dostigao sličnu fazu u svim uzorcima i do kraja fermentacije odvija se na sličan način.



Slika 54. Mikrostruktura uzoraka proizvedenih primenom jogurtne starter kulture (A), (A') J5,4; (B), (B') J5,1; (C), (C') J4,8; (D), (D') J4,6; (A)–(D) uvećanje 10000x; (A')–(D') uvećanje 20000x.

Mikrostruktura uzoraka dobijenih primenom tri starter kulture (inokulum kombuhe, jogurtna i probiotska kultur) je manje gusta i kompaktna u poređenju sa jogurtom obogaćenim obranim mlekom u prahu, natrijum kalcijum kazeinatom, koncentratom proteina surutke ili njihovom kombinacijom (Akalin i sar., 2012).



Slika 55. Mikrostruktura uzoraka proizvedenih primenom probiotske starter kulture (A), (A') P5,4; (B), (B') P5,1; (C), (C') P4,8; (D), (D') P4,6; (A)–(D) uvećanje 10000x; (A')–(D') uvećanje 20000x.

Komparativna istraživanja pokazala su da uzorci proizvedeni delovanjem tri različite starter kulture: inokuluma kombuhe, jogurtne i probiotske kulture prate isti trend ponašanja. Svi uzorci pokazuju istu regresionu liniju, sa različitim koeficijentima i visokom vrednošću r^2 , osim uzorka proizvedenog primenom jogurtne kulture na pH 5,4. Merenja viskoziteta na pH 5,4 ukazuju na sličnosti u procesu formiranja gela između uzoraka proizvedenih primenom inokuluma kombuhe i probiotske kulture. Naime, formiranje gela počinje na višoj pH vrednosti (pH=5,6) u poređenju sa uzorkom proizvedenim primenom jogurtne kulture (pH=5,1). Najveće razlike u izmerenim reološkim parametrima uočene su u prvoj fazi umrežavanja kazeina za sva tri uzorka. Uzorak dobijen korišćenjem inokuluma kombuhe imao je najveće vrednosti kompleksnog modula što je rezultiralo boljim reološkim karakteristikama gotovog proizvoda. Najveće promene u teksturalnim karakteristikama i viskozitetu su uočene između pH 5,4 i 5,1. Ovi rezultati pokazuju

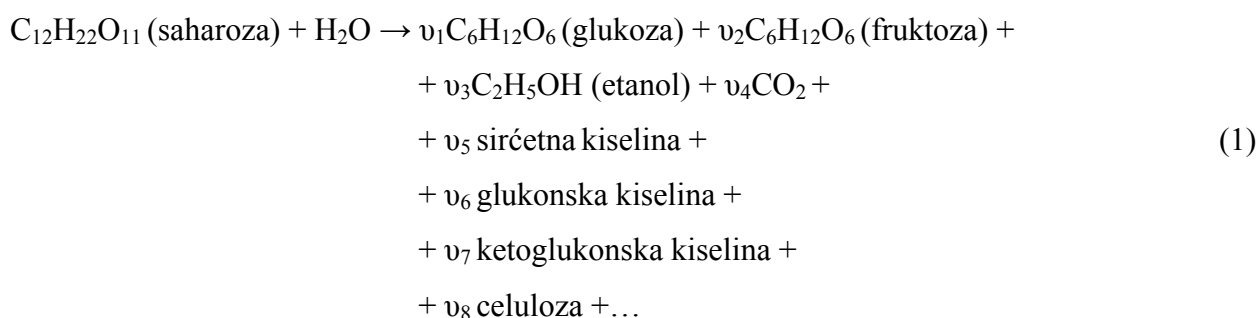
da kombuha primenjena kao starter daje fermentisani mlečni proizvod boljih reoloških karakteristika u poređenju sa primenom probiotske starter kulture, a neznatno različit od proizvoda dobijenog delovanjem jogurtne starter kulture.

ČETVRTI EKSPERIMENT

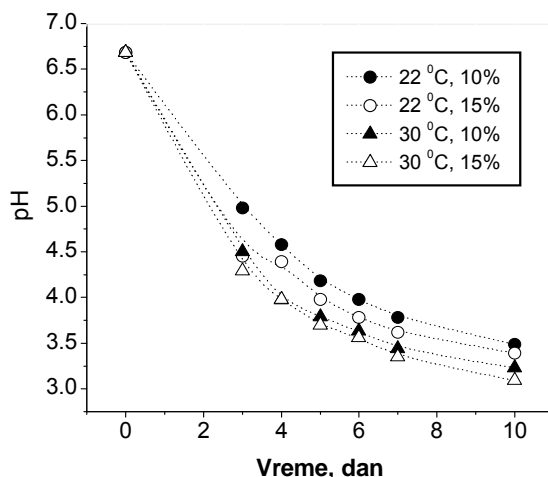
Za optimizaciju procesa fermentacije mleka uz primenu inokuluma kombuhe izvršena je analiza kinetike fermentacije saharoze tokom proizvodnje kombuha napitka na crnom čaju. Na osnovu dobijenih rezultata definisan je i empirijski model procesa fermentacije laktoze.

Kinetika fermentacije saharoze

Kinetika fermentacije saharoze dejstvom kombuhe, na dve temperature (22°C i 30°C) i u uzorcima inokulisanim sa dve količine inokulima kombuhe kultivisane na crnom čaju (10% v/v i 15% v/v), ispitana je praćenjem promena vrednosti pH tokom fermentacije (slika 56) kao i određivanjem promena koncentracije substrata (saharoze) i međuprodukata – glukoze, fruktoze, ukupne kiselosti i etanola (slika 57). Ovakav plan eksperimenta trebao je da potvrdi pretpostavljeni hemijski model napisan u opštem obliku:

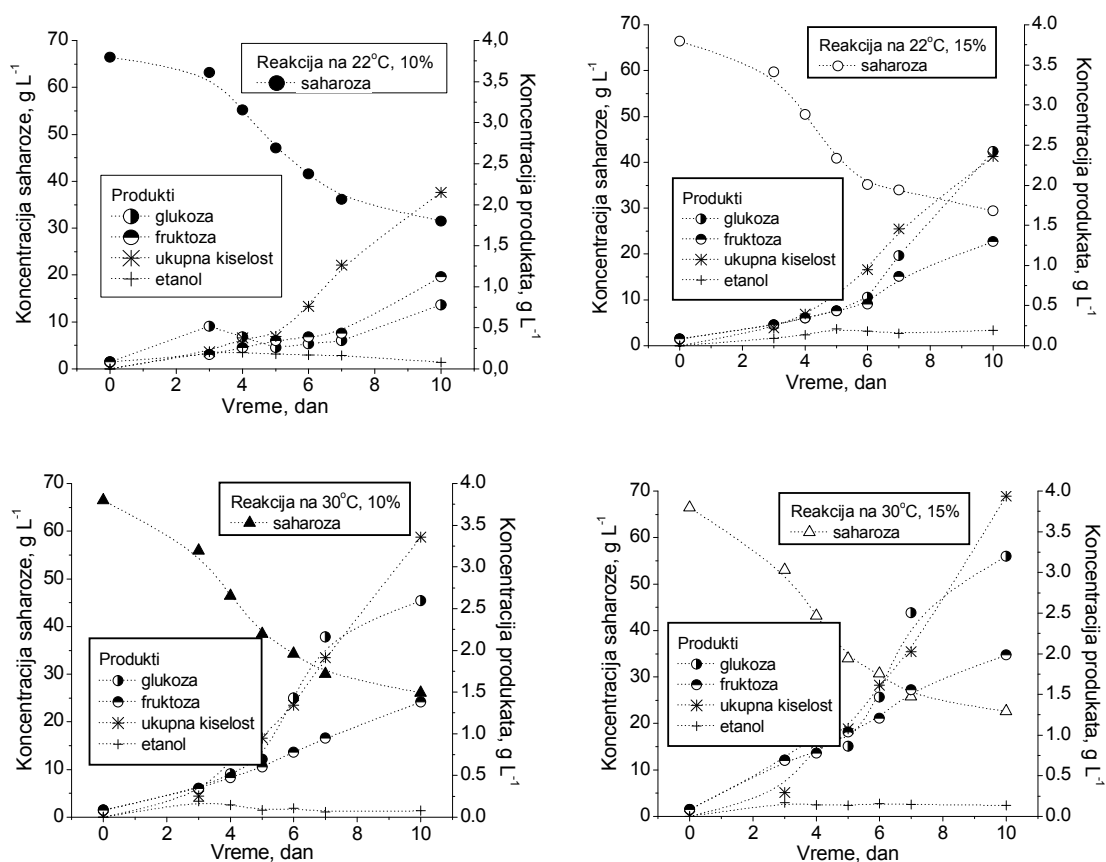


Kao što je poznato, reakcija (1) je katalizovana enzimima koje proizvode mikroorganizmi iz inokuluma kombuhe. Molekuli saharoze vezuju se za aktivne centre enzima gde bivaju transformisani u glukozu i fruktozu, koji se dalje konvertuju u druge produkte kroz niz uzastopnih i paralelnih reakcija. Kao posledica ovoga, reakciona smeša menja sastav (kvalitativni i kvantitativni) tokom fermentacije. Ove promene opisuje stehiometrijski koeficijent (ν) koji se menja u funkciji vremena.



Slika 56. Promena pH kao funkcija temperature i koncentracije inokuluma.

Tokom fermentacije, pH vrednost reakcione smeše opada skoro eksponencijalno, bez vidljive lag faze, zbog akumulisanih organskih kiselina (slika 56). Organske kiseline određene su kao titraciona kiselost, koja je izražena u gramima sirćetne kiseline po litri uzorka i njihov sadržaj je uključen u koncentraciju produkata (slika 57).



Slika 57. Kinetika fermentacije saharoze kao funkcija temperature i koncentracije inokuluma.

Približno 15% niže pH vrednosti su postignute na višoj temperaturi (30°C) u uzorcima inokulisanim sa većom količinom kombuha inokuluma (15% v/v). To je u skladu sa dobijenim vrednostima ukupne količine produkovanih kiselina: 2,2 g/L (22°C i 10% v/v), 2,4 g/L (22°C i 15% v/v), 3,4 g/L (30°C i 10% v/v) i 3,9 g/L (30°C i 15% v/v) desetog dana fermentacije. Pored ukupne kiselosti, određena je količina i drugih međuprodukata. Reakciona smeša sadržala je 1,2 – 2 g/L glukoze i 0,75 – 3,25 g/L fruktoze nakon deset dana fermentacije, ukazujući da se nivo glukoze brže smanjuje od nivoa fruktoze. Količina produkovanog etanola bila je veoma niska (0% – 0,5%) i dozvoljena je u bezalkoholnim pićima. Veće količine svih produkata bile su u uzorcima dobijenim na 30°C, inokulisanih sa 15% v/v starter kulture tj. kombuha inokuluma.

Na osnovu bilansa mase, desetog dana fermentacije, može se zaključiti da je manje od 15% saharoze konvertovano u pomenute produkte (glukozu, fruktozu, ukupne kiseline i etanol). Naime, sledeći iznosi saharoze su konvertovani: 6,2% (22°C i 10% v/v), 9,4% (22°C i 15% v/v), 11,2% (30°C i 10% v/v), 13,9% (30°C i 15% v/v). Količina saharoze koja nije iskorišćena bila je na visokom nivou: 47,4% (22°C i 10% v/v), 44,2% (22°C i 15% v/v), 39,2% (30°C i 10% v/v), 34% (30°C i 15% v/v). Tipično za fermentaciju kombuhom je stvaranje celulozne opne, na površini reakcione tečnosti, vidljive golim okom. Celulozna opna sa površine, zajedno sa pripadajućim celuloznim vlaknima, odvojena je nakon deset dana fermentacije. Pre merenja, pomenuti sistem je ispran vodom i osušen do konstantne mase. Dobijene vrednosti suve materije na 22°C dodatkom 10% v/v i 15% v/v inokuluma kombuhe bile su 0,198 g/L i 0,218 g/L respektivno; dok su na 30°C dodatkom 10% v/v i 15% v/v inokuluma kombuhe bile 0,304 g/L i 0,321 g/L respektivno.

Model koncentracije saharoze

Prateći trend promene koncentracije saharoze (slika 57) može se zaključiti da se proces odvija u tri faze pri svim eksperimentalnim uslovima (temperature i koncentracije inokuluma):

1. blagi, inicijalni pad koncentracije saharoze na početku fermentacije;
2. veoma izražen pad koncentracije saharoze u srednjoj fazi;
3. blagi pad koncentracije saharoze na kraju fermentacije, sa nagibom sličnim onom na početku fermentacije.

Najbolji model za predstavljanje ovakve krive, koja se sastoji iz dve lag faze između kojih je faza izraženog pada koncentracije je Boltzmanova (sigmoidalna) funkcija:

$$S(t) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-\frac{t-t_0}{\Delta t}}} \quad (2)$$

gde S označava koncentraciju saharoze (g/L), koja se menja u vremenu t . Parametri A_1 i A_2 odgovaraju položajima dve asimptote $S(t)$ krive (gornjoj i donjoj), t_0 je t -koordinata tačke u kojoj nagib krive ima najveću vrednost, dok je Δt širina koraka eksponencijalnog pada. Četiri parametra (A_1 , A_2 , t_0 i Δt) određena su primenom Levenberg–Marquardtove metode (ORIGIN 6.1) na osnovu eksperimentalnih rezultata (koncentracije saharoze na slici 57). Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 30. Funkcija $S(t)$ određena je za sve ispitivane reakcije na izabranim temperaturama i pri različitim koncentracijama inokuluma. Određeni koeficijenti funkcije bili su veoma visoki ($R^2 > 0,99$) i ukazuju na dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa odabranim modelom u čitavom intervalu promenljivih veličina.

Tabela 30. Parametri sigmoidalnog (Boltzmanovog) modela koncentracije

Parametri u ekvivalenciji 2	Ispitivani sistem			
	22°C, 10% v/v	22°C, 15% v/v	30°C, 10% v/v	30°C, 15% v/v
A_1	67,51	66,17	67,10	68,78
A_2	31,57	30,62	28,81	22,72
t_0	4,812	4,458	4,070	3,749
Δt	1,1000	0,7987	0,9215	1,248
R^2	0,99539	0,98793	0,99816	0,99740

Značaj svakog pojedinačnog faktora modela koncentracije (2) utvrđen je statistički determinisanim t -faktorima (tabela 31). Analiza t -faktora daje fizičko značenje parametara kao i samog modela. Očigledno, najznačajniji parametar je A_1 (42–44,5%), što je usko povezano sa početnom koncentracijom saharoze. Skoro podjednako su značajni faktori t_0 (27–29%) i A_2 (21–24%). Oni odgovaraju središnjoj tački krive koncentracije (u kojoj brza reakcija počinje da usporava) i krajnjoj koncentraciji saharoze, respektivno. Najmanje je značajan parametar Δt (7–9%), koji definiše širinu najstrmijeg dela krive $S(t)$, koji je u vezi sa periodom vremena u kojem se dešava najintenzivnija potrošnja saharoze.

Tabela 31. Statistička procena parametara modela koncentracije t -faktorima

t -faktori parametara u ekvivalenciji 2	Ispitivani sistem			
	22°C, 10% v/v	22°C, 15% v/v	30°C, 10% v/v	30°C, 15% v/v
t -faktor za A_1	44,40%	41,60%	41,80%	42,00%
t -faktor za A_2	21,90%	23,10%	23,60%	21,00%
t -faktor za t_0	26,70%	29,10%	27,70%	27,90%
t -faktor za Δt	7,03%	6,20%	6,96%	9,15%

Model brzine reakcije

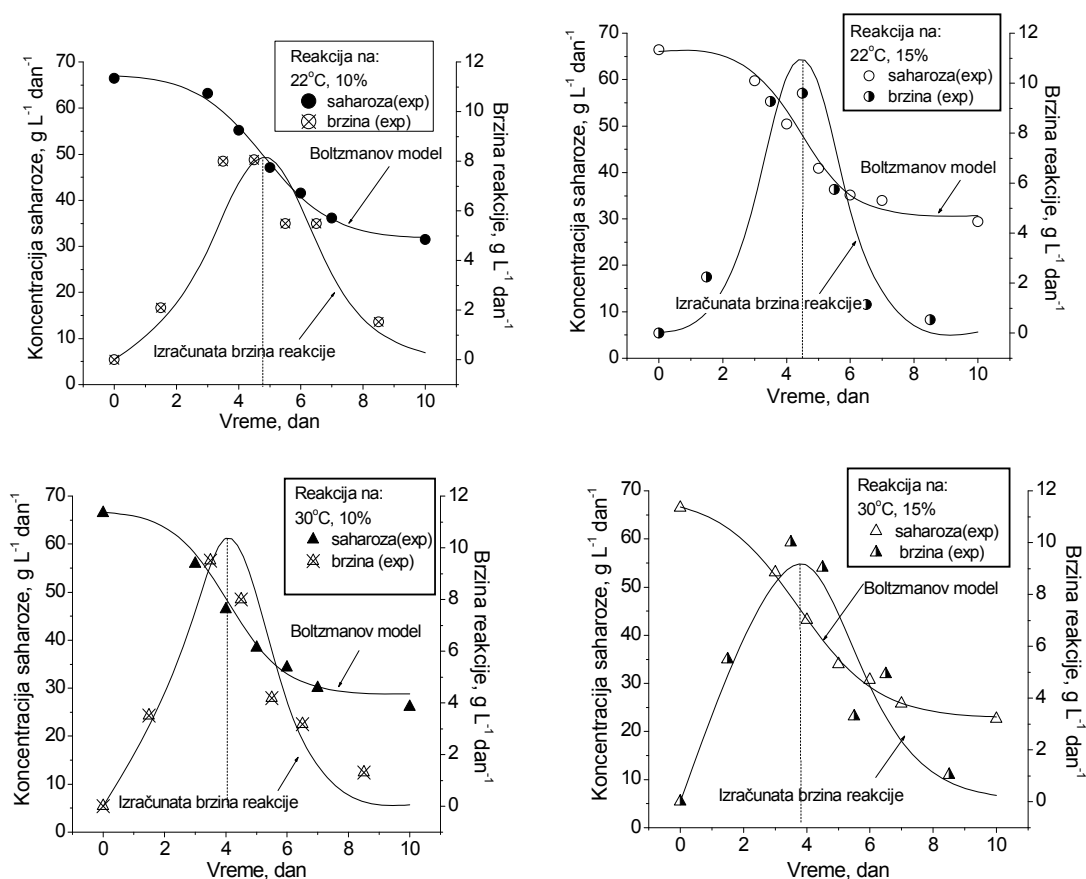
S obzirom na to da je fermentacija delovanjem kombuhe kompleksan proces, upotrebljen je empirijski pristup modelovanju kinetike fermentacije. Model je baziran na promeni koncentracije saharoze tokom fermentacije. Prvi izvod funkcije koncentracije saharoze u jednačini 2 definiše brzinu reakcije (1):

$$-\frac{dS(t)}{dt} = \frac{e^{\frac{t-t_0}{\Delta t}} (A_1 - A_2)}{\Delta t \left(1 + e^{\frac{t-t_0}{\Delta t}} \right)^2} \quad (3)$$

Pošto je jednačina (3) dobijena analitički, njena primena ne uzrokuje grešku u proračunima. Izvodi, izračunati iz jednačine (3), grafički su prikazani na slici 58 kao krive brzine reakcije, zajedno sa $S(t)$ -krivama (eksperimentalnim i izračunatim). Takođe, eksperimentalno dobijene vrednosti brzina reakcije prikazane su za sve ispitivane slučajeve. Eksperimentalne vrednosti brzina reakcije, izračunate su merenjem koncentracije saharoze na različitim temperaturama i koncentracijama inokuluma. Izračunate vrednosti brzina reakcije dobijene su primenom izvoda $S(t)$ funkcije u središnjoj tački svakog intervala vremena, $(S(t)_{i+1} - S(t)_i) / \Delta t$. Greške u ovakvim izračunavanjima mogu biti značajne kao što je i prikazano na slici 58, što čini numeričku aproksimaciju brzine reakcije manje preciznom. Kada su odstupanja eksperimentalno dobijenih vrednosti od izračunatih izražena kao suma razlika kvadrata podeljena sa ukupnim brojem eksperimentalnih tačaka, dobijene su sledeće vrednosti: 1,35 g/L dan (22°C i 10% v/v), 1,92 g/L dan (22°C i 15% v/v), 1,67 g/L dan (30°C i 10% v/v), 1,48 g/L dan (30°C i 15% v/v).

Analiza krivih brzine reakcije (slika 58) pokazuje da brzina fermentacije dostiže maksimum nakon približno 4–5 dana. Ova faza je delimično uzrokovana mikrobiološkim sastavom kombuhe. Naime, kvasci transformišu glukozu u etanol, koji stimuliše produkciju sirćetne kise-

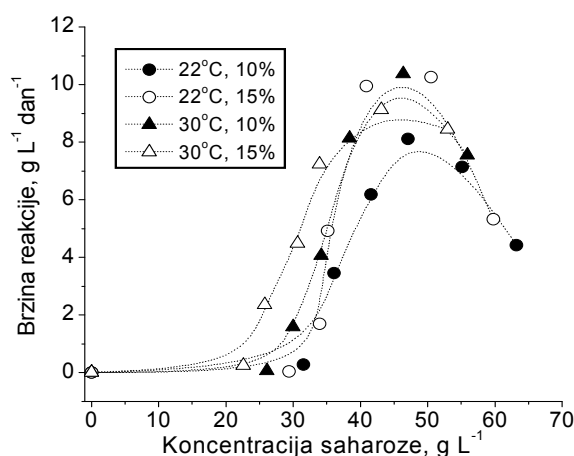
line (Liu i sar., 1996). S druge strane, bakterije sintetišu plutajuću celuloznu pelikulu koja zadržava ćelije kvasaca i bakterija. Sve ove interakcije doprinose nekoj vrsti samo-ubrzanja reakcije. Nakon dostizanja maksimuma, brzina reakcije brzo opada, verovatno zbog efekta prekomerne kiselosti, tipične za kasnije faze fermentacije, koji može uzrokovati suzbijanje metaboličke aktivnosti prisutnih mikroorganizama. Ovaj zaključak podržavaju rezultati dobijeni u radu Chena i Liu-a (2000) koji su ispitivali produženu fermentaciju saharoze dejstvom kombuhe.



Slika 58. Brzina reakcije kao funkcija temperature i koncentracije inokuluma kombuhe. (Linije prikazuju matematički model, simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti.)

Najveća brzina (11 g/L dan) postignuta je u sistemu na 22°C, prethodno inokulisanog sa 15% v/v starter kulture. Velike brzine reakcije (10,5 g/L dan i 9,5 g/L dan) takođe su postignute u reakcijama na 30°C. Najmanji maksimum (8 g/L dan) imao je sistem na 22°C, inokulisan sa 10% v/v starter kulture. Može se zaključiti da su dobijeni rezultati u skladu sa očekivanjima vezanim za pozitivne efekte temperature na kinetiku reakcije. Takođe, veća količina inokuluma ne povećava maksimalnu brzinu reakcije na 30°C, sugerišući da je koncentracija inokuluma od 10% v/v prihvatljiva (Lončar i sar., 2006). Fermentacija u sistemu na 22°C i 15% v/v starter kulture (slika

58) predstavlja izuzetak u smislu relevantnih faktora – temperature i koncentracije inokuluma. Naime, brzina reakcije odstupa od očekivane visoke vrednosti. Precizno objašnjenje ovakvog odstupanja zahteva dalja istraživanja. Što se tiče dužine trajanja reakcije, duže vreme (4,5–5 dana) potrebno je za postizanje maksimalne brzine na nižoj temperaturi (22°C), dok je kraće vreme (3,8–4 dana) dovoljno za postizanje maksimalne brzine na višoj temperaturi (30°C). Generalno gledano, brzina reakcije je veća na višoj temperaturi. Kada su poznati podaci za krive brzina, mogu se predstaviti krive zasićenja (brzina reakcije nasuprot koncentraciji supstrata) (slika 59). Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku na nižim koncentracijama supstrata, ukazujući na kompleksni ne-Michaelis-Mentenov tip kinetike, koji je uspešno predstavljen pomoću empirijskog modela.



Slika 59. Krive zasićenja – brzina reakcije nasuprot koncentracije supstrata.

Jedna od prednosti poznavanja brzine fermentacije je mogućnost određivanja optimalnog vremena trajanja procesa proizvodnje fermentisanog mlečnog napitka primenom kombuhe u cilju postizanja željene kiselosti (pH) u krajnjem proizvodu. Različiti autori sugerišu različite pH vrednosti, ali ne niže od pH=3,5. U našim istraživanjima, fermentacioni sistem dostigao je tu vrednost za 6,5–10 dana (slika 56). S druge strane, ukoliko se fermentacija odvija samo unutar perioda ubrzane reakcije (3,8–5 dana), postignuta pH vrednost iznosi približno 4–4,3, respektivno. Istraživanja grupe autora (Malbaša i sar., 2006) pokazuju da su ove vrednosti adekvatne.

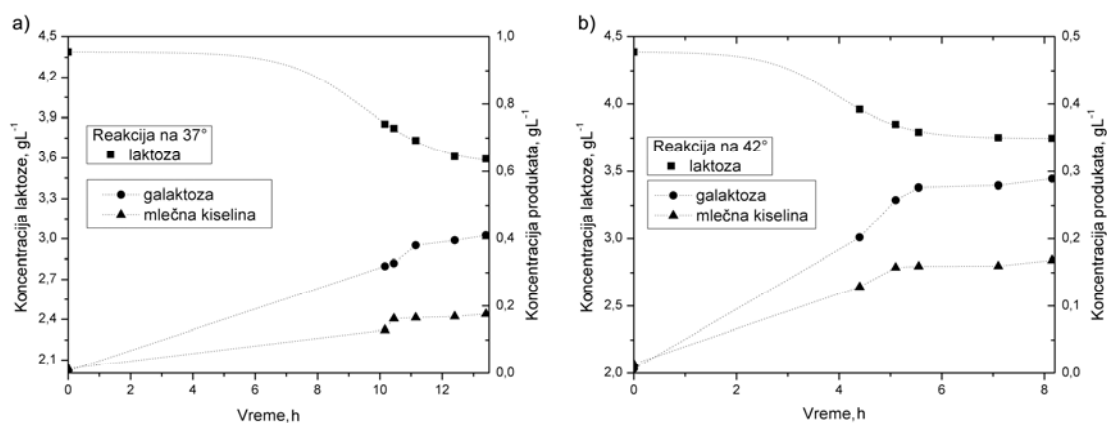
Nakon obrade eksperimentalnih rezultata dobijena su dva matematička modela za kinetiku fermentacije saharoze dejstvom kombuhe – jedan koji opisuje promenu koncentracije saharoze tokom fermentacije, i drugi koji opisuje brzinu pomenute fermentacije. Pokazano je da oba empirijska modela omogućavaju bolje razumevanje transformacija saharoze delovanjem kombu-

he. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se brzina fermentacije povećava do postizanja maksimalne vrednosti unutar približno 4–5 dana u svim ispitivanim sistemima. Nakon postizanja maksimuma, brzina reakcije naglo opada. Brzina fermentacije uglavnom raste sa povećanjem radne temperature u opsegu od 22°C do 30°C. Na brzinu fermentacije malo utiče koncentracija inokuluma u opsegu od 10% do 15% v/v. Optimalno trajanje fermentacije, pod primenjenim uslovima, je 3,5–5 dana. Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku pri izabranoj koncentraciji substrata.

Model fermentacije laktoze

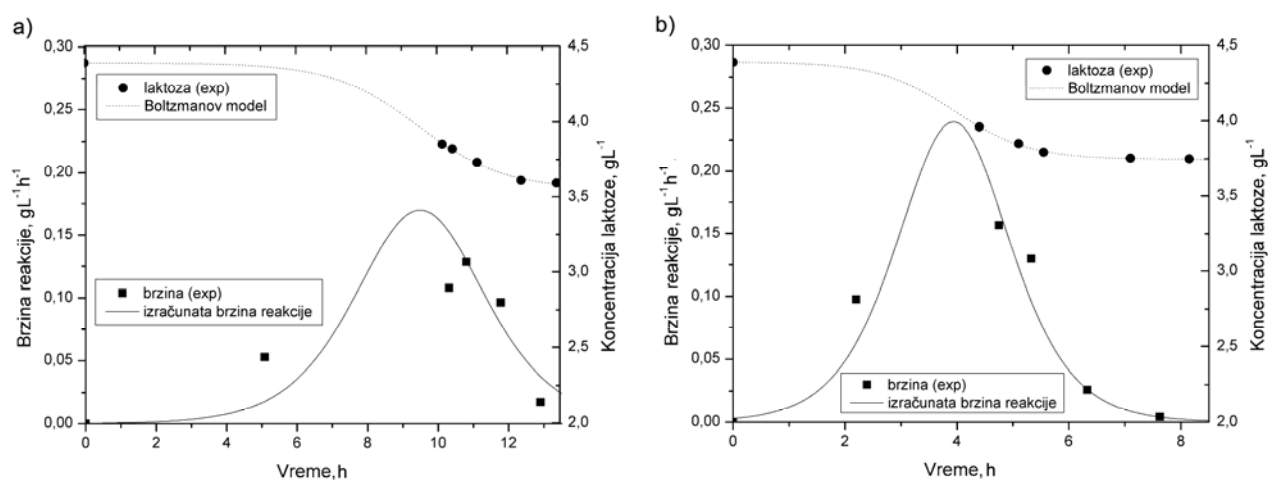
Kinetika fermentacije laktoze u mleku dejstvom kombuhe, na dve temperature (37 i 42°C) u uzorcima dobijenim inokulumom kombuhe kultivisanim na crnom čaju (10% v/v) ispitana je praćenjem promena pH vrednosti tokom fermentacije kao i determinacijom promena koncentracije supstrata (laktoze) i međuprodukata – galaktoze i mlečne kiseline. Tokom fermentacije, laktoza se prvo transformiše u glukozu i galaktozu, koje se dalje konvertuju u druge produkte kao što su pirogroždana kiselina, mlečna kiselina, ugljenik (IV)–oksid, voda, etanol i dr. kroz niz uzastopnih i paralelnih reakcija (Tamime i Robinson, 2004; Surono i Hosono, 2011a). Reakciona smeša menja kvalitativni i kvantitativni sastav tokom fermentacije.

Najbolji model za predstavljanje krive promene koncentracije laktoze kao i kod saharoze je Boltzmanova (sigmoidalna) funkcija. Promena koncentracije laktoze na obe temperature (37 i 42°C) sastoji se od dve lag faze između kojih je faza izraženog pada koncentracije (slika 60). Na 37°C tok promene sadržaja laktoze razlikuje se od reakcije na 42°C jer ima manje izraženu lag fazu na kraju fermentacije a faza pada koncentracije je između 7. i 12. sata dok je na 42°C između 4. i 6. sata.



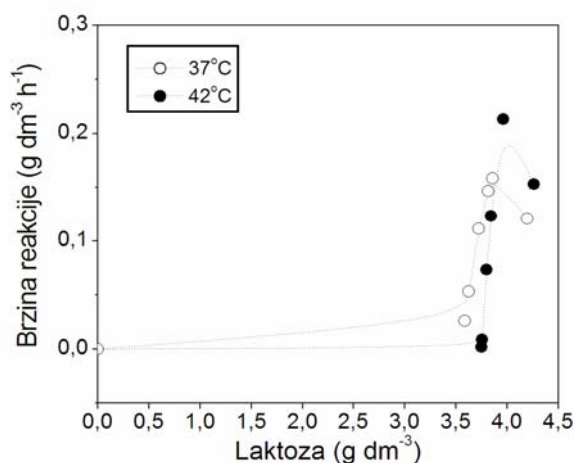
Slika 60. Kinetika fermentacije laktoze kao funkcija temperature.

Analiza krivih brzine reakcije (slika 61) pokazuje da brzina fermentacije laktoze dostiže maksimum nakon 9,5 h na 37°C odnosno 4 h na 42°C. Nakon dostizanja maksimuma, brzina reakcije brzo opada najverovatnije zbog suzbijanja metaboličke aktivnosti prisutnih mikroorganizama usled produkcije organskih kiselina što je u skladu sa rezultatima dobijenim u radu Chen i Liu (2000) koji su ispitali produženu fermentaciju saharoze dejstvom kombuhe. Najveća brzina (0,24 g/L h) postignuta je u sistemu na 42°C, što je u skladu sa dosadašnjim rezultatima primene kombuhe za fermentaciju mleka na temperaturama 40–43°C (Iličić, 2010; Milanović i sar., 2008; Malbaša i sar., 2009c).



Slika 61. Brzina reakcije kao funkcija temperature.
(Linije prikazuju matematički model, simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti.)

Na osnovu podataka za krive brzina fermentacije, krive zasićenja (brzina reakcije nasuprot koncentraciji laktoze) predstavljene su na slici 62. Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku na nižim koncentracijama laktoze, ukazujući na kompleksni ne-Michaelis-Mentenov tip kinetike.



Slika 62. Krive zasićenja – brzina reakcije nasuprot koncentracije laktoze.

ZAKLJUČAK

Kombuha kultivisana na crnom čaju zaslađenim saharozom može uspešno da se koristi kao starter kultura za fermentaciju laktoze u mleku bez prethodnog koncentrisanja. Dodatak 10% v/v inokuluma kombuhe na 42°C optimalna je količina za fermentaciju mleka sa 0,9 i 2,2% w/w mlečne masti. Količina mlečne masti u mleku značajno utiče na vreme fermentacije i karakteristike dobijenih metabolita. Primarni produkti fermentacije laktoze u mleku prolaze dalje transformacije, glukoza mnogo brže od galaktoze, što je potvrda ranijih istraživanja fermentacije mleka običnim i koncentrisanim inokulumom kombuhe.

Inokulum kombuhe kultivisan na crnom čaju odnosno čaju od majčine dušice u kombinaciji sa probiotskom starter kulturom dvostruko skraćuje vreme fermentacije mleka u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. Vrsta čaja upotrebljena za fermentaciju ima značajan uticaj na sposobnost vezivanja vode i teksturalne karakteristike proizvedenih fermentisanih mlečnih napitaka, a nema na sinerezis. Nasuprot tome, na fizičko–hemijske karakteristike fermentisanih mlečnih napitaka bitnije ne utiče različita temperatura fermentacije mleka (37°C, 40°C i 43°C). Rezultati faktorijalne analize pokazali su da interakcija faktora Temperatura*Vrsta čaja značajno utiče na sadržaj L–mlečne kiseline, dok je signifikantan uticaj na teksturalne karakteristike pokazala interakcija faktora Vrsta čaja*Dan skladištenja.

Tokom fermentacije mleka u različitim fazama procesa pri odabranim pH vrednostima (6,07; 5,8; 5,4; 5,1; 4,8 i 4,6) dodatkom 10% inokuluma kombuhe na 42°C transformiše se 14,6% laktoze odnosno 18,2% na 37°C. Sadržaj galaktoze i glukoze koje nastaju fermentacijom i hidrolizom laktoze raste između prve i druge tačke fermentacije (pH=6,07 i pH=5,8). Sadržaj fruktoze pri pH=4,6 veći je u uzorcima proizvedenim na 42°C u poređenju sa onima proizvedenim na 37°C, što ukazuje na veći afinitet kombuhe prema fruktozi na nižoj temperaturi.

Dominantne organske kiseline tokom fermentacije su L–mlečna kiselina i sirćetna kiselina. Produkcija L–mlečne kiseline tokom fermentacije mleka dodatkom inokuluma kombuhe na 37°C i 42°C postepeno raste od 0,0142 g/100g do maksimalne vrednosti na kraju procesa od 0,1764 g/100g na 37°C, odnosno 0,1680 g/100g na 42°C.

Nije utvrđena značajna razlika u sadržaju masnih kiselina tokom fermentacije mleka kombuhom na 37°C i 42°C. Sadržaj palmitinske kiseline (C16:0) u mleku i uzorcima tokom fermentacije je najveći, zatim slede miristinska, stearinska i oleinska kiselina. Fermentisani mlečni napici proizvedeni na 37°C i 42°C (pH=4,6) imali su veći sadržaj mononezasićenih masnih

kiselina kao i polinezasićenih masnih kiselina u poređenju sa mlekom. Povećanje sadržaja ovih masnih kiselina može se pripisati delovanju kombuhe.

Glavne promene reoloških svojstava tokom fermentacije mleka u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka uz primenu kombuhe na 37°C i 42°C su na početku procesa geliranja kazeina i povećavaju se tokom procesa fermentacije mleka. Praćenjem procesa fermentacije mleka od početne pH vrednosti 6,07 do završne 4,6, najznačajnije promene teksturalnih karakteristika (čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i indeksa viskoziteta) i reoloških svojstava zabeležene su između pH=5,4 i 5,1, što je u korelaciji sa mikrostrukturom. Analiza mikrostrukture pokazala je nestajanje grube klasterske strukture na pH > 5,6 i potom pojavu fine mreže kazeinskih micela u daljem toku fermentacije. Postoji visoka korelacija između čvrstoće i tiksotropije ($r^2=0,93$, $p=0,0001$), što je u skladu sa promenama koje se dešavaju finijim umrežavanjem kazeinskih micela. Utvrđena je i korelacija između teksturalnih svojstava i mikrostrukture gela.

Komparativna istraživanja uticaja tri različite starter kulture: inokuluma kombuhe, jogurtne odnosno probiotske kulture na promene komponenata i strukture mleka tokom procesa fermentacije na 42°C pokazala su sličan trend promena. Promene viskoziteta u svim uzorcima pokazuju istu regresionu liniju, sa različitim koeficijentima i visokom vrednošću r^2 , osim uzorka proizvedenog primenom jogurtne kulture na pH 5,4. Merenja viskoziteta na pH 5,4 ukazuju na sličnosti u procesu formiranja gela između uzoraka proizvedenih primenom inokuluma kombuhe i probiotske kulture. Formiranje gela kod uzoraka dobijenih delovanjem kombuhe počinje na višoj pH vrednosti (pH 5,6) u poređenju sa uzorkom proizvedenim primenom jogurtne kulture (pH 5,1). Najveće razlike u izmerenim reološkim parametrima uočene su u prvoj fazi umrežavanja kazeina primenom sve tri starter kulture. Uzorak dobijen korišćenjem inokuluma kombuhe imao je najveće vrednosti kompleksnog modula, što je rezultiralo boljim reološkim karakteristikama gotovog proizvoda. Najveće promene u teksturalnim karakteristikama i viskozitetu su uočene između pH 5,4 i 5,1. Ovi rezultati pokazuju da kombuha primenjena kao starter kultura daje fermentisani mlečni proizvod boljih reoloških karakteristika u poređenju sa primenom probiotske starter kulture. Ustanovljene su minimalne razlike ispitivanih parametara kvaliteta kombuha fermentisanog mlečnog napitka u odnosu na proizvod dobijen delovanjem tradicionalne jogurtne starter kulture.

Da bi se definisao empirijski model procesa fermentacije laktoze u mleku delovanjem kombuhe formulisana su prethodno dva matematička modela za kinetiku fermentacije saharoze u tradicionalnom kombuha napitku (na crnom čaju) – jedan koji opisuje promenu koncentracije saharoze tokom fermentacije, i drugi koji opisuje brzinu fermentacije. Oba empirijska modela omogućavaju bolje razumevanje transformacija saharoze delovanjem kombuhe. Brzina fermenta-

cije uglavnom raste sa povećanjem radne temperature u opsegu od 22°C do 30°C. Na brzinu fermentacije minimalno utiče koncentracija inokuluma u opsegu od 10% do 15% v/v. Optimalno trajanje fermentacije, pod primenjenim uslovima, je 3,5–5 dana. Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku pri izabranoj koncentraciji supstrata.

Najbolji model za predstavljanje krive promene koncentracije laktoze u toku fermentacije mleka delovanjem kombuhe, kao i kod saharoze je sigmoidalna funkcija. Promena koncentracije laktoze na ispitivanim temperaturama 37°C i 42°C sastoji se od dve lag faze između kojih je faza izraženog pada koncentracije. Na 37°C tok promene sadržaja laktoze razlikuje se od reakcije na 42°C, jer ima manje izraženu lag fazu na kraju fermentacije. Faza pada koncentracije laktoze na 37°C je između 7-og i 12-og časa, dok je na 42°C između 4-og i 6-og časa. Krive zasićenja pokazuju sigmoidalnu kinetiku na nižim koncentracijama laktoze, ukazujući na kompleksni ne-Michaelis–Mentenov tip kinetike.

Generalno može se istaći da su primenom inokuluma kombuhe tokom fermentacije mleka u različitim fazama procesa ustanovljene specifične promene komponenata i strukture u poređenju sa efektima delovanja jogurtne odnosno probiotske starter kulture.

LITERATURA

1. Akalin, A. S., Ünal, G. (2010): The influence of milk supplementation on the microbiological stability and textural characteristics of fermented milk. *Milchwissenschaft*, 65 (3), 291-294.
2. Akalin, A. S., Ünal, G., Dinkci, N., Hayaloglu, A. A. (2012): Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 95 (7), 3617-3628.
3. Akhnazarova, S., Kafarov, V. (1982): *Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering*. Mir Publishers Moscow, Moscow, Russia.
4. Akin, M. B., Akin, M. S., Kırmacı, Z. (2007): Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, 104, 93-99.
5. Anon. (1992): *Enzyme Nomenclature*. The international union of biochemistry and molecular biology, Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 371-421.
6. Aryana, K. J., Plauche, S., Rao, R. M., McGrew, P., Shah, N. P. (2007): Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 72 (3), M79-M84.
7. Atamer, M., Carić, M., Milanović, S., Gavarić, D. (1996): Kvalitet jogurta proizvedenog iz UF mleka. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 91, 19-26.
8. Barbosa-Canovas, G. V., Fernandez-Molina, J. J., Alzamora, S. M., Tapia, M. S., Lopez-Malo, A., Chanes, J. W. (2003): General considerations for preservation of fruits and vegetables. In: *Handling and Preservation of Fruits and Vegetables by Combined Methods for Rural Areas*, FAO Agricultural Services, Billetin 134.
9. Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012): Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT – Food Science and Technology*, 47, 71-77.
10. Belloso-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.
11. Benezech, I., Maingonnat, J. F. (1994): Characterization of the rheological properties of yogurt – a review. *Journal of Food Engineering*, 21, 447-472.

12. Beshkova, D., Simova, E., Frengova, G., Simov, Z. (1998): Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 180-186.
13. Blanc, P. J. (1996): Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnology Letters*, 18, 139-142.
14. Bohmler, G., Gerwert, J., Scupin, E., Sinell, H. J. (1996): The epidemiology of helicobacteriosis in humans; studies of the survival capacity of the microbe in food. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 103 (10), 438-443.
15. Buchenhuskes, H. J. (1993): Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures in various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 253-272.
16. Cardoso, L. V. G., Ferreira, M., Schneedorf, J. M., Carvalho J. C. T. (2003): Avaliação de fermentdo de quefir sobre o trânsito intestinal de ratos. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 1, 107-109 (in Portuguese).
17. Casarotti, S. N., Monteiro, D. A., Moretti, M. M. S., Penna, A. L. B. (2012): Influence of the combination of probiotic culture during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59, 67-75.
18. Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2002): Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5656-5662.
19. Chen, C., Liu, B. Y. (2000): Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 834-839.
20. Chr. Hansen, Prospect material: EN – exact–0899.
21. Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G. (2003): Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
22. Coskun, H., Ondul, E. (2004): Free fatty acid accumulation by mesophilic lactic acid bacteria in cold stored milk. *Journal of Microbiology*, 42, 133–138.
23. Couto, S. R., Sanroman, M. A. (2006): Application of solid–state fermentation to food industry – A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.
24. Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A. M., Granato, D., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. (2010): Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 358-373.

25. Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., Goff, H. D. (2004): A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14, 1025-1031.
26. Dalgleish, D. G., Alexander, M., Corredig M. (2005): Mechanism of acid coagulation of milk studied by a multi-technique approach. In: Food Colloids: Interactions, Microstructure, and Processing, Dickinson, E. (ed.), Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 16-25.
27. Das, U. N., Fams, M. D. (2002): Essential fatty acid as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. *Nutrition*, 18, 786-789.
28. D'auria, E., Agostoni, C., Giovannini, M., Riva, E., Zetterström, R., Fortin, R., Greppi, G. F., Bonizzi, L., Roncada, P. (2005): Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk. *Acta Paediatrica*, 94, 1708-1713.
29. Dave, R. I., Shah, N. P. (1997): Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.
30. De Lorenzi, L., Pricl, S., Torriano, G. (1995): Rheological behavior of low-fat and full-fat stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 5, 661-671.
31. De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., Degeest, B., Vanningelgem, F. (2003): Exopolysaccharide – producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, 13 (8), 707-717.
32. Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Trung Le, T., Messens, K., Van Camp, J. (2008): Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.
33. Duboc, P., Mollet, B. (2001): Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
34. Dufresne, C., Farnworth, E. (2000): Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, 409-421.
35. Duraković, K., Milanović, S., Carić, M., Iličić, M., Tekić, M., Lendel, J. (2008): Funkcionalni niskoenergetski fermentisani mlečni napitak proizveden uz primenu kombuhe. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2), 66-73.
36. Dutta, D., Gachhui, R. (2006): Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp nov., isolated from kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1899-1903.

37. Ekinci, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B., Guzel–Seydim, Z. (2008): Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 216–224.
38. El–Salam, S. S. A. (2012): 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea kombucha. *New York Science Journal*, 5, 55-61.
39. Evanhuis, N., de Vries, T. R. (1959): The condition of calcium phosphate in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 13, 1-15.
40. Evers, J. M. J. (2004): The milk fat globule membrane – compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, 14, 661-674.
41. FAO/WHO (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
42. Fernandez–Garcia, E., McGregor, J. U. (1994): Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77, 2934-2939.
43. Fite, A., Dykhuizen, R., Litterick, A., Golden, M., Leifert, C. (2004): Effects of ascorbic acid, glutathione, thiocyanate, and iodide on antimicrobial activity of acidified nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 655-658.
44. Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H., Wallace, J. (1993): Biochemistry of cheese ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Fox, P. F. (ed.), volume 1, Chapman & Hall, London, UK, pp. 389-438.
45. Frank, G. W. (2014): Kombucha. Das Teepilz – Getränk: Praxisgerechte Anleitung für die Zubereitung und Anwendung. Ennsthaler GmbH + Co. Kg, A 4400 Steyr, Austria, p. 172.
46. Frank, J. F., Hassan, N. A. (1998): Starter cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology*, Marth, E. H. i Steele, J. L. (eds.), Marcel Dekker, New York, USA, pp. 131-172.
47. Friedman, M., Kim, S. Y., Lee, S. J., Han, G. P., Han, J.S., Lee, R. K., Kozukue, N. (2005): Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. *Journal of Food Science*, 70, 550-559.
48. Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney, H. P. L. (eds.) (2011): *Encyclopedia of Dairy Science*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, California, USA.
49. Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., Bhat, R. (2012): Fermentation of black tea broth (kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19, 109-117.
50. Gomis, D. B. (1992): HPLC analysis of organic acids. In: *Food Analysis by HPLC*, Nollet, L. M. L. (ed.), Marcel Dekker, New York, SAD, pp. 371-385.

51. Gonzales, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamon, J. M. (2005): Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 295-304.
52. González de Llano, D., Rodríguez, A., Cuesta, P. (1996): Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening—analysis by HPLC. *Journal of Applied Bacteriology*, 80 (5), 570-576.
53. Greenacre, E. J., Brocklehurst, T. F., Waspe, C. R. (2003): *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3945-3951.
54. Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998): Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT – Food Science and Technology*, 31, 291-296.
55. 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.
56. Gregurek, Lj. (2001): Nova generacija prebiotika. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 12 (1-2), 4.
57. Güzel–Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., Bodine, A. B. (2000): Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 35-43.
58. Guzman–Gonzalez, M., Morais, F., Ramons, M., Amigo, L. (1999): Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117-1122.
59. Hardi, J., Slacanac, V. (2000): Examination of coagulation kinetics and rheological properties of fermented milk products: Influence of starter culture, milk fat and addition of inulin. *Mljekarstvo*, 50, 217-226.
60. Harwalker, V. R., Kalab, M. (1980): Milk gel structure. XI. Electron microscopy of glucono- β -lactone induced skim milk gels. *Journal of Texture Studies*, 11, 35-49.
61. Havemose, M., Weisbjerg, M., Bredie, W., Neilsen, J. (2004): Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *International Dairy Journal*, 14, 563-570.

62. Heertje, I., Visser, J., Smits, P. (1985): Structure formation in acid milk gels. *Food Microstructure*, 4, 267-277.
63. Helland, M. H., Wicklund, T., Narvhus, J. A. (2004): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water- based cereal puddings. *International dairy Journal*, 14 (11), 957-965.
64. Hesseltine, C. W. (1965): A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia*, 57, 149-197.
65. Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2004): Proteomic analysis of κ -casein micro-heterogeneity. *Proteomics*, 4, 743-752.
66. Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F. (2005): Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine κ -casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 5, 990-1002.
67. Horne, D. S. (1999): Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9 (3-6), 261-268.
68. Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanović, S., Vukić, V., Iličić, M., Popović, Lj., Kanurić, K. (2014): The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *Journal of Functional Food*, 10, 336-345.
69. Hsiao, C. P., Siebert, K. J. (1999): Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 189-201.
70. Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Đurić, M., Tekić, M., Vukić, V., Duraković, K., Popović, S. (2009): Primena inokuluma čajne gljive u tehnologiji funkcionalnih fermentisanih mlečnih proizvoda. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 20 (1-2), 65-70.
71. Iličić, M. (2010): Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
72. Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Đurić, M., Tekić, M., Vukić, V., Ranogajec, M. (2010): Functional and reological characteristics of fermented dairy products. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 21 (1-2), 82-89.
73. Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Vukić, V., Kanurić, K., Ranogajec, M., Hrnjez, D. (2013): The effect of transglutaminase on rheology and texture of fermented milk products. *Journal of Texture Studies*, 44, 160-168.
74. Jacob, M., Nöbel, S., Jaros, D., Rohm, H. (2011): Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids*, 25, 928-934.

75. Janković, I., Stojanović, M. (1994): Microbial and chemical composition, growth, therapeutical and antimicrobial characteristics of tea fungus. *Mikrobiologija*, 31, 25-34.
76. Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminthan, K. (2007): Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102, 392-398.
77. Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathiskumar, M., Swaminthan, K. (2008): Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109, 227-234.
78. Jayabalan, R., Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., Sathiskumar, M. (2014): A review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 538-550.
79. Jensen, N. B. (1999): Influence of oxygen on growth and products formation in lactic acid bacteria. PhD Thesis, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.
80. Jensen, R. G. (2002): Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85, 295-350.
81. Jiménez-Flores, R., Brisson, G. (2008): The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Science and Technology*, 88, 5-18.
82. Kalab, M. (1995). Practical Aspects of Electron Microscopy in Cheese Research. In: Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese, Malin, L., Tunick, M. H. (eds.), Plenum Press, New York, USA, p. 2470.
83. Kalab, M., Allan-Wojtas, P., Miller, S. (1995): Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (6), 177-186.
84. Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., Ajandouz, E. H. (2012): Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49, 226-232.
85. Kankaanpää, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E., Lee, Y. K. (2001): The influence of polyunsaturated fatty acid on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 194, 149-153.
86. Karlsson, A. O., Ipsen, R., Ardo, Y. (2007): Observations of casein micelles in skim milk concentrate by transmission electron microscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 1102-1107.
87. Kim, Y. J., Liu, R. H. (2002): Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 67, 1731-1737.

88. Kontkanen, H., Rokka, S., Kemppinen, A., Miettinen, H., Hellström, J., Kruus, K., Marnila, P., Alatossava, T., Korhonen, H. (2011): Enzymatic and physical modification of milk fat: A review. *International Dairy Journal*, 21, 3-13.
89. Kravić, S., Suturović, Z., Brezo, T., Karišik-Đurović, A., Vitas, J., Malbaša, R., Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z. (2011): Characterisation of fatty acid composition in milk-based Kombucha products. 2nd CEFSER (Center of Excellence in Food Safety and Emerging Risks) WORKSHOP "Persistent Organic Pollutants in Food and the Environment", 26th Symposium on Recent Developments in Dairy Technology, BIOXEN seminar "Novel approaches for environmental protection", Novi Sad, Serbia, Proceedings, 268–272.
90. Kristo, E., Biliaderis, C. G., Tzanetakis, N. (2003): Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83, 437-446.
91. Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., Liao, C. C. (1996): The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13, 407-415.
92. Liu, J. R., Chen, M. J., Lin, C. W. (2005): Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2467-2474.
93. Lock, A. L., Shingfield, K. J. (2004): Optimising milk composition. In: *Dairying—Using Science to Meet Consumers' Needs*, Kebreab, E., Mills, J., Beever, D. E. (eds.), Nottingham University Press, Loughborough, UK, pp. 107-188.
94. Lopez, C. (2011): Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 391-404.
95. Malbaša, R. (2000): Mogućnost dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive. Magistrska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
96. Malbaša, R. (2004): Istraživanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
97. Malbaša, R., Lončar, E., Đurić, M., Klašnjaja, M., Kolarov, Lj., Markov, S. (2006): Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha. *Food and Bioprocess Processing*, 84, 193-199.
98. Malbaša, R., Lončar, E., Đurić, M. (2008a): Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106, 1039-1045.

99. Malbaša, R., Lončar, E., Đurić, M., Došenović, I. (2008b): Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108, 926-932.
100. Malbaša, R., Minić, S., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2008c): Uticaj inokuluma kombuhe na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2), 43-46.
101. Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M., Kolarov, Lj. (2009a): Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, 112, 178-184.
102. Malbaša, R. (2009b): Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe. *Monografija*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
103. Malbaša, R., Lončar, E., Milanović, S., Kolarov, Lj. (2009c): Use of milk-based kombucha inoculum for milk fermentation. *Acta Periodica Technologica*, 40, 47-53.
104. Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., Čanadanović-Brunet, J. (2011): Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727-1731.
105. Malbaša, R., Vitas, J., Lončar, E., Milanović, S. (2012): Physical and textural characteristics of fermented milk products obtained by kombucha inoculums with herbal teas. *Acta Periodica Technologica*, 43, 51-58.
106. Malbaša, R. (2014): Antioksidativna svojstva kombuha proizvoda. *Monografija*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
107. Marenjak, T. S., Poljičak-Milas, N., Delaš, I. (2006): Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Mljekarstvo*, 56 (2), 119-137.
108. Markov, S. L., Malbaša, R. V., Hauk, M. J., Cvetković, D. D. (2001): Investigation of tea fungus microbe associations: I: the yeasts. *Acta Periodica Technologica*, 32, 133-138.
109. Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Paul Ross, R., Cotter, P. D. (2014): Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171-178.
110. Marshall, V. M. (1993): Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 46 (2), 49-56.
111. Marshall, V. M. E., Tamime, A. Y. (1997): Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 35-41.
112. Marz, U. (2002): World markets for citric, ascorbic, isoascorbic acids: Highlighting antioxidants in food. Business Communications Company (Inc.): Food and Beverage Publications Report Code FOD017B, www.bccresearch.com

113. Mattila–Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002): Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12, 173-182.
114. Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C., Grunder, K. (1995): The yeast spectrum of the 'tea fungus kombucha'. *Mycoses*, 38, 289-295.
115. McMahon, D. J., Du, H., McManus, W. R., Larsen, K. M. (2009): Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *Journal of Dairy Sciences*, 92, 5854-5867.
116. Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dykes, G. A., Gidley, M. J. (2009): Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 576-583.
117. Milanović, S. (1997): Fermentisani mlečni napici za specijalne namene. Monografija "Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda", eds. Obradović, D. i sar., Beograd, Jugoslovenski mlekerski simpozijum, Zlatibor, 49-55.
118. 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.
119. Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Malbaša, R., Tekić, M., Ilić, M., Duraković, K. (2008): Low energy kombucha fermented milk-based beverages. *Acta Periodica Technologica*, 39, 37-46.
120. Mullin, W. J., Emmons, D. B. (1997): Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*, 30, 147-151.
121. Nauth, K. R. (2006): Yogurt. In: Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Hui, Y. H. (ed.), volume 4, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 152-1–152-15.
122. Nikbakht, R., Sadrzadeh, M., Mohammadi, T. (2007): Effect of operating parameters on concentration of citric acid using electrodialysis. *Journal of Food Engineering*, 83, 596-604.
123. Nishimoto, T., Uyeta, M., Tane, S. (1969): Precursor of benzoic acid in fermented milk. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 10 (6), 410-413.
124. Obanda, M., Owuor, O., Mang'oka, R., Kavoi, M. M. (2004): Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chemistry*, 85, 163-173.

125. Obradović, D., Ristić, G., Karić, A. (2001): Perspektive primene probiotika u industriji mleka. Jugoslovenski mlekarski simpozijum: Savremeni trendovi u mlekarstvu, Vrnjačka Banja, Zbornik radova, 97-98.
126. Obradović, D., Radin, D., Radulović, Z. (2009): *Saccharomyces boulardii* jedini kvasac probiotik, *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 20 (1-2), 3-5.
127. Oda, M., Hasegawa, H., Komastu, S., Kambe, M., Tsuchiya, F. (1983): Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 1623-1625.
128. Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., Shimizu, S. (2005): Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 355-364.
129. Oh, D. K., Hong, G. H., Lee, Y., Min, S., Sin, H. S., Cho, S. K. (2003): Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 907-912.
130. Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A. (2011): Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, 107, 36-40.
131. Omae, M., Maeyama, Y., Nishimura, T. (2008): Sensory properties and taste compounds of fermented milk produced by *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Technology Research*, 14 (2), 183-189.
132. Osada, K., Nagira, K., Teruya, K., Tachibana, H., Shirahata, S., Murakami, H. (1993): Enhancement of interferon- β production with sphingomyelin from fermented milk. *Biotherapy*, 7, 115-123.
133. Østlie, H. M., Helland, M. H., Narvhus, J. A. (2003): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87 (1-2), 17-27.
134. Ota, A. (1999): Protection against an infection disease by enterohaemorrhagic *E. coli* 0-157. *Medical Hypotheses*, 53, 87-88.
135. Ott, A., Fay, L. B., Chaintreau, A. (1997): Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 850-858.
136. Ott, A., Germond, J. E., Chaintreau, A. (2000): Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ^{13}C -labeled precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1512-1517.

137. Paavilainen, S., Korpela, T. (1993): Comparison of high-performance liquid and gas chromatography in the determination of organic acids in culture media of alkaliphilic bacteria. *Journal of Chromatography A*, 634 (2), 273-280.
138. Papadakis, E. N., Polychroniadou, A. (2005): Application of a microwave-assisted extraction method for the extraction of organic acids from Greek cheeses and sheep milk yoghurt and subsequent analysis by ion – exclusion liquid chromatography. *International Dairy Journal*, 15, 165-172.
139. Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., deMan, J. M., Cazzola, F. (1988): Gelation profiles of yogurt as affected by heat treatment of milk. *Journal of Dairy Science*, 71, 582-588.
140. Parodi, P. W. (1979): Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *Journal of Dairy Research*, 46, 75-81.
141. Patocka, G., Cervenkova, R., Narine, S., Jelen, P. (2006): Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 16, 399–405.
142. Pederson, C. S. (1979): *Microbiology of Food Fermentations*. 2nd Edition, Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, USA, pp. 1-29.
143. Permprasert, J., Devahastin, S. (2005): Evaluation of the effects of some additives and pH on surface tension of aqueous solutions using a drop-weight method. *Journal of Food Engineering*, 70, 219-226.
144. Peterson, J., Dwyer, J., Jacques, P., Rand, W., Prior, R., Chui, K. (2004): Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 397-405.
145. Pravilnik o izmenama i dopunama pravilnika o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010): Službeni glasnik Republike Srbije, broj 69.
146. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010): Službeni glasnik Republike Srbije, broj 33.
147. Radulović, Z., Paunović, D., Iličić, M., Mirković, N., Petrušić, M., Obradović, D. (2010): Promena mikroflore čajne gljeve tokom skladištenja fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 21 (1-2), 99-102.
148. Rao, D. R., Reddy J. C. (1984): Effects of lactic fermentation of milk on milk lipids. *Journal of Food Science*, 49, 748–750.
149. Rašić, J. L., Kurmann, J. A. (1983): *Bifidobacteria* and their role: microbiological, nutritional – physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

150. Ray, B. (1996): *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
151. Raya, R. R., de Nadra, M. C., De Ruiz Halgado, A., Oliver, G. (1986): Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 41, 397-399.
152. Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B. (2012): Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4 (2), 124-140.
153. Reiss, J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 198, 258-261.
154. Ricke, S. C. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82, 632-639.
155. Robinson, J. L., Dombrowski, D. B. (1983): Effect of orotic acid ingestion on urinary and blood parameters in humans. *Nutrition Research*, 3 (4), 407-415.
156. Robinson, R. K. (1997): Fermented milks, yogurt. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Robinson, R., Batt, C., Patel, P. D. (eds.), Academic Press, London, UK, pp. 784-791.
157. Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Pereira, C. I., Gomes, A. M., Malcata, F. X., Freitas, A. C. (2011): The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT – Food Science and Technology*, 44 (1), 100-108.
158. Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., Schneedorf, J. M. (2005): Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404-408.
159. Roefs, S. P. F. M., Walstra, P., Dalgleish, D. G., Horne, D. S. (1985): Preliminary note on the change in casein supramolecules caused by acidification. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 39, 119-122.
160. Rohm, H., Kovac, A. (1994): Effects starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels. *Journal of Texture Studies*, 25, 311-329.
161. Rombaut, R., Dewettinck, K. (2006): Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*, 6, 1362-1373.
162. Roncada, P., Piras, C., Soggiu, A., Turk, R., Urbani, A., Bonizzi, L. (2012): Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, 75 (14), 4259-4274.
163. Rysstad, G., Knutsen, W., Abrahamsen, R. (1990): Effect of threonine and glycine on acetaldehyde formation in goats' milk yogurt. *Journal of Dairy Research*, 57, 401-411.
164. Samona, A., Robinson, R. K., Marakis, S. (1996): Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13, 275-280.

165. Sandoval–Castilla, O., Lobato–Calleros, C., Aguirre–Mandujano E., Vernon–Carter, E. J. (2004): Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14 (2), 151–159.
166. Schneedorf, J. M., Anfiteatro, D. (2004): Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas, Carvalho, J. C. T. (ed.), Tecmedd, Ribeirão Preto, Brazil, pp. 443–467.
167. Seto, A., Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. (1997): Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for sucrose as a carbon source. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 735-736.
168. Shengua, H., Ma, Y., Wang, J., Li, Q., Yang, X., Tang, S., Li, H. (2011): Milk fat composition of yak breeds in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (2), 223-230.
169. Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., SchulerSchmid, U., Teuber, M. (1996): Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 590-594.
170. Şimşek, O., Con, A. H., Tulumoğlu, S. (2006): Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17, 263-270.
171. Smulders, F. J., Greer, G. G. (1998): integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: Prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 149-169.
172. Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000): Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (6), 2589-2594.
173. Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2001): Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnologica*, 21 (1), 49-56.
174. Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., Mortlock, R. P. (1996): Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/Kombucha beverage. *Acta Biotechnologica*, 16 (2–3), 199-205.
175. Steventon, A. J., Parkinson, J., Fryer, P. J., Bottomley, R. C. (1990): The Rheology of Yoghurt. In: Rheology of Food, Pharmaceutical and Biological Materials with General Rheology, Carter, R. E. (ed.), Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 196-210.
176. Strap, J. L., Latos, A., Shim, I., Bonetta, D. T. (2011): Characterization of pellicle inhibition in *Gluconacetobacter xylinus* 53582 by a small molecule, pellicin, identified by a chemical genetics screen. *PloS One*, 6 (12), e28015.

177. Surono, S., Hosono, A. (2011a): Fermented Milks – Types and Standards of Identity. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Fuquay, J. W. (ed.), 2nd Edition, Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 470-476.
178. Surono, S., Hosono, A. (2011b): Fermented Milks – Starter Cultures. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Fuquay, J. W. (ed.), 2nd Edition, Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 477-482.
179. Suzuki, I., Kato, S., Kizada, T., Yono, N., Morichi, T. (1986): Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. Characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides and nucleic acid synthesis. *Journal of Dairy Science*, 69, 971-978.
180. Tamime, A. Y., Deeth, H. C. (1980): Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43, 939-977.
181. Tamime, A. Y., Kalab, M., Davies, G. (1984): Microstructure of set-style yoghurt manufactured from cow's milk fortified by various methods. *Food Microstructure*, 3, 83-92.
182. Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2004): *Yoghurt, Science and Technology*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, p.619.
183. Tamime, A. Y. (ed.) (2005): *Probiotic Dairy Products*. Vol. 1, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
184. Tamime, A. Y. (2006): *Fermented Milks*. Blackwell Science Ltd, UK, p. 262.
185. Tamime, A. Y., Hassan, A., Farnworth, E., Toba, T. (2007). Structure of Fermented Milks. In: *Structure of Dairy Products*, Tamime, A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd, UK, pp. 134-169.
186. Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004): Yeast ecology of kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 119-126.
187. Tormo, M., Izco, J. M. (2004): Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy product. *Journal of Chromatography A*, 1033 (2), 305-310.
188. Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. (2011): *Glucanacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1417-1420.
189. Ünal, G., Akalin, A. S. (2013): Influence of fortification with sodium-calcium caseinate and whey protein concentrate on microbiological, textural and sensory properties of set-type yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 66 (2), 264-272.

190. Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., Mattanovich, D. (2006): Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5492-5499.
191. Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., Huys, G. (2006): Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, 16, 1470-1476.
192. Van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G., Boerrigter, I. J. (1986): pH-induced physico-chemical changes of casein supramolecules in milk and their effect on renneting. I. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 281-296.
193. Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., de Vuyst, L. (2004): Biodensity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2), 900-912.
194. Vasbinder, A. J., Alting, A. C., Visschers, R. W., & de Kruif, C. G. (2003): Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal*, 13 (1), 29-38.
195. Visser, J., Minihan, A., Smits, P., Tjan, S., B., Heertje, I., (1986): Effects of pH and temperature on the milk salt system. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 351-368.
196. Vitas, J., Malbaša, R., Grahovac, J., Lončar, E. (2013): The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 19 (1), 129-139.
197. Vitas, J., Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Iličić, M., Kolarov, Lj. (2010): Influence of milk fat content on quality of kombucha fermented milk beverages. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 21 (1-2), 76-81.
198. Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (1999): Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, New York, USA, p. 794.
199. Williams, C. M. (2000): Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49, 165-180.
200. Wu, W., Gai, B., Ji, B. (2004): Study on the isolation and identification of microbes of kombucha. *Food Science*, 25 (4), 55-58.

201. Xu, Z.-M., Emmanouelidou, D. G., Raphaelides, S. N., Antoniou, K. D. (2008): Effects of heating temperature and fat content on the structure development of set yogurt. *Journal of Food Engineering*, 85, 590-597.
202. Yadav, H., Shalini, J., Sinha, P. R. (2007): Production of free fatty acid and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal*, 17, 1006–1010.
203. Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997): The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1244-1251.
204. Yamada, Y., Yukphan, P., Huong, T.L.V., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. (2012): Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 397-404.
205. Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2010): Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 446-455.
206. Yildiz, F. (2010): Overview of Yogurt Manufacturing. In: *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products*, Yildiz, F. (ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-45.
207. Yuguchi, H., Hiramatsu, A., Doi, K., Ida, C., Okonogi, S. (1989): Studies on the flavour of yogurt fermented with Bifidobacteria – Significance of volatile components and organic acids in the sensory acceptance of yogurt. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 60, 734-741.
208. Zhang, Z. Y., Jin, B., Kelly, J. M. (2007): Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251-263.
209. Zhang, H., Zhang, Z., Xin, X. (2011): Isolation and identification of microorganisms from kombucha fungus culture. *Journal of Beijing Union University (Natural Sciences)*, 2, 011.