



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTICAJ SOLI, TEMPERATURE I
STARTER KULTURE NA FIZIČKO-HEMIJSKE I
MIKROBIOLOŠKE PROMENE U TOKU
FERMENTACIJE KUPUSA U GLAVICAMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Aleksandra Tepić Horecki

Kandidat:

Mirna Drašković Berger,
dipl. inž. tehnol.-mast.

Novi Sad, 2021. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Mirna Drašković Berger

AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):

Dr Aleksandra Tepić Horecki, redovni profesor

MN

Naslov rada: NR

Uticaj soli, temperature i starter kulture na fizičko-hemijske i mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa u glavicama

Jezik publikacije:

Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda:

srp. / eng.

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

AP Vojvodina

UGP

Godina:

2021.

industrijskim uslovima, pri različitim uslovima fermentacije: količina dodate soli, različite temperature fermentacije i primena starter kulture. Takođe je prikazana mogućnost primene zbira ranga razlika (eng. Sum of Ranking Differences, SRD), hijerarhijske klaster analize (eng. Hierarchical Cluster Analysis, HCA) i analize glavnih komponenata (eng. Principal Component Analysis, PCA) za opisivanje funkcionalne zavisnosti primenjenih parametara fermentacije i fizičkih, hemijskih i mikrobioloških karakteristika fermentisanog kupusa u glavicama, a sa ciljem određivanja optimalnih uslova fermentacije.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: 27.11.2020.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)

dr Sunčica Kocić-Tanackov, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik

KO

dr Aleksandra Tepić Horecki, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, član, mentor

dr Zdravko Šumić, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, član

dr Branimir Pavlić, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, član

dr Biljana Cvetković, naučni saradnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

Key word documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph documentation

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

PhD thesis

CC

Author:

Mirna Drašković Berger

AU

Mentor:

Dr Aleksandra Tepić Horecki, professor

MN

Title:

Influence of salt, temperature and starter culture on physico-chemical and microbiological changes during cabbage heads fermentation

TI

Language of text:

Serbian (Latin)

LT

Language of abstract:

eng. / srp.

LA

Country of publication:

Republic of Serbia

CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2021
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
PP

Physical description: 7 chapters / 150 pages / 25 figures / 38
tables / 142 references
PD

Scientific field: Biotechnical sciences
SF

Scientific discipline: Technology of plant products
SD

Subject, Key words: Cabbage heads; physico-chemical and
microbiological characteristics; cabbage
fermentation; starter culture; biochemistry
of fermentation; sum of ranking
differences and hierarchical cluster
analysis, principal component analysis.
SKW

UC

Holding data: Library of Faculty of Technology,
University of Novi Sad, 21000 Novi Sad,
Bulevar cara Lazara 1
HD

Note: None
N

Abstract: The research within this thesis includes the
characterization of fresh cabbage hybrid
bravo heads and the examination of
physic-chemical and microbiological
changes during the cabbage heads
fermentation. The obtained results
contribute to the development of a
AB

scientific knowledge base related to the characteristics of fermented cabbage in industrial conditions, under different fermentation conditions: the amount of added salt, different fermentation temperatures and the application of starter culture. The possibility of applying Sum of Ranking Differences (SRD), Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) is also presented in order to describe the functional dependence of the applied fermentation parameters and physical, chemical and microbiological characteristics of fermented cabbage heads, with the aim of determining the optimal fermentation conditions.

Accepted on Senate on:

27.11.2020.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

Dr Sunčica Kocić-Tanackov, Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, president

Dr Aleksandra Tepić Horecki, Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member, menthor

Dr Zdravko Šumić, Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member

Dr Branimir Pavlić, Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member

Dr Biljana Cvetković, Research Associate, Scientific Institute of Food Technology, University of Novi Sad, member

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	5
2.1. Kupus (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	5
2.1.1. Botaničke karakteristike, hemijski sastav i značaj	7
2.1.2. Mikrobiološka oboljenja kupusa	11
2.1.3. Odlike kvaliteta kupusa bitne za fermentaciju	13
2.2. Fermentacija kupusa	15
2.2.1. Priprema sirovine.....	16
2.2.2. Uticajni faktori.....	17
2.2.3. Faze fermentacije.....	19
Greške kod fermentacije kupusa.....	21
2.3. Starter kulture	22
2.3.1. Kiselo-mlečne starter kulture	23
2.3.2. Uticaj starter kulture na proces fermentacije	27
2.4. Biohemija fermentacije i njeni fenomeni	28
2.4.1. Fizičko-hemijske promene u toku fermentacije kupusa	29
2.4.1.1. Metabolizam šećera	30
2.4.1.2. Organske kiseline i promena ukupne kiselosti	34
2.4.1.3. Antioksidativna aktivnost	36
2.4.1.4. Tekstura i promena boje	37
2.4.1.5. Biogeni amini	38
2.4.1.6. Ukupna suva materija, aktivnost vode i sadržaj soli	40
2.4.2. Mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa	42
3. EKSPERIMENTALNI DEO	45
3.1. Materijal	45
3.2. Metode.....	46
3.2.1. Proces fermentacije u industrijskim uslovima.....	46
3.2.2. Fizičko-hemijske analize svežeg i fermentisanog kupusa.....	49
3.2.2.1. Sadržaj ukupne i rastvorljive suve materije.....	50
3.2.2.2. Sadržaj masti	50
3.2.2.3. Sadržaj proteina	50
3.2.2.4. Sadržaj celuloze (sirovih vlakana).....	51

3.2.2.5. Ukupna kiselost	51
3.2.2.6. Sadržaj ukupnih šećera.....	51
3.2.2.7. Sadržaj soli	51
3.2.2.8. pH vrednost	51
3.2.2.9. Aktivnost vode	51
3.2.2.10. Sadržaj ukupnih fenola.....	52
3.2.2.11. Antioksidativna aktivnost.....	52
3.2.2.12. Sadržaj askorbinske kiseline	53
3.2.2.13. Sadržaj organskih kiselina.....	54
3.2.2.14. Teksturalne karakteristike i ukupna promena boje	54
3.2.2.15. Sadržaj biogenih amina	57
3.2.2.16. Senzorska ocena	58
3.2.3. Mikrobiološke analize.....	58
3.2.3.1. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	58
3.2.3.2. Ukupan broj kvasaca i plesni	58
3.2.3.3. Ukupan broj <i>Enterobacteriaceae</i>	59
3.2.3.4. Ukupan broj bakterija mlečne kiseline.....	59
3.2.4. Statistička analiza.....	59
4. REZULTATI I DISKUSIJA	61
4.1. Karakterizacija svežeg kupusa hibrida bravo.....	61
4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike svežeg kupusa	62
4.1.2. Mikrobiološki profil svežeg kupusa.....	65
4.2. Fizičko-hemijske i mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa u glavicama	65
4.2.1. Promena suve materije u toku fermentacije kupusa.....	66
4.2.2. Ukupna kiselost u uzorcima fermentisanog kupusa.....	72
4.2.3. Sadržaj ukupnih šećera u uzorcima fermentisanog kupusa.....	75
4.2.4. Sadržaj soli u uzorcima fermentisanog kupusa	80
4.2.5. Promena pH vrednosti u toku fermentacije kupusa	84
4.2.6. a_w vrednost fermentisanog kupusa	87
4.2.7. Sadržaj ukupnih fenola u glavicama fermentisanog kupusa hibrida bravo.....	90
4.2.8. Antioksidativna aktivnost i sadržaj askorbinske kiseline u toku fermentacije kupusa hibrida bravo	92
4.2.9. Sadržaj organskih kiselina u toku fermentacije kupusa	100
4.2.10. Uticaj fermentacije na teksturalne karakteristike listova kupusa	111
4.2.11. Ukupna promena boje listova kupusa u toku fermentacije	114

4.2.12. Sadržaj biogenih amina u toku fermentacije kupusa hibrida bravo.....	117
4.2.13. Mikrobiološki parametri tokom fermentacije kupusa hibrida bravo	119
4.2.14. Senzorska ocena fermentisanih glavica kupusa.....	122
4.2.15. Hemometrijska analiza primenjena na ogled iz fermentacije kupusa 2015. godine	126
5. ZAKLJUČAK.....	130
6. LITERATURA	135
7. PRILOG	149

1. UVOD

Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) predstavlja značajnu povrtarsku kulturu prema obimu proizvodnje i potrošnje. Visok stepen proizvodnje uslovljen je velikom potrošnjom i relativno niskom cenom kupusa na tržištu. Pored ekonomskih razloga, ova povrtarska namirnica veoma je važna u ishrani i sa zdravstvenog aspekta. Kupus može biti konzumiran u svežem stanju, kivan, sušen i fermentisan. Pored nabrojanih mogućnosti upotrebe kupusa u ishrani koja je omogućena tokom čitave godine, lekovita svojstva iskorišćena su i u medicinske svrhe. Kupus je pogodan zbog niske kalorične vrednosti, sadržaja minerala i vitamina. Interesantno je napomenuti da je vitamin U prvi put pronađen u kupusu.

Fermentacija kupusa je dobro poznat proces još iz antičkog doba, međutim, tada su listovi svežeg kupusa potapani u voćne sokove, vino ili sirće. Kasnije su ove tečnosti bile zamenjene solju, što se i danas praktikuje. Proces fermentacije kupusa baziran je na principima kiselo-mlečne fermentacije, gde se šećeri prisutni u glavicama kupusa prevode u kiseline zahvaljujući mikrobiološkoj aktivnosti, a fermentisani kupus dobija potpuno nove karakteristike u poređenju sa sirovim kupusom. Biološkim procesom kao što je fermentacija kupusa dobija se proizvod sa produženim rokom trajanja, poboljšanim hranljivim vrednostima i specifičnim senzorskim

karakteristikama, ukusom i mirisom, a da je pri tome izbegnuta upotreba hemijskih konzervanasa i visokih temperatura.

Fermentisani kupus se tradicionalno proizvodi u domaćinstvima u celoj Srbiji, dok je vojvođansko naselje Futog poznato po proizvodnji fermentisanog kupusa i kupusa generalno. Smatra se da je futoški kupus kultivisan još u 18. veku, a danas je na široko poznat kao sorta sa zaštićenim geografskim poreklom. U srpskim domaćinstvima kupus se tradicionalno fermentiše u obliku celih glavica ili sečen na tanke rezance, poznatiji kao ribanac. Fermentisani kupus smatra se vrlo važnom namirnicom u ljudskoj ishrani, s obzirom da sadrži bioaktivne komponente koje poseduju antioksidativne karakteristike i pozitivno utiču na zdravlje ljudi.

Industrijska proizvodnja fermentisanog kupusa započinje odabirom svežeg materijala, koji će poslužiti kao supstrat. U ove svrhe isključivo se koristi beli kupus zbog blagog, slatkastog ukusa i optimalnog sadržaja fermentišućih šećera. U cilju fermentacije uglavnom se upotrebljavaju kasne sorte kupusa, koje se odlikuju većim sadržajem suve materije i šećera. Poznat je veliki broj sorti i hibrida kupusa koje se mogu upotrebljavati za proces fermentacije u industrijskim uslovima, a hibridi kupusa se naročito primenjuju zbog ujednačenosti glavica, boljeg prinosa i dobrih mogućnosti čuvanja.

Osnovni zahtev za uspešan proces fermentacije kupusa u glavicama je omogućavanje povoljnih uslova sredine koji će pospešiti rast bakterija mlečne kiseline, a inhibirati rast nepoželjne mikropopulacije. Selekcija se može izvršiti na osnovu samo nekoliko uticajnih faktora – temperatura, so i anaerobni uslovi. Međutim, pored navedenih osnovnih uticajnih faktora, primena sojeva mikroorganizama odgajenih u specijalno kontrolisanim laboratorijskim uslovima, poznatih kao starter kulture, u cilju iniciranja procesa fermentacije, može biti pogodna za kontrolu procesa u proizvodnji fermentisanog kupusa u glavicama. Dodatno, upotreba starter kultura, izolovanih iz svežeg ili fermentisanog povrća i prilagođenih specifičnoj biljnoj matrici, mogla bi produžiti rok upotrebe i uticati povoljno na senzorske i funkcionalne karakteristike fermentisanog kupusa u glavicama.

Ispitivanje fizičko-hemijskih i mikrobioloških promena fermentisanog kupusa u glavicama u industrijskim uslovima uz primenu starter kulture predstavlja nedovoljno istraženu oblast. S obzirom na značaj fermentisanog kupusa u ishrani, veoma je bitno odrediti korelaciju između primenjenih parametara fermentacije i fizičkih, hemijskih i mikrobioloških karakteristika gotovog proizvoda. Ispitivanja uticaja procesnih parametara na fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike fermentisanog kupusa u glavicama značajna su za dobijanje mogućih vrednih podataka prilikom odabira najpovoljnijih uslova za tehnološki postupak procesa fermentacije. Utvrđivanjem funkcionalne zavisnosti između procesnih parametara i fizičkih, hemijskih i mikrobioloških karakteristika, uz mogućnost primene statističkih analiza, može se dobiti osnova za optimizaciju procesa fermentacije, a u ciju maksimalnog očuvanja vrednih nutritivnih i senzornih karakteristika fermentisanog kupusa u glavicama.

Cilj istraživanja u okviru ove disertacije je fizičko-hemijska i mikrobiološka karakterizacija svežeg kupusa hibrida bravo, kao i praćenje uticaja tri različita parametra – soli, temperature i starter kulture na fizičko-hemijske i mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa u glavicama. Ogledi iz fermentacije kupusa 2015, 2016. i 2017. godine postavljeni su u industrijskim uslovima. Plan ogleđa iz fermentacije kupusa u glavicama hibrida bravo 2015. godine izveden je na osnovu Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (BBD) sa tri numerička faktora na tri nivoa, odnosno trinaest slučajnih ponavljanja. Fizičko-hemijska svojstva fermentisanog kupusa analizirana su univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) da bi se utvrdile statistički značajne promenljive za razlikovanje uzoraka. Statistička obrada podataka preko zbira ranga razlika (engl. Sum of Ranking Differences, SRD) i hijerarhijske klaster analize (engl. Hierarchical Cluster Analysis, HCA) poslužile su za određivanje optimalnih uslova fermentacije u pogledu antioksidativne aktivnosti i sadržaja askorbinske kiseline. Takođe, primenjena je i analiza glavnih komponenata (engl. Principal Component Analysis, PCA) da bi se ispitali uzorci glavica kupusa koje su fermentisane u različitim uslovima, kao i korelacija između ispitivanih fizičkih i hemijskih parametara.

Cilj ogleđa iz fermentacije kupusa 2016. godine bio je određivanje fizičko-hemijskih karakteristika kupusa u glavicama hibrida bravo i rasola fermentisanih pri različitim

temperaturnim intervalima i njihovo poređenje sa uzorkom svežeg kupusa. Ogled iz fermentacije kupusa 2016. godine postavljen je i u cilju poređenja fizičko-hemijskih karakteristika fermentisanog kupusa hibrida bravo sa rezultatima dobijenim u ogledu iz prethodne fermentacije kupusa 2015. godine. Kao i u prethodnom ogledu, i u ovom slučaju fizičko-hemijska svojstva fermentisanog kupusa analizirana su univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) da bi se utvrdile statistički značajne promenljive za razlikovanje uzoraka “Tukey’s honest significance” testom i $\alpha = 0,05$ kriterijumom (p-vrednost $< 0,05$ predstavlja značajnu razliku) korišćenjem programa Statistica 10.

Ogled iz fermentacije kupusa 2017. godine izvršen je sa ciljem poređenja rezultata fizičko-hemijskih i senzorskih svojstava različitih sorti/hibrida kupusa u glavicama. Proces fermentacije praćen je i u cilju određivanja završne tačke fermentacije pri različitim uslovima sredine. Temperatura fermentacije merena je u toku procesa fermentacije dok su promenljive bile slani rastvor, rasol iz prethodne fermentacije, starter kultura, kao i sorta, odnosno hibrid kupusa. U ove svrhe korišćena je sorta kupusa futoški, kao i hibridi kupusa tenisiti i bravo. Pored navedenog, vršeno je i poređenje rezultata fizičko-hemijskih svojstava sa uzorcima svežeg kupusa navedenih sorti/hibrida, kao i sa rezultatima dobijenim iz prethodnih fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine. Fizičko-hemijska svojstva fermentisanog kupusa u glavicama analizirana su univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) da bi se utvrdile statistički značajne promenljive za razlikovanje uzoraka “Tukey’s honest significance” testom i $\alpha = 0,05$ kriterijumom (p-vrednost $< 0,05$ predstavlja značajnu razliku) korišćenjem programa Statistica 10.

2. OPŠTI DEO

2.1. KUPUS (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) je dvogodišnje povrće koje spada u porodicu kupusnjača, odnosno krstašica. Biljka formira vegetativne organe, odnosno lisnu rozetu ili glavicu u prvoj godini, dok se u drugoj godini razvijaju generativni organi, odnosno cvetonosno stablo koje daje plod i seme. Poznate su dve forme kupusa, beli kupus “alba” i crveni kupus “rubra”. Ova veoma značajna povrtarska kultura u ishrani se koristi u svežem stanju, kao i u raznim prerađevinama. Kod kupusa se u ishrani koristi glavica, koja može biti u svežem obliku, fermentisana, pipremljena kao varivo, marinirana, sušena, konzervirana ili zamrznuta (Červenski, 2010; Harbaum-Piayda i sar., 2016).

Kupus je u ishrani prisutan još od perioda pre nove ere i spada među najstarije konzumirano povrće. Istorijski i botanički zapisi svedoče o tome da je korišćen za ishranu još u periodu od 4000 godina pre nove ere. Prve forme koje su u literaturi opisane podsećale su na današnje raštane, imale su slabo formiranu i mekanu glavicu. Beli kupus se pominje na pergamentima koji datiraju čak od 1000 godina pre nove ere, kada je korišćen kao lek protiv

ćelavosti. Postepeno, gajenjem, ljudi su birali biljke koje su imale najpoželjnije karakteristike i na taj način izvršena je selekcija kupusa. Formirani su različiti tipovi koji su se razlikovali po fizičkim i hemijskim karakteristikama, odnosno izdiferencirani su različiti varijeteti unutar jedne vrste (*Brassica oleracea* L.). Smatra se da je kupus kod koga je glavica okruglog oblika stariji oblik od kupusa špicastog (konusni oblik) ili spljoštenog oblika glavice, sa čijim se gajenjem krenulo na kraju 17. i početkom 18. veka (Červenski i Medić-Pap, 2018).

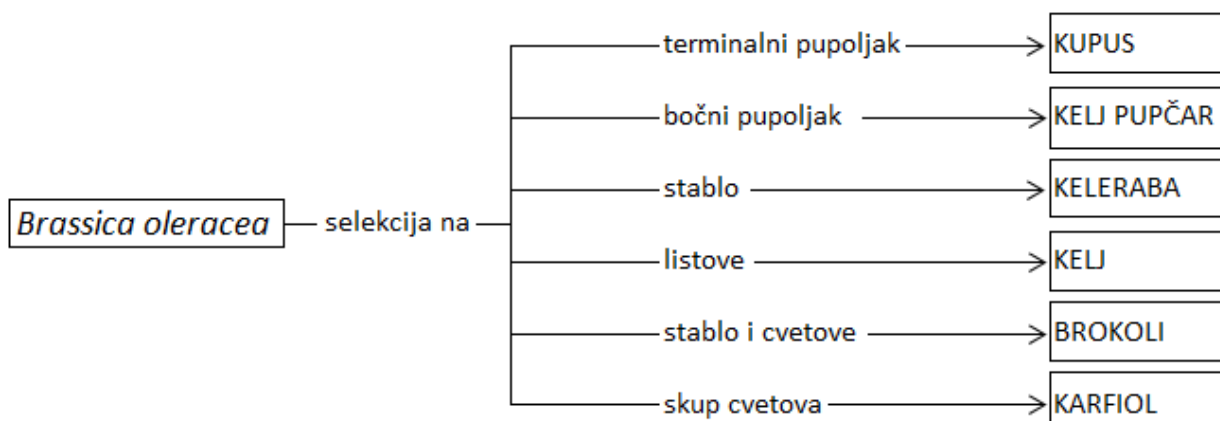
Veliku rasprostranjenost kupusa obezbeđuje njegova veoma dobra prilagodljivost na različite uslove gajenja, što potiče od činjenice da se kod kupusa selekciji podvrgavaju vegetativni organi, a oni su mnogo prilagodljiviji od reproduktivnih organa (Mirecki, 2001). Proizvodnja kupusa je uglavnom locirana u rečnim dolinama (Ivanović, 2004), jer su područja sa vlažnom i hladnom klimom pogodnija za uzgoj ove značajne namirnice. Kupus kao sirovina veoma dobro podnosi mraz i u toplijim predelima uglavnom se uzgaja u toku zime i u rano proleće (Chiang i sar., 1993). Prema obimu proizvodnje i potrošnje u Republici Srbiji kupus predstavlja značajnu povrtarsku kulturu. Prosečna površina pod kupusom i prinos u Republici Srbiji u periodu od 2004. do 2013. godine iznosili su 20840 ha, odnosno 14 t po hektaru (Červenski i Medić-Pap, 2018). Površina pod kupusom i drugim kupusnjačama (izuzev karfiola i brokolija) na svetskom nivou 2019. godine iznosila je 2446294 ha, dok je prinos bio 29 t po hektaru (faostat.fao.org).

Optimalna temperatura za rast kupusa kreće se između 15 °C i 17 °C, dok otpornost prema mrazu zavisi od faze rasta i razvića. Biljka je najosetljivija u fazi nicanja i u drugoj godini u vreme cvetanja i plodonošenja, kada i na 1 °C mogu izmrznuti cvetovi i tek formirano seme. Velike potrebe za vlagom primećuju se u svim fazama razvoja, a naročito u toku zavijanja i rasta glavice. Navodnjavanje u toku leta i u ranu jesen je obavezna agrotehnička mera. Pored vlage, kupus zahteva i mnogo svetlosti, u protivnom glavice ostaju sitne i rastresite. Potrebe za svetlošću su najveće u fazi mladih biljaka rasada i u fazi obrazovanja lišća. Za gajenje kupusa najpogodnija su neutralna do slabo kisela zemljišta, gde se vrednosti kreću od pH 5,5 pa do pH 6,8. Kasne sorte i hibridi zahtevaju teža, plodnija i vlagom dobro obezbeđena zemljišta, dok su laka i peskovita zemljišta pogodnija za rane sorte kupusa. Potrebe kupusa za hranljivim

materijama su veoma velike, uglavnom se dobijaju najbolji rezultati ukoliko se upotrebe i organska i mineralna đubriva. Posle gajenja kupusa zemljište ostaje nezakorovljeno, pa je dobar predusev za većinu povrtarskih vrsta. Kod nas se gaji najčešće postrno posle ječma, mladog krompira, graška i pšenice. Kupus je potrebno gajiti u plodoredu, jer u protivnom veoma često strada od bolesti i štetočina (Ivanović, 2004).

2.1.1. Botaničke karakteristike, hemijski sastav i značaj

Kupus vodi poreklo od lisnatog kupusa, od koga su diferencijacijom nastale i ostale kupusnjače. Tokom hiljadu godina ljudi su birali i gajili kupusnjače sa najpoželjnijim karakteristikama te su nastali različiti varijeteti unutar jedne vrste (slika 2.1). Porodica kupusnjača pored kupusa obuhvata kelj pupčar, kelerabu, kelj, brokoli i karfiol (Červenski, 2010).



Slika 2.1. Šematski prikaz selekcije kupusnjača

Koren kupusa je dobro razvijen, vretenaste građe, sastoji se od nekoliko debljih žila iz kojih izbijaju bočne žile. Najveća masa korena koncentrisana je u zemljištu do 50 cm dubine, a samo pojedinačne žile prodiru i do 1,5 m dubine. Koren se brzo regeneriše, što je veoma značajno za opstanak rasada pri lošijim uslovima rasađivanja (Ivanović, 2004).

Stablo kupusa je kratko i zbijeno, poznatije kao kočan. Deo stabla od korena do glavice naziva se spoljašnji kočan i uslovljava visinu biljke, dok se unutrašnji kočan nalazi u samoj

glavici i od njega zavisi kvalitet, odnosno zbijenost glavice. Što je unutrašnji kočan kraći, to je veći broj listova, a glavica je čvršća i obrnuto (Červenski, 2010).

Listovi kupusa su prosti, donji su na drškama, a gornji su sedeći. Oblik lista može biti gladak ili naboran. List ima različit oblik nervature, koja može biti fina i gruba. Ukoliko je nervatura listova nežnija, bolji je kvalitet kupusa. Boja listova može biti bela, krem, svetlo-žuta, svetlo-zelena ili ljubičasta, dok ukus može biti sladak ili slabo ljut. Listovi formiraju rozetu različitog prečnika, koja može dosežati i preko 90 cm kod krupnih sorti kupusa (Ivanović, 2004; Červenski, 2010).

Formiranje glavice nastupa nakon formiranja 15 do 20 listova kupusa, kao rezultat rasta terminalnog pupoljka pri usporenom rastu listova. Glavica može biti različitog oblika (od okruglog do izduženog), različite težine, veličine i čvrstine (Červenski, 2010). Kompaktnost glavice zavisi od brzine rasta stabla i listova kupusa. Brzina rasta stabla i listova je u tesnoj vezi sa načinom đubrenja u toku vegetacije. Ukoliko se više koriste azotna đubriva, a manje kalijumova, glavice će biti rastresitije, zelene boje sa većim brojem gram-negativnih bakterija. Sa druge strane, ako se više koriste kalijumova đubriva, dobijaju se kompaktne glavice, bele boje, ali nešto sitnije veličine (Dekić, 2011). U glavici se nagomilavaju rezervne materije (Červenski, 2010).

Cvetonosno stablo izbija iz pupoljaka, prvo iz temenog, a zatim i iz bočnih pupoljaka, u toku druge godine. Cvetonosno stablo je razgranato i izrasta u visinu od 1 m do 1,5 m u proseku. Cvetovi izbijaju na vrhu stabla u obliku grozdaste cvasti, sastoje se od po četiri čašična i krunična lista. Listovi krunice raspoređeni su u obliku krsta, odakle potiče naziv porodice krstašica. Cvetonosno stablo je veoma razgranato i daje oko 3000 do 4000 cvetova, a cvetanje traje 20 do 50 dana. Cvet je žute boje sa šest prašnika, tučak se sastoji od dva oplodna listića. Oprašivanje se vrši uz pomoć insekata (Ivanović, 2004).

Plod predstavlja ljuska koja ima u sebi od 3 do 10 komada semenki i duga je od 8 do 12 cm. Ljuska sadrži centralnu placentu, na kojoj se sa obe strane u nizu nalazi raspoređeno seme. Kada ljuska sazri, lako puca na dva šava i seme ispada (Ivanović, 2004; Červenski, 2010).

Zrelo seme je okruglog ili jajastog oblika, prečnika od 1 do 2 mm, tamno smeđe boje. Nedozrelo seme je crno, dok je prezrelo plavičaste boje. Apsolutna težina semena je od 2 do 4 g, klijavost semena može da se čuva 3 do 4 godine (Ivanović, 2004).

Pored navedenih botaničkih karakteristika, bitno je posebno istaći hemijski sastav i značaj glavica kupusa. Kupus zauzima istaknuto mesto među povrćem s obzirom da ga ljudi gotovo svakodnevno upotrebljavaju u ishrani. Smatra se ukusnom i hranljivom namirnicom zahvaljujući sadržaju osnovnih hranljivih materija, vitamina i minerala (Maksimović, 2005) čije vrednosti su predstavljene u tabeli 2.1.

Značaj koji kupus zauzima u ishrani, pored mogućnosti korišćenja tokom cele godine kao svež, ukišeljjen ili sušen, potiče i od lekovitih svojstava koja su iskorišćena u medicinske svrhe, zatim niske kalorične vrednosti, sadržaja vitamina i minerala. Svež kupus sadrži u proseku 24-28 kalorija na 100 g (Ivanović, 2004). Što se sadržaja vitamina tiče, svež kupus sadrži najviše vitamina C, a manje vitamina A, B1, B2, B5, B6, E, kao i prvi put pronađen kod kupusa, vitamin U. Drugo ime pod kojim je vitamin U poznat je brasicin. Prema Mehta i sar. (2012), sadržaj vitamina C može da iznosi oko 30 mg/100 g sveže sirovine, što sprečava potamnjanje kupusa. Vitamin U pomaže u smanjenju bolova kod obolelih od čira na želucu. Smatra se da ovaj vitamin pomaže u otklanjanju čireva, kako spoljašnjih na koži, tako i unutrašnjih, na želucu i dvanaestopalačnom crevu. Vitamin U je dobio ime od skraćenice latinske reči *ulcus*, što u prevodu znači čir (Červenski, 2010). Pored hemijskog sastava navedenog u tabeli 2.1, korisno je napomenuti da biljke iz roda krstašica u ćelijskim vakuolama sadrže i glukozinolate. Glukozinolati su jedinjenja koja sama po sebi nisu biološki aktivna. Međutim, usled mehaničkih povreda nastalih žvakanjem, nagnječenjem ili mržnjenjem enzim mirozinaza hidrolizuje glukozinolate do nestabilnog intermedijera od koga se, daljom razgradnjom, dobijaju različiti proizvodi – izotiocijanati, tiocijanati, nitrili i epitionitrili (Jay i sar., 2005; Dekić, 2011; Palani i sar., 2016).

Tabela 2.1. Hemijski sastav svežeg belog i crvenog kupusa (Červenski, 2010)

Hemijski sastav		Beli kupus	Crveni kupus
	Suva materija	7,85	9,61
Sadržaj osnovnih hranljivih materija [%]	Masti	0,12	0,16
	Proteini	1,44	1,43
	Celuloza	2,30	2,10
	Šećer	3,58	3,91
Sadržaj vitamina [mg/100 g]	A (IU)	171	1116
	B1	0,050	0,064
	B2	0,040	0,069
	B5	0,300	0,418
	B6	0,096	0,209
	C	32,200	57,000
	E	0,150	0,110
	U	7,040	/
Sadržaj mineralnih materija [mg/100 g]	Ca	47,00	45,00
	Fe	0,59	0,80
	Na	18,00	27,00
	Mg	15,00	16,00
	P	23,00	30,00
	Se (µg)	0,90	0,60
	K	246,00	243,00
	Zn	0,18	0,22
J	0,01	0,01	

IU*- 1 IU=0,30 mikrograma

Izotiocijanati i druga sumporna jedinjenja poreklom iz *Brassica* povrća poseduju antioksidativnu, antifungalnu i antibakterijsku aktivnost (Jay i sar., 2005; Palani i sar., 2016).

Epidemiološke studije pokazale su da redovna konzumacija povrća iz roda *Brassica*, uključujući kupus, brokoli, karfiol, kelj i kelj pupčar, smanjuje rizik od različitih tipova kancerogenih oboljenja (Ciska i Pathak, 2004). Pozitivna korelacija između konzumiranja *Brassica* povrća i rizika od oboljenja postoji uglavnom zahvaljujući prisustvu ove jedinstvene grupe sekundarnih metabolita koji su dobili ime glukozinolati (Palani i sar., 2016).

2.1.2. Mikrobiološka oboljenja kupusa

Bolesti kupusa mogu da budu mikrobiološkog porekla ili da nastanu usled vremenskih nepogoda i nedostatka hranljivih materija u zemljištu. Oboljenje se može javiti na svim delovima biljke i u bilo kojoj fazi razvoja. Visoke temperature, navodnjavanje zemljišta, period razvića do obrazovanja semena, kao i često gajenje kupusa na istom mestu iz godine u godinu, pogoduju razvoju mikroorganizama koji izazivaju njegovo kvarenje. Prema tome, mikrobiološka oboljenja predstavljaju značajan ograničavajući faktor za uspešno gajenje ovih povrtarskih kultura. Mikrobiološka oboljenja kupusa mogu biti gljivičnog, bakterijskog i virusnog porekla. U najrasprostranjenija gljivična oboljenja spada kila kupusa, plamenjača, bela rđa, pepelnica i crna pegavost (Vukojević i Duletić-Laušević, 2004). Među oboljenjima izazvanim patogenim bakterijama izdvajaju se crna i vlažna trulež kupusa (Červenski i Gvozdenović, 2007; Červenski, 2010).

Najrasprostranjenija bolest kupusa je kila kupusa koju izaziva gljiva iz grupe zemljišnih patogena, *Plasmodiophora brassicae*. Simptomi koji se javljaju usled ovog gljivičnog oboljenja manifestuju se kao abnormalno povećanje korena i podzemnih delova stabla. Kile mogu biti izolovane na delovima korena ili pokrivati ceo korenov sistem. Pri infekciji većih razmera javljaju se i nadzemni simptomi u vidu uvelih, žučkastih listova, a donji listovi mogu i da pootpadaju. Inficirane glavice kupusa zaostaju u rastu, smanjuje se veličina i kvalitet glavica (Chiang i sar., 1993; Vukojević i Duletić-Laušević, 2004). Ostala gljivična oboljenja – plamenjaču, belu rđu, pepelnicu i crnu pegavost – izazivaju *Peronospora parasitica*, *Albugo candida*, *Erysiphe cruciferarum* i *Alternaria brassicae*, redom. Navedeni mikroorganizmi spadaju u grupu folijalnih patogena. Za razliku od simptoma bolesti kile kupusa, kod ovih

oboljenja simptomi se javljaju na nadzemnim biljnim delovima, posebno na listovima biljke (Brophy i Laing, 1992; Vukojević i Duletić-Laušević, 2004).

Među ekonomski najštetnije bolesti kupusnjača spada oboljenje pod nazivom crna trulež. Patogena bakterija *Xantomonas campestris* pv. *campestris*, uzročnik oboljenja, održava se u zaraženim biljnim ostacima 2 do 3 godine, zatim u semenu i nekim korovima. Mikroorganizam se širi preko vode za navodnjavanje i kišnih kapi, dok značajnu ulogu u širenju infekcije imaju i insekti, puževi golaći i oruđe za rad. Kupusnjače mogu biti zaražene u bilo koje vreme tokom razvoja, od faze klijanja do obrazovanja semena. Oboljenje se manifestuje kod rasada u vidu crnjenja duž kotiledonih listića koji venu, suše se i opadaju. Bolest se može proširiti i na stabljiku koja dobija staklast izgled, povija se, razmekšava i trune (Červenski i Gvozdenović, 2007). Karakterističan simptom u vidu žute pege koja se sužava idući duž nerava ka centralnom lisnom nervu, javlja se na ivici lišća kod starijih biljaka. Tkivo u okviru pege se postepeno suši, dok lisni nervi postaju gotovo crne boje. Bakterija preko lisnih nerava prodire u peteljke, stablo i koren. Donji listovi obolelih glavica opadaju, a glavice ostaju zakrčljale (Červenski, 2010). Među oboljenjima izazvanim patogenim bakterijama izdvaja se i bolest vlažna trulež. Ovu bolest biljaka iz porodice kupusnjača izaziva patogena bakterija *Erwinia carotovora*. Do oboljevanja biljaka dolazi naročito nakon obilnih padavina, usled oštećenja uzrokovanih mrazom ili nakon najezde insekata. Kod kupusa trulež se manifestuje na listovima glavice uz propratni neprijatan miris. Oboleli delovi biljke poprimaju vlažan izgled, lisni nervi dobijaju boju meda i razmekšavaju se, a zatim tkivo počinje da tamni. Često je slučaj da do ispoljavanja navedenih simptoma dođe tek u toku skladištenja sirovine. Berbu je potrebno vršiti kada je vreme suvo, a nakon berbe glavice držati na rashlađenom mestu (Červenski, 2010).

U cilju proizvodnje zdrave sirovine koja je preduslov za dalju preradu, od velike je važnosti preduzeti određene mere zaštite, kako na njivi, tako i u skladišnim prostorima. Neke od preventivnih mera koje je neophodno sprovesti u suzbijanju oboljenja su upotreba zdravog semena i rasada, primena i kontrola plodoređa, drenaža zemljišta, uništavanje korova i zaraženih biljaka u usevu. Među mere kontrole spada i uništavanje insekata i glodara, izbegavanje

mehaničkih oštećenja, kao i uklanjanje obolelih biljaka (Vukojević i Duletić-Laušević, 2004; Červenski, 2010).

2.1.3. Odlike kvaliteta kupusa bitne za fermentaciju

Odlike kvaliteta kupusa koje su bitne kao preduslov za uspešnu fermentaciju ogledaju se pre svega u kvalitetu sveže sirovine, odabiru sorte i sastavu prirodno prisutne mikropopulacije (Mehta i sar., 2012; Ray i Montet, 2015).

Glavice kupusa namenjene za fermentaciju trebalo bi da budu krupne, sa belim kompaktnim listovima, otpornim na pucanje i tamnjenje. Ukoliko se za fermentaciju upotrebe glavice koje poseduju zelene listove, slabo zbijene i sa niskim sadržajem šećera, dobiće se proizvod koji je oštrog mirisa i gorkog ukusa (Mehta i sar., 2012). Sa druge strane, ako se za preradu koriste prezrele glavice, može doći do nepoželjnog omekšavanja tkiva (Niketić-Aleksić, 1988). Kupus namenjen za proizvodnju treba da bude tehnološki zreo, odnosno da glavica dostigne određenu krupnoću, čvrstinu i da sadrži nekoliko ovojnih listova (Hutkins, 2006). Vremenski period u kome kupus zadržava tehnološku zrelost zavisi od spoljne temperature (leti je kraći, dok je u jesen duži). Berbu treba obaviti pre nego što spoljna temperatura padne ispod 5 °C. Berbu po kišovitom vremenu potrebno je izbegavati, jer se tada kupus lako kvvari, a glavice je potrebno seći ostrim noževima. Nož za berbu potrebno je da bude oštar, jer se tako umanjuje broj pokušaja pri sečenju, a na taj način se izbegavaju oštećenja glavica kupusa, kao i rizik od povreda berača. Glavice je najbolje odlagati u sanduke (Ivanović, 2004; Červenski i Medić-Pap, 2018). Kupus je moguće skladištiti određeni vremenski period do prerade. Temperatura hladnog skladišta potrebno je da bude oko 0 °C, a relativna vlažnost vazduha iznad 90%. U tabeli 2.2 dato je maksimalno vreme skladištenja za zeleni i beli kupus. Odstupanja od prikazanih vrednosti moguća su u zavisnosti od sorte (Aked, 2002).

Tabela 2.2. Vremenski period skladištenja glavica kupusa u odnosu na temperaturu i relativnu vlažnost vazduha (Aked, 2002)

Sirovina	Temperatura [°C]	Vlažnost vazduha [%]	Vreme skladištenja
Zeleni kupus	0-1	95-100	3 meseca
Beli kupus	0-1	95-100	6-7 meseci

Proizvodnja fermentisanog kupusa, kao što je napomenuto, započinje odabirom svežeg materijala, koji će poslužiti kao supstrat. Postoje brojne sorte kupusa, ali beli kupus se isključivo koristi zbog blagog, slatkastog ukusa i sadržaja fermentišućih šećera od oko 5%, sa skoro jednakim odnosom glukoze i fruktoze i malom količinom saharoze (Hutkins, 2006). U cilju fermentacije uglavnom se upotrebljavaju kasne sorte kupusa, koje se odlikuju većim sadržajem suve materije i šećera, čiji sadržaj treba da bude minimalno 3% (Niketić-Aleksić, 1988). U današnje vreme sorte kupusa koje se u Srbiji često koriste za fermentaciju su futoški, srpski melez, orion, rubin itd. Ove sorte kupusa su veoma pogodne za proces fermentacije, zahvaljujući optimalnom sadržaju šećera unutar glavica (Červenski, 2010). Poznat je veliki broj sorti i hibrida kupusa koji se mogu upotrebljavati za različite namene. Hibridi kupusa se naročito široko gaje zbog ujednačenosti glavica, boljeg prinosa i dobrih mogućnosti čuvanja (Niketić-Aleksić, 1988; Cvetković, 2014). Najpogodnije domaće sorte kupusa za fermentaciju su futoški, koji je dominantan u Vojvodini, i srpski melez, popularan u centralnoj Srbiji (Niketić-Aleksić, 1988; Červenski, 2010). Sorta kupusa futoški ima veoma dobar prinos, a preporučeno vreme berbe je u kasnu jesen. Glavice kupusa sorte futoški su okrugle i čvrste. Boja spoljašnjih listova futoškog kupusa je zelena, dok je boja unutrašnjosti glavice bela (Červenski, 2004). Pored domaćih sorti, hibridi kupusa nalaze široku primenu u srpskim poljoprivrednim gazdinstvima. Hibrid bravo često se primenjuje u procesu fermentacije zahvaljujući uniformnosti glavica, boljem prinosu i dobrim karakteristikama prilikom skladištenja. Kupus hibrida bravo ima plavo-zelene ovojne listove. Glavice su okrugle, a listovi su tesno zbijeni, što je preduslov za uspešan proces fermentacije. Kupus bravo je pogodan za konzumaciju kako u fermentisanom tako i u sirovom stanju, sa preporučenim periodom berbe u kasnu jesen (Cvetković, 2014). Kupus hibrida tenisiti, takođe nalazi primenu u srpskim poljoprivrednim gazdinstvima i koristi se za proces

fermentacije. Tenisiti je kupus tople sezone sa jakim ovojnim listovima. Glavice kupusa tenisiti su okrugle sa tamnim plavo-zelenim spoljašnjim listovima, dok su unutrašnji listovi žute do svetlo-zelene boje (www.blychem.mu).

Mikropopulacija, prirodno prisutna na svežem biljnom materijalu, pored toga što zavisi od vrste biljke, razlikuje se i u zavisnosti od uticaja prirodnih stimulanasa kao što su svetlost, temperatura, vlaga, sastav vazduha, pH i sastav zemljišta. Vrsta i broj mikroorganizama različit je za različite biljne vrste, ali se razlikuje i od lista do lista na istoj biljci, kao i od lista do lista u zavisnosti od sezone, pa čak i dana. Bakterije obično bivaju nastanjene u predelima lista gde se sakuplja voda i gde su zaštićene od UV svetlosti. Mikrobiološka ispitivanja su pokazala da spoljašnji listovi glavica kupusa sadrže mnogo veći broj mikroorganizama nego tkivo u blizini jezgra glavice. Sa spoljašnjih listova kupusa izolovano je više od 2×10^6 cfu/g bakterija gde dominiraju gram-negativne bakterije), dok je sa unutrašnjih listova izolovano 4×10^3 cfu/g bakterija. Ukoliko se kupus skladišti nekoliko meseci pre početka prerade, u hladnom skladištu na oko 0°C i vlažnosti vazduha od 90%, rang mikropopulacije je od $1,4 \times 10^6$ cfu/g na spoljašnjim listovima do $3,8 \times 10^2$ cfu/g u jezgru uzorka. U ovom slučaju, psihrotrofne bakterije koje pripadaju rodovima najzastupljenije grupe prisutnih mikroorganizama su *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas* kao i kvasci i plesni (Sapers i sar., 2006).

2.2. FERMENTACIJA KUPUSA

Fermentacija povrća, samim tim i kupusa, bazirana je na istim principima kao i druge kiselo-mlečne fermentacije, kod kojih se šećeri prevode u kiseline posredstvom aktivnosti mikroorganizama, a proizvod dobija nove karakteristike u poređenju sa sirovim materijalom (Hutkins, 2006). Fermentisani kupus smatra se vrlo važnom namirnicom u ljudskoj ishrani, s obzirom da sadrži minerale, mlečnu kiselinu, askorbinsku kiselinu, dijetetska vlakna i fitohemikalije (Cvetković i sar., 2015). Ove bioaktivne komponente poseduju antioksidativne karakteristike i pozitivno utiču na zdravlje ljudi (Kusznierewicz i sar., 2008a).

Fermentacija kupusa je dobro poznat proces još iz antičkog doba, kada su listovi sirovog kupusa potapani u voćne sokove, vino ili sirće. Pretpostavlja se da su ove tečnosti bile zamenjene solju u periodu između 1550. i 1750. godine nove ere (Farnworth, 2008). Fermentisani kupus se tradicionalno pravi u srpskim domaćinstvima u formi celih glavica ili sečen na rezance, poznat kao ribanac. Vojvođansko naselje Futog je dobro poznato po proizvodnji fermentisanog kupusa u Srbiji (Cvetković i sar., 2008). Postoje pretpostavke da je futoški kupus kultivisan još od 18. veka i danas je na široko poznata sorta sa zaštićenim geografskim poreklom (Červenski, 2010).

Biološkim procesom kao što je fermentacija kupusa dobija se proizvod, odnosno fermentisani kupus, sa produženim rokom upotrebe, poboljšanim nutritivnim vrednostima i specifičnim senzorskim karakteristikama, ukusom i aromom, a da je pri tome izbegnuta upotreba hemijskih konzervanasa i primena visokih temperatura (Đukić i sar., 2015). S tim u vezi, sam proces fermentacije kupusa nosi sa sobom i određene rizike i lako može doći do skretanja fermentacije u pogrešnom smeru. Ključ za uspešnu fermentaciju kupusa je održavanje optimalnih parametara procesa (Jevšnik i sar., 2009).

2.2.1. Priprema sirovine

Glavice kupusa namenjene za proces fermentacije i dobijanje gotovog proizvoda fermentisanog kupusa u glavicama moraju biti zdrave. Biraju se glavice koje su čvrste, dovoljno zrele, sa što većim sadržajem šećera i koje nisu jako krupne. Koriste se cele glavice kojima je potrebno odstraniti ovojne listove. Ovim postupkom se zamenjuje pranje i otklanja mehanička nečistoća, kao i nepoželjni mikroorganizmi iz okoline. Koren kupusa se uglavnom ne odstranjuje, već se zaseče u obliku krsta, radi lakše difuzije soli unutar same glavice. Pripremljen sirovi kupus se dalje postavlja u posude za fermentaciju (najčešće kace) koje mogu biti drvene, betonske, kombinacija stakla i plastike ili plastične (Hutkins, 2006). Najbolje su drvene ili plastične posude kada je reč o manjim količinama sirovine, dok se u industrijskim uslovima često koriste bazeni čiji su zidovi zaštićeni premazima otpornim na kiselinu (Červenski i Medić-Pap, 2018).

Kupusu se dodaje od 2% do 2,5% soli na masu kupusa. Za razliku od ribanca kod koga se so dodaje direktno na izribanu sirovinu, kod kupusa u glavicama dodaje se slani vodeni rastvor. Vodeni rastvor treba da sadrži 5% do 6% soli (Niketić-Aleksić, 1988). Količina dodate soli zavisi od godišnjeg doba. Ukoliko se fermentacija obavlja u septembru, kada su dnevne temperature obično visoke, dodaju se veće koncentracije soli. Nasuprot tome, za fermentaciju koja se vrši u novembru, kada su dnevne temperature niže, dovoljna je manja koncentracija soli (Červenski, 2010). Kuhinjsku so je potrebno rastvoriti u higijenski potpuno ispravnoj hladnoj vodi. Na ovaj način, usled dodatka vode, smanjuje se i koncentracija šećera kod glavica kupusa, pa je i sadržaj kiselina kod gotovog proizvoda redovno niži u poređenju sa ribanim kupusom (Niketić-Aleksić, 1988).

Potrebno je da vodeni rastvor soli u potpunosti prekriva glavice kupusa, a posude se zatvaraju da bi se proizvod zaštitio od aerobnih mikroorganizama, stranih materija i insekata. Zahvaljujući osmotskim silama u prisustvu soli, voda počinje da difunduje iz biljnog tkiva. Naliv koji se na ovaj način formira sadrži šećere i druge rastvorene hranljive materije koje difunduju iz kupusa. Prema tome, ova vodena faza predstavlja mesto najvećeg dela mikrobiološke aktivnosti (Hutkins, 2006). Veoma je bitno da so unutar posude za fermentaciju bude ravnomerno raspoređena. U industrijskim uslovima bolja raspoređenost rastvora soli u vodi postiže se sistemom pumpi uz pomoć kojih slani rastvor cirkuliše unutar kaca i bazena tokom trajanja procesa fermentacije (Mastilović i sar., 2007).

2.2.2. Uticajni faktori

Glavice kupusa kao biljni supstrat, pored prirodno prisutnih bakterija mlečne kiseline potrebnih za fermentaciju, sadrže i kompleksnu mikropopulaciju koju čine i drugi, manje poželjni mikroorganizmi. Prirodna populacija bakterija mlečne kiseline predstavlja samo manji deo ukupne mikropopulacije prisutne na polaznom materijalu. Za razliku od fermentacije mleka, gde se pasterizacijom može značajno smanjiti autohtona mikropopulacija prisutna u sirovom mleku, kod proizvodnje fermentisanog povrća, pa samim tim i kupusa, ovaj korak se ne primenjuje. Prema tome, osnovni zahtev za uspešnu fermentaciju je da se stvore povoljni uslovi okoline koji će pospešiti rast bakterija mlečne kiseline, a inhibirati rast nepoželjne

mikropopulacije. Selekcija se može izvršiti uz pomoć samo nekoliko faktora: temperatura, so i anaerobni uslovi (Hutkins, 2006).

Uticaj temperature je jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na proces fermentacije kupusa. Opseg temperature od 18 °C do 22 °C smatra se najpoželjnijim za inicijaciju procesa fermentacije, dok optimalna temperatura u toku fermentacije kupusa iznosi približno 21 °C (Hui, 2012). Brzina fermentacije veoma zavisi od temperature rasola (Ray i Montet, 2015). Temperature ispod 10 °C ometaju početak fermentacije i pogoduju kvarenju kupusa. Sa druge strane, visoke temperature prilikom fermentacije kupusa uzrokuju prekomerno stvaranje kiselina, što dovodi do toga da gotov proizvod ima ukus na zelen i nezreo kupus, a može da dođe i do promene boje kupusa na sivo-braon (Farnworth, 2008; Červenski, 2010).

Rastvorena so iz rasola prilikom fermentacije kupusa u glavicama onemogućava rast većini bakterija koje bi bile konkurencija bakterijama mlečne kiseline. Iako koncentracija soli koja se uobičajeno dodaje kupusu (2-2,5% za ribanac i 5-6% za kupus u glavicama) (Niketić-Aleksić, 1988) obično ne inhibira rast svih nepoželjnih bakterija, dovoljna je da omogući značajnu prednost u rastu bakterijama mlečne kiseline. Nadalje, u kombinaciji sa ostalim faktorima, selektivni efekat relativno umerene koncentracije soli može biti značajno povećan. Kada se pH vrednost usled proizvodnje organskih kiselina prvi put smanji kombinacija slane i kisele sredine obezbeđuje dugoročne zaštitne uslove za budući gotov proizvod (Hutkins, 2006). Konačno, so doprinosi željenom ukusu proizvoda i pomaže da se dobije hrskava tekstura, uz prevenciju omekšavanja tkiva (Wolkers-Rooijackers i sar., 2013). Posledica niske ili visoke koncentracije soli odražava se na konzistenciju kupusa. Pri suviše niskim koncentracijama soli dolazi do omekšavanja kupusa, dok pri visokim koncentracijama dolazi do očvršćavanja (Červenski, 2010).

Polazna atmosfera u posudama za fermentaciju kupusa je aerobna, sa redoks potencijalom od preko 200 mV. Fizičkim odstranjivanjem vazduha i usvajanjem kiseonika od strane biljnih ćelija, dolazi do brzog smanjenja redoks potencijala i uslovi postaju anaerobni. Tako, pseudomonasi, gljive i drugi obligatni aerobi, koji mogu biti prisutni u velikom broju, imaju veoma male šanse da prežive. Dodatno, neki od ovih mikroorganizama su osetljivi i na so, te se

njihov dalji rast prekida (Hutkins, 2006). Ukoliko anaerobni uslovi nisu postignuti, odnosno posude za fermentaciju budu izložene vazduhu, dolazi do rasta aerobnih bakterija, kvasaca i plesni. Kao rezultat aktivnosti ovih nepoželjnih mikroorganizama dolazi do kvara kupusa u posudama za fermentaciju tako što tkivo kupusa omekšava i raspada se, uz neprijatan miris (Đukić i sar., 2015).

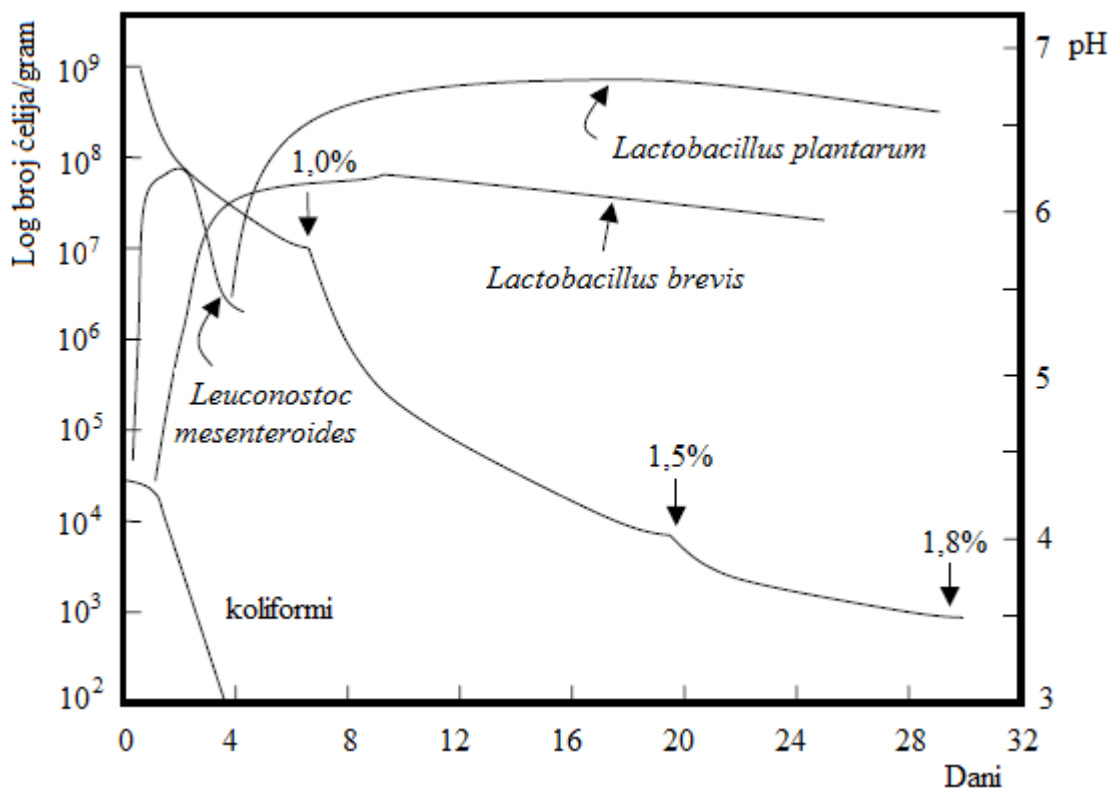
2.2.3. Faze fermentacije

Proizvodnja fermentisanog kupusa, kao i mnogog drugog povrća, zavisi od sukcesije prirodne mikropopulacije. Neki mikroorganizmi se javljaju na početku fermentacije sa određenim funkcijama i nakon toga njihova uloga se završava. Drugi mikroorganizmi, u suprotnom, javljaju se kasnije u toku fermentacije, a njihov rast zavisi od prethodnika, odnosno uslova koje su stvorili svojom aktivnošću. Mikroorganizmi koriste hranljive materije prisutne u svežem materijalu kao izvor energije, dok u okolinu izlučuju korisne bioproizvode (Ray i Bhunia, 2014). Glavni proizvod kiselo-mlečne fermentacije je mlečna kiselina koja ima ulogu konzervansa, a ujedno predstavlja i osnovni sastojak koji daje ukus proizvodu (Ray i Montet, 2015).

Kiselo-mlečna fermentacija odvija se prema fazama i skoro uvek prema istom principu, kako je predstavljeno na slici 2.2. Mikrobiološka aktivnost započinje čim se sirovina postavi u posude za fermentaciju i doda rastvor soli. U početku dominira mešovita aerobna mikropopulacija, koja se sastoji do koliformnih i sirćetnih bakterija, kvasaca i plesni. Prisutni mikroorganizmi koriste preostali kiseonik i odgovorni su za proizvodnju aromatičnih jedinjenja, raznih organskih kiselina i estara. Posredstvom bakterija iz roda *Enterobacteriaceae*, stvaraju se mravlja i sirćetna kiselina, male količine mlečne i ćilibarne kiseline, alkohol i gas. Ova faza traje veoma kratko, u proseku oko 3 dana, zahvaljujući kompeticiji bakterija mlečne kiseline i kiselina koje ove bakterije proizvode (Đukić i sar., 2015; Müller i sar., 2018).

Sledeća faza naziva se faza inicijacije, heterolitička ili gasna faza. Ova faza je obeležena rastom *Leuconostoc mesenteroides*, koja je tolerantna prema soli, ima relativno kratku lag fazu i visok stepen rasta na temperaturama između 15 °C i 18 °C. Glavni šećeri u kupusu – glukoza,

fruktoza i u manjoj meri saharoza, prevode se uglavnom u mlečnu kiselinu, sirćetnu kiselinu, manitol i etanol, zajedno sa ugljen-dioksidom koji je važan za uspostavljanje anaerobnih uslova (Bamforth, 2005). Kisela sredina od 0,6% do 0,8%, računato na mlečnu kiselinu, nastala usled rasta *Ln. mesenteroides*, stimuliše rast drugih bakterija mlečne kiseline, dok inhibira rast bakterija koje ne pripadaju ovoj grupi. Proizvodnja ugljen-dioksida snižava redoks potencijal na -200 mV, što dodatno stimuliše anaerobne, bakterije mlečne kiseline (Hutkins, 2006). Konačno, posle perioda od oko nedelju dana fermentacije, heterofermentativne bakterije mlečne kiseline, čiji broj može porasti i na 9 log cfu/ml ili više, odumiru (Breidt i sar., 2015). Heterofermentativne bakterije mlečne kiseline proizvode mlečnu kiselinu i druge produkte za razliku od homofermentativnih bakterija koje proizvode uglavnom mlečnu kiselinu (Ray i Bhunia, 2014) o čemu će biti više reči u poglavljima 2.3.1 i 2.4.1.1.



Slika 2.2. Sukcesija rasta bakterija mlečne kiseline u toku fermentacije kupusa. Na različitim pH vrednostima prikazana je približna kiselost sredine računato na mlečnu kiselinu (Hutkins, 2006)

Sredina u kojoj se odvija fermentacija kupusa postaje previše kisela za heterofermentativne organizme, dolazi do smanjenja *Leuconostoc* populacije i smene nekoliko drugih bakterija mlečne kiseline otpornijih na kiseline. Ova faza naziva se prema tome homolitička ili ne-gasna faza. Fermentacija se nastavlja uz posredstvo bakterija *Lactobacillus plantarum* i u manjoj meri *Lb. brevis*. Oba mikroorganizma su veoma stabilna u kiseloj sredini i veoma su dobri proizvođači kiseline, čiji sadržaj se gotovo udvostručuje (Bamforth, 2005; Hutkins, 2006).

Konačno, kada kiselost dostigne vrednost od 1,6% i pH vrednost sredine opadne ispod 4,0 samo je *Lb. plantarum*, koja je veoma tolerantna prema kiseloj sredini, sposobna da raste. Ceo proces može da traje jedan do dva meseca, a fermentacija se smatra kompletnom kada je ukupna kiselost (računato na mlečnu kiselinu) oko 1,7% i pH vrednost sredine između 3,4 i 3,6 (Hutkins, 2006). Ukupna kiselost kod fermentisanog kupusa u glavicama kreće se u proseku od 1% do 1,2%, a sadržaj mlečne kiseline je veći zbog nešto većeg učešća homofermentativnih tipova bakterija mlečne kiseline. Fermentisani kupus u glavicama ostaje u posudama za fermentaciju sve dok ukupna kiselost ne bude oko 1%, računato na mlečnu kiselinu. Kupus se zatim skladišti u istoj posudi, ili se u ovoj fazi obrađuje do gotovog proizvoda (Niketić-Aleksić, 1988; Bamforth, 2005).

Greške kod fermentacije kupusa

Neppravilno vođenje procesa fermentacije dovodi do grešaka koje uzrokuju skretanje fermentacije u nepoželjnom smeru, što dovodi do kvara glavica kupusa. Neadekvatna temperatura, koncentracija soli i kiseonik – uzročnici su kvara kupusa o čemu je bilo više reči u poglavlju 2.2.2. Pored navedenih uticajnih faktora, do skretanja fermentacije može doći i posredstvom drugih činilaca.

Ukoliko su prilikom gajenja kupusa korišćena zaštitna sredstva u prevelikim količinama ili su primenjena suviše kasno u periodu rasta kupusa, kao posledica se javlja mnogo manji rast bakterija mlečne kiseline u toku fermentacije. Takođe, neophodno je obezbediti kupusu potrebne

uslove za rast jer su bakterije mlečne kiseline veoma osetljive na nedostatak nekih mikroelemenata, vitamina i aminokiselina (Červenski, 2010).

Fenomen sukcesije mikroorganizama u toku fermentacije (opisan u poglavlju 2.2.3.) može biti posredovan ne samo promenom uslova okruženja, već i pojavom bakteriofaga. Bakteriofagi, poznati i kao fagi, su virusi koji mogu da zaraze bakterijske ćelije. Fagi su široko rasprostranjeni u životnoj sredini, pa se tako mogu naći i u vodi za navodnjavanje, kao i na samoj površini povrtarskih kultura (Goyal, 2006). Dokazano je da su fagi prisutni u postupku fermentacije i direktno mogu uticati na mikrobiološku sukcesiju. Izolovano je više od dvadeset šest različitih tipova faga iz uzoraka rasola prilikom fermentacije kupusa (Yoon i sar., 2002; Lu i sar., 2003). Ovi virusi bili su sposobni da utiču na bakterije mlečne kiseline, uključujući vrste rodova *Leuconostoc* i *Lactobacillus*. Daljom karakterizacijom otkriveno je da su neki fagi stabilni na niskim pH vrednostima od oko 3,5 i sposobni da istraju u posudama za fermentaciju i do šest dana. Prema tome, ovo je veoma značajno za fermentaciju, jer kritične vrednosti populacije faga dovode do raspadanja ćelija bakterija mlečne kiseline, odnosno fermentacija postaje neuspešna (Hutkins, 2006).

Prljava sveža sirovina sadrži mnogo mikroba poreklom iz zemljišta. Tu se mogu naći u velikom broju, između ostalih, i plesni, enterokoke i klostridije. Enterobakterije, razgradnjom proteina, mogu prouzrokovati neprijatan miris i ukus kod kupusa u toku fermentacije. Rast bakterije *Clostridium butyricum* kod kupusa stvara miris i ukus na buternu kiselinu. Navedeni mikroorganizmi sprečavaju da se bakterije mlečne kiseline pravilno razvijaju, što dovodi do kvara kupusa tokom procesa fermentacije (Červenski i Medić-Pap, 2018).

2.3. STARTER KULTURE

Starter kulture su sojevi mikroorganizama koji su odgajani u specijalno kontrolisanim laboratorijskim uslovima, a koriste se u cilju inicijacije procesa fermentacije kod određene grupe proizvoda (Ray i Bhunia, 2014). Starter kulture mogu biti pojedinačni sojevi mikroorganizama ili

se mogu sastojati od više sojeva, u zavisnosti od vrste supstrata, odnosno sirovine (Sinha, 2011). Klasifikacija starter kultura prema broju sojeva data je u tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Definicija starter kultura prema broju sojeva (Hui, 2004)

Starter kultura	Sadržaj
Jedan soj	Definisan soj, sa poznatim tehnološkim karakteristikama.
Više sojeva	2-6 dobro definisanih sojeva, sa poznatim tehnološkim karakteristikama.
Mešavina sojeva	Nepoznat broj sojeva koji nisu definisani.

Jedan soj kao starter kultura obično predstavlja kvasce ili plesni, a koristi se za proizvodnju piva i vina, ili bakterije mlečne kiseline koje se koriste za proizvodnju nekoliko vrsta mlečnih proizvoda, kobasica i fermentisanog kupusa. Više sojeva kao starter kultura koristi se za proizvodnju mlečnih proizvoda, kiselog testa, kobasica i vina. Mešavina nedefinisanih bakterijskih sojeva kao starter kultura prvenstveno se koristi u mlečnoj industriji i industriji za proizvodnju kiselog testa (Hui, 2004).

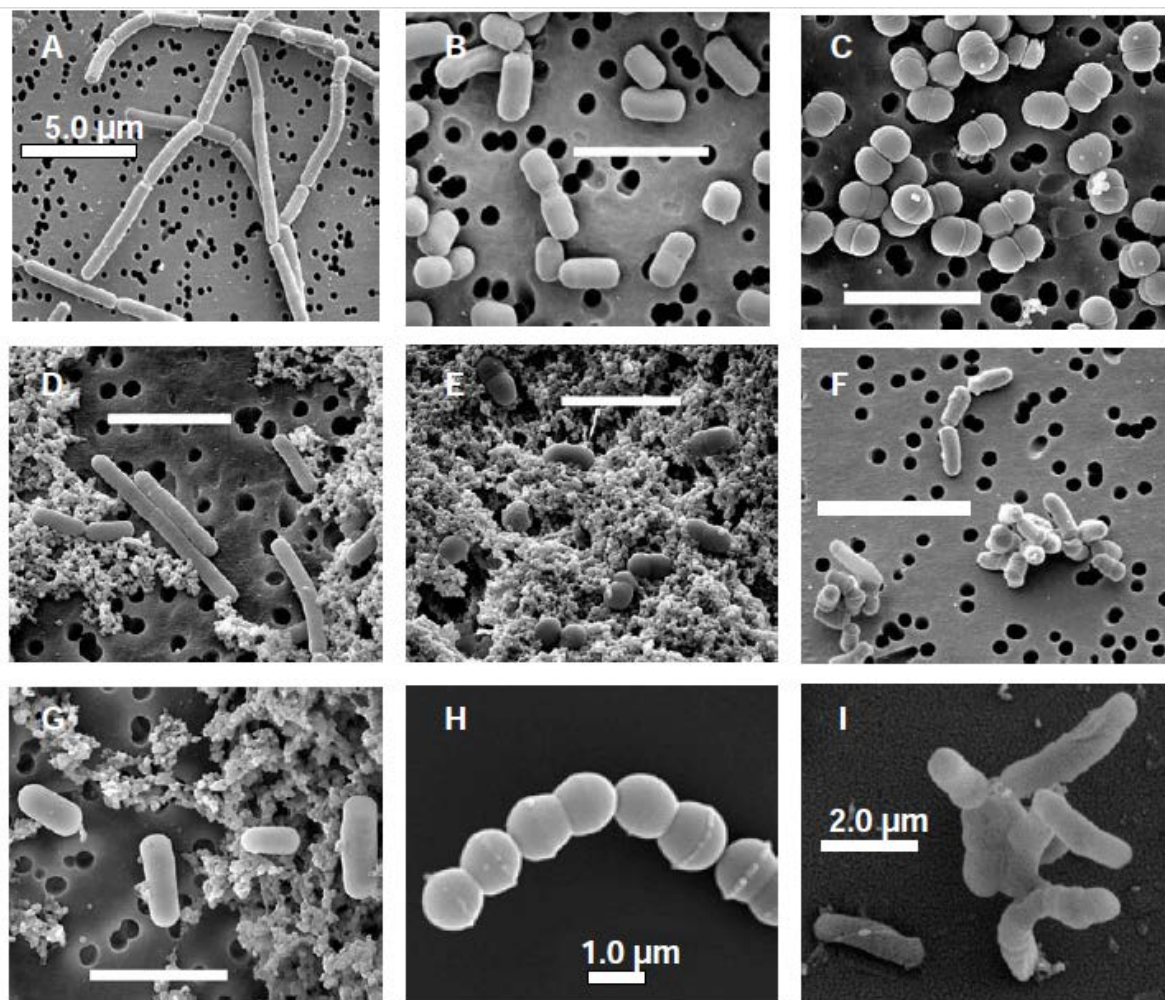
2.3.1. Kiselo-mlečne starter kulture

Vrste iz grupe bakterija mlečne kiseline pripadaju rodovima *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, i *Oenococcus*. Ove bakterije su sposobne da metabolizuju mlečnu kiselinu iz ugljenih hidrata prisutnih u supstratu. Vrste prvih pet rodova koriste se kao starter kulture za fermentaciju hrane. Pored gore navedenih rodova, interesantno je napomenuti da i bakterije koje ne pripadaju grupi kiselo-mlečnih mogu da se dodaju kao kulture u procesu fermentacije. Upotreba ovih bakterija koje ne pripadaju grupi bakterija mlečne kiseline zasnovana je uglavnom na njihovoj sposobnosti da metabolizuju aminokiseline i generišu različita jedinjenja odgovorna za ukus proizvoda. Sojevi bakterije *Brevibacterium linens*, predstavljene na slici 2.3 F, pojačavaju ukus sira proizvodnjom isparljivih jedinjenja koja sadrže sumpor (npr. metanotiol) i masnih kiselina (npr. izovalerijanska). Poznata je i primena probiotika

(živi organizmi koji imaju zdravstvenu korist po ljudski organizam kada se dodaju u odgovarajućoj količini) kao dodataka proizvodima. Glavni mikroorganizmi koji se koriste kao probiotici su vrste roda *Bifidobacterium* (slika 2.3 I). Ove probiotske kulture proizvode se na isti način kao i starter kulture (Hutkins, 2006).

Određene vrste iz roda *Lactococcus*, veličine ćelije između 0,5 μm i 1,0 μm u prečniku, i *Streptococcus*, veličine 0,7 μm do 0,9 μm u prečniku, uključene su u proces fermentacije mleka (slika 2.3 E i H). U fermentaciji povrća uglavnom učestvuju vrste rodova *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* (Ray i Bhunia, 2014). Pojedini predstavnici rodova *Pediococcus* i *Lactobacillus* prikazani su na slici 2.3 A, B, C, D i G (Hutkins, 2006).

Rod *Leuconostoc* je morfološki heterogen i može da sadrži genetički različite grupe bakterija. Međutim, bakterije iz roda *Leuconostoc* uglavnom su sfernog ili sočivastog oblika, organizovane u parove ili lance. Ćelije su gram-pozitivne, nepokretne, ne stvaraju spore, katalaza negativne i fakultativno anaerobne su. Mogu da se razvijaju u temperaturnom opsegu od 1 °C do 37 °C, sa optimumom između 20 °C i 30 °C. Neke vrste mogu da prežive i 30 minuta na 60 °C. Ove bakterije se nalaze na biljkama, povrću, silaži, mleku i nekim mlečnim proizvodima, kao i na svežem i prerađenom mesu. Poznato je pet vrsta iz *Leuconostoc* roda bakterija *Ln. mesenteroides*, *Ln. paramesenteroides*, *Ln. lactis*, *Ln. carnosum* i *Ln. gelidum*. *Ln. mesenteroides* sadrži tri podvrste ssp. *mesenteroides*, ssp. *dextranicum* i ssp. *cremoris*. Ove bakterije su odgovorne za fermentaciju glukoze do D(-) mlečne kiseline, ugljen-dioksida, etanola ili sirćetne kiseline, uz redukciju pH vrednosti u intervalu između 4,5 i 5,0 (Ray i Bhunia, 2014). Sojevi bakterijske vrste *Ln. mesenteroides* koriste se kao starter kulture u fermentaciji kupusa. Moguće je koristiti jedan ili više sojeva kao starter kulturu. Kombinacija sojeva *Ln. mesenteroides* sa sojevima vrste *Lb. plantarum* koristi se u kontroli procesa fermentacije kupusa i kineskog kupusa (Breidt i sar., 1995; Jung i sar., 2012; Xiong i sar., 2014, Yang i sar., 2020).



Slika 2.3. Elektronski mikrosnimci bakterija mlečne kiseline i srodnih bakterija: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (A); *Lactobacillus brevis* (B); *Pediococcus pentosaceus* (C); *Lactobacillus casei* (D); *Lactococcus lactis* (E); *Brevibacterium linens* (F); *Lactobacillus helveticus* (G); *Streptococcus thermophilus* (H); i *Bifidobacterium longum* (I). Dužina skale je 3,0 µm, osim ako drugačije nije naznačeno (Hutkins, 2006)

Bakterije iz roda *Pediococcus* su sfernog oblika, formiraju tetrade, ali mogu biti prisutne i u parovima. Na slici 2.3 C primećuje se odsustvo pojedinačnih ćelija i lanaca. Ove bakterije su gram-pozitivne, nepokretne, ne formiraju spore, a fakultativno anaerobne su. Dobro rastu između 25 °C i 40 °C, dok neke vrste mogu da rastu i pri temperaturi od 50 °C. U zavisnosti od vrste, ove bakterije, mogu da se nađu u biljkama, povrću, silaži, pivu, mleku, kao i u fermentisanom povrću, mesu i ribi (Ray i Bhunia, 2014). Rod *Pediococcus* obuhvata oko jedanaest vrsta, od

kojih prevladavaju *Pc. pentosaceus* i *Pc. acidilactici*, izolovani u toku fermentacije različitih vrsta hrane (Adesulu-Dahunsi i sar., 2021). Ove dve vrste je teško razlikovati, ali za razliku od *Pc. acidilactici*, *Pc. pentosaceus* fermentiše maltozu, ne raste na temperaturi od 50 °C i uništava ga temperatura od 70 °C za 5 min. Bakterije ovog roda fermentišu glukozu do L(+) ili DL mlečne kiseline, a neke vrste mogu redukovati pH vrednost i do 3,6. U zavisnosti od vrste, mogu da fermentišu saharozu, arabinozu, ribozu, ksilozu, i u manjoj meri laktozu, ukoliko se nalazi kao izvor ugljenih hidrata u hranljivoj podlozi (Ray i Bhunia, 2014). *Pc. pentosaceus* koristi se kao starter kultura za fermentaciju mlečnih proizvoda i proizvoda od povrća, kao što su sirevi i fermentisani kupus (Jang i sar., 2014).

Lactobacillus pripada heterogenoj grupi nepokretnih, fakultativno anaerobnih gram-pozitivnih štapića koji se, u zavisnosti od vrste, mogu razlikovati po obliku, rastu i metabolizmu. Prema veličini i obliku, ćelije se razlikuju od veoma kratkih, skoro kokoidalnih, do veoma dugačkih, tanjih ili debljih, često savijenih štapića. Štapići mogu biti prisutni kao pojedinačne ćelije ili kraći i duži lanci (slika 2.3 A, B, D i G). Temperatura rasta varira od 1 °C do 50 °C. Međutim, vrste koje se koriste kao starter kulture za kontrolisanu fermentaciju dobro rastu na temperaturi od 25 °C do 40 °C. Nekoliko vrsta ovog roda uključenih u spontanu fermentaciju na niskim temperaturama dobro rastu i pri temperaturi od 10 °C do 25 °C. Pojedine vrste se mogu naći na biljkama, žitaricama, semenima, svežem i prerađenom mleku i mesu, kao i na svežem i fermentisanom povrću. Rastući na glukozu, u zavisnosti od vrste, proizvode ili samo mlečnu kiselinu [L(+), D(-) ili DL], ili mešavinu mlečne kiseline, etanola, sirćetne kiseline i ugljen-dioksida. Takođe, neke bakterije ovog roda proizvode i diacetil. Mnoge vrste koriste laktozu, saharozu, fruktozu ili galaktozu, dok neke vrste mogu da fermentišu pentoze. U zavisnosti od vrste, pH sredina može biti snižena posredstvom ovih bakterija i do intervala između 3,5 i 5,0. Na osnovu metaboličke šeme na heksoze i pentoze, vrste su podeljene u tri grupe bakterija, kako je predstavljeno u tabeli 2.4. Bakterijske vrste iz grupe I fermentišu heksoze i disaharide, kao što su laktoza i saharoza, proizvode uglavnom mlečnu kiselinu i ne fermentišu pentoze kao što su npr. riboza, ksiloza ili arabinoza. Bakterije grupe II, u zavisnosti od vrste i količine dostupnih ugljenih hidrata, proizvode ili uglavnom mlečnu kiselinu ili mešavinu mlečne, sirćetne i mravlje

kiseline, etanol i ugljen-dioksid. Vrste iz grupe III fermentišu ugljene hidrate do mešavine laktata, acetata, etanola i ugljen-dioksida (Ray i Bhunia, 2014).

Među velikim brojem vrsta postoje one koje se koriste kao starter kulture za kontrolisanu fermentaciju povrća. U fermentaciji povrća učestvuje *Lb. plantarum*, a kao proizvod dobija se DL-mlečna kiselina. Sojevi vrsta *Lb. plantarum* i *Lb. pentosus*, izolovani iz smokvi i dobro pripremljene turšije, pokazuju veoma dobre probiotske karakteristike, pa se mogu upotrebiti kao starter kulture u razvoju fermentisanih probiotskih proizvoda (Yuasa i sar., 2020).

Tabela 2.4. Podela *Lactobacillus* vrsta prema grupama (Ray i Bhunia, 2014)

Osobine	Grupa I	Grupa II	Grupa III
Prethodni naziv	Termobakterije	Streptobakterije	Betabakterije
Šema fermentacije ugljenih hidrata*	Obligatno homofermentativne	Fakultativno heterofermentativne	Obligatno heterofermentativne
Krajnji proizvod fermentacije ugljenih hidrata	Laktat	Laktat ili laktat, acetat, etanol, ugljen-dioksid, formijat	Laktat, acetat, etanol, ugljen-dioksid
Fermentacija pentoza	-	+	+
Reprezentativne vrste	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> , <i>bulgaricus</i> , <i>lactis</i> <i>Lb. leichmannii</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>pseudoplanatarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. divergens</i> <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. confuses</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. sanfrancisco</i> <i>Lb. reuteri</i>

*homofermentativni proizvode uglavnom mlečnu kiselinu, dok heterofermentativni proizvode mlečnu kiselinu i druge produkte

2.3.2. Uticaj starter kulture na proces fermentacije

Mnogi naučnici istraživali su primenu starter kultura i otkrili da su one veoma pogodne za standardizaciju i kontrolisanje mikropopulacije tokom procesa fermentacije (Gardner i sar., 2001; Xiong i sar., 2014; Torres i sar., 2020).

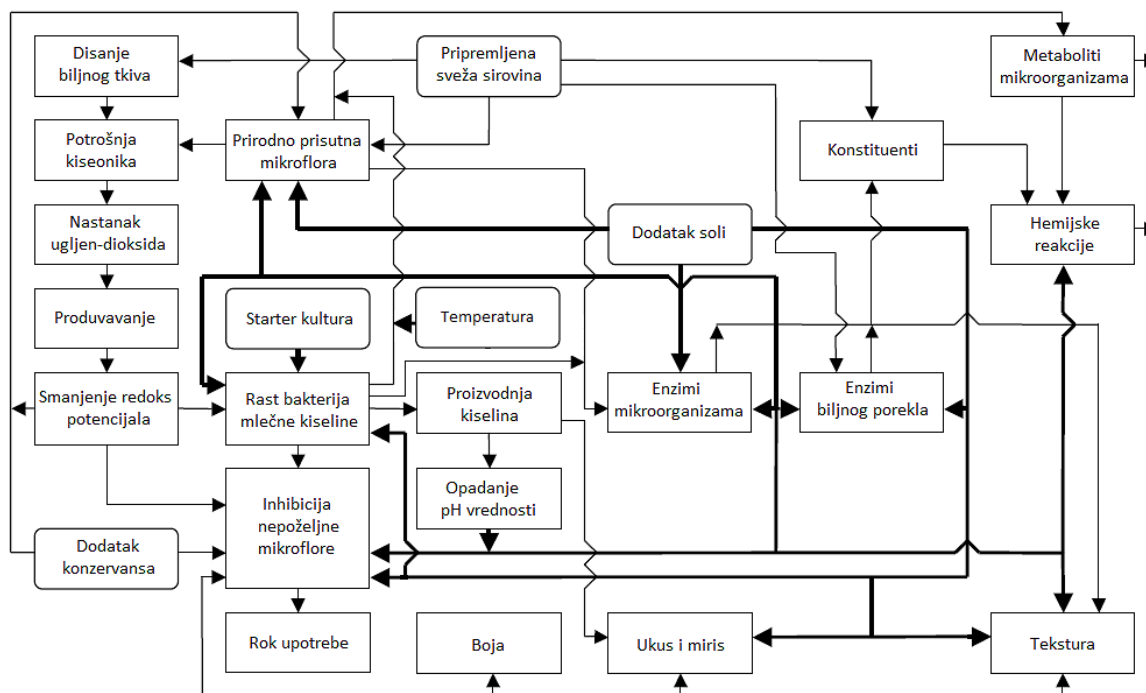
Proces fermentacije koji se odvija spontano, iako veoma koristan za očuvanje svežeg povrća, podložan je greškama nastalim usled inhibicije od strane bakterija koje izazivaju kvarenje ili patogenih mikroorganizama. Skretanje fermentacije dovodi do nepoželjnih senzorskih karakteristika i nutritivnog sastava u toku procesa fermentacije, pa se kontrolisana fermentacija pronalazi kao veoma dobro rešenje. Upotreba autohtonih starter kultura izolovanih iz svežeg ili fermentisanog povrća, koje su prilagođene specifičnoj biljnoj matrici, može produžiti rok upotrebe i uticati povoljno na senzorske i funkcionalne karakteristike fermentisanih proizvoda. Dodatno, autohtone starter kulture koje se koriste u fermentaciji povrća su većinom probiotici i utiču povoljno na zdravlje ljudi, tako što pozitivno utiču na sastav crevne mikropopulacije, imuni sistem, nutritivni sastav preko proizvodnje novih bioaktivnih jedinjenja ili povećanja bioraspoloživosti već postojećih (Torres i sar., 2020).

Bakterijske starter kulture mogu biti pogodne za kontrolu procesa u proizvodnji fermentisanog kupusa. Primena starter kultura u fermentaciji kupusa još uvek nije dovoljno razvijena i istražena. Prema tome, postoji težnja proizvođača za njihovom primenom u cilju poboljšanja procesa proizvodnje i fizičko-hemijskih karakteristika gotovog proizvoda, kako fermentisanog kupusa, tako i drugih fermentisanih proizvoda.

2.4. BIOHEMIJA FERMENTACIJE I NJENI FENOMENI

Fermentisana hrana definiše se kao hrana podvrgnuta dejstvu mikroorganizama i enzima koji pokreću biohemijske reakcije i na taj način uzrokuju značajne poželjne modifikacije u toj hrani. Reakcije koje se odvijaju u toku fermentacije namirnica, pored produžetka roka upotrebe i promene fizičko-hemijskih karakteristika, imaju za cilj i poboljšanje nutritivnog i funkcionalnog kvaliteta hrane. Fermentacija je proces koji zavisi od biološke aktivnosti mikroorganizama odgovornih za proizvodnju niza metabolita koji mogu suzbiti rast i preživljavanje neželjene mikropopulacije i na taj način produžiti rok upotrebe prehrambenih proizvoda biljnog i životinjskog porekla (Mehta i sar., 2012). Fizičko-hemijski parametri, njihove promene i mikrobiološki profil u toku fermentacije povrća zavise u mnogome od koncentracije soli,

temperature i dodate starter kulture. Kompleksni sistem mikrobioloških, biohemijskih, enzimatskih, hemijskih i fizičkih procesa u toku fermentacije kupusa (Farnworth, 2008) prikazan je šematski na slici 2.4.



Slika 2.4. Interakcija različitih faktora sa proizvodnim koracima u toku fermentacije kupusa prema modifikovanoj šemi Farnworth (2008)

Na slici 2.4 prikazani su glavni međusobni odnosi tokom fermentacije kupusa koji utiču na senzorska svojstva i rok upotrebe gotovog proizvoda. Proces fermentacije kupusa odvija se pod uticajem mnoštva udruženih faktora od kojih su glavni detaljnije objašnjeni u poglavljima 2.2.1 i 2.2.2, dok su fizičko-hemijske i mikrobiološke promene koje se odvijaju u toku fermentacije kupusa opisane u nastavku teksta.

2.4.1. Fizičko-hemijske promene u toku fermentacije kupusa

U fizičko-hemijske parametre koji se mogu pratiti u toku fermentacije kupusa u glavicama, između ostalih, spadaju sadržaj ukupne suve materije, pH vrednost, antioksidativna

aktivnost, sadržaj organskih kiselina, tekstura i ukupna promena boje, aktivnost vode, ukupna kiselost, sadržaj ukupanih šećera, sadržaj soli, kao i sadržaj biogenih amina.

2.4.1.1. Metabolizam šećera

Sadržaj šećera je jedan od najvažnijih parametara namirnica namenjenih za proces fermentacije (Cvetković i sar., 2008). Nizak sadržaj šećera u povrću i neutralna pH vrednost obezbeđuju prirodan medijum za fermentaciju bakterijama mlečne kiseline (Ray i Montet, 2015). Najčešći fermentabilni šećeri koji se nalaze u povrću su glukoza, fruktoza i saharoza (Hui, 2004). Biotransformacijom ovih šećera pod uticajem bakterija mlečne kiseline vrši se značajan uticaj na senzorske karakteristike povrća (Sinha, 2011).

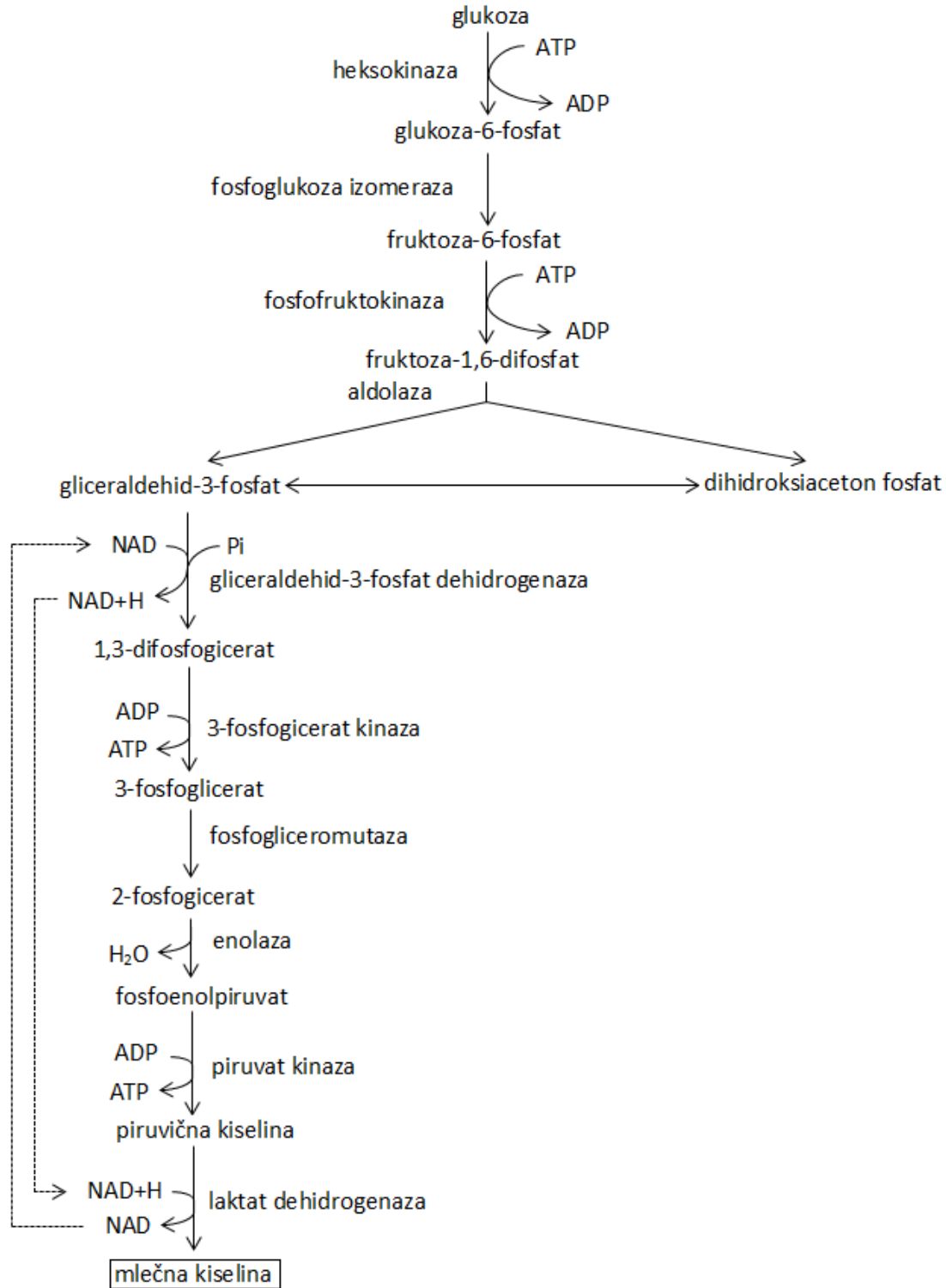
Najzastupljeniji šećeri u kupusu kao supstratu su heksozni monosaharidi glukoza i fruktoza. Tokom fermentacije kupusa ovi šećeri se prema Embden-Meyerhoff-Parnas mehanizmu obično konvertuju u mlečnu kiselinu uz aktivnost homofermentativnih bakterija mlečne kiseline, dok će heterofermentativne bakterije pored mlečne kiseline proizvesti i druge proizvode putem fosfoketolaza mehanizma. Homofermentativni put razgradnje šećera prikazan je na slici 2.5, dok je heterofermentativni prikazan na slici 2.6. Za razliku od glukoze i fruktoze, disaharid saharoza u svežem kupusu je manje zastupljen (Hutkins, 2006; Sapers i sar., 2006). Većina šećera koja je prirodno prisutna u sirovom kupusu prevodi se uglavnom u mlečnu kiselinu delovanjem bakterija mlečne kiseline (Medina i sar., 2016).

Metabolizam razgradnje glukoze prilikom fermentacije kupusa odvija se posredstvom homolaktičkih i heterolaktičkih bakterija. Homolaktičke bakterije mlečne kiseline razlažu glukozu dajući piruvat koji se dalje redukuje u mlečnu kiselinu delovanjem enzima laktat dehidrogenaze, kako je predstavljeno na slici 2.5. Nasuprot tome, heterolaktičke bakterije proizvode mlečnu kiselinu prema fosfoketolaza mehanizmu, predstavljenom na slici 2.6, tako što u početku dolazi do cepanja CO₂ iz molekula glukoze, a kao rezultat nastaje ksiloza-5-fosfat. Reakcija je dalje katalizovana enzimom fosfoketolaza, dajući gliceraldehid-3-fosfat i acetilfosfat. Gliceraldehid-3-fosfat se, prema istom mehanizmu homolaktičkih bakterija, redukuje u mlečnu kiselinu, dok se acetilfosfat redukuje do etanola. Heterofermentativnim putem dobija se 1 mol ATP-a po molu

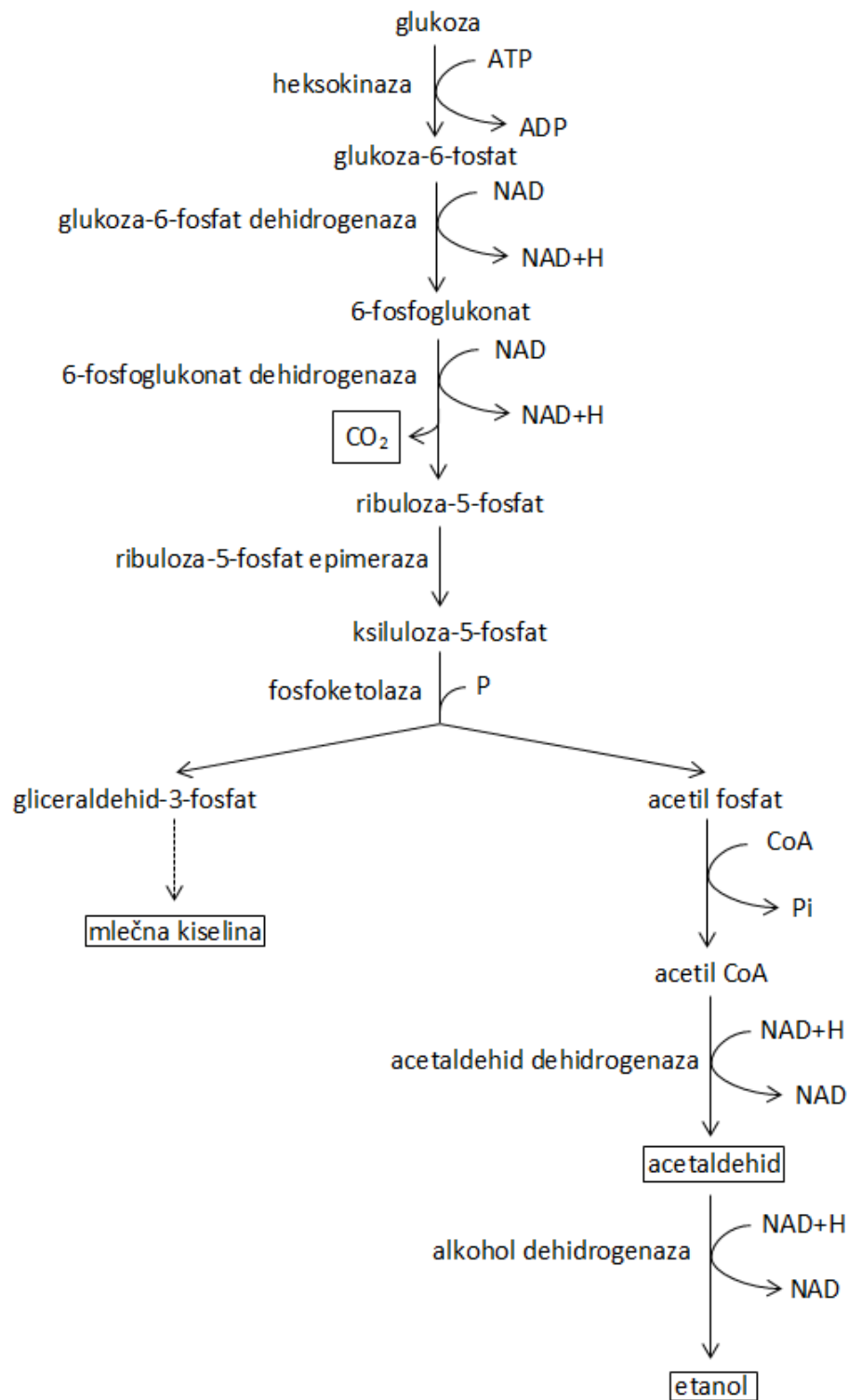
glukoze, u poređenju sa 2 mola ATP-a koja se dobijaju homofermentativnim putem. Prema tome, fermentacija glukoze heterofermentativnim putem je samo upola efikasna, u poređenju sa fermentacijom homofermentativnim putem (Hui, 2004; Hutkins, 2006; Ray i Montet, 2015).

Metabolizam fruktoze tokom fermentacije kupusa odvija se zahvaljujući enzimima, fruktokinazi i fosfoglukoizomerazi, koje luče bakterije mlečne kiseline. Ovim mehanizmom fruktoza se prevodi u fruktoza-6-fosfat, a zatim se izomerizuje do glukoza-6-fosfata. Homofermentativnim putem glukoza-6-fosfat prevodi se glikolizom u piruvat, koji se posredstvom enzima laktat dehidrogenaze redukuje u mlečnu kiselinu. Za razliku od homolaktičkih bakterija, heterolaktičke bakterije sadrže manitol dehidrogenazu, koja katalizuje redukciju fruktoze u manitol i oksiduje NADH u anaerobnim uslovima. Pri ovoj reakciji koristi se mala količina fruktoze kao akceptor elektrona, a preostala fruktoza se prevodi u mlečnu kiselinu, etanol, acetat i CO₂ (Hui, 2004; Sapers i sar., 2006). Manitol predstavlja fermentabilni supstrat za *Lb. plantarum*, koja može metabolisati manitol u mlečnu, sirćetnu, ćilibarnu kiselinu i etanol u prisustvu citrata. Količina akumuliranog manitola u fermentisanom povrću zavisi od obima rasta *Lb. plantarum*. U kimčiju (fermentisani proizvod od povrća u kome je glavni sastojak kineski kupus) ne dolazi do velikog porasta broja ovih bakterija, te se manitol akumulira od 0,4% do 0,5%. Međutim, prilikom fermentacije kupusa i krastavaca, gde dolazi do značajnog porasta broja *Lb. plantarum*, manitol se akumulira u manjoj meri (Sinha, 2011).

Metabolizam saharoze u završnoj fazi fermentacije kupusa je uglavnom nepotpun, jer saharoza nije optimalni fermentabilni šećer za bakterije mlečne kiseline. Zapravo, samo nekoliko bakterija mlečne kiseline poseduje sposobnost fermentacije saharoze, uz pomoć β-glukozidaze, a kao proizvodi nastaju glukoza i fruktoza, koji se dalje mogu metabolizovati prethodno pomenutim metabolizmima (Hui, 2004).



Slika 2.5. Homofermentativni put razgradnje šećera (Hutkins, 2006)



Slika 2.6. Heterofermentativni put razgradnje šećera (Hutkins, 2006)

2.4.1.2. Organske kiseline i promena ukupne kiselosti

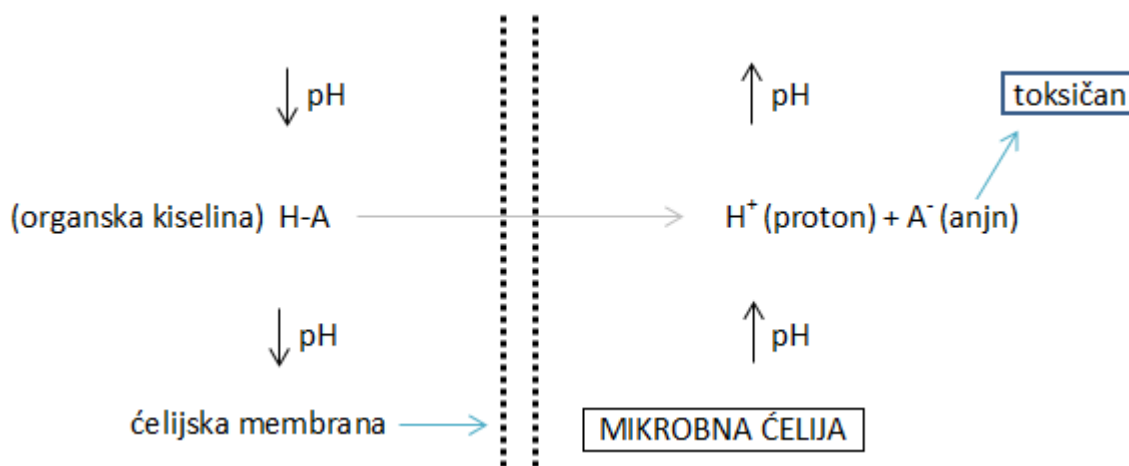
Organske kiseline su primarni metabolički proizvodi mikroorganizama. Koriste se kao aditivi i konzervansi, kako bi se sprečilo propadanje i produžio period skladištenja kod kvarljivih namirnica. Organske kiseline su, pored navedenog, i regulatori kiselosti, koji mogu održavati ili menjati pH vrednosti prehrambenih proizvoda, poboljšavati ukus i pozitivno uticati na antioksidativnu aktivnost, a sve u cilju sprečavanja kvarenja hrane (Liu i Zhou, 2014).

Askorbinska kiselina, poznata kao vitamin C, rastvorljiva je u vodi i lako se oksidiše u prisustvu vazduha, toplote i svetlosti. Igra važnu ulogu u funkciji ljudskog metabolizma, formiranju kostiju, obrazovanju zdravih desni i zarastanju rana. Deluje kao antioksidant, kofaktor mnogih enzimskih reakcija i ima pozitivan efekat na apsorpciju mineralnih materija u organizmu. Nedostaci ovog vitamina mogu prouzrokovati anemiju, skorbut, mišićnu degeneraciju, kapilarno krvarenje, neurološke poremećaje i mogu oslabiti imuni sistem. Ljudski organizam nije u mogućnosti da sintetiše askorbinsku kiselinu, te je njen unos u potpunosti zavisian od ishrane (Singh i Prasad, 2018). Pored crne ribizle (120-150 mg/100 g vitamina C), agruma i drugog voća, a od povrća npr. slatke crvene paprike (185 mg/100 g), dobar izvor vitamina C su zeleno lisnato povrće i kupusnjače (Tepić Horecki, 2019). Prema istraživanju autora Singh i Prasad (2018), sadržaj askorbinske kiseline kod mahunarki kreće se od 1,87 do 11,88 mg/100 g, a kod zelenog lisnatog povrća od 3,46 do 24,54 mg/100 g, dok kod kupusnjača iznosi 52-125 mg/100 g svežeg proizvoda (Červenski i Gvozdrenović, 2004; Maksimović, 2005). Ova komponenta predstavlja najosetljiviji vitamin koji lako može biti razgrađen u dodiru sa kiseonikom na početku procesa fermentacije, enzimatskom aktivnošću tkiva kupusa ili mikroorganizama, kao i anaerobno u toku fermentacije (Bender, 1978; Adetuyi i Ibrahim, 2014).

Za razliku od askorbinske, kao i oksalne kiseline, koje su prirodno prisutne u svežim glavicama kupusa (Sinha, 2011; Gaafar i sar., 2014), u toku procesa fermentacije dolazi do stvaranja drugih organskih kiselina, kao što su mlečna, sirćetna, mravlja i ćilibarna (Mehta i sar., 2012; Drašković i sar., 2017).

Prilikom fermentacije kupusa usled obrazovanja organskih kiselina dolazi do snižavanja pH vrednosti (Hui i Evranuz, 2016), odnosno porasta ukupne kiselosti. Ukupna, odnosno

titraciona kiselost kod kupusa izražava se na mlečnu kiselinu kao dominantnu u procesu biološke fermentacije (Marth i Steele, 2001; Yoon i sar., 2006). U toku fermentacije posredstvom aktivnosti mikroorganizama dolazi do porasta ukupne kiselosti, kao što je predstavljeno na slici 2.2 u poglavlju 2.2.3. Kada koncentracija kiselina, računato na mlečnu kiselinu, dostigne 1%, bakterije *Ln. mesenteroides* se inhibiraju i za 4 do 6 dana veoma teško mogu biti detektovane, dok se kiselost u narednoj fazi gotovo udvostručuje (Hutkins, 2006). Glavice fermentisanog kupusa imaju ukupnu kiselost, izraženu na mlečnu kiselinu, po pravilu nižu u poređenju sa ribanim kupusom (Niketić-Aleksić, 1988). Pri fermentaciji kupusa u glavicama, zbog dodatka vode, koncentracija šećera je snižena, te je i sadržaj ukupnih kiselina redovno niži u poređenju sa ribanim kupusom, kako je ranije napomenuto. Bakterije mlečne kiseline proizvode mlečnu kiselinu dok se svi šećeri ne potroše, a vrednost tokom fermentacije kupusa obično pada sa pH 6,0 na pH 3,4 (Bamforth, 2005). Opadanje pH vrednosti tokom procesa fermentacije inhibira dalje stvaranje mlečne kiseline (National Research Council, 1992; Hui, 2012). S obzirom na navedeno, pH vrednost predstavlja veoma dobar indikator procesa fermentacije kupusa. Niska pH vrednost čini organske kiseline liposolubilnim, omogućavajući im da difunduju kroz ćelijske membrane i dospevaju do citoplazme patogena (slika 2.7), što ima pozitivnu ulogu sa zdravstvenog aspekta na ljudski organizam (Djadouni i Kihal, 2012).



Slika 2.7. Šematski prikaz transportnog sistema i mogućeg posledičnog dejstva organske kiseline na mikrobnu ćeliju (Theron i Rykers Lues, 2011)

Organske kiseline nastale fermentacijom glavica kupusa, pored toga što poseduju antimikrobno delovanje, doprinose i porastu antioksidativne aktivnosti kod fermentisanog kupusa (Liu i Zhou, 2014; Özcelik i sar., 2016).

2.4.1.3. Antioksidativna aktivnost

Antioksidanti su vredna grupa jedinjenja voća i povrća. Ova jedinjenja značajno smanjuju negativne efekte reaktivnih vrsta kiseonika i azota na normalnu fiziološku funkciju organizma, odlažući ili usporavajući stvaranje slobodnih radikala. U većini slučajeva antioksidativno delovanje uključuje različite mehanizme, te se zbog toga antioksidativna svojstva ne mogu pripisati određenoj klasi hemijskih jedinjenja. Prema tome, antioksidanti su pronađeni među mnogim klasama primarnih i sekundarnih biljnih metabolita, kao što su aminokiseline, amini i poliamini, organske kiseline, terpenoidi, fenoli, alkaloidi i jedinjenja sumpora. Dokazano je da smeše antioksidanata imaju veću antioksidativnu aktivnost od zbira pojedinačnih jedinjenja. Tako, postoje sinergijske interakcije između fenolnih kiselina, β -karotena i askorbinske kiseline, kao i između flavonoida i tokoferola (Sinha, 2011).

Preradom svežeg povrća dolazi do transformacije antioksidanata. Ukoliko se u toku procesa proizvodnje antioksidanti transformišu u aktivnija jedinjenja, poboljšava se antioksidativna aktivnost proizvoda, dok uništavanje ili gubitak antioksidanata generalno dovodi do smanjenja antioksidativne aktivnosti. Antioksidativna aktivnost se smanjuje usled inaktivacije antioksidativnih jedinjenja oksidacijom, na primer, delovanjem enzima (polifeniloksidaza i dr.) ili ispiranjem u vodi za kuvanje. Obe promene imaju veći uticaj na antioksidativna jedinjenja rastvorljiva u vodi, askorbinsku kiselinu, flavonoide i fenolne kiseline, nego na antioksidante rastvorljive u mastima, karotenoide i tokoferole (Jongen, 2002).

Biljke iz grupe krstašica poseduju dobru antioksidativnu aktivnost, najviše zahvaljujući grupi fenolnih jedinjenja kao što su flavonoli i hidrosicimetna kiselina. Pored ovih jedinjenja, antioksidativnoj aktivnosti kod krstašica doprinose jedinjenja iz grupe glukozinolata, karoteni i vitamini (Jongen, 2002). Usled promena koje se odvijaju u toku fermentacije kupusa, uključujući transformaciju antioksidanata u aktivnija jedinjenja pod dejstvom aktivnosti mikroorganizama ili

inhibicijom enzima, dolazi do porasta antioksidativne aktivnosti. Prema tome, gotov proizvod – fermentisani kupus može posedovati bolje antioksidativne karakteristike u poređenju sa sirovim glavicama kupusa (Kusznierewicz i sar., 2008a).

2.4.1.4. Tekstura i promena boje

Senzorni parametri, tekstura i boja, pored ukusa i mirisa, važni su kvalitativni atributi s obzirom da su prvi primećeni od strane potrošača (Tepić, 2012; Hui i Evranuz, 2016). Tokom proizvodnje fermentisanog povrća šećeri u sirovini transformišu se u mlečnu kiselinu i druge organske kiseline koje pomažu u očuvanju proizvoda. Kiselo-mlečna fermentacija doprinosi senzornim karakteristikama namirnica kao što su poželjan miris, ukus, tekstura i izgled. Međutim, promene u teksturi i boji mogu nastati kao rezultat mikrobiološkog kvarenja, pa se smatraju i glavnim parametrima koji ukazuju na uspešnost i efikasnost procesa fermentacije prehrambenih proizvoda (Hui i Evranuz, 2016).

Teksturalne promene koje se dešavaju u povrću nakon berbe obično se manifestuju preko omekšavanja tkiva usled gubitka vode i razgradnje pektina. Pektin, komponenta ćelijskog zida i središnje lamele biljne ćelije, biljci obezbeđuje čvrstoću. Omekšavanje povrća javlja se usled aktivnosti enzima koji rastvaraju i depolimerizuju pektin. Dve grupe enzima koje razgrađuju pektin uključuju depolimeraze i pektin esteraze. Depolimeraze hidrolizuju glikozidne veze, dok pektin esteraze uzrokuju deesterifikaciju pektina. U nekim slučajevima, prilikom fermentacije, pored NaCl u naliv se dodaje i kalcijum-hlorid (CaCl_2) u količini 0,2-0,4% da bi se dobila hrskava tekstura proizvoda. Kalcijum jača ćelijski zid, stvarajući intermolekularne mostove između slobodnih karboksilnih grupa pektinske kiseline i reguliše aktivnost enzima ćelijskog zida. U toku procesa fermentacije kvasci mogu prouzrokovati omekšanje tkiva proizvodnjom pektolitičkih enzima i na taj način uticati na teksturu tkiva kod povrća u kasnijim fazama fermentacije (Hui i Evranuz, 2016). Na omekšavanje tkiva mogu da utiču i morfološke karakteristike glavica kupusa, naime kod čvrstih kompaktnih glavica sa izrazito zbijenim listovima, difuzija slanog rastvora je otežana, što može imati za posledicu omekšavanje tkiva unutar glavice tokom procesa fermentacije (Cvetković, 2014). Prema tome, glavni problem

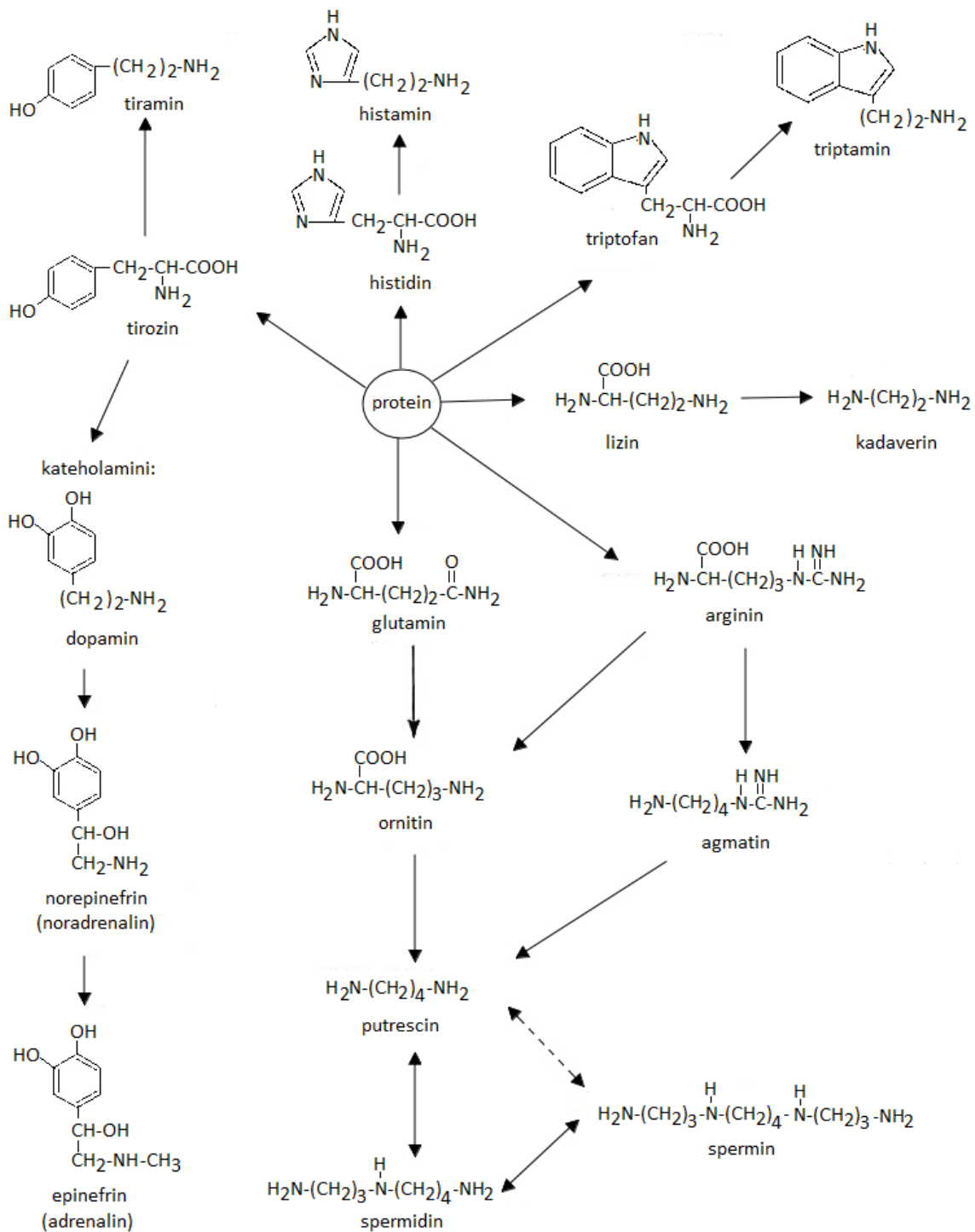
tokom skladištenja fermentisanog povrća javlja se usled aktivnosti biljnih enzima i enzima mikroorganizama (Cvetković, 2014; Hui i Evranuz, 2016).

Pored teksture, boja je glavna karakteristika koja čini proizvod privlačnim potrošačima, te predstavlja sinonim za kvalitet proizvoda i igra istaknutu ulogu u konačnom odabiru i potrošnji (Nieto-Sandoval i sar., 1999). Prilikom prerade povrća veoma često dolazi do gubitka boje, usled nestabilnosti bojenih materija i nepoželjnih enzimatskih i neenzimatskih reakcija (Tepić, 2012). Značajne promene u boji obično se javljaju ukoliko proces fermentacije nije dobro vođen. Smeđa boja glavica kupusa obično se javlja usled oksidacije fenolnih jedinjenja. U toku fermentacije moguće je da se na glavicama kupusa pojave promene u boji na crveno, roze ili sivo, koje nastaju kao proizvodi metabolizma nepoželjnih mikroorganizama (Niketić-Aleksić, 1988; Červenski, 2010). Enzimatske reakcije koje dovode do promene boje i omekšavanja tkiva proizvoda nastaju ukoliko se fermentacija odvija pri visokim temperaturama, niskim koncentracijama soli i ukoliko je proizvod bio izložen dejstvu kiseonika (Sinha, 2011).

2.4.1.5. Biogeni amini

Biogeni amini su organske azotne baze koje se sintetišu kao posledica ćelijskog metabolizma mikroorganizama, biljaka i životinja (Santos, 1996). Akumulacija biogenih amina dešava se u namirnicama u kojima postoji dostupan izvor slobodnih aminokiselina i enzima dekarboksilaze. Aminokiseline se formiraju iz proteina (slika 2.8) uz pomoć aktivnosti mikrobnih proteinaza i peptidaza (Hutkins, 2006).

Hemijska struktura biogenih amina može biti alifatična, aromatična ili heterociklična. U alifatične biogene amine ubrajaju se putrescin, kadaverin, spermin, spermidin; aromatični su tiramin, feniletilamin, dok su heterociklični histamin i triptamin. Putrescin, kadaverin, spermin i spermidin su neophodni za žive ćelije, važni su za regulaciju funkcije nukleinskih kiselina i sinteze proteina, kao i stabilizaciju ćelijskih membrana. Međutim, prisustvo biogenih amina u namirnicama može biti u tesnoj vezi sa kvarenjem, kao i epidemijama trovanja hranom (Santos, 1996).



Slika 2.8. Šematski prikaz nastanka biogenih amina (Halász i sar., 1994)

U fermentisanim proizvodima od povrća obično se nalaze male količine biogenih amina. Međutim, ukoliko su koncentracije biogenih amina koje se unose preko namirnica visoke, može doći do trovanja hranom. Biogeni amini se smatraju kancerogenima zahvaljujući sposobnosti da reaguju sa nitritima i formiraju nitrozamine (Hui, 2004).

Biogeni amini koji se mogu pronaći u fermentisanom povrću, uglavnom fermentisanom kupusu, kimčiju i maslinama, uključuju histamin dobijen iz histidina, tiramin iz tirozina i putrescin i kadaverin iz lizina, arginina i glutamina. Međutim, u većini slučajeva zabeležene koncentracije biogenih amina u ovim proizvodima od povrća manje su od nivoa koji može prouzrokovati simptome trovanja hranom, odnosno manje su od 1 g/kg (Hutkins, 2006).

Sadržaj biogenih amina u komercijalnom fermentisanom kupusu je približno 540 mg/kg. Glavni biogeni amini kod fermentisanog kupusa su histamin, tiramin, putrescin i kadaverin, nastali redom od histidina, tirozina, ornitina i lizina. Starter kulture koje sadrže *Lb. plantarum* sposobne su da suzbiju proces stvaranja tiramina, putrescina i kadaverina snižavanjem pH vrednosti sredine, što dovodi do inhibicije mikroorganizama koji su sposobni da učestvuju u sintezi biogenih amina (Hui, 2004). Toksikološki nivo biogenih amina veoma je nezahvalan za određivanje, s obzirom da zavisi od individualnih karakteristika pojedinca, kao i prisustva drugih amina (Özogul i Özogul, 2019).

2.4.1.6. Ukupna suva materija, aktivnost vode i sadržaj soli

Pored do sada opisanih promena koje se odvijaju u toku fermentacije, posmatraju se i drugi vredni fizičko-hemijski parametri kao što su sadržaj ukupne suve materije, aktivnost vode i sadržaj soli u glavicama kupusa.

Sadržaj ukupne suve materije u glavicama kupusa je veoma važan indikator kvaliteta i kreće su u proseku oko 8% kod tehnološki zrelog kupusa (Červenski i Medić-Pap, 2018). Glavni sastojci kod belog kupusa su ugljeni hidrati. Oni čine oko 90% ukupne suve materije, od čega su približno 2/3 ugljeni hidrati niske molekulske mase, dok približno 1/3 čine dijetetska vlakna (Nilnakara i sar., 2009). Sadržaj ukupne suve materije ukazuje i na stepen zrelosti (Cvetković, 2014), što je veoma bitno pri odabiru sirovine za dalju preradu i tehnološki proces proizvodnje.

Rane sorte sa manjim sadržajem suve materije pokazuju lošije rezultate pri procesu fermentacije, dok se za fermentaciju biraju srednje kasne sorte sa većim sadržajem suve materije i šećera (Červenski i Medić-Pap, 2018; Satora i sar., 2021).

Vrednost a_w kod svežeg povrća obično se kreće u granicama od 0,98 do 0,99 (Ray i Bhunia, 2014). U industriji često se koriste različiti načini za sniženje vrednosti a_w , jer je to od posebne važnosti za sprečavanje razvoja nepoželjnih mikroorganizama. U tabeli 2.5. predstavljena je veza između vrednosti a_w i koncentracije slanog rastvora sa različitim % NaCl.

Tabela 2.5. Veza između aktivnosti vode i koncentracije slanog rastvora (Jay i sar., 2005)

Aktivnost vode (a_w)	% NaCl [m/v]
0,995	0,9
0,990	1,7
0,980	3,5
0,960	7,0
0,940	10,0
0,920	13,0
0,900	16,0
0,880	19,0
0,860	22,0

Vrednosti a_w na kojima je inhibiran rast većine koka i laktobacila i vegetativne ćelije bacila kreću se u granicama 0,95-0,91, dok je rast većine kvasaca i plesni inhibiran pri a_w vrednostima 0,91-0,86 i 0,86-0,80, redom (Tepić Horecki, 2019). Snižavanje vrednosti a_w često se primenjuje u cilju očuvanja kupusa od mikrobiološkog kvara (Ray i Montet, 2015), tako što se dodatkom soli može redukovati vrednost a_w i ograničiti rast bakterija koje su odgovorne za kvarenje proizvoda (Roberts i Greenwood, 2003; Hutkins, 2006).

Koncentracije soli, koje se dodaju svežem povrću na početku fermentacije, različite su u zavisnosti od sirovine namenjene za proces fermentacije. Veća tolerancija na so zahteva se kod

bakterija koje su potrebne za uspešnu fermentaciju krastavaca (10%-16%) i maslina (9%-10%) u odnosu na kupus u glavicama (5%-6%) i ribanac (2%-2,5%) (Daeschel i Fleming, 1984; Niketić-Aleksić, 1988; Mehta i sar., 2012). Takođe, dinamika premeštanja soli unutar povrća je različita u toku procesa fermentacije u zavisnosti od načina tretiranja kupusa pre fermentacije. Apsorpcija soli dešava se sporije kod kupusa namenjenog za fermentaciju u glavicama u poređenju sa ribanim kupusom. Prema Pederson i sar. (1961) potrebno je od tri do četiri sedmice da bi se koncentracija soli između rasola i glavica kupusa izjednačila. Dodatak soli, uglavnom NaCl, predstavlja kritični faktor u toku fermentacije kupusa, jer rast mikroorganizama i senzorne karakteristike gotovog proizvoda, fermentisanog kupusa, zavise od količine dodate soli (Peñas i sar., 2010).

2.4.2. Mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa

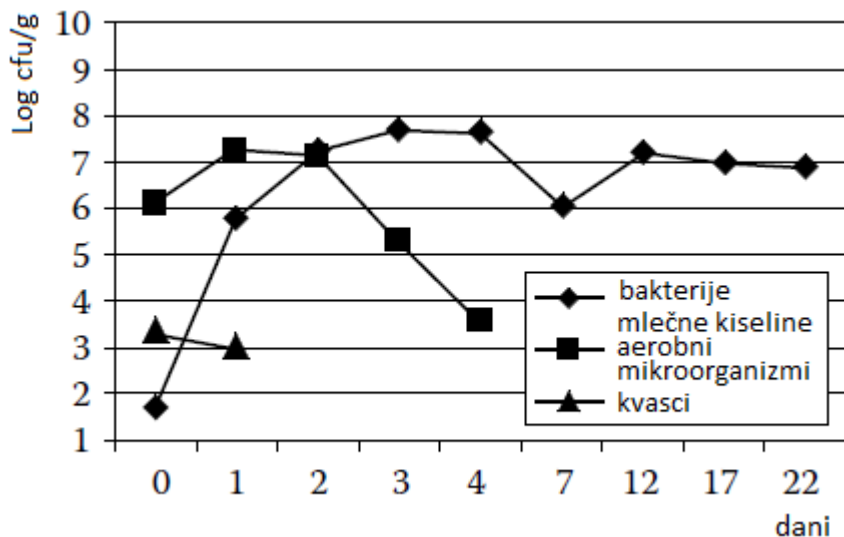
Biljni materijal sadrži mikroorganizme čija populacija zavisi od karakteristika biljnog materijala, kao i geografskog porekla (Torres i sar., 2020). Jestivi delovi povrća su prirodno stanište za različite vrste mikroorganizama predstavljene u tabeli 2.6. Dominantna inicijalna mikropopulacija na svežem povrću sastoji se uglavnom od aerobnih bakterija pseudomonasa, fakultativno anaerobnih enterobakterija, kvasaca i plesni (Holzapfel i sar., 2008; Cvetković, 2014).

Spoljašnji, neoprani, listovi kupusa mogu da sadrže jedan do dva miliona mikroorganizama po 1 g sirovine, dok se kod odstranjenih i opranih listova taj broj kreće između 200 i 500 hiljada. Unutrašnji listovi glavica kupusa sadrže mali broj vrsta mikroorganizama koje se nalaze u malom broju, između 100 do 150000 po 1 g (Žakula, 1980). Bakterije mlečne kiseline na glavicama svežeg kupusa veoma su slabo zastupljene, do 10^3 cfu/g, što predstavlja 0,15%-1,5% ukupne populacije bakterija, od kojih je najzastupljenija *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* (Holzapfel i sar., 2008; Cvetković, 2014).

Tabela 2.6. Mikropopulacija prisutna na sirovom svežem povrću (Hutkins, 2006)

Mikroorganizam	Log cfu/g
Aerobne bakterije	4,0 – 6,0
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Flavobacterium</i>	
<i>Micrococcus</i>	
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Bacillus</i>	
Enterobakterije	3,0 – 3,5
<i>Enterococcus</i>	
<i>Enterobacter</i>	
<i>Klebsiella</i>	
<i>Escherichia</i>	
Kvasci i plesni	0,3 – 4,6
<i>Fusarium</i>	
<i>Ascochyta</i>	
<i>Aspergillus</i>	
<i>Penicillium</i>	
<i>Rhodotorula</i>	
Bakterije mlečne kiseline	0,7 – 4,0
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Pediococcus</i>	
<i>Streptococcus</i>	
<i>Tetragenococcus</i>	

U toku fermentacije kupusa dolazi do rasta broja bakterija mlečne kiseline, kako je predstavljeno na slici 2.9, dok broj aerobnih mikroorganizama i kvasaca opada.



Slika 2.9. Promene glavnih grupa mikroorganizama u toku fermentacije kupusa (Holzapfel i sar., 2008)

Bakterije mlečne kiseline koje su uključene u fermentaciju kupusa su *Ln. mesenteroides*, *Ln. fallax*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* i *Pc. pentosaceus*, među kojima *Lb. plantarum* pripada jednoj od najčešće izolovanih vrsta (Hutkins, 2006; Torres i sar., 2020). Povećan sadržaj NaCl tokom procesa fermentacije stimuliše rast ovih bakterija, a sprečava rast nepoželjnih mikroorganizama (Cvetković, 2014). Bakterije mlečne kiseline kao izvor azota koriste aminokiseline, peptide i proteine, a takođe moraju dobiti neophodne vitamine i faktore rasta iz supstrata na kome se razvijaju (Žakula, 1980). U toku kiselo-mlečne fermentacije bakterije mlečne kiseline sintetišu metabolite sa antimikrobnim delovanjem, kao što su organske kiseline, bakteriocini i komponente niske molekulske mase, vodonik peroksid i diacetil (Trias i sar., 2008). Bakteriocini su proteinske supstance koje inhibiraju rast patogenih mikroorganizama, među koje spadaju *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., što doprinosi dobroj održivosti gotovog proizvoda fermentisanog kupusa u glavicama (Trias i sar., 2008; Cvetković, 2014; Terefe, 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. MATERIJAL

Sveže glavice kupusa hibrida bravo, tenisiti i sorte futoški za potrebe analize prikupljene su sa polja PG Kurjakov iz Futoga. Uzorci svežeg i fermentisanog kupusa samleveni su u kašu, izuzev uzoraka namenjenih za analizu ukupne promene boje i teksturalnih karakteristika. Kaše kupusa i uzorci rasola iz fermentacije kupusa 2016. godine zamrznuti su i skladišteni na temperaturi -20 °C pre analiziranja.

Za fermentaciju kupusa korišćen je natrijum-hlorid (NaCl), kuhinjska so, proizvođača Solana d.d. Tuzla, Bosna i Hercegovina.

Kao starter kultura korišćena je liofilizovana bakterijska kultura, *Lactobacillus plantarum* 14D, proizvođača Centro Sperimentale del Latte S.r.l. (Zelo Buon Persico (LO), Italija), namenjena za svrhe fermentacije povrća.

Za nalivanje glavica kupusa u cilju procesa fermentacije korišćena je voda iz gradske vodovodne mreže.

1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), Folin-Ciocalteu reagens i standard mravlje kiseline bili su proizvođača Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemačka). *Orto*-fosforna kiselina je iz Kemika (Zagreb, Hrvatska), standardi vitamina C i sirćetne kiseline J.T. Baker iz Holandije, standardi mlečne i oksalne kiseline iz Laborat Laphoma Hemikali (Skopje, Makedonija) i standard ćilibarne kiseline iz Supelco Analytical (Bellefonte, Pensilvanija). Ostale hemikalije i reagensi bili su analitičke čistoće.

3.2. METODE

3.2.1. Proces fermentacije u industrijskim uslovima

Glavice kupusa hibrida bravo u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine podvrgnute su procesu fermentacije u industrijskim uslovima u PG Kurjakov iz Futoga. Glavice kupusa upotrebljene za proces fermentacije ubrane su istog dana kada je fermentacija postavljena, bez prethodnog skladištenja sirovine. Prethodno je izvršena selekcija sveže sirovine. Bolesne i oštećene glavice nisu korišćene za eksperiment. Listovi sa vrha svake glavice odstranjeni su da bi se redukovala nečistoća i nepoželjni mikroorganizmi iz okoline. Korenovi kupusa zasečeni su u obliku krsta, radi lakše difuzije soli unutar glavica, pre postavljanja kupusa u plastičnu burad zapremine 3000 l. Glavice kupusa, 1500 kg po buretu, tesno su zbijene, rastvor soli je sipan dok nije kompletno prekrpio glavice kupusa. Konačno, burad su zatvorena u ciju postizanja anaerobnih uslova.

Plan ogleda prikazan u tabeli 3.1. izveden je na osnovu Box-Behnken eksperimentalnog dizajna sa tri numerička faktora na tri nivoa, odnosno 13 slučajnih promenljivih. Nezavisne promenljive – sadržaj soli, količina upotrebljene starter kulture i temperature naliva iskorišćene su za eksperimentalni dizajn. Priprema starter kulture izvedena je po uputstvu proizvođača. Porcije liofilizovane bakterijske kulture u količini 37,5 g (75 g) rastvorene su u 375 ml (750 ml) vode sa česme. Rastvori su dodati u burad sa kupusom i rastvorom soli. Bolja raspoređenost rastvora soli u vodi postignuta je upotrebom sistema pumpi uz pomoć kojih je slani rastvor cirkulisao unutar buradi u periodu od 5 min jednom na dan.

Tabela 3.1. Eksperimentalni dizajn sa nezavisnim promenljivim i oznakama uzoraka

Uzorak	NaCl [%]	Starter kultura [g/kg ^a]	t [°C]
V1 ^b	6	0	22
V2	7	0	18
V3	8	0	22
V4	7	0	26
V5	6	0,025	18
V6	8	0,025	18
V7	7	0,025	22
V8	6	0,025	26
V9	8	0,025	26
V10	7	0,050	18
V11	6	0,050	22
V12	8	0,050	22
V13	7	0,050	26

^asvež kupus^b“zlatni” standard

“Zlatni” standard je poznata referenca i predstavlja uslove koje proizvođač PG Kurjakov iz Futoga obično koristi tokom proizvodnje fermentisanog kupusa. U ovom slučaju to su – količina dodatog NaCl od 6%, bez upotrebe starter kulture, pri temperaturi od 22 °C i dužini procesa fermentacije od 62 dana. Svež uzorak je prikupljen na dan berbe, dok su ostali uzorci prikupljeni nakon 5, 12, 27 i 62 dana fermentacije u cilju praćenja fizičko-hemijskih i mikrobioloških promena u toku fermentacije.

U ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine, postavljenom takođe u industrijskim uslovima u PG Kurjakov, priprema sirovine kupusa hibrida bravo odvijala se na isti način kao u ogledu iz 2015. godine. Količina dodatog NaCl u ovom ogledu iznosila je 6%. Proces fermentacije odvijao se spontano u trajanju od 40 dana. Promenljiva u ovom ogledu bila je temperatura fermentacije. Uzorci fermentisanog kupusa predstavljeni su oznakama K1-K3, dok

je sveži uzorak kupusa označen sa oznakom K0. Uporedo sa uzorcima kupusa, nakon 40 dana fermentacije, za analizu uzimani su i uzorci rasola označeni sa oznakama R1-R3. Oznake uzoraka i temperaturni uslovi fermentacije predstavljeni su u tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Oznake uzoraka fermentisanog kupusa i rasola pri različitim temperaturnim intervalima

Uzorak	Oznaka uzorka	Temperaturni interval [°C]
kupus	K1	16-18
	K2	18-20
	K3	20-22
rasol	R1	16-18
	R2	18-20
	R3	20-22

Ogled iz fermentacije kupusa 2017. godine postavljen je kao i prethodna dva ogleda u industrijskim uslovima u PG Kurjakov iz Futoga. Fermentaciji su podvrgnuta dva hibrida kupusa, tenisiti i bravo i kupus sorte futoški. Priprema sirovine odvijala se na isti način kao u prethodna dva ogleda. Fermentacija se odvijala u devet plastičnih buradi tako što je svaka sorta odnosno hibrid kupusa tretiran na tri različita načina. Uzorci kupusa u glavicama T1, B4 i F7 fermentisani su procesom spontane fermentacije uz dodatak 3,3% NaCl. Procenat NaCl iznosio je 3,3% u ovom slučaju iz razloga što je 2017. godine proizvođač Kurjakov koristio 3,3% NaCl pri uobičajenoj proceduri fermentacije kupusa u svom gazdinstvu. Uzorci T2, B5 i F8 fermentisani su rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije koja se odvijala takođe u PG Kurjakov u industrijskim uslovima. Procenat NaCl u rasolu iznosio je 2,57%. Uzorci T3, B6 i F9 fermentisani su sa 3,3% NaCl uz dodatak starter kulture. Količina dodate starter kulture iznosila je 0,050 g po kilogramu svežeg kupusa. Priprema starter kulture izvedena je prema istom postupku, kao što je opisano u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine. Oznake uzoraka sorte/hibrida kupusa i navedeni uslovi fermentacije predstavljeni su tabelarno radi bolje preglednosti (tabela 3.3).

Tabela 3.3. Oznake uzoraka fermentisanog kupusa i rasola pri različitim temperaturnim intervalima

Sorta/hibrid	Oznaka uzorka	Uslovi fermentacije
tenisiti	T1	3,3% NaCl
	T2	rasol
	T3	3,3% NaCl + starter
bravo	B4	3,3% NaCl
	B5	rasol
	B6	3,3% NaCl + starter
futoški	F7	3,3% NaCl
	F8	rasol
	F9	3,3% NaCl + starter

Burad sa kupusom izložena su temperaturi okoline, a temperatura naliva je praćena u toku fermentacije i rezultati merenja su predstavljeni u tabeli 4.5, u poglavlju 4.2.1. U svrhu analiza uzorci kupusa uzeti su nakon 3, 6, 12, 24, kao i poslednjeg dana fermentacije, dok su sveži uzorci sve tri sorte/hibrida uzeti na dan postavljanja ogleda. Na osnovu sadržaja šećera za uzorke T1, B4 i F7 određen je 55-ti dan kao poslednji dan fermentacije, dok je za ostale uzorke (T2, T3, T5, T6, F8 i F9) poslednji dan bio 44-ti dan fermentacije.

3.2.2. Fizičko-hemijske analize svežeg i fermentisanog kupusa

Karakterizacija svežeg kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine određena je sadržajem masti, proteina, celuloze (sirovih vlakana), ukupne suve materije, pH vrednosti, antioksidativnom aktivnosti, sadržajem askorbinske i drugih organskih kiselina, teksturom i promenom boje, aktivnosti vode, ukupne kiselosti, sadržajem ukupnih šećera, sadržajem soli i biogenih amina. Navedene analize, izuzev sadržaja masti, proteina i celuloze (sirovih vlakana), određene su kako u svežim tako i u fermentisanim uzorcima kupusa.

Fizičko-hemijske analize u koje spadaju sadržaj suve materije (ukupne i rastvorljive), ukupna kiselost, sadržaj ukupnih šećera, sadržaj soli, pH, a_w , sadržaj ukupnih fenola i sadržaj organskih kiselina određene su u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa hibrida bravo i rasola u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine. Analize teksture i ukupne promene boje određene su samo za uzorke svežeg i fermentisanog kupusa u glavicama.

U ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine u uzorcima svežeg kupusa u glavicama sorte/hibrida tenisiti, bravo i futoški analizirana je ukupna suva materija, ukupna kiselost, sadržaj ukupnih šećera, sadržaj soli i a_w , tekstura i promena boje. Navedene analize urađene su i u uzorcima fermentisanog kupusa sve tri sorte/hibrida kupusa, s tim da je pH vrednost u uzorcima kupusa praćena u toku procesa fermentacije. Dodatno, fermentisane glavice kupusa tenisiti, bravo i futoški podvrgnute su senzorskoj analizi šestočlanog tima iskusnih ocenjivača.

3.2.2.1. Sadržaj ukupne i rastvorljive suve materije

Ukupna suva materija (sm) svih uzoraka određena je gravimetrijskom metodom analize sušenjem do konstantne mase na temperaturi $105 \pm 0,5$ °C (Sl. list SFRJ, 29/83).

Rastvorljiva suva materija merena je refraktometrom uz pomoć Abbe-ovog univerzalnog refraktometra direktnim očitavanjem rezultata merenja sa skale refraktometra (Sl. list SFRJ, 29/83).

3.2.2.2. Sadržaj masti

Sadržaj masti određen je u svežem kupusu hibrida bravo (fermentacija kupusa 2015. godine). Postupak određivanja baziran je na konvencionalnom "Soxhlet extraction" metodu (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010), upotrebom dietil etra kao rastvarača.

3.2.2.3. Sadržaj proteina

Sadržaj proteina u uzorku svežeg kupusa hibrida bravo (fermentacija kupusa 2015. godine) određen je metodom po Kjeldahl-u (Marcó, i sar., 2002).

3.2.2.4. Sadržaj celuloze (sirovih vlakana)

Sadržaj celuloze (sirovih vlakana) u kupusu hibrida bravo u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine određen je metodom po Kirschner-Ganakovoj (Vračar, 2001).

3.2.2.5. Ukupna kiselost

Ukupna kiselost uzoraka kupusa izražena je na mlečnu kiselinu. Analiza je urađena za sveže uzorke kupusa i uzorke prikupljene poslednjeg dana fermentacije, titracijom, koristeći 0,1 M NaOH sa fenolftaleinom kao indikatorom (Sl. list SFRJ, 29/83).

3.2.2.6. Sadržaj ukupnih šećera

Sadržaj ukupnih šećera u svežim i fermentisanim uzorcima kupusa, kao i u uzorcima rasola iz fermentacije kupusa 2016. godine, određen je metodom po Luff-Schoorl-u (Sl. list SFRJ, 29/83).

3.2.2.7. Sadržaj soli

Sadržaj soli u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa, kao i u uzorcima rasola iz fermentacije 2016. godine, određen je metodom po Mohr-u (Kolarov i sar., 1996).

Sva određivanja sadržaja suve materije, masti, proteina, celuloze (sirovih vlakana), ukupne kiselosti, sadržaja ukupnih šećera i sadržaja soli izvedena su u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti (%) \pm SD.

3.2.2.8. pH vrednost

pH vrednost uzoraka svežeg i fermentisanog kupusa, kao i rasola iz fermentacije kupusa 2016. godine, merena je na uređaju WTW Inolab 720 pH-meter, Holandija, pri temperaturi od 20 °C (Vračar, 2001).

3.2.2.9. Aktivnost vode

Aktivnost vode (a_w vrednost), merena je u uzorcima svežeg kupusa i fermentisanim uzorcima kupusa, kao i rasola u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine. Aktivnost vode merena je postavljanjem približno 2 g kaše kupusa, odnosno 2 ml rasola, u plastičnu mernu

posudu merne ćelije sa sondom unutar a_w -metra (CH-8853 Lachen, Novasina LabSwift, Švajcarska). Nakon dostizanja ravnotežne vlažnosti, a_w vrednost se očitava sa displeja a_w -metra.

3.2.2.10. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa hibrida bravo u glavicama, kao i uzorcima rasola u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine. Uzorci svežeg i fermentisanog kupusa hibrida bravo odmrznuti su pre ekstrakcije. Oko 10 g uzorka preneseno je u erlenmajer zapremine 50 ml, preliveno je sa 25 ml rastvora ekstrakcionog sredstva (metanola) i prekriveno folijom. Nakon toga, uzorci su postavljeni na laboratorijski šejker (UNIMAX 1010, Heidolph, Nemačka), gde su mešani 24 h na sobnoj temperaturi u mraku. Sadržaj je kvantitativno prenesen u odmerne tikvice od 50 ml i dopunjen rastvaračem do nazivne zapremine. Dobijeni ekstrakti i uzorci rasola (nakon odmrzavanja) profiltrirani su u staklene bočice sa poklopcima i skladišteni na tamnom mestu do analiziranja. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu i filtratima rasola određen je prema Folin-Ciocalteu proceduri (Singleton i Rossi, 1965; Kähkönen i sar., 1999) uz upotrebu hlorogene kiseline kao standarda. Apsorbanca je izmerena na 765 nm (6300 Spectrophotometer, Jenway, UK). Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao ekvivalent hlorogene kiseline (mg CAE/100 g sm za uzorke kupusa i mg/100 ml za uzorke rasola). Eksperiment je ponovljen tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

3.2.2.11. Antioksidativna aktivnost

Uzorci svežeg i fermentisanog kupusa hibrida bravo (ogled iz fermentacije kupusa 2015. godine) odmrznuti su pre ekstrakcije. Oko 10 g uzorka preneseno je u erlenmajer zapremine 50 ml, preliveno je sa 25 ml rastvora ekstrakcionog sredstva (metanola) i prekriveno folijom. Nakon toga, uzorci su postavljeni na laboratorijski šejker (UNIMAX 1010, Heidolph, Nemačka), gde su mešani 24 h na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 24 h uzorci su kvantitativno preneseni u odmerne tikvice zapremine 50 ml koje su dopunjene ekstrakcionim sredstvom do nazivne zapremine 50 ml. Sadržaj tikvica je profiltriran kroz kvalitativni filter papir (plava traka). Ovako pripremljeni ekstrakti skladišteni su u zatvorenim bocama u frižideru (4 °C). Sposobnost uzorka

da neutrališe 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) slobodne radikale određena je korišćenjem metode prezentovane u studiji Espin i sar. (2000). Određena zapremina razblaženog uzorka izmeša se sa metanolom (96%) i 90 μ M DPPH u cilju dobijanja finalnih koncentracija uzoraka. Nakon inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 515 nm i rezultati su izraženi kao kapacitet hvatanja slobodnih radikala (engl. Radical Scavenging Capacity, RSC) u procentima. Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (%RSC) je izračunat pomoću sledeće formule:

$$\%RSC = 100 - \frac{A_{uzorka} * 100}{A_{stepe\ probe}} \quad (1)$$

Antioksidativna aktivnost je dalje izražena kao inhibitorna koncentracija 50% od RSC vrednosti (IC_{50}). IC_{50} predstavlja koncentraciju rastvora koja je potrebna da bi se dobilo 50% RSC, izraženog kao mg svežeg, odnosno fermentisanog kupusa po ml.

3.2.2.12. Sadržaj askorbinske kiseline

Uzorci svežeg i fermentisanog kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine, oko 2,5 g po uzorku, odmereni su u erlenmajere zapremine 50 ml. U erlenmajere je dodato 5 ml rastvora 3% m-fosforne kiseline i 8% sirćetne kiseline u bidestilovanoj vodi. Sadržaj erlenmajera mešan je 5 minuta i nakon mešanja dopunjen do nazivne zapremine bidestilovanom vodom. Pre analiziranja, svi uzorci su profiltrirani kroz membranu od regenerisane celuloze sa veličinom pora 0,45 μ m i 25 mm prečnika (Macherey-Nagel, Nemačka). Određivanje askorbinske kiseline izvedeno je reversno faznom hromatografijom, upotrebom Agilent 1100 Series HPLC, USA, prema Šumić i sar. (2016). Sistem se sastoji od degasera, binarne pumpe, ZORBAX® SB-C18 kolone (4,6×150 mm, 5-Micron) i UV-DAD detektora. Analize su izvršene u izokratskom režimu sa 0,1 mol/l amonijum-acetata (pH 5,1) kao mobilnom fazom. Postavljeni su LC parametri: brzina protoka 0,4 ml/min, temperatura kolone 37 °C, i talasnom dužinom 254 nm (Cvetković i sar., 2012). Za kalibraciju je korišćen standard askorbinske kiseline. Rezultati su izraženi u mg/100 g sm.

3.2.2.13. Sadržaj organskih kiselina

Oko 20 g uzorka, svežeg i fermentisanog kupusa, pomešano je sa bidestilovanom vodom u odnosu 1:1,75. Uzorci su homogenizovani uz pomoć ultraturaksa Heidolph DiAx 900 (Gemini BV, Holandija) na 1000 obrtaja u trajanju od 5 minuta i magnetne mešalice MSH-420 (Boeco, Nemačka) u trajanju od 20 minuta. Nakon toga uzorci su kvantitativno preneseni u kivete i postavljeni u centrifugu (Janetzki, Nemačka) na 4000 obrtaja u trajanju od 10 minuta. Supernatanti su korišćeni za dalje analiziranje. Uzorci rasola (ogled iz fermentacije kupusa 2016. godine) profiltrirani su kroz filter papir (plava traka) pre analize. Određivanje organskih kiselina u uzorcima kupusa mereno je upotrebom reversno fazne hromatografije, sa Agilent 1100 Series HPLC, USA, prema naučnicima Kordiš-Krapež i sar. (2001), sa manjim modifikacijama u pogledu tipa kolone, talasne dužine detekcije i temperature kolone. Sistem je opremljen sa degaserom, binarnom pumpom, ZORBAX[®] SB-C18 kolonom (4,6×150 mm, 5-Micron) i UV-DAD detektorom. Analize su izvedene u izokratskom režimu sa 6 mmol/l fosforne kiseline (pH 2,1) kao mobilne faze. Postavljeni su LC parametri: brzina protoka 1,0 ml/min, temperatura kolone 28 °C, detekciona talasna dužina za oksalnu, mravlju, mlečnu, sirćetnu i ćilibarnu kiselinu je 220 nm. Za kalibraciju su korišćeni standardi organskih kiselina. Rezultati su izraženi u g/100 g sm i mg/ml, za uzorke kupusa i rasola, redom.

Određivanja antioksidativne aktivnosti, sadržaja askorbinske i drugih organskih kiselina izvedena su u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD.

3.2.2.14. Teksturalne karakteristike i ukupna promena boje

Instrumentalna merenja teksture u ogledima iz fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine izvedena su korišćenjem testa sile probijanja na teksturometru (TA.HDplus, Stable Micro System, Engleska), prema Cvetković (2014). Test probijanja na listove kupusa izveden je pomoću cilindrične sonde od nerđajućeg čelika prečnika 2 mm. Merenje je obavljeno tako što je deo lista kupusa postavljen na šuplje postolje i preklopljen perforiranom platformom, kako je predstavljeno na slici 3.1. Analiza je podešena tako da je brzina testa 2,0 mm/s, rastojanje 20 mm i sila 5 kg. Rezultati čvrstoće lišća kupusa izraženi su kao sila (g) potrebna za probijanje kroz uzorke. Eksperiment je ponavljen deset puta za svaki od uzoraka, u statističke svrhe.

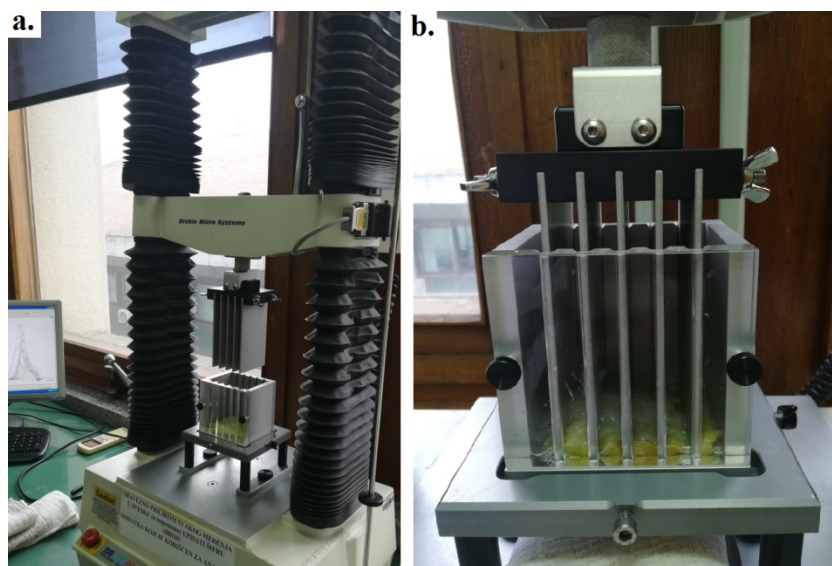


Slika 3.1. Instrumentalna analiza teksturalnih karakteristika delova listova kupusa

Instrumentalna merenja teksture u ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine izvedena su korišćenjem testa sile presecanja na teksturometru (TA.HDplus, Stable Micro System, Engleska). Test presecanja na listove kupusa izveden je pomoću 5-Blade Kramer Shear Cell, kao što je predstavljeno na slici 3.2. Analiza je podešena tako da je brzina testa 1,5 mm/s, rastojanje 53% i sila 250 kg. Rezultati čvrstoće lišća kupusa izraženi su kao sila (g) potrebna za presecanje listova kupusa. Eksperiment je ponovljen šest puta za svaki od uzoraka, u statističke svrhe.

Površinska boja uzoraka merena je prema autoru Cvetković (2014). Hromametar CR-400 (Minolta Co., Ltd., Japan), korišćen je u svrhu merenja ukupne promene boje (slika 3.3). Ukupna promena boje (ΔE) između svežeg kupusa (L_0^* , a_0^* i b_0^*) i fermentisanog kupusa (L^* , a^* i b^*) utvrđena je prema jednačini (2) gde (L^*) predstavlja svetloću, (a^*) udeo crvene boje i (b^*) žute boje:

$$\Delta E = \sqrt{[(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2]} \quad (2)$$



Slika 3.2. Instrumentalna analiza listova kupusa, a) uređaj za merenje teksturalnih karakteristika i b) merenje sile presecanja listova kupusa



Slika 3.3. Instrumentalna analiza površinske boje delova listova kupusa

Merenja boje su izvedena za sve uzorke kupusa, postavljajući mernu glavu hromometra na svaki pripremljeni uzorak. Kalibracija je rađena sa standardnom belom bojom, a merenja su ponovljena pet puta u statističke svrhe.

3.2.2.15. Sadržaj biogenih amina

Sadržaj biogenih amina određen je u svim uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom opisanom od strane Cvetković (2014). 2 g svakog uzorka pomešano je sa 125 μ l internog standarda i 10 ml 0,4 M perhlorne kiseline, koristeći Ultra-Turrax IKA T25 uređaj, 2-3 min pri 5000 o/min. Nakon mešanja, uzorci su centrifugirani na 3000 rpm, 10 min i ohlađeni na 4 °C. Supernatant je sakupljen i ekstrakcija je ponovljena. Oba ekstrakta su spojena i filtrirana kroz kvalitativni filter-papir, prebačena u odmernu tikvicu i dopunjena do 100 ml 0,4 M perhlornom kiselinom. Nakon toga, 1 ml rastvorenog ekstrakta pomešan je sa 300 μ l zasićenog NaHCO₃, 200 μ l 2N NaOH i 2 ml rastvora danzil-hlorida. Rastvor je promešan i ostavljen na 40 °C, 45 minuta, a zatim je dodato 100 μ l amonijaka. Uzorci su ostavljeni 30 minuta, dopunjeni acetonitrilom i filtrirani kroz PVDF filter (0,45 μ m) pre ubrizgavanja u hromatograf. HPLC analiza je izvršena na Agilent 1200 Series sa DAD, na koloni Agilent, Eclipse XDB-C18, 1,8 μ m, 4,6×50 mm. Mobilna faza je korišćena u gradijentu acetonitrila (A) i vode (B) predstavljenim u tabeli 3.4. Brzina protoka mobilne faze je 1,5 ml/min. Detekcija je izvršena na 190-400 nm.

Tabela 3.4. Gradijent mobilne faze tokom HPLC analize
(Cvetković, 2014)

t (min)	%B
0,00	50
7,60	10
10,00	10
12,00	50

3.2.2.16. Senzorska ocena

Senzorska ocena fermentisanih glavica kupusa rađena je u ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine. Fermentisani kupus u glavicama ocenjivan je od strane šestočlanog tima iskusnih ocenjivača prema metodama opisanim od strane Peñas i sar. (2010) i Wolkers-Rooijackers i sar. (2013) uz modifikacije u pogledu odabira reprezentativnih svojstava. Pre početka senzorske ocene glavica kupusa napravljen je izbor reprezentativnih svojstava fermentisanog kupusa od strane tima ocenjivača. Izgled, boja, miris, kiselost, slanoća, gorčina, izgled na preseku, elastičnost, ukus i ukupan utisak su izabrana svojstva u cilju evaluacije senzorskog kvaliteta fermentisanih glavica kupusa. Navedena reprezentativna svojstva fermentisanog kupusa ocenjena su primenom metode bodovanja sa rasponom ocena od 1 do 5. Ocena 1 predstavlja veoma lože svojstvo, dok ocena 5 predstavlja odlično svojstvo. Svako svojstvo ocenjeno je od strane svakog od šest ocenjivača iz tima, a rezultati ocena su izraženi preko srednjih vrednosti.

3.2.3. Mikrobiološke analize

U svežim i fermentisanim uzorcima kupusa u glavicama (ogled iz fermentacije kupusa 2015. godine) analiziran je ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca, plesni, *Enterobacteriaceae* i bakterija mlečne kiseline.

3.2.3.1. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija

Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija određen je prema metodi ISO 4833. Po 1ml pripremljenih razređenja (10^{-1} - 10^{-7}) plasirano je u Petri ploče. Ploče su zatim nalivane sa podlogom za ukupan broj bakterija (PCA) i inkubirane na 30 °C, 72 h.

3.2.3.2. Ukupan broj kvasaca i plesni

Određivanje ukupnog broja kvasaca i plesni izvedeno je prema metodi ISO 21527-1. Po 1 ml pripremljenih decimalnih razređenja (10^{-1} - 10^{-3}) plasirano je u Petri ploče. Ploče su zatim nalivane sa Dihloran rose-bengal hloramfenikol agarom (DRBC) i inkubirane na 25 °C, 5 dana.

3.2.3.3. Ukupan broj *Enterobacteriaceae*

Ukupn broja *Enterobacteriaceae* je određen prema metodi ISO 21528-2. Pripremljena razređenja (10^{-1} - 10^{-3}) plasirana su u Petri ploče (po 1 ml). Petri ploče su zatim nalivane ljubičasto-crvenim žučno-glukoznim agarom (VRBGA) i inkubirane na 37 °C, 24 h. Nakon inkubiranja izvedeno je potvrđivanje tipičnih i atipičnih kolonija izraslih na VRBGA na osnovu morfoloških i biohemijskih testova (oksidaza test, oksidativno-fermentativni test) i izračunavanje broja *Enterobacteriaceae* na osnovu potvrđenih kolonija.

3.2.3.4. Ukupan broj bakterija mlečne kiseline

Određivanje ukupnog broja bakterija mlečne kiseline izvedeno je prema metodi Gilliland i sar. (1984) i ISO 15214. Po 1 ml pripremljenih decimalnih razređenja (10^{-1} - 10^{-7}) plasirano je u Petri ploče i naliveno Man Rogosa Sharpe (MRS) agarom. Zasejane ploče su inkubirane na 30°C, 72 h.

Svi rezultati određivanja ukupnog broja - aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca, plesni, *Enterobacteriaceae* i bakterija mlečne kiseline izraženi su kao log cfu/g.

3.2.4. Statistička analiza

Za određivanje optimalnih uslova fermentacije u pogledu antioksidativne aktivnosti i sadržaja askorbinske kiseline u uzorcima kupusa primenjen je zbir ranga razlika (engl. Sum of Ranking Differences, SRD) i hijerarhijska klaster analiza (engl. Hierarchical Cluster Analysis, HCA). Eksperimenti su izvedeni u okviru Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (BBD) sa tri numerička faktora na tri nivoa, odnosno trinaest slučajnih ponavljanja. Nezavisne promenljive upotrebljene za eksperimentalni dizajn bile su temperatura (18 °C, 22 °C, 26 °C), starter kultura (0 g/kg, 0,025 g/kg, 0,050 g/kg) i sadržaj NaCl (6%, 7%, 8%). Eksperimentalni dizajn sa nezavisnim promenljivim i oznakama uzoraka predstavljene su u tabeli 3.1. SRD je primenjen u cilju određivanja razlika između različitih uslova fermentacije. Uzorak V1 koji je dobijen pri temperaturi 22 °C, 6% NaCl i bez dodatka starter kulture proglašen je “zlatnim” standardom. “Zlatni” standard je poznata referenca (Ráczi i sar., 2015) i u ovom slučaju predstavlja uslove

koje proizvođač PG Kurjakov iz Futoga (gde je izveden ogled fermentacije) obično koristi u toku proizvodnje fermentisanog kupusa u glavicama. U ulaznoj matrici uzorci dobijeni nakon različitih vremena fermentacije (5, 12, 27 i 62 dana) raspoređeni su u redove, dok su metode, odnosno različiti uslovi fermentacije raspoređeni u kolone. Računanje i poređenje sa “zlatnim” standardom izvedeno je prema metodi opisanoj od strane naučnika Héberger i Kollár-Hunek (2011). Provera SRD metode izvršena je poređenjem redova slučajnih brojeva (engl. Comparison of Ranks by Random Numbers, CRRN) što zahteva određivanje teorijske raspodele funkcije SRD vrednosti koja odgovara broju objekata (n) sačinjene od slučajnih brojeva (Héberger i Škrbić, 2012). Računanje SRD i CRRN izvršeno je u Microsoft Excel 2010, dok su dvostruki dendrogrami dobijeni u softveru NCSS 11 Trial.

Fizičko-hemijska svojstva fermentisanog kupusa kao što su suva materija, tekstura, ukupna promena boje, ukupna kiselost, sadržaj ukupanih šećera, sadržaj soli i sadržaj organskih kiselina analizirana su univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) da bi se utvrdile promenljive statistički značajne za razlikovanje uzoraka “Tukey’s honest significance” testom i $\alpha = 0,05$ kriterijumom (p -vrednost $< 0,05$ predstavlja značajnu razliku) korišćenjem programa Statistica 10.

Analiza glavnih komponenata (engl. Principal Component Analysis, PCA) izvršena je kako bi se naglasile razlike i grupisanja između uzoraka kupusa fermentisanog pod različitim uslovima (ogled iz fermentacije kupusa 2015. godine) i pronašla korelacija između fizičkih i hemijskih parametara. U ovoj metodi početne promenljive se transformišu korišćenjem dekompozicije sopstvenih vrednosti u skup linearno nekoreliranih promenljivih nazvanih glavne komponente (PC). Eksperimentalni parametri uključeni u PCA su ukupna suva materija, pH vrednost, antioksidativna aktivnost, organske kiseline, tekstura i promena boje, a_w , sadržaj ukupanih šećera, sadržaj soli i sadržaj biogenih amina, a izvedeni su korišćenjem Statistica 10.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. KARAKTERIZACIJA SVEŽEG KUPUSA HIBRIDA BRAVO

U cilju karakterizacije svežeg kupusa analizirane su fizičko-hemijske karakteristike i mikrobiološki profil uzoraka glavica kupusa hibrida bravo u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine. U uzorku svežeg kupusa analiziran je sadržaj ukupne suve materije, masti, sadržaj proteina, celuloze (sirovih vlakana), ukupna kiselost, sadržaj ukupnih šećera, soli, pH vrednost, aktivnost vode, antioksidativna aktivnost, sadržaj organskih kiselina (askorbinska, oksalna, mravlja, mlečna, sirćetna i ćilibarna), teksturalne karakteristike i sadržaj biogenih amina. Rezultati fizičko-hemijskih analiza sirovog kupusa predstavljeni su u tabeli 7.1. u Prilogu. Mikrobiološki profil svežeg kupusa hibrida bravo dobijen je određivanjem ukupnog broja - aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca, plesni, *Enterobacteriaceae* i bakterija mlečne kiseline, a dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 4.1.

4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike svežeg kupusa

Ukupna suva materija u svežem kupusu zavisi od načina uzgoja i uslova rasta, a predstavlja veoma važan indikator kvaliteta i starosti svežeg i fermentisanog kupusa. Ukupna suva materija u svežem uzorku bila je 9,00%, što je nešto niže u poređenju sa rezultatima Mirecki (2001), gde je sadržaj suve materije za svež kupus bio u opsegu 9,21% i 10,46%, a nešto viši od proseka za vrednosti kod tehnološki zrelog kupusa (8,00%) (Červenski i Medić-Pap, 2018).

Povrće sadrži između 0,10% i 0,70% masti (Šulc, 1969). Sadržaj masti u uzorku svežeg kupusa hibrida bravo od 0,26% u saglasnosti je sa podacima Šulc (1969) i Cvetković (2014), prema kojima je sadržaj masti za svež kupus iznosio 0,20%.

Sadržaj proteina u povrću iz porodice krstašica obično varira između 1,14% i 3,38% (Červenski i Gvozdrenović, 2007). Viši sadržaj proteina u svežem kupusu negativno utiče na kvalitet fermentacije (Cvetković, 2014). Hibrid kupusa bravo koji je ispitan u ovoj studiji poseduje manje proteina (0,75%) u poređenju sa podacima koje su objavili Ivanović (2004), Červenski (2010) i Cvetković (2014) (1,10-1,50%; 1,44% i 1,40%, redom).

Sadržaj sirovih vlakana zavisi od sorte, starosti i dela biljke. Celuloza ima važnu ulogu kao dijetetsko vlakno i kao prebiotik za mikroorganizme prisutne u gastrointestinalnom traktu, prema tome ima pozitivan efekat po zdravlje ljudi (Sinha, 2011). Eksperimentalno dobijena vrednost sadržaja celuloze (sirovih vlakana) bila je 1,67%, što je više u odnosu na rezultat dobijen kod Cvetković (2014) za hibrid bravo i kupus sorte futoški, 1,06% i 0,58%, redom.

Titracioni aciditet (preračunat na mlečnu kiselinu) u uzorku svežeg kupusa u iznosu od 0,13% bio je u granici sa vrednostima koje je predstavio Vračar (2001), gde je titracioni aciditet u svežem kupusu varirao između 0,1% i 0,4%. Dobijeni rezultat takođe je u saglasnosti i sa istraživanjem Drašković i sar. (2017), gde je ukupna kiselost svežeg kupusa hibrida bravo iznosila 0,15%.

Optimalan sadržaj ukupnih šećera u svežem kupusu je između 3,5% i 6,5% i ne bi trebalo da bude niži od 3% (Niketić-Aleksić, 1988; Červenski, 2010). Prema tome, 3,9% ukupnih šećera

u uzorku kupusa hibrida bravo, koji je korišćen za ovo istraživanje, može se smatrati kao poželjan preduslov za dalju preradu procesom fermentacije.

Povrće spada u grupu namirnica koje imaju nizak sadržaj soli. Titracionom metodom prema Mohr-u pronađeno je 0,05% soli u svežim uzorcima kupusa hibrida bravo, u ovom istraživanju. U cilju poboljšanja unosa povrća i smanjenja ukusa gorčine moguće je dodati 0,2% soli svežem povrću (Bouhlal i sar., 2014; Bakke i sar., 2018) i na taj način povećati unos ovih zdravstveno veoma važnih namirnica, naročito kod dece.

pH vrednost povrća uglavnom je umereno kisela do neutralna (Adams i Moss, 2008). pH vrednost svežeg kupus hibrida bravo iznosila je 5,87, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima za svež kupus pH 5,40-6,00 (Jay i sar., 2005) i pH 5,20-6,30 (Adams i Moss, 2008).

Aktivnost vode utiče na kvalitet prehrambenih namirnica i postojanost proizvoda tako što može da predstavlja ograničavajući faktor za rast nepoželjnih mikroorganizama (Barbosa-Cánovas i sar., 2007). a_w vrednost svežeg kupusa hibrida bravo u ovom ogledu bila je nešto niža, a_w 0,963, u odnosu na a_w vrednosti za sveže uzorke hibrida tenisiti a_w 0,970 i bravo a_w 0,975 i sorte kupusa futoški a_w 0,975, prema istraživanju Drašković i sar. (2018).

Povrće, naročito iz grupe krstašica, poznato je kao dobar izvor antioksidativnih komponenti. Konzumiranje kupusa ima povoljan efekat na zdravlje ljudi zahvaljujući visokom sadržaju antioksidativnih materija kao što su vitamini, polifenoli, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja (Kusznierewicz i sar., 2008b; Sun i sar., 2009). Antioksidativna aktivnost svežeg kupusa hibrida bravo, izražena kao IC_{50} vrednost bila je 53,64 mg/ml. Viša IC_{50} vrednost odgovara manjoj antioksidativnoj aktivnosti. U toku prerade voća i povrća može doći do povećanja antioksidativne aktivnosti usled veće antioksidativne moći polifenolnih jedinjenja u intermedijernim fazama oksidacije ili formiranja novih jedinjenja sa većom antioksidativnom aktivnošću (Jongen, 2002; Kusznierewicz i sar., 2008a; Acosta-Estrada i sar., 2014; Šumić, 2014).

Organske kiseline kratkog lanca značajno utiču na postupak fermentacije jer poseduju antimikrobnu aktivnost. Oksalna kiselina prirodno je prisutna u svežem kupusu (Sinha, 2011) i ona povećava antioksidativni kapacitet i inhibira degradaciju svežeg materijala u toku

skladištenja (Wang i sar., 2016). Sadržaj oksalne kiseline u uzorku svežeg kupusa bio je 11,39 g/100 g sm, dok je sadržaj mravlje, mlečne, sirćetne i ćilibarne kiseline iznosio 0,38 g/100 g sm, 0,72 g/100 g sm, 0,50 g/100 g sm i 0,95 g/100 g sm, redom kako je predstavljeno u tabeli 7.1. u prilogu. Sadržaj askorbinske kiseline u iznosu od 5,94 mg/100 g sm u svežem kupusu u ovom radu razlikovao se u odnosu na rezultate Cvetković (2014), gde je izmereno 8,82 mg/kg odnosno 8,98 mg/100 g sm za hibrid bravo.

List kupusa ima izraženu nervaturu, koja može biti fina ili gruba. Ukoliko je nežnija, kvalitet kupusa za fermentaciju je bolji (Maksimović, 2005; Červenski i Medić-Pap, 2018). Teksturalne karakteristike listova svežeg kupusa hibrida bravo izražene su kao prodorna sila, odnosno sila (g) koja je potrebna da igla instrumenta proдре kroz delove listova kupusa. U ovom istraživanju prodorna sila svežeg lista kupusa iznosila je 318,10 g. Izmerena vrednost je u saglasnosti sa rezultatom prethodnih istraživanja Drašković i sar. (2017), gde je prodorna sila kod svežeg kupusa hibrida bravo iznosila 315,00 g.

Biogeni amini mogu se očekivati gotovo u svim namirnicama koje sadrže proteine ili slobodne aminokiseline, a izložene su uslovima pogodnim za mikrobiološku ili biohemijsku aktivnost. Ukupna količina različitih amina koji nastaju u ovim uslovima u velikoj meri zavisi od hemijskog sastava namirnice i prisutnih mikroorganizama. Biogeni amini se nalaze u širokom spektru prehrambenih proizvoda, uključujući riblje proizvode, mesne prerađevine, mlečne proizvode, vino, pivo, proizvode od voća i povrća, orašaste plodove i čokoladu. U svežim nefermentisanim namirnicama prisustvo biogenih amina može biti pokazatelj neželjene mikrobne aktivnosti, odnosno može se koristiti kao indikator kvarenja namirnica (Santos, 1996). U glavicama svežeg kupusa hibrida bravo iz ovog ogleда biogeni amini nisu detektovani (tabela 7.1, u Prilogu). Isti rezultati dobijeni su u istraživanju Cvetković (2014), gde nisu detektovani biogeni amini ni kod glavica svežeg kupusa sorte futoški, kao ni kod kupusa hibrida bravo.

4.1.2. Mikrobiološki profil svežeg kupusa

Sastav prirodno prisutne mikropopulacije na svežem biljnom materijalu zavisi od vrste sirovine i njenog hemijskog sastava. Samim tim, dalji način prerade, kao i proizvodnja fermentisanog povrća, zavisna je od smene prirodno prisutnih mikroorganizama na polaznom svežem materijalu (Hutkins, 2006; Sapers i sar., 2006).

Rezultati mikrobiološke analize svežeg kupusa hibrida bravo predstavljani su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Mikrobiološki profil svežeg kupusa hibrida bravo

Mikrobiološka analiza	Broj [log cfu/g]
Aerobne mezofilne bakterije	4,20
Kvasci	3,81
Plesni	nd*
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,25
Bakterije mlečne kiseline	1,85

*nije detektovano

Rezultati predstavljeni u tabeli 4.1. su u skladu sa podacima za reprezentativnu mikropopulaciju povrća izloženu od strane Hutkins (2006), gde su se vrednosti ukupnog broja aerobnih bakterija, kvasca i plesni, enterobakterija i bakterija mlečne kiseline kretale u rasponu od 4,00-6,00, 0,30-4,60, 3,00-3,50 i 0,70-4,00 (log cfu/g), redom.

4.2. FIZIČKO-HEMIJSKE I MIKROBIOLOŠKE PROMENE U TOKU FERMENTACIJE KUPUSA U GLAVICAMA

Trinaest fermentisanih uzoraka (V1-V13) prikupljano je nakon 5, 12, 27 i 62 dana fermentacije u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine. Različite kombinacije za tri različite promenljive (količina NaCl, starter kultura i temperatura) primenjivane su kako je prikazano u tabeli 3.1. Tri fermentisana uzorka kupusa (K1-K3) i rasola (R1-R3) prikupljeno je nakon 40

dana procesa spontane fermentacije uz dodatak 6% NaCl u ogledu iz 2016. godine. Uslovi fermentacije prikazani su u tabeli 4.3. Devet fermentisanih uzoraka kupusa u glavicama (T1-T3, B4-B6 i F7-F9) u ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine prikupljeno je nakon 3, 6, 12, 24 i 44 (55) dana. Oznake uzoraka i uslovi fermentacije mogu se videti iz tabela 4.4 i 4.5.

Kao najpogodniji indikatori kvaliteta procesa fermentacije praćeni su: ukupna suva materija, ukupna kiselost, sadržaj ukupnih šećera, sadržaj soli, pH vrednost, a_w , antioksidativna aktivnost, sadržaj askorbinske kiseline i drugih organskih kiselina (oksalna, mravlja, mlečna, sirćetna i ćilibarna), sadržaj ukupnih fenola, tekstura i promena boje, sadržaj biogenih amina, ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca i plesni, *Enterobacteriaceae*, bakterija mlečne kiseline i senzorske karakteristike.

4.2.1. Promena suve materije u toku fermentacije kupusa

Ukupna suva materija predstavlja sadržaj svih jedinjenja koja ulaze u sastav povrća, izuzev vode. Sadržaj suve materije, specifičan kako za svaku vrstu povrća, tako i za svaku sortu unutar iste vrste, zavisi od klimatskih uslova, agrotehničkih mera i stepena zrelosti. Od stepena zrelosti zavisi sastav, a samim tim i odnos pojedinih sastojaka. Kao najvažnije komponente koje ulaze u sastav ukupne suve materije kod povrća smatraju se šećeri, kiseline, bojene materije, pektinske i mineralne materije (Niketić-Aleksić, 1988; Sinha, 2011). Hemijskom analizom glavica kupusa pokazano je da spoljašnji listovi kupusa sadrže dva puta više suve materije u poređenju sa unutrašnjim listovima (Červenski i Medić-Pap, 2018). Bakterijsko oboljenje, uzrokovano patogenom bakterijom *Xantomonas campestris* pv. *campestris*, o kome je bilo više reči u poglavlju 2.1.2., dovodi do smanjenja sadržaja suve materije i smanjenja koncentracije monosaharida u listovima kupusa (Hui i Evranuz, 2016). Prema istraživanju Mirecki (2001), sadržaj suve materije zavisi i od vremenskog perioda gajenja kupusa, te je tako kupus posađen sredinom avgusta imao višu prosečnu vrednost suve materije od kupusa posađenog sredinom jula. Sadržaj suve materije varira i u odnosu na sortu kupusa. Sorte koje poseduju viši sadržaj suve materije smatraju se i kvalitetnijim, jer to podrazumeva veći sadržaj pojedinih sastojaka, pa sirovina ima veću hranljivu vrednost i bolja senzorna svojstva (Niketić-Aleksić, 1988). Sadržaj

suve materije uglavnom je proporcionalan sadržaju šećera, pa se za fermentaciju biraju srednje kasne sorte sa većim sadržajem suve materije (Červenski i Medić-Pap, 2018; Satora i sar., 2021).

Tokom procesa fermentacije kupusa u ovom ogledu (fermentacija kupusa 2015. godine) zabeležen je pad ukupnog sadržaja suve materije. Rezultati su predstavljeni u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Uticaj vremena fermentacije na ukupnu suhu materiju fermentisanog kupusa dobijenog pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak (uslovi)/ dani	Ukupna suva materija [%]			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	8,73 ± 0,06 ^{b,A}	7,46 ± 0,06 ^{ef,C}	7,69 ± 0,02 ^{cd,B}	7,01 ± 0,04 ^{cd,D}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	8,25 ± 0,06 ^{c,A}	8,46 ± 0,10 ^{bc,A}	7,71 ± 0,07 ^{cd,B}	7,52 ± 0,13 ^{ab,C}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	7,80 ± 0,07 ^{d,B}	8,63 ± 0,04 ^{abc,A}	6,85 ± 0,14 ^{g,C}	7,53 ± 0,03 ^{ab,B}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	8,18 ± 0,02 ^{d,C}	8,99 ± 0,00 ^{a,A}	8,29 ± 0,01 ^{a,B}	7,24 ± 0,04 ^{bc,D}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	8,25 ± 0,10 ^{c,A}	8,30 ± 0,23 ^{bc,A}	7,82 ± 0,18 ^{bc,B}	6,83 ± 0,25 ^{d,C}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	8,24 ± 0,22 ^{c,B}	8,64 ± 0,13 ^{ab,A}	8,15 ± 0,01 ^{ab,B}	7,77 ± 0,10 ^{a,C}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	9,47 ± 0,30 ^{a,A}	8,39 ± 0,19 ^{bcd,B}	8,25 ± 0,03 ^{a,B}	7,33 ± 0,16 ^{bc,C}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	8,06 ± 0,05 ^{cd,A}	8,29 ± 0,00 ^{bcd,A}	7,43 ± 0,23 ^{de,B}	6,83 ± 0,07 ^{d,C}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	7,79 ± 0,02 ^{d,B}	8,37 ± 0,06 ^{bcd,A}	7,68 ± 0,20 ^{cde,B}	7,34 ± 0,01 ^{bc,C}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	8,12 ± 0,06 ^{cd,A}	7,87 ± 0,12 ^{de,AB}	7,78 ± 0,10 ^{bcd,B}	5,50 ± 0,04 ^{f,C}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	8,95 ± 0,04 ^{b,A}	7,02 ± 0,20 ^{f,B}	6,99 ± 0,20 ^{fg,B}	6,10 ± 0,20 ^{e,C}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	8,16 ± 0,07 ^{d,A}	8,12 ± 0,50 ^{cd,A}	7,30 ± 0,13 ^{ef,B}	6,37 ± 0,10 ^{e,C}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	8,86 ± 0,05 ^{b,A}	8,55 ± 0,16 ^{abc,B}	8,29 ± 0,07 ^{a,B}	7,52 ± 0,12 ^{ab,B}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c, d, e, f i g – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

Rezultati nakon 5, 12, 27 i 62 dana fermentacije bili su u granicama 9,47-7,79%, 8,99-7,02%, 8,29-6,85% i 7,77-5,50%, redom. Dobijeni rezultati su očekivani i u saglasnosti sa rezultatima Holzapfel i sar. (2008), gde je suva materija kupusa prvog dana fermentacije bila 9,10%, dok je nakon 23 dana njen sadržaj opao na 8,30%, za kupus fermentisan pri temperaturi od 19 °C.

Kao što rezultati iz tabele 4.2. pokazuju, uzorak V7 značajno se statistički razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka petog dana fermentacije. Isti uzorak imao je i najveći sadržaj ukupne suve materije petog dana u odnosu na ostale uzorke kupusa istog dana fermentacije. 62-og dana fermentacije uzorak V10 statistički se značajno razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka istog dana fermentacije. Uzorak V10 imao je i najniži sadržaj suve materije poslednjeg dana fermentacije. Ukoliko se posmatra statistička razlika po danima fermentacije, može se primetiti da su se uzorci V1 i V4 statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$) u toku celokupnog perioda trajanja fermentacije u odnosu na druge uzorke fermentisanog kupusa u pogledu sadržaja ukupne suve materije.

U ogledu izvedenom iz fermentacije kupusa 2016. godine analiziran je sadržaj ukupne i rastvorljive suve materije svežeg uzorka kupusa hibrida bravo u glavicama, kao i fermentisanih uzoraka kupusa i rasola nakon 40 dana fermentacije pri različitim temperaturnim intervalima, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.3. U ovom ogledu uzorcima kupusa u glavicama dodato je 6% natrijum-hlorida.

Tabela 4.3. Sadržaj ukupne i rastvorljive suve materije u svežem i fermentisanom kupusu (K) i rasolu (R) nakon 40 dana fermentacije pri različitim temperaturnim uslovima, ogled iz 2016. godine

Uzorak (uslovi)	Suva materija [%]	
	ukupna	rastvorljiva
K0 (svež)	9,45 ± 1,40 ^a	5,97 ± 0,06 ^b
K1 (16-18 °C)	7,88 ± 0,54 ^{ab}	6,00 ± 0,00 ^b
K2 (18-20 °C)	7,69 ± 0,24 ^b	6,00 ± 0,50 ^b
K3 (20-22 °C)	7,97 ± 0,21 ^{ab}	7,00 ± 0,00 ^a
R1 (16-18 °C)	4,64 ± 0,09 ^c	4,63 ± 0,55 ^c
R2 (18-20 °C)	5,26 ± 0,18 ^c	5,00 ± 0,00 ^c
R3 (20-22 °C)	5,95 ± 0,06 ^c	4,90 ± 0,10 ^c

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Sadržaj ukupne suve materije u svežem kupusu hibrida bravo u ovom istraživanju (tabela 4.3) odgovara u potpunosti rezultatima istraživanja Mirecki (2001) za svež kupus 9,21-10,46%. U svim uzorcima kupusa u glavicama dobijenim nakon 40 dana fermentacije sadržaj ukupne suve materije kretao se u granicama 7,69-7,97%. Rezultati fermentisanih uzoraka ukazuju na to da različite temperature fermentacije nisu uticale značajno na iznos ukupne suve materije u toku procesa fermentacije (tabela 4.3). Ukupna suva materija u uzorcima rasola bila je u intrvalu 4,64-5,95%. U ovom slučaju, zapaženo je da suva materija u uzorcima rasola raste sa porastom temperaturnog intervala fermentacije.

Uzorci rasola značajno su se statistički razlikovali ($p < 0,05$) od uzoraka kupusa u pogledu sadržaja ukupne suve materije (tabela 4.3) u ovom istraživanju.

Rastvorljiva suva materija sastoji se od u vodi rastvorljivih jedinjenja kojima pripadaju šećeri i kiseline, a da bi proces fermentacije bio uspešan neophodno je više od 3% ovih jedinjenja u svežem kupusu (Dobričević i Plietić, 2004). Sadržaj rastvorljive suve materije uzorka sveže glavice kupusa hibrida bravo bio je odgovarajući za potencijalno uspešan proces fermentacije (tabela 4.3). Primećeno je da fermentisani uzorci kupusa poseduju više rastvorljive suve materije od uzoraka rasola. Sadržaj rastvorljive suve materije u uzorcima kupusa je očekivano viši s obzirom da glavice svežeg kupusa sadrže šećer, za razliku od slanog rastvora koji je korišćen za proces fermentacije.

Uzorak K3 značajno se statistički razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka kupusa i rasola. Takođe, primećeno je da su se uzorci rasola značajno statistički razlikovali ($p < 0,05$) od uzoraka kupusa u pogledu sadržaja rastvorljive suve materije, kao što se može videti iz tabele 4.3.

U ogledu izvedenom iz fermentacije kupusa 2017. godine analiziran je sadržaj ukupne suve materije svežih i fermentisanih glavica kupusa hibrida bravo i tenisiti i sorte futoški, a praćena je i promena ukupne suve materije u uzorcima fermentisanih glavica kupusa u toku procesa fermentacije, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.4.

Ukupna suva materija uzoraka svežeg kupusa tenisiti, bravo i futoški iznosila je redom 7,69%, 8,53% i 8,31% što je niže u poređenju sa uzorcima svežeg kupusa iz prethodnih ogleda,

fermentacije kupusa 2015. (9,00%) i 2016. (9,45%) godine. Međutim, sadržaj ukupne suve materije svežih uzoraka bio je u granicama za tehnološki zreo kupus, kod koga se sadržaj ukupne suve materije kreće u proseku oko 8% (Červenski i Medić-Pap, 2018). Hibrid kupusa bravo, koji je upotrebljen kao sirovina u prethodna dva ogleda, imao je višu ukupnu suhu materiju u poređenju sa kupusom tenisiti i futoški, u ovom istraživanju. Razlike u sadržaju suve materije svežeg kupusa hibrida bravo u različitim sezonama posledica su različitih godina uzgoja sirovine, odnosno uslova uzgoja, sastava zemljišta i vremenskih prilika.

Tabela 4.4. Promena ukupne suve materije kod različitih sorti/hibrida kupusa u glavicama u toku procesa fermentacije pri različitim uslovima fermentacije, ogled iz 2017. godine

Uzorak (uslovi) dani	Ukupna suva materija [%]				
	3	6	12	24	44 (55*)
T1* (3,3% NaCl)	11,47 ± 1,34 ^{a,A}	7,52 ± 0,95 ^{c,B}	7,17 ± 0,44 ^{c,B}	8,16 ± 0,69 ^{bc,B}	7,32 ± 0,31 ^{bc,B}
T2 (rasol)	8,02 ± 0,07 ^{c,A}	7,34 ± 0,14 ^{c,BC}	7,53 ± 0,29 ^{c,AB}	6,11 ± 0,19 ^{ec,D}	6,78 ± 0,43 ^{c,D}
T3 (3,3%NaCl + starter)	8,17 ± 0,42 ^{c,B}	10,42 ± 0,26 ^{a,A}	7,70 ± 0,98 ^{c,B}	8,05 ± 0,01 ^{bc,B}	8,49 ± 0,20 ^{a,B}
B4* (3,3% NaCl)	9,06 ± 0,35 ^{bc,A}	9,04 ± 0,33 ^{b,A}	9,32 ± 0,20 ^{a,A}	8,68 ± 0,49 ^{ab,A}	8,53 ± 0,41 ^{a,A}
B5 (rasol)	8,67 ± 0,06 ^{c,A}	7,33 ± 0,19 ^{c,B}	7,24 ± 0,31 ^{c,B}	6,09 ± 0,30 ^{e,C}	6,77 ± 0,25 ^{c,B}
B6 (3,3% NaCl + starter)	9,13 ± 0,37 ^{bc,A}	8,22 ± 0,01 ^{bc,B}	9,05 ± 0,24 ^{ab,A}	7,33 ± 0,22 ^{cd,C}	6,66 ± 0,09 ^{c,D}
F7* (3,3% NaCl)	8,92 ± 0,04 ^{c,B}	10,73 ± 0,24 ^{a,A}	9,07 ± 0,70 ^{ab,B}	7,19 ± 0,41 ^{cd,C}	8,08 ± 0,12 ^{ab,BC}
F8 (rasol)	8,63 ± 0,38 ^{c,A}	8,14 ± 0,31 ^{bc,AB}	7,92 ± 0,13 ^{bc,B}	6,41 ± 0,27 ^{de,C}	7,09 ± 0,08 ^{c,C}
F9 (3,3% NaCl + starter)	10,45 ± 0,27 ^{ab,A}	8,69 ± 0,30 ^{b,BC}	8,22 ± 0,29 ^{abc,C}	9,17 ± 0,02 ^{a,B}	8,17 ± 0,57 ^{ab,C}

rasol – prethodne fermentacije izvršene uz dodatak 3,3% NaCl sa finalnim sadržajem NaCl 2,57%

starter – 0,050 g/kg svežeg kupusa

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c, d i e – razlike između uzoraka (T1-F9)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (3, 6, 12, 24 i poslednji dan fermentacije) u okviru istog uzorka

Pored uslova fermentacije navedenih u tabeli 4.4., temperatura je merena u toku procesa fermentacije u svakom buretu na dan uzimanja uzorka, a vrednosti su predstavljene u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Temperatura u toku fermentacije glavica kupusa, ogled iz 2017. godine

Hibrid, sorta	Dani/ uzorak	3	6	12	24	35	44	55
		t [C°]						
tenisiti	T1	17	17	13	14	14	10	10
tenisiti	T2	17	17	13	14	14	10	10
tenisiti	T3	17	17	13	14	14	10	10
bravo	B4	17	17	13	14	14	10	10
bravo	B5	17	17	13	14	14	10	10
bravo	B6	17	17	13	14	14	10	10
futoški	F7	17	17	13	14	14	10	10
futoški	F8	17	17	13	14	14	10	10
futoški	F9	17	17	13	14	14	10	10

Ukoliko se uporede ukupne suve materije svežih uzoraka kupusa tenisiti, bravo i futoški sa ukupnim suvim materijama poslednjeg dana fermentacije, vidi se da nije došlo do značajnog smanjenja sadržaja ukupne suve materije kod pojedinih uzoraka kupusa. Razlog ovome mogu biti niže temperature na kojima se odvijao proces fermentacije (tabela 4.5). Veće vrednosti suve materije na početku fermentacije u poređenju sa svežom sirovinom mogu biti posledica vršenja ogleda u industrijskim uslovima i činjenice da je dodatak soli uticao na ukupnu suhu materiju tako što se uzorkovanjem sigurno „zahvatio“ i slani rastvor koji je i difundovao u tkivo kupusa dok su šećeri još uvek bili prisutni. Međutim, poređenjem ukupnog sadržaja suve materije u uzorcima 3. dana fermentacije (11,47-8,02%) i poslednjeg ispitivanog dana (8,53-6,66%), može se zaključiti da je došlo do opadanja sadržaja suve materije u toku fermentacije kupusa. Isti zaključak izveden je i iz ogleda za fermentacije kupusa 2015. i 2016. godine.

Uzorci T3 i F7 značajno su se statistički razlikovali ($p < 0,05$) od ostalih fermentisanih uzoraka šestog dana fermentacije. Ukoliko se posmatra promena suve materije po danima fermentacije, primećeno je da se kod uzorka B4 sadržaj ukupne suve materije nije statistički razlikovao u toku celokupnog procesa fermentacije (tabela 4.4).

4.2.2. Ukupna kiselost u uzorcima fermentisanog kupusa

Ukupna kiselost je vredan parametar kvaliteta koji pokazuje efikasnost procesa fermentacije i štiti proizvod, kontrolišući rast mikroorganizama koji izazivaju kvarenje namirnica (Niketić-Aleksić, 1988; Hui i Evranuz, 2016). Ukupna, odnosno titraciona kiselost, izražena na mlečnu kiselinu, u kupusu kao svežoj sirovini ima prilično niske vrednosti i obično je niža od 0,6% (Hutkins, 2006).

Ukupna kiselost (izražena na mlečnu kiselinu) određena je za sve uzorke kupusa poslednjeg dana fermentacije (62. dan) u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine, a rezultati su prikazani u tabeli 4.6. Rezultati su pokazali da se ukupna kiselost povećavala tokom procesa fermentacije kupusa, kao posledica potrošnje šećera od strane bakterija mlečne kiseline i sinteze organskih kiselina. Fermentacija ribanog kupusa smatra se završenom kada je formirano najmanje 1% mlečne kiseline (Medina i sar., 2016). Ukupna kiselost polaznog uzorka svežeg kupusa iznosila je 0,13% (tabela 7.1, u Prilogu). U toku procesa fermentacije došlo je do porasta ukupne kiselosti u rasponu od 0,54% do 0,89% u uzorcima fermentisanog kupusa u glavicama kako je predstavljeno u tabeli 4.6.

Generalno gledajući, uzorci koji su fermentisani pri nižim koncentracijama soli imali su i nižu ukupnu kiselost. Uzorak V2 posedovao je najvišu ukupnu kiselost i statistički se značajno razlikovao od ostalih uzoraka ($p < 0,05$), dok su uzorci V1, V8, V10 i V11 imali najnižu ukupnu kiselost i statistički su se značajno razlikovali od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa poslednjeg ispitivanog dana ($p < 0,05$), tabela 4.6.

Rezultati ukupne kiselosti uzoraka kupusa u glavicama hibrida bravo i rasola dobijenih u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine predstavljeni su u tabeli 4.7.

Ukupna kiselost uzorka svežeg kupusa u ovom ogledu iznosila je 0,15% što se slaže sa rezultatima prethodnog ogleada (fermentacija kupusa 2015. godine, gde je ukupna kiselost u uzorku svežeg kupusa iznosila 0,13%) kao i sa literaturnim podacima za ukupnu kiselost svežeg kupusa (0,1-0,4%, Vračar, 2001). U toku fermentacije došlo je do rasta ukupne kiselosti u uzorcima kupusa do opsega 0,69-0,79, dok je ukupna kiselost u uzorcima rasola imala niže

vrednosti 0,23-0,67. Rezultati ukupne kiselosti uzoraka fermentisanog kupusa, predstavljeni u tabeli 4.7, u saglasnosti su sa rezultatima fermentacije kupusa 2015. godine (tabela 4.6), neovisno o primenjenom temperaturnom intervalu na kome se odvijao proces fermentacije.

Tabela 4.6. Ukupna kiselost uzoraka fermentisanog kupusa nakon 62 dana pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak	NaCl [%]	Starter kultura [g/kg svežeg kupusa]	t [°C]	Ukupna kiselost [%mlečne kiseline]
V1	6	0	22	0,60 ± 0,04 ^f
V2	7	0	18	0,89 ± 0,00 ^a
V3	8	0	22	0,75 ± 0,00 ^{cd}
V4	7	0	26	0,69 ± 0,00 ^d
V5	6	0,025	18	0,69 ± 0,00 ^e
V6	8	0,025	18	0,70 ± 0,00 ^{de}
V7	7	0,025	22	0,74 ± 0,04 ^{cde}
V8	6	0,025	26	0,54 ± 0,00 ^g
V9	8	0,025	26	0,69 ± 0,00 ^d
V10	7	0,050	18	0,62 ± 0,00 ^f
V11	6	0,050	22	0,59 ± 0,04 ^{fg}
V12	8	0,050	22	0,81 ± 0,00 ^b
V13	7	0,050	26	0,76 ± 0,00 ^{bc}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Uzorak svežeg kupusa, K0, posedovao je najnižu ukupnu kiselost i značajno se statistički razlikovao od ostalih uzoraka kupusa i rasola ($p < 0,05$), što se moglo i očekivati s obzirom da sveži kupus poseduje fermentabilne šećere koji, uz pomoć bakterija mlečne kiseline, tek treba da se prevedu u mlečnu i ostale organske kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata iz tabele 4.7. pokazalo se da uzorci rasola, R2 i R3, fermentisani na višim temperaturama imaju nižu ukupnu kiselost i značajno se statistički razlikuju od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Uzorak kupusa K1 i rasola R1 poseduju značajno višu ukupnu kiselost, u odnosu na prethodno komentarisane uzorke

kupusa i rasola. Uzorci K1 i R1 fermentisani su na najnižem temperaturnom intervalu i značajno se statistički razlikuju od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Uzorci kupusa u glavicama K2 i K3 statistički se značajno razlikuju od ostalih uzoraka. Uzorci K2 i K3 poseduju ujedno i najveću ukupnu kiselost, što je bilo i očekivano u ovom istraživanju, jer su fermentisani pri višim temperaturnim intervalima u odnosu na uzorak kupusa K1 (tabela 4.7).

Tabela 4.7. Ukupna kiselost uzoraka svežeg i fermentisanog kupusa (K) i rasola (R) nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl i različitim temperaturnim intervalima, ogled iz 2016. godine

Uzorak (uslovi)	Ukupna kiselost [%mlečne kiseline]
K0 (svež)	0,15 ± 0,02 ^e
K1 (16-18 °C)	0,69 ± 0,04 ^b
K2 (18-20 °C)	0,79 ± 0,00 ^a
K3 (20-22 °C)	0,75 ± 0,04 ^a
R1 (16-18 °C)	0,67 ± 0,00 ^b
R2 (18-20 °C)	0,23 ± 0,00 ^d
R3 (20-22 °C)	0,39 ± 0,00 ^c

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Ukupna kiselost uzoraka svežih glavica kupusa tenisiti, bravo i futoški iznosila je 0,10, 0,16 i 0,20, redom (fermentacija kupusa 2017. godine). U toku procesa fermentacije došlo je do rasta ukupne kiselosti uzoraka fermentisanog kupusa, a rezultati poslednjeg dana fermentacije predstavljeni su u tabeli 4.8. Temperature pri kojima se odvijala fermentacije prikazane su u tabeli 4.5.

Kao što se iz prikazanih rezultata može videti, ukupna kiselost uzoraka fermentisanog kupusa u ovom ogledu kretala se u granicama 0,36-1,07%. Uzorak fermentisanog kupusa sorte futoški F7 imao je najnižu ukupnu kiselost 0,36% i statistički se značajno razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa. Može se primetiti da dužina fermentacije u trajanju od 55 dana, uz nisku koncentraciju soli i niže temperature (tabela 4.5) u poređenju sa

fermentacijama kupusa 2015. i 2016. godine, kao i nedostatak starter kulture, nije bila dovoljna da se dostigne odgovarajuća kiselost u glavicama kupusa sorte futoški, odnosno fermentacija nije bila kompletna. Najvišu ukupnu kiselost 0,91-1,07% imali su uzorci kupusa fermentisanog u rasolu iz prethodne fermentacije izvedene takođe u industrijskim uslovima, neovisno o sorti i hibridu kupusa, i značajno su se statistički razlikovali od ostalih fermentisanih uzoraka ($p < 0,05$).

Tabela 4.8. Ukupna kiselost različitih sorti/hibrida fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije, ogled iz 2017. godine

Uzorak (uslovi)	Ukupna kiselost [%mlečne kiseline]
T1* (voda+3,3%NaCl)	0,64 ± 0,08 ^c
T2 (rasol)	1,07 ± 0,04 ^a
T3 (voda+3,3%NaCl+starter)	0,58 ± 0,04 ^c
B4* (voda+3,3%NaCl)	0,60 ± 0,04 ^c
B5 (rasol)	0,97 ± 0,00 ^{ab}
B6 (voda+3,3%NaCl+starter)	0,67 ± 0,04 ^c
F7* (voda+3,3%NaCl)	0,36 ± 0,04 ^d
F8 (rasol)	0,91 ± 0,04 ^b
F9 (voda+3,3%NaCl+starter)	0,61 ± 0,00 ^c

* – 55. dan fermentacije, za ostale uzorke 44. dan fermentacije
rasol – prethodne fermentacije sa finalnim sadržajem NaCl 2,57%
starter – 0,050 g/kg svežeg kupusa
 Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

4.2.3. Sadržaj ukupnih šećera u uzorcima fermentisanog kupusa

Najvažniji preduslov za rast bakterija mlečne kiseline je dostupnost fermentabilnih šećera. Sorte i hibridi kupusa namenjeni za proces fermentacije poseduju dovoljnu količinu šećera za uspešnu fermentaciju. Takođe, sadržaj šećera koji zaostane nakon fermentacije daje proizvodu prijatan ukus, pa se smatra poželjnom karakteristikom fermentisanog kupusa (Holzapfel, 2008). Većina šećera koja je prirodno prisutna u svežem kupusu, posredstvom

aktivnosti bakterija mlečne kiseline prevodi se u mlečnu kiselinu (Medina i sar., 2016), o čemu je ranije bilo više reči.

Sadržaj ukupnih šećera fermentisanog kupusa u glavicama hibrida bravo u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine, nakon 62 dana fermentacije pri različitim uslovima, predstavljen je u tabeli 4.9. Sadržaj ukupnih šećera u svežem kupusu iznosio je 3,90%. Fermentacijom se sadržaj šećera smanjio do opsega 0,00-0,49% (tabela 4.9), pa je proces fermentacije smatran završenim. Iz prikazanih rezultata može se primetiti da uzorci kupusa V2, V3, V6 i V11 sadrže zaostale šećere i značajno se razlikuju od ostalih fermentisanih uzoraka. Dodatno, uzorci V3, V6 i V11 kod kojih je sadržaj ukupnih šećera najviši značajno se statistički razlikuju od svih ostalih uzoraka ($p < 0,05$) fermentisanog kupusa bravo u glavicama.

Tabela 4.9. Rezultati sadržaja ukupnih šećera uzoraka fermentisanog kupusa nakon 62 dana pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak	NaCl [%]	Starter kultura [g/kg svežeg kupusa]	t [°C]	Sadržaj ukupnih šećera [%]
V1	6	0	22	nd
V2	7	0	18	0,34 ± 0,02 ^b
V3	8	0	22	0,43 ± 0,01 ^a
V4	7	0	26	nd
V5	6	0,025	18	nd
V6	8	0,025	18	0,47 ± 0,09 ^a
V7	7	0,025	22	nd
V8	6	0,025	26	nd
V9	8	0,025	26	nd
V10	7	0,050	18	nd
V11	6	0,050	22	0,49 ± 0,00 ^a
V12	8	0,050	22	nd
V13	7	0,050	26	nd

nd – nije detektovano

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

U uzorcima kupusa u glavicama hibrida bravo fermentisanih pri temperaturi od 26 °C nije zabeleženo prisustvo šećera, kao što se iz prikazanih rezultata u tabeli 4.9. može videti. Ovo može biti očekivano, jer je primenjena temperatura u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine bila najviša u toku fermentacije uzoraka V4, V8, V9 i V13.

Slični rezultati dobijeni su u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine, gde je pri višim primenjenim temperaturama fermentacije sadržaj ukupnih šećera bio niži, kako je predstavljeno u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Sadržaj ukupnih šećera uzoraka svežeg i fermentisanog kupusa (K) i rasola (R) nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl i različitim temperaturnim intervalima, ogled iz 2016. godine

Uzorak (uslovi)	Sadržaj ukupnih šećera [%]
K0 (svež)	3,91 ± 0,02 ^a
K1 (16-18 °C)	1,70 ± 0,35 ^b
K2 (18-20 °C)	0,58 ± 0,01 ^c
K3 (20-22 °C)	0,27 ± 0,01 ^c
R1 (16-18 °C)	nd
R2 (18-20 °C)	nd
R3 (20-22 °C)	nd

nd – nije detektovano

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Optimalan sadržaj ukupnih šećera u glavicama svežeg kupusa treba da bude u intervalu 3,5-6,5% i ne bi trebalo da bude niži od 3% (Niketić-Aleksić, 1988; Červenski, 2010) kako je ranije napomenuto. Sadržaj ukupnih šećera u kupusu u ovom ogledu iznosio je 3,91%, te se može zaključiti da je u pogledu sadržaja ukupnih šećera svež kupus bio pogodan za proces fermentacije.

U toku procesa fermentacije došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih šećera kod uzoraka fermentisanog kupusa u glavicama. Uzorci fermentisanog kupusa K2 i K3 posedovali su veoma nizak sadržaj ukupnih šećera (tabela 4.10), što ukazuje na to da je 40 dana bilo dovoljno za

kompletan proces fermentacije. Međutim, sadržaj šećera u uzorku K1 bio je viši, te se može zaključiti da kombinacija primenjenog intervala temperature (16-18 °C) i trajanje fermentacije (40 dana) nisu bili dovoljni da bi proces fermentacije bio završen. Kao što može biti i očekivano, sadržaj ukupnih šećera u uzorcima rasola nije bio detektovan.

Uzorak K0 imao je najviše ukupnih šećera i statistički se značajno razlikovao od ostalih uzoraka kupusa ($p < 0,05$), kako se može primetiti iz tabele. Uzorci kupusa fermentisani pri višim temperaturnim intervalima (K2 i K3) imali su najmanji sadržaj ukupnih šećera i statistički su se značajno razlikovali od ostalih uzoraka ($p < 0,05$).

U ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine sadržaj ukupnih šećera uzoraka svežeg kupusa tenisiti, bravo i futoški bio je redom 4,80%, 3,98% i 3,15%. Sadržaj šećera kupusa hibrida bravo veoma je sličan rezultatima dobijenim u ogledima iz fermentacije kupusa 2015. (3,90%) i 2016. (3,91%) godine.

Sadržaj ukupnih šećera uzoraka fermentisanog kupusa u glavicama (fermentacija kupusa 2017. godine) pri različitim uslovima fermentacije predstavljen je u tabeli 4.11. Temperature na kojima se odvijao proces fermentacije prikazane su u tabeli 4.5. Iz tabele 4.11. može se zaključiti da je sadržaj ukupnih šećera niži u poređenju sa uzorcima svežeg kupusa, odnosno u toku fermentacije došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih šećera, što je bio slučaj i kod fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine.

Preostali šećer u uzorcima kupusa nakon fermentacije smatra se poželjnim, jer doprinosi boljem ukusu fermentisanog proizvoda (Holzapfel, 2008). Sadržaj šećera ispod 1% uzet je kao indikator završetka procesa fermentacije u ovom ogledu. U uzorcima fermentisanog kupusa podvrgnutim spontanoj fermentaciji (T1, B4 i F7) sadržaj ukupnih šećera dostigao je vrednosti ispod 1% nakon 55 dana fermentacije, te je 55. dan određen kao poslednji dan fermentacije kod ovih uzoraka. Uzorci fermentisani uz pomoć rasola iz prethodne fermentacije (T2, B5 i F8) i uz dodatak starter kulture (T3, B6 i F9) posedovali su sadržaj šećera niži od 1% nakon 44 dana fermentacije, pa je 44. dan određen kao poslednji dan fermentacije za ovu grupu uzoraka. Upotrebom starter kulture skratilo se vreme potrebno za završetak procesa fermentacije, odnosno

došlo je do brže potrošnje šećera od strane bakterija mlečne kiseline. Isti trend primećen je i pri upotrebi rasola iz prethodne fermentacije. Bakterije vrste *Lb. plantarum* dominiraju u poslednjoj fazi fermentacije, pogoduje im kisela sredina i pH vrednosti ispod 4,0 kada je njihov rast intenzivan (Hutkins, 2006; Đukić i sar., 2015), o čemu je ranije bilo više reči. Starter kultura primenjena u ogledu iz 2017. godine, takođe, pripada vrsti *Lb. plantarum*, te je isti trend primećen pri upotrebi rasola iz prethodne fermentacije moguće objasniti prisustvom *Lb. plantarum* u rasolu čija sredina odgovara dobroj održivosti bakterija ove vrste.

Tabela 4.11. Sadržaj ukupnih šećera uzoraka fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije, ogled iz 2017. godine

Uzorak (uslovi)	Sadržaj ukupnih šećera [%]
T1* (voda+3,3%NaCl)	0,93 ± 0,00 ^a
T2 (rasol)	0,45 ± 0,10 ^c
T3 (voda+3,3%NaCl+starter)	nd
B4* (voda+3,3%NaCl)	0,90 ± 0,01 ^a
B5 (rasol)	0,44 ± 0,00 ^c
B6 (voda+3,3%NaCl+starter)	0,54 ± 0,00 ^{bc}
F7* (voda+3,3%NaCl)	nd
F8 (rasol)	0,60 ± 0,05 ^b
F9 (voda+3,3%NaCl+starter)	0,91 ± 0,03 ^a

* – 55. dan fermentacije, za ostale uzorke 44. dan fermentacije
rasol – prethodne fermentacije sa finalnim sadržajem NaCl 2,57%
starter – 0,050 g/kg svežeg kupusa
nd – nije detektovano
 Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Uzorci T1, B4 i F9 posedovali su najviše ukupnih šećera i statistički su se značajno razlikovali od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa u glavicama ($p < 0,05$), kako je predstavljeno u tabeli 4.11.

4.2.4. Sadržaj soli u uzorcima fermentisanog kupusa

So je neophodna za razvoj anaerobnih uslova tokom fermentacije, sprečavanje rasta nepoželjnih mikroorganizama koji izazivaju kvarenje namirnica i inaktivaciju endogenih pektolitičkih enzima koji dovode do omekšavanja proizvoda (Peñas i sar., 2017). So utiče na ukus proizvoda, snižava a_w vrednost, te posredno utiče na vrstu i obim mikrobnog metabolizma i indirektno pomaže u sprečavanju omekšavanja biljnog tkiva (Medina-Pradas i sar., 2017).

Sadržaj soli u fermentisanim glavicama kupusa hibrida bravo poslednjeg ispitivanog dana u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine predstavljen je u tabeli 4.12.

So povećava osmotski pritisak u toku fermentacije, što dovodi do ekstrakcije soka iz tkiva kupusa (Wolkers-Rooijackers i sar., 2013). Sadržaj soli u uzorku svežeg kupusa pre fermentacije iznosio je 0,05% (tabela 7.1, u Prilogu). Tokom procesa fermentacije, usled difuzije dodatog NaCl, došlo je do povećanja sadržaja soli u uzorcima fermentisanog kupusa. Sadržaj soli poslednjeg ispitivanog dana fermentacije u svim uzorcima kupusa u glavicama kretao se u granicama 2,08-3,19%. Uzorci V4, V6 i V11 ne dele slovo (tabela 4.12) ni sa jednim od preostalih uzoraka, te se statistički značajno razlikuju od ostalih fermentisanih uzoraka ($p < 0,05$). Navedeni uzorci (V4, V6 i V11) statistički se značajno razlikuju i između sebe ($p < 0,05$), a uzorak V6 poseduje i najveći sadržaj soli poslednjeg ispitivanog dana fermentacije (tabela 4.12). Sadržaj soli u ovom ogledu odgovara granicama 2-4% navedenim u istraživanju Cvetković (2014) za količinu soli u fermentisanom kupusu, kao i granicama 1,5-4% (Sl. glasnik RS, 128/2020) za količinu soli u biološki konzervisanom povrću.

Sadržaj soli u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa i rasola pri različitim temperaturnim intervalima u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine predstavljen je u tabeli 4.13.

Tabela 4.12. Sadržaj soli uzoraka fermentisanog kupusa nakon 62 dana pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak	NaCl [%]	Starter kultura [g/kg svežeg kupusa]	t [°C]	Sadržaj soli [%]
V1	6	0	22	2,93 ± 0,00 ^{bc}
V2	7	0	18	2,80 ± 0,00 ^d
V3	8	0	22	2,14 ± 0,03 ^{hi}
V4	7	0	26	2,43 ± 0,03 ^f
V5	6	0,025	18	2,88 ± 0,00 ^{cd}
V6	8	0,025	18	3,19 ± 0,00 ^a
V7	7	0,025	22	2,91 ± 0,00 ^e
V8	6	0,025	26	2,08 ± 0,07 ⁱ
V9	8	0,025	26	2,22 ± 0,09 ^{gh}
V10	7	0,050	18	3,03 ± 0,03 ^b
V11	6	0,050	22	2,63 ± 0,03 ^e
V12	8	0,050	22	2,91 ± 0,03 ^c
V13	7	0,050	26	2,30 ± 0,03 ^g

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Tabela 4.13. Sadržaj soli u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa i rasola nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl i različitim temperaturnim intervalima, ogled iz 2016. godine

Uzorak (uslovi)	Sadržaj soli [%]
K0 (svež)	0,05 ± 0,01 ^g
K1 (16-18 °C)	0,79 ± 0,05 ^f
K2 (18-20 °C)	2,19 ± 0,00 ^e
K3 (20-22 °C)	2,45 ± 0,00 ^d
R1 (16-18 °C)	2,84 ± 0,00 ^c
R2 (18-20 °C)	3,18 ± 0,02 ^b
R3 (20-22 °C)	3,27 ± 0,05 ^a

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Sadržaj soli u uzorcima kupusa povećava se u toku procesa fermentacije kao što je to bio slučaj i u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine. Takođe, iz tabele 4.13. može se zapaziti da uzorci kupusa fermentisani pri većem intervalu temperatura poseduju više soli u glavicama. Uzorak fermentisan pri najnižem temperaturnom intervalu imao je i najmanju količinu soli 0,79%. Sadržaj soli u uzorku K1 bio je veoma nizak u poređenju sa prethodnim ogledom (fermentacija kupusa 2015. godine) i literaturnim podacima (Cvetković, 2014; Sl. glasnik RS, 128/2020). Na osnovu navedenog može se zaključiti da pri temperaturnom intervalu 16-18 °C nakon 40 dana fermentacije, nije uspelo da difunduje dovoljno soli u glavice kupusa da bi se proces fermentacije smatrao završenim. Nasuprot tome, sadržaj soli u uzorcima K2 i K3, fermentisanim pri višim temperaturnim intervalima, 18-20 °C i 20-22 °C, bio je odgovarajući i u granicama za količinu soli u biološki konzervisanom povrću, 1,5-4% (Sl. glasnik RS, 128/2020). U uzorcima rasola sadržaj soli bio je u granicama 2,84-3,27%. Veći sadržaj soli koji se nalazi u rasolu u poređenju sa fermentisanim glavicama kupusa je očekivan, s obzirom da je u vodenom rastvoru bilo 6% NaCl na samom početku ogleada, a većina soli zadržala se u rasolu. Dodatno, primećeno je da uzorak rasola R3 sadrži najviše soli i takođe je fermentisan pri najvišem temperaturnom intervalu u ovom ogledu.

Sadržaj soli u svim uzorcima u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine statistički se značajno razlikovao ($p < 0,05$), kako se može primetiti posmatranjem vrednosti iz tabele 4.13. Prema tome, može se zaključiti da različiti uslovi fermentacije statistički značajno utiču na sadržaj soli u gotovim proizvodima ($p < 0,05$).

U svežim uzorcima kupusa u glavicama tenisiti, bravo i futoški sadržaj soli bio je 0,09%, 0,19% i 0,09%, redom (fermentacija kupusa 2017. godine). Sadržaj soli u uzorcima fermentisanog kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije predstavljen je u tabeli 4.14., dok su temperature u toku fermentacije prikazane u tabeli 4.5.

Tabela 4.14. Sadržaj soli u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije, ogled iz 2017. godine

Uzorak (uslovi)	Sadržaj soli [%]
T1* (voda+3,3%NaCl)	3,06 ± 0,00 ^c
T2 (rasol)	1,48 ± 0,03 ^g
T3 (voda+3,3%NaCl+starter)	2,58 ± 0,05 ^d
B4* (voda+3,3%NaCl)	3,05 ± 0,05 ^c
B5 (rasol)	2,48 ± 0,05 ^e
B6 (voda+3,3%NaCl+starter)	2,58 ± 0,00 ^d
F7* (voda+3,3%NaCl)	3,37 ± 0,02 ^b
F8 (rasol)	2,22 ± 0,00 ^f
F9 (voda+3,3%NaCl+starter)	3,57 ± 0,00 ^a

* – 55. dan fermentacije, za ostale uzorke 44. dan fermentacije

rasol – prethodne fermentacije sa finalnim sadržajem NaCl 2,57%

starter – 0,050 g/kg svežeg kupusa

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Poređenjem rezultata uzorka svežeg i fermentisanog kupusa vidi se da je, očekivano, zabeleženo povećanje sadržaja soli u glavicama fermentisanog kupusa, što odgovara zapažanjima izvedenim u ogledima iz fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine. Najmanje soli sadržale su glavice kupusa fermentisane uz pomoć rasola dobijenog iz prethodne fermentacije kupusa. Finalni sadržaj NaCl u rasolu iz prethodne fermentacije bio je 2,57%, pa je niži sadržaj soli u uzorcima T2, B5 i F8 mogao biti očekivan. Uzorci T2, B5 i F8 su se i statistički značajno razlikovali od svih ostalih uzoraka kupusa u glavicama ($p < 0,05$). Uzorci futoškog kupusa F7 i F9, fermentisani spontanom fermentacijom i uz primenu starter kulture, takođe su se značajno statistički razlikovali, kako između sebe tako i od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Nasuprot tome, uzorci tenisiti i bravo fermentisani spontanom fermentacijom (T1 i B4) nisu se između sebe značajno razlikovali, kao ni uzorci fermentisani uz dodatak starter kulture (T3 i B6). Sadržaj soli u uzorcima hibrida bravo bio je u granicama 2,48-3,05%, što je veoma slično rezultatima dobijenim za ovaj hibrid kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine, gde je sadržaj soli bio u granicama 2,08-3,19% (tabela 4.12).

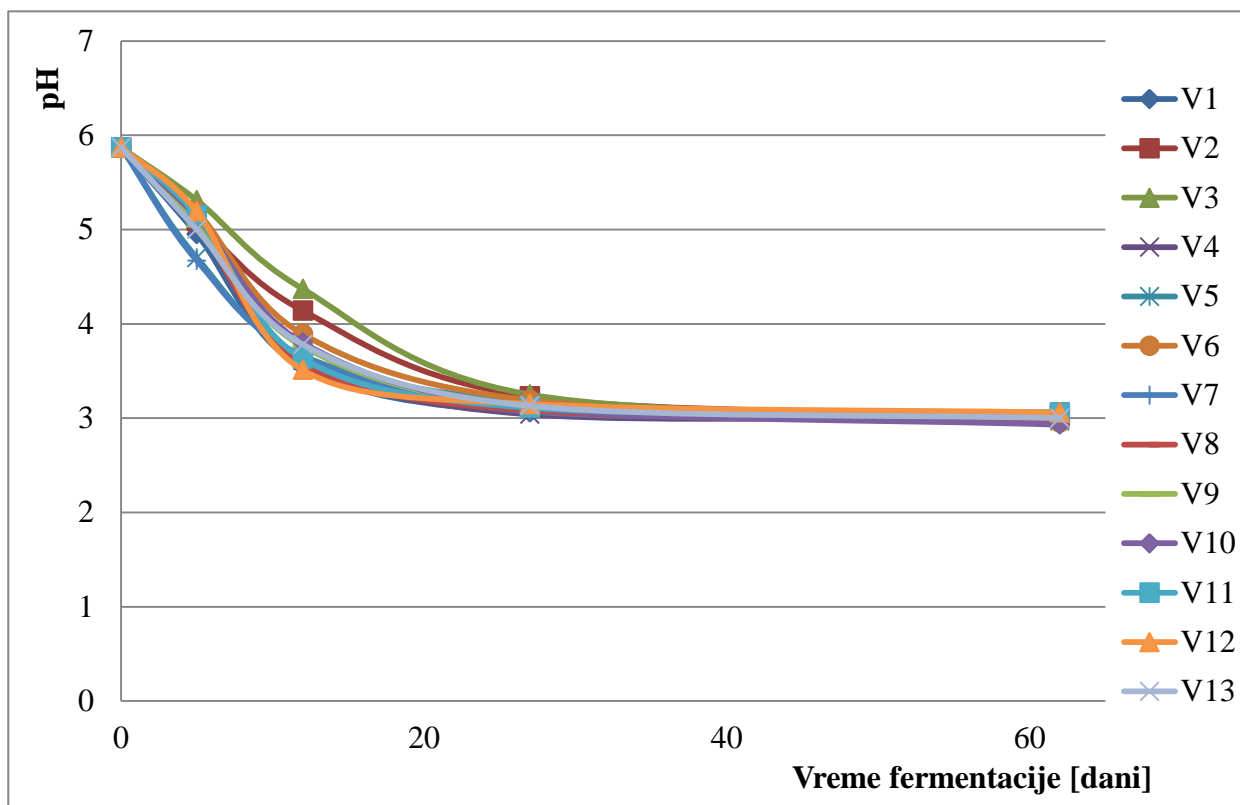
4.2.5. Promena pH vrednosti u toku fermentacije kupusa

Vrednosti u rasponu pH 6,0-8,0 su, generalno, najpogodnije za rast i razvoj bakterija. Kvasci najbrže rastu pri vrednostima pH 4,5-6,0, a plesni pri rasponu pH 3,5-4,0. Izuzeci od ovog pravila su bakterije koje proizvode značajne količine kiselina, kao što su laktobacili i bakterije sirćetne kiseline, sa optimumom obično između pH 5,0-6,0. Većina prehrambenih proizvoda je blago kiselog ukusa. Kiselost namirnica je u tesnoj vezi sa mikrobiološkim profilom i brzinom kvarenja proizvoda. Biljni proizvodi klasifikovani kao povrće uglavnom imaju neutralnu ili umereno kiselu pH vrednost, pa su izuzetno osetljivi na kvarenje koje je izazvano bakterijskom aktivnošću. Sveže glavice kupusa obično pokazuju vrednosti u rasponu pH 5,2-6,3 (Adams i Moss, 2008).

Vrednost pH u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine praćena je u cilju kontrole procesa fermentacije i utvrđivanja konačne stabilnosti fermentisanog proizvoda, kupusa u glavicama. pH vrednosti ispitivanih uzoraka kupusa u toku procesa fermentacije predstavljene su grafički na slici 4.1. Nakon 5, 12, 27 i 62 dana pH vrednosti bili su u granicama 5,31-4,67, 4,37-3,51, 3,25-3,04 i 3,06-2,93, redom. Izmerene vrednosti nakon 5 dana fermentacije u skladu su sa merenjima koja su izveli Palani i sar. (2016), gde je vrednost pH u fermentisanom kupusu nakon 5 dana fermentacije iznosila 4,20.

Sa grafika predstavljenog na slici 4.1 vidi se da nije došlo do značajnog pada pH vrednosti od 27. do 62. dana fermentacije, odnosno pH vrednost je stagnirala u tom periodu, što ukazuje na to da je dostignuta krajnja tačka fermentacije 62. dana. Slično tome, krajnja tačka procesa fermentacije bila je u granicama pH vrednosti od 3,20 do 3,16 u glavicama kupusa hibrida bravo nakon 50 dana fermentacije kod Cvetković (2014). Proces fermentacije se može zaustaviti bilo kada nakon što vrednost opadne ispod pH 4,1, a fermentisani kupus se može distribuirati kao pasterizovani proizvod. Obično, za fermentisani kupus na području Evrope ove vrednosti se kreću između pH 4,1 i pH 3,8, jer potrošači sve više preferiraju proizvode blago-kiselog ukusa (Holzapfel i sar., 2008). S tim u vezi, rezultati dobijeni merenjima pH vrednosti u

uzorcima fermentisanog kupusa u glavicama nakon 12 dana fermentacije (pH 4,37-3,51) pokazali su se kao najpogodniji.

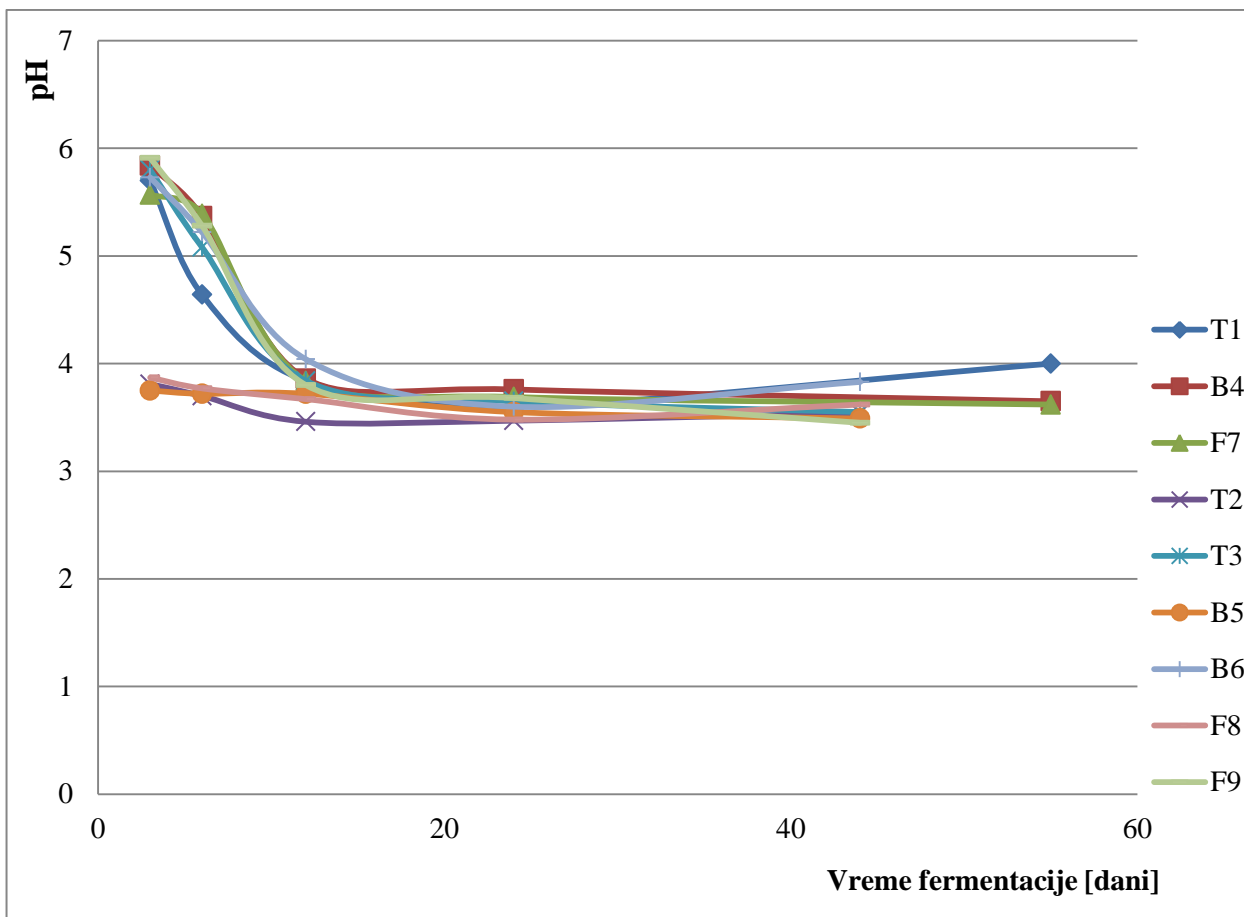


Slika 4.1. Promena pH vrednosti u toku fermentacije kupusa u glavicama pri različitim uslovima fermentacije (količina NaCl, starter kultura i temperatura); V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C), V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C), V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C), V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C), V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C), V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C), V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C), V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C), V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C), V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C), ogleđ iz 2015. godine

U ogleđu iz fermentacije kupusa 2016. godine pH vrednost svežeg kupusa hibrida bravo iznosila je 5,90 i pokazalo se da je veoma slična pH vrednosti 5,87, izmerenoj u prethodnom ogleđu iz fermentacije kupusa 2015. godine (tabela 7.1, u Prilogu), ova merenja odgovaraju pH vrednostima za svež kupus 5,20-6,30 (Adams i Moss, 2008). pH vrednosti fermentisanih glavica kupusa hibrida bravo nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl iznosile su 3,49, 3,12 i 2,97 za temperaturne intervale 16-18 °C, 18-20 °C i 20-22 °C, redom. Primećeno je da je, očekivano, došlo do pada pH vrednosti u toku procesa fermentacije za sve fermentisane uzorke

kupusa. Na osnovu izmerenih vrednosti može se zaključiti da sa porastom temperaturnih intervala dolazi do opadanja vrednosti pH, odnosno da se pri višim temperaturama fermentacija odvijala brže, pa su i pH vrednosti za ove uzorke 40-og dana bile niže. U uzorcima rasola pH vrednosti su iznosile 3,00, 3,16 i 3,08 za intervale temperatura 16-18 °C, 18-20 °C i 20-22 °C, redom. Približno jednake vrednosti pH u uzorcima rasola izmerene u ovom ogledu ukazuju na to da različiti intervali temperatura nisu značajno uticali na uzorke rasola u toku fermentacije.

Promena pH vrednosti u toku fermentacije kupusa 2017. godine predstavljena je grafički na slici 4.2 za uzorke kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije. U uzorcima kupusa fermentisanim procesom spontane fermentacije, kao i uz upotrebu starter kulture, pH vrednosti progresivno opadaju sve do 12-og dana fermentacije. Nakon toga, pH vrednosti sporo opadaju ili blago rastu. Sa druge strane, u uzorcima kod kojih je za fermentaciju korišćen rasol od prethodne fermentacije pad pH vrednosti od trećeg do poslednjeg dana fermentacije veoma je spor. U uzorcima T3, B4, F7 i F9 pH vrednosti opadaju od trećeg pa sve do poslednjeg dana fermentacije, dok se kod drugih uzoraka primećuje blagi porast pH vrednosti nakon 24 dana (slika 4.2). Izuzetak je uzorak T2, kod koga dolazi do blagog porasta pH vrednosti već nakon 12-og dana fermentacije. Uzevši u obzir sve do sada navedeno u pogledu pH vrednosti, najbolji rezultati zabeleženi su kod uzoraka T3 i F9 u ovom ogledu. Oba uzorka fermentisana su uz dodatak starter kulture, a pH vrednosti su iznosile 3,55 za uzorak T3 i 3,45 za uzorak F9.



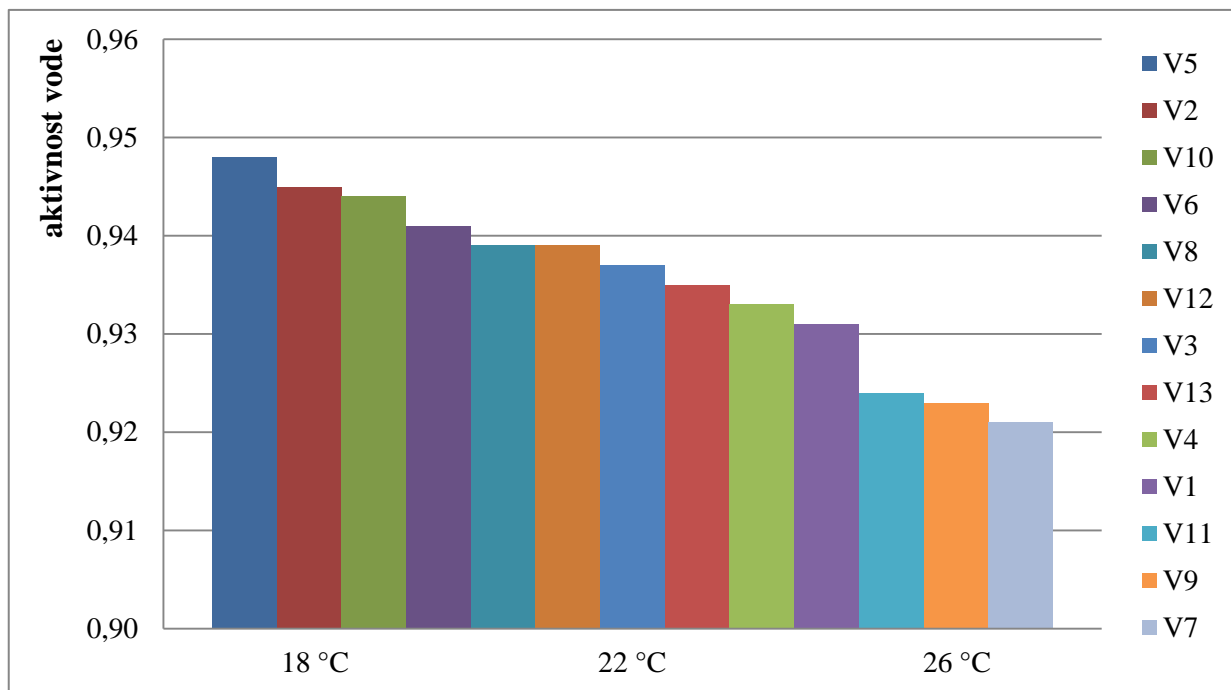
Slika 4.2. Promena pH vrednosti u toku fermentacije kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije: T1, B4, F7 (voda + 3,3% NaCl); T2, B5, F8 (rasol iz prethodne fermentacije); T3, B6, F9 (voda + 3,3% NaCl + starter kultura 0,050 g/kg), ogled iz 2017. godine

4.2.6. a_w vrednost fermentisanog kupusa

Aktivnost vode (a_w) predstavlja odnos pritiska pare namirnice koja se ispituje i pritiska pare čiste vode, odnosno destilovane vode. Destilovana voda propisana je kao standard i ima vrednost $a_w = 1,00$. Prema tome, sva a_w merenja u namirnicama iznosiće $< 1,00$ (Gurtler i sar., 2014). Aktivnost vode koristi se za predviđanje opstanka i rasta mikroorganizama u hrani i direktno utiče na kvalitet i stabilnost proizvoda (Barbosa-Cánovas i sar., 2007).

Merenje a_w vrednosti izvedeno je u svim uzorcima fermentisanog kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine poslednjeg (62-og) ispitivanog dana. U toku procesa

fermentacije došlo je do siženja a_w vrednosti kod svih uzoraka kupusa hibrida bravo u glavicama, poređenjem rezultata merenja u svežem kupusu, gde je a_w vrednost iznosila 0,963 (tabela 7.1, u Prilogu) i a_w vrednosti u fermentisanim uzorcima poslednjeg ispitivanog dana 0,948-0,921. Na slici 4.3 predstavljene su aktivnosti vode fermentisang kupusa u glavicama poslednjeg ispitivanog dana, pri različitim temperaturama fermentacije.



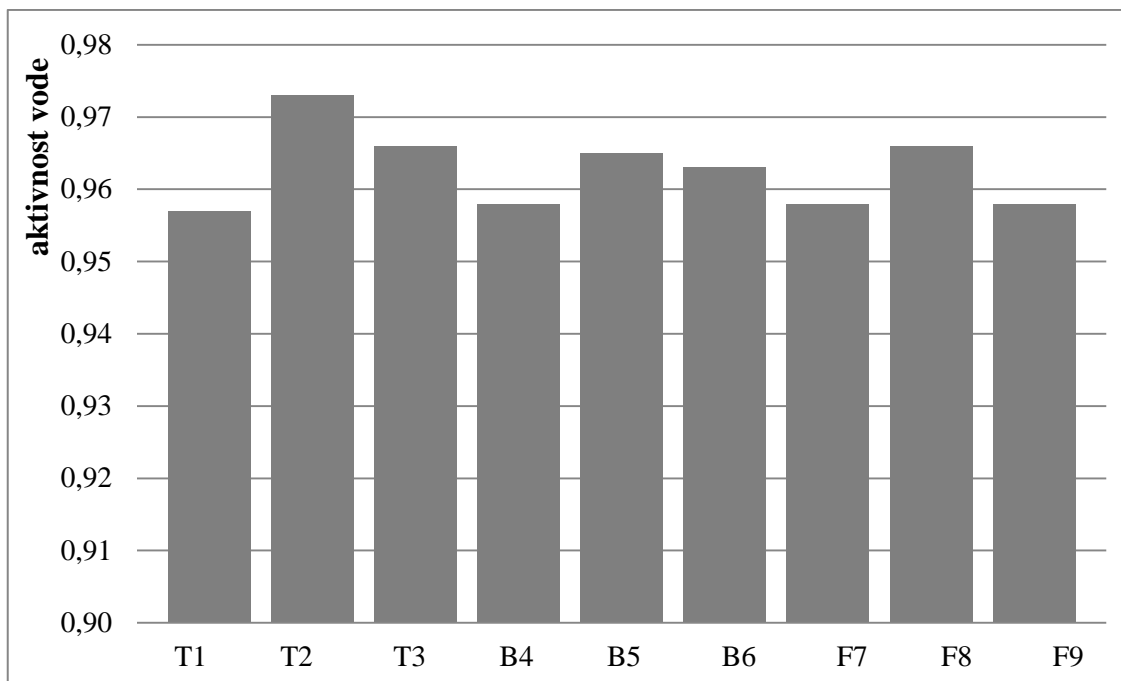
Slika 4.3. a_w vrednosti u uzorcima fermentisanog kupusa u glavicama nakon 62 dana pri različitim uslovima fermentacije (količina NaCl, starter kultura i temperatura); V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C), V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C), V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C), V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C), V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C), V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C), V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C), V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C), V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C), V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C), ogled iz 2015. godine

Uzorci fermentisani pri najnižim temperaturnim uslovima (18 °C) posedovali su najviše a_w vrednosti i obrnuto, kako se može videti sa dijagrama na slici 4.3.

a_w vrednost uzorka svežeg kupusa hibrida bravo u ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine iznosila je 0,997. Nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl došlo je do pada a_w vrednosti; 0,981, 0,976 i 0,967 kod svih uzoraka kupusa fermentisanih pri temperaturnim

intervalima 16-18 °C, 18-20 °C i 20-22 °C, redom. Uzorci fermentisani pri višim temperaturnim intervalima posedovali su niže a_w vrednosti i obrnuto. Ista zapažanja izvedena su u prethodnom ogledu (fermentacija kupusa 2015. godine, slika 4.3). Primećeno je da uzorak, fermentisan pri temperaturnom intervalu 20-22 °C, pored najniže a_w vrednosti ima i najviše soli kako se može videti iz tabele 4.13. Sa porastom temperaturnog intervala došlo je do smanjenja a_w vrednosti i povećanja sadržaja soli u fermentisanim glavicama kupusa hibrida bravo u ovom ogledu. Navedeno zapažanje je i očekivano, s obzirom da su a_w vrednost i sadržaj soli u namirnici u direktnoj korelaciji. Naime, NaCl iz vodenog rastvora uzrokuje sekreciju soka iz ćelija kupusa usled težnje za izjednačavanjem osmotskog pritiska unutar glavice kupusa i slanog rastvora, što posledično dovodi do smanjenja aktivnosti vode unutar glavica kupusa, odnosno a_w vrednost u uzorcima fermentisanog kupusa opada. a_w vrednosti u uzorcima rasola iz fermentacije kupusa 2016. godine iznosile su 0,972, 0,972 i 0,974 za intervale temperatura 16-18 °C, 18-20 °C i 20-22 °C, redom. Prema ovome, može se zaključiti da su a_w vrednosti rasola bliske, bez obzira na temperaturni interval pri kome se proces fermentacije odvijao.

Rezultati merenja a_w vrednosti za svež kupus tenisiti, bravo i futoški bili su 0,970, 0,975 i 0,975, redom (fermentacija kupusa 2017. godine). Svi uzorci kupusa u glavicama u ovom ogledu fermentisani su pri istom temperaturnom intervalu, koji je u toku fermentacije varirao od 17 °C do 10 °C (tabela 4.5) u PG Kurjakov iz Futoga. a_w vrednosti u fermentisanim uzorcima kupusa za svaki uzorak ponaosob predstavljene su dijagramom na slici 4.4. U toku fermentacije kupusa uglavnom je došlo do pada a_w vrednosti, izuzetak je uzorak T2 fermentisan rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije. Takođe, najviše a_w vrednosti izmerene su u uzorcima fermentisanim sa rasolom iz prethodne fermentacije, neovisno o sorti ili hibridu kupusa. Visoke a_w vrednosti kod uzoraka T2, B5 i F8 mogle bi se objasniti niskim sadržajem soli koji je bio na raspolaganju ovim glavicama kupusa, s obzirom da je finalna koncentracija NaCl u rasolu iz prethodne fermentacije bila 2,57%. Generalno, najniže a_w vrednosti u ovom ogledu imali su uzorci kupusa podvrgnuti spontanom procesu fermentacije (T1, B4 i F7), dok je među uzorcima fermentisanim uz primenu starter kulture najnižu a_w vrednost imao uzorak F9.

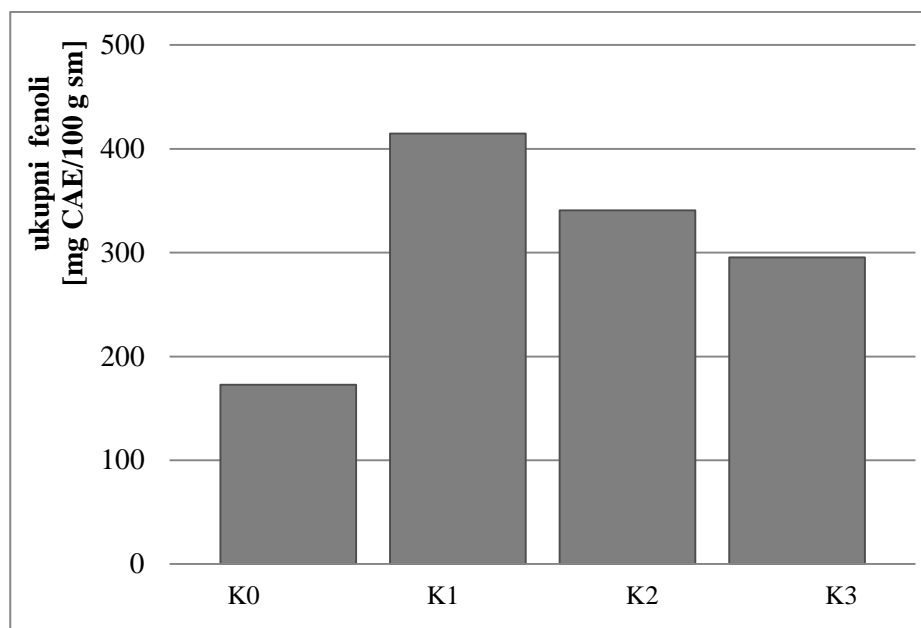


Slika 4.4. a_w vrednosti u uzorcima fermentisanog kupusa kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije: T1, B4, F7 (voda + 3,3% NaCl); T2, B5, F8 (rasol iz prethodne fermentacije); T3, B6, F9 (voda + 3,3% NaCl + starter kultura 0,050 g/kg), ogleđ iz 2017. godine

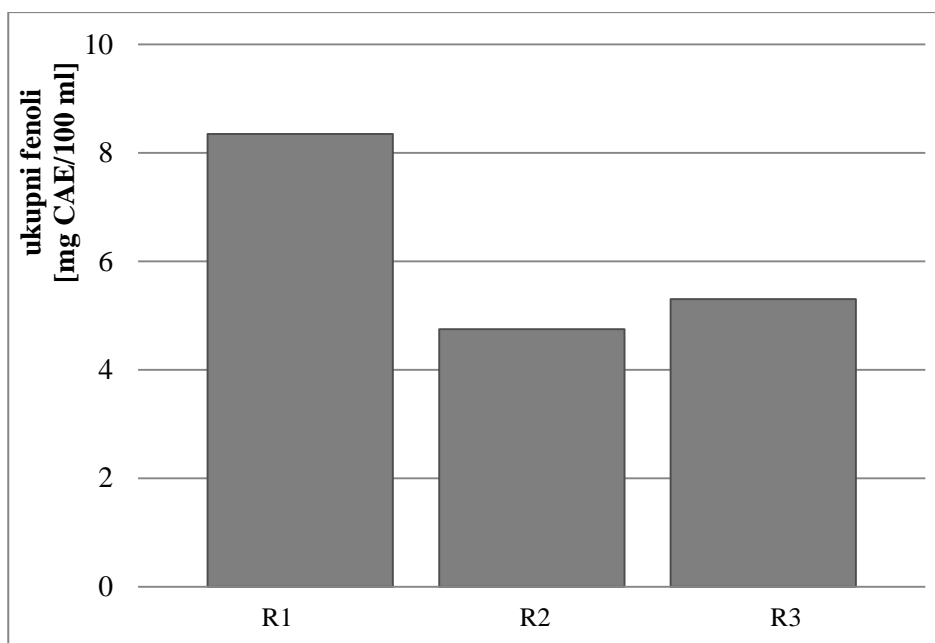
4.2.7. Sadržaj ukupnih fenola u glavicama fermentisanog kupusa hibrida bravo

Fenolna jedinjenja pripadaju grupi biološki aktivnih supstanci koje su važne za ljudsko zdravlje jer poseduju antimikrobne, antivirusne i protivupalne karakteristike (Ignat i sar., 2011). Kupus je poznat kao izvor jedinjenja koja poseduju značajnu antioksidativnu aktivnost, s obzirom da je bogat polifenolnim jedinjenjima, o čemu je bilo više reči u poglavlju 2.4.1.3.

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa hibrida bravo u glavicama određivan je u ogleđu iz fermentacije kupusa 2016. godine. Fermentacija je trajala 40 dana uz dodatak 6% NaCl i pri različitim temperaturnim intervalima. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa u glavicama predstavljen je dijagramom na slici 4.5, dok je sadržaj ukupnih fenola u rasolima predstavljen na slici 4.6.



Slika 4.5. Sadržaj ukupnih fenola svežeg kupusa (K0) i kupusa fermentisanih pri različitim temperaturnim intervalima; K1 (16-18 °C), K2 (18-20 °C), K3 (20-22 °C) nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl, ogled iz 2016. godine



Slika 4.6. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima rasola dobijenih pri različitim temperaturnim intervalima; R1 (16-18 °C), R2 (18-20 °C), R3 (20-22 °C) nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% NaCl, ogled iz 2016. godine

Sadržaj ukupnih fenola značajno je viši u fermentisanim uzorcima kupusa u poređenju sa uzorkom svežeg kupusa kako se može primetiti sa slike 4.5. Veći sadržaj ukupnih fenola u uzorcima fermentisanog kupusa mogao je biti očekivan s obzirom da su bakterije mlečne kiseline sposobne da oslobađaju polifenolna jedinjenja koja se nalaze u vezanom obliku unutar ćelija kupusa. Oslobađanjem fenolnih jedinjenja u glavicama kupusa posledično dolazi i do rasta sadržaja ukupnih fenola u toku procesa fermentacije (Acosta-Estrada i sar., 2014). Takođe, primećuje se pad sadržaja ukupnih fenola u uzorcima fermentisanog kupusa sa porastom temperaturnog intervala. Prema tome, najviše ukupnih fenola imao je uzorak K1 koji je fermentisan pri najnižim temperaturama (16-18 °C) u ovom ogledu. Ukoliko se posmatra dijagram sa slike 4.6. primećuje se da je sadržaj ukupnih fenola u uzorcima R2 i R3 bio nizak u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u uzorku R1. Isti zaključak se može izvesti kao i u slučaju uzoraka glavica fermentisanog kupusa, najviše fenola posedovao je uzorak rasola koji je fermentisan pri najnižem temperaturnom intervalu. Moguće je da su pri nižim temperaturnim intervalima favorizovane bakterije mlečne kiseline koje više transformišu polifenolna jedinjenja, kao što su pojedine vrste bakterija roda *Lactobacillus*.

4.2.8. Antioksidativna aktivnost i sadržaj askorbinske kiseline u toku fermentacije kupusa hibrida bravo

Fermentisani kupus ima značajan kapacitet uklanjanja slobodnih radikala zahvaljujući fenolnim jedinjenjima. Ova fenolna jedinjenja nalaze se u ćelijama svežeg kupusa kao slobodni molekuli ili u vezanom obliku (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). *Lactobacillus plantarum* je sposobna da oslobađa neke vezane fenolne komponente u toku procesa fermentacije, što dovodi do porasta antioksidativne aktivnosti kupusa (Acosta-Estrada i sar., 2014). Askorbinska kiselina je bioaktivno jedinjenje koje zajedno sa fenolnim jedinjenjima doprinosi antioksidativnom kapacitetu kod *Brassica* povrća (Gaafar i sar., 2014). Antioksidativna aktivnost i sadržaj askorbinske kiseline u toku procesa fermentacije analizirani su u uzorcima fermentisanog kupusa hibrida bravo u glavicama u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine. Rezultati

antioksidativne aktivnosti, izraženi preko IC_{50} i sadržaj askorbinske kiseline, predstavljeni su u tabli 4.15. koja ujedno predstavlja i ulaznu matricu za hemometrijsku analizu.

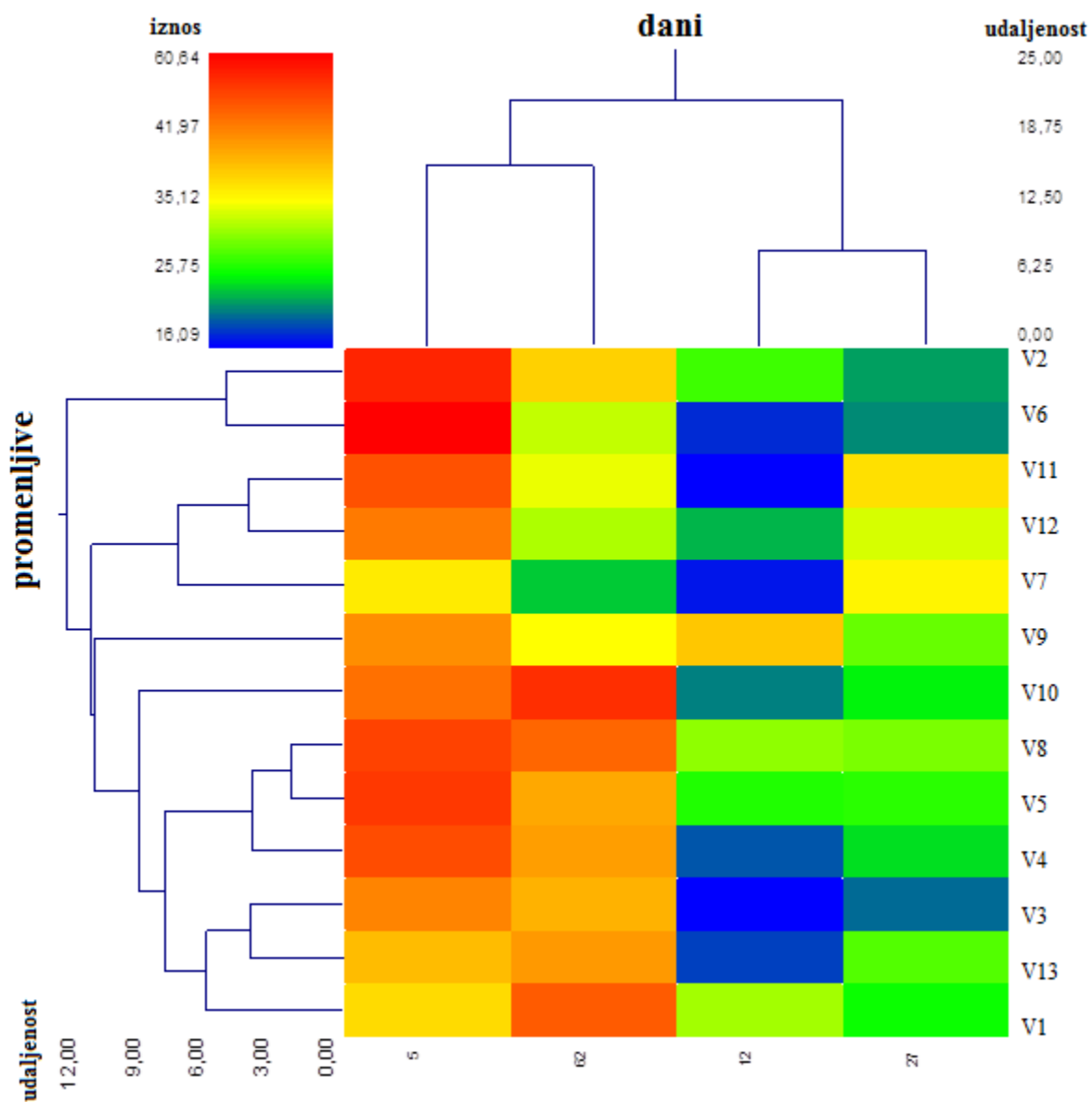
U ovom istraživanju primenjena je statistička obrada podataka, preko zbira ranga razlika (SRD) i hijerarhijske klaster analize (HCA), na rezultate antioksidativne aktivnosti i sadržaja askorbinske kiseline. Dvostruki dendogrami (slike 4.7. i 4.9.) pružaju jasan prikaz podataka koji je pogodan za lakše razumevanje dobijenih rezultata istraživanja. SRD-CRRN tehnika omogućila je poređenje sa “zlatnim“ standardom (podrobnije objašnjeno u poglavljima 3.2.1. i 3.2.4.), što je obezbedilo bolju osetljivost za grupisanje uzoraka od ANOVA tehnike, u ovom slučaju. SRD i HCA su posebno pogodne za obradu podataka koje karakterišu dve ili više promenljivih, kao što su sadržaj NaCl, starter kultura, temperatura i vreme fermentacije, u ovom ogledu. SRD i HCA su prilično nove tehnike i uspešno su korišćene u skorijim istraživanjima za obradu podataka kod slično dizajniranih eksperimenata (Kovačević i sar., 2015; Sipos i sar., 2016; Šoronja Simović i sar., 2017).

Tabela 4.15. Rezultati antioksidativne aktivnosti i sadržaja askorbinske kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije (količina NaCl, starter kultura i temperatura): V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C), V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C), V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C), V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C), V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C), V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C), V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C), V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C), V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C), V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C), ogleđ iz 2015. godine

Uzorak	IC ₅₀ [mg/ml]												
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13
5	34,33 ± 0,99	60,16 ± 0,67	41,03 ± 0,96	47,69 ± 1,30	51,74 ± 0,97	60,64 ± 1,12	32,04 ± 0,97	50,92 ± 1,20	40,39 ± 1,34	41,86 ± 0,76	45,97 ± 1,11	41,21 ± 1,21	35,97 ± 0,88
12	26,10 ± 0,90	23,74 ± 0,84	16,09 ± 0,92	18,41 ± 1,08	23,07 ± 0,76	17,06 ± 1,07	16,39 ± 0,65	25,50 ± 0,96	35,92 ± 1,49	18,94 ± 0,89	16,09 ± 0,57	20,03 ± 1,09	17,77 ± 0,65
27	22,73 ± 1,05	19,99 ± 1,00	18,63 ± 1,10	22,00 ± 1,00	23,67 ± 1,41	18,99 ± 0,77	30,99 ± 1,10	25,07 ± 0,88	24,14 ± 0,97	22,64 ± 0,98	33,45 ± 0,99	28,91 ± 0,77	24,04 ± 0,92
62	42,30 ± 1,40	35,01 ± 1,06	36,99 ± 0,98	38,77 ± 0,77	38,71 ± 0,82	27,82 ± 1,15	21,57 ± 1,03	41,99 ± 1,31	30,50 ± 0,54	54,34 ± 1,67	29,38 ± 1,56	27,26 ± 0,86	38,98 ± 0,73
Askorbinska kiselina [mg/100 g sm]													
5	3,07 ± 0,02	3,21 ± 0,01	4,81 ± 0,03	3,82 ± 0,03	4,36 ± 0,03	3,74 ± 0,02	3,37 ± 0,07	2,67 ± 0,02	3,75 ± 0,01	3,73 ± 0,09	3,01 ± 0,01	3,23 ± 0,01	3,37 ± 0,05
12	2,59 ± 0,01	3,34 ± 0,05	2,63 ± 0,01	3,96 ± 0,05	1,90 ± 0,02	2,59 ± 0,01	3,58 ± 0,04	2,70 ± 0,03	4,28 ± 0,18	2,80 ± 0,09	2,97 ± 0,00	2,89 ± 0,03	2,19 ± 0,04
27	1,79 ± 0,04	2,39 ± 0,01	3,21 ± 0,02	2,21 ± 0,01	1,86 ± 0,02	2,07 ± 0,07	1,43 ± 0,03	2,50 ± 0,06	3,41 ± 0,10	1,43 ± 0,01	1,84 ± 0,04	2,99 ± 0,07	2,15 ± 0,00
62	2,91 ± 0,11	2,23 ± 0,05	1,49 ± 0,01	2,35 ± 0,01	5,02 ± 0,03	1,38 ± 0,03	1,70 ± 0,01	2,22 ± 0,00	2,66 ± 0,10	2,96 ± 0,03	2,04 ± 0,02	2,13 ± 0,02	2,13 ± 0,04

Rezultati IC_{50} , nakon 5 dana fermentacije bili su u granicama 32,04-60,64 mg/ml, kako se može videti iz tabele 4.15. Pokazalo se da su dobijeni rezultati veoma slični rezultatima IC_{50} , 26,69 mg/ml i 42,18 mg/ml, u kineskom kupusu nakon 2 dana fermentacije pri temperaturi od 25 °C, prema Sun i sar. (2009). Može se primetiti da antioksidativna aktivnost svežeg kupusa (tabela 7.1, u Prilogu) raste u toku fermentacije i dostiže svoj maksimum 12-og dana fermentacije (tabela 4.15, slika 4.7). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Kusznierevicz i sar. (2008a), gde je antioksidativna aktivnost u ispitivanim uzorcima dostigla maksimum nakon 10 dana fermentacije. Procesni parametri utiču na fiziologiju tkiva kupusa i između ostalog mogu izazvati akumulaciju fenolnih jedinjenja i drugih sekundarnih metabolita (Reyes i sar., 2007). Na ovaj način može biti objašnjen porast inicijalne vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka kupusa u toku procesa fermentacije (Sun i sar., 2009). Međutim, antioksidativna aktivnost blago opada nakon 12 dana fermentacije i dostiže najniže vrednosti nakon 62 dana, ali ove vrednosti su ipak veće ukoliko se porede sa svežim kupusom u glavicama.

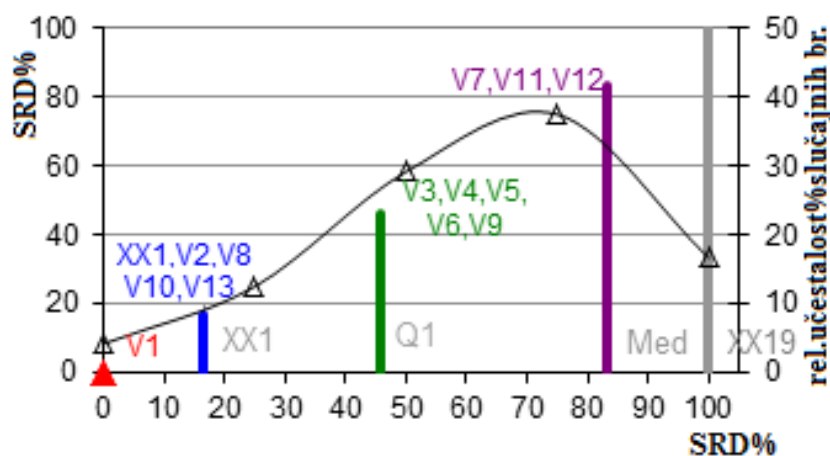
Dupli dendogram za vrednost IC_{50} dobijen je upotrebom HCA bazirane na “single-linkage“ algoritmu i euklidskoj udaljenosti, kako je predstavljeno na slici 4.7. Analizirani uzorci su podeljeni na manje grupe koje se nazivaju klasteri, tako da su slične vrednosti odvojene u zasebne klastere. Sličnosti između uzoraka uočavaju se prema boji polja u dendogramu. Sličnosti su primećene između vrednosti IC_{50} dobijenih za uzorke analizirane nakon 5 i 62 dana (grupa 1), kao i sličnosti uzoraka dobijenih analiziranjem nakon 12 i 27 dana (grupa 2) procesa fermentacije. Takođe je primećeno da grupa 1 ima značajno veću razdaljinu od grupe 2, te tako fermentisani uzorci iz grupe 1 imaju više vrednosti za IC_{50} , što znači da im je antioksidativna aktivnost niža u poređenju sa grupom 2.



Slika 4.7. Dupli dendrogram za vrednosti IC_{50} dobijen upotrebom HCA baziran na “single-linkage“ algoritmu i euklidskoj udaljenosti

Grafički prikaz SRD-CRNN analize za vrednosti IC_{50} u fermentisanim uzorcima kupusa predstavljen je na slici 4.8. SRD metod je primenjen u cilju grupisanja uzoraka prema vrednostima IC_{50} za svaki uzorak ponaosob u odnosu na referentni uzorak V1 (6%, 0 g/kg,

22 °C). Grupe uzoraka napravljene su na osnovu sličnosti između vrednosti IC_{50} za uzorke dobijene na 5., 12., 27. i 62. dan fermentacije.



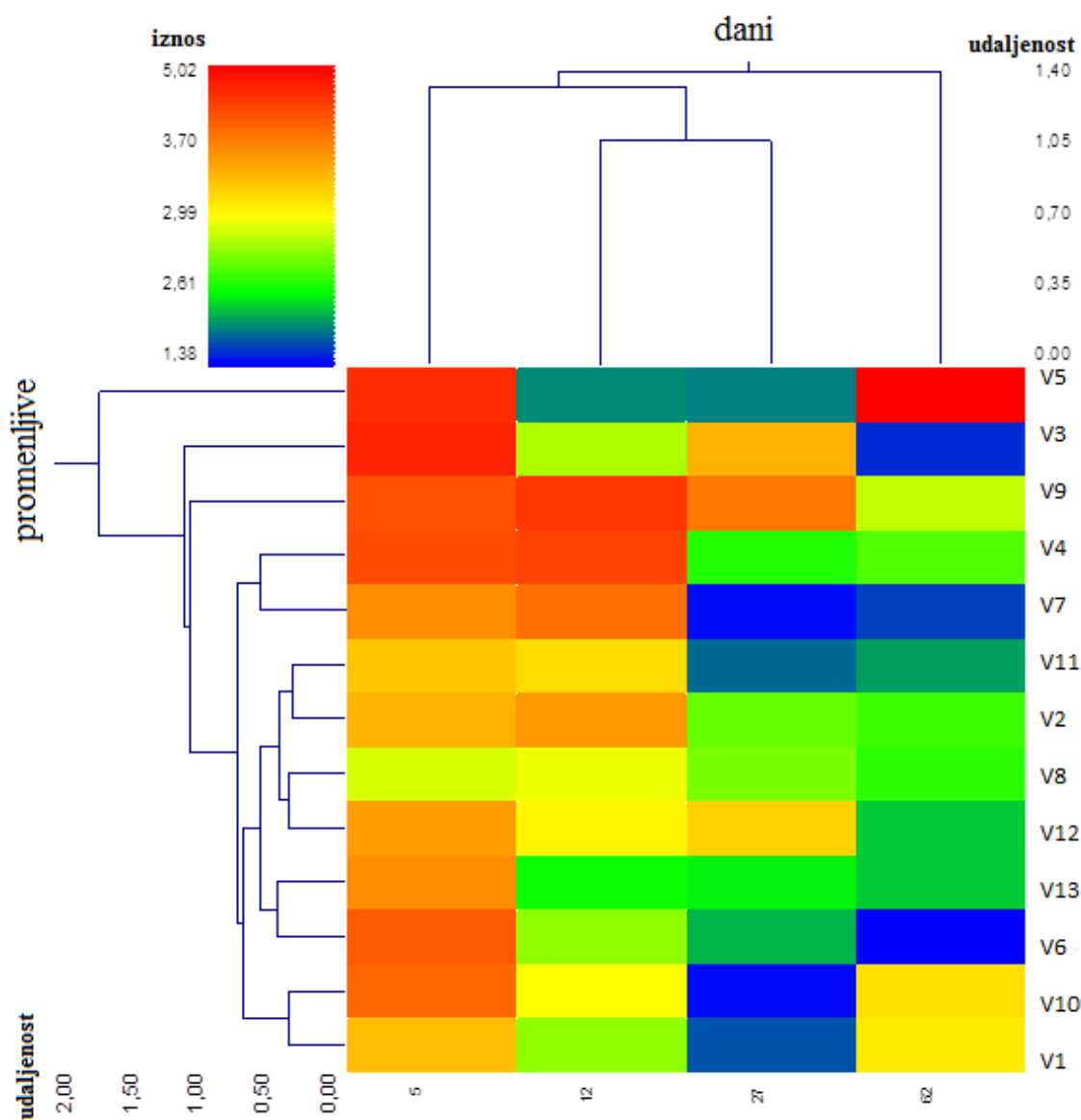
Slika 4.8. SRD-CRNN analiza za vrednosti IC_{50} kod uzoraka fermentisanog kupusa, ogleđ iz 2015. godine

Najveća razlika između referentnog uzorka i fermentisanih uzoraka dobijena je za grupu koja sadrži uzorke V7, V11 i V12 (slika 4.8). Primećeno je da dodatak starter kulture utiče značajno na postupak fermentacije u pogledu antioksidativnih karakteristika kupusa, na istoj temperaturi fermentacije kao što je bila i za referentni uzorak. Ove razlike su se pokazale kao najpozitivnije 12. dana fermentacije, ako se izvrši poređenje uzoraka sa svežim i referentnim uzorkom, s tim da uzorak V11 ima najbolje antioksidativne karakteristike sa vrednošću 16,09 mg/ml (tabela 4.15). Takođe, primećeno je da je procesom fermentacije došlo do povećanja antioksidativne aktivnosti do 3 puta, što je veom sličan rezultat sa rezultatom istraživanja Peñas i sar. (2015), gde je procesom fermentacije došlo do povećanja antioksidativne aktivnosti kupusa za 3 do 4 puta.

Sadržaj askorbinske kiseline u toku fermentacije uglavnom opada, a gubici od 5. do 62. dana bili su u granicama 5-69%, u ovom istraživanju, kako se može zaključiti iz tabele 4.15. Prema Mehta i sar. (2012), gubici sadržaja askorbinske kiseline u toku fermentacije kupusa iznosili su oko 40%. Međutim, može se dogoditi da dođe i do porasta sadržaja askorbinske kiseline u toku fermentacije kupusa (Wolkers-Rooijackers i sar., 2013; Cvetković, 2014), što je takođe slučaj kod uzorka V5 (tabela 4.15). Ovaj porast u sadržaju askorbinske kiseline dešava se usled aktivnosti mikroorganizama u toku procesa fermentacije (Bremus i sar., 2006), kao i

zahvaljujući degradaciji antioksidativnog jedinjenja koje se zove askorbigen u kiseloj sredini (Wolkers-Rooijackers i sar., 2013).

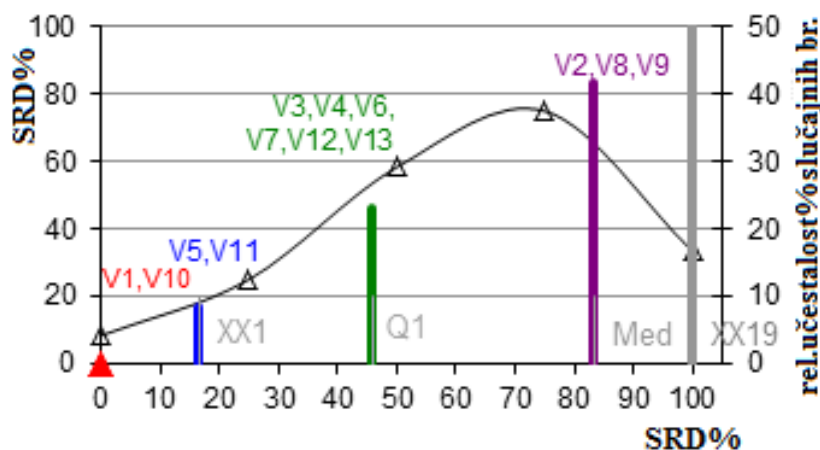
Dupli dendogram za askorbinsku kiselinu dobijen upotrebom HCA predstavljen je na slici 4.9. Sličnosti su primećene između uzoraka nakon 12 i 27 dana fermentacije (grupa 1). Dodatno, sličnosti postoje i između grupe 1 i uzoraka analiziranih nakon 5 dana fermentacije (grupa 2) kao i između grupe 2 i uzoraka analiziranih nakon 62 dana fermentacije (grupa 3). Može se primetiti da grupa 1 ima značajno niže rastojanje u poređenju sa grupama 2 i 3.



Slika 4.9. Dupli dendogram, za vrednosti sadržaja askorbinske kiseline, dobijen upotrebom HCA baziran na “single-linkage“ algoritmu i euklidskoj udaljenosti

Sadržaj askorbinske kiseline, sa najvišim sadržajem za uzorak svežeg kupusa (tabela 7.1, u Prilogu), opada u toku fermentacije, kao što se vidi sa slike 4.9. Anaerobna degradacija askorbinske kiseline je ubrzana u prisustvu saharoze i fruktoze. Ove reakcije su uglavnom nezavisne od pH, ali je njihovo odvijanje u blagom porastu ako je opseg vrednosti između pH 3 i pH 4 (Bender, 1978), što se postiže oko 6. dana fermentacije kupusa (Červenski, 2010). Dodatno, gubici u askorbinskoj kiselini u toku fermentacije kupusa mogu biti povezani sa učešćem askorbinske kiseline u formiranju antioksidativne komponente koja je poznata kao askorbigen (Martinez-Villaluenga i sar., 2012). Sa druge strane, ovo dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti fermentisanog kupusa.

SRD-CRNN analize sadržaja askorbinske kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa grafički su predstavljene na slici 4.10. Uzorci su grupisani na osnovu razlika u odnosu na referentni uzorak V1 (6 %, 0 g/kg, 22 °C).



Slika 4.10. SRD-CRNN analiza za vrednosti sadržaja askorbinske kiseline kod uzoraka fermentisanog kupusa, ogled iz 2015. godine

Treća grupa uzoraka uključuje uzorke V2, V8 i V9 i ona je najmanje slična sa referentnim uzorkom (slika 4.10). Sva tri uzorka su dobijena pri različitim temperaturama fermentacije u poređenju sa referentnim uzorkom. Tako, u ovom slučaju, temperatura je najvažnija promenljiva koja uzrokuje najveće promene u sadržaju askorbinske kiseline kod fermentisanih uzoraka kupusa u glavicama.

4.2.9. Sadržaj organskih kiselina u toku fermentacije kupusa

Sadržaj organskih kiselina – mravlje, mlečne, sirćetne i ćilibarne raste u toku fermentacije, za razliku od oksalne kiseline, čiji sadržaj opada unutar glavica kupusa (Cvetković, 2014). Razgradnja oksalne kiseline je posledica aktivnosti mezofilnih anaerobnih oksalat-razgrađujućih bakterija (Adeleke i sar., 2017; Daniel i sar., 2017). Prisustvo mlečne, sirćetne i drugih organskih kiselina je važan faktor inhibicije rasta patogenih bakterija, kao što su *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Anatum i *Listeria monocytogenes* i bakterija izazivača kvarenja proizvoda (Phungamngoen i sar., 2013; Inatsu i sar., 2017). U ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine ispitivan je uticaj vremena fermentacije na sadržaj oksalne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije, a rezultati su prikazani u tabeli 4.16. Sadržaj mravlje i mlečne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa predstavljen je u tabeli 4.17., dok je sadržaj sirćetne kiseline prikazan u tabeli 4.18., a sadržaj ćilibarne kiseline u tabeli 4.19.

Nakon 12-og dana fermentacije primećen je značajan pad sadržaja oksalne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa u glavicama hibrida bravo. Takođe, iz tabele 4.16. može se videti da uzorci koji su fermentisani bez dodavanja starter kulture imaju značajno niži sadržaj oksalne kiseline (1,29-1,97 g/100 g sm) u poređenju sa uzorcima kojima je dodata starter kultura u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa (2,02-5,19 g/100 g sm) i 0,050 g/kg svežeg kupusa (2,67-7,37 g/100 g sm) poslednjeg ispitivanog dana. Sadržaj oksalne kiseline se statistički značajno razlikovao među svim uzorcima fermentisanog kupusa u toku vremena fermentacije ($p < 0,05$) izuzev kod uzorka V9, kod koga se sadržaj oksalne kiseline nije statistički značajno razlikovao od 27-og do 62-og dana i uzorka V11, kod koga se sadržaj oksalne kiseline nije značajno razlikovao između 5-og i 12-og dana fermentacije.

Mravlja kiselina nije detektovana ni u jednom uzorku nakon 5 dana fermentacije (tabela 4.17). Isti rezultat je dobijen u istraživanju Park i Cheigh (2004), gde sadržaj mravlje kiseline nije detektovan nakon 7 dana fermentacije kod uzoraka kupusa fermentisanih pri temperaturnom intervalu 12-16 °C. Najniži sadržaj mravlje kiseline 12-og dana fermentacije posedovali su uzorci fermentisani procesom spontane fermentacije. Uzrak V2 imao je najmanju detektovanu količinu mravlje kiseline, a i statistički se značajno razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka kupusa 12-og dana. Sadržaj mravlje kiseline raste u toku fermentacije sve do 27 dana, nakon

čega blago opada do 62 dana, za većinu ispitivanih uzoraka. Izuzeci su primećeni uglavnom kod uzoraka fermentisanih uz dodatak starter kulture u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa.

Tabela 4.16. Promena sadržaja oksalne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak (uslovi)/ dani	oksalna kiselina [g/100 g sm]			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	8,03 ± 0,01 ^{h,A}	7,32 ± 0,01 ^{i,B}	3,46 ± 0,07 ^{h,C}	1,29 ± 0,07 ^{i,D}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	10,71 ± 0,09 ^{e,A}	10,15 ± 0,04 ^{e,B}	2,42 ± 0,09 ^{i,C}	1,75 ± 0,05 ^{h,D}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	9,19 ± 0,09 ^{g,A}	8,76 ± 0,10 ^{g,B}	5,39 ± 0,06 ^{d,C}	1,97 ± 0,06 ^{h,D}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	9,39 ± 0,03 ^{g,A}	8,14 ± 0,10 ^{h,B}	2,63 ± 0,10 ^{i,C}	1,66 ± 0,08 ^{h,D}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	10,49 ± 0,10 ^{e,B}	11,81 ± 0,11 ^{b,A}	4,92 ± 0,01 ^{e,D}	5,19 ± 0,03 ^{c,C}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	11,61 ± 0,14 ^{d,A}	9,56 ± 0,11 ^{f,B}	0,41 ± 0,09 ^{k,D}	3,13 ± 0,11 ^{e,C}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	11,93 ± 0,11 ^{c,A}	10,40 ± 0,11 ^{d,B}	5,94 ± 0,06 ^{e,D}	7,50 ± 0,05 ^{a,C}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	10,63 ± 0,06 ^{e,A}	5,67 ± 0,06 ^{k,B}	3,90 ± 0,03 ^{g,C}	2,02 ± 0,09 ^{g,D}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	11,39 ± 0,10 ^{d,A}	6,76 ± 0,02 ^{i,B}	3,92 ± 0,10 ^{g,C}	3,98 ± 0,10 ^{d,C}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	9,79 ± 0,10 ^{f,B}	10,80 ± 0,03 ^{c,A}	5,06 ± 0,02 ^{e,C}	4,17 ± 0,07 ^{d,D}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	13,43 ± 0,13 ^{b,A}	13,39 ± 0,10 ^{a,A}	7,98 ± 0,08 ^{a,B}	6,45 ± 0,07 ^{b,C}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	14,32 ± 0,02 ^{a,A}	8,66 ± 0,11 ^{g,B}	6,31 ± 0,08 ^{b,D}	7,37 ± 0,10 ^{a,C}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	11,59 ± 0,07 ^{d,A}	10,36 ± 0,10 ^{de,B}	4,53 ± 0,07 ^{f,C}	2,67 ± 0,01 ^{f,D}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a-k – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

Sadržaj mlečne kiseline se postepeno povećava tokom fermentacije (tabela 4.17), uglavnom zahvaljujući aktivnosti *Lactobacillus plantarum*. Ova bakterija je dominantna u kasnijim fazama fermentacije povrća, zahvaljujući svojoj visokoj toleranciji prema kiseloj sredini (Daeschel i Fleming, 1984). Najviši sadržaj mlečne kiseline u poređenju sa ostalim ispitivanim organskim kiselinama na kraju procesa fermentacije posledica je homofermentativne prirode bakterija mlečne kiseline i ujedno primenjene starter kulture (Gardner i sar., 2001). Takođe, bakterijski sojevi igraju značajnu ulogu u proizvodnji mlečne kiseline u toku procesa fermentacije (Oonkhanond i sar., 2017). Sadržaj mlečne kiseline u mešavini soka od kupusa i šargarepe, pod uticajem *Lactobacillus plantarum* (189/86) bio je 12,43 g/l, dok je pod uticajem

Lactobacillus plantarum (190/86) bio 7,23 g/l nakon 232 h fermentacije (Karovičová i sar., 1994). Najmanje mlečne kiseline 5-og dana fermentacije imali su uzorci V4 i V6 i statistički su se značajno razlikovali ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa. Uzorak V13 posedovao je najviše mlečne kiseline 5-og dana i značajno se statistički razlikovao od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Primećeno je da su se 12-og dana fermentacije svi uzorci međusobno statistički razlikovali ($p < 0,05$), izuzev parova uzoraka koji su ujedno sadržali i najveće količine mlečne kiseline – V1 i V8, V9 i V11, kao i V4 i V10 (tabela 4.17). 27-og dana fermentacije statistički su se značajno razlikovali svi uzorci fermentisanog kupusa, izuzev uzorka V5 i V6, koji se nisu međusobno razlikovali u pogledu sadržaja mlečne kiseline. Uzorci V5 i V6 fermentisani su na istim temperaturama fermentacije (18 °C) i uz dodatak jednake količine starter kulture u iznosu od 0,025 g/kg svežeg kupusa. Takođe, uzorak V12 nije se statistički značajno razlikovao od uzorka V7, kao ni od uzorka V10, 27-og dana fermentacije. Najmanje mlečne kiseline imao je uzorak V13 poslednjeg ispitivanog dana i statistički se značajno razlikovao od ostalih uzoraka ($p < 0,05$), dok su najviše mlečne kiseline imali uzorci V3 i V12 i razlikovali se značajno od ostalih uzoraka kupusa ($p < 0,05$). Uzorci V3 i V12 posedovali su najveću količinu mlečne kiseline u toku celokupnog procesa fermentacije. Oba uzorka, V3 i V12, fermentisana su pri istoj količini NaCl u iznosu od 8% i na istoj temperaturi od 22 °C. Ukoliko se posmatra proces fermentacije u toku vremena, može se zaključiti da se sadržaj mlečne kiseline svih uzoraka međusobno statistički značajno razlikuje ($p < 0,05$) (tabela 4.17).

Tabela 4.17. Promena sadržaja mravlje i mlečne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Dani	5	12	27	62	5	12	27	62
komponenta	mravlja kiselina				mlečna kiselina			
	sadržaj [g/100 g sm]							
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	nd*	nd	0,71 ± 0,04 ^{ghi,A}	0,57 ± 0,07 ^{cdi,B}	0,87 ± 0,01 ^{fg,h,D}	7,86 ± 0,00 ^{a,C}	13,05 ± 0,08 ^{e,A}	12,86 ± 0,01 ^{f,B}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	nd	0,49 ± 0,09 ^{d,A}	0,61 ± 0,02 ^{i,A}	0,52 ± 0,04 ^{d,A}	1,20 ± 0,05 ^{b,D}	3,10 ± 0,04 ^{i,C}	8,39 ± 0,05 ^{k,B}	11,76 ± 0,01 ^{g,A}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	nd	nd	0,91 ± 0,04 ^{de,A}	0,96 ± 0,02 ^{a,A}	0,99 ± 0,09 ^{def,D}	4,09 ± 0,05 ^{g,C}	16,47 ± 0,01 ^{a,B}	16,64 ± 0,06 ^{a,A}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	nd	nd	0,76 ± 0,06 ^{fg,h,A}	0,53 ± 0,06 ^{d,B}	0,39 ± 0,04 ^{j,D}	7,06 ± 0,02 ^{c,C}	14,32 ± 0,06 ^{b,A}	10,58 ± 0,10 ^{i,B}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	nd	0,70 ± 0,01 ^{c,B}	0,85 ± 0,02 ^{sf,A}	0,58 ± 0,01 ^{cdi,C}	0,91 ± 0,04 ^{efg,D}	5,25 ± 0,03 ^{e,C}	10,15 ± 0,13 ^{i,B}	14,56 ± 0,03 ^{c,A}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	nd	0,83 ± 0,03 ^{b,A}	0,97 ± 0,02 ^{cd,A}	0,98 ± 0,11 ^{a,A}	0,32 ± 0,05 ^{j,D}	2,76 ± 0,08 ^{j,C}	10,04 ± 0,10 ^{i,B}	14,11 ± 0,06 ^{d,A}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	nd	0,93 ± 0,03 ^{b,A}	0,80 ± 0,06 ^{fg,A}	0,64 ± 0,06 ^{bcd,B}	0,72 ± 0,05 ^{i,D}	4,56 ± 0,05 ^{f,C}	11,11 ± 0,02 ^{h,B}	12,73 ± 0,02 ^{f,A}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	nd	1,22 ± 0,00 ^{a,A}	0,92 ± 0,05 ^{de,B}	0,69 ± 0,05 ^{bc,C}	1,04 ± 0,02 ^{cd,e,D}	7,82 ± 0,02 ^{a,C}	11,88 ± 0,03 ^{f,B}	13,14 ± 0,01 ^{e,A}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	nd	nd	0,67 ± 0,02 ^{hi,A}	0,76 ± 0,06 ^{b,a}	0,82 ± 0,02 ^{ghi,D}	7,49 ± 0,10 ^{b,C}	8,87 ± 0,05 ^{j,B}	11,06 ± 0,05 ^{b,A}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	nd	0,90 ± 0,05 ^{b,A}	0,95 ± 0,01 ^{cde,A}	0,61 ± 0,02 ^{bcd,B}	1,06 ± 0,04 ^{bcd,D}	7,00 ± 0,10 ^{c,C}	11,43 ± 0,12 ^{g,A}	11,04 ± 0,10 ^{h,B}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	nd	1,21 ± 0,05 ^{a,B}	1,60 ± 0,02 ^{a,A}	0,98 ± 0,04 ^{a,C}	0,74 ± 0,02 ^{hi,D}	7,58 ± 0,08 ^{b,C}	12,41 ± 0,10 ^{d,B}	15,89 ± 0,02 ^{b,A}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	nd	nd	1,03 ± 0,02 ^c	nd	1,14 ± 0,04 ^{bc,D}	6,34 ± 0,08 ^{d,C}	11,20 ± 0,12 ^{gh,B}	16,55 ± 0,08 ^{a,A}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	nd	nd	1,29 ± 0,02 ^{b,A}	0,54 ± 0,04 ^{cdi,B}	1,37 ± 0,09 ^{a,D}	3,67 ± 0,04 ^{h,C}	12,14 ± 0,08 ^{e,A}	9,82 ± 0,10 ^{j,B}

* nije detektovano

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a-k – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

Tabela 4.18. Promena sadržaja sirćetne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Uzorak (uslovi)/ dani	sirćetna kiselina [g/100 g sm]			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	3,40 ± 0,02 ^{h,A}	2,30 ± 0,02 ^{ef,B}	1,23 ± 0,02 ^{h,C}	1,34 ± 0,08 ^{de,C}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	4,49 ± 0,02 ^{e,A}	2,46 ± 0,00 ^{e,B}	1,33 ± 0,05 ^{h,C}	0,91 ± 0,01 ^{f,D}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	6,88 ± 0,01 ^{a,A}	4,42 ± 0,05 ^{a,B}	2,84 ± 0,08 ^{a,C}	2,02 ± 0,02 ^{a,D}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	3,97 ± 0,05 ^{g,A}	3,31 ± 0,08 ^{b,B}	2,18 ± 0,06 ^{bc,D}	1,27 ± 0,02 ^{de,C}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	4,20 ± 0,09 ^{f,A}	2,24 ± 0,03 ^{fg,B}	1,55 ± 0,02 ^{g,C}	1,56 ± 0,08 ^{bc,C}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	6,51 ± 0,10 ^{b,A}	4,39 ± 0,12 ^{a,B}	2,27 ± 0,00 ^{b,C}	1,70 ± 0,07 ^{b,D}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	4,75 ± 0,02 ^{d,A}	2,77 ± 0,09 ^{d,B}	1,34 ± 0,01 ^{h,D}	2,01 ± 0,11 ^{a,C}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	5,39 ± 0,08 ^{c,A}	2,97 ± 0,08 ^{c,B}	2,03 ± 0,08 ^{de,C}	1,74 ± 0,11 ^{b,D}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	4,72 ± 0,09 ^{d,A}	2,26 ± 0,01 ^{fg,B}	1,57 ± 0,02 ^{g,C}	1,39 ± 0,07 ^{cde,D}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	3,95 ± 0,04 ^{g,A}	1,17 ± 0,07 ^{i,C}	1,62 ± 0,02 ^{fg,B}	1,24 ± 0,08 ^{e,C}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	3,96 ± 0,01 ^{g,A}	0,77 ± 0,02 ^{j,D}	1,74 ± 0,00 ^{f,B}	1,44 ± 0,07 ^{cd,C}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	4,02 ± 0,01 ^{g,A}	1,91 ± 0,06 ^{h,B}	1,92 ± 0,01 ^{e,B}	1,55 ± 0,02 ^{bc,C}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	4,31 ± 0,09 ^{f,A}	2,08 ± 0,09 ^{gh,B}	2,13 ± 0,08 ^{cd,B}	1,34 ± 0,03 ^{de,C}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a-j – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

Brza proizvodnja i relativno visok sadržaj sirćetne kiseline na samom početku procesa fermentacije delimično je uzrokovan aktivnošću bakterija *Leuconostoc mesenteroides*. Ove bakterije poseduju heterofermentativne karakteristike, koriste glukozu za svoj rast, što dovodi do stvaranja mlečne kiseline, ugljen-dioksida, etanola i sirćetne kiseline u toku fermentacije (Ray i Bhunia, 2014). Navedene karakteristike su poželjne u fermentisanom kupusu, jer pozitivno utiču na ukus proizvoda (Daeschel i Fleming, 1984). Sadržaj sirćetne kiseline 5-og dana fermentacije bio je u opsegu 1700 mg/l – 3066,5 mg/l za sve ispitivane uzorke, što je vrlo slično rezultatu od 3200 mg/l za kupus nakon 4 dana u reaktoru za ispiranje, prema Li i sar. (2017). Niži sadržaj sirćetne kiseline nakon 62 dana ukazuje na efikasnost u redukovanju proizvodnje sirćetne kiseline posredstvom homofermentativnih bakterija u poslednjem stadijumu fermentacije, tabela 4.18. Najniži sadržaj sirćetne kiseline poslednjeg dana fermentacije bio je u uzorku V2 i značajno se statistički razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka. Sadržaj sirćetne kiseline u uzorku

V2 se značajno razlikovao u toku dana fermentacije ($p < 0,05$). Najviši sadržaj sirćetne kiseline 62-og dana bio je u uzorcima V3 i V7, ovi uzorci su se značajno razlikovali od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Takođe, sadržaj sirćetne kiseline u uzorcima V3 i V7 razlikovao se značajno u toku celokupnog vremena fermentacije ($p < 0,05$), kao što se može primetiti iz tabele 4.18.

Ćilibarna kiselina može biti detektovana u maloj količini u uzorcima fermentisanog kupusa, jer se sintetiše u prvoj, heterofermentativnoj fazi fermentacije (Cvetković, 2014). Dobijeni rezultati imaju vrednosti od 0,42 g/100 g sm do 1,94 g/100 g sm poslednjeg ispitivanog dana fermentacije (tabela 4.19). Najmanje ćilibarne kiseline 5-og dana fermentacije bilo je u uzorku V4, koji se statistički značajno razlikovao od ostalih uzoraka ($p < 0,05$). Najviše ćilibarne kiseline 5-og dana posedovali su uzorci V3 i V5 i statistički su se značajno razlikovali, kako između sebe tako i od svih drugih uzoraka fermentisanog kupusa ($p < 0,05$). Kao u slučaju uzoraka V3 i V5, isto je primećeno za uzorke V3 i V12 27-og dana fermentacije, dok je najniži sadržaj ćilibarne kiseline bio u uzorcima V6 i V8 i značajno se razlikovao ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa u glavicama. Poslednjeg ispitivanog dana fermentacije najviše ćilibarne kiseline bilo je u uzorcima V8 i V10 i ovi uzorci su se statistički značajno razlikovali ($p < 0,05$) od ostalih uzoraka fermentisanog kupusa. Najniži sadržaj ćilibarne kiseline zabeležen je u uzorku V13 poslednjeg ispitivanog dana i ovaj uzorak statistički se značajno razlikovao ($p < 0,05$) od svih ostalih uzoraka u pogledu sadržaja ćilibarne kiseline, kao što se može videti iz tabele 4.19.

Tabela 4.19. Promena sadržaja ćilibarne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. Godine

Uzorak (uslovi)/ dani	ćilibarna kiselina [g/100 g sm]			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	1,61 ± 0,00 ^{c,A}	0,40 ± 0,02 ^{hi,C}	nd*	0,80 ± 0,01 ^{fg,B}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	1,58 ± 0,02 ^{c,A}	1,00 ± 0,02 ^{c,B}	0,91 ± 0,09 ^{ef,BC}	0,78 ± 0,09 ^{fg,C}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	2,45 ± 0,02 ^{a,A}	1,17 ± 0,00 ^{ab,C}	2,00 ± 0,11 ^{b,B}	0,99 ± 0,05 ^{de,D}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	0,88 ± 0,04 ^{h,C}	0,80 ± 0,05 ^{de,C}	1,26 ± 0,03 ^{c,A}	1,13 ± 0,03 ^{cd,B}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	2,08 ± 0,06 ^{b,A}	0,71 ± 0,04 ^{ef,BC}	0,88 ± 0,11 ^{f,B}	0,62 ± 0,05 ^{g,C}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	1,28 ± 0,02 ^{ef,A}	0,50 ± 0,04 ^{gh,C}	0,45 ± 0,08 ^{g,C}	0,85 ± 0,03 ^{ef,B}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	1,30 ± 0,02 ^{ef,A}	1,15 ± 0,02 ^{b,B}	0,91 ± 0,07 ^{ef,C}	0,88 ± 0,05 ^{ef,C}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	1,42 ± 0,03 ^{de,B}	0,46 ± 0,06 ^{hi,D}	0,62 ± 0,00 ^{g,C}	1,76 ± 0,03 ^{a,A}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	1,50 ± 0,03 ^{cd,A}	0,58 ± 0,07 ^{d,C}	1,00 ± 0,08 ^{def,C}	1,22 ± 0,05 ^{c,B}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	1,19 ± 0,06 ^{fg,B}	0,59 ± 0,08 ^{fg,C}	nd	1,94 ± 0,05 ^{a,A}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	1,11 ± 0,03 ^{g,B}	0,48 ± 0,00 ^{ghi,C}	1,08 ± 0,02 ^{cde,B}	1,29 ± 0,11 ^{bc,A}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	1,20 ± 0,12 ^{fg,C}	0,36 ± 0,01 ^{i,D}	2,75 ± 0,05 ^{a,A}	1,46 ± 0,09 ^{b,B}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	1,29 ± 0,09 ^{ef,A}	1,28 ± 0,05 ^{a,A}	1,15 ± 0,05 ^{cd,A}	0,42 ± 0,09 ^{h,B}

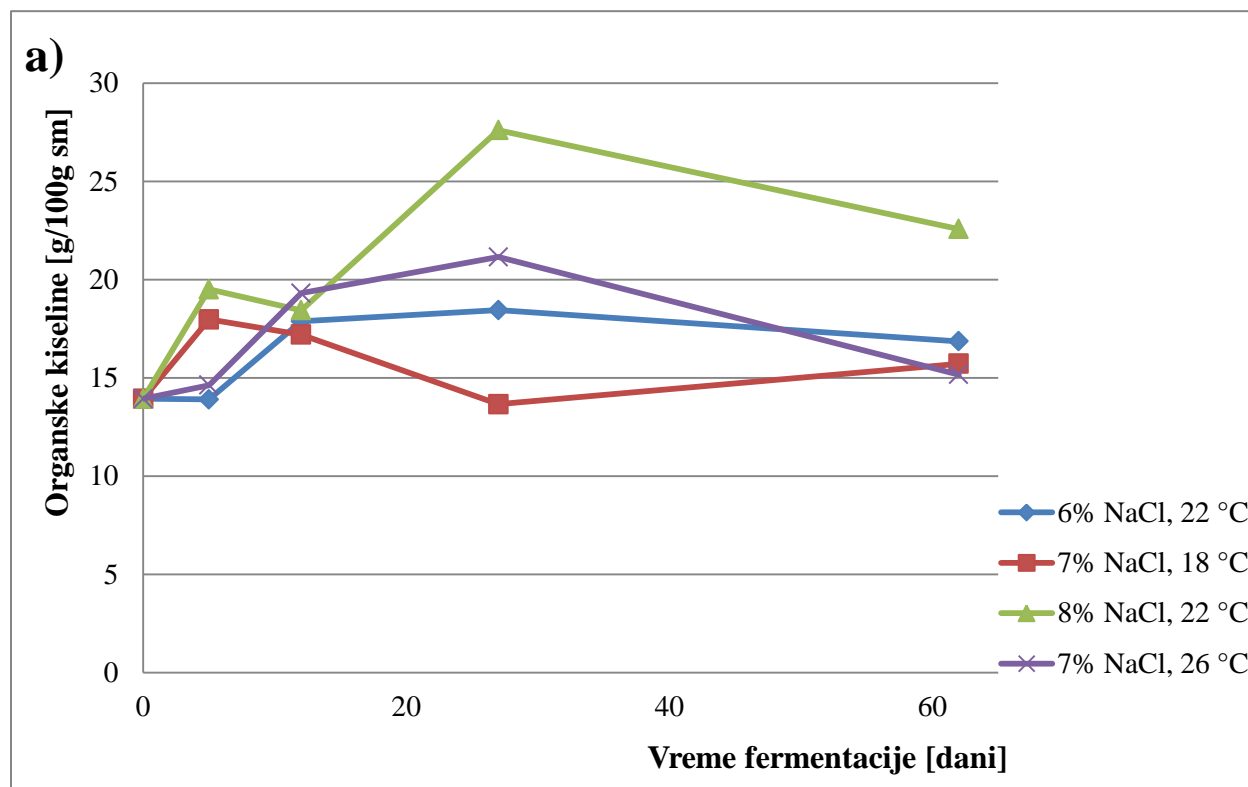
* nije detektovano

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

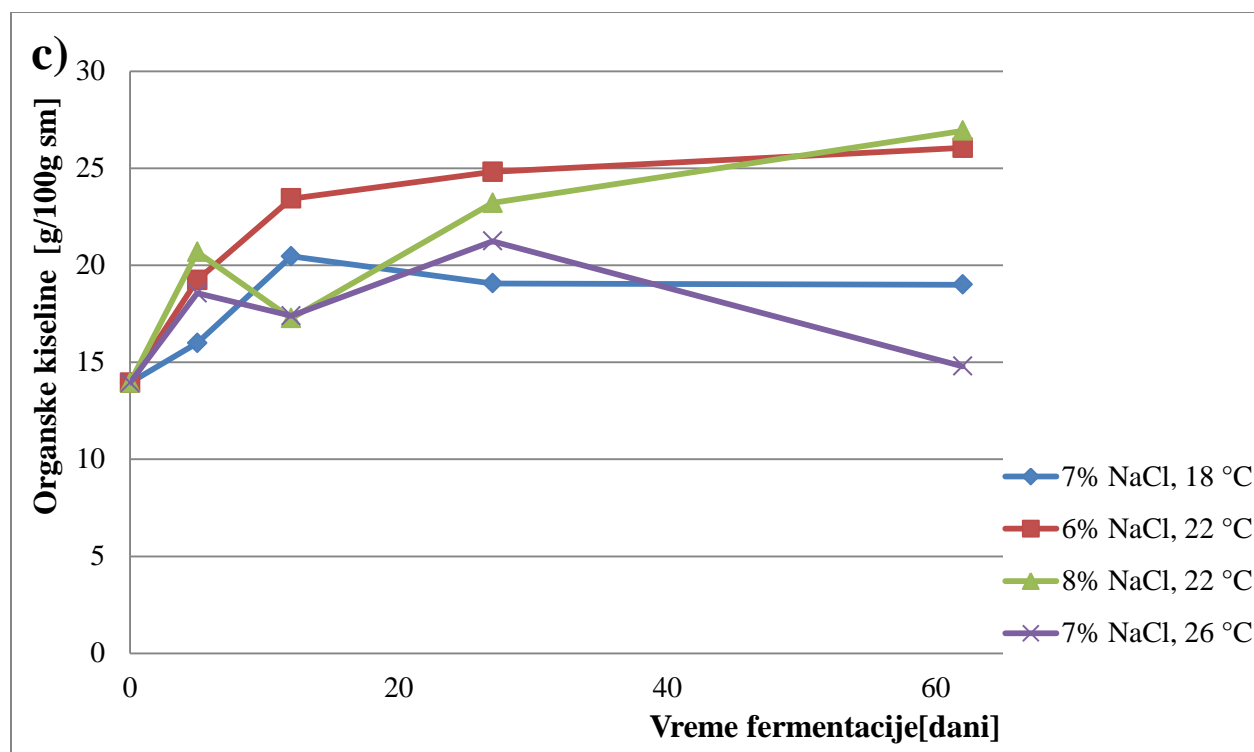
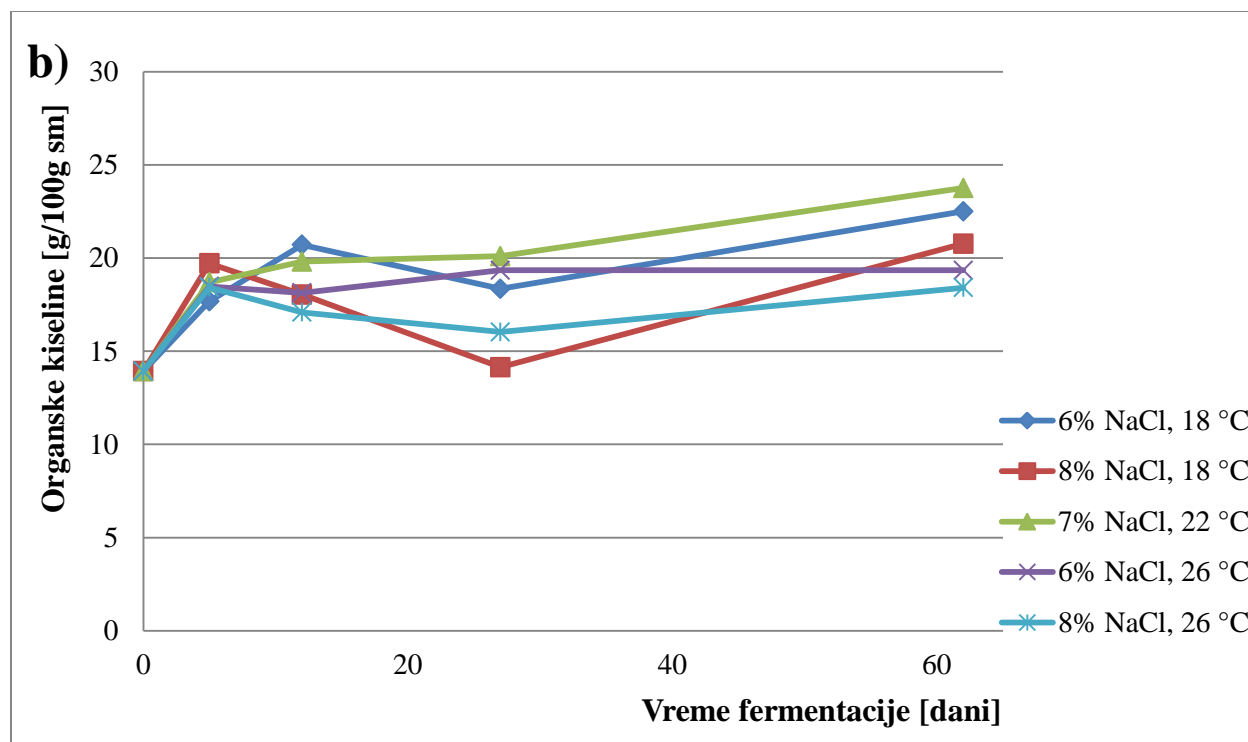
Mala slova a-i – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B, C i D – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

Sadržaj ukupnih organskih kiselina grafički je predstavljen na slici 4.11. Grafici pokazuju zavisnost sadržaja ukupnih kiselina u odnosu na vreme fermentacije pri različitim uslovima fermentacije. Sadržaj ukupnih organskih kiselina za spontani proces fermentacije predstavljen je na slici 4.11 a, sadržaj ukupnih organskih kiselina pri dodatku starter kulture 0,025 g/kg svežeg kupusa prikazan je na slici 4.11 b, a i sadržaj ukupnih organskih kiselina pri dodatku starter kulture 0,050 g/kg svežeg kupusa prikazan je na slici 4.11 c.



Slika 4.11. Promene sadržaja ukupnih organskih kiselina u toku fermentacije: a) bez dodatka starter kulture, b) sa dodatkom starter kulture 0,025 g/kg svežeg kupusa, i c) sa dodatkom starter kulture 0,050 g/kg svežeg kupusa



Slika 4.11. Promene sadržaja ukupnih organskih kiselina u toku fermentacije: a) bez dodatka starter kulture, b) sa dodatkom starter kulture 0,025 g/kg svežeg kupusa, i c) sa dodatkom starter kulture 0,050 g/kg svežeg kupusa

Najviši sadržaj organskih kiselina nakon 5 dana fermentacije bio je u uzorku V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) i iznosio je 20,68 g/100 g sm, nakon 12 dana u uzorku V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C) 23,43 g/100 g sm, nakon 27 dana u uzorku V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C) 27,61 g/100 g sm i nakon 62 dana u uzorku V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) 26,93 g/100 g sm, slika 4.11. Blagi porast u toku fermentacije i najveća uniformnost rezultata u sadržaju ukupnih organskih kiselina je kod uzoraka kojima je dodata starter kultura u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa (slika 4.11 b). U opštem slučaju, dodatak starter kulture povećan je sadržaj ukupnih organskih kiselina u toku procesa fermentacije, kako se može zaključiti poređenjem grafika slike 4.11. Može se primetiti da je najveći sadržaj ukupnih organskih kiselina poslednjeg ispitivanog dana bio kod uzoraka fermentisanog kupusa V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C), sa vrednostima 26,05 g/100 g sm i 26,93 g/100 g sm, redom.

U ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine ispitivan je sadržaj organskih kiselina u uzorcima svežeg i fermentisanog kupusa u glavicama hibrida bravo i rasolima nakon 40 dana fermentacije pri dodatku 6% NaCl na različitim temperaturnim intervalima, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.20. Ćilibarna kiselina je detektovana u uzorcima (sa izuzetkom uzorka svežeg kupusa), ali kvantifikacija nije bila moguća.

Sadržaj oksalne kiseline opao je u toku fermentacije kao što je to bio slučaj i u ogledu izvedenom iz fermentacije kupusa 2015. godine. Može se primetiti da sa porastom temperaturnog intervala pri kom se odvijao proces fermentacije ima manje oksalne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa i svi uzorci statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$; tabela 4.20). U toku procesa fermentacije usled promene pH sredine i koncentracije kiseonika u posudama za fermentaciju dolazi do formiranja drugih organskih kiselina – mlečne, sirćetne, mravlje i ćilibarne (Farnworth, 2008) kao što je bio slučaj i u ovom istraživanju. Ćilibarna kiselina je detektovana u uzorcima fermentisanog kupusa u glavicama, ali kvantifikacija nije bila moguća, kao što je ranije napomenuto.

Tabela 4.20. Sadržaj organskih kiselina u svežem i fermentisanom kupusu (K) i rasolu (R) nakon 40 dana fermentacije uz dodatak 6% soli pri različitim temperaturnim uslovima, ogled iz 2016. godine

Uzorak (uslovi)	oksalna kiselina	mlečna kiselina	sirćetna kiselina	mravlja kiselina
	[g/100 g sm]			
K0 (svež)	4,72 ± 0,15 ^a	nd*	nd	nd
K1 (16-18 °C)	4,20 ± 0,10 ^b	3,07 ± 0,06 ^c	4,13 ± 0,10 ^a	nd
K2 (18-20 °C)	3,08 ± 0,06 ^c	4,58 ± 0,10 ^b	2,34 ± 0,15 ^b	nd
K3 (20-22 °C)	1,12 ± 0,06 ^d	5,20 ± 0,10 ^a	1,77 ± 0,06 ^c	1,33 ± 0,06
	[mg/ml]			
R1 (16-18 °C)	1,16 ± 0,03 ^a	2,53 ± 0,02 ^a	0,86 ± 0,01 ^b	nd
R2 (18-20 °C)	0,46 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,00 ^c	0,31 ± 0,00 ^c	nd
R3 (20-22 °C)	0,39 ± 0,01 ^c	0,39 ± 0,01 ^b	1,01 ± 0,05 ^a	0,69 ± 0,01

* nije detektovano

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Biotransformacijom šećera, o čemu je ranije bilo više reči, dolazi do formiranja prvenstveno mlečne kiseline koja kupusu daje prepoznatljiv oštar ukus, a pored mlečne kiseline nastaju i jedinjenja kao što su sirćetna kiselina, etanol i ugljen-dioksid (Sinha, 2011). Sa porastom temperatura fermentacije došlo je do povećanja sadržaja mlečne kiseline u uzorcima fermentisanog kupusa u ovom ogledu, kao što se može videti iz tabele 4.20. Uzorci K1, K2 i K3 značajno su se razlikovali ($p < 0,05$), te se može zaključiti da različiti uslovi fermentacije značajno utiču na sadržaj mlečne kiseline u fermentisanom kupusu.

Sirćetna i mravlja kiselina ispoljavaju jače inhibitorne karakteristike prema nepoželjnim mikroorganizmima u poređenju sa mlečnom kiselinom, te se usled njihovog prisustva u toku fermentacije pojačava zaštitni efekat prema poželjnim bakterijama mlečne kiseline (Marth i Steele, 2001). Sadržaj sirćetne kiseline bio je viši pri nižim temperaturama fermentacije, dok je mravlja kiselina kvantifikovana jedino u uzorku K3, gde je temperaturni interval bio najviši (tabela 4.20). Uzorci K1, K2 i K3 značajno su se statistički razlikovali ($p < 0,05$), što ukazuje na to da različiti uslovi pri kojima se odvijala fermentacija, kao što je to bio slučaj kod oksalne i mlečne kiseline, značajno utiču na sadržaj sirćetne kiseline.

Sadržaj oksalne kiseline u uzorcima rasola opada sa porastom temperature fermentacije, kao i u slučaju uzoraka fermentisanog kupusa. Najviše mlečne kiseline imao je rasol R1 (16-18

°C), a sirćetne R3 (20-22 °C), što je suprotno u poređenju sa uzorcima fermentisanog kupusa K1 i K3. Mravlja kiselina je kvantifikovana jedino u uzorku rasola dobijenom pri najvišem temperaturnom intervalu, kao što je to bio slučaj i kod uzorka fermentisanog kupusa u glavicama. Uzorci rasola, kao i uzorci kupusa, značajno se statistički razlikuju u pogledu sadržaja oksalne, mlečne i sirćetne kiseline ($p < 0,05$; tabela 4.20).

4.2.10. Uticaj fermentacije na teksturalne karakteristike listova kupusa

Tekstura fermentisanog kupusa je nešto čvršća u poređenju sa svežim kupusom, s obzirom da dodatak NaCl pozitivno utiče na čvrstoću listova. Međutim, u toku procesa fermentacije može da dođe do omekšavanja tkiva usled delovanja mikroorganizama i njihovih enzima. Kvasci proizvode pektolitičke enzime koji mogu dovesti do omekšavanja tkiva kupusa (Hui i Evranuz, 2016), kao i bakterije iz rodova *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, ukoliko je temperatura fermentacije niža od 10 °C i sadržaj dodatog NaCl niži od 2% (Hutkins, 2006). Prodorna sila koja predstavlja meru čvrstine listova kod uzoraka fermentisanog kupusa u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine bila je u granicama od 253,4 g do 626,2 g poslednjeg ispitivanog dana (tabela 4.21). Primećeno je da nije došlo do značajnog omekšavanja tkiva kod uzoraka fermentisanog kupusa u poređenju sa svežim kupusom, gde je prodorna sila iznosila 318,1 g (tabela 7.1, u Prilogu).

Najveća razlika u pogledu prodorne sile 5-og dana fermentacije primećena je između uzorka V3, kod koga je tekstura tkiva kupusa bila veoma čvrsta i uzorka V1 koji je imao najmekšu teksturu. Oba uzorka fermentisana su procesom spontane fermentacije pri istoj temperaturi. Veća čvrstoća lista kod uzorka V3 može se objasniti većim sadržajem NaCl koji je utrošen za fermentaciju (8%) u odnosu na sadržaj NaCl (6%) koji je utrošen za fermentaciju uzorka V1 (tabela 4.21). 12-og dana fermentacije najveća razlika primećena je između uzoraka V6 i V11, kod kojih je prodorna sila bila najveća, u poređenju sa uzorcima V10 i V12, kod kojih su zabeležene najniže vrednosti prodorne sile. 27-og dana fermentacije uzorak kupusa V3 razlikovao se značajno od ostalih uzoraka u pogledu veoma čvrste teksture. Ovaj uzorak fermentisan je pri dodatku naviše količine soli korišćene u ovom ogledu (8%). 62-og dana fermentacije značajne razlike postojale su između uzorka V3 (najčvršća tekstura) i uzoraka V11 i V12 (najmekša tekstura), kako se vidi iz tabele 4.21 ($p < 0,05$).

Tabela 4.21. Prodorna sila fermentisanih listova kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Dani/ uzorak (uslovi)	prodorna sila [g]			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	251,2 ± 59,5 ^{d,A}	321,1 ± 63,8 ^{bc,A}	281,4 ± 64,6 ^{b,A}	410,1 ± 252,1 ^{bc,A}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	527,3 ± 150,0 ^{bcd,A}	306,1 ± 87,8 ^{bc,B}	259,5 ± 51,7 ^{b,B}	302,1 ± 88,7 ^{cd,B}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	890,7 ± 458,0 ^{a,A}	309,3 ± 64,2 ^{bc,B}	757,6 ± 583,2 ^{a,AB}	626,2 ± 146,2 ^{a,AB}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	607,0 ± 220,3 ^{abc,A}	329,4 ± 57,2 ^{bc,B}	419,4 ± 74,3 ^{b,B}	304,7 ± 68,5 ^{cd,B}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	345,6 ± 130,1 ^{bcd,A}	408,6 ± 52,3 ^{ab,A}	376,5 ± 43,5 ^{b,A}	310,2 ± 74,9 ^{cd,A}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	635,2 ± 247,0 ^{ab,A}	478,4 ± 63,7 ^{a,A}	478,0 ± 67,0 ^{b,A}	480,2 ± 75,5 ^{ab,A}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	513,2 ± 111,7 ^{bcd,A}	303,4 ± 120,8 ^{bc,C}	454,1 ± 67,8 ^{b,AB}	382,1 ± 57,7 ^{bcd,BC}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	537,8 ± 203,6 ^{bcd,A}	361,7 ± 54,2 ^{abc,B}	323,4 ± 68,6 ^{b,B}	372,8 ± 43,7 ^{bcd,B}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	526,1 ± 141,9 ^{bcd,A}	420,5 ± 110,5 ^{ab,AB}	386,1 ± 93,6 ^{b,B}	295,2 ± 52,4 ^{cd,B}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	411,2 ± 110,0 ^{bcd,A}	273,3 ± 98,7 ^{c,B}	427,5 ± 70,2 ^{b,A}	285,0 ± 44,6 ^{cd,B}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	456,1 ± 75,3 ^{bcd,A}	460,1 ± 105,1 ^{a,A}	382,1 ± 54,1 ^{b,A}	254,8 ± 46,0 ^{d,B}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	325,2 ± 172,8 ^{cd,A}	284,0 ± 58,9 ^{c,A}	271,9 ± 42,7 ^{b,A}	253,4 ± 93,3 ^{d,A}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	333,4 ± 111,8 ^{cd,A}	328,7 ± 74,1 ^{bc,A}	350,1 ± 68,6 ^{b,A}	335,4 ± 80,8 ^{bcd,A}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c i d – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B i C – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

U ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine prodorna sila lista svežeg kupusa iznosila je 314,5 g, dok su prodorne sile fermentisanih uzoraka K1 (16-18 °C), K2 (18-20 °C) i K3 (20-22 °C) iznosile redom 370,0 g, 418,0 g i 307,2 g. Uzorci su, pored navedenih različitih temperaturnih intervala, fermentisani pri jednakoj količini NaCl (6%) i jednakom vremenskom periodu u trajanju od 40 dana. Posmatrajući izmerene vrednosti prodorne sile može se primetiti da različiti temperaturni intervali nisu uzrokovali omekšanje tkiva kupusa, kao ni razlike u čvrstoći listova između fermentisanih uzoraka.

U ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine određivana je sila presecanja celih listova uzoraka svežeg kupusa i uzoraka dobijenih pri različitim uslovima fermentacije. Sila presecanja celih listova kupusa u ovom slučaju odabrana je (umesto prodorne sile, u ogledima iz 2015. i 2016. godine) radi boljeg poređenja rezultata merenja, odnosno čvrstoće listova tri različite sorte/hibrida kupusa. Sila presecanja listova svežeg kupusa tenisiti, bravo i futoški bila je redom

9072 g, 9829 g i 6582 g. Rezultati merenja sile presecanja listova fermentisanog kupusa pri različitim uslovima fermentacije predstavljani su u tabeli 4.22.

Značajne promene sile presecanja primećene su kod hibrida tenisiti fermentisanog uz dodatak starter kulture. Sila presecanja kod uzorka T3 rasla je u toku fermentacije od 5303 g do 15307 g. Rezultati merenja pokazuju da je na početku fermentacije došlo do omekšava tkiva kupusa, dok je u toku procesa fermentacije došlo do očvršćavanja listova. Fermentisani proizvod poslednjeg ispitivanog dana imao je značajno čvršću teksturu lista, kao što se može videti iz tabele 4.22.

Sila presecanja listova svežeg kupusa bravo i fermentisanih listova ovog hibrida nije se značajno razlikovala, što je u saglasnosti sa zaključkom izvedenim u prethodnom ogledu za izmerene vrednosti prodorne sile (fermentacija kupusa 2016. godine). Prema tome, vidi se da različiti uslovi fermentacije nisu doveli do značajnih promena u sili presecanja između uzoraka, kao ni do omekšavanja tkiva kupusa hibrida bravo.

Tabela 4.22. Sila presecanja fermentisanih listova kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije: T1, B4, F7 (voda + 3,3% NaCl); T2, B5, F8 (rasol iz prethodne fermentacije); T3, B6, F9 (voda + 3,3% NaCl + starter kultura 0,050 g/kg), ogled iz 2017. godine

Dani/ uzorak	3	6	12	24	44 (55*)
sila presecanja [g]					
T1*	9797 ± 3145 ^{ab,A}	9408 ± 3052 ^{ab,A}	10507 ± 1680 ^{a,A}	8659 ± 3244 ^{a,A}	13187 ± 4718 ^{a,A}
T2	12466 ± 3683 ^{a,A}	4968 ± 944 ^{b,B}	11120 ± 1445 ^{a,A}	10196 ± 2707 ^{a,A}	8778 ± 2861 ^{a,AB}
T3	5303 ± 1805 ^{b,C}	7780 ± 2770 ^{ab,BC}	8042 ± 2528 ^{ab,BC}	12035 ± 2639 ^{a,AB}	15307 ± 5777 ^{a,A}
B4*	4414 ± 1468 ^{b,A}	6160 ± 2574 ^{ab,A}	8955 ± 4055 ^{ab,A}	9100 ± 3030 ^{a,A}	8059 ± 4959 ^{a,A}
B5	11562 ± 3127 ^{a,A}	5660 ± 2173 ^{ab,C}	7978 ± 2432 ^{ab,ABC}	7343 ± 2734 ^{a,BC}	10552 ± 985 ^{a,AB}
B6	9625 ± 3194 ^{ab,A}	4248 ± 1682 ^{b,B}	4571 ± 1197 ^{b,B}	6529 ± 3317 ^{a,AB}	8346 ± 2067 ^{a,AB}
F7*	9141 ± 3766 ^{ab,A}	9341 ± 4543 ^{ab,A}	11794 ± 4734 ^{a,A}	7200 ± 2442 ^{a,A}	10331 ± 2882 ^{a,A}
F8	8085 ± 3382 ^{ab,AB}	10805 ± 3047 ^{a,A}	5077 ± 1556 ^{b,B}	7660 ± 4549 ^{a,AB}	8726 ± 3636 ^{a,AB}
F9	5397 ± 2501 ^{b,B}	5771 ± 2964 ^{ab,B}	8011 ± 2264 ^{ab,B}	7536 ± 1.899 ^{a,B}	14672 ± 4584 ^{a,A}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c i d – razlike između uzoraka (T1-F9)

Velika slova A, B i C – razlike između dana (3, 6, 12, 24 i poslednji dan fermentacije)

Značajne promene u sili presecanja dogodile su se kod svih uzoraka fermentisanog kupusa sorte futoški u poređenju sa svežim uzorkom. Naime, došlo je do značajnog očvršćavanja tkiva u poslednjoj fazi fermentacije. Najveće promene su zabeležene kod uzorka F9, gde je sila presecanja iznosila 14672 g na kraju fermentacije, u poređenju sa uzorkom svežeg kupusa, kod koga je sila presecanja bila 6582 g.

Najveće razlike u sili presecanja, ukoliko se posmatra treći dan fermentacije, zabeležene su između uzoraka T2 i B5, kod kojih je sila presecanja imala najviše vrednosti, i uzoraka T3, B4 i F9, gde je tekstura bila najmekša. Može se primetiti da su oba uzorka, T2 i B5, fermentisana rasolom iz prethodne fermentacije, za razliku od uzoraka T3, B4 i F9 (tabela 4.22). 6-og dana fermentacije najveće razlike zabeležene su između uzorka F8, gde je sila presecanja bila najveća, i uzoraka T2 i B6, gde su izmerene najniže vrednosti. Nasuprot tome, 12-og dana fermentacije uzorci T1, T2 i F7 imali su najčvršću teksturu, dok su uzorci B6 i F8 imali najmekšu teksturu. 24-og i poslednjeg dana fermentacije značajne razlike u sili presecanja između uzoraka nisu primećene ($p < 0,05$) i nije došlo do značajnog omekšavanja tkiva kupusa. Isti zaključak je izveden u ogleđima iz fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine gde, takođe, nije došlo do značajnog omekšavanja tkiva kupusa na kraju procesa fermentacije.

4.2.11. Ukupna promena boje listova kupusa u toku fermentacije

Uobičajena promena boje (ΔE) u toku fermentacije kupusa je od zelene, za svež kupus, do svetlo-žute ili žuto-krem, za fermentisane uzorke (Peñas i sar., 2010). U toku heterofermentativne faze ukoliko se fermentacija odvija u pravom smeru, bakterije čiji predstavnik je *Ln. mesenteroides* odgovorne su za proizvodnju ugljen-dioksida i nastanak anaerobnih uslova u posudama za fermentaciju kupusa. Anaerobni uslovi obezbeđuju stabilizaciju vitamina C i doprinose očuvanju prirodne boje kupusa (Farnworth, 2008). Međutim, značajne promene u boji mogu nastati usled aktivnosti nepoželjnih aerobnih bakterija i kvasaca. Rast ovih mikroorganizama obično je uzrokovan neravnomernom raspodelom soli u nalivu i ukoliko naliv ne prekriva u potpunosti glavice kupusa u posudama za fermentaciju (Hui i Evranuz, 2016). Rezultati ukupne promene boje fermentisanog kupusa bravo u glavicama u ogleđu iz fermentacije kupusa 2015. godine predstavljeni su u tabeli 4.23. Vrednosti ΔE kreću se u granicama od 10,27 do 12,91 poslednjeg ispitivanog dana fermentacije.

Posmatrajući tabelu 4.23. može se zaključiti da je došlo do promena u boji od svežeg do fermentisanog kupusa u glavicama hibrida bravo, ukoliko se uzme u obzir da $\Delta E < 1$ nije senzorno uočljivo (Filimon i sar., 2011). Međutim, u toku fermentacije kupusa u glavicama, nakon 5, 12 i 62 dana fermentacije nije došlo do značajnih promena u boji između uzoraka fermentisanog kupusa ($p < 0,05$). Najveća razlika u vrednostima za ukupnu promenu boje primećena je kod uzoraka V2 i V5 (najeća promena u boji), i uzorka V3 (najmanja ukupna promena boje), izmerena nakon 27. dana fermentacije.

Tabela 4.23. Ukupna promena boje fermentisanih listova kupusa pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije 2015. godine

Dani/ uzorak (uslovi)	ΔE			
	5	12	27	62
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	7,73 ± 1,37 ^{a,B}	13,46 ± 4,13 ^{a,A}	12,57 ± 2,21 ^{abc,AB}	12,72 ± 2,79 ^{a,AB}
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	10,13 ± 2,89 ^{a,B}	11,50 ± 2,54 ^{a,AB}	14,96 ± 2,63 ^{a,A}	11,95 ± 1,96 ^{a,AB}
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	8,18 ± 0,35 ^{a,AB}	11,81 ± 3,35 ^{a,A}	6,40 ± 3,52 ^{c,B}	11,15 ± 1,66 ^{a,A}
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	6,93 ± 2,03 ^{a,B}	11,02 ± 1,91 ^{a,A}	9,24 ± 0,47 ^{abc,AB}	10,50 ± 3,44 ^{a,AB}
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	10,62 ± 3,30 ^{a,A}	14,93 ± 3,72 ^{a,A}	13,67 ± 3,36 ^{a,A}	11,58 ± 2,14 ^{a,A}
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	8,85 ± 0,70 ^{a,A}	14,02 ± 3,81 ^{a,A}	11,89 ± 3,14 ^{abc,A}	10,77 ± 4,56 ^{a,A}
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	8,56 ± 1,81 ^{a,A}	11,23 ± 3,08 ^{a,A}	11,98 ± 3,17 ^{abc,A}	11,41 ± 2,06 ^{a,A}
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	7,31 ± 2,16 ^{a,B}	11,24 ± 0,45 ^{a,A}	8,63 ± 1,75 ^{abc,AB}	10,45 ± 1,11 ^{a,A}
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	9,75 ± 2,39 ^{a,AB}	8,46 ± 1,51 ^{a,B}	12,77 ± 3,14 ^{abc,A}	10,28 ± 1,88 ^{a,AB}
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	9,84 ± 2,42 ^{a,A}	13,49 ± 2,93 ^{a,A}	11,95 ± 4,37 ^{abc,A}	11,48 ± 1,99 ^{a,A}
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	9,44 ± 3,05 ^{a,A}	11,96 ± 3,59 ^{a,A}	13,49 ± 4,06 ^{ab,A}	12,91 ± 1,47 ^{a,A}
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	6,51 ± 3,50 ^{a,B}	13,22 ± 3,33 ^{a,A}	7,17 ± 2,20 ^{bc,B}	10,27 ± 2,07 ^{a,AB}
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	7,85 ± 0,59 ^{a,A}	10,58 ± 3,23 ^{a,A}	10,69 ± 2,06 ^{abc,A}	11,15 ± 2,58 ^{a,A}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c i d – razlike između uzoraka (V1-V13)

Velika slova A, B i C – razlike između dana (5, 12, 27 i 62)

U ogledu iz fermentacije kupusa 2016. godine ukupna promena boje uzoraka fermentisanih listova kupusa K1 (16-18 °C), K2 (18-20 °C) i K3 (20-22 °C) iznosila je redom 10,68, 10,32 i 12,14. Glavice kupusa su fermentisane uz dodatak 6% NaCl, dok je proces fermentacije trajao 40 dana. Izmerene vrednosti ΔE ne razlikuju se značajno, pa se može

zaključiti da nije došlo do značajnih promena u boji između uzoraka. Najveća promena u boji izmerena je kod uzorka K3, što je na neki način i moglo biti očekivano, s obzirom da je ovaj uzorak fermentisan na najvišem temperaturnom intervalu, u poređenju sa ostalim uzorcima. Izmerene vrednosti ukupne promene boje u ovom ogledu 10,32-12,14 veoma su slične vrednostima iz fermentacije kupusa 2015. godine, gde su vrednosti ΔE poslednjeg dana fermentacije iznosile 10,27-12,91 (tabela 4.23). Prema tome, može se izvesti zaključak da različiti uslovi fermentacije (fermentacija kupusa 2015. i 2016. godine) nisu doveli do većih promena u boji listova kupusa hibrida bravo.

U ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine merene su vrednosti ukupne promene boje fermentisanih uzoraka pri različitim uslovima fermentacije za različite hibride/sortu kupusa, a rezultati su prikazani u tabeli 4.24.

Tabela 4.24. Ukupna promena boje fermentisanih listova kupusa tenisiti, bravo i futoški pri različitim uslovima fermentacije: T1, B4, F7 (voda + 3,3% NaCl); T2, B5, F8 (rasol iz prethodne fermentacije); T3, B6, F9 (voda + 3,3% NaCl + starter kultura 0,050 g/kg), ogled iz 2017. godine

Dani/ uzorak	3	6	12	24	44 (55*)
	ΔE				
T1*	5,60 ± 3,32 ^{bc,AB}	3,98 ± 1,11 ^{c,B}	8,53 ± 2,98 ^{abcd,A}	4,36 ± 1,94 ^{bc,B}	8,90 ± 3,04 ^{a,A}
T2	6,24 ± 4,06 ^{bc,AB}	5,71 ± 2,69 ^{bc,AB}	4,74 ± 2,84 ^{d,AB}	3,81 ± 1,31 ^{c,B}	8,14 ± 2,21 ^{a,A}
T3	6,49 ± 3,50 ^{bc,A}	6,37 ± 2,75 ^{bc,A}	5,46 ± 2,37 ^{cd,A}	4,10 ± 1,79 ^{bc,A}	7,71 ± 2,66 ^{a,A}
B4*	5,44 ± 3,27 ^{bc,AB}	4,64 ± 1,63 ^{bc,AB}	6,54 ± 1,69 ^{bcd,A}	3,30 ± 1,20 ^{c,B}	5,41 ± 1,58 ^{a,AB}
B5	5,51 ± 1,34 ^{bc,A}	8,00 ± 4,49 ^{abc,A}	6,29 ± 2,65 ^{bcd,A}	5,10 ± 2,51 ^{bc,A}	8,65 ± 1,98 ^{a,A}
B6	3,82 ± 2,14 ^{c,B}	5,44 ± 3,62 ^{bc,AB}	9,99 ± 5,29 ^{abc,A}	5,24 ± 3,39 ^{bc,AB}	9,18 ± 2,81 ^{a,AB}
F7*	9,40 ± 2,82 ^{ab,A}	12,84 ± 3,99 ^{a,A}	11,17 ± 1,36 ^{ab,A}	8,59 ± 3,59 ^{b,A}	10,62 ± 1,57 ^{a,A}
F8	5,13 ± 1,66 ^{bc,D}	6,59 ± 2,78 ^{bc,CD}	12,27 ± 2,56 ^{a,AB}	15,11 ± 4,18 ^{a,A}	10,44 ± 2,59 ^{a,BC}
F9	11,90 ± 2,37 ^{a,A}	9,66 ± 3,56 ^{ab,AB}	5,11 ± 2,01 ^{cd,B}	7,95 ± 2,64 ^{bc,AB}	8,46 ± 6,40 ^{a,AB}

Ukoliko ne dele slovo značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Mala slova a, b, c i d – razlike između uzoraka (T1-F9)

Velika slova A, B i C – razlike između dana (3, 6, 12, 24 i poslednji dan fermentacije)

U ovom ogledu (fermentacija kupusa 2017. godine), kod hibrida kupusa primećuje se najmanja promena u boji u toku fermentacije, kao i na kraju procesa fermentacije, s obzirom da su vrednosti ΔE uzoraka kupusa tenisiti i bravo generalno bile niže u poređenju sa kupusom sorte futoški (tabela 4.24).

Najveće razlike u boji trećeg ispitivanog dana primećene su između uzorka B6 (najmanja promena boje) i uzorka F9 (najveća promena boje). Oba uzorka, B6 i F9, fermentisana su pri istim uslovima fermentacije. Jedina razlika između ova dva uzorka zasniva se na hibridu, odnosno sorti kupusa. 6-og dana fermentacije najmanja promena u boji zabeležena je kod uzorka T1, dok se najveća promena boje dogodila kod uzorka F7. Uzorci T1 i F7 fermentisani su pri istim uslovima, dok je razlika, kao i u prethodnom slučaju, bila samo do hibrida, odnosno sorte kupusa. Najmanja promena u boji 12-og dana fermentacije dogodila se kod uzorka T2. Uzorak kupusa T2 fermentisan je rasolom iz prethodne fermentacije, uz dodatak 3,3% NaCl (konačan sadržaj NaCl preostalog u rasolu upotrebljenom za fermentaciju kupusa 2017. godine bio je 2,57%). 24-og dana fermentacije najniže vrednosti ΔE , odnosno najmanje promene boje, zabeležene su kod uzoraka T2 i F8. Uzorak F8, kao i T2, fermentisan je rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije. Poslednjeg ispitivanog dana fermentacije, u pogledu ukupne promene boje, nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka fermentisanog kupusa ($p < 0,05$).

4.2.12. Sadržaj biogenih amina u toku fermentacije kupusa hibrida bravo

Bakterije mlečne kiseline sposobne su za dekarboksilaciju jedne ili više aminokiselina i većina namirnica u kojima se ove bakterije razvijaju mogu sadržati značajne količine putrescina, kadaverina, histamina i tiramina. Shodno tome, u proizvodnji fermentisanog kupusa gde dolazi do smene mikropopulacije, mogu se očekivati biogeni amini, naročito putrescin, koji se često akumulira u rasolu (Santos, 1996). Formiranje biogenih amina u procesu spontane fermentacije usko je povezano sa rastom *Ln. mesenteroides*. Međutim, vrste roda *Pediococcus* takođe su odgovorne za stvaranje biogenih amina. Zabeleženo je da je proizvodnja histamina povezana sa intenzivnim rastom bakterija roda *Pediococcus*. Iako starter kulture koje sadrže *Lb. plantarum* imaju značajnu ulogu u formiranju biogenih amina suzbijajući proces njihovog nastanka, o čemu je bilo reči u poglavlju 2.4.1.5, svežina polaznog materijala, odnosno sirovog kupusa, smatra se glavnim faktorom održavanja koncentracije biogenih amina na niskom nivou (Hui, 2004). Biogeni amini nisu detektovani u sirovim glavicama kupusa (tabela 7.1, u Prilogu). Nakon 5 dana fermentacije putrescin je detektovan samo kod uzorka V5, a nakon 12 dana procesa fermentacije kod uzoraka V1 i V5, prema tabeli 4.25.

Tabela 4.25. Sadržaja biogenih amina u uzorcima fermentisanog kupusa u toku procesa fermentacije pri različitim uslovima (količina NaCl, starter kultura i temperatura) fermentacije kupusa 2015. godine

Biogeni amini [mg/kg]/ uzorak (uslovi)	5		12		27		62
	putrescin	kadaverin	putrescin	kadaverin	putrescin	kadaverin	putrescin
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	nd*	5,75	7,51	8,58	16,01	nd	16,20
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	nd	5,64	nd	8,82	18,84	4,94	14,90
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	nd	9,69	nd	18,41	12,60	nd	16,21
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	nd	6,69	nd	18,06	10,60	nd	15,24
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	6,14	6,05	6,59	10,05	11,30	5,68	13,07
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	nd	6,33	nd	14,91	11,47	11,26	7,88
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	nd	13,36	nd	7,71	5,72	nd	19,55
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	nd	4,83	nd	8,05	8,11	nd	9,40
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	nd	7,63	nd	5,88	5,11	5,19	14,15
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	nd	5,70	nd	12,85	11,05	nd	5,59
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	nd	6,47	nd	8,70	7,19	nd	15,88
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	nd	11,76	nd	8,08	11,22	nd	15,12
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	nd	7,33	nd	12,77	8,28	7,32	17,56

* nije detektovano

Ispitivanja su pokazala da je nakon 27. i 62. dana fermentacije putrescin detektovan u svim uzorcima fermentisanog kupusa. Kadaverin je detektovan kod svih fermentisanih uzoraka 5-og i 12-og dana. Nakon 27 dana kadaverin je detektovan samo kod uzoraka V2, V5, V6, V9 i V13, a samo kod uzorka V2 nakon 62 dana fermentacije (tabela 4.25). Prema tome, može se videti da kadaverin nije detektovan poslednjeg ispitivanog dana kod uzoraka kupusa fermentisanih uz pomoć starter kulture. Maksimalan sadržaj putrescina, poslednjeg ispitivanog dana, bio je 19,55 mg/kg u uzorku V7, dok je maksimalan sadržaj kadaverina iznosio 4,18 mg/kg u uzorku V2 nakon 62 dana fermentacije. Nešto više vrednosti putrescina i kadaverina u toku spontane fermentacije kupusa sorte futoški dobijene su u studiji Cvetković (2014), gde je sadržaj putrescina bio u granicama 20,37-56,87 mg/kg, dok je kadaverin bio u granicama 3,47-25,08 mg/kg.

4.2.13. Mikrobiološki parametri tokom fermentacije kupusa hibrida bravo

Sastav mikropopulacije, pa samim tim i kvalitet fermentisanih glavica kupusa, u mnogome je zavisao od uslova pripreme sirovine, prvenstveno količine dodate soli i temperature spoljašnje sredine. Zajedničkim metaboličkim aktivnostima mikroorganizama, pre svega bakterija mlečne kiseline i kvasaca u toku procesa fermentacije kupusa, dobija se kao rezultat proizvod specifičnog ukusa i mirisa (Đukić i sar., 2015). Mikrobiološki profil [log cfu/g] uzoraka glavica kupusa u toku procesa fermentacije prikazan je u tabeli 4.26.

Tabela 4.26. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka glavica kupusa tokom fermentacije kupusa iz 2015. godine

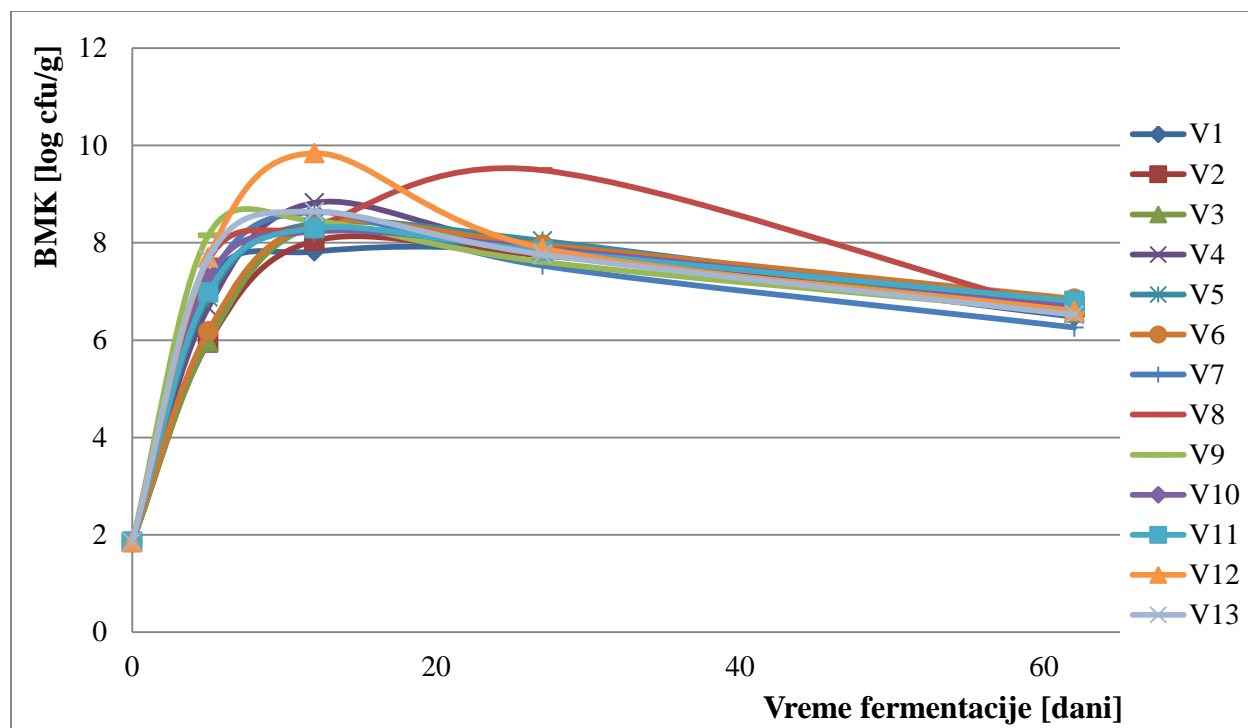
Dani	5	12	27	62	5	12	27	62	5	12	27	62	5	12	27	62
	ukupan broj kvasaca				ukupan broj plesni				<i>Enterobacteriaceae</i>				bakterije mlečne kiseline			
mikroorganizam	[log cfu/g]															
uzorak (uslovi)																
V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C)	6,89	3,62	3,08	2,81	1,78	3,15	3,85	3,38	nd*	nd	nd	nd	7,18	7,82	7,80	6,48
V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C)	3,11	3,45	3,00	2,48	1,85	2,90	3,95	3,36	nd	nd	nd	nd	5,95	8,04	7,74	6,68
V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C)	5,45	3,48	2,60	2,30	2,00	2,78	3,65	3,20	nd	nd	nd	nd	5,97	8,34	7,91	6,56
V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C)	5,38	2,52	3,70	3,00	1,90	2,15	2,70	4,40	nd	nd	nd	nd	6,67	8,82	7,87	6,52
V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C)	5,76	3,11	3,30	5,11	1,48	3,59	3,70	4,23	nd	nd	nd	nd	6,88	8,40	8,04	6,63
V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C)	3,04	4,08	4,83	5,04	1,00	3,18	3,95	2,85	nd	nd	nd	nd	6,18	8,38	7,96	6,85
V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C)	4,77	2,90	4,86	5,11	1,00	2,78	3,00	3,36	nd	nd	nd	nd	7,20	8,63	7,53	6,26
V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C)	5,15	2,78	3,48	2,15	2,00	2,04	3,53	3,95	nd	nd	nd	nd	7,64	8,34	9,49	6,52
V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C)	4,82	1,78	3,59	3,04	1,00	1,70	2,90	3,00	nd	nd	nd	nd	8,15	8,45	7,61	6,56
V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C)	2,97	4,04	3,72	5,08	1,30	4,28	3,51	3,85	nd	nd	nd	nd	7,28	8,23	7,89	6,73
V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C)	3,38	3,53	3,48	3,00	1,30	3,15	4,08	3,20	nd	nd	nd	nd	6,98	8,30	7,83	6,80
V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C)	4,74	2,30	4,49	2,00	2,30	3,45	3,30	3,70	nd	nd	nd	nd	7,70	9,84	7,89	6,60
V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C)	4,93	2,28	4,28	3,04	1,00	2,08	3,95	3,60	nd	nd	nd	nd	7,68	8,64	7,76	6,52

* nije detektovano

Ukupan broj kvasaca poslednjeg ispitivanog dana u uzorcima kojima nije dodavana starter kultura prilikom fermentacije bio je u granicama od 2,30 do 3,00 log cfu/g. Međutim, u uzorcima kojima je dodata starter kultura u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa, broj kvasca poslednjeg dana fermentacije kretao se u rasponu od 2,15 do 5,11 log cfu/g, dok je u uzorcima kojima je dodata starter kultura u iznosu 0,050 g/kg svežeg kupusa broj kvasca poslednjeg dana fermentacije bio 2,00-5,08 log cfu/g. Ipak, ukupan broj kvasca poslednjeg ispitivanog dana bio je manji kod većine uzoraka u poređenju sa svežim kupusom (tabela 4.2). Izuzetak su uzorci V5, V6, V7 i V10, kod kojih je došlo do porasta ukupnog broja kvasaca tokom procesa fermentacije. Sva četiri uzorka dobijena su od glavica kupusa fermentisanih uz dodatak starter kulture, dok su generalno najviše vrednosti dobijene u uzorcima kupusa kojima je dodata starter kultura u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa. Za razliku od vrednosti dobijenih za ukupan broj kvasaca, ukupan broj plesni povećao se u poslednjoj fazi u svim fermentisanim uzorcima (tabela 4.26) u poređenju sa svežim uzorkom (tabela 4.2). Najveći broj plesni poslednjeg dana fermentacije bio je u uzorku V4, gde starter kultura nije dodata, dok je najmanji broj bio u uzorku V6, gde je dodato 0,025 g starter kulture. Najmanji broj plesni, za spontano fermentisane uzorke i za uzorke sa 0,025 g starter kulture, zabeležen je kod uzorka kojima je dodata najveća količina NaCl, što je u skladu sa zapažanjima Viander i sar. (2003) i Cvetković i sar. (2015). Međutim, za uzorke sa dodatkom 0,050 g starter kulture to nije bio slučaj i nije zabeležena značajna razlika ukupnog broja plesni između uzoraka u poslednjoj fazi fermentacije.

Bakterije koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* detektovane su u sirovom kupusu (tabela 4.2), dok nakon 5 dana procesa fermentacije više nisu mogle biti detektovane, kako se vidi iz tabele 4.26. Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju podudaraju se sa rezultatima Wolkers-Rooijackers i sar. (2013), gde su *Enterobacteriaceae* otkrivene 2-og dana, ali nakon 4-og dana fermentacije kupusa nije bilo moguće detektovati ih. Ovo se može objasniti osetljivošću enterobakterija na stres izazvan postepenim povećanjem kiselosti u kombinaciji sa dodatkom soli.

Ukupan broj bakterija mlečne kiseline bio je u porastu sve do 12-og dana procesa fermentacije za sve ispitivane uzorke kupusa u glavicama, kako je predstavljeno grafički na slici 4.12. Nakon 12-og dana fermentacije, broj bakterija mlečne kiseline opada sve do poslednjeg ispitivanog dana.



Slika 4.12. Profil bakterija mlečne kiseline (BMK) u toku procesa fermentacije kupusa u glavicama pri različitim uslovima fermentacije (količina NaCl, starter kultura i temperatura); V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C), V3 (8%, 0 g/kg, 22 °C), V4 (7%, 0 g/kg, 26 °C), V5 (6%, 0,025 g/kg, 18 °C), V6 (8%, 0,025 g/kg, 18 °C), V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), V8 (6%, 0,025 g/kg, 26 °C), V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C), V10 (7%, 0,050 g/kg, 18 °C), V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C), V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C), ogled iz 2015. godine

Uzorak V8 se razlikuje od ostalih fermentisanih uzoraka, jer kod ovog uzorka broj bakterija mlečne kiseline raste do 27. dana fermentacije i zatim opada. Nagli porast ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u početnim fazama fermentacije je posledica anaerobnog okruženja koje je formirano postepeno dejstvom prirodno prisutne aerobne mikropopulacije svežeg kupusa. Međutim, inhibitorski efekat izazvan niskim vrednostima pH (poglavlje 4.2.5, slika 4.1) dovodi do značajnog opadanja ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u poslednjim fazama procesa fermentacije (Xiong i sar. 2012).

4.2.14. Senzorska ocena fermentisanih glavica kupusa

Pored fizičko-hemijskih karakteristika, senzorska ocena predstavlja važan segment analize gotovog proizvoda. Procesi koji se odvijaju u toku konzumacije namirnica – usitnjavanje, mešanje, vlaženje uz pomoć pljuvačke, deformacije i promena u temperaturi registruju se pomoću čula i teško ih je instrumentalno izmeriti. Prema tome, senzorskom analizom namirnica

dobija se kompletna slika teksturalnih karakteristika hrane uz pomoć ljudskih čula (Cvetković, 2014). Senzorska ocena u ogledu iz fermentacije kupusa 2017. godine rađena je u cilju prihvatljivosti gotovog proizvoda fermentisanog kupusa u glavicama hibrida tenisiti i bravo i sorte kupusa futoški, kao i poređenja sorte i hibrida kupusa u smislu senzorske prihvatljivosti. Uzorci kupusa upotrebljeni za senzorsku analizu fermentisani su pri različitim uslovima fermentacije, kao što je predstavljeno u tabeli 4.27. pri jednakim temperaturnim uslovima koji su praćeni u toku fermentacije i prikazani u poglavlju 4.2.1. u tabeli 4.5. Kao što je već nekoliko puta navedeno, dužina fermentacije za uzorke T1, B4 i F7 fermentisane procesom spontane fermentacije iznosila je 55 dana, dok je za ostale uzorke iznosila 44 dana, što je utvrđeno na osnovu fizičko-hemijskih analiza o kojima je do sada diskutovano. Uzorci fermentisanog kupusa u glavicama ocenjeni su od strane šestočlanog tima iskusnih ocenjivača, tako što su ocenjena reprezentativna svojstva kupusa primenom metode bodovanja sa rasponom ocena od 1 do 5, gde broj 1 predstavlja veoma loše, dok broj 5 predstavlja odlično svojstvo. Pre početka ocene od strane tima napravljen je izbor reprezentativnih svojstava fermentisanih glavica kupusa. Izgled, boja, miris, kiselost, slanoca, gorčina, izgled na preseku, elastičnost, ukus i ukupan utisak su izabrana svojstva u cilju evaluacije senzorskog kvaliteta fermentisanih glavica kupusa. Svako svojstvo ocenjeno je od strane svakog od šest ocenjivača iz tima, a srednje vrednosti ocena predstavljene su u tabeli 4.27.

Opšti izgled cele glavice kupusa pokazao se kao najbolji za sortu kupusa futoški generano, sa navišom ocenom za futoški kupus fermentisan uz dodatak starter kulture. Nešto niže ocene za izgled dobili su hibridi kupusa, dok su hibridi fermentisani rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije (takođe rađene u industrijskim uslovima) dobili najlošije ocene za izgled glavice.

Tabela 4.27. Senzorska ocena fermentisanih glavica kupusa sorte/hibrida tenisiti, bravo i futoški dobijenih pri različitim uslovima fermentacije iz 2017. godine

Sorta/hibrid	ocena	tenisiti			bravo			futoški		
		3,3% NaCl rasol ¹	3,3% NaCl + starter ²	T3	3,3% NaCl rasol	3,3% NaCl + starter	B6	3,3% NaCl rasol	3,3% NaCl + starter	F9
svojtvo		T1	T2	T3	B4	B5	B6	F7	F8	F9
izgled	1-5	4,25	3,67	4,08	4,75	4,08	4,25	4,83	4,83	4,92
boja	1-5	3,83	2,42	4,00	4,83	3,50	4,08	4,33	4,42	4,92
miris	1-5	3,67	2,92	3,67	4,33	3,83	2,83	4,75	4,33	4,58
kiselost	1-5	3,67	2,33	3,92	4,58	3,33	4,67	4,50	4,17	4,33
slanoća	1-5	3,83	3,00	3,75	4,08	3,67	4,25	4,17	4,75	3,67
gorčina	1-5	4,08	2,67	4,42	4,83	4,67	4,50	4,50	3,83	4,50
izgled na preseku	1-5	2,25	2,25	2,83	4,00	3,25	3,42	4,67	4,75	4,67
elastičnost	1-5	3,90	2,00	4,80	4,60	4,50	4,80	5,00	5,00	4,80
ukus	1-5	3,92	1,75	3,83	4,33	3,33	4,08	4,00	3,58	3,58
ukupan utisak	1-5	3,58	2,08	3,75	4,67	3,50	4,00	4,17	3,83	4,08

1 – rasol dobijen iz prethodne fermentacije izvršene u industrijskim uslovima uz dodatak 3,3% NaCl sa finalnim sadržajem NaCl 2,57%

2 – starter kultura dodata u količini od 0,050 g/kg svežeg kupusa

Najbolju ocenu za boju cele glavice kupusa dobio je kupus sorte futoški fermentisan uz pomoć starter kulture, kao što je bio slučaj i kod opšteg izgleda fermentisane glavice kupusa, dok su najlošije ocene dobili hibridi fermentisani rasolom iz prethodne fermentacije.

Aromatične materije su, pored bojenih materija, veoma bitni nosioci senzorskih karakteristika voća, povrća i proizvoda od voća i povrća, pa su samim tim veoma značajne za kvalitet, kako svežeg voća i povrća, tako i njihovih prerađevina. Ove materije odgovorne su za miris, a dobrim delom i za ukus vrsta i sorti voća i povrća. Aromatska jedinjenja su u većini slučajeva lako isparljiva i veoma su reaktivna. Isparljiva jedinjenja mogu nastati iz masnih kiselina, amino kiselina, glukozinolata, terpenoida, fenola i srodnih jedinjenja (Tepić Horecki, 2019). Najbolje ocene za miris fermentisane glavice, iznad 4, dobili su kupus sorte futoški generalno i hibrid bravo fermentisan procesom spontane fermentacije. Najlošije ocene za miris generalno odneo je hibrid tenisiti, dok je najlošiju ocenu dobio hibrid bravo fermentisan uz dodatak starter kulture.

Najlošije ocene za ukupnu kiselost dobili su uzorci fermentisani rasolom iz prethodne fermentacije za svaki hibrid/sortu ponaosob. Ukoliko se ovi rezultati povežu sa hemijskom analizom ukupne, odnosno titracione kiselosti, gde su najviše vrednosti, 0,91-1,07%, dobijene upravo za uzorke fermentisane rasolom iz prethodne fermentacije, može se zaključiti da je prihvatljiviji fermentisani proizvod manje kiselog ukusa. Najbolju ocenu za kiselost dobio je kupus hibrida bravo fermentisan uz dodatak starter kulture, a ukupna kiselost (izražena na mlečnu kiselinu) za ovaj uzorak iznosila je 0,67% (poglavlje 4.2.2, tabela 4.8).

Slanoća kupusa bila je najbolja kod sorte kupusa futoški koji je fermentisan rasolom iz prethodne fermentacije, a najlošija kod kupusa hibrida tenisiti, takođe fermentisanog rasolom iz prethodne fermentacije. Hemijskom analizom utvrđeno je da je kupus futoški fermentisan rasolom iz prethodne fermentacije imao 2,22% soli, dok je hibrid tenisiti fermentisan rasolom iz prethodne fermentacije sadržao najmanju količinu soli, 1,48% (poglavlje 4.2.4, tabela 4.14). Na osnovu rezultata hemijske i senzorske analize može se izvesti zaključak da se preferira umerena slanoća proizvoda fermentisanog kupusa.

Gorčina, pored kiselosti i slanoće, spada u svojstva ukusa proizvoda. Ukus gorčine kod povrća može se smanjiti dodatkom soli (Bouhlal i sar., 2014; Bakke i sar., 2018). Najbolje ocene za svojstvo gorčine odneo je hibrid kupusa bravo, sa najvećom ocenom za uzorak B4. Sadržaj

soli u ovom uzorku određen hemijskom metodom bio je 3,05% (poglavljje 4.2.4, tabela 4.14). Najlošiju ocenu za ukus gorčine dobio je hibrid tenisiti fermentisan rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije (T2). Dobijeni rezultati u pogledu gorčine fermentisanog kupusa mogli su biti očekivani, s obzirom da je uzorak T2 sadržao i najmanje soli određene titracionom metodom prema Mohr-u 1,48% (poglavljje 4.2.4, tabela 4.14).

Izgled na preseku glavice bio je najbolje ocenjen kod kupusa sorte futoški. Ocene za ovo svojstvo fermentisanog kupusa odgovaraju ocenama za opšti izgled glavice i boju, o čemu je ranije prodiskutovano. Najlošiji izgled na preseku glavice bio je kod kupusa hibrida tenisiti, uzorci T1-T3 (tabela 4.27).

Elastičnost, iako najbolja za kupus sorte futoški F7-F9 u ovom slučaju, bila je veoma dobra i za kupus fermentisan uz dodatak starter kulture neovisno o sorti ili hibridu, sa jednakom prosečnom ocenom 4,80 za sve uzorke. Najlošiju ocenu za elastičnost dobio je uzorak kupusa tenisiti fermentisan rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije.

Ukus je ključna komponenta u ocenjivanju kvaliteta fermentisanog kupusa, a odlikuju ga uglavnom slane, kisele i sumporne note (Trail i sar., 1995; Johanningsmeier i sar., 2005). Sumporna nota fermentisanog kupusa može da bude poželjna karakteristika koja doprinosi ukusu na „kiseli kupus“. Međutim ukoliko je veoma prisutna može da bude i neprijatna za svojstva ukusa i mirisa fermentisanog kupusa (Johanningsmeier i sar., 2005). Najbolju ocenu za opšti ukus dobio je uzorak hibrida bravo fermentisan u procesu spontane fermentacije, dok je najlošiju ocenu dobio hibrid tenisiti fermentisan rasolom iz prethodne fermentacije.

Najbolji ukupan utisak, baziran na senzorskoj evaluaciji uzoraka, ostavio je na ocenjivače uzorak hibrida bravo fermentisan procesom spontane fermentacije, dok je uzorak sa najnižom ocenom bio hibrid tenisiti fermentisan rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije izvedene takođe u industrijskim uslovima.

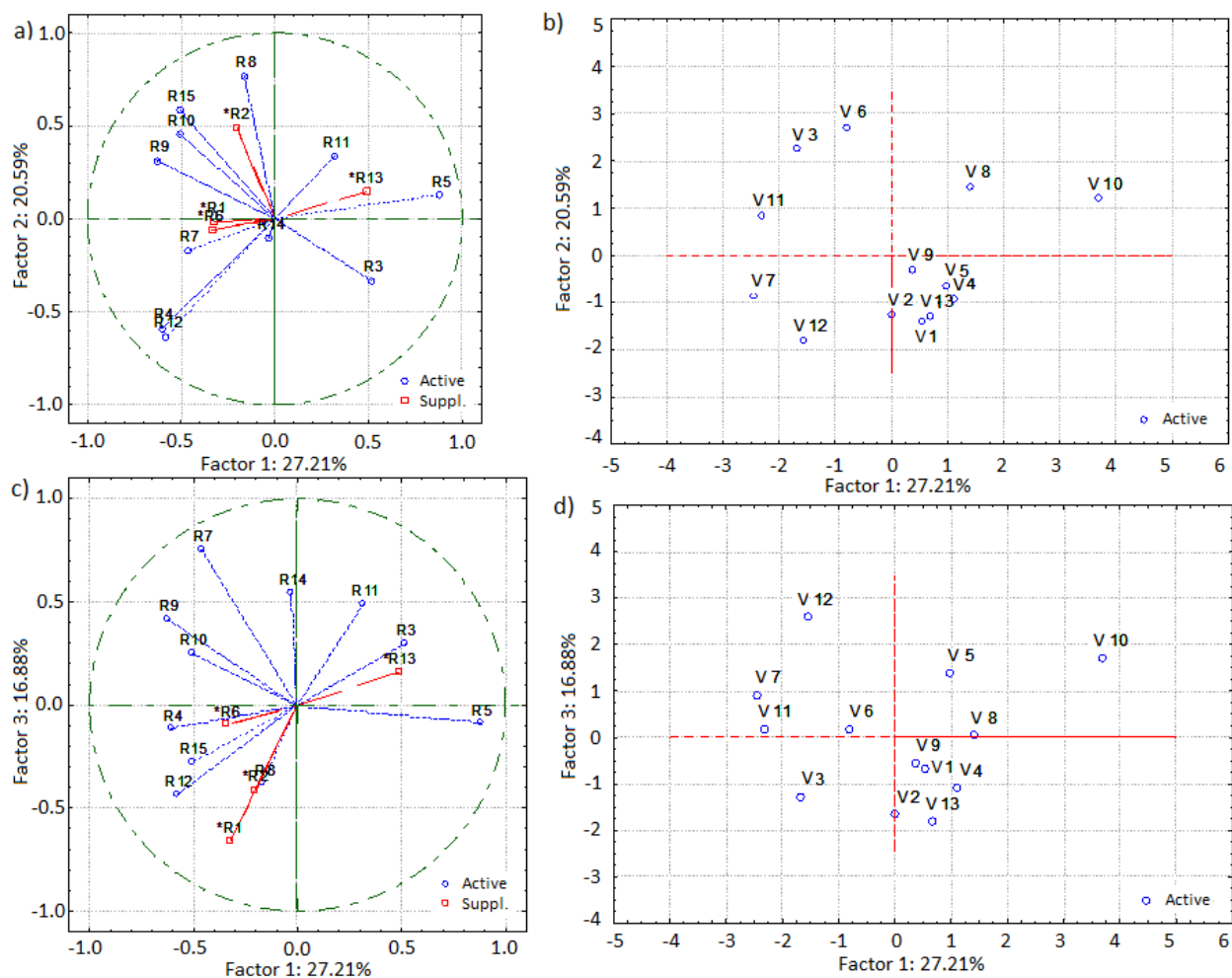
4.2.15. Hemometrijska analiza primenjena na ogled iz fermentacije kupusa 2015. godine

Hemometrija je hemijska disciplina koja uz pomoć matematičkih i statističkih metoda oblikuje ili bira optimalan postupak merenja, odnosno eksperiment. Na ovaj način, hemometrijskom analizom omogućeno je dobijanje maksimalnog broja informacija o

analiziranom sistemu. U zavisnosti od odabira hemometrijske metode i analiziranih promenljivih, tumačenje korelacionih odnosa može se primeniti na različite sisteme sa ciljem objašnjavanja njihove srodnosti i različitosti (Ilić, 2014).

Postoje istraživanja u kojima je analiza glavnih komponentata (PCA) bila primenjena za odabir najvažnijih analitičkih i senzorskih promenljivih rasola od kupusa i kupusa i luka, fermentisanih primenom starter kultura koje sadrže *Lb. plantarum* (Karovičová i sar., 2002; Kohajdová i Karovičová, 2005).

Kako bi se dobio bolji pregled sličnosti između različitih uslova fermentacije (uticaj količine dodatog NaCl, starter kulture i temperature) primenjena je analiza glavnih komponentata. PCA je primenjena na rezultate analiza izvedene u ogledu iz fermentacije kupusa 2015. godine na osnovu njihovih fizičkih i hemijskih svojstava. Multivarijantni statistički pristup, odnosno PCA, primenjen je u cilju razlikovanja uzoraka glavica kupusa koje su fermentisane u različitim uslovima i pronalaženja korelacije između ispitivanih fizičkih i hemijskih parametara. Prema tome, fizički parametri koji su korišćeni za PCA su sadržaj ukupne suve materije, a_w , čvrstoća listova i ukupna promena boje listova, dok su hemijski parametri pH, IC_{50} , sadržaj biogenih amina, sadržaj askorbinske, oksalne, mravlje, mlečne, sirćetne i ćilibarne kiseline, sadržaj soli i ukupan sadržaj šećera. Rezultati navedenih analiza predstavljeni su grafički na slici 4.13 biplot dijagramom na kome su fizičko-hemijski parametri predstavljeni sledećim oznakama: R1- ukupna suva materija, R2-čvrstoća listova, R3-askorbinska kiselina, R4-pH, R5- IC_{50} , R6-ukupna promena boje, R7-oksalna kiselina, R8-mravlja kiselina, R9-mlečna kiselina, R10-sirćetna kiselina, R11-ćilibarna kiselina, R12-biogeni amini, R13- a_w , R14-sadržaj soli i R15-ukupan sadržaj šećera.



Slika 4.13. Biplot raspodela PC1 i PC2 (a) i PC1 i PC3 (c) za grupisanje ispitivanih fizičkih i hemijskih parametara (R1-ukupna suva materija, R2-čvrstoća listova, R3-askorbinska kiselina, R4-pH, R5-IC₅₀, R6-ukupna promena boje, R7-okсалna kiselina, R8-mravlja kiselina, R9-mlečna kiselina, R10-sirćetna kiselina, R11-ćilibarna kiselina, R12-biogeni amini, R13-a_w, R14-sadržaj soli i R15-ukupan sadržaj šećera); scoreplot PC1 i PC2 (b) za različite količine NaCl, starter kulture i temperature i PC1 i PC3 (d)

PCA je izvedena kako bi se umanjio broj dimenzija složenog sistema petnaest promenljivih koje su grupisane. Hemijski parametri su predstavljeni na slici 4.13 a i c kao aktivne promenljive, dok su fizički parametri predstavljeni kao pomoćne promenljive na istoj slici. Može se videti da su PC1 i PC2 činile 47,80% (slika 4.13 a), dok su PC2 i PC3 činile 44,09% (slika 4.13 c) od ukupne varijanse modela. Prve tri glavne komponente činile su 64,68% ukupne varijance modela. PC1 je u negativnoj korelaciji sa svim parametrima grupisanja, osim sa sadržajem askorbinske kiseline, IC₅₀, sadržajem ćilibarne kiseline i a_w. S druge strane, PC2 je u negativnoj korelaciji sa ukupnom suvom materijom, sadržajem askorbinske kiseline, pH, ukupnom promenom boje, sadržajem oksalne kiseline, sadržajem biogenih amina i sadržajem

soli, dok je pozitivno koreliran sa sadržajem organskih kiselina; mravlja, mlečna, sirćetna i ćilibarna, osim oksalne i askorbinske kiseline, a takođe i sa čvrstoćom listova, IC_{50} , a_w i ukupnim sadržajem šećera. Shodno tome, PC3 je bio u negativnoj korelaciji sa pH, IC_{50} , sadržajem mravlje kiseline, sadržajem biogenih amina, ukupnim sadržajem šećera i svim fizičkim parametrima, osim a_w , dok je bio u pozitivnoj korelaciji sa a_w , sadržajem soli i sadržajem svih organskih kiselina, osim mravlje kiseline.

Na distribuciju uzoraka uticali su uslovi fermentacije, obzirom da su neke grupe uzoraka koje su posedovale jednake količine soli, starter kulture i temperature, mogle biti grupisane zajedno (slika 4.13 b, d). Najjasnije razlike ove tri grupe mogu se videti na slici 4.13 d između uzoraka fermentiranih na različitim temperaturama fermentacije i uzoraka kod kojih je primenjena starter kultura. S tim u vezi, najveći uticaj u ovoj studiji imala je temperatura na kojoj su uzorci fermentirani. Svi uzorci fermentirani na temperaturi od 26 °C grupisani su na desnoj strani grafika, dok su uzorci fermentisani na 22 °C grupisani na levoj strani, sa izuzetkom uzorka V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C). Prema tome, može se zaključiti da su najveći uticaj na proces fermentacije imale temperature od 26 °C i 22 °C. Pored uticaja temperature, primena starter kulture imala je, takođe, veliki značaj za proces fermentacije. Uzorci bez dodatka starter kulture grupisani su na donjoj polovini grafika prikazanog na slici 4.13 d. U međuvremenu, uglavnom su svi uzorci koji sadrže starter kulturu grupisani na gornjoj polovini grafika, osim uzorka V9 (8%, 0,025 g/kg, 26 °C) i V13 (7%, 0,050 g/kg, 26 °C). Shodno tome, prema ovom istraživanju primena same starter kulture ima više uticaja na proces fermentacije nego količina primenjene starter kulture. Dodatno, svi uzorci fermentisani sa dodatkom 6% NaCl grupisani su na gornjoj polovini grafika, osim uzorka V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), dok su svi uzorci fermentirani uz dodatka 7% NaCl grupisani na donjoj polovini grafika, osim uzorka V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), prikazanog na slici 4.13 d. Konačno, može se izvesti zaključak da su, pored temperature i primenjene starter kulture, takođe, i koncentracije dodatog NaCl od 6% i 7% imale uticaj na proces fermentacije, u ovom slučaju.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu glavice kupusa hibrida bravo su podvrgnute tehnološkom procesu spontane fermentacije i fermentacije uz primenu starter kulture u industrijskim uslovima. U ogledu iz 2017. godine glavice kupusa bravo, tenisiti i futoški podvrgnute su spontanoj fermentaciji, fermentaciji uz upotrebu rasola koji je dobijen takođe u industrijskim uslovima i fermentaciji uz primenu starter kulture, pri različitim procesnim parametrima.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Karakterizacija svežeg kupusa hibrida bravo, pored toga što je izvršena u cilju praćenja promena sadržaja fizičko-hemijskih i mikrobioloških parametara od svežeg do fermentisanog proizvoda, urađena je i u cilju potvrde podobnosti ove sirovine za dalji tehnološki postupak prerade procesom fermentacije. Dobijeni rezultati fizičko-hemijskih analiza uzoraka svežih glavica, kao što su nizak sadržaj proteina od 0,75%, ukupna suva materija 9,00% i vrednost pH 5,87 pokazatelji su odgovarajućeg kvaliteta i zrelosti. Sadržaj oksalne kiseline, 11,39 g/100 g sm, koja je odgovorna za dobar antioksidativni kapacitet i inhibira degradaciju svežeg materijala, pored toga i odgovarajuća ukupna kiselost 0,13% i optimalan sadržaj ukupnih šećera 3,9%, pokazali su da je ova sirovina imala dobre preduslove za uspešan proces fermentacije. Dodatno, mikrobiološka analiza

glavica kupusa hibrida bravo pokazala je da je ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija od 4,20 log cfu/g, kvasaca 3,81 log cfu/g, enterobakterija 3,25 log cfu/g i bakterija mlečne kiseline 1,85 log cfu/g odgovarao ukupnom broju reprezentativne mikropopulacije kod svežeg povrća prema literaturnim podacima. Na osnovu dobijenih rezultata, fizičko-hemijskih i mikrobioloških analiza, za uzorke svežeg kupusa hibrida bravo može se zaključiti da je sirovina bila odgovarajućeg kvaliteta za dalji tehnološki postupak prerade procesom fermentacije.

- Sadržaj ukupne suve materije u uzorcima glavica kupusa opadao je u toku procesa fermentacije. Određivanjem sadržaja ukupnih šećera, zaključeno je da glavice kupusa fermentisane pri temperaturi od 26 °C ne sadrže zaostali šećer u uzorcima, bez obzira na primenjene količine NaCl i dodate starter kulture, što može biti i očekivano, s obzirom da su fermentisane pri najvišoj temperaturi fermentacije. Najviše šećera od 1,70% sadržao je uzorak K1 (16-18 °C; 40 dana), te se može zaključiti da kombinacija primenjenog intervala temperature i trajanje fermentacije nisu bili dovoljni da bi proces fermentacije bio završen. Nasuprot vrednostima za sadržaj ukupnih šećera, ukupna kiselost izražena na mlečnu kiselinu i sadržaj soli rasli su u glavicama kupusa u toku procesa fermentacije. Najvišu ukupnu kiselost (0,91-1,07%) imali su uzorci kupusa fermentisani uz upotrebu rasola iz prethodne fermentacije. Uzorak K1, fermentisan pri najnižem temperaturnom intervalu, imao je i najmanju količinu soli 0,79%, te se može zaključiti da nakon 40 dana fermentacije, pri temperaturnom intervalu 16-18 °C u glavice kupusa nije uspelo da difunduje dovoljno soli da bi se proces fermentacije smatrao kompletnim. Sadržaj soli u svim ostalim uzorcima u ovom istraživanju kretao se u granicama 1,48-3,57%, što odgovara vrednostima za količinu soli u biološki konzervisanom povrću propisanu Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od voća i povrća.
- Upotreba starter kulture dovela je do ubrzanog opadanja pH vrednosti, a najpovoljniji rezultati dostignuti su nakon 12 dana procesa fermentacije. U toku fermentacije došlo je do opadanja a_w vrednosti u uzorcima. Kupus fermentisan pri višim temperaturama imao je niže a_w vrednosti i obrnuto. Dodatno, primećeno je

da su najviše a_w vrednosti izmerene u uzorcima fermentisanim rasolom iz prethodne fermentacije nezavisno od sorte ili hibrida kupusa. Visoke a_w vrednosti izmerene u uzorcima fermentisanim rasolom iz prethodne fermentacije mogle bi se objasniti niskim sadržajem soli koji je bio na raspolaganju ovim glavicama kupusa u toku procesa fermentacije.

- Više fenolnih jedinjenja bilo je u fermentisanim uzorcima kupusa u poređenju sa svežim kupusom, kao što je moglo biti i očekivano s obzirom da su bakterije mlečne kiseline sposobne da oslobađaju polifenolna jedinjenja koja se nalaze u vezanom obliku unutar ćelija kupusa. Takođe, primećuje se pad sadržaja ukupnih fenola u uzorcima fermentisanog kupusa sa porastom temperaturnog intervala. Prema tome, najviše ukupnih fenola imao je uzorak K1 koji je fermentisan pri najnižim temperaturama (16-18 °C). Isti zaključak se može izvesti i u slučaju uzoraka rasola, najviše fenola posedovao je uzorak rasola koji je fermentisan pri najnižem temperaturnom intervalu (16-18 °C).
- Zbir ranga razlika (engl. Sum of Ranking Differences, SRD) i hijerarhijska klaster analiza (engl. Hierarchical Cluster Analysis, HCA) korišćene su u cilju određivanja razlika između referentnog (6%, 0 g/kg, 22 °C) i drugih uzoraka fermentisanih glavica kupusa, u pogledu antioksidativne aktivnosti i sadržaja askorbinske kiseline. Najveće razlike za antioksidativnu aktivnost, izraženu preko IC_{50} , dobijene su kod uzoraka V7 (7%, 0,025 g/kg, 22 °C), V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C) i V12 (8%, 0,050 g/kg, 22 °C) u poređenju sa referentnim uzorkom V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), u toku procesa fermentacije, uzevši u obzir sve ispitivane dane, 5., 12., 27. i 62. dan fermentacije. Prema tome, dodatak starter kulture, pri temperaturi fermentacije koja je iznosila 22 °C, značajno je uticao na antioksidativnu aktivnost fermentisanih glavica kupusa hibrida bravo. U međuvremenu, ukoliko se uzme u obzir promena sadržaja askorbinske kiseline u toku procesa fermentacije, najveća razlika primećena je kod uzoraka V2 (7%, 0 g/kg, 18 °C), V8 (6%, 0,050 g/kg, 26 °C) i V9 (8%, 0,050 g/kg, 26 °C), u poređenju sa referentnim uzorkom V1 (6%, 0 g/kg, 22 °C), uzevši u obzir sve ispitivane dane, 5., 12., 27. i 62. dan fermentacije. Ukoliko se uzme u obzir promena sadržaja askorbinske kiseline, može se zaključiti da je najznačajna

promenljiva koja je imala uticaja u toku procesa fermentacije bila temperatura fermentacije. Generalno, vrednosti antioksidativne aktivnosti glavica kupusa bile su u porastu od početka, dostigle svoj maksimum 12. dana fermentacije i blago opadale sve do poslednjeg ispitivanog dana fermentacije. Sa druge strane, sadržaj askorbinske kiseline uglavnom je opadao u toku procesa fermentacije, sa najvišom vrednošću za svež uzorak kupusa.

- Dodatak starter kulture pozitivno je uticao na ukupan sadržaj organskih kiselina u toku procesa fermentacije pri temperaturi fermentacije od 22°C. Sadržaj organskih kiselina bio je u porastu tokom procesa fermentacije, dostižući najviše vrednosti uglavnom kod uzoraka koji su fermentisani dodatkom starter kulture u iznosu 0,050 g/kg svežeg kupusa i pri temperaturi fermentacije od 22 °C. Blagi porast sadržaja organskih kiselina i najveća uniformnost rezultata primećena je kod uzoraka fermentisanih dodatkom starter kulture u iznosu 0,025 g/kg svežeg kupusa, a najviše organskih kiselina dobijeno je pri temperaturi fermentacije od 22 °C.
- Nije došlo do značajnog omekšanja tkiva kupusa kod fermentisanih uzoraka kupusa, niti do značajne promene boje listova kupusa između uzoraka u toku fermentacije. Što se tiče sadržaja biogenih amina, zapaženo je da kadaverin nije detektovan 62. dana fermentacije kod uzoraka kupusa fermentisanih uz primenu starter kulture.
- Ukupan broj kvasaca uglavnom je opadao, dok je ukupan broj plesni rastao do 62. dana fermentacije u poređenju sa uzorcima svežeg kupusa. Postepeno povećanje ukupne kiselosti u kombinaciji sa sadržajem soli uzrokovalo je da *Enterobacteriaceae* nisu detektovane nakon 5. dana procesa fermentacije. Nagli porast u broju bakterija mlečne kiseline odvijao se do 12. dana, dok je inhibitorni efekat koji je uzrokovan niskom pH vrednošću doveo do značajne redukcije u broju bakterija mlečne kiseline 62. dana fermentacije.
- Na osnovu senzorske evaluacije uzoraka najbolju ocenu za ukupan utisak dobio je uzorak hibrida bravo fermentisan procesom spontane fermentacije, dok je najnižu ocenu dobio uzorak hibrida tenisiti fermentisan rasolom dobijenim iz prethodne fermentacije izvedene takođe u industrijskim uslovima.

- Uzevši u obzir bioaktivne materije koji su izražene uz pomoć HCA i SRD hemometrijskih analiza, najpovoljniji uslovi procesa fermentacije izvedenog u industrijskim uslovima u ovom radu bili su 6% NaCl, 0,050 g starter kulture po kilogramu svežeg kupusa, temperatura od 22 °C i trajanje fermentacije od 12 dana. Primećeno je da je najbolji uzorak imao istu količinu dodatog NaCl i fermentisan je pri istoj temperaturi kao i “zlatni” standard. Međutim, razlika između “zlatnog” standarda i uzorka V11 (6%, 0,050 g/kg, 22 °C) je upravo u dodatku starter kulture u iznosu 0,050 g/kg svežeg kupusa, što dovodi do zaključka da odgovarajuća količina dodate starter kulture može pozitivno uticati na sadržaj bioaktivnih jedinjenja kao i na trajanje procesa fermentacije. Dodatno, primena analize glavnih komponenata (engl. Principal Component Analysis, PCA) na određene fizičke (sadržaj ukupne suve materije, a_w , čvrstoća listova kupusa i ukupna promena boje listova kupusa) i hemijske (pH, IC_{50} , sadržaj biogenih amina, sadržaj askorbinske, oksalne, mravlje, mlečne, sirćetne i ćilibarne kiseline, sadržaj soli i sadržaj ukupnih šećera) parametre pokazala je da najveći uticaj na proces fermentacije imala je temperatura, praćena primenom starter kulture i na kraju različite količine dodatog NaCl.

6. LITERATURA

- 1) Acosta-Estrada, A. B., Gutiérrez-Urbe, A. J., Serna-Saldívar, O. S.: Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152 (2014) 46-55.
- 2) Adams, M. R., Moss, M. O. (2008): *Food Microbiology* (3rd ed.). RSC Publishing, Cambridge, United Kingdom.
- 3) Adeleke, R., Nwangburuka, C., Oboirien, B.: Origin, roles and fate of organic acids in soils, a review. *South African Journal of Botany*, 108 (2017) 393-406.
- 4) Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I. Jeyaram, K.: Diversity and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Nigerian traditional fermented foods. *LWT - Food Science and Technology*, 140 (2021) 110697.
- 5) Adetuyi, F. O., Ibrahim, T. A.: Effect of fermentation time on the phenolic, flavonoid and vitamin C contents and antioxidant activity of okra (*Abelmoschus esculentus*) seed. *Nigerian Food Journal*, 32, 2 (2014) 128-137.
- 6) Aked, J. (2002): Maintaining the post-harvest quality of fruits and vegetables. In: Jongen, W. (Ed.): *Fruit and vegetable processing, Improving quality*. CRC Press, Cambridge, United Kingdom. (pp. 119-149).
- 7) Bakke, A., Stubbs, C. A., McDowell, E. H., Moding, K. J., Johnson, S. L., Hayes, J. E.: Mary Poppins was right: Adding small amounts of sugar or salt reduces the bitterness of vegetables. *Appetite*, 126 (2018) 90-101.

- 8) Bamforth, C. V. (2005): Food, Fermentation and Micro-organisms. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- 9) Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana, J. A., Schmidt, S. J., Labuza, T. P. (2007): Water activity in foods: fundamentals and applications. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- 10) Bender, E. A. (1978): Food Processing and Nutrition. Academic Press, London, UK.
- 11) Bouhlal, S., Issanchou, S., Chabanet, C., Nicklaus, S.: 'Just a pinch of salt'. An experimental comparison of the effect of repeated exposure and flavor-flavor learning with salt or spice on vegetable acceptance in toddlers. *Appetite*, 83 (2014) 209-217.
- 12) Breidt, E., Crowley, K. A., Fleming, H. P.: Controlling cabbage fermentations with nisin and nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*. *Food Microbiology*, 12 (1995) 109-116.
- 13) Breidt, F., McFeeters, R. F., Perez-Diaz, I., Lee, C-H. (2015): Fermented Vegetables. In: Doyle, M. P., Buchanan, R. L. (Eds): *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (4th ed.). ASM Press, Washington, D.C. (pp 841-855).
- 14) Bremus C., Herrmann U., Bringer-Meyer S., Sahm H.: The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology*, 124 (2006) 196-205.
- 15) Brophy, T. F., Laing, M. D.: Screening of fungicides for the control of downy mildew on container-grown cabbage seedlings. *Crop protection*, 11 (1992) 160-164.
- 16) Chiang, M. S., Chong, C., Landry, B. S., Crete, R. (1993): Cabbage *Brassica oleracea* subsp. capitata L. In: Kalloo, G., Bergh, B. O. (Eds.): *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. Pergamon Press, Oxford, UK. (pp. 113-155).
- 17) Ciska, E., Pathak, D. R.: Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 7938-7943.
- 18) Cvetković, B., Bardić, Ž., Jakanović, M., Mastilović, J.: Technological quality of biofermented white cabbage, cultivar Futoški. *Food Processing, Quality and Safety*, 35, 2 (2008) 93-97.
- 19) Cvetković, B. R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Nježić, Z. B., Šimurina, O., Filipčev, B., Tepić, A.: Poređenje tehnika i metoda određivanja L-askorbinske kiseline u voću. *Hemijska Industrija*, 66, 4 (2012) 553-558.
- 20) Cvetković, B. (2014): Primena tehnoloških postupaka spontane fermentacije i osmotske dehidratacije za unapređenje nutritivnog profila, senzornih svojstava i

- održivosti kupusa. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- 21) Cvetković, B. R., Pezo, L. L., Tasić, T., Šarić, L., Kevrešan, Ž., Mastilović, J.: The optimisation of traditional fermentation process of white cabbage (in relation to biogenic amines and polyamines content and microbiological profile). *Food chemistry*, 168 (2015) 471-477.
 - 22) Červenski, J., Gvozdrenović, Đ. (2004): *Kupus*. Izdavačka kuća Draganić, Beograd, Srbija.
 - 23) Červenski, J., Gvozdrenović, Đ. (2007): *Karfiol i brokola*. Partenon, Beograd, Srbija.
 - 24) Červenski, J. (2010): *Gajenje kupusa*. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija.
 - 25) Červenski, J., Medić-Pap, S. (2018): *Proizvodnja kupusa*. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Srbija.
 - 26) Daeschel, M. A., Fleming, H. P.: Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiology*, 1 (1984) 303-313.
 - 27) Daniel, S. L., Pilsel, C., Drake, H. L.: Anaerobic oxalate consumption by microorganisms in forest soils. *Research in Microbiology*, 158 (2017) 303-309.
 - 28) Dekić, M. (2011): *Fitohemijsko ispitivanje odabranih biljnih vrsta familija Geraniaceae i Brassicaceae*. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, odsek za hemiju, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
 - 29) Djadouni, F., Kihal, M.: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and spectrum of their biopeptides against spoilage germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 3 (2012) 435-443.
 - 30) Dobričević, N., Pliestić, S.: Quality of cabbage cultivars intended for fermentation in the Ogulin region. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 69 (2004) 109-113.
 - 31) Drašković, M., Tepić Horecki, A., Šumić, Z., Malbaša, R., Vitas, J., Pavlić, B., Vakula, A.: Variation of bioactive compounds content in fermented cabbage: Influence of fermentation temperature. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 21, 3 (2017) 136-141.
 - 32) Drašković, M. V., Vakula, A. S., Šumić, Z. M., Daničić, T. N., Jakanović, M. R., Pavlić, B. M., Tepić Horecki, A. N.: Monitoring the physico-chemical parameters of

- cabbage heads during fermentation: The impact of fermentation conditions and cabbage varieties. *Acta periodica technologica*, 49 (2018) 31-41.
- 33) Đukić, D. A. Vesković, S. M., Mandić, L. G. (2015): Opšta i industrijska mikrobiologija. Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Čačak, Srbija. (pp. 454-461).
- 34) Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J.: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3 (2000) 648-656.
- 35) Farnworth, E. R. (2008): *Handbook of Fermented Functional Foods* (2nd ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 36) Filimon, R., Niculaua, M., Sârbu, S., Filimon, R., Arion, C.: Determination of chromatic characteristics of the hydroalcoholic extracts obtained from the fruits of some cherry and sour cherry varieties. *Lucrări științifice, seria Agronomie*, 54, 1 (2011) 124–129.
- 37) Gaafar, A. A., Aly, F. H., Salama, A. Z., Mahmoud, M. K.: Characterizing the antioxidant and anticancer properties of secondary metabolites from red and white cabbages *Brassica oleracea* L. var. *capitata*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3, 4 (2014) 171-186.
- 38) Gardner, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C. P.: Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International journal of food microbiology*, 64, 3 (2001) 261-275.
- 39) Gilliland, E. S., Sandine, E. W., Vedamuthu, R. E. (1984): Acid-producing microorganisms. In: Speck, L. M. (Ed.): *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, D.C., USA. (pp. 184-196).
- 40) Goyal, S. M. (2006): *Viruses in Foods*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY.

- 41) Gurtler, J. B., Doyle, M. P., Kornacki, J. L. (2014): *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY.
- 42) Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5 (1994) 42-49.
- 43) Harbaum-Piayda B., Palani K., Schwarz K.: Influence of postharvest UV-B treatment and fermentation on secondary plant compounds in white cabbage leaves. *Food Chemistry*, 197 (2016) 47-56.
- 44) Héberger, K., Kollár-Hunek, K.: Sum of ranking differences for method discrimination and its validation: comparison of ranks with random numbers. *Journal of Chemometrics*, 25, 4 (2011) 151-158.
- 45) Héberger, K., Škrbić, B.: Ranking and similarity for quantitative structure-retention relationship models in predicting Lee retention indices of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica chimica acta*, 716 (2012) 92-100.
- 46) Holzapfel, W., Schillinger, U., Buckenhüskes, H. (2008): Sauerkraut. In Farnworth, E. R. (Ed.): *Handbook of Fermented Functional Foods* (2nd ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. (pp. 395-412).
- 47) Hui, Y. H. (2004): *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, Inc, New York, NY.
- 48) Hui, Y. H. (2012): *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology* (2nd ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 49) Hui, Y. H., Evranuz, E. Ö. (2016): *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. (2nd ed.). Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 50) Hutkins, R. W. (2006): *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Iowa, US.
- 51) Ignat, I., Volf, I., Popa, V.: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 4 (2011) 1821-1835.

- 52) Ilić, S. B. (2014): Hemometrijska analiza rezultata hemijskih i bioloških istraživanja farmakološki značajnih biljaka. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet departman za hemiju, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
- 53) Inatsu, Y., Weerakkody, K., Bari, M. L., Hosatani, Y., Nakamura, N., Kawasaki, S.: The efficacy of combined (NaClO and organic acids) washing treatments in controlling *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and spoilage bacteria on shredded cabbage and bean sprout. *LWT-Food Science and Technology*, 85 (2017) 1-8.
- 54) ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C.
- 55) Ivanović, M.: Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Povrtarski glasnik*, 2, 3 (2004) 11-14.
- 56) Jang, S., Lee, J., Jung, U., Choi, H-S., Suh, H. J.: Identification of an anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable. *Food control*, 43 (2014) 42-48.
- 57) Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). Springer, New York, NY.
- 58) Jevšnik, M., Hlebec, V., Raspor, P.: Survey of safe and hygienic practices among Slovenian sauerkraut growers. *Food Control*, 20 (2009) 677-685.
- 59) Johanningsmeier, S. D., Fleming, H. P., Thompson, R. L., McFeeters, R. F.: Chemical and sensory properties of sauerkraut produced with *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures of differing malolactic phenotypes. *Journal of Food Science*, 70, 5 (2005) 343-349.
- 60) Jongen, W. (2002): *Fruit and vegetable processing, Improving quality*. CRC Press, Cambridge, United Kingdom.
- 61) Jung, J. Y., Lee, S. H., Lee, H. J., Seo, H-Y., Park, W-S., Jeon, C. O.: Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (2012) 378-387.

- 62) Karovičová, J., Drdák, J., Polonský, J., Rajniaková, A.: Dynamics of production of organic acids during lactic fermentation of vegetable juice. *Journal of Chromatography A*, 665 (1994) 55-58.
- 63) Karovičová, J., Kohajdová, Z., Hybenová, E.: Using of multivariate analysis for evaluation of lactic acid fermented cabbage juices. *Chemical Papers*, 56, 4 (2002) 267-274.
- 64) Kohajdová, Z. Karovičová, J.: Sensory and chemical evaluation of lactic acid-fermented cabbage-onion juices. *Chemical papers*, 59, 1 (2005) 55–61.
- 65) Kolarov, Lj., A., Lončar, E., S., Ačanski, M., M. (1996): Kvantitativna hemijska analiza, Praktikum sa elementima teorije. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 66) Kordiš-Krapež, M., Abram, V., Kač, M., Ferjančić, S.: Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 2 (2001) 93-99.
- 67) Kovačević, S. Z., Tepić, A. N., Jevrić, L. R., Podunavac-Kuzmanović, S. O., Vidović, S. S., Šumić, Z. M., Ilin, Ž. M.: Chemometric guidelines for selection of cultivation conditions influencing the antioxidant potential of beetroot extracts. *Computers and Electronics in Agriculture*, 118 (2015) 332-339.
- 68) Kusznierevicz, B., Śmiechowska, A., Bartoszek, A., Namieśnik, J.: The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. *Food Chemistry*, 108 (2008a) 853-861.
- 69) Kusznierevicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, S., Namieśnik, J.: Partial characterization of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activity and proteins. *LWT-Science Direct*, 41 (2008b) 1-9.
- 70) Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 10 (1999) 3954-3962.
- 71) Li, Y., Hua, D., Mu, H., Xu, H., Jin, F., Zang, X.: Conversion of vegetable wastes to organic acids in leaching bed reactor: Performance and bacterial community analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124, 2 (2017) 195-203.

- 72) Liu, X. Zhou, P. (2014): Solid-state food fermentation and sustainable development. In Chen, J., Zhu, Y. (Eds.). *Solid State Fermentation for Foods and Beverages*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. (pp. 348-378).
- 73) Lu, Z., Breidt, F., Plengvidhya, V., Fleming, H. P.: Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6 (2003) 3192-3202.
- 74) Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F.: Soxhlet extraction: Past and present panacea, a review. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2383-2389.
- 75) Maksimović, P. S. (2005): *Povrtarske kupusnjače*. Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Čačak, Srbija.
- 76) Marcó, A., Rubio, R., Compañó, R., Casals, I.: Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta*, 57 (2002) 1019-1026.
- 77) Marth, E. H., Steele, J. L. (2001): *Applied dairy microbiology* (2nd ed.). Marcel Dekker, Inc, New York, NY.
- 78) Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., Sidro, B., Ullate, M., Frias, J., Vidal-Valverde, C.: White cabbage fermentation improves ascorbigen content, antioxidant and nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced macrophages. *LTW-Food Science and Technology*, 46 (2012) 77-83.
- 79) Mastilović, J., Novaković, A., Červenski, J., Jovanović, P., Cvetković, B. (2007): *Elaborat o načinu proizvodnje i specifičnim karakteristikama proizvoda, Futoški sveži i kiseli kupus*. Institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- 80) Medina, E., DeCastro, A., Romero, C., Ramírez, E. M., Brenes, M. (2016): Safety of fermented fruits and vegetables. In Prakash, V., Martin-Belloso, O., Keener, L. (Eds.). *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*. Academic Press, Waltham, Massachusetts. (pp. 355–367).
- 81) Medina-Pradas, E., Pérez-Díaz, I. M., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F. N. (2017): Review of Vegetable Fermentations With Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage. In Bevilacqua, A., Corbo, M. R.,

- Sinigaglia, M. (Eds.). The Microbiological Quality of Food. Woodhead Publishing. (pp. 211-236).
- 82) Mehta, B. M., Kamal-Eldin, A., Iwanski, R. Z. (2012): Fermentation effects on food properties. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- 83) Mirecki, N.: Uticaj sorte i vremena sadnje na kvalitet kupusa. *Savremena poljoprivreda*, 50 (2001) 117-122.
- 84) Müller, A., Rösch, N., Cho, G-S., Meinhardt, A-K., Kabisch, J., Habermann, D., Böhnlein, C., Brinks, E., Greiner, R., Charles M. A. P. Franz, C. M. A. P.: Influence of iodized table salt on fermentation characteristics and bacterial diversity during sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 76 (2018) 473-480.
- 85) National Research Council. Applications of biotechnology in traditional fermented foods. Washington, DC: National Academies Press, 1992.
- 86) Nieto-Sandoval, J.M., Fernández-López, J.A., Almela, L., Muñoz, J.A.: Dependence between apparent color and extractable color in paprika. *Color Research and Application*, 24, 2 (1999) 93-97.
- 87) Niketić-Aleksić, G. (1988): Tehnologija voća i povrća. Naučna knjiga, Beograd, Srbija.
- 88) Nilnakara, S., Chiewchan, N., Devahastin, S.: Production of antioxidant dietary fibre powder from cabbage outer leaves. *Food and Bioproducts Processing*, 87 (2009) 301-307.
- 89) Oonkhanond, B., Jonglertjunya, W., Srimarut, N., Bunpachart, P., Tantinukul, S., Nasongkla, N., Sakdaronnarong, C.: Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocelluloses fractionation, succharification, fermentation, and *ex-situ* nanofiltration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 3 (2017) 2533-2541.
- 90) Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F.: Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LTW-Food Science and Technology*, 73 (2016) 536-542.
- 91) Özogul, Y., Özogul, F. (2019): Chapter 1: Biogenic amines formation, toxicity, regulations in food. In: Saad, B., Tofalo, R. (Eds): Biogenic amines in food: analysis, occurrence and toxicity. The Royal Society of Chemistry, London, UK. (pp. 1-17).

- 92) Palani, K., Harbaum-Piayda, B., Meske, D., Keppler, J. K., Bockelmann, W., Heller, K. J., Schwarz, K.: Influence of fermentation on glucosinolates and glucobrassicin degradation products in sauerkraut. *Food Chemistry*, 190 (2016) 755-762.
- 93) Park, K-Y., Cheigh, H-S. (2004): Kimchi. In Hui, Y. H. (Ed.). *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. (pp. 621-655).
- 94) Pederson, C. S., Niketić, G., Albury, M. N.: Fermentation of the Yugoslavian pickled cabbage. *Applied Microbiology*, 10, 1 (1961) 86–89.
- 95) Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., Vidal-Valverde, C.: Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from *Brassica oleracea* var. *capitata* cv. bronco grown in Eastern Spain. Effect of storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 3549–3557.
- 96) Peñas, E., Martinez-Villaluenga, C., Pihlava, J.-M., Frias, J.: Evaluation of refrigerated storage in nitrogen-enriched atmospheres on the microbial quality, content of bioactive compounds and antioxidant activity of sauerkrauts. *LTW-Food Science and Technology*, 61 (2015) 463-470.
- 97) Peñas, E., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. (2017): Sauerkraut: production, composition, and health benefits. In Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E. (Eds.). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Academic Press, London, United Kingdom (pp. 557-576).
- 98) Phungamngoen, C., Chiewchan, N., Devahastin, S.: Effects of various pretreatments and drying methods on *Salmonella* resistance and physical properties of cabbage. *Journal of Food Engineering*, 115 (2013) 237-244.
- 99) Pravilnik o kvalitetu proizvoda od voća i povrća (Sl. glasnik RS, br. 128/2020).
- 100) Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (Sl. list SFRJ, br. 29/83).
- 101) Rácz, A., Papp, N., Balogh, E., Fodor, M., Héberger, K.: Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Analytical Methods*, 7 (2015) 4216-4224.
- 102) Ray, B., Bhunia, A. (2014): *Fundamental Food Microbiology*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.

- 103) Ray, R. C., Montet, D. (2015): *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 104) Reyes, L. F., Villarreal, J. E., Cisneros-Zevallos, L.: The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101 (2007) 1254-1262.
- 105) Roberts, D., Greenwood, M. (2003): *Practical Food Microbiology* (3rd ed.). Blackwell Publishing Ltd., Malden, Massachusetts.
- 106) Santos, S. M.: Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29 (1996) 213-231.
- 107) Sapers, G. M., Gorny, J. M., Yousef, A. E. (2006): *Microbiology of Fruits and Vegetables*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- 108) Satora, P., Skotniczny, M., Strnad, S., Piechowicz, W.: Chemical composition and sensory quality of sauerkraut produced from different cabbage varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 136 (2021) 110325.
- 109) Shahidi, F., Ambigaipalan, P.: Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects, a review. *Journal of Functional Foods*, 18 (2015) 820-897.
- 110) Singh, P., Prasad, S.: Determination of ascorbic acid and its influence on the bioavailability of iron, zinc and calcium in Fijian food samples. *Microchemical Journal*, 139 (2018) 119-124.
- 111) Singleton, V. L., Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 3 (1965) 144-158.
- 112) Sinha, N. K. (2011): *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- 113) Sipos, L., Bernhardt, B., Gere, A., Komáromi, B., Orbán, C., Bernáth, J., Szabó, K.: Multicriteria optimization to evaluate the performance of *Ocimum basilicum* L. varieties. *Industrial crops and products*, 94 (2016) 514-519.
- 114) SRPS EN ISO 4833-1:2014. Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama - Deo 1: Brojanje kolonija na 30 °C tehnikom nalivanja ploče.

- 115) SRPS ISO 21528-2:2009. Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* – Deo 2: Metoda brojanja kolonija.
- 116) SRPS ISO 21527-1:2011. Horizontalna metoda za određivanje broja kvasaca i plesni - Deo 1: Tehnika brojanja kolonija u proizvodima sa aktivnošću vode većom od 0,95.
- 117) Sun, Y.-P., Chou, C.-C., Yu, R.-C.: Antioxidant activity of lactic-fermented Chinese cabbage. *Food Chemistry*, 115 (2009) 912-917.
- 118) Šoronja Simović, D., Maravić, N., Šereš, Z., Mišan, A., Pajin, B., Jevrić, L. R., Podunavac-Kuzmanović, S. O., Kovačević, S. Z.: Antioxidant capacity of cookies with non-modified and modified sugar beet fibers: chemometric and statistical analysis. *European Food Research and Technology*, 243, 2 (2017) 239-246.
- 119) Šulc, D. (1969): Poznavanje sirovina, pomoćnih sirovina i pomoćnog materijala za proizvodnju prerađevina voća i povrća. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 120) Šumić, Z. (2014): Optimizacija sušenja voća u vakuumu. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- 121) Šumić, Z., Vakula, A., Tepić, A., Čakarević, J., Vitas, J., Pavlič, B.: Modeling and optimization of red currants vacuum drying process by response surface methodology (RSM). *Food chemistry*, 203 (2016) 465-475.
- 122) Tepić, A. (2012): Bojene materije voća i povrća. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 123) Tepić Horecki, A. (2019): Tehnologija proizvoda od voća i povrća. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 124) Terefe, N. S. (2016): Food fermentation. In Reference module in food science. Elsevier, Werrabee, Australia. (pp. 1–3).
- 125) Theron, M. M., Rykers Lues, J. F. (2011): Organic acids and food preservation. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- 126) Torres, S., Verón, H., Contreras, L., Isla, M. I.: An overview of plant autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, 9 (2020) 112-123.
- 127) Trail, A. C., Fleming, H. P., Young, C. T., McFeters, R. F.: Chemical and sensory characterization of commercial sauerkraut. *Journal of Food Quality*, 19 (1995) 15-30.

- 128) Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., Bañeras, L.: Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127 (2008) 91-98.
- 129) Viander, B., Mäki, M., Palva, A.: Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology*, 20, 4 (2003) 391-395.
- 130) Vračar, O. Lj. (2001): Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 131) Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. (2004): Patogene gljive povrća i voća u Srbiji. NNK International, Beograd, Srbija.
- 132) Wang, Z., Cao, J., Jiang, W.: Changes in sugar metabolism caused by exogenous oxalic acid related to chilling tolerance of apricot fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 114 (2016) 10–16.
- 133) Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Thomas, S. M., Nout, M. J. R.: Effects of sodium reduction scenarios on fermentation and quality of sauerkraut. *LWT-Food Science and Technology*, 54 (2013) 383-388.
- 134) Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M., Xie, M.: Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during Chinese sauerkraut fermentation. *Food Control*, 26 (2012) 178-181.
- 135) Xiong, T., Peng, F., Liu, Y., Deng, Y., Wang, X., Xie, M.: Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT - Food Science and Technology*, 59 (2014) 713-717.
- 136) Yang, X., Hu, W., Xiu, Z., Jiang, A., Yang, X., Sarengaowa, Ji, Y., Guan, Y., Feng, K.: Microbial dynamics and volatiline profiles during the fermentation of Chinese northeast sauerkraut by *Leuconostoc mesenteroides* ORC 2 and *Lactobacillus plantarum* HBUAS 51041 under different salt concentrations. *Food Research International*, 130 (2020) 108926.
- 137) Yoon, S. S., Barrangou-Pouey, R., Breidt, F., Klaenhammer, T. R., Fleming, H. P.: Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2 (2002) 973-976.

- 138) Yoon, K. Y., Woodams, E. E., Hang, Y. D.: Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97 (2006) 1427-1430.
- 139) Yuasa, M., Shimada, A., Matsuzaki, A., Eguchi, A., Tominaga, M.: Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using probiotic lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, 39 (2020) 100810.
- 140) Žakula, R. (1980): *Mikrobiologija hrane*, drugo izdanje. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
- 141) <http://www.blychem.mu/downloads/TENACITY.pdf>; 20. mart 2018.
- 142) <http://www.faostat.fao.org>

7. PRILOG

Tabela 7.1. Fizičko-hemijske karakteristike svežeg kupusa hibrida bravo

Fizičko-hemijska analiza	Rezultat
Ukupna suva materija (sm) [%]	9,00 ± 1,59
Sadržaj masti [%]	0,26 ± 0,02
Sadržaj proteina [%]	0,75 ± 0,10
Sadržaj celuloze (sirovih vlakana) [%]	1,67 ± 0,05
Ukupna kiselost (titracioni aciditet) [% mlečna kiselina]	0,13 ± 0,01
Sadržaj ukupnih šećera [%]	3,90 ± 0,02
Sadržaj soli [%]	0,05 ± 0,00
pH vrednost	5,87 ± 0,00
Aktivnost vode (a_w)	0,963 ± 0,00
IC ₅₀ [mg/mL]	53,64 ± 0,69
Sadržaj askorbinske kiseline [mg/100 g sm]	5,94 ± 0,05
Sadržaj oksalne kiseline [g/100 g sm]	11,39 ± 0,09
Sadržaj mravlje kiseline [g/100 g sm]	0,38 ± 0,01
Sadržaj mlečne kiseline [g/100 g sm]	0,72 ± 0,02
Sadržaj sirćetne kiseline [g/100 g sm]	0,50 ± 0,08
Sadržaj ćilibarne kiseline [g/100 g sm]	0,95 ± 0,02
Tekstura (prodorna sila) [g]	318,10 ± 42,08
Sadržaj biogenih amina [mg/kg]	nd*

*nije detektovano