



UNIVERZITET U NOVOM SADU
Tehnološki fakultet Novi Sad

**BIOLOŠKA AKTIVNOST FERMENTISANIH MLEČNIH
NAPITAKA DOBIJENIH PRIMENOM KOMBUHE I
KONVENCIONALNIH STARTER KULTURA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof.dr **Spasenija Milanović**

Kandidat:
Dajana Hrnjez, dipl. inž.-master

Novi Sad, 2015. godina

Zahvaljujem se svima koji su mi na bilo koji način pomogli i olakšali rad na izradi ove disertacije i koji su svojim zalaganjem i nesebičnim trudom doprijeteli da ona ugleda svjetlost dana.

Srdačno se zahvaljujem mentoru i članovima Komisije na razumijevanju, korektnom i profesionalnom odnosu.

Sa posebnim zadovoljstvom se zahvaljujem mentoru: Prof. dr Spaseniji Milanović koja me je strpljivo i pažljivo usmeravala u radu i profesionalnom razvoju. Posebno se zahvaljujem na ukazanom poverenju, neizmjerljivoj podršci kao i na prijateljskim savjetima i prenetom optimizmu.

Zahvaljujem se koleginicama Dr Žužani Vaštag, Dr Tatjani Tasic i Jeleni Tomić na posvećenom vremenu, spremnosti i otvorenosti za profesionalnu saradnju.

Posebno se zahvaljujem svojoj porodici, Vladimiru i prijateljima na bezuslovnom razumijevanju, nemjerljivoj moralnoj podršci i ljubavi jer oni su zaslužni za sve što danas jesam.

Rezultati ove doktorske disertacije dio su projekta 999 46009 finansiranog od strane ministarstva Prosvete, Nauke i Tehnološkog razvoja republike Srbije.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
NAZIV FAKULTETA: TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dajana Hrnjez
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Spasenija Milanović, redovni profesor
Naslov rada: NR	Biološka aktivnost fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih primenom kombuhe i konvencionalnih starter kultura
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bul. Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 6/ 149 stranica / 42 slike / 42 tabele/ 243 reference/)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Fermentisani mliječni napici, kombuha, antioksidativni potencijal, ACE-inhibicija, biološka aktivnost, stepen proteolize, biogeni amini
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. Cara Lazara 1 2, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Proizvodnja fermentisanih mliječnih napitaka unapreijedenih funkcionalnih karakteristika postala je jedan od glavnih fokusa u industriji prerade mlijeka. Cilj doktorske disertacije je ispitivanje biološke aktivnosti fermentisanih mliječnih napitaka dobijenih primjenom nekonvencionalne starter kulture, kombuhe (kultivisane na crnom čaju zaslađenim saharozom u koncentraciji od 10%) i poređenje sa karakteristikama proizvoda dobijenih primenom konvencionalnih starter kultura, jogurtne odnosno probiotske, tokom skladištenja. Za fermentaciju je korišćeno mlijeko sa 2,8% mliječne masti na temperatura 42°C.</p> <p>Promjene tokom fermentacije mlijeka primjenom kombuhe i konvencionalnih starter kultura praćene su određivanjem stepena proteolize, sadržaja laktoze, D-galaktoze, D-glukoze i D-fruktoze i masnih kiselina pri sledećim pH vrijednostima: 6,4; 6,0; 5,5; 5,0 i 4,6. Promjene antihipertenzivne aktivnosti (AKE inhibitorna aktivnost), antioksidativne aktivnosti (ABTS i DPPH metod) kao i promjene stepena proteolize, reoloških i senzornih karakteristika sve tri vrste fermentisanih mliječnih napitaka praćene su tokom 21-og dana skladištenja. Osim toga praćene su i promjene sadržaja šećera, masnih kiselina, minerala (kalcijuma, natrijuma i kalijuma), vitamina C i biogenih amina.</p> <p>Tokom procesa fermentacije mlijeka primjenom različitih starter kultura može se zaključiti da postoji razlika u promjenama udijela pojedinačnih proteinskih frakcija analiziranih metodom kapilarne elektroforeze.</p> <p>Različite starter kulture utiču na različitu AKE inhibitornu aktivnost tokom skladištenja, što ukazuje na različitu proteolitičku aktivnost korišćenih starter kultura. Utvrđeno je da AKE inhibitorna aktivnost raste tokom skladištenja, pri čemu uzorci proizvedeni primjenom kombuhe imaju najveću AKE inhibitornu aktivnost na kraju 14 dana skladištenja i ona iznosi 79,4%, dok su u jogurtu i probiotskom jogurtu te vrijednosti 63,4 i 64,6% redom. Takođe, tokom skladištenja stepen proteolize raste u svim uzorcima sa značajnim međusobnim varijacijama. Antioksidativna aktivnost svih uzoraka opada tokom skladištenja ali je u svim uzorcima zabilježena veća aktivnost na ABTS nego na DPPH slobodne radikale. Nakon 21-og dana skladištenja najveći antioksidativni potencijal određen metodom stabilizacije ABTS⁺ katjona imali su uzorci sa jogurtnom starter kulturom (TEAC vrijednost 8,922 mmolmg⁻¹). U pogledu sastava masnih kiselina, tokom 14 dana skladištenja u kombuha fermentisanim mliječnim</p>

	<p>napicima kao i napicima dobijenim sa jogurtom i probiotskom starter kulturom dolazi do porasta udjela zasićenih (SFA) i opadanje mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Nakon 21-og dana skladištenja sadržaj SFA; MUFA i PUFA u kombuha fermentisanom mliječnom napitku iznosio je 65,94; 30,73 i 3,33% redom, dok su te vrijednosti kod jogurta iznosile 66,02; 30,77 i 3,21% i probiotskog jogurta 66,04; 30,66 i 3,30 % redom. Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje i 14 dana skladištenja imali su uzorci sa kombuha starter kulturom ($0,5457 \pm 0,017 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$). Uzorci dobijeni upotrebom konvencionalnih startera pokazali su bolje reološke osobine pri ispitivanim uslovima tokom 21 dana skladištenja. Kombuha fermentisani mlečni proizvod imao je karakterističan, blago kiseli, osvežavajući ukus i naglašenu aromu.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata biološke aktivnosti i promjena kvaliteta kombuha fermentisanog mliječnog napitka tokom skladištenja, u odnosu na karakteristike proizvoda dobijenih upotrebom konvencionalnih starter kultura može se objasniti opravdanost upotrebe kombuha starter kulture u fermentaciji mlijeka sa ciljem dobijanja novog funkcionalnog fermentisanog mliječnog proizvoda.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	29.10.2014. godine
Datum odbrane: DO	
<p>Članovi komisije: predsednik:</p> <p>član (mentor):</p> <p>član:</p> <p>član:</p>	<p>Dr Marijana Carić, profesor emeritus Univerzitet u Novom Sadu,</p> <p>Dr Spasenija Milanović, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu,</p> <p>Dr Aleksandra Torbica, Naučni savetnik, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Dr Mirela Iličić, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu,</p>

University of Novi Sad
Faculty of technology
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dajana Hrnjez
Mentor: MN	Dr Spasenija Milanović, Full Professor
Title: TI	Biological activity of fermented milk beverages obtained using kombucha and conventional starter culture
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bul.cara Lazara, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	Chapters 6, pages 149, figures 42, tables 42, references 243
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Dairy technology
Subject, Key words SKW	Fermented milk beverages, kombucha, antioxidative potential, ACE inhibitory activity, degree of proteolysis, biogenic amines

UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, bul. Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Nowadays, production of fermented dairy products with elevated benefits on human health has become one of the major focus in dairy industry. The aim of the PhD thesis is to examine the biological activity of fermented milk products obtained using non-conventional starter culture kombucha (cultivated on black tea with 10% of sucrose) and comparison with products obtained by conventional starter cultures, probiotic/yoghurt during storage. Milk with 2.8% of milk fat was used for the samples production at temperature of 42 °C.</p> <p>The changes of components content during the milk fermentation by kombucha and conventional starter cultures were monitored at the following pH values: 6.4; 6.0; 5.5; 5.0 and 4.6., by determining the degree of proteolysis, lactose, D-galactose, D-glucose and D-fructose, fatty acids. The antihypertensive activity (ACE inhibitory activity), antioxidant activity (ABTS and DPPH tests) and the degree of proteolysis, sensory and rheological characteristics of all three types of fermented milk products were observed during 21 days of storage. Moreover, the chemical qualities of samples were monitored analyzing the contents of sugars, fatty acids, minerals (calcium, sodium and potassium), vitamin C and biogenic amines.</p> <p>There were differences in protein fractions (analyzed by capillary electrophoresis) of products obtained by using different starter cultures during the milk fermentation. Different starter cultures affect different ACE inhibitory activity during the storage, which implies different proteolytic activity of used starter cultures. It has been found that the ACE inhibitory activity was increased during the storage; wherein the samples obtained using kombucha starter culture have the highest ACE inhibitory activity at the 14th day of storage, 79.4%, while in yogurt and probiotic yoghurt it was 63.4 and 64.6% respectively. Also, the degree of proteolysis during the storage was increased in all samples with significant mutual variations. In all products, higher ABTS than 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was determined, while both activities slightly decreased during the storage. The antioxidant activity of all samples decreases during storage. After 21 days of storage, the highest antioxidant potential, determined by the ABTS^{·+} method had a yoghurt samples (TEAC value of 8.922 mmolmg⁻¹). In terms of the fatty acids composition during 14 days of storage in all type of fermented dairy products relative content of SFA (saturated fatty acids - SFA) increased, while relative contents of MUFA (monounsaturated fatty acids) and PUFA (polyunsaturated fatty acids) decreased during that period of storage. After 21 days of storage the content of SFA; MUFA and PUFA in kombucha fermented milk</p>

	<p>product was 65.94; 30.73 and 3.33% respectively. In yogurt sample their content was 66.02, 30.77 and 3.21%, while in probiotic 66.04; 30.66 and 3.30% respectively. In all fermented milk products, long chain fatty acids were dominant with a total share of about 45% in all varieties of fermented dairy products. The highest content of vitamin C after production and 14 days of storage was in samples obtained by kombucha starter culture ($0.5457 \pm 0.017 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$). Samples obtained by conventional starter showed better overall rheological properties at the tested conditions for 21 days of storage. Kombucha fermented milk product had a characteristic, distinctive mild sour, refreshing taste and conspicuous aroma.</p> <p>The obtained results of biological activity and the quality of kombucha fermented milk products during storage in comparison to the same characteristics of the products obtained using conventional starter culture, could explain that kombucha is convenient starter for milk fermentation with the aim of obtaining new functional fermented milk products with pronounced bioactive characteristics and distinctive sensory and rheology properties.</p>
Accepted on Senate on: AS	29.10.2014.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB President: Member (mentor): Member: Member:	Marijana Carić, Ph.D., Professor Emeritus, University of Novi Sad Spasenija Milanović, Ph.D., Full Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad Aleksandra Torbica, Ph.D., Reserach Associate, Institute of Food Technology, University of Novi Sad Mirela Iličić, Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
NUTRITIVNA VRIJEDNOST MLIJEKA.....	3
Makronutrijenti mlijeka.....	3
Proteini.....	3
Ugljeni hidrati.....	6
Lipidi.....	6
Mikronutrijenti mlijeka.....	11
Vitamini.....	11
Minerali.....	11
FERMENTISANI MLIJEČNI PROIZVODI.....	13
Vrste i klasifikacija proizvoda.....	13
Starter kulture za fermentaciju mlijeka.....	14
FUNKCIONALNE KOMPONENTE FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA.....	21
BIOAKTIVNI PEPTIDI.....	23
Vrste i podjela.....	23
Mehanizmi nastanka bioaktivnih peptida.....	24
Struktura i funkcija bioaktivnih peptida.....	27
Mliječni proizvodi kao izvori biološki aktivnih peptida.....	28
Antihipertenzivni i antikoagulatorni peptidi.....	31
ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA.....	37
Slobodni radikali i antioksidativni odbrambeni sistem.....	37
Antioksidativni potencijal.....	40
ZDRAVSTVENI ASPEKT FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA.....	45
Koncept funkcionalne hrane.....	45
Netolerancija na laktozu.....	45
Apsorpcija minerala.....	46
Uticaj na gastrointestinalni trakt.....	46
Antikancerogeno dejstvo.....	47
KOMBUHA SASTAV I OSOBINE.....	48
Funkcionalne karakteristike i biološki potencijal kombuha napitaka.....	51
Primjena kombuhe u tehnologiji fermentisanih mliječnih napitaka.....	54

3. MATERIJAL I METODI RADA.....	57
MATERIJAL.....	57
Mlijeko.....	57
Starter kulture.....	57
Jogurtna starter kultura.....	57
Probiotska starter kultura.....	57
Inokulum kombuhe.....	57
PROIZVODNJA FERMENTISANIH MLIJEČNIH NAPITKA.....	58
Eksperiment I.....	58
Eksperiment II.....	58
METODI RADA.....	60
Analiza inokuluma kombuhe.....	60
Analiza mlijeka i fermentisanih mliječnih napitaka.....	61
Osnovne hemijske analize.....	61
Sadržaj šećera.....	61
Sadržaj mineralnih materija Ca, Na i K.....	62
Sastav masnih kiselina.....	62
Sadržaj vitamina C.....	63
Sadržaj biogenih amina.....	64
Određivanje stepena proteolize –TCA metod.....	65
Određivanje stepena proteolize –SDS-PAGE kapilarna elektroforeza.....	65
Određivanje antioksidativne aktivnosti uz pomoć (DPPH) testa radikalne inhibicije.....	66
Određivanje antioksidativne aktivnosti uz pomoću ABTS ⁺ radikal katjon dekolizacionog testa.....	67
Inhibitorna aktivnost angiotenzin I konvertujućeg enzima (AKE I).....	67
Teksturalne karakteristike.....	68
Viskozitet.....	68
Senzorna analiza.....	69
Instrumentalno određivanje boje.....	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
EKSPERIMENT I.....	70
Fizičko- hemijske karakteristike.....	70
pH vrijednost.....	70
Stepen proteolize- SDS PAGE kapilarna elektroforeza.....	71
EKSPERIMENT II.....	73
FIZIČKO- HEMIJSKE KARAKTERISTIKE SIROVINA I PROIZVODA.....	73

Karakteristike mlijeka	73
Karakteristike inokuluma kombuhe	73
Karakteristike fermentisanih mliječnih napitaka nakon proizvodnje.....	74
PROMJENE KOMPONENTA TOKOM PROCESA FERMENTACIJE	75
pH vrijednost	75
Stepen proteolize	77
TCA metod	77
SDS-PAGE kapilarna elektroforeza	78
Šećeri	82
Masne kiseline	83
PROMJENE KOMPONENTATA TOKOM SKLADIŠTENJA	88
pH vrijednost i fizičko-hemijske karakteristike.....	88
Stepen proteolize	90
TCA metod	90
SDS-PAGE kapilarna elektroforeza	92
Masne kiseline	96
Biogeni amini	101
Šećeri	103
Vitamin C	105
Minerali	106
PROMJENE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI TOKOM SKLADIŠTENJA.....	107
Inhibitorna aktivnost Angiotenzin konvergirajućeg enzima (AKE)	107
Antioksidativna aktivnost	110
PROMJENE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA TOKOM SKLADIŠTENJA.....	113
Viskozitet	113
Teksturalne karakteristike	119
PROMJENE SENZORNIH KARAKTERISTIKA TOKOM SKLADIŠTENJA	123
Analiza boje	123
Senzorna ocijena	125
5. ZAKLJUČCI	127
6. LITERATURA	130

1.UVOD

Prvobitna funkcija fermentacije mlijeka bila je da produži rok trajanja proizvoda, a pored toga postignute su mnoge prednosti kao što su poboljšanje svarljivosti i ukusa, kao i mogućnost proizvodnje širokog spektra različitih proizvoda. Potrošnja jogurta, kao proizvoda visoke nutritivne ima dugu tradiciju u mnogim zemljama. Danas je dobijanje širokog asortimana fermentisanih mliječnih proizvoda sa dodatnim, povećanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima jedan od glavnih pravaca istraživanja u tehnologiji mlijeka i mliječnih proizvoda. Aktuelni trendovi na tržištu fermentisanih mliječnih proizvoda baziraju se na dodacima različitih funkcionalnih (aktivnih) sastojaka, kao što su vitamini, probiotici, prebiotici (Mattila-Sandholm i sar. 2002; Tamime 2006). Zahvaljujući visoko vrijednim proteinima mlijeka i produktima fermentacije (laktata, acetata, diacetila, acetaldehida, etanola, organskih kiselina ugljendioksida i dr.), jogurt predstavlja idealan proizvod koji može da zadovolji sve nutritivne i funkcionalne zahteve u pogledu aktivnih komponenata i kao proizvod široke upotrebe zauzima posebno mjesto u razvoju fermentisanih mliječnih proizvoda. Novija istraživanja su fokusirana na ispitivanja bioaktivnih komponenata fermentisanih mliječnih proizvoda, kao što su bioaktivni peptidi. Proteini mlijeka su poznati prekursori peptida koji imaju značajne antioksidativne, antihipertenzivne, antimikrobne, imunomodulatorne, antikancerogene i opioidne aktivnosti (Korhonen 2009). Bioaktivni peptidi nastaju kao produkti fermentacije mlijeka djelovanjem proteolitičkih starter kultura ili dodavanjem proteolitičkih enzima. Količina ovih peptida u finalnim proizvodima prije svega zavisi od proteolitičke aktivnosti mikroorganizama koji učestvuju u fermentaciji mlijeka kao i od aktivnosti dodatog proteolitičkog enzima. Do sada su u fermentisanim mliječnim proizvodima, kao što su sir i jogurt, najviše proučavani peptidi sa potencijalnim antihipertenzivnim (angiotenzin I konvertujući enzim, ACE inhibitor) i antioksidativnim potencijalom. Sa druge strane, istraživanje upotreba nekonvencionalnih starter kultura pruža veliku mogućnost u pogledu proizvodnje različitih vrsta fermentisanih mliječnih napitaka sa poželjnim tehnološkim, nutritivnim, senzornim i funkcionalnim karakteristikama. Starter kulture višestruko utiču na fizička, nutritivna i senzorna svojstva fermentisanih mliječnih napitaka; poboljšavaju reološke i doprinose dijetetskim i funkcionalnim svojstvima (Shah i sar. 2002; Tamime 2006). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da vrsta simbioze kvasaca (*Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Brettanomyces*, *Torulasporea* i *Candida*) i bakterija sirćetne kiseline (*Acetobacter* i *Gluconobacter*) poznata pod nazivom kombuha može uspešno da se primijeni

kao nekonvencionalni starter u tehnologiji funkcionalnih fermentisanih mliječnih napitaka (Milanović i sar. 2008; Malbaša i sar. 2009). Najnovija istraživanja mikrobiološkog sastava kombuhe ukazuju na značajno prisustvo bakterija mliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, čija se koncentracija tokom fermentacije zaslađenog čaja od 3-10 dana povećava za 3.3%, ili čak za 39.4% u određenim čajnim napicima (Marsh i sar. 2014). Marsh i sar. (2014) su ustanovili da je *Gluconobacter* dominantan bakterijski rod u simbiozi dok je od kvasaca najzastupljeniji rod *Zygosaccharomyces*. Isti autori su takođe pokazali značajan uticaj povećane koncentracije bakterija mliječne kiseline, *Lactobacillus*-a na brži rast roda *Gluconobacter*-a, što doprinosi produkciji određenih metabolita. Kombuha se tradicionalno koristi za fermentaciju zaslađenog crnog čaja, pri čemu se dobija osvježavajući, blago gazirani napitak poznat po terapijskim svojstvima posebno u slučajevima oboljenja organa za varenje, dijabetesa, visokog nivoa holesterola, visokog krvnog pritiska, u borbi protiv stresa i kancera, itd (Sreeramulu i sar. 2001; Battikh i sar. 2012; Bhattacharya i sar. 2013; Srihari i sar. 2013).

Shodno dosadašnjim ispitivanjima biološki aktivnih komponenata kombuhe (Sreeramulu i sar. 2001; Bhattacharya i sar. 2011; Battikh i sar. 2012; Bhattacharya i sar. 2013; Srihari i sar. 2013) i njihovog terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje, primjena kombuhe u tehnologiji fermentisanih mliječnih napitaka, sa ciljem dobijanja funkcionalnog fermentisanog napitka predstavlja veoma interesantnu oblast za istraživanje.

S obzirom na značaj bioaktivnih komponenata mlijeka, prije svega proteina mlijeka, kao i kombuha čajnog napitka i specifičan tip fermentacije laktoze kombuhom, cilj ove disertacije je utvrđivanje funkcionalnih karakteristika novodobijenog napitka kao izuzetno važnog segmenta za implementaciju i plasiranje proizvoda na tržište. Stoga će se determinisati uticaj proteolitičke aktivnosti startera na komponente mlijeka tokom fermentacije i pratiti promjene biološke aktivnosti, senzornih i reoloških karakteristika dobijenog fermentisanog mliječnog napitka tokom skladištenja. Takođe, utvrdiće se sličnosti i razlike u datim osobinama između kombuha fermentisanog mliječnog napitka i proizvoda tipa jogurt i probiotski jogurt.

2. PREGLED LITERATURE

NUTRITIVNA VRIJEDNOST MLIJEKA

Mlijeko kao biološka tečnost složenog sastava, nutritivno je visoko vrijedna namirnica, jer sadrži gotovo sve energetske, gradivne i zaštitne materije u takvom kvantitativnom odnosu da ih ljudski organizam može optimalno da iskoristi (Carić i Milanović 1997). Koncept mlijeka kao biološki aktivnog fluida, koji pored nutritivnih vrijednosti putem velikog broja biohemijskih puteva, štiti organizam od štetnih spoljašnih uticaja poznat je još od davnina. Međutim, identifikacija biološki aktivnih komponenata koji doprinose održavanju i poboljšanju ljudskog zdravlja, kao i razvoj novih proizvoda baziranih na ovim komponentama počeo je intenzivno da se razvija tek u novije vrijeme. Mlijeko se osim u svježem obliku konzumira i u različitim prerađenim varijantama, čija je osnovna namjena čuvanje nutritivnih sastojaka i produžetak roka trajanja. Između mnoštva drugih proizvoda, jogurt i sir predstavljaju najstariji oblik konzerviranja mlijeka poznat još hiljadama godina unazad (Tamime 2007). Mliječni proizvodi, sir i jogurt predstavljaju važne izvore kalcijuma, kalijuma, fosfora, proteina, vitamina A, vitamina B₁₂, riboflavina B₂ i niacina B₃. Veliki broj najnovijih istraživanja ukazuje na blagotvorno dejstvo fermentisanih mliječnih proizvoda na sniženje nivoa holesterola u krvi (Kawase i sar. 2000) krvnog pritiska (Seppo i sar. 2003), kao i na njihova antikancerogena i osteoprotektivna dejstva (Moller i sar. 2008). Ove osobine i mehanizmi djelovanja pripisuju se bioaktivnim komponentama u mlijeku kao i onim nastalim tokom tehnološkog procesa prerade mlijeka.

Makronutrijenti mlijeka

Proteini

Proteini mlijeka se sastoje od 85% kazeina i 15% proteina surutke (proteini mliječnog seruma) i sadrže svih devet esencijalnih amino kiselina neophodnih za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. Visok nutritivni značaj proteina mlijeka posledica je, ne samo povoljnog aminokiselinskog sastava već i odgovarajućih fizičko-hemijskih karakteristika koje doprinose da mlijeko predstavlja kompletnu hranu (Carić i Milanović 1997). Različite studije su pokazale da pojedinačni proteini imaju niz značajnih funkcija kao

što su oporavak mišića posle sportskih aktivnosti, smanjenje rizika od karijesa kao i sprečavanje kardiovaskularnih oboljenja (Cifelli i sar. 2011).

Kazein

Osnovni protein mlijeka je kazein, koji čini 85% ukupnih proteina. Kazein je složenog sastava i pripada grupi fosfoproteina. Kazein se u mlijeku nalazi u obliku kazeinske micelle. Primarnu strukturu kazeinske micelle predstavljaju 4 genetska produkta α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ -kazein i nekoliko minornih proteina koji su derivati nastali post-transkriptivnom proteolizom primarnog kazeina endogenom alkalnom proteinazom mlijeka–plazminom. Jedinstvene osobine kazeinske micelle su rezultat post-translatornih modifikacija kojima su sve kazeinske frakcije fosforilisane do određenog stepena. Ova osobina je posebno bitna kod formiranja kazeinske micelle i kasnije tokom njenih promjena usled dejstva proteolitičkih enzima. Zbog različitog aminokiselinskog sastava sve komponente kazeinske micelle su veoma reaktivne i podležu međusobnim interakcijama na bazi vodoničnih, hidrofobnih, elektrostatičkih i disulfidnih veza (Farrell 2011).

Proteini surutke

Proteini surutke pripadaju globularnim proteinima, čine oko 20% ukupnih proteina, ali proporcionalno sadrže veću količinu esencijalnih aminokiselina. Od ukupnih proteina surutke najzastupljeniji su β -laktoglobulin (50%) i α -laktalbumin (20%) kao genetski proizvodi mliječne žlijezde. Biološka vrijednost proteina surutke iznosi 100, dok je biološka vrijednost kazeina niža i iznosi 69. Veća biološka vrijednost proteina surutke potiče od većeg udjela lizina (40% više) i tioaminokiselina (2,5 puta više) (Tratnik i sar., 2012). Pored toga odnos cistein/metionin u proteinima surutke je 10 puta veći u odnosu na one u kazeinu, što povećava njihovu bioiskoristivost. Ukupna biološka vrijednost proteina mlijeka je visoka i iznosi 90, zbog čega se i svrstavaju u grupu biološki najvrijednijih proteina hrane. Proteini mlijeka, posle proteina jaja, predstavljaju jednu od najvrijednijih nutritivnih komponenata, jer sadrže sve esencijalne aminokiseline neophodne za normalan rast i razvoj ljudskog organizma (Carić i Milanović 1997).

Tabela 1. Hemijski sastav frakcija kazeina i proteina surutke u mlijeku evropskih rasa goveda (Swaisgood 1986. Tratnik 2012).

Amino-kiselina	α_{s1} -Kazein B	α_{s1} -Kazein A	K-Kazein B	β -Kazein A ²	γ_1 -kazein A ²	γ_2 -kazein A ²	γ_3 -kazein A	β -LG A	α -LA B
Asp	7	4	4	4	4	4	2	11	9
Asn	8	14	7	5	3	1	1	5	12
*Thr	5	15	14	9	8	4	4	8	7
Ser	8	6	12	11	10	7	7	7	7
SerP	8	11	1	5	1	0	0	0	0
Glu	24	25	12	18	11	4	4	16	8
Gln	15	15	14	21	21	11	11	9	5
Pro	17	10	20	35	34	21	21	8	2
Gly	9	2	2	5	4	2	2	3	6
Ala	9	8	15	5	5	2	2	14	3
1/2Cys	0	2	2	0	0	0	0	5	8
*Val	11	14	11	19	17	10	10	10	6
*Met	5	4	2	6	6	4	4	4	1
*Ile	11	11	13	10	7	3	3	10	8
*Leu	17	13	8	22	19	14	14	22	13
*Tyr	10	12	9	4	4	3	3	4	4
*Phe	8	6	4	9	9	5	5	4	4
Trp	2	2	1	1	1	1	1	2	4
*Lys	14	24	9	11	10	4	3	15	12
His	5	3	3	5	5	4	3	2	3
Arg	6	6	5	4	2	2	2	3	1
Pyro Glu	0	0	1	0	5	0	0	0	0
Ukupno (ostaci)	199	207	169	209	104	104	102	162	123
Molarna Masa***	23,612	25,228	19,005	23,98	11,822	11,822	11,557	18,362	14,1

* - esencijalne aminokiseline ***- Molarne mase monomera

 β -LG- beta laktoglobulin, α -LA- alfa laktalbumin

Ugljeni hidrati

Laktoza

Laktoza predstavlja glavni ugljeni hidrat mlijeka i zastupljena je u iznosu od oko 4,8 %. Dugo se smatralo da je ona jedini ugljeni hidrat u mlijeku. Kasnije je ustanovljeno prisustvo cerebrozida, slobodne glukoze i galaktoze, amino-šećera, kao što su heksozamin, o-acetil-laktozamin i oligosaharidi, ali je njihova koncentracija u mlijeku zanemarljiva u odnosu na laktozu. Nutritivna vrijednost laktoze ogleda se u tome što zajedno sa amino-šećerima u gastro-intestinalnom traktu olakšava apsorpciju kalcijuma i ostalih zemnoalkalnih metala, stvarajući sa njima helate i sprečavajući njihovu precipitaciju. Pored toga, usled sporije hidrolize relativno se duže zadržava u crevnom traktu gde dolazi do njene kiselomliječne fermentacije čime se sprečava rast i razvoj patogenih bakterija u crijevnom traktu, poboljšava iskorištenje mliječne masti, učestvuje u sintezi nekih vitamina u crevnom traktu i zbog sporije resorpcije povoljno utiče u dijetalnoj ishrani (Carić i Milanović 1997).

Oligosaharidi

Oligosaharidi predstavljaju klasu bioaktivnih molekula sastavljenih od 3-10 monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnim vezama. Interesovanje za mliječne oligosaharide počelo je sa saznanjem da stimulišu preferencijalni rast korisne mikroflore u gastrointestinalnom traktu (Hugenholtz 2013). Ovo je od izuzetne važnosti za inhibiciju vezivanja patogenih mikroorganizama za epitelne ćelije. Nedavno je u kravljem mlijeku indentifikovano oko 40 slobodnih oligosaharida. Većina oligosaharida sadrži sijalnu kiselinu koja ima funkciju inhibicije vezivanja patogenih mikroorganizama. Pored toga, slični rezultati su dobijeni analizom oligosaharida permeata surutke i polovina ovih oligosaharida je identična onim izolovanim iz humanog mlijeka (Cifelli i sar. 2011).

Lipidi

Najveći dio lipida mlijeka čini mliječna mast (98-99%), zatim fosfolipidi, steroli, liposolubilni pigmenti i vitamini, kao i ostale minorne komponente (Carić i Milanović 1997). Može se uzeti da mlijeko prosečno sadrži oko 3,8% mliječne masti. Nutritivna vrijednost, izgled, tekstura, senzorne karakteristike i stabilnost mlijeka i mliječnih proizvoda je u najvećoj mjeri u korelaciji sa sadržajem i sastavom mliječne masti (Cifelli i sar. 2011). Međutim, to je sastojak čija količina podliježe najvećim varijacijama i u okviru iste rase, pa

čak i kod pojedinih individua u toku istog dana, u toku laktacije i pod uticajem brojnih činilaca koji mogu da utiču na sastav i osobine mlijeka.

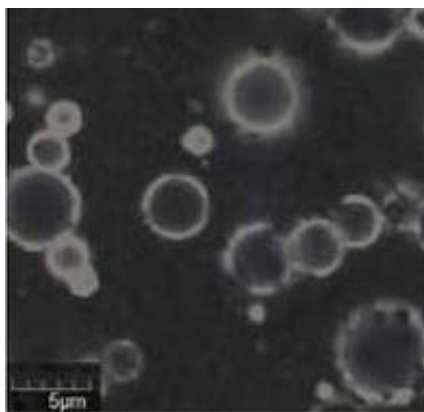
Masti u mlijeku se dijele na proste i složene, prema hemijskom sastavu. Proste masti imaju pretežno energetska vrijednost u organizmu ali takođe i određenu biološku vrijednost dok složene masti imaju pretežno biološki značaj. Najveći dio mliječne masti čine proste masti i one predstavljaju 97-98% ukupnih masnih materija. Proste masti su estri trihidroksilnog alkohola glicerola sa masnim kiselinama. Proste masti zajedno sa fosfolipidima (lecitin, kefalin, sfingomijelin) pripadaju saponifikujućim lipidima, jer zagrijavanje sa bazama dovodi do njihove hidrolize pri čemu nastaju sapuni. Ostali lipidi, steroli (holesterol), karotenoidi (pigmenti) i vitamini rastvorljivi u mastima (A, D, E i K) pripadaju grupi nesaponifikujućih lipida (Đorđević 1982).

Osim što je siromašno nezasićenim masnim kiselinama, mlijeko uobičajno ne sadrži velike količine polinezasićenih masti ali je njihov odnos biološki adekvatan (Cifelli i sar. 2011). Klinička istraživanja su pokazala da ishrana obogaćena zasićenim mastima povećava rizik od hiperholesterolemije (povećanje nivoa low-density lipoprotein (LDL)) a samim tim i od kardiovaskularnih oboljenja. Ipak, obimna retrospektivna epidemiološka istraživanja nisu pokazala uticaj mlijeka i mliječnih proizvoda na povećan rizik od kardiovaskularnih oboljenja. Ovakav uticaj objašnjava se činjenicom da mlijeko sadrži veliku količinu zasićenih masnih kiselina kratkih ili srednje dugih lanaca koje pojedinačno imaju neutralan ili čak pozitivan uticaj na nivo krvnog LDL holesterola. Pored toga mlijeko je najbogatiji prirodni izvor konjugovane linolne kiseline, koja smanjuje rizik od nekoliko tipova kancera i kardiovaskularnih oboljenja. Mlijeko je takođe bogat izvor sfingolipida (prosečno 0,2-1,0% od ukupne količine mliječne masti)

Globule mliječne masti

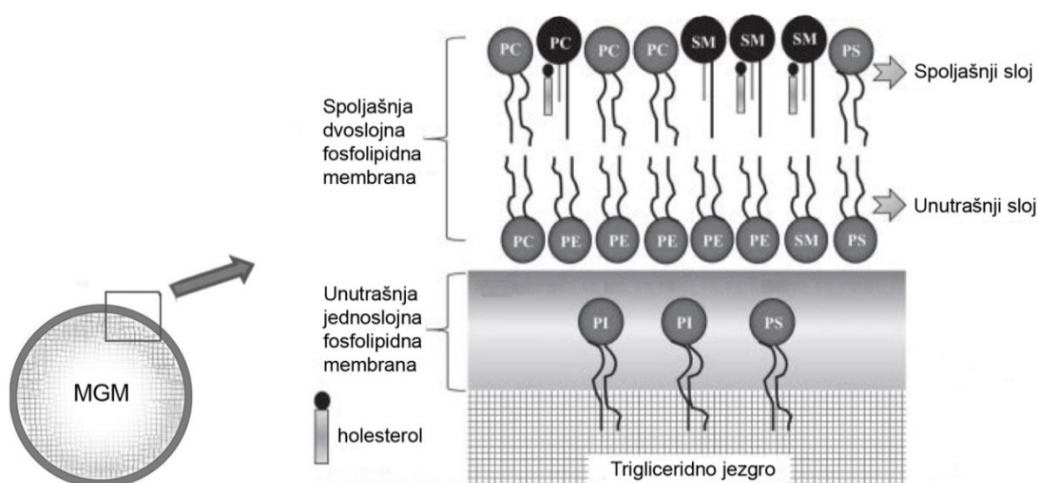
Približno 95% mliječne masti je dispergovano u mlijeku u formi masnih globula (slika 2), dijametra 0,1-20 μm (Fox i McSweeney 1998). U odnosu na veličinu globula mliječne masti dijele se u 3 grupe:

1. submikronske globule (<0,1 μm)
2. globule srednje veličine (1-8 μm)
3. masne globule (>10 μm)



Slika 1. Izgled globula mliječne masti (Chandan i Kilara 2013)

Masne globule u mlijeku se sastoje od jezgra sačinjenog od triglicerida koje je obavijeno sa tankom membranom – membranom masnih globula (MMG), debljine 10 – 20nm. Membrane masnih globula imaju protektivnu ulogu i štite masne globule od koalescencije i enzimske razgradnje. MMG se odlikuju složenom strukturom i sastavom koji pretežno čine polarni lipidi i specifični membranski proteini. Sfingolipidi čine više od 1/3 lipidne frakcije MMG. Komponente koje ulaze u sastav MMG, posebno sfingolipidi i specifični proteini, smatraju se bioaktivnim komponentama koje se odlikuju izraženim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima što je tema brojnih istraživanja poslednjih nekoliko godina. Takođe, pojedine frakcije MMG, usled njihovog specifičnog porijekla, odlikuju se veoma dobrim tehnološkim, posebno emulzifikujućim i stabilišućim, svojstvima (Spitsberg 2005; Dewettinck i sar. 2008), (Miočinović i sar. 2010). što pruža brojne mogućnosti primjene mliječne masti u proizvodnji raznih prehrambenih proizvoda.



Slika 2. Šematski model membrane globula mliječne masti: *PE*-fosfatidiletanolamin, *PC*-fosfatilholin, *PI*-fosfatilinozitol, *PS*-fosfatidilserin, *SM*-sfingomijelin, *MFG*-milk fat-globule (globule mliječne masti) (Zheng i sar. 2014)

MMG pored proteina i fosfolipida, sadrži i trigliceride, masne kiseline, glikoproteine, holesterol, enzime i druge komponente u malom procentu. Odnos komponenta koji učestvuju u izgradnji MMG-a, dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Sastav membrane globula mliječne masti (Chandan i Kilara 2013)

Gradivne jedinice	Sadržaj
proteini	25-60% mase
ukupni lipidi	0,5-1,1 mgmg ⁻¹ proteina
neutralni lipidi	0,25-0,88 mgmg ⁻¹ proteina
fosfolipidi	0,13-0,34 mgmg ⁻¹ proteina
glikofosfolipidi	13 μgmg ⁻¹ proteina
heksaze	108 μgmg ⁻¹ proteina
heksaamini	60 μgmg ⁻¹ proteina
sijalinske kiseine	20 μgmg ⁻¹ proteina
RNK	20 μgmg ⁻¹ proteina
glikoaminoglikani	0,1 μgmg ⁻¹ proteina

Masne kiseline

Najveći dio masnih kiselina (MK) u mliječnoj masti inkorporiran je u proste masti (trigliceride) koji čine 97-98% mliječne masti. Takođe one su gradivne jedinice i fosfolipida i sterola. Sastav masnih kiselina u trigliceridima, kao i sastav mliječne masti zavisi od mnogo faktora, tako npr. godišnje doba direktno utiče na sadržaj zasićenih masti (u zimskom periodu je viši u odnosu na letnji period) (Eskin i Shahidi 2012). U kravljem mlijeku se nalazi više od 437 komponenata, zbog čega je mlijeko proizvod sa najraznovrsnijim profilom masnih kiselina od čega 69% čine zasićene MK (Patton i Jensen 1975). U tabeli 3 dat je sastav i sadržaj MK u kravljem mlijeku. Eskin i Shahidi (2013), navode da dugolančane, više masne kiseline (sa 14-23 C-atoma) čine 85%, a kratkolančane (niže masne kiseline, sa 4-6 C-atoma) 15% ukupnih MK. *Cis*-oleinska kiselina je najznačajnija *cis*-nezasićena masna kiselina. Linolna i α -linoleinska su najvažnije *cis*-polinezasićene MK, jer spadaju u esencijalne MK, koje se ne mogu sintetisati u ljudskom organizmu. Termin esencijalna se proširio i na derivate ovih kiselina (C20:5 i C22:6). Značaj konjugovane linolne kiseline je predmet istraživanja velikog broja naučnika.

Prisustvo *trans*-nezasićenih masnih kiselina objašnjava se nepotpunom biohidrogenacijom nezasićenih lipida u buragu preživara. *Trans*-masti privlače pažnju javnosti zbog negativnih uticaja na ljudsko zdravlje. Naime, postoji sumnja da *trans*-18:1 MK

može dovesti do povećanja lošeg, holesterola (LDL) i smanjenja dobrog, holesterola (HDL-high-density lipoprotein), što se negativno odražava na LDL : HDL odnos. Sadržaj *trans*-masti zavisi od ishrane goveda (koncentracija može varirati od 2 do 6 %). Uočeno je da svježja trava umanjuje stepen biohidrogenacije u buragu, što dovodi do povećanja sadržaja *trans*-masti. Zato je u zimskom periodu, kada se u ishrani koriste koncentрати i silaža, znatno povoljniji njihov sadržaj (Fox i McSweeney 2007).

U strukturi polarnih lipida MMG, najviše su zastupljene nezasićene masne kiseline. Glicerofosfolipidi su naročito bogati nezasićenim MK koje imaju nisku tačku topljenja i bitno utiču na regulaciju fluidnosti membrane masnih globula. To su najčešće 18:1, 18:2 i 18:3 masne kiseline. Fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI) i fosfatidilserin (PS) sadrže uglavnom nezasićene MK, dok fosfatidilholin (PC) sadrži u većem stepenu zasićene masne kiseline (16:0). Sfingolipidi, većinom sfingomijelin (SM), sadrže MK sa visokom tačkom topljenja (16:0, 22:0, 23:0, 24:0) (Lopez i sar. 2011).

Tabela 3. Sastav masnih kiselina u kravljem mlijeku (Eskin i Shahidi 2012)

Masna kiselina (MK)	Prosječan sadržaj (%)
4:0	4,4
6:0	2,4
8:0	1,4
10:0	2,7
12:0	3,3
14:0	10,9
15:0	0,9
16:0	30,6
17:0	0,4
18:0	12,2
20:0	0,2
Ukupne zasićene MK	69,4
10:1	0,3
14:1	0,8
16:1	1,0
17:1	0,1
18:1	22,8
Ukupne mononezasićene cis-MK	25,0
18:2	1,6
18:3	0,7
Ukupne polinezasićene cis-MK	2,3
16:1t	0,4
18:1t	2,1
18:2t	0,2
Ukupne polinezasićene trans-MK	2,7

Mikronutrijenti mlijeka

Vitamini

Po broju individualnih vitamina u mlijeku može se reći da je bogato vitaminima, ali ako se posmatra sa aspekta zadovoljenja dnevnih potreba, sadržaj varira u zavisnosti od vrste vitamina. U mlijeku su prisutni kako vitamin A tako i njegovi prekursori karotenoidi. Kako je vitamin A liposolubiln, njegov sadržaj varira u zavisnosti od sadržaja masti u mlijeku i mliječnim proizvodima. Takođe, liposolubilni vitamini D, E i K su prisutni u malim količinama u mlijeku i mliječnim proizvodima. Mlijeko je bogato vitaminima grupe B, pa je konzumiranjem mlijeka moguće gotovo u potpunosti zadovoljiti dnevne potrebe tiamina (B₂) i kobalamina (B₁₂) neophodnog za razvoj nervnih ćelija i crvenih krvnih zrnaca (Carić i Milanović 1997). Sadržaj vitamina u mlijeku dat je u tabeli 4.

Tabela 4. Sadržaj vitamina u mlijeku (Carić i Milanović 1997)

Vrsta vitamina	Sadržaj u 100 g	
	Srednja vrijednost	Opseg variranja
Vitamin A (mg)	0,030	0,022-0,033
Karotin (mg)	0,023	0,020-0,025
Vitamin D (µg)	0,09	0,008-0,20
Vitamin E (mg)	0,070	-
Vitamin K (µg)	-	0,04-16,6
Vitamin B ₁ (mg)	0,036	0,03-0,04
Vitamin B ₂ (mg)	0,18	0,10-0,20
Nikotin amid (mg)	0,087	0,066-0,11
Pantotenska kiselina (mg)	0,35	0,28-0,42
Vitamin B ₆ (mg)	0,049	0,006-0,067
Biotin (µg)	3,5	2,0-5,0
Folna kiselina (µg)	1,8	0,37-2,1
Vitamin B ₁₂ (µg)	0,54	0,36-0,76
Vitamin C (mg)	1,47	0,20-2,50

Minerali

Mlijeko i mliječni proizvodi su važan izvor neophodnih minerala. Najvažnije su soli mlijeka hloridi, fosfati i citrati koji se nalaze u ravnoteži sa kalcijumom, magnezijumom i

kalijumom. Ovi mikroelementi imaju višestruki značaj u ljudskom organizmu. Regulišu aktivnost enzima, acido-baznu ravnotežu i osmotski pritisak i olakšavaju transfer esencijalnih jedinjenja kroz ćelijsku membranu. Najvrijednijim mineralnim materijama u mlijeku sa nutritivnog aspekta, smatraju se kalcijum i fosfor, jer se nalaze u istom odnosu kao i u skeletu, pa je samim tim njihovo iskorištenje i najveće. Sadržaj gvožđa u mlijeku je izuzetno nizak, stoga se čine napori da se mlijeko i mliječni proizvodi obogate u skladu sa dnevnim potrebama ljudskog organizma u gvožđu (Carić i Milanović 1997). U mlijeku se nalaze i minerali u tragovima, a od njih najveći dio pripada cinku i selenu. Konzumiranjem jedne porcije mlijeka (224 ml) zadovoljava se 37% dnevnih potreba cinka, kao konstituenta oko 100 enzima i 50% dnevnih potreba selena zaduženog za uklanjanje reaktivnih kiseoničnih radikala (Cifelli i sar. 2011). Mineralne materije u mlijeku (Tabela 5) mogu se nalaziti u obliku:

- jona;
- više i manje rastvorljivih, ali nedisociranih soli;
- neorganskih ili organskih soli;
- nerastvorljivih soli;
- adsorbovanih elemenata ili jona i
- kao sastojci prostetskih grupa (Cifelli i sar. 2011).

Tabela 5. Sadržaj minerala u mlijeku (Carić i Milanović 1997)

Minerali	Sadržaj u 100 g	
	Srednja vrijednost	Opseg variranja
Natrijum	47 mg	32-54 mg
Kalijum	155 mg	147-160 mg
Magnezijum	-	9,2-23,6 mg
Kalcijum	128 mg	126-130 mg
Mangan	0,003 mg	0,002-0,004 mg
Gvožđe	0,14 mg	0,07-0,24 mg
Kobalt	0,072 µg	0-0,23 µg
Bakar	0,026 mg	0,02-0,03 mg
Cink	0,35 mg	0,10-0,50 mg
Fosfor	87,3 mg	80,2-94,4 mg
Fluorid	0,020 mg	0,006-0,033 mg
Hlorid	90,1 mg	87,5-92,7 mg
Jodid	11,3 µg	3,5-102 µg

FERMENTISANI MLIJEČNI PROIZVODI

Vrste i klasifikacija proizvoda

Istorijski se fermentacija mlijeka može pratiti unazad do oko 10 000 godina pne. Vrlo je vjerovatno da je fermentacija u početku nastala spontano kao posledica djelovanja autohtone mikroflore mlijeka (Tamime i Robinson 2007). Danas su fermentisani mliječni proizvodi važna komponenta ishrane. Pored jogurta, postoje i brojne vrste fermentisanih mlijeka proizvedenih u različitim djelovima svijeta. Širom svijeta, oko 400 imena primenjuju se za različite fermentisane mliječne proizvode dobijene tradicionalnim i industrijskim postupkom (Surono i Hosono 2011). Fermentisani mliječni proizvodi obuhvataju veliku grupu proizvoda koji se međusobno razlikuju prema vrsti, tipu fermentacije, sadržaju mliječne masti, konzistenciji, vrsti dodataka i dr. (Carić 1997; Tamime i Robinson 2007). Svaka vrsta fermentisanog mlijeka uključuje specifične mikroorganizme, zasnovane prvenstveno na optimalnim uslova rasta starter kulture (tj. mezofilna i termofilna mikroflora); kao i određenu vrstu mlijeka od kojeg su dobijeni (Surono i Hosono 2011).

Klasifikacija fermentisanih mliječnih proizvoda može se izvršiti prema:

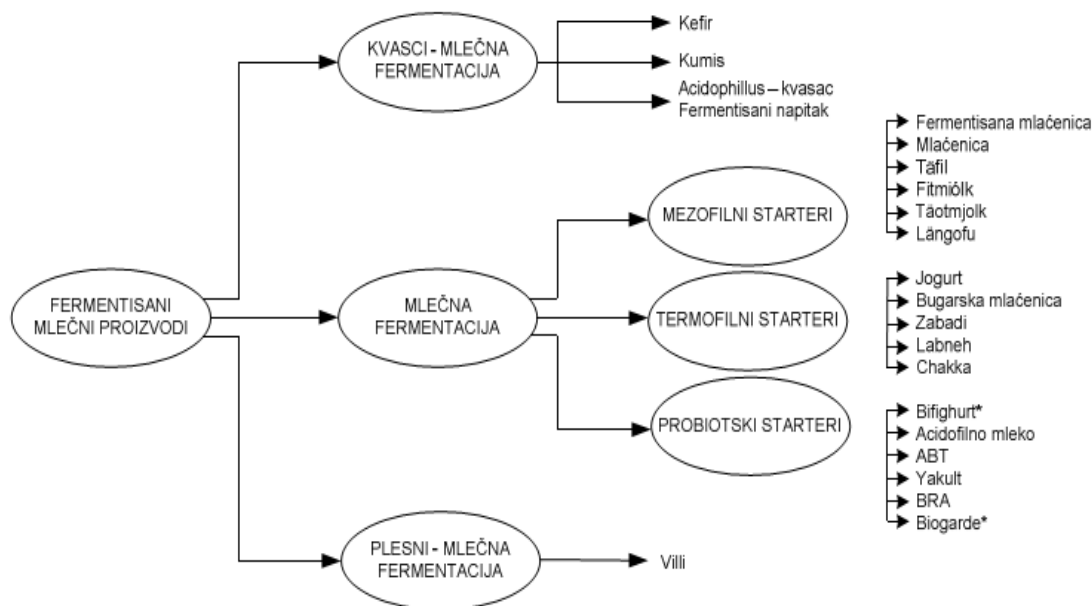
- porijeklu sirovine: mlijeko krave, ovce, koze, kobile i dr.;
- hemijskom sastavu sirovine: punomasno mlijeko, standardizovano na određeni procenat masti i/ili obogaćeno proteinima, mlaćenica;
- vrsti fermentacije: homofermentativna i heterofermentativna;
- načinu obrade mlijeka: pasterizovano, homogenizovano i nehomogenizovano;
- konzistenciji: čvrsta ili tečna, u zavisnosti od toga da li je punjenje u ambalažu obavljeno prije ili poslije fermentacije;
- dodacima: za poboljšanje konzistencije i povećanje suve materije; aromatični dodaci, vitamini, mineralne materije i proteini za poboljšanje nutritivne i biološke vrijednosti.

Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mlijeka i starter kultura (33/2010, 69/2010 i 43/2013) fermentisani proizvodi od mlijeka proizvode se fermentacijom mlijeka (kravljeg, ovčijeg, kozjeg i bivoljeg mlijeka ili njihove miješavine) i proizvoda od mlijeka dobijenih isključivo od mlijeka, kojima je dozvoljeno dodavanje sastojaka potrebnih za njihovu proizvodnju, pod uslovom da ti sastojci nisu dodati kako bi djelimično ili potpuno zamijenili

bilo koju mliječnu komponentu, primjenom starter kultura za proizvode od mlijeka. Fermentisani proizvodi od mlijeka proizvode se i nalaze na tržištu kao:

- jogurt;
- kiselo mlijeko;
- fermentisani proizvodi od mlijeka sa probiotskim bakterijama;
- kefir;
- ostali fermentisani proizvodi od mlijeka;
- fermentisani mliječni napici.

Codex Alimentarius Commission i International Dairy Federation (IDF) su definisali internacionalne standarde za fermentisane mliječne proizvode. Prema ovim standardima fermentisani mliječni proizvodi sa minimalnim sadržajem proteina od 2,7% se klasifikuju kao jogurt, kefir, kumis i specifični fermentisani mliječni proizvodi dok se oni sa minimalnim sadržajem proteina od 5.6% klasifikuju kao koncentrovani fermentisani proizvodi (*stagisto-strained yoghurt, labneh, ymer i ylette*). Prema ovim standardima aromatizovani fermentisani mliječni proizvodi su definisani kao proizvodi koji mogu da sadrže najviše 50% dodatka. Šema klasifikacije fermentisanih mliječnih proizvoda data je na slici 3.



Slika 3. Šema klasifikacije fermentisanih mliječnih proizvoda (Tamime i Robinson 1999)

Starter kulture za fermentaciju mlijeka

Starter kulture putem 470 različitih metaboličkih interakcija obezbjeđuju različite metabolite koji imaju višestruku ulogu u formiranju fizičko-hemijskih i senzornih

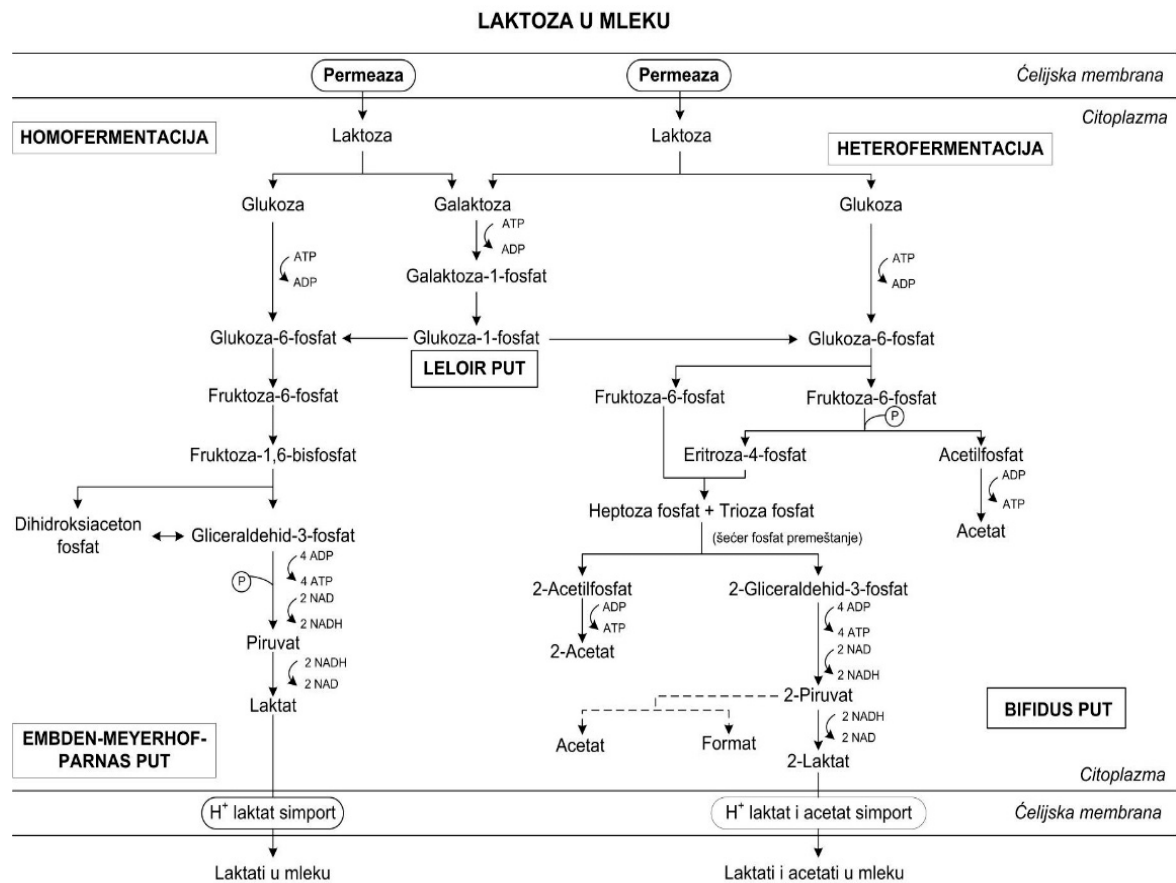
karakteristika fermentisanih mliječnih proizvoda (Suroño i Hosono 2011). Neke od uloga starter kultura tokom fermentacije su:

- formiranje mliječne kiseline redukcijom sadržaja laktoze (20-30%) koja ima konzervišući efekat i doprinosi produžetku trajnosti proizvoda, i pored toga podstiče rad creva, poboljšava resorpciju Ca i P;
- produkcija bakteriocina koji takođe mogu da imaju konzervišuće djelovanje;
- produkcija organskih kiselina, karbonilnih komponenata i djelimične hidrolize proteina i masti čime se poboljšavaju senzorne karakteristike;
- poboljšavanje reoloških svojstava fermentisanih mliječnih proizvoda (viskozitet, čvrstoća i dr.);
- doprinose dijetetskim/funkcionalnim i nutritivnim svojstvima fermentisanih mliječnih proizvoda, posebno u kombinaciji sa probioticima (Tamime i Robinson 2007).

Različiti mikroorganizmi (bakterije, kvasci i plesni – pojedinačno ili u odabranim kombinacijama) mogu se koristiti za proizvodnju fermentisanih mliječnih proizvoda. Iako su svi proizvodi rezultat fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu, vrsta, udio i odnos pojedinih grupa mikroorganizama u starter kulturi utiče na proces i tip fermentacije. Kako je već poznato, laktoza se razgrađuje intracelularno od strane mikroorganizama starter kulture. Način ulaska laktoze u ćeliju zavisi od vrste mikroorganizama, a može biti (Tamime i Robinson 2004):

1. Transport preko laktozafosfottransferaznog sistema gdje dolazi do fosforilacije pomoću fosfoenol piruvata u fosfottransferazni sistem. Navedeni složeni sistem translocira laktozu iz spoljašnjeg u unutrašnji dio citoplazmine membrane i u ćeliji se formira laktoza-fosfat. Laktoza-6-fosfat se hidrolizuje pomoću β -fosfotalaktozidaze u monosaharide.
2. Transport preko proton gradijent permeaznog sistema koji prenosi laktozu kroz bakterijsku ćelijsku membranu. Laktoza se unutar ćelije dalje razgrađuje enzimom beta-galaktoidaza na molekul glukoze i molekul galaktoze. Beta-galaktoidaza razgrađuje laktozu na jedan molekul glukoze i jedan molekul galaktoze.

Dalji put razgradnje ovih heksoza može biti putem homofermentacije ili heterofermentacije i prikazan je na slici 4.



Slika 4. Biohemijski putevi razgradnje laktoze (Tamime 2006)

Homolitička fermentacija mlijeka prisutna je kod starter kultura *Str. thermophilus* i *Lb. acidophilus* odvija se Embden-Meyerhof-Parnas-ovim putem (EMP put) katabolizma glukoze. Mikroorganizmi transportuju laktozu bez hemijske modifikacije putem permeaze a ovako nefosforilovana laktoza se dalje hidrolizuje putem β -galaktozidaze na nefosforilovanu glukozu i galaktozu. Glukoza se kataboličkim putem transformiše do piruvata, dok galaktoza izlazi iz ćelije. Kada se glukoza potpuno istroši od strane navedenih mikroorganizma, počinje razgradnja galaktoze Leloir-evim putem.

Heterofermentacija je prisutna kod probiotskih bakterija *Bifidobacterium* spp. Laktoza se prvo transportuje u ćeliju pomoću permeaze i hidrolizuje se u glukozu i galaktozu. Navedene heksoze se katabolizuju preko fruktoza-1,6-bifosfata, koji se razgrađuje pomoću fruktoza-difosfat aldolaze. Krajnji produkti fermentacije su laktati i acetati. Fermentacijom 2 mola glukoze nastaju 3 mola acetata i 2 mola laktata. Pored toga ove bakterije fermentišu i glukozu procesom dekarboksilacije produkujući CO_2 .

Osim ove podjele, fermentisani mliječni proizvodi se prema tipu fermentacije dijele i na:

- 1) proizvode mliječno-kisele fermentacije gdje se primjenjuju mezofilne (optimalna temperatura rasta 20-30°C) ili termofilne (optimalna temperatura rasta 37-45°C) bakterije mliječne kiseline (jogurt);
- 2) proizvode dobijene alkoholno-mliječnom fermentacijom primjenom kvasaca i bakterija mliječne kiseline (kefir i kumis);
- 3) proizvodi u kojima je fermentacija posledica kombinacija plesni i bakterija mliječne kiseline (villi).

Navedene grupe mikroorganizama generalno se mogu podjeliti na:

- tradicionalne bakterije mliječne kiseline i
- netradicionalne starter kulture (Tamime 2006).

Tradicionalne bakterije mliječne kiseline koje se najčešće koriste u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda čine mikroorganizmi iz rodova: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Na osnovu morfoloških karakteristika navedeni mikroorganizmi su u obliku koka ili štapića. Pažljiv izbor temperature i vrste mikroorganizma predstavlja važan faktor u očuvanju identiteta i specifičnosti svakog fermentisanog mliječnog proizvoda.

Za razliku od tradicionalnih kultura, netradicionalne starter kulture koje se koriste u industriji mlijeka sadrže probiotike ili se kombinaciju različite grupe mikroorganizama u cilju modifikacije tj. poboljšanja fizičko-hemijskih, nutritivnih i senzornih karakteristika proizvoda. Netradicionalnu mikrofloru čine različite bakterijske grupe mikroorganizama u okviru starter kulture, a to su najčešće: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*. Vrste starter kultura date su u tabeli 6, dok su karakteristike mezofilnih i termofilnih starter kultura prikazane u tabelama 7 i 8.

Tabela 6. Karakteristike starter kultura u fermentisanim mliječnim proizvodima (Suroño i Hosono 2011)

Vrsta mikroorganizma ¹	Tempertaura rasta (°C)			Mliječno-kisela frementacija		Mliječna kiselina%	Krajnji pH
	Min.	Opt.	Max.	Homofermentacija	Heterofermentacija		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	22	45	52	+		1,5–1,8	3,8
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	18	40	50	+		1,5–1,8	3,8
<i>Lb. helveticus</i>	22	42	54	+		1,5–2,2	3,8
<i>Lb. acidophilus</i>	27	37	48	+		0,3–1,9	4,2
<i>Lb. kefir</i>	8	32	43		+	1,2–1,5	—
<i>Lb. brevis</i>	8	30	42		+	1,2–1,5	—
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>		30		+		1,2–1,5	—
<i>S. thermophiles</i>	22	40	52	+		0,6–0,8	4,5
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	8	30	40	+		0,5–0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	8	22	37	+		0,5–0,7	4,6
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>	8	22–28	40	+		0,5–0,7	4,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>Cremoris</i>	4	20–28	37		+	0,1–0,2	5,6
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>	4	20–28	37		+	0,1–0,2	5,6
<i>Bifidobacterium</i> (<i>bifidum</i> , <i>infantis</i> , etc)	22	37	48			0,1–1,4	4,5

¹ *Lb.*, -*Lactobacillus*; *S.*, -*Streptococcus*; *Lc.*, -*Lactococcus*; *Ln.*, -*Leuconostoc*

Tabela 7. Mikrobiološke i biohemijske karakteristike mezofilnih bakterija mliječne kiseline koje se upotrebljavaju za fermentaciju mlijeka (Surono i Hosono 2011)

Karakteristike	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextransicum</i>
Oblik ćelija i Konfiguracija	Okrugle, parovi, kratki laci	Okrugle, parovi, kratki/dugi lanci	Okrugle, parovi, kratki lanci	Okrugle, parovi, kratki/dugi lanci	Okrugle, parovi, lanci
Temperature rasta (°C)					
<i>Optimalna</i>	28–31	22	28	20–25	20–25
<i>Minimalna</i>	8–10	8–10	8–10	4–10	4–10
<i>Maksimalna</i>	40	37–39	40	37	37
Temperatura inkubacije (°C)	21–30	22–30	22–28	22	22
Toplotni tretman (60 °C 30 min)	±	±	±		
Izomer mliječne kiseline	L(+)	L(+)	L(+)	D(-)	D(-)
Proizvodnja mliječne kiseline (%)	0,5-0,7	0,5-0,7	0,5-0,7	0,1-0,2	0,1-0,2
Proizvodnja Sirćetne kiseline (%)				0,2–0,4	0,2–0,4
Produkcija (CO₂)			+	±	±
Proteolitička aktivnost	+	+	+	±	±
Lipolitička aktivnost	±	±	±	±	±
Citratna fermentacija			+	+	+
Komponente arome	+	+	+++	+++	+++
Proizvodnja mukopolisaharida	±	±	±	-	Dekstran iz saharoze
Proizvodnja hidrogen peroksida	+	+	+	±	±
Proizvodnja alkohola	±	±	±	±	±
Tolerancija na so (%max)	4-6,5	4	4-6,5	6,5	6,5

Tabela 8. Mikrobiološke i biohemijske karakteristike termofilnih bakterija mliječne kiseline koje se upotrebljavaju za fermentaciju mlijeka (Surono i Hosono 2011)

Karakteristike	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Oblik ćelija i Konfiguracija	Okrugle do ovalne, parovi, dugi lanci	Štapičaste sa okruglim krajevima, pojedinačne ili u kratkim lancima	Štapičaste sa okruglim krajevima, pojedinačne, parovi, kratki lanci	Štapičaste sa četvrtastim krajevima, kratki/dugi lanci	Štapičaste sa bifurkacionim krajevima (Y oblik)
Temperature rasta (°C)					
<i>Optimalna</i>	40–45	40–45	37	37	37
<i>Minimalna</i>	20	22	20-22	15-20	22
<i>Maksimalna</i>	50	52	45-48	40-45	48
Temperatura inkubacije (°C)	40-45	42	37	37	37
Toplotni tretman (60 °C 30 min)	++	+			
Izomer mliječne kiseline	L(+)	L(-)	DL	L(+)	L(+)
Proizvodnja mliječne kiseline (%)	0,6-0,8	1,7-1,8	0,3-2	1,2-1,5	0,1-1,4
Proizvodnja Sirćetne kiseline (%)	U tragovima	U tragovima	+	+	+++
Produkcija (CO₂)					+
Proteolitička aktivnost	±	+	±	±	+
Lipolitička aktivnost	±	±	±	±	±
Citratna fermentacija					
Komponente arome	++	++	+	±	++
Proizvodnja mukopolisaharida	±	++	-	±	++
Proizvodnja hidrogen peroksida	±	+	+	+	+
Proizvodnja alkohola		U tragovima	U tragovima	U tragovima	U tragovima
Tolerancija na so (% max)	2	2	6,5	2	2

FUNKCIONALNE KOMPONENTE FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA

Kvalitet fermentisanih mliječnih proizvoda zavisi od više različitih parametara. Najvažniji faktori su: kvalitet mlijeka, sastav mlijeka za proizvodnju, dodaci za poboljšanje teksture, homogenizacija, uslovi pasterizacije, vrsta starter kulture, uslovi fermentacije i naravno način i uslovi punjenja i skladištenja proizvoda (Gregurek i Tonković 2008). Pored teksturalnih, reoloških i senzornih parametara kvaliteta veoma je važna i nutritivna vrijednost fermentisanih mliječnih proizvoda. Iako ne postoji značajna razlika između sastava fermentisanog i nefermentisanog mlijeka, promjene koje se javljaju na komponentama mlijeka tokom fermentacije utiču na hranljivu vrijednost i njihovu bioraspoloživost (Takano i Yamamoto 2002). Nutritivna vrijednost fermentisanih mliječnih proizvoda sastoji se, kao i kod mlijeka, u osnovnim sastojcima potrebnim ljudskom organizmu za rast, reprodukciju, održavanje, obnavljanje i zadovoljenje energetske potrebe. Pored toga, fermentisani mliječni proizvodi imaju veliku dijetnu vrijednost koja se ogleda u promjenjenoj koloidnoj strukturi masti i masti u odnosu na mlijeko, pod dejstvom mliječne kiseline, tako da ih organizam mnogo lakše iskorišćava. Fermentacijom pomoću mikroorganizama, dolazi do smanjenja laktoze u jogurtu za 20-30%, a povećavanja količine mliječne kiseline. Djelimična hidroliza masti je rezultat lipolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline pri čemu se oslobađaju masne kiseline. Procesom fermentacije ne dolazi do značajnih promjena u sadržaju mineralnih materija, ali se askorbinska kiselina razgrađuje u visokom procentu, kao i vitamini B₆ i B₁₂, dok je degradacija vitamina A i D manje zastupljena. Gubitak vitamina B₁₂ tokom fermentacije može se redukovati korišćenjem bakterija iz roda *Leuconostoc* ili *Propionibacterium shermani*. Pored toga smanjuje se sadržaj pantotenske kiseline i vitamina B₁, a povećava se sadržaj holina. Koncentracija folne kiseline u jogurtu je povećana skoro 100%. Povećanje sadržaja folne kiseline kao i holina, posledica je njihove sinteze od strane starter kulture, posebno *Streptococcus thermophilus* (Gilliand 1993).

U tabeli 9 prikazan je tipičan sastav glavnih konstituenata mlijeka i jogurta.

Tabela 9. Hemijski sastav i energetska vrijednost mlijeka i jogurta (Carić i sar. 2000)

Sastojak	Mlijeko	Jogurt		
		Punomasni	Sa niskim sadržajem masti	Voćni
Proteini (g100g ⁻¹)	3,5	3,9	4,5	5,0
Mast (g100g ⁻¹)	4,25	3,4	1,6	1,25
Ugljeni hidrati (g100g ⁻¹)	4,75	4,9	6,5	18,6
Ca (mg100g ⁻¹)	119	145	150	176
P (mg100g ⁻¹)	94	114	118	153
Na (mg100g ⁻¹)	50	47	51	-
K (mg100g ⁻¹)	152	186	192	544
Energetska vrijednost (kcal100g ⁻¹)	67,5	72	64	98

Tokom procesa fermentacije, iz matriksa mlijeka se oslobađa veliki broj različitih jedinjenja kao što su laktoferin, sfingolipidi, mikronutrijenti i konjugovana linolna kiselina ili dolazi do sinteze novih komponenata kao što su egzopolisaharidi i bioaktivni peptidi (tabela 10). Sa aspekta terapijskog djelovanja, posebno su interesantni mliječni proteini i bioaktivni peptidi koji imaju širok spektar funkcionalnih svojstava, kao što su antihipertenzivne i antioksidativne osobine, a omogućavaju i lakše usvajanje mineralnih materija. Istraživanjima je ustanovljeno da hidrolizati koji nastaju, uglavnom iz α_s -kazeina, dejstvom proteolitičkih enzima bakterija mliječne kiseline pokazuju antioksidativnu aktivnost i imaju sposobnost da spriječe enzimsko i neenzimsko stvaranje lipidnih peroksida (Beermann i Hartung 2013). Za svoj normalan razvoj BMK zahtjevaju slobodne amino kiseline kojih nema dovoljno u mlijeku. Stoga one produkuju proteaze zadužene za razgradnju mliječnih proteina čiji krajnji produkti razgradnje, amino kiseline i peptidi, ostaju u fermentisanom proizvodu kao značajni nosioci bioaktivnosti.

Tabela 10. Funkcionalne karakteristike i zdravstveni efekti komponenata koje se formiraju tokom fermentacije mlijeka (Beermann i Hartung 2013)

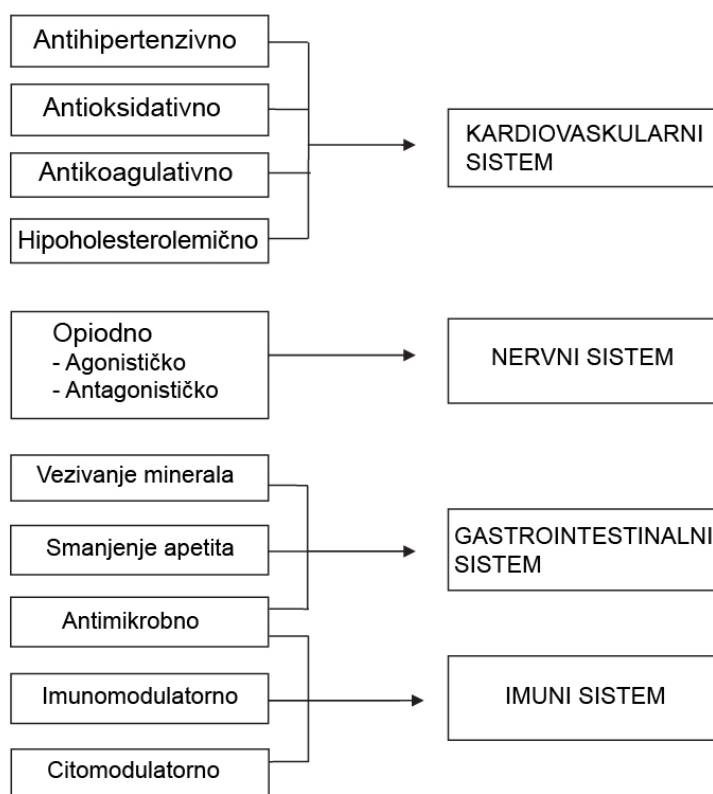
Komponenta	Funkcija
Kiseline: mliječna, acetatna, propionska i limunska <i>Slobodne masne kiseline</i>	Produkti acidifikacije, konzervišući uticaj, poboljšanje arome, antimikrobno i antikancerogeno dejstvo, uticaj na imuni sistem. Uticaj na teksturu i stabilizaciju teksture, smanjenje holesterola u krvi.
Bakteriocini: nizin, lakticin, pediocin, acidofilin	Antimikrobna svojstva
Sfingolipidi: sfingomijelin, glukozilceramid, laktozilceramid	Antikancerogena svojstva, zaštita protiv bakterijskih infekcija u stomaku.
Bioaktivni peptidi: Peptidi iz kazeina: <ul style="list-style-type: none"> ✓ α-s_{1/2} kazeinski peptidi ✓ β- kazeinski peptidi ✓ κ-kazeinski peptidi ✓ kazeinski fosfopetidi Peptidi iz proteina surutke: <ul style="list-style-type: none"> ✓ α-laktoalbuminski peptidi ✓ β-laktoglobulinski peptidi Peptid laktoferina	Antihipertenzivna Antimikrobna svojstva Antioksidativna svojstva Imunostimulaciona svojstva, Opioidni agonisti/antagonisti Mineralno vezujuća uloga.

BIOAKTIVNI PEPTIDI

Vrste i podjela

Bioaktivnim komponentama se smatraju one supstance (molekuli) koje se sastoje od proteina, lipida i/ili ugljenih hidrata i imaju sposobnost da izazovu biološki odgovor kao što je smanjenje hipertenzije, sprečavanje nastajanje karcinoma, povećanje čiste mišićne mase, stimulisanje imunog sistema i inhibiranje razvoja patogenih mikroorganizma. Pored toga funkcionalne supstance treba da imaju biološku aktivnost mjerljivu na fiziološki realnom nivou u opsegu u kome se nalaze u hrani. Bioaktivni peptidi mogu se podjeliti na one sa senzornom, antioksidativnom, površinski aktivnom funkcijom i one sa fiziološkom funkcijom. Mlijeko i mliječni proizvodi se smatraju bogatim izvorom bioaktivnih peptida (Tidona i sar. 2009; Jäkälä i Vapaatalo 2010). Prvi objavljeni rezultati analize mliječnog proteoma pokazali su 90 različitih minornih peptida proteina mlijeka od kojih većina kako se

pretpostavljalo, ima ulogu u odbrani organizma domaćina. Otkriveni peptidi se nalaze u niskim koncentracijama u frakcijama surutke, dok drugi mogu biti sintetisani u mliječnim žlijezdama ili nastati direktnom ili indirektnom razgradnjom kazaina. Šematski prikaz fiziološke funkcije poznatih bioaktivnih peptida dat je na slici 5 (Korhonen i Pihlanto 2006).



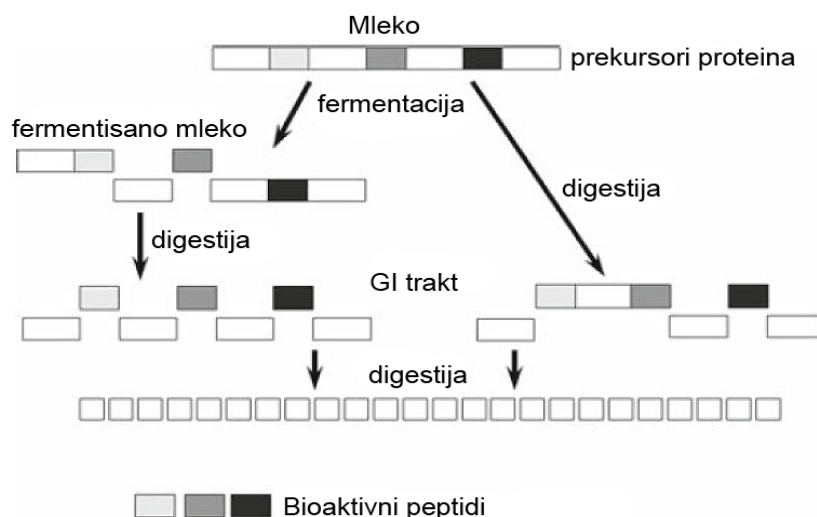
Slika 5. Fiziološka funkcija bioaktivnih peptida (Korhonen i Pihlanto 2006)

Mehanizmi nastanka bioaktivnih peptida

Biološki aktivni peptidi proteina mlijeka, uobičajno se sastoje od 2-20 amino kiselina i mogu nastati na sledeće načine:

1. tokom procesa fermentacije mlijeka aktivnošću proteolitičkih enzima iz starter kulture,
2. *in vivo* enzimskom hidrolizom u gastrointestinalnom traktu pod dejstvom digestivnih enzima ili enzima mikroflore intestinalnog trakta,
3. tokom procesa obrade mlijeka korišćenjem komercijalnih enzima mikrobiološkog ili biljnog porekla.

Kombinacije metoda 1 i 2 ili 1 i 3 smatraju se najefikasnijim u dobijanju funkcionalnih peptida kratkih lanaca.



Slika 6. Šema mogućeg mehanizma nastanka bioaktivnih peptida iz prekursora proteina mlijeka mikrobiološkom fermentacijom i gastrointestinalnom digestijom (Moller i sar. 2008)

1. Bioaktivni peptidi nastali tokom tehnološkog procesa prerade mlijeka procesom fermentacije mlijeka

Bioaktivni peptidi tokom procesa obrade mlijeka mogu nastati djelovanjem enzima nativnih mikroorganizama ili enzima upotrebljenih starter kultura. Proteolitički sistem bakterija mliječne kiseline rodova *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* i *L. delrueckii subsp. bulgaricus*, je veoma dobro okarakterisan i sastoji se od ćelijskih intracelularnih proteaza uključujući endopeptidaze, aminopeptidaze, tripeptidaze i dipeptidaze (Christensen i sar. 1999). Najnovija istraživanja pokazala su da ovakvom proteolizom proteina mlijeka pored velikog broja različitih bioaktivnih peptida nastaje značajan broj peptida sa imunomodulatornom funkcijom (Matar i sar. 1996; Pihlanto-Leppala A i sar. 1998; Gobbetti i sar. 2000).

Tabela 11. Bioaktivni peptidi dobijeni hidrolizom mliječnih proteina upotrebom različitih mikroorganizama i njihovih enzima (Korhonen i Pihlanto 2006)

Mikroorganizam	Protein prekursor	Peptidna sekvenca	Bioaktivnost	Reference
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -cn κ -cn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	AKE inhibitorna aktivnost	(Nakamura i sar. 1995)
<i>Lactobacillus GG</i> enzimi+pepsin & tripsin	β -cn α_{s1} -cn	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Opioidna, AKE inhibitorna imunomodulatorna	(Rokka i sar. 1997)
<i>Lb. helveticus</i> CP90 proteinaze	β -cn	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Prp (Gln)	AKE inhibitorna	(Maeno i sar. 1996)
<i>Lb. helveticus</i> CPN 4	Proteini surutke	Tyr-Pro	AKE inhibitorna	(Yamamoto i Takano 1999)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	β -cn κ -cn	Vise fragmenata	AKE inhibitorna	(Gobbetti i sar. 2000)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO13953	κ -cn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His- Leu-Ser-Phe-Met	Antioksidativna	(Kudoh i sar. 2001)
<i>Lb. rhamnosus</i> + digestija sa pepsinom i Corolase PP	β -cn	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu, Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys	AKE inhibitorna Antioksidativna	(Hernandez-Ledesma i sar. 2004)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	β -cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro- Gly Pro-Ile	AKE inhibitorna	(Ashar i Chand 2004)
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	β -cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	AKE inhibitorna	(Ashar i Chand 2004)
<i>Lb. helveticus</i> JCM 1004 ekstrakt slobodnih ćelija	Hidrolizat obranog mlijeka	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	AKE inhibitorna	(Pan i sar. 2005)

2. Bioaktivni peptidi nastali u gastrointestinalnom traktu

Bioaktivni peptidi nastali tokom procesa digestije hrane su obično produkti razgradnje kazeina djelovanjem proteaza: pepsina, tripsina ili himotripsina. U prvoj fazi digestije, prekursori bioaktivnih proteina su podvrgnuti enzimima pankreasa, prolazeći kroz želudac gdje mogu provesti i do nekoliko sati, razgrađuju se želudačnim sokom (HCl i pepsinom). Ovaj prvi nivo razgradnje proteina omogućava dalju razgradnju nastalih frakcija djelovanjem enzima intestinalnog trakta. Mikrobiološki enzimi native mikroflore probavnog trakta djeluju samo na one proteinske frakcije koje dopijuju do debelog crijeva. U poređenju sa mikrobiološkim enzimima mikroflore ili starter kulture tokom procesa obrade mlijeka, enzimi varenja imaju drugačija aktivna mjesta hidrolize proteina. Samim tim nastali bioaktivni peptidi mogu značajno da se razlikuju kako po svojoj funkciji tako i po absorpciji (Moller i sar. 2008).

3. Bioaktivni peptidi nastali tokom tehnološkog procesa obrade mlijeka upotrebom komercijalnih enzima

Ovaj način dobijanja bioaktivnih peptida se najčešće primjenjuje za komercijalnu proizvodnju peptida sa određenom biološkom funkcijom, kao što je antihipertenzivna, imunomodulatorna, antioksidativna i sl. Proteolitički enzimi izolovani iz BMK –a se uspješno koriste za dobijanje bioaktivnih peptida sa AKE- inhibitornom aktivnosti. Ovi enzimi su najčešće kalcijum – vezujući enzimi (Meisel i FitzGerald 2003; Yamamoto i sar. 2003; FitzGerald i sar. 2004; Gobetti i sar. 2004). Osim ovih enzima, enzimi izolovani iz *Aspergillus oryzae* pokazali su mogućnost dobijanja peptida izuzetno visoke AKE-inhibitorne aktivnosti (Mizuno i sar. 2004; Hirota i sar. 2007).

Struktura i funkcija bioaktivnih peptida

Kao što je već rečeno, bioaktivni mliječni peptidi mogu da imaju različite biološke funkcije, uključujući opioidno, antikoagulatorno, antihipertenzivno, antioksidativno, antimikrobno, antikancerogeno i imunomodulatorno dejstvo (Bal dit Sollier i sar. 1996; Laffineur i sar. 1996; Teschemacher i sar. 1997; Saito i sar. 2000; Rival i sar. 2001; Seppo i sar. 2003; Parodi 2007). Nastali peptidi svoju biološku aktivnost mogu da ispolje već u intestinalnom traktu ili nakon absorpcije putem krvotoka na određenim ciljnim organima

(mjestima) u organizmu. Zbog toga je neophodno da tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt ostanu stabilni i imaju bioaktivnost *in vivo* na ciljnom mjestu u organizmu. Funkcija aktivnih peptida mlijeka zavisi od native strukture proteina od koga su dobijeni, bilo hemijskom hidrolizom, mikrobiološkom i enzimskom proteolizom kazeina i proteina surutke. Karakteristike biofunktionalnosti zavise od aminokiselinske sekvence i broja rezidua koji varira od 2 do 20. Iako sadrže iste aminokiseline, neki peptidi mogu ispoljavati potpuno različitu bioaktivnost kako zbog različitog sternog oblika, tako i zbog visoke hidrofobnosti. Prisustvo prolina sprečava dalju proteolizu peptidnih frakcija zbog njegove izuzetno čvrste konformacije koja sprečava gubitak entropije nakon vezanja. Zbog toga su frakcije koje sadrže prolin otporne na uticaj enzima za varenje (Beermann i Hartung 2013). Bioaktivni peptidi su najčešće bezukusni ili imaju gorak ukus, izuzetak su glutaminska i asparaginska kiselina sa izuzetno slatkim ukusom. Gorak ukus peptidnih frakcija raste sa povećanjem hidrofobnosti i dužine peptidne sekvence (Jäkälä i Vapaatalo 2010). Zanimljivo je da bioaktivni peptidi predstavljaju mnogo adekvatniji, bioraspoloživiji izvor esencijanih aminokiselina u poređenju sa nativnim proteinima pa čak i slobodnim aminokiselinama (Beermann i Hartung 2013).

Mliječni proizvodi kao izvori biološki aktivnih peptida

Pojedinačni kazeinski proteini ili fermentisani mliječni proizvodi kao što su sir i jogurt, kao krajnji proizvod fermentacije, postali su važan izvor za proučavanje i izolaciju bioaktivnih proteina (Urista i sar. 2011). Veći broj istraživanja ukazao je na pozitivan uticaj ovih peptida u regulisanju rada nervnog sistema, gastrointestinalnog trakta, modulaciji digestivnih enzima, apsorpciji hranljivih materija, kardiovaskularnog kao i imunološkog sistema. Tako na primjer, peptidi dobijeni iz β -laktoglobulina pokazuju antihipertenzivne, antikoagulantne, opioidne, antimikrobne, imunomodulantne i hipoholesteremične karakteristike. Osim toga svi navedeni peptidi imaju i značajnu antioksidativnu aktivnost i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Ebringer i sar. 2008; Beermann i Hartung 2013). Osim ovih bioaktivnih peptida, multifunkcionalne karakteristike pokazuju i kazomorfini, laktorfini imunopeptidi i kazokinini. Funkcija i osobine bioaktivnih peptida dobijenih putem fermentacije zavise, prije svega od aktivnosti nativnih (endogenih) proteolitičkih enzima mlijeka kao i proteolitičkih sposobnosti upotrebljenog mikroorganizma. Prednost upotrebe ovako dobijenih bioaktivnih peptida je u činjenici da BMK pored proteolitičke aktivnosti, nizom drugih metabolita obezbjeđuju i dodatne zdravstvene benefite (Picard i sar. 2005; Jha i

sar. 2008; Stamatova i Meurman 2009).

Tabla 12. Bioaktivni peptidi izvedeni iz mliječnih proteina (Meisel 2005)

Bioaktivni peptidi	Protein prekursor	Fiziološka aktivnost
Kazomorfini	α -CN, β -CN	Opioidni agonist
α-laktorfin	α -LA	Opioidni agonist
β-laktorfin	β -LG	Opioidni agonist
Laktoferoksin	LF	Opioidni antagonist
Kazokini	K-CN	Opioidni antagonist
Kazokinini	α -CN, β -CN	AKE-inhibitori
Laktokinini	α -LA, β -LG	AKE-inhibitori
Laktofericin	LF	Antimikrobno
Kazoplatelini	K-CN, Transferin	Antitrombotska
Imunopeptidi	α -CN, β -CN	Imunomodulatori
Fosfopeptidi	α -CN, β -CN	Vezivanje minerala, antikancerogena
Serofin	BSA	Opioidni agonist
Kasecidin	α -CN	Antimikrobno

α -LA - α -laktalbumin; β -LG- β -laktoglobulin; α -CN- α -kazein ; β -CN- β -kazein; LF-laktoferin, BSA- serum albumin

Komercijalni proizvodi dobijeni enzimskom hidrolizom kazeina ili proteina surutke, a koji sadrže visoke koncentracije tačno određenih bioaktivnih peptida stiču sve veću popularnost na tržištu kao dodaci ishrani. Jedan od najpoznatijih ovakvih antihipertenzivnih proizvoda jeste *Calpis*, sastavljen od tripeptida valin-valin-prolin (VVP) i izoprolin-prolin-prolin (IPP) a dobijen mliječnom fermentacijom pomoću *Lb. helveticus* (CP790 i *Saccharomyces cerevisiae* (Tidona i sar. 2009). Ovi tripeptidi su pronađeni i u pavlaci kako i u nekim vrstama sireva, posebno u sirevima švajcarskog tipa (Tidona i sar. 2009; Jäkälä i Vapaatalo 2010) Primjeri najčešćih oblika ovih komercijalnih dodataka ishrani prikazani su u tabeli 13.

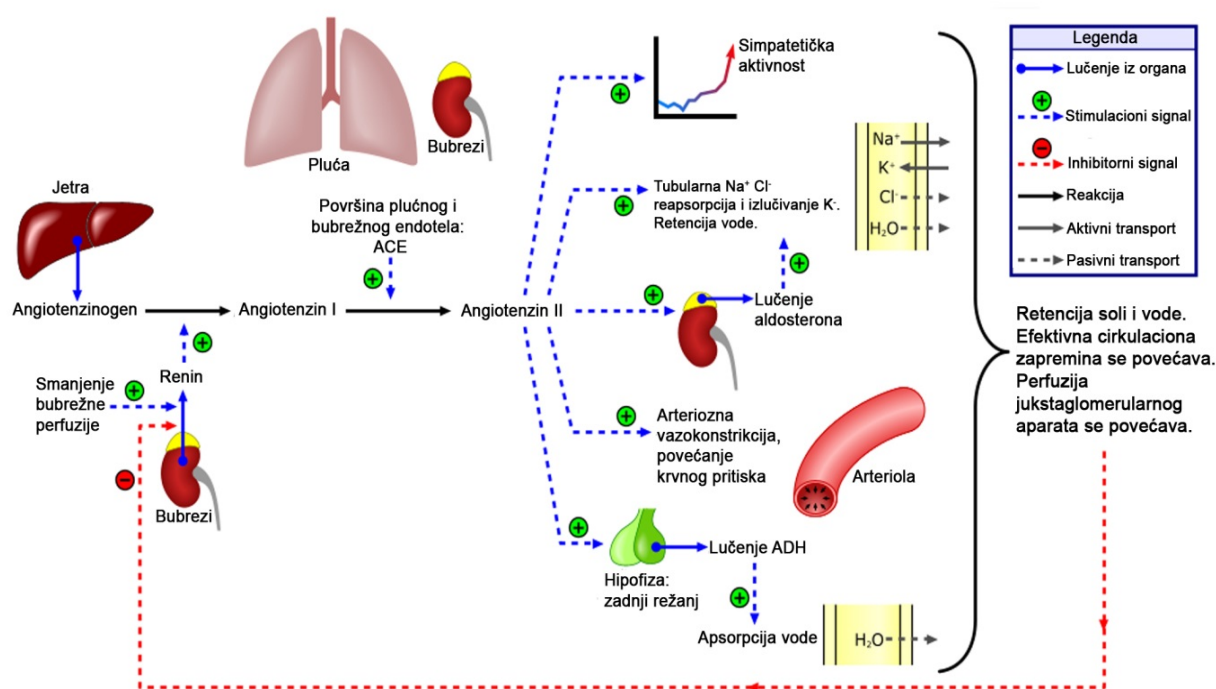
Tabela 13. Komercijalni mliječni proizvodi i dodaci sa biološki aktivnim peptidima (Korhonen i Pihlanto 2006).

Komercijalni naziv	Vrsta proizvoda	Funkcionalni bioaktivni peptidi	Zdravstveno/funkcionalni efekat	Proizvođač
Calpis	Kiselomliječno	VPP, IPP (β -CN)	Snižanje krvnog pritiska	Calpis Co., Japan
Evolus	Fermentisani mliječni napitak obogaćen kalcijumom	CN i κ -CN VPP, IPP (β -CN)	Snižanje krvnog pritiska	Valio Oy, Finska
BioZate	Hidrolizovani izolat proteina surutke	CN i κ -CN β -LG fragmenti	Snižanje krvnog pritiska	Davisco, SAD
BioPURE-GMP	Izolat proteina surutke	κ -CN (106–169)	Prevenција nastanka karijesa	Davisco, SAD
PRODIET F200/Lactium	Aromatizovan mliječni napitak, poslastica/dezert, kapsule	α ₁ -CN (91–100)	Zaštita od bakterija i virusa i smanjenje stresa	Ingredia, Francuska
Festivo	Nisko-masni tvrdi sir	α ₁ -CN (1–9), α ₁ -CN (1–7), α ₁ -CN (1–6)	Do sada nema potvrđenih uticaja na zdravlje	MTT Agrifood Research, Finska
Cistein peptidi	Dodatak (hidrolizat)	peptidi proteina mlijeka	Energetski efekat	DMV International, Holandija
C12 peptide	Dodatak (hidrolizat)	peptidi kazeina	Snižanje krvnog pritiska	DMV International, Holandija
Capolac	Dodatak	kazeinfosfo peptidi	Povećanje absorpciju minerala	Arla Foods Ingredients, Švedska
PeptoPro	Dodatak (hidrolizat)	peptidi kazeina	povećanje atletskih sposobnosti i oporavka mišića	DSM Food specialtes, Holandija
Vivinal Alpha	Dodatak (hidrolizat)	peptidi proteina surutke	Povećava relaksaciju, opuštenost i pospanost	Borculo Domo Ingredients (BDI), Holandija

CN- kazein, LG- laktoglobulin

Antihipertenzivni i antikoagulatorni peptidi

Angiotenzin konvertujući enzim - AKE I (EC3.4.15.1, *dipeptidilna karboksipeptidaza I, peptidaza P*) predstavlja peptidazu koja je kao dio sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) krvnog regulatornog sistema od velikog značaja za regulaciju krvnog pritiska. AKE I konvertuje angiotenzin I u angiotenzin II reakcijom odvajanja C-terminalnog dipeptida His-Leu. Ovom reakcijom se povećava vazokonstriktorsko dejstvo (sužavanje krvnih sudova) odnosno indirektno krvni pritisak. Angiotenzin II takođe stimuliše oslobađanje aldosterona iz kore nadbubrežne žlijezde koji povećava resorpciju natrijuma i vode kao i resorpciju kalijuma od strane bubrega, čime se dodatno povećava krvni pritisak (Slika 7). Iako sadrži dva homologa domena, C- i N-, C-terminalni domen AKE I je katalitički aktivni domen. Supstance koje inhibiraju aktivnost AKE I, takozvani AKE-inhibitori, koriste za lečenje arterijske hipertenzije.



Slika 7. Sumarna šema renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) krvnog regulatornog sistema http://en.wikipedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png.

Antihipertenzivni i antikoagulatorni peptidi proteina mlijeka posebno kazeina, intenzivno se proučavaju poslednju deceniju (FitzGerald i sar. 2004; Tidona i sar. 2009; Sieber i sar. 2010). Ovi peptidi sadrže najviše 9 aminokiselinskih rezidua i njihova inhibitorna

aktivnost izražava se preko IC_{50} vrijednosti koja varira u opsegu od 100-500 μmolL^{-1} -koncentracija potrebna za 50% inhibicije AKE I.

Zajedničke karakteristike svih AKE-inhibitornih peptida su:

- kratak peptidni lanac (2-9 aminokiselinskih rezidua),
- prisustvo hidrofobnih rezidua u sekvenci (najčešće aromatični ili razgranatih lanaca),
- prisustvo prolina, lizina ili arginina na C- terminalnom kraju,
- Otpornost na hidrolizu digestivnim enzimima.

Pregled bioaktivnih peptida i uticaj na ljudsko zdravlje dat je u tabeli 14.

Table 14. Bioaktivni peptidi i njihov uticaj na ljudsko zdravlje (Beermann i Hartung 2013)

Vrsta bioaktivnih peptida	Protein/prekursor	AA-sekvencija	Funkcija/ metoda	Reference
Anti-Hipertenzivini	S i r			
kazokinini:	α_{S1} -kazein	f(1-6), f(1-7),f(1-9), f(24-32), f(102-110)	AKE-inhibicija (<i>in vitro</i>) spektrofotometrijski (SHAR)	(Ong i sar. 2007)
	β -kazein	f(47-52), f(193-209)		
	α_{S1} -kazein	f(1-9), f(1-13) f(60-68), f(109-119)	AKE-inhibicija, Sniženje krvnog pritiska (SHR studija)	(Saito i sar. 2000)
	Digestija pepsinom:			
	α_{S1} -kazein;	f(90-94) f(143-149)	AKE-inhibitiorna, Sniženje krvnog pritiska (SHAR)	(Contreras i sar. 2009)
	α_{S2} -kazein β -kazein	f(89-95) f(74-76), f(84-86)	AKE-inhibicija Prevenција nastanka maligne hipertenzije	(Costa i sar. 2005)
	κ -kazein	f(108-110)		
	IPP,VPP obogaćeni jogurt			
	β -kazein	f(74-76), f(84-86)	Ne postoje klinički dokazi za antihipertenzivnu aktivnost	(van der Zander i sar. 2008)
	κ -kazein	f(108-110)		
A.oryzae Proteazna digestija:				

	β -kazein	f(74–76), f(84–86)	Konstantno sniženje krvnog pritiska kod pacijenata sa viskom i umijerenom hipertenzijom (kliničko ispitivanje)	(Mizuno i sar. 2005)
	k-kazein	f(108–110)		
Alkalazna digestija kozjeg mlijeka:				
	β -kazein	f(78–83) f(84–87) f(181–184)	Biodostupnost	(Geerlings i sar. 2006)
			Bez biodostupnosti	
			Bez biodostupnosti (<i>in vitro</i> AKE inhibitorni test)	
Kalpis	β -kazein	f(74–76),f(84–86) f(47–76)	Biodostupnost (SHAR- metod ,SHR studija)	(Masuda i sar. 1996) (Foltz i sar. 2007)
Laktokinini	<i>Tripsin digestija:</i> β – laktoglobulin ovcijeg mlijeka	β –Laktoglobulin fragmenti	Biodostupnost (klinička ispitivanja) AKE-inhibitor	(Jean-Marc i sar. 2005)
Hidrolizat proteina surutke	<i>Alkalazna digestija surutke:</i>	—	AKE-inhibicija, Sniženje krvnog pritiska,	(Costa i sar. 2005)
	<i>Fermentacija proteina surutke upotrebom: <i>L.helveticus i S.cerevisiae</i></i>	—	Biodostupnost (<i>in vitro</i> gastrointestinalna digestija i AKE inhibitorni test)	(Vermeirssen i sar. 2004)
Laktokinini	β – laktoglobulin	f(142–148)	Bez biodostupnosti (<i>in vitro</i> gastrointestinalna digestija Serum proteinzna/peptidazna digestija AKE-inhibitiorni test	(Walsh i sar. 2004)
Anti-mikrobini:	<i>Peptoliticki:</i> laktoferin	f(17–42), f(1–16-s-s-f43–48),	inhibicija rasta bakterija (<i>in vitro</i>)	(Dionysius i Milne 1997)
Laktofericin		f(1–42-s-s-f43–48)		
Laktofericin B	<i>Peptolitcki:</i> laktoferin	f(17–41)	Inhibicija rasta bakterija, Makromolekularna sinteza	(Ulvatne i sar. 2004)
	<i>Sintetički:</i> laktoferin	f(17–41)	Bez post-antibiotički efekat <i>E.coli,S.aureus</i> (<i>in vitro</i> test)	(Haukland i Vorland 2001)

Najznačajniji AKE I inhibitorni peptidi mlijeka su kazokinini- derivati kazeina i laktokinini-derivati surutke. Ovi peptidi su identifikovani u fermentisanim mliječnim proizvodima (Fuglsang i sar. 2002; Miguel i sar. 2005; van der Zander i sar. 2008) i u proteinskim hidrolizatima dobijenim upotrebom pepsina, tripsina i himotripsina (Maruyama i Suzuki 1982; Maeno i sar. 1996; Abubakar i sar. 1998; Hirota i sar. 2007). Najefikasniji kazokinini su produkti α_{s1} kazeina u djelu sekvence 23-27 i β -kazeina sekvence 177-183, sa IC_{50} vrijednostima manjim od $20 \mu\text{molL}^{-1}$ (Tidona i sar. 2009; Farrell 2011). Količina i kvalitet AKE I inhibitornih peptida u mlijeku i mliječnim proizvodima zavise prije svega od trajanja fermentacije i upotrebljenih starter kultura. Mikroorganizmi koji se koriste za njihovu produkciju, treba da posjeduju visoku proteolitičku aktivnost i da budu bezbjedni za ljudsku upotrebu. Zbog toga su bakterije mliječne kiseline najčešće korišćeni mikroorganizmi u starter kulturi. Fermentacijom mlijeka starter kulturama *Str. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* u odnosu 1:1 nastaju peptidi značajne antihipertenzivne aktivnosti (Hugenholtz 2013). Pored ovih startera i probiotske bakterije kao i rod *Lb. helveticus* LBK-16H imaju mogućnost stvaranja hidrofилnih peptida sa izuzetno visokom AKE I inhibitornom aktivnošću (Hugenholtz 2013). Nakamura i sar. (1995) su koristili *L. helveticus* zajedno sa kvascima *Saccharomyces cerevisiae* za dobijanje AKE I inhibitornih peptida: IPP I VPP. Nielsen i sar. (2009) su ispitivanjem AKE inhibitorne aktivnosti fermentisanih mliječnih proizvoda dobijenih upotrebom 13 različitih sojeva bakterija mliječne kiseline tokom sedam dana skladištenja zaključili da sojevi *Lb. helveticus* i *Lactococcus* imaju najveću proteolitičku i AKE aktivnost nastalih produkata. Isti autori su dokazali značajan porast AKE inhibitorne aktivnosti tokom skladištenja kod svih dobijenih proizvoda (Nielsen i sar. 2009). Pregled mikroorganizama sa dokazanom mogućnosti proizvodnje AKE-inhibitornih peptida dat je u tabeli 15.

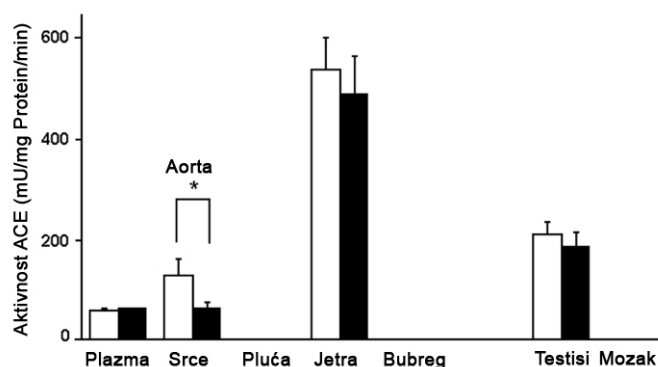
Tabela 15. Mikroorganizmi koji imaju mogućnost sinteze AKE inhibitornih peptida

Mikroorganizmi	Identifikovani peptidi	Protein prekursor	Reference
<i>L. helveticus</i> CP790, and <i>S. cerevisiae</i>	Nd	β -CN, κ -CN	(Yamamoto i sar. 1994; Hata i sar. 1996; Nakamura i sar. 1996; Mizushima i sar. 2004)
<i>L. helveticus</i> LBK16H	β -CN (74-76)	β -CN, κ -CN	(Hata i sar. 1996; Sipola i sar. 2001; Seppo i sar. 2003)
<i>L. helveticus</i> CPN4	κ -CN (108-110) β -CN (84-86)	Proteini surutke	(Yamamoto i Takano 1999)
<i>L. helveticus</i> NCC2765	β -CN (62-67) β -CN (75-83) β -CN (149-153) β -CN (155-158) β -CN (183-190) β -CN (198-205) β -CN (208-213) β -CN (208-224) α_{s2} -CN (205-212)	α_{s1} -CN, β -CN	(Robert i sar. 2004)
<i>L. helveticus</i> CHCC637	Nd	Kravlje mlijeko	(Fuglsang i sar. 2002)
<i>L. helveticus</i> CHCC641	Nd	Kravlje mlijeko	(Fuglsang i sar. 2002; Minervini i sar. 2009)
Kombinacija startera: <i>S. thermophilus</i> CR12, <i>L. casei</i> LC01, <i>L. helveticus</i> PR4, <i>L. plantarum</i> 1288	Nd	Kozje mlijeko	(Gobbetti i sar. 2000)
<i>L. delb. bulgaricus</i> SS1	β -CN (6-14) β -CN (7-14) β -CN (73-82)	β -CN, κ -CN	
<i>L. lactis cremoris</i> FT4	β -CN (74-82) β -CN (75-82) β -CN (6-14) β -CN (7-14) β -CN (47-52)	β -CN, κ -CN	(Gobbetti i sar. 2000)
<i>K. marxianus marxianus</i>	β -CN (169-175) κ -CN (152-160) κ -CN (155-160)	β -LG	(Belem i sar. 1999)

<i>E. faecalis</i> CECT5728 <i>E. faecalis</i> CECT5727 <i>E. faecalis</i> CECT5826 <i>E. faecalis</i> CECT5827	Nd	Kravlje mlijeko	(Miguel i sar. 2005)
Kefir	β -CN (48-56) β -CN (94-105) β -CN (94-106) β -CN (203-209) β -CN (50-54) β -CN (58-68) α _{s1} -CN (97-102) α _{s2} -CN (174-179) α _{s1} -CN (18-23) α _{s2} -CN (203-208) κ -CN(119-123)	Kravlje mlijeko	(Quiros i sar. 2005; Santillo i sar. 2009)

Iako ovi peptidi *in vitro* pokazuju značajnu AKE inhibitornu aktivnost, njihova *in vivo* aktivnost prije svega zavisi od otpornosti na gastrointestinalne enzime varenja, intestinalnu absorpciju i proteolizu u krvnim sudovima. Tako na primjer, neki mliječni peptidi imaju značajno nižu AKE-inhibitornu aktivnost u *in vitro* uslovima, nego sintetički inhibitori, npr. Kaptopril, ali u *in vivo* uslovima ispoljavaju značajno veću aktivnost. Ovo može biti posledica, mnogo većeg ćelijskog afiniteta prema prirodno izvedenim inhibitorima kao i njihove sporije eliminacije iz organizma (Fujita i Yoshikawa 1999). Nasuprot tome neki peptidi koji ispoljavaju visoku *in vitro* AKE- inhibitornu aktivnost u *in vivo* uslovima čak ni ne pokazuju aktivnost. Primjer je peptid FFVAP izolovan iz frakcija α _{s1}-kazeina (Pihlanto-Leppala A i sar. 1998; Gobbetti i sar. 2000; Meisel i FitzGerald 2003; FitzGerald i sar. 2004) sa izuzetno visokom *in vitro* aktivnosti ($IC_{50} = 6 \mu\text{molL}^{-1}$) (Maruyama i sar. 1985) ali bez aktivnosti u *in vivo* uslovima. Klinička ispitivanja pokazala su otpornost tripeptida IPP na enzime varenja, čime ovi peptidi nerazgrađeni dospjevaju u krvni sistem (Tidona i sar. 2009; Jäkälä i Vapaatalo 2010). Stoga se može zaključiti da su C- terminalne P-P veze otporne na proteolitičke enzime sistema za varenje, prije svega na proteolizu pepsinom, i kao takvi nepromjenjeni dospjevaju do aktivnog mjesta AKE I.

Osnovna hipoteza o mehanizmu djelovanja bioaktivnih peptida mlijeka na AKE I pretpostavlja da se oni absorbiraju putem krvi i koncentruju u aorti gdje ispoljavaju svoju inhibitornu aktivnost na AKE ekspresovanom na površini endotelnih ćelija (Nakamura i sar. 1996; Tidona i sar. 2009). Slika (8)



Slika 8. Aktivnost AKE na različitim organima spontane hipertenzije ispoljena posle tretmana sa (□) svježim i kiselim mlijekom (■) (Takano 2002)

Tromboza je patološki problem stvaranja ugrušaka ili tromba u arterijama, venama ili srčanim komorama koji je uobičajno povezan sa problemima hipertenzije. Sa proteinsko-hemijskog gledišta, mehanizam koagulacije mlijeka se može porediti sa zgrušavanjem krvi. Stoga je i očekivano da je kazoplatelin kazoplatelin oligopeptid f (106-116) kravljeg κ -kazeina, koji je uključen u koagulaciju mlijeka, strukturni homolog ljudskog fibrinogena gamma-lanca f (400–411) (Tamime 2007; Tidona i sar. 2009). Kazoplatelini sprečavaju agregaciju ADP-aktivnih trombocita kao i interakciju fibrinogenkog gama lanca sa specifičnim receptorima na krvnim pločicama (Tamime 2007; Tidona i sar. 2009). Kazoplatelin je mali κ -kazeinski fragment (106-110) koji pokazuje antikoagulišuću aktivnost inhibicijom fibrinogenkog vezivanja za trombocite. Pored toga otkriven je i niz drugih fragmenta κ -kazeinglikopeptida koji pokazuju neku od pomenutih aktivnosti (Tamime 2007; Tidona i sar. 2009).

Osim svega navedenog, treba istaći da fermentisani mliječni proizvodi pored navedenih peptida koji su nosioci biološke funkcije, sadrže i vijabilne mikroorganizme starter kultura kao i druge aktivne komponente kao što je kalcijum, koji mogu doprinijeti cjelokupnoj *in vivo* hipotenzivnoj aktivnosti (Sipola i sar. 2001).

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA

Slobodni radikali i antioksidativni odbrambeni sistem

Patološka stanja organizma (kao npr. starenje, kancerogeneza, kardiovaskularna, neurološka oboljenja, dijabetes, neplodnost itd.) uzrokovana su nekontrolisanom i

prekromjernom produkcijom slobodnih radikala u humanom organizmu, najčešće toksičnim oblicima kiseonika (reaktivne kiseonične vrste) koji izazivaju degradiraju ćelijskih proteina, enzima, lipidne membrane, DNA i time umanjuju celularnu resorpciju (Chance i sar. 1979; Urso i Clarkson 2003). Patološke promjene organizma najčešće su posledica načina ishrane, kvaliteta hrane i životne sredine kao i navika i fizičke aktivnosti.

Čak 2-5% molekuskog kiseonika koji se unese u organizam ostane neredukovano u respiratornom lancu ili ćelijama i predstavlja toksični oblik. U normalnim uslovima nastajanje slobodnih radikala je u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Ukoliko se poremeti ravnoteža, dolazi do povećane produkcije slobodnih radikala ili do smanjenja koncentracije antioksidanata. Ovakvo stanje naziva se *oksidativni stres*. Reaktivne kiseonične vrste značajne za oksidativni stres su: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), perhidroksilradikal (HOO^{\bullet}), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$), alkoksil radikal (RO^{\bullet}) i peroksil radikal (ROO^{\bullet}). Ovi slobodni radikali nastaju kao međuproizvodi hemijskih reakcija a njihova osnovna osobina je nezasićenost elektronima. Nespareni elektroni mogu da se nalaze na

- O-atomu, kao kod alkoksil, hidroksil, peroksil i superoksid anjon radikala (RO^{\bullet} , $^{\bullet}OH$, ROO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$),
- C-atomu, kao kod alkil radikala ($^{\bullet}CH_3$, $CH_3CH_2^{\bullet}$),
- N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala (NO^{\bullet}) ili na
- S-atomu, kao kod tiil radikala ($n-C_6H_9S^{\bullet}$) i dr. (Tumbas 2005).

Najjednostavniji slobodni radikal je vodonikov atom, koji ima jedan proton i jedan elektron u elektronskom omotaču a nespareni elektron mogu imati i atomi halogena (npr. Cl^{\bullet}), alkalnih metala (Na^{\bullet}) ili nekih jona metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}) (Piletić i sar. 1993).

Pregled najvažnijih slobodnih radikala i njihovih neradikalnih oblika dat je u tabeli.

Tabela 16. Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste (Tumbas 2005; Halliwell 2011)

Slobodni radikali	Neradikalski oblici
Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	
Superoksid anjon radikal $(O_2^{\cdot-})$	Vodonik peroksid H_2O_2
Hidroksid radikal $\cdot OH$	Hipobromna kiselina $HOBr$
Hidroperoksid radikal HO_2^{\cdot}	Hipohlorna kiselina $HOCl$
Peroksi radikal RO_2^{\cdot}	Ozon O_3
Alkoksi radikal RO^{\cdot}	Singletni kiseonik 1O_2
Karbonatni radikal $CO_3^{\cdot-}$	Organski peroksid $ROOH$
Ugljendioksidni radikal $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$
	Peroksinitritna kiselina $ONOOH$
Reaktivne hlorne vrste (RCS)	
Atomski hlor Cl^{\cdot}	Hipohlorna kiselina $HOCl$
	Nitril (nitronijum) hlorid NO_2Cl
	Hloramini
Reaktivne azotove vrste (RNS)	
Azotmonoksidni radikal NO^{\cdot}	Azotasta kiselina HNO_2
Azotdioksidni radikal NO_2^{\cdot}	Nitrozo katjon NO^+
	Nitroksidni anjon $NO^{\cdot-}$
	Dinitrogen tetroskid N_2O_4
	Dinitrogen trioksid N_2O_3
	Peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$
	Peroksinitritna kiselina $ONOOH$
	Nitronijum (nitril) katjon NO_2^+
	Alkilperoksinitriti $ROONO$
	Nitril (nitronijum) hlorid NO_2Cl

Antioksidativni odbrambeni mehanizam ljudskog organizma od oštećenja koja izazivaju slobodni radikali sastoji se od intracelularnih enzima koji su sposobni da neutrališu reaktivne slobodno radikalske vrste. Mišljenje mnogih naučnika je, da su antioksidanti redukujuća sredstva koja i sama lako oksiduju i zato uspješno dovode do terminacije lančanih reakcija. Postoje razni mehanizmi njihovog djelovanja (Weber, 1996):

- ✓ djeluju kao hvatači („skevindžeri“) slobodnih radikala,
- ✓ daju elektrone i redukuju neka jedinjenja,
- ✓ razgrađuju hidroperokside lipida koji su nastali u fazi propagacije,
- ✓ eliminišu dejstvo nascentnog oblika kiseonika,
- ✓ inhibiraju neke enzime,
- ✓ pokazuju sinergetske efekte.

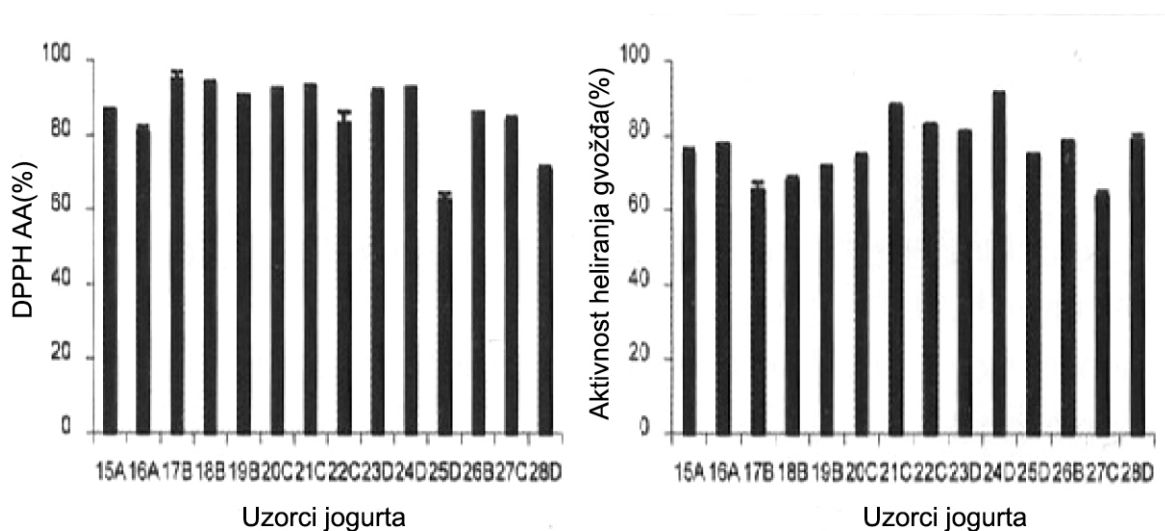
Primarna reakcija u tom smislu je dismutacija superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i kiseonik, enzimom superoksid dismutazom, koju prati i uklanjanje vodonik peroksida u prisustvu glutation peroksidaze (Čanadanović-Brunet 1997). Endogeni antioksidanti u organizmu su ženski polni hormoni, koenzim Q10, katalaze, glutation itd. Odbrana organizma od oksidativnog stresa sastoji se od enzimskih antioksidanata i antioksidativnih vitamina. Enzimski antioksidanti uključuju superoksid dismutazu, glutation peroksidazu i katalazu, dok neenzimski antioksidanti uključuju vitamine E i C, karotenoide, polifenole i mikronutrijente (selen, bakar i cink) kao sastavne komponente metaloprotein-enzima (Andallu i sar. 2011; Vitas i sar. 2013). Zbog sve veće izloženosti štetnim uticajima životnog okruženja i velike produkcije slobodnih radikala, neophodno je preventivno inhibirati peroksidaciju lipida i produkciju slobodnih radikala kako u živim ćelijama tako i u hrani. Stoga su pored endogenih antioksidanta, organizmu potrebni i egzogeni antioksidanti. Sintetički antioksidanti se zbog svoje visoke efikasnosti, stabilnosti i niske cene u velikoj mjeri primjenjuju u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Utvrđeno je da neki sintetički antioksidanti imaju toksično, odnosno kancerogeno dejstvo, pa se zbog toga sve više zamjenjuju prirodnim antioksidantima. Najznačajniji izvor prirodnih antioksidanata su ljekovito bilje, začinsko bilje, žitarice, voće i povrće, animalni proizvodi, fermentisani proizvodi i biljni voskovi (Hall iiii 2001)

Aktivnost antioksidanata zavisi ne samo od njihove strukture, nego i od mnogih drugih faktora, kao što su koncentracija, temperatura, svjetlost, tip supstrata, fizičko stanje sistema, kao i prisustvo mikrokomponentata koje deluju kao prooksidanti ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova 2001).

Antioksidativni potencijal

Najnovija istraživanja pokazuju da su mlijeko i fermentisani mliječni proizvodi izuzetno bogati antioksidativnim materijama. Antioksidativna aktivnost mlijeka i mliječnih proizvoda zavisi prije svega od sadržaja antioksidativnih supstanci, zatim sadržaja masti i dodataka koji se koriste u procesu proizvodnje kao što su voće, prebiotici i sl. Takođe, može

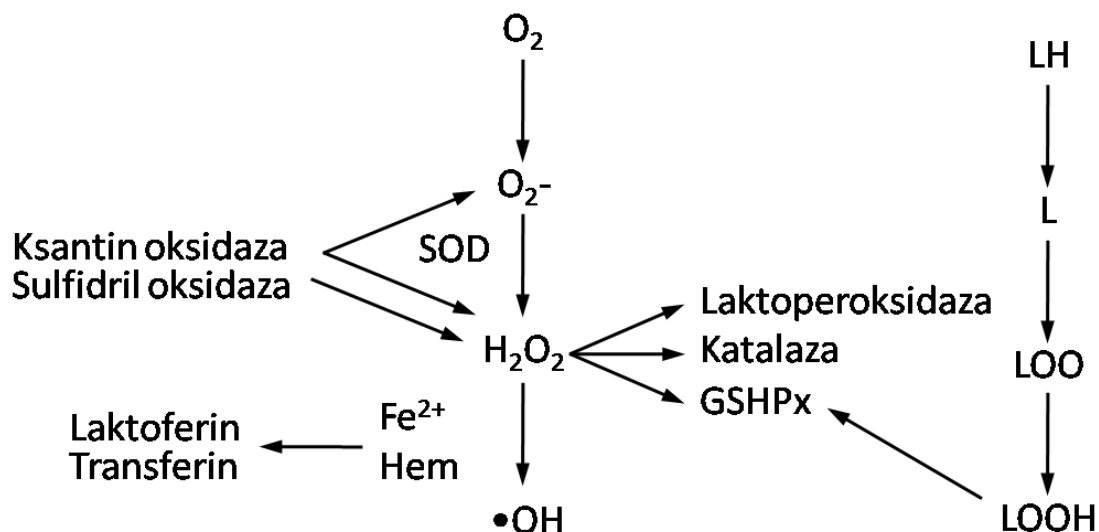
se zapaziti veća antioksidativna aktivnost u mlijeku obogaćenom vitaminima (A+D₃) (Živković i sar. 2009). Što se tiče uticaja temperature na antioksidativnu aktivnost, više vrijednosti zabeležene su u mlijeku tretiranom visokom temperaturom (UHT tretman, engl. ultra high temperature), što se može objasniti prisustvom produkata Majlardovih reakcija (Unal 2012).



Legenda: 15A-djelimično obrani jogurt (2,8% m.m.); 16A-obrani jogurt (0,15% m.m.); 17B-Voćni jogurt-jagoda (3,8% m.m.); 18B-Voćni jogurt-šumsko voće (3,8% m.m.); 19B-Voćni jogurt-breskva i kajsija (3,8% m.m.); 20C-Probiotski jogurt sa kajsijom (2,8% m.m.); 21C-Probiotski jogurt sa jagodom (2,8% m.m.); 22C-Probiotski nativni jogurt (3,5% m.m.); 23D-Voćni jogurt-jagoda (2,1% m.m.); 24D-Voćni jogurt-malina (2,1% m.m.); 25D-Voćni jogurt-breskva (2,1% m.m.); 26B-Punomasni jogurt (3,9% m.m.); 27C-Punomasni jogurt (3,8% m.m.); 28D-Nativni jogurt (3% m.m.)

Slika 9. Antioksidativna aktivnost (AA) različitih fermentisanih mliječnih proizvoda tipa jogurta (Unal 2012)

Mehanizam antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih proizvoda pripisuje se bioaktivnosti pojedinih proteinskih frakcija mlijeka kao i direktnoj aktivnosti, tj. sposobnosti starter kultura da inhibiraju peroksidaze i razlažu superoksid anjon i vodonikperoksid (Korpela i sar. 1997; Kullisaar i sar. 2002). Istraživanja na ovom polju i dalje su aktuelna, a posebno se odnose na mehanizme djelovanja (slika 10).



Slika 10. Potencijalni mehanizmi djelovanja pro- i antioksidanata u mlijeku (Lindmark-Månsson i Åkesson 2000)

Najranija istraživanja antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih proizvoda vezana su za sposobnost soja *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* da razgrade κ -kazein do peptidnih frakcija antioksidativnih sposobnosti. Peptidne frakcije koje sadrže metionin, glutamin, tirozin, lizin, histidin, cistein, valin i prolin posjeduju izrazite antioksidativne sposobnosti (Kudoh i sar. 2001; Rajapakse i sar. 2005) su izolovali sekvencu Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met iz fermentisanog mlijeka dobijenog upotrebom *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* koja ima veliku sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala. Kasnija istraživanja ukazivala su na mogućnost upotrebe i drugih starter kultura za proizvodnju fermentisanih proizvoda povećane antioksidativne aktivnosti. Sah i sar. (2014) su dokazali korelaciju- zavisnost antioksidativne aktivnosti i stepena proteolize fermentisanih mliječnih proizvoda dobijenih kombinacijom probiotskih sojeva *Lactobacillus acidophilus* (ATCC_4356TM), *Lactobacillus casei* (ATCC_393TM) i *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (ATCC_BAA52TM) (Sah i sar. 2014). Virtanen i sar. (2007) su takođe pokazali mnogo veću antioksidativnu aktivnost fermentisanih proizvoda dobijenih upotrebom mješanih starter kultura u poređenju sa proizvodima dobijenih upotrebom istih pojedinačnih starter kultura. Prednost mješanih starter kultura posledica je sinergističkog efekta peptidnih frakcija nastalih tokom fermentacije. Prvo *in vitro* istraživanje djelovanja *Lactobacillus fermentum* LF31 na adenokarcinogenim ćelijama linije T-29 ljudskog debelog crijeva pokazala su značajnu antioksidativnu aktivnost ovoga soja (Frank 1995; Persichetti i sar. 2014)

Farvin i sar. (2010) su izolovali frakcije α_{s1} i α_{s2} kazeina kao i nekoliko frakcija β -kazeina iz jogurta koje posjeduju antioksidativnu aktivnost LC-MS/MS metodom. Zanimljivo je da skoro sve izolovane frakcije sadrže najmanje jedan prolin kao aktivnu reziduu. Pored toga identifikovan je i značajan broj slobodnih amino-kiselina His, Tyr, Thr i Lys, čija je antioksidativna aktivnost poznata još od ranije (Farvin i sar. 2010). Mehanizam antioksidativne aktivnosti bioaktivnih peptida zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika aminokiselinske sekvence. Tako na primjer, aromatične amino kiseline kao što su fenilalanin, triptofan i tirozin mogu stabilizovati slobodni radikal doniranjem protona (Chen i sar. 1998). Hidrofobne rezidue, valin, leucin, tirozin povećavaju rastvorljivost peptida u lipidnom matriksu i time pospiješuju pristupačnost hidrofobnim slobodno-radikalnim vrstama ili polinezasićenim masnim kiselinama (Qian i sar. 2008). Biološka funkcija antioksidativnih peptida kao i ostalih bioaktivnih peptida zavisi od njihove biodostupnosti. Osnovni farmakokinetički princip LADME (liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion - oslobađanje, absorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje) najbolje ilustruje proces realizacije bioaktivnosti u organizmu. Peptidi se u organizmu absorbuju i transportuju različitim mehanizmima u zavisnosti od veličine i sastava aminokiselinske sekvence.

Neki od definisanih mehanizama su (Power i sar. 2013):

- Paracelularni put- veliki hidrofilni peptidi se transportuju energetski nezavisnom pasivnom difuzijom kroz uske spojeve;
- Transcelularni put- hidrofobni peptidi se transportuju putem nosača olakšanom difuzijom. Ovo je energetski zavisna difuzija kroz ćeljsku membranu;
- Limfni sistem- lipofilni, veliki peptidi se absorbuju iz međuprostora u limfni sistem
- Peptidni nosači- Peptidi otporni na hidrolizu se transportuju iz enterocita (crijevnih absorpcione ćelije) u krvotok preko nosača smještenih na crijevnoj bazolateralnoj membrani, npr. PepT1

Pregled antioksidativnih peptida proteina mlijeka dat je u tabeli 17.

Tabela 17. Peptidi proteina mlijeka koji pokazuju antioksidativnu aktivnost

Proteinski prekursor	Treatment	Peptidi	Fragmenti	Antioksidativna aktivnost	Reference
Kazein (cn)	Pepsin	Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu	α_{S1} -cn f(144-149)	Sposobnost hvatnja slobodnih radikala: Superoksid anjon Hidroksidil radikal DPPH radikal	(Suetsuna i sar. 2000)
	Tripsin	Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys	β -cn f(98-105)	Sposobnost hvatanja DPPH radikala	(Rival i sar. 2001)
		Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	β -cn f(177-183)		
		Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys	β -cn f(169-176)		
		Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys	β -cn f(170-176)		
		Kazeinfosopeptidi		Inhibiticija nastanka TBARS Sposobnost hvatanja slobodnih radikala	
Mlijeko	Fermentacija sa <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met	k-cn f(96-106)	Sposobnost hvatnja DPPH radikala	(Kudoh i sar. 2001)
β-Laktoglobulin (b-lg)	Enzimska modifikacija	Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile	β -lg f(19-29)	Sposobnost hvatnja radikala (Oxygen radical absorbance capacity ORAC)	(Hernandez-Ledesma i sar. 2005)
	Corolase PP (Corolase PP)	Met-His-Ile-Arg-Leu	β -lg f(145-149)		
		Tyr-Val-Glu-Glu-Leu	β -lg f(42-46)		

Osim navedenih bioaktivnih peptida koji pokazuju antioksidativna svojstva, fermentisani mliječni proizvodi u velikoj količini sadrže riboflavin, u nešto manjoj količini retinol, a u maloj koncentraciji sadrže tokoferol i askorbinsku kiselinu. Mlijeko i mliječni proizvodi sa većim sadržajem mliječne masti (2,8%) imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na mlijeko sa manjim sadržajem masti (1.6%), zbog veće reaktivnosti liposolubilnih antioksidanata i membranskih proteina masne globule (Živković i sar. 2009; Unal 2012).

ZDRAVSTVENI ASPEKT FERMENTISANIH MLIJEČNIH PROIZVODA

Koncept funkcionalne hrane

U industrijski razvijenom društvu sve su više naglašeni zdravstveni problemi izazvani preuhranjenošću i konzumiranjem nutritivno siromašne a hrane visoke energetske vrijednosti . Nasuprot tome u siromašnim zemljama javljaju se problemi nedovoljne količine hrane potrebne za normalan rast i razvoj. Zbog ovih problema postoji sve veća potreba za proizvodnjom funkcionalne hrane sa naglašenim zdravstvenim i nutritivnim efektima. Koncept funkcionalne hrane koja pored uobičajenih nutritivnih funkcija utiče i na poboljšanje zdravstvenog stanja organizma smanjenjem rizika od bolesti potiče još od 80-ih godina prošlog vijeka. Glavni zdravstveni efekti su obično povezani sa sadržajem biološki aktivnih komponenata (vitamini, dijetetska vlakna, probiotske kulture, minerali, masne kiseline, itd.-) koje pozitivno utiču na fizičko i mentalno zdravlje (Diplock i sar. 1999; Ashwell 2001; Kwak i Jukes 2001; Roberfroid 2002). Zbog toga su zdravstveni uticaji funkcionalne hrane podjeljeni u dvije grupe, jedna se odnosi na nutritivni aspekt i predstavlja mogućnost efikasnog snadbevanja nutrijentima konzumiranjem manje količine proizvoda. Druga je fiziološka funkcija koja uključuje profilaktičke i terapijske efekte. Fermentisani mliječni proizvodi zbog svojih multifunkcionalnih efekata na zdravlje ljudi svrstavaju se u funkcionalnu hranu.

Netolerancija na laktozu

Laktoza (4-0-β-D-galaktopiranozil-D-glukopiranoza, C₁₂H₂₂O₁₁) je najzastupljeniji ugljeni hidrat u mlijeku i mliječnim proizvodima i glavni izvor energije novorođenčadi. Međutim, tokom starenja sve češće se javlja smanjenje aktivnosti enzima β-galaktozidaze

tankog crijeva zaduženih za razgradnju laktoze čime se javljaju zdravstvene poteškoće tokom varenja. Ove poteškoće se manifestuju kao nadimanje i dijareja. U slučajevima laktozne netolerancije, ferementisani mliječni napici imaju značajnu prednost upotrebe u odnosu na nefermetisana mlijeka, usled djelimične razgradnje laktoze tokom ferementacije. Sadržaj laktoze u mlijeku je od 4-5%, ali je kod jogurta ta količina smanjena na oko 3 %. Pored smanjenog sadržaja laktoze, neka ispitivanja pokazuju sposobnost enzima laktaze BMK-a da razlažu laktozu čak i u crijevima (Cifelli i sar. 2011).

Apsorpcija minerala

Kalcijum je gradivni element kostiju i zuba, neophodan je za mišićne kontrakcije, prenošenje nervnih signala, za izlučivanje hormona i enzima. Stalan nivo kalcijuma u krvi je neophodan da bi procesi u organizmu nesmetano funkcionisali. Pored toga što se nalazi u velikoj količini u mlijeku, kalcijum u ovom obliku ima mnogo veću biološku iskorištenost u odnosu na istu količinu u drugom obliku. Ovakva prednost proizilazi iz mnogo bolje apsorpcije kalcijuma usled nastale mliječne kiseline kao i fosfolipida nastalih hidrolizom kazeina. Nedavna ispitivanja na modelima životinja sa osteoporozom su pokazala doprinos mliječne kiseline u povećanju gustine kalcijuma u kostima i samim tim i njegovoj apsorpciji. Iako ova zapažanja sugerišu na poboljšanu apsorpciju kalcijuma u prisustvu mliječne kiseline, na osnovu dosadašnjih naučnih istraživanja nije moguće definitivno potvrditi prednost konzumiranja ferementisanih nad neferementisanim mliječnim proizvodima (Cifelli i sar. 2011).

Uticaj na gastrointestinalni trakt

Pored obilja autohtone mikroflore, digestivni trakt posjeduje i takozvane prolazne mikroorganizme koji mogu izazvati poremećaje i infekcije patogenim vrstama ili mogu poboljšati peristaltiku i funkciju autohtone mikroflore. Uticaj fermentisanih mliječnih proizvoda na rad digestivnog trakta poznat je još od davnina. U početku se taj uticaj vezivao samo za proizvode dobijene upotrebom probiotskih vrsta mikroorganizama. Ispitivanja uticaja tradicionalnih BMK-a na digestivni trakt pokazala su jačanje njegove imune funkcije uprkos nemogućnosti njegove kolonizacije. Mehanizam djelovanja BMK pripisuje se blagotvornom uticaju mliječne kiseline, kao glavnog produkta fermentacije mlijeka, koja podstiče funkciju

pankreeasa stimulišući sekreciju svih digestivnih organa) potpomaže cirkulaciju krvi, sprečava procese truljenja i konstipaciju podstičući peristaltiku creva (Frank 1995).

Antikancerogeno dejstvo

Kancer je jedan od najčešćih uzročnika smrti današnjice. Prema epidemiološkim studijama incidencija kancera je u velikoj mjeri posledica uticaja životne sredine, a posebno ishrane. Istarživanja u Holandiji su pokazala da oboleli od kancera dojke mnogo manje ili uopšte ne konzumiraju fermentisane mliječne napitke u odnosu na kontrolnu grupu. Upotreba fermentisanih mlečnih proizvoda posebno se dovodi u vezu sa smanjenjem rizika kancera debelog crijeva. Predloženo je nekoliko mogućih inhibitornih mehanizma djelovanja fermentisanih mliječnih proizvoda za tu svrhu.

Modifikacija crijevne mikroflore. Poznato je da konzumiranje veće količine mesa povećava i rizik kancera debelog crijeva, kao posledica velike aktivnosti kancerogeneza kao što su enzimi glukoronidaze, nitroreduktaze, azoreduktaze i steroida-7-dehidroksilaze. Nekoliko studija pokazalo je značajno smanjenu aktivnost ovih enzima u prisustvu *Lactobacillus acidophilus-a* ali i upotrebom acidofilnog mlijeka. *Lactobacillus acidophilus* je takođe pokazao inhibitorno dejstvo nad hemijskim kancerogenozama pacova, čime je potvrđena efikasna inhibitorna aktivnost ove starter kulture u slučajevima kancera debelog crijeva (Takano i Yamamoto 2002).

Uticaj na imunološki sistem- Imuni sistem pored toga što brani organizam od bakterijskih i virusnih infekcija takođe igra važnu ulogu u mnogim bolestima kao što su kancer, alergije i autoimune bolesti. Pokazano je da intestinalni trakt, kao periferni organ, ima funkciju i imunog organa koji štiti od crijevnih infekcija i utiče na systemske imunološke funkcije. Na njegovu funkciju prije svega utiče crijevna mikroflora i ishrana. Upotreba fermentisanih mliječnih napitaka, pored uticaja na kancerogeneze, takođe inhibira i infektivna oboljenja. Istraživanja su pokazala da BMK mogu da utiču na funkcije imunih ćelija aktiviranjem makrofaga i *natural killer (NK) (prirodnih ubica)* ćelija. Aktivnost ovih ćelija primjećena je kao antikancerogeno dejstvo stratera *Lb. casei* i *Lb. delbruecki spp. bulgaricus* na životinjskim modelima zaraženim *Klebsiella pneumoniae*. U navedenim ogledima pokazano je da zaražene životinje koje su konzumirale fermentisane mliječne napitke žive duže u odnosu na kontrolnu grupu koja je upotrebljavala samo nefermentisane mlijeko. Osim toga odvojene studije su pokazale uticaj BMK-a na citokine. Citokini su proteini male molekulske mase, od 6-70 kDa, koji djeluju kao posrednici između elemenata imunog sistema, koji regulišu njihove

imune odgovore prenošenjem informacije između ćelija. Citokini su neophodni za normalno odvijanje svih faza imunološkog odgovora i značajan su faktor regulacije tipa, jačine i dužine imunološke reakcije. Svi imunološki odgovori u organizmu su praćeni produkcijom citokina. U humanim kliničkim studijama pokazano je povećanje interferona u serumu, koji aktiviraju NK ćelije nakon unošenja jogurta u odnosu na unošenje nefermentisanog obranog mlijeka (Takano i Yamamoto 2002).

KOMBUHA SASTAV I OSOBINE

Kombuha je u široj javnosti poznata i kao ruska, japanska, kineska, indijska ili samo čajna gljiva, uprkos činjenici da ona nije gljiva u pravom smislu te riječi, niti je gljiva uključena u fermentaciju zaslađenog čaja. Naziv kombuha je dobila zbog stvaranja celulozne pelikule koja pluta na površini fermentacione tečnosti i izgledom podsjeća na gljive. Formalni, botanički naziv je *Medusomyces giseveii* (Hesseltine 1965). Vjeruje se da kombuha vodi porijeklo iz sjeveroistočne Kine (Mandžurije), a prvi zapisi o kombuha napitku su iz 221. godine p.n.e. Iz Azije se kombuha širila preko Sibira i unutrašnjosti Rusije, da bi prije više od 160 godina stigla u Evropu. Pored ljekovitih efekata koji se pripisuju kombuhi, primjena kombuha napitaka u kućnim uslovima je jednostavna, što doprinosi popularnosti ove grupe proizvoda (Malbaša 2009).

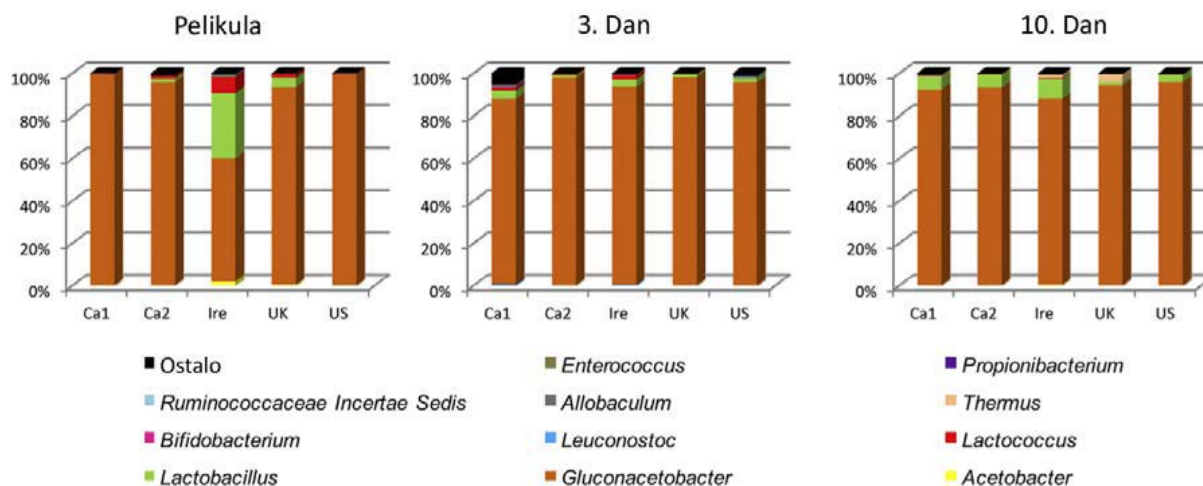
Slično radnoj kulturi kefirnih zrnaca, tačan mikrobiološki sastav kombuhe ne može biti preciziran, jer zavisi prije svega od podloge za fermentaciju i klimatskog područja (Jayabalan i sar. 2014). Kao prvi identifikovani mikroorganizmi starter kulture kombuhe bile su bakterije sirćetne kiseline *Acetobacter* i *Gluconobacter* i kvasci *Saccharomyces Zygosaccharomyces* (Hesseltine 1965). Neki od članova simbiotske zajednice i najvažnija jedinjenja koja proizvode prikazani su u tabeli 18 (Streiger i Steinegger 1957; Reiss 1987; Lončar i sar. 2006; Malbaša 2009)

Tabela 18. Simbiotske kulture prisutne u kombuhi i njihovo djelovanje (Streiger i Steinegger 1957; Reiss 1987; Lončar i sar. 2006; Malbaša 2009)

Mikroorganizmi	Izgled	Djelovanje
Bakterije sirćetne kiseline	okrugle ćelije najčešće u parovima-diplokoke	prevodi glukozu u glukonsku kiselinu
<i>Bacterium gluconicum</i>		
<i>Bacterium xylinum</i>	kraći ili duži štapići pojedinačni ili u parovima sređeni u lance- dugačke ili savijene niti	Na tečnostima stvara skrame
<i>Bacterium xylinoides</i>	kraći ili duži štapići pojedinačni ili u parovima sređeni u lance- dugačke ili savijene niti	na tečnostima stvara skrame
<i>Acetobacter ketogenum</i>	pokretni ili nepokretni štapići	oksidira alkohol u CH ₃ COOH
Kvasci	ćelije oblika limuna sa po 4 askospore	fermentira saharozu
<i>Saccharomyces Ludwigii</i>		
<i>Schizosaccharomyces Pombe</i>	cilindrične vegetativne ćelije sa zaobljenim krajevima sa po 4 askospore	fermentira saharozu
<i>Mycoderma</i>		biosinteza alkohola
<i>Torula</i> (dva oblika)	ćelije ovalne ili kruškaste	----
<i>Pichia fermentas</i>	ćelije različitog oblika od loptastog ili jajastog do cilindričnog često sa pseudomicelijom	stvara skramu
<i>Saccharomyces apiculatus</i>		
Štetni mikroorganizmi	ćelije u vidu niti	užegao ukus
Plesni		
Vinski kvasci	vegetativne ćelije okrugle, jajaste ili izdužene često sa pseudomicelijom	fermentacija vina
Strane bakterije sirćetne kiseline kao npr. <i>Bacterium ascendes</i>	štapići, pokretni	oksidira alkohol u CH ₃ COOH

Međutim danas je radna kultura kombuhe poznata kao asocijacija bakterija sirćetne kiseline (BSK) rodova *Acetobacter* i *Gluconobacter*, bakterija mliječne kiseline rodova *Lactobacillus* i autohtonih vrsta kvasaca (rodova *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*) (Sievers i sar. 1995; Yamada i sar. 1997; Chen i Liu 2000; Wu i sar.

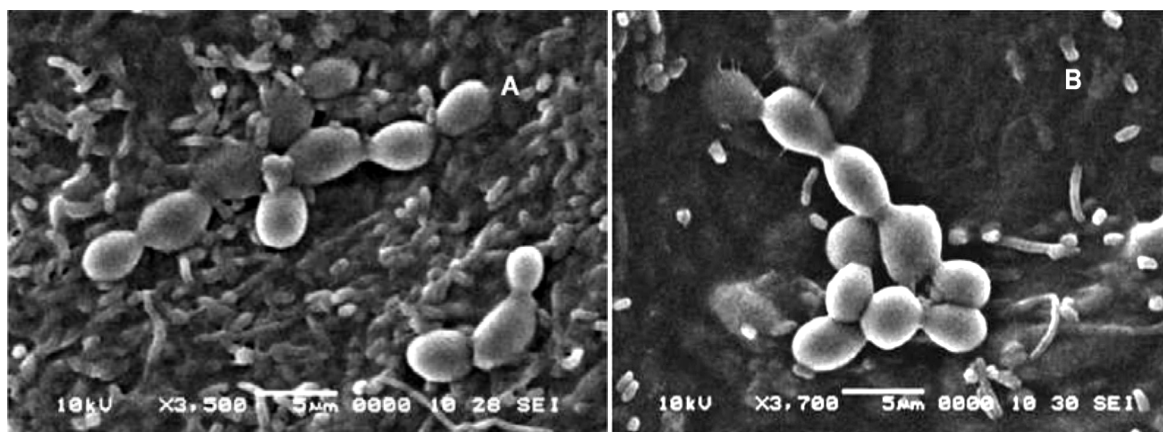
2004; Dutta i Gachhui 2006; Trovatti i sar. 2011; Zhang i sar. 2011; El-Salam 2012; Marsh i sar. 2014). Najnovija istraživanja mikrobiološkog sastava kombuhe dokazuju značajno prisustvo bakterija mliječne kiseline (Wu i sar. 2004; Zhang i sar. 2011; Marsh i sar. 2014). Autori Marsh i sar. (2014) su ispitivanjem kombuha uzoraka iz različitih područja utvrdili prisustvo BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, čija će koncentracija tokom fermentacije zaslađenog čaja od 3-10 dana povećava za 3.3%, ili čak za 39.4% u određenim čajnim napicima (slika 11).



Slika 11. Mikrobiološki sastav (do nivoa roda): (A) pelikule; (B) čajnog napitka nakon 3 dana fermentacije i (C) čajnog napitka nakon 10 dana fermentacije, na osnovu analize 16S RNK gena (Marsh i sar. 2014)

Kvasci su u simbiozi kombuhe zastupljeni u mnogo većem broju vrsta u odnosu na bakterije. Nalaze se djelom u pelikuli, a djelom u kultivacionoj tečnosti kao talog. Kvasci u ovoj simbiozi obavljaju niz funkcija kao što su biosinteza alkohola, oksidacija alkohola i organskih kiselina, inverzija šećera. Osnovna uloga kvasaca je da enzimom invertaza (saharaza, β -glukozidaza) hidrolizuju saharozu u podlozi za kultivaciju kombuhe i tako je učine dostupnom bakterijama sirćetne kiseline. Ove bakterije u nedostatku odgovarajućih enzima, saharozu kao takvu ne mogu da usvoje, odnosno molekul saharoze ne mogu da transportuju u ćeliju, niti ga mogu ekstracelularno hidrolizovati.

Na slici 12. dat je mikroskopski prikaz ćelija kvasaca i bakterija sirćetne kiseline u celuloznoj pelikuli kombuhe.



Slika 12. Prikaz asocijacije kvasaca i bakterija u celuloznoj pelikuli kombuhe elektronskom mikroskopijom (uvećanje 27A = 3500x i 27B = 3700) (Jayabalan i sar. 2014)

Funkcionalne karakteristike i biološki potencijal kombuha napitaka

Kombuha kao asocijacija kvasaca i bakterija- sposobna je da u inkubacionom periodu od 7 – 10 dana na optimalnoj temperaturi 25 - 30°C, transformiše veoma jednostavan supstrat, pod aerobnim uslovima, u blago gazirani, nakiseo osvežavajući napitak koji pored supstanci ekstrahovanih iz čaja sadrži i metaboličke produkte mikroorganizama:

- šećere (saharoza, glukoza, fruktoza),
- kiseline (glukonska, glukuronska, mliječna, vinska, ćilibarna, jabučna, limunska, oksalna, malonska, sirćetna),
- vitamine (C, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂),
- enzime (invertaza, amilaza, katalaza, citohrom-oksidaza),
- alkohole (etanol),
- jone esencijalnih elemenata (Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺).

Osim nabrojanih, utvrđeno je i prisustvo 14 aminokiselina, vitamina E, kofeina, antibiotski aktivnih materija, usninske kiseline, kao i drugih jedinjenja (Malbaša 2009).

Sadržaj najzastupljenijih komponenta u kombuha napitku prema Roussin-u (Roussin 1996) iznosi: za fruktoza 25 gL⁻¹, sirćetnu kiselinu 2 gL⁻¹ i glukonsku kiselinu 3,1 gL⁻¹. Ostale komponente etil glukonat, oksalna kiselina, glukarna kiselina, ketoglukonske kiseline, pirogroždana kiselina i druge organske kiseline prisutne su u koncentraciji manjoj od 1 gL⁻¹. Porijeklo kombuhe, klimatski faktori, kao i različiti sojevi kvasaca i bakterija značajno utiču na kvalitativni i kvantitativni sastav napitka. Utvrđeno je da, čak i kad je u pitanju jednaka dužina fermentacije i isti sadržaj saharoze (Simpson i Blay 1966; Reiss 1987; Blanc 1996) postoje značajne razlike u sadržaju metabolita nastalih tokom fermentacije. Tako sadržaj sirćetne kiseline varira prema različitim autorima, (Blanc 1996) je u podlozi sa 7% saharoze,

nakon 15 dana fermentacije odredio 6 gL^{-1} , (Sievers i sar. 1995) $2,1 \text{ gL}^{-1}$ nakon 10 dana, $5,8 \text{ gL}^{-1}$ nakon 20 dana, $13,1 \text{ gL}^{-1}$ a nakon 30 i čak $28,4 \text{ gL}^{-1}$ nakon 40 dana, dok su (Sreeramulu i sar. 2000) nakon istog perioda od 40 dana odredili $7,66 \text{ gL}^{-1}$ sirćetne kiseline a nešto niži sadržaj od $6,17 \text{ gL}^{-1}$ odredili su (Jayabalan i sar. 2007) u podlozi sa 10% saharoze posle 15 dana. Sa farmakološkog aspekta od metabolita kombuhe posebno su značajne glukuronska, L – mliječna kiselina, glukonska kiselina i vitamini.

Biološki vrijedna jedinjenja kao što su vitamini B grupe: tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (B_3), pantotenska kiselina (B_5), piridoksin (B_6), p-aminobenzoeva kiselina, vitamin B_{12} , folna kiselina, nikotinska kiselina, biotin, inozitol nastaju metaboličkom aktivnošću kvasaca čajne gljive (Petrović S 1995). Sintezu vitamina C vrše bakterija sirćetne kiseline, a ona u velikoj mjeri zavisi od izvora ugljenika u supstratu za kultivaciju, pri čemu saharoza u odnosu na glukozu i fruktozu stimulatивно deluje na sintezu vitamina C (Petrović S 1995).

S obzirom na veliki broj detektovanih nutritivno vrijednih metabolita kombuhe i potencijalnih terapijskih svojstava, poslednjih nekoliko decenija postoji veliko interesovanje za kombuhom kao funkcionalnim napitkom. Brojna pripisana terapijska i profilaktička svojstva kombuhe uglavnom su zasnovana na opservacijama i tvrdnjama njenih dugogodišnjih konzumenata. Zahvaljujući produktima metaboličke aktivnosti, napitak od kombuhe pored osvežavajućeg efekta, djeluje pozitivno kod upale krajnika, glavobolje, arterioskleroze, reumatizma, otežanog varenja itd. Istraživanja su dokazala antibiotsku aktivnost kombuhe prema *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Agrobacterium tumefaciens*, uglavnom zahvaljujući produkciji sirćetne kiseline tokom fermentacije (Sreeramulu i sar. 2001). Za većinu karakteristika kombuhe odgovorne su organske kiseline koje se proizvode tokom fermentacije.

Antioksidativno dejstvo kombuhe povezano je sa drugim farmakološkim efektima kao što su antikancerogeno i imunomodulatorno dejstvo, kao i prevencija artritisa i inflamacija (Jayabalan i sar. 2014). Pokazano je da kombuha čajni napitak ima veći antioksidativni potencijal u poređenju sa nefermentisanim čajem, što se pripisuje nastalim metabolitima male molekulske mase kao i strukturnoj modifikaciji polifenola u čaju enzimima prisutnih bakterija i kvasaca (Bhattacharya i sar. 2013). Identifikacija ovih ekstracelularnih enzima i metabolita zaduženih za hvatanje slobodnoradikalnih jedinica predstavlja neophodan korak za definisanje metaboličke aktivnosti kombuhe (Jayabalan i sar. 2014). Antioksidativni potencijal kombuha napitka pripremljenog na različitim čajnim podlogama, zeleni, crni čaj i na različite slobodne radikale raste sa dužinom trajanja fermentacije (Chu i Chen 2006; Jayabalan i sar. 2008; Yang i sar. 2009). Iako je antioksidativni potencijal i mogućnost

hvatanja slobodnih radikala kombuha čajnog napitka u korelaciji sa dužinom trajanja fermentacije, trajanje fermentacije duže od 10 dana nije preporučljivo zbog prevelike akumulacije organskih kiselina koje mogu imati štetno dejstvo pri upotebi .

In vivo istraživanje antioksidativne aktivnosti kombuhe sprovedo je nekoliko autora. Dipti i sar. (2003) su izazivali oksidativni stres u organizmu pacova dodavanjem rastvora olovo acetata dok su Bhattacharya i sar. (2011) u iste svrhe koristili organsko jedinjenje tercijalni butil hidroperoksid (TBHP). Rezultati oba nezavisna istraživanja su pokazali da primjena kombuhe u ishrani ovih životinja smanjuje lipidnu peroksidaciju i oštećenje DNK uz istovremeno povećanje nivoa glutaciona (Dipti i sar. 2003). Autori smatraju da je kombuha potencijalni antioksidativni agens i da u kombinaciji sa toksičnim TBHP i olovom održava antioksidativni status ćelija približno isti onome u netretiranim ćelijama.

Antikancerogeno dejstvo kombuha napitka dokazano je još 1951. godine na kliničkim ispitivanjima u Rusiji od strane *Centra za onkološka ispitivanja i Ruske akademije nauka u Moskvi*. (Cetojevic-Simin i sar. 2008) su takođe pokazali antiproliferativna svojstva kombuhe na HeLa ćelijama (cervix epithelial carcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma), i MCF-7 (breast adenocarcinoma) kolorimetrijskom metodom. Veliki broj istraživanja antikancerogene aktivnost kombuhe na linijama ćelija, pokazuje njen potencijal u inhibiciji angiogeneze izmjenom ekspresije angiogenskih stimulatora (Jayabalan i sar. 2011; Srihari i sar. 2013). Predloženi mogući antikancerogeni mehanizmi kombuha čajnog napitka su (Conney i sar. 2002; Ioannides i Yoxall 2003; Park i Dong 2003):

1. inhibicija mutacije gena,
2. inhibicija proliferacije kancerogenih ćelija,
3. podsticanje apoptoze kancerogenih ćelija,
4. usporavanje odnosno završetak metastaza

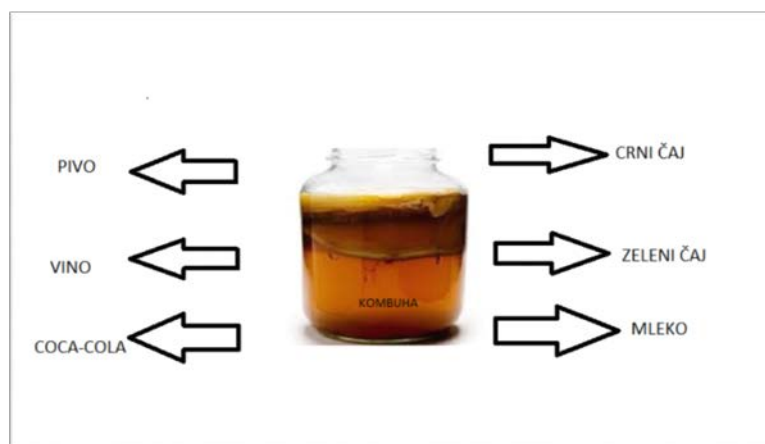
Antikancerogeno dejstvo kombuha napitka, pojedini autori pripisuju prisustvu 1,4-saharolaktona koji je detektovan u različitim koncentracijama. (Yang i sar. 2009) su nakon 8 dana fermentacije detektovali $2,30 \text{ mgml}^{-1}$ u tradicionalnom kombuha napitku, a u modifikovanom napitku (inokulisanom izolatom *Gluconobacter* sp.) $3,51 \text{ mgml}^{-1}$. Dok su (Bhattacharya i sar. 2011), nakon 14 dana fermentacije kombuhe odredili sadržaj od $1,32 \text{ mgml}^{-1}$ 1,4-saharolaktona.

Jedinjenje 1,4-saharolaktona inhibira djelovanje bakterijske β -glukuronidaze, enzima koji je indirektno povezan sa kancerom, prevođenjem konjugovanog oblik glukuronida u kancerogenu aglikonsku komponentu. Dokazano je da je aktivnost ovoga enzima u fecesu

osoba obolelih od raka debelog creva veća nego kod zdravih osoba, što ukazuje na značajnu njegovu ulogu u kancerogenezi (Wang i sar. 2010).

Primjena kombuhe u tehnologiji fermentisanih mliječnih napitaka

Pored uobičajnog supstrata za gajenje kombuhe, najčešće zaslađenog crnog i zelenog čaja, ispitivane su i mogućnosti upotrebe drugih supstrata: crnog piva, koka kole, vina (crno, belo), melase, ehinacee, mente, rtanjskog čaja, laktoze, glukoze, fruktoze, surutke i dr. (Reiss 1987; Reiss 1994; Bellosa–Morales i Hernandez–Sanchez 2003; Markov i sar. 2012). Shodno mikrobiološkom sastavu radne kulture kombuhe i značajnom prisustvu bakterija mliječne kiseline moguća je i njena kultivacija na mlijeku i na taj način primjena kao nekonvencionalnog startera u tehnologiji fermentisanih mliječnih napitaka. Upotreba kombuhe kao nekonvencionalne starter kulture u tehnologiji fermentisanih mliječnih proizvoda ispitivana je sa aspekta uticaja temperature fermentacije, vrste čaja za kultivaciju kombuhe, koncentracije i vrste inokuluma, uticaja sadržaja mliječne masti (Iličić 2010; Kanurić i sar. 2011; Vitas 2013).



Slika 13. Pogodni supstrati za inokulaciju kombuhe

Autori (Milanović i sar. 2002; Malbaša i sar. 2009) su konstatovali da proces fermentacije mlijeka inokulumom kombuhe (prozvedenog na različitim supstartima, crni, zeleni čaj i topinambur) traje duže nego pri proizvodnji klasičnog jogurta zbog specifičnog mikrobiološkog sastava inokuluma i složenog sastava mlijeka. Vrsta, zapreminski udio, hemijske i mikrobiološke karakteristike inokuluma, direktno utiču na tok i vrijeme fermentacije mlijeka, biohemijske procese tokom proizvodnje, kao i fizičko-hemijske i

senzorne karakteristike funkcionalnog fermentisanog mliječnog napitka (Malbaša i sar. 2009; Iličić i sar. 2013).

Malbaša i sar. (2009) su ispitivali mogućnost upotrebe različitih koncentracija uparenog kombuha inokuluma za dobijanje fermentisanih mliječnih napitaka. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da koncentracija inokuluma od 10 i 15% ne utiče na reološka svojstva i senzorni kvalitet dobijenih proizvoda koji je bio izuzetno visok čak i nakon 5 dana skladištenja. Kao nastavak ovih istraživanja, Iličić i sar. (2012) su ispitivali uticaj istih koncentracija inokuluma kombuhe (10 i 15%) na razgradnju laktoze u model sistemu i mlijeku sa različitim sadržajem mliječne masti (0.9% w/w i 2.2% w/w). Koncentracija inokuluma nije značajno uticala na brzinu fermentacije ali je fermentacija mlijeka sa većim sadržajem mliječne masti bila kraća. Pored toga proizvodi sa većim sadržajem mliječne masti imali su bolje reološke i teksturalne karakteristike u poređenju sa proizvodima sa manjim sadržajem mliječne masti.

Kombinacija probiotske starter kulture i kombuhe kultivisane na različitim vrstama čaja *Camellia sinensis* (crni čaj) i *Thymus serpyllum* (majčina dušica) takođe su pokazala moguću upotrebu kombuhe kao startera u tehnologiji fermentisanih mliječnih napitaka. Različite temperature 37⁰ i 42⁰ C fermentacije nisu imale uticaj na hemijske karakteristike dobijenih napitaka, ali je interakcija faktora temperatura i vrsta čaja značajno uticala na sadržaj L-mliječne kiseline. Vrsta čaja je takođe značajno uticala na teksturalne karakteristike proizvoda (Milanović i sar. 2012).

Reološke karakteristike kombuha fermentisanih mliječnih napitaka u kombinaciji sa i bez dodatka transglutaminaze kao i poređenje sa napicima dobijenim upotrebom probiotske starter kulture ispitivali su Iličić i sar. 2013. Zaključci ovog istraživanja pokazali su da probiotska starter kultura daje čvršći i stabilniji gel u poređenju sa kombuha starterom. Takođe, proizvodi sa dodatkom transglutaminaze imali su bolje reološke karakteristike. Sa druge strane (Iličić 2010; Vukic i sar. 2014). su ispitivajući mikrostrukturu i reološke karakteristike kombuha fermentisanih mliječnih proizvoda u komparaciji sa probiotskom odnosno jogurnom starter kulturom tokom procesa fermentacije, zaključili da je process geliranja mlijeka –umrežavanja kazeinskih micela upotrebom kombuhe sličan kao i upotrebom konvencionalnih startera. Početak geliranja kod kombuha fermentisanih mliječnih proizvoda zabilježen je pri nešto većim pH vrijednostima, pH=5,4 nego što je uobičajno za konvencionalne starter kulture.

Vitas i sar. (2013) su ispitivali antioksidativnu aktivnost kombuha fermentisanih mliječnih napitaka dobijenih primjenom kombuha inokuluma kultivisanog na dva različita supstrata i

upotrebom mlijeka sa različitim sadržajem mliječne masti 0,8;1,6, i 2,8 %. Osim toga ispitan je uticaj različite temperature fermentacije mlijeka na antioksidativnu aktivnost na DPPH i hidroksi radikale. Vrsta inokuluma nije imala značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost na hidroksi radikale, ali je značajno uticao na antioksidativnu aktivnost na DPPH-a radikale. Na osnovu dobijenih rezultata u navedenom istraživanju može se zaključiti da su sa aspekta antioksidativne aktivnosti za proizvodnju kombuha fermentisanog mliječnog napitaka optimalna temperatura fermentacije u opsegu 41-43⁰ C i sadržaj mliječne masti 2,8%.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da je hemijski sastav mlijeka i supstrata za kultivaciju kombuhe kao i vrsta primjenjenog inokuluma od presudne važnosti za nutritivna, fizičko-hemijska i senzorna svojstva funkcionalnih proizvoda pri čemu je ustanovljeno da proizvode sa većim sadržajem mliječne masti karakterišu bolje teksturalne i senzorne osobine.

3.MATERIJAL I METODI RADA

MATERIJAL

Mlijeko

Za proizvodnju fermentisanih mliječnih napitaka korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mlijeko sa 2,8% mliječne masti proizvođača AD MLEKARA Subotica.

Starter kulture

Jogurtna starter kultura

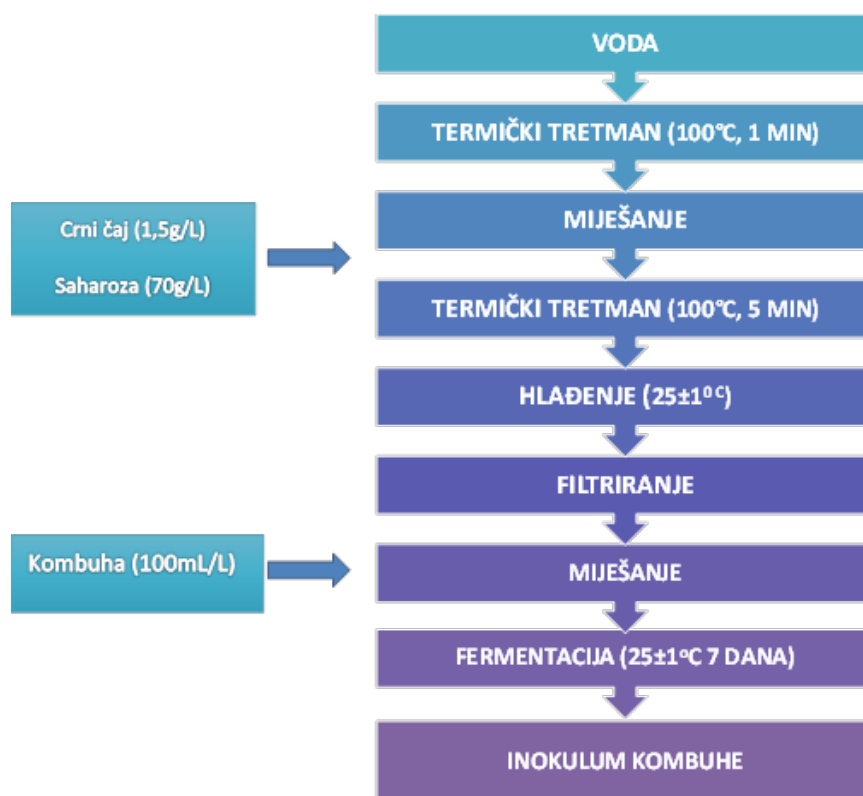
Za proizvodnju tradicionalnog jogurta korišćena je starter kultura YF-L812 (termofilna starter kultura Yo-Flex®, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*).

Probiotska starter kultura

Za proizvodnju probiotskog jogurta korišćena je probiotska starter kultura Kultura ABT-7-Probio-Tek® (LA-5® *Lactobacillus acidophilus*, BB-12® *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus*, Chr.Hansen, Horsholm, Danska).

Inokulum kombuhe

Inokulum kombuhe korišćen u proizvodnji fermentisanih mliječnih napitaka dobijen je po postupku prikazanom na slici 14 (Milanović i sar. 2002). Kombuha je kultivisana na crnom čaju - 1,5 gL⁻¹ zaslađenom sa saharozom koncentracije 70 gL⁻¹. U čaj ohlađen na sobnu temperaturu dodato je 10% (v/v) inokuluma kombuhe iz prethodne sukcesivne fermentacije. Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi 25±1°C, 7 dana. Za inokulaciju mlijeka korišćeno je 10% (v/v) pripremljenog inokuluma (pH=3,21).



Slika 14. Tehnološki proces proizvodnje inokuluma kombuhe

PROIZVODNJA FERMENTISANIH MLIJEČNIH NAPITKA

Eksperiment I

Prvi eksperiment imao je za cilj izbor optimalne temperature fermentacije mlijeka nekonvencionalnom starter kulturom- kombuhom. Kombuha fermentisani mliječni napici proizvedeni su na temperaturama 37 i 42°C.

Za inokulaciju mlijeka, korišćen je inokulum kombuhe pripremljen prema gore navedenoj proceduri u koncentraciji od 10% v/v. Fermentacija mlijeka je trajala do postizanja pH vrijednosti 4,6, nakon čega je gel ohlađen na 8°C, izmješšan električnom mješalicom i pakovan u odgovarajuću ambalažu. Uzorci su čuvani do trenutka analize na 4°C.

Eksperiment II

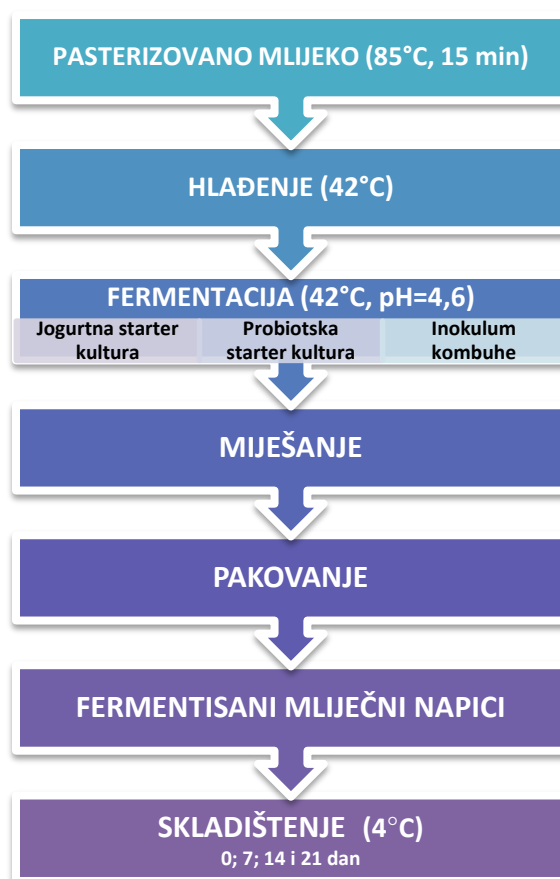
Na osnovu rezultata hemijske analize uzoraka dobijenih u *eksperimentu I*, dužine trajanja fermentacije i rezultata prethodnih istraživanja (Kanurić 2014, Milanović 2012) odabrana je temperatura fermentacije za proizvodnju fermentisanih mliječnih napitaka u

eksperimentu II. Fermentisani mliječni napici proizvedeni su na temperaturi 42°C upotrebom tri vrste starter kultura:

- 10% (v/v) inokuluma kombuhe uzetog nakon kultivacije na crnom čaju
- probiotska starter kultura 0,005 g100g⁻¹
- jogurtna starter kultura 0,005 g100g⁻¹.

Karakteristike dobijenih fermentisanih mliječnih proizvoda praćene su tokom procesa fermentacije i tokom 21 dana skladištenja u intervalima 7, 14 i 21 dan.

Fermentacija je trajala do postizanja pH=4,6 nakon čega su gelovi ohlađeni na temperaturu 8°C i izmiješani električnom mješalicom (Slika 15). Tokom procesa fermentacije uzimani su uzorci za analizu pri sledećim pH vrijednostima: 6,4 (samo kod kombuha fermentisanog mliječnog napitka) 6,0, 5,5, 5,0 i 4,6. Proizvodi sa završnom pH 4,6 su skladišteni 21 dan u frižideru na 4°C. Svi uzorci su proizvedeni u tri nezavisna ponavljanja. Pregled korišćenih uzoraka dat je u tabeli 19.



Slika 15. Tehnološki proces proizvodnje fermentisanih mliječnih napitaka

Tabela 19. Simboli proizvedenih fermentisanih mliječnih napitaka

pH tokom fermentacije	Starter kultura		
	Jogurt	Probiotik	Kombuha
6,4	-	-	K 6,4
6,0	J6,0	P6,0	K6,0
5,5	J5,5	P5,5	K5,5
5,0	J5,0	P5,0	K5,0
4,6	J0	P0	K0
Vrijeme skladištenja	Starter kultura		
	Jogurt	Probiotik	Kombuha
0 dan	J0	P0	K0
7 dan	J7	P7	K7
14 dan	J14	P14	K14
21 dan	J21	P21	K21

METODI RADA

Analiza inokuluma kombuhe

Hemijske karakteristike korišćenog inokuluma kombuhe određene su prema metodama opisanim za analizu mlijeka i fermentisanih mliječnih napitaka. Analizirani parametri kavliteta bili su:

- pH vrijednost inokuluma kombuhe mjerena je korišćenjem laboratorijskog pH metra pH Spear, Eutech Instruments Oakton, England.
- Sadržaj mineralnih materija- plamenom fotometrijom (plameni fotometar Evans Electroelenium LTD),
- Sadržaj vitamina C - visoko-pritisnom tečnom hromatografijom –HPLC (Agilent 1100)
- Antioksidativna aktivnost-na DPPH i ABTS⁺ slobodne radikale određena je spektrofotometrijski prema metodama navedenim za analizu mlijeka i fermentisanih mliječnih napitaka.

Analiza mlijeka i fermentisanih mliječnih napitaka

Osnovne hemijske analize

U mlijeku i fermentisanim mliječnim napicima (tradicionalni, probiotski i kombuha fermentisani mliječni napitak) primjenom standardnih metoda analize (Carić i sar. 2000) ispitani su sledeći parametri kvaliteta :

- suva materija - direktnom metodom sušenja na temperaturi 102 ± 1 °C; (SM) (ISO6731:2010- IDF21:2010 SRPS ISO 13580:2008);
- mliječna mast - metodom po Gerberu (SRPS ISO 488:2013 DM201/2);
- ukupni proteini - sadržaj proteina određen je metodom po Kjeldahl-u (SRPS EN ISO 8968-1:2008);
- pH - aktivna kiselost određena je elektrohemijski pomoću laboratorijskog pH-metra (pH Spear, Eutech Instruments Oakton, England) uz dvostruku kalibraciju na pH 4 i 7.
- pepeo - metodom žarenja na temperaturi 550 °C (IDF 90:1979);
- ukupna kiselost određena je metodom titracije sa 0.1 mol L^{-1} NaOH u prisustvu fenolftaleina kao indikatora, a izražena je preko sadržaja mliječne kiseline kao dominantne (Lončar E. i sar. 2013). Ukupna kiselost je izračunata po formuli:

$$m_{\text{mliječna kiselina}} = (V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times M_{\text{mliječna kiselina}} / 1000) \times 50 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$$

- Energetska vrijednost fermentisanih mliječnih napitaka u 100 grama proizvoda izračunata je na sledeći način:

$$EV = (\% \text{ proteina} \times 4,4 + \% \text{ mliječne masti} \times 9,3 + \% \text{ ukupnih šećera} \times 4,1) \times 4,186$$

[kJ100g⁻¹]

Sadržaj šećera

Priprema uzorka

Odmjereno je 5g uzorka na analitičkoj vagi i u normalni sud od 25 ml dodato 10 ml destilovane vode, a potom zagrijavano u vodenom kupatilu na 50-60°C, 15 min. U prohladenu smjesu dodato je 0,5 ml Kareza I, 0,5 ml Kareza II i 1 ml 100 mM rastvora NaOH, a zatim dopunjeno destilovanom vodom do crte i filtrirano kroz filter papir 381.

Visoko-pritisna tečna hromatografija - HPLC analiza

Sadržaj šećera analiziran je visoko-pritisnom tečnom hromatografijom (Agilent Technologies 1200 Series sa ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) sa kolonom Zorbax Carbohydrate Column (4.6 x 250mm. 5 μ m) (Agilent Technologies). Dobijen filtrat, 10 μ L je injektovan direktno autosemplerom, protokom 1.000 mLmin⁻¹, na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min. Kao mobilna faza sa izokratskim protokom korišćen je sistem acetonitril/voda odnosa 70/30. v/v, dok su parametri detektora bili sledeći: temperatura 40 \pm 1°C, pritisak azota 4,5 \pm 0,1 bara.

Sadržaj mineralnih materija Ca, Na i K

Priprema uzoraka mlijeka kombuhe i fermentisanih mliječnih proizvoda za određivanje, natrijuma kalcijuma i kalijuma plamenom fotometrijom izvedena je ekstrakcijom pomoću hlorovodonične kiseline. Ekstrakcija je izvedena primjenom modifikovane metode prema Simpson i Blay (1966). Nakon homogenizacije uzoraka miješanjem, na tehničkoj vagi je odmjereno 1,5 (2,5) grama uzorka u erlenmajer i dodato je 10 ml 6M hlorovodonične kiseline. Uzorak je zagrijavan od momenta ključanja 10 minuta uz povratni hladnjak. Nakon hlađenja sadržaj erlenmajera je kvantitativno prenijet u normalni sud od 50 ml, dodato je 2 ml 10% rastvora lantana (zbog kalcijuma) i nakon toga sud je dopunjen destilovanom vodom do crte. Radi uklanjanja taloga uzorak je filtriran kroz kvalitativnu filter hartiju, te je dobijeni filtrat korišćen za dalju analizu.

Kvantitativno određivanje kalijuma, natrijuma i kalcijuma izvedeno je metodom kalibracione krive. Kalibracione krive su definisane za svaki element, kao i za postupak pripreme uzoraka, u cilju izjednačavanja sastava matriksa uzorka i standardnih rastvora, odnosno izvođenja analize standardnih rastvora i uzorka pri istim eksperimentalnim uslovima. Za analizu je korišćen plameni fotometar Evans Electro Selenium LTD.

Sastav masnih kiselina

Priprema uzorka

a) Ekstrakcija lipida

Ekstrakcija masti je uz manje modifikacije izvedena u skladu sa dokumentovanom metodom (Havemose i sar. 2004). Mast iz uzorka (20 cm³ uzorka) je ekstrahovana dodatkom

40 cm³ smiješe rastvarača metanol:hlороform (1:1, v/v). Smiješa je snažno mućkana jedan minut i nakon toga centrifugirana 10 minuta na 3000 o/min. Donja faza koja sadrži lipidnu frakciju je odvojena i uparena do suva strujom azota.

b) Priprema metil estra masnih kiselina

Pripema metil estara je izvedena uz neznatne modifikacije prema metodi (Kravić 2010). Prethodno ekstrahovana mast iz uzoraka je rastvorena u 2,4 cm³ heksana. Dodato je 0,6 cm³ rastvora kalijum hidroksida u metanolu koncentracije 2 moldm⁻³. Epruveta je zavorena i intenzivno mućkana 20 sekundi, nakon čega je ostavljena jedan minut u vodenom kupatilu na 70 °C. Nakon 20 sekundi mućkanja dodato je 1,2 cm³ hlorovodonične kiseline (1 mol dm⁻³). Nakon završetka fazne separacije, gornja faza koja sadrži metil estre masnih kiselina je dekantovana i korišćena za dalju analizu.

Gasno hromatografska – maseno spektrometrijska analiza (GC-MS)

Za analizu metil estra masnih kiselina korišćen je gasni hromatograf 7890B Agilent Technologies sa maseno spektrometrijskim detektorom 5977A Agilent Technologies i autosemplerom 7693 Agilent Technologies. Razdvajanje metil estara masnih kiselina izvedeno je primijenom kapilarne kolone DB-23 dužine 60 m, unutrašnjeg prećnika 0,25 mm sa slojem stacionarne faze (50% cijanopropil-metil polisiloksan) od 0,25 µm. Kao gas nosač korišćen je helijum sa konstantnim protokom od 1,2052 mlmin⁻¹. Analize su izvedene primjenom sledećeg temperaturnog programa: početna temperatura kolone od 50°C održavana je 1 minut, nakon čega je sledio porast temperature brzinom od 25°C/min do temperature od 175°C koja je održavana 0 minuta. Zatim je temperatura rasla brzinom od 4°C/min do konačne temperature od 235°C, koja je održavana 5 minuta. Temperatura injektora iznosila je 250°C, zapremina uzorka 1,0 µL, a odnos razdjeljivanja 50:1. Maseni spektri su snimani SCAN tehnikom u intervalu m/z 50-400 a.m.u. Kvalitativno određivanje izvedeno je na osnovu masenih spektara i retencionih vremena, a kvantitativno u skladu sa AOAC (963.22) metodom pri čemu je za definisanje korekcionih faktora korišćen standardni rastvor smeše 37 metil estara masnih kiselina (37 component FAME Mix, 47885-U, Supelco).

Sadržaj vitamina C

Priprema uzorka

Na analitičkoj vagi odmjereno je 1 g uzorka u normalni sud od 10 mL, koji je do crte dopunjen sa 3%-nim rastvorom meta fosforne kiseline u 8%-noj sirćetnoj kiselinu. Ekstrakcija

vitamina C izvršena je ručnim mućkanjem rastvora tačno 5 min i filtriranjem kroz filter papir plava traka a potom je rastvor propušten kroz membranski filter 0,45 μl . Dobijeni filtrat je korišćen za HPLC analizu.

Visoko-pritiska tečna hromatografija - HPLC analiza

Za određivanje sadržaja vitamina C korišćen je HPLC Agilent 1100 sistem (SAD) sa petljom injektora od 20 μL i sa C18 kolonom prečnika čestica 5 μm , i UV detektorom. Kao mobilna faza korišćen je rastvor amonijak - acetata (0,1 M, pH=5,1) protoka 0,4 mlmin^{-1} a temperatura kolone je bila 37°C. Analize su trajale 4,5 minuta i ponavljane su tri puta.

Sadržaj biogenih amina

Reagensi

a. Standardi biogenih amina

Za analizu biogenih amina, korišćeno je devet standarda. Svi standardi biogenih amina su posebno rastvoreni u 50 ml destilovane vode i to: 60 mg triptamin hidrohlorida, 70 mg β -feniletilamin hidrohlorida, 90 mg putrescin dihidrohlorida, 90 mg kadaverin dihidrohlorida, 80 mg histamin dihidrohlorida, 60 mg serotonin hidrohlorida, 60 mg tiramin hidrohlorida, 120 mg spermidin difosfata, 130 mg spermin difosfata.

Osnovni rastvori su čuvani najduže jedan mjesec na 4 °C.

Radni rastvor je dobijen razblaživanjem osnovnih standardnih rastvora biogenih amina u vodi do koncentracije od 100 $\mu\text{g/ml}$. Radni rastvor je čuvan na 4 °C najduže nedelju dana.

b. Interni standard - 50 mg 1,7-diaminoheptana je rastvoreno u 50 ml vode. Rastvor internog standarda je čuvan najduže nedelju dana na 4 °C.

c. Rastvor danzil hlorida - 20 mg danzilhlorida, reagensa za derivatizaciju je rastvoreno u 2 ml acetona, rastvor je pripreman neposredno pre upotrebe.

Ekstrakcija i derivatizacija uzoraka

Priprema i ekstrakcija uzoraka izvršene su prema metodi (Eerola S. i sar. 1993; Tasić 2012). Ukratko, u epruvete je izmjereno 2 g uzorka na nalitičkoj vagi. Nakon dodatka određene količine internog standarda i 10 ml 0,4 M perhlorne kiseline, uzorak je homogenizovan na ultraturaksu 1 min. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 3000 obrtaja, a supernatant je nakon filtriranja prenet u odmerni sud od 25 ml. Ekstrakcija je ponovljena sa dodatkom još 10 ml 0,4 M perhlorne kiseline, a sadržaj je dobro izmiješan prije ponovnog centrifugiranja pod istim uslovima. Supernatanti su spojeni i odmerni sud je dopunjen do oznake perhlornom kiselinom.

U 1 ml ekstrakta uzorka dodato je 200 μL 2M NaOH, 300 μl zasićenog NaHCO_3 i 2 ml danzil hlorida, nakon čega je reakciona smiješa inkubirana u vodenom kupatlu 45 minuta na 40 °C. Ostatak danzil hlorida uklonjen je dodatkom 100 μL amonijaka (25%). Nakon 30 minuta reakciona smješa je razblažena acetonitrilom do zapremine od 5 ml i filtrirana kroz membranske filtere sa veličinom pora od 0.45 μm .

Visoko-pritisna tečna hromatografija - HPLC analiza

Sadržaj biogenih amina određen je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu (Agilent 1200 series), koji sadrži binarnu pumpu, vakuumski degazer, autosempler, termostat, kolonu Eclipse XDB-C18, 1,8 μm 4,6 x 50 mm i detektor sa serijom dioda (DAD). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača A (acetonitril) i B (ultračista voda) primjenom sledećeg gradijenta: u početku 50% B; linearni gradijent do 10% B za 7,6 min, 10% B do 10 minuta; linearni gradijent do 50% B za 2 min. Sistem je stabilizovan na početne uslove 3 minute prije sledeće analize. Protok pokretne faze je bio 1,5 ml/min, a temperatura kolone 40 °C. Injektovano je 5 μl uzorka direktno autosemplerom. Razdvojene komponente su detektovane na 254 nm, a spektri snimljeni u opsegu 190-400 nm.

Određivanje stepena proteolize –TCA metod

Stepen proteolize određen je kao procenat koncentracije proteina rastvornih u 8% trihlorsirćetnoj kiselini (TCA) sledećim postupkom: 0,85mL uzorka pomješano je sa 0,4 mL of 25% TCA i ostavljeno na 4°C, 30 min. Nakon toga smješa je centrifugirana na 14100g (Ependorf Mini Spin Plus) 5 min. Supernatant je filtriran kroz membranski filter prečnika pora 0,45 μm . Ukupan sadržaj proteina je određen metodom po Lowry i sar. (1951), a kao standardni protein korišćen je albumin kravljeg seruma. Stepen proteolize izračunat je kao procenat proteina rastvorljivih u 8% TCA u odnosu na ukupno rastvorljive proteine.

Određivanje stepena proteolize –SDS-PAGE kapilarna elektroforeza

Priprema uzoraka za određivanje proteinskog profila je urađena prema modifikovanoj metodici (Tidona i sar. 2011). Uzorci su rastvoreni u puferu (0,125 M TrisHCl, 4% SDS, 2% glicerol, 5% β -merkptoetanol, pH=6,8) u odnosu 1:1.5 v/v i zagrijani 5 min na 100 °C. Elektroforetsko razdvajanje je izvršeno na čip bioanalizatoru Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Čip je prethodno pripremljen prema proizvođačkom protokolu (Protein 80 LabChip kit). Kapilarni gel sistem, Protein 80 Plus LabChip kit je

upotrebljen za analizu uzoraka a dobijeni rezultati su analizirani upotrebom Protein 80 softver analize u okviru programskog paketa *2100 expert software*. Albumin goveđeg seruma je korišćen kao standard za kvantifikaciju proteinskih frakcija uzoraka. Svi uzorci su analizirani u tri nezavisna ponavljanja.

Određivanje antioksidativne aktivnosti uz pomoć (DPPH) testa radikalne inhibicije

Priprema uzoraka

Priprema vodenih ekstrakata fermentisanih mliječnih napitaka

U svrhu određivanja antioksidativne aktivnosti i AKE (angiotenzin konvertujući enzim) inhibicije ekstrahovane su peptidne frakcije kao pretpostavljeni nosioci bioaktivnosti. Vodeni rastvori fermentisanih mliječnih napitaka pripremljeni su prema autorima (Amirdivani i Baba 2011; Shori i Baba 2013). Ukratko: 10 g uzorka homogenizovano je sa 2,5 mL (sterilisane) dH₂O. Vrijednost pH je podešena na 4,0 sa 0,1 M HCl (približno 3 mL), uzorci su potom zagrijani do 45°C u vodenom kupatilu (10 min) i centrifugirani 10 min na 10000 g pri temperaturi 4°C. Supernatant je odvojen a njegova pH vrijednost je podešena na 7,0 dodatkom 0,1 M NaOH (približno 3 mL) ,a potom ponovno centrifugiran (10000 g, 10 min, 4°C). Sakupljeni supernatant je skaldišten na -20°C do njegove upotrebe.

Spektrofotometrijska analiza

Sposobnost hvatanja 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) slobodnih radikala određivana je metodom opisanom prema Morales i Jimenez-Perez (2001). Alikvot vodenog ekstrakta uzoraka (0,2 mL) je dodat u 1 mL svježe pripremljenog rastvora DPPH* (74 mgL⁻¹) u etanolu. Ovako dobijena smješa se nakon 5 minuta držanja na sobnoj temperature centrifugira 5 minuta (10000g -Eppendorf Mini Spin plus). Absorbanca supernatanta mjerena je nakon 30 minuta na 520 nm (T80/T80+ UV-Vis Spektrofotometer PG instrument LTD, a koncentracija DPPH u reakcionoj smješi određena preko kalibracione krive. Antiradikalna (antioksidativna) aktivnost na DPPH radikale (AA) i izračunata prema formuli:

$$\%AA = \left[\frac{(DPPH_b) - (DPPH_t)}{(DPPH_b)} \right] \times 100$$

gdje je [DPPH_b] koncentracija DPPH u slijepoj probi, [DPPH_t] koncentracija DPPH* u uzorku (u vodenom proteinskom ekstraktu), nakon 30 min reakcije.

Određivanje antioksidativne aktivnosti uz pomoću ABTS⁺ radikal katjon dekolorizacionog testa

ABTS⁺ (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) dekolorizacioni test je rađen prema metodi autora (Re i sar. 1999). Brzina reakcije obezbojenja ABTS⁺ rastvora praćena je u prisustvu vodenih rastvora ekstrakata na 734 nm, korišćenjem T80/T80+ UV-Vis spektrofotometra (PG instruments LTD). 0,2 mL vodenog ekstrakta uzorka pripremljenog prema gore navedenoj metodi za DPPH analizu, (redukovanoj sadržaja protein: 0,5, 0,75, 1,5 i 1 mgmL⁻¹) dodato je u 2 mL rastvora ABTS⁺ ($A_{734nm}=0,7\pm 0,02$) i absorbanca je mjerena do 10 min. Odgovarajuća količina slijepe probe je paralelno analizirana. Na isti način je pripremljena i standardna kriva troloks-a sa već poznatim koncentracijama. Procenat smanjenja absorbance za 10 minuta trajanja analize izražena je u funkciji potencijalne antioksidativne aktivnosti određene koncentracije troloks-a. Troloks ekvivalent antioksidativne aktivnosti (TEAC) uzoraka dobijen je djeljenjem procenta inhibicije procentom ekvivalentne antioksidativne koncentracije troloksa i izražen kao mmol TEAC po mg proteina u ekstraktu (mmolTEACmg⁻¹).

Inhibitorna aktivnost angiotenzin I konvertujućeg enzima (AKE I)

Priprema uzoraka

AKE inhibitorna aktivnost vodenih ekstrakata uzoraka određena je prema metodi (Yoshie-Stark i sar. 2004). Različite koncentracije uzorka inkubirane su na 37 °C, 80 min sa rastvorom hippuryl-His-Leu (HHL) u 0,2 molL⁻¹ kalijum fosfatnom puferu sa sadržajem 300 mmolL⁻¹ NaCl (pH 8,30) i rastvorom AKE. Konačna koncentracija HHL bila je 10 mmolL⁻¹ a AKE 25 mUmL⁻¹. Reakcija je zaustavljena dodatkom 110 µL 1 molL⁻¹ HCl.

Reverzno fazna visoko pritisna tečna hromatografija - RP-HPLC analiza

Hipurna kiselina (HK) dobijena od HHL određena je reverzno faznom visoko pritisnom tečnom hromatografijom (RP-HPLC). Odvajanje HK kiseline od HHL izvršeno je direktnim injektovanjem 20 µL dobijene reakcione smješe na Zorbax Eclipse XDB (Agilent Technology, Santa Clara CA, USA)-C18 kolonu (4,6 Id x 150 mm, 5 µm, 80 Å). Kolona je potom eluirana sa 50% metanolom i 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom (razblaženoj u vodi), sa konstantnim protokom od 1 mLmin⁻¹ na 22°C. Absorbanca eluata je mjerena na 228 nm.

Površina ispod pika koji odgovara HK na hromatogramu je integraljena i kvantifikovana.. AKE inhibitorna aktivnost je izračunata prema sledećoj formuli:

$$AKE \text{ inhibitorna aktivnost (\%)} = \frac{(A - A_0) - (B - B_0)}{(A - A_0)}$$

Gdje je A koncentracija HK u reakciji bez inhibitora, B koncentracija HK u reakciji sa potencijalnim inhibitorom, A_0 i B_0 su odgovarajuće slijepe probe gdje je HCl dodat u test tubu prije rastvora enzima.

Teksturalne karakteristike

Teksturalne karakteristike varijanti fermentisanih mliječnih napitka ispitivane su nakon proizvodnje prije homogenizacije kao tokom skladištenja korišćenjem Texture Analyser TA.XPplus (Micro Stable System, Engleska) na temperaturi 4°C. Sila kompresije je mjerena korišćenjem diska A/BE prečnika 35 mm i ekstenzionog tega čije je opterećenje 5 kg. Korišćena je opcija "Return to Start". Brzina pomjeranja diska prije i tokom testa je iznosila 1,0 mm/s. Disk je prelazio rastojanje od 30 mm. Analizirani su parametri čvrstoće, konzistencije, kohezivnosti i indeksa viskoziteta.

Viskozitet

Viskozitet uzoraka je mjereno pri temperaturi 5°C korišćenjem viskozimetra High Performance Haake Rheo Stress600 (Karlsruhe, Nemačka), PP60Ti pri različitim brzinama obrtaja od 0 do 25s⁻¹. Krive proticanja određene su metodom histerezisne petlje u opsegu navedenih brzina smicanja (0-40rpm)

Promjene viskoziteta uzoraka fermentisanih mliječnih proizvoda praćene su prije homogenizacije i tokom skladištenja.

Vrijednost koeficijenta tiksotropije računata je prema sledećoj formuli:

$$K_d = \frac{A_{up} - A_{down}}{A_{up}}$$

Gde je : K_d - koeficijent tiksotropije ili relativna histerezisna površina,

A_{up} - površina ispod uzlazne krive proticanja i

A_{down} - površina ispod silazne krive proticanja .

Senzorna analiza

Senzornu analizu uzoraka je izvršila grupa ocijenjivača prema petobalnom bod sistemu i opisnom metodom (Radovanović i Popov-Raljić 2001). Prilikom ocijenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1 do 5. Za senzorne ocene određen je koeficijent važnosti: izgled-1, boja-2, konzistencija- 4, miris-3 i ukus-10. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na kvalitet, a izbalansirani da ukupan zbir iznosi 20. Sabiranjem pojedinačnih korigovanih ocijena dobija se jedinstven kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet koji se izražava kao % od maksimalno mogućeg kvaliteta. Djeljenjem ove vrijednosti sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobija se ponderisana srednja ocijena, koja takođe izražava sveukupni kvalitet proizvoda.

Instrumentalno određivanje boje

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

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

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

gdje su:

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

L_0 , a_0 , b_0 parametri za mjereni uzorak

4. REZULTATI I DISKUSIJA

EKSPERIMENT I

Fizičko- hemijske karakteristike

Analizirane hemijske karakteristike, sadržaj suve materije, pepela, mliječne masti i ukupnih proteina fermentisanih mliječnih napitaka ne pokazuju statistički značajne razlike na različitim temperaturama fermentacije (tabela 20). Kvalitet mlijeka korišćenog u proizvodnji fermentisanih mliječnih napitaka u skladu je sa važećim Pravilnikom o kvalitetu mlijeka (Sl.list SRJ, 33/2010 i 69/2010).

Tabela 20. Hemijske karakteristike mlijeka i fermentisanih mliječnih napitaka

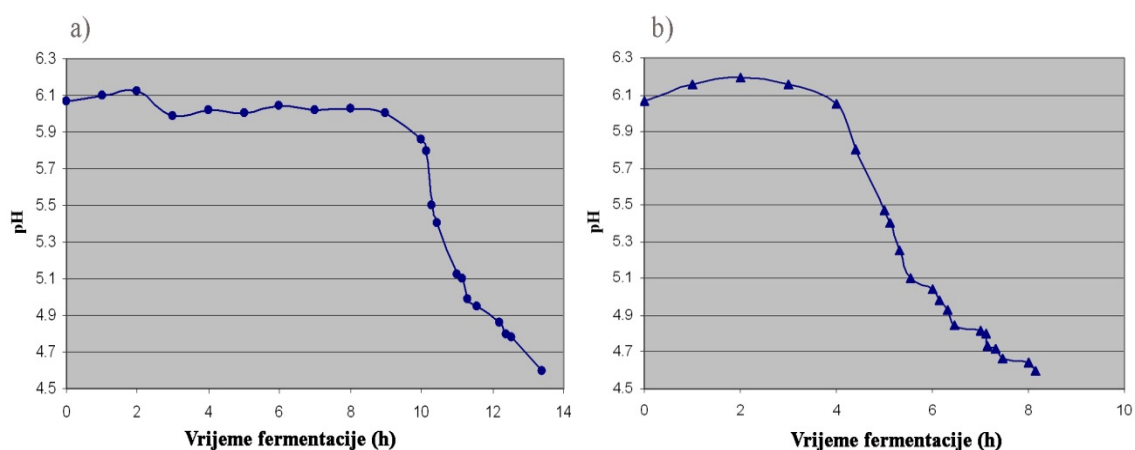
Hemijski kvalitet (g100 g ⁻¹)	Mlijeko	K37	K42
Suva materija	10,34 ± 0,02	9,98 ± 0,24	10,34 ± 0,03
Mast	2,00 ± 0,00	1,98 ± 0,00	1,98 ± 0,00
Ukupni protein	3,12 ± 0,12	2,82 ± 0,17	3,14 ± 0,08
Pepeo	0,69 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,68 ± 0,01

pH vrijednost

Na osnovu dobijenih rezultata evidentno je da proces fermentacije na temperaturi 37°C traje duže u odnosu na temperaturu 42 °C. Dodatkom 10% inokuluma pH vrijednost fermentacije počinje na pH 6,07 i do postizanja pH 4,6 fermentacija traje 13h i 40 minuta. Dok je na temperaturi 42°C fermentacija završena nakon 8h i 15 min (slika 16). Tokom prvih 9h, proces fermentacije na nižoj temperaturi je tekao bez značajnih promjena pH vrijednosti, nakon čega se bilježi njegov nagli pad do postizanja pH 4,95 u toku naredna 3h. Sličan proces naglog pada pH vrijednosti bilježi se i na temperaturi 42 °C ali u znatno kraćem vremenskom periodu, nakon postepenog pada u toku 2h, nagli pad na 5,1 dostiže za svega 1h i 30 min. Moguće je uočiti nagli pad pH nakon tačke pH 5,9 na obe temperature.

Generalno posmatrano, temperatura fermentacije u mlijeku utiče na aktivnost korišćene starter kulture, odnosno na tok i dužinu trajanja fermentacije. Vrijeme fermentacije

mlijeka u uzorku pri temperaturi fermentacije 42 °C kraće je za 5h i 25 minuta u odnosu na uzorak mlijeka na temperaturi fermentacije 37 °C. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije publikovanim istraživanjima saradnika tima (Milanović i sar. 2002; Milanović i sar. 2012) koji su za fermentaciju mlijeka koristili kombinacije probiotske starter kulture i kombuhe kultivisane na različitim vrstama čaja (majčina dušica i crni čaj) i zaključili da upotreba različite vrste čaja ne utiče značajno na dužinu fermentacije. Međutim ovakva kombinacija starter kultura značajno skraćuje vrijeme fermentacije na svega 4,5h na temperaturi 37°C ili 3.5h na 42°C. Ovi rezultati ukazuju na važnost faktora temperature u procesima rasta, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti mikroorganizama. Takođe rezultati ukazuju da povećavanje temperature fermentacije na 42°C, uzrokuje brži pad pH vrijednosti i najviše odgovara metaboličkoj aktivnosti korišćenog startera (Milanović i sar. 2012).

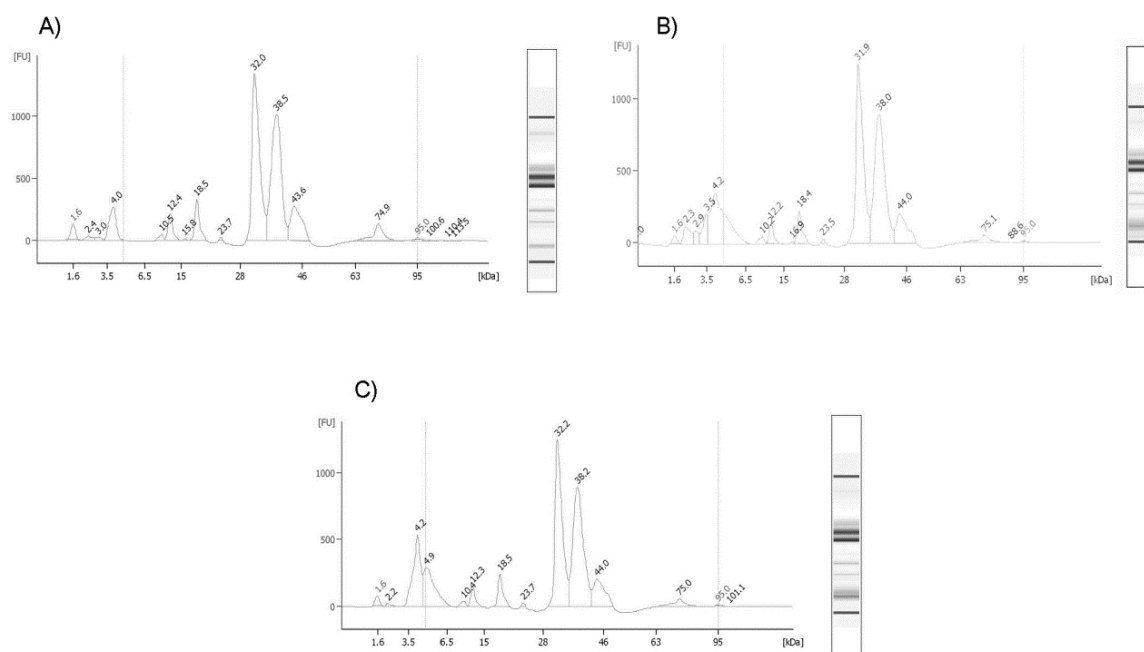


Slika 16. Promjena pH vrijednosti tokom fermentacije mlijeka kombuhom na a) 37°C i b) 42°C

Stepen proteolize- SDS PAGE kapilarna ektroforeza

Upotrebom Agilent Bioanalyzer-a 2100 za analizu proteinskih profila, dobijene su molekulske mase frakcija kazeina veće od očekivanih (slika 17). Ovakvo pomjeranje molekulskih masa proizilazi od sklonosti kazeina ka formiranju agregata, postt-translatornih modifikacija hemijskih karakteristika (proteoliza, glikozilacije, fosforilacije ili hidrofobnosti) koje utiču na strukturu i formiranje gela kao i interakcije sa matriksom elektroforetskog razdvajanja (Ng-Kwai-Hang 2011). Ovo pomijeranje je posebno izraženo kod κ -kazeina gdje je sa očekivanih 19kDa molekulska masa pomjerena čak na 46 KDa. Relativni sadržaj α - i β -kazeinskih frakcija u fermentisanim mliječnim napicima raste u odnosu na sadržaj u mlijeku na obe temperature, dok frakcija κ -kazeina bilježi statistički značajan pad u odnosu na mlijeko (tabela 21) ali je sadržaj niži kod uzorka proizvedenog na temperaturi 37 °C. Relativni udio α -

laktalbumina, β -laktoglobulina, u fermentisanim mliječnim napicima na obe temperature je niži u odnosu na mlijeko. Procesom fermentacije, sadržaj lizozima detektovanog u mlijeku se smanjuje te ga u gotovim proizvodima nije bilo moguće detektovati, dok se laktoferin i pored značajnog smanjenja detektuje ali nema bitnih razlika u njegovom sadržaju na odabranim temperaturama.



Slika 17. Kvantifikacija proteinskih frakcija detektovanih SDS-PAGE kapilarnom elektroforezom a) mlijeko b) kombuha frementisani mliječni napitak na 37 °C (K37) i c) 42 °C (K42)

Tabela 21. Relativni sadržaj proteinskih frakcija u mlijeku (M) i kombuha frementisanog mliječnog napitka na 37 °C (K37) i 42 °C (K42)

Proteinske frakcije	Uzorak		
	M (%)	K 37 (%)	K42 (%)
α -laktalbumin	4,86 \pm 0,04	3,26 \pm 0,04	3,88 \pm 0,05
lizozim	0,13 \pm 0,02	nd	nd
β -laktoglobulin	6,92 \pm 0,04	5,48 \pm 0,05	5,81 \pm 0,09
β -kazein	35,66 \pm 0,18	40,57 \pm 0,20	38,54 \pm 0,01
α -kazein	35,17 \pm 0,16	38,81 \pm 0,14	39,19 \pm 0,05
κ -kazein	12,04 \pm 0,03	8,80 \pm 0,02	9,15 \pm 0,05
laktoferin	2,93 \pm 0,02	1,42 \pm 0,07	1,42 \pm 0,05

Rezultati analize proteinskih frakcija ukazuju na niži sadržaj alergenskih frakcija α -laktalbumina and β -laktoglobulina u kombuha fermentisanim mliječnim napicima u poređenju sa mlijekom, pa samim tim predstavljaju potencijalno pogodan proizvod za ishranu ljudi alergičnih na mlijeko.

EKSPERIMENT II

FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE SIROVINA I PROIZVODA

Karakteristike mlijeka

Hemijski sastav mlijeka sa 2,8% mliječne masti prikazan je u tabeli 22.

Tabela 22. Hemijski sastav mlijeka

Karakteristika	Sadržaj
pH	6,8 ± 0,05
Suva materija (g100g⁻¹)	11,56 ± 0,08
Mliječna mast (g100g⁻¹)	2,8 ± 0,02
Ukupni protein (g100g⁻¹)	3,08 ± 0,02
Laktoza (g100g⁻¹)	4,74
Pepeo (g100g⁻¹)	0,71 ± 0,01
Minerali (mg100g⁻¹)	
Ca	115,19 ± 2,21
Na	57,36 ± 0,0
K	153,39 ± 0,0
Vitamin C (mg100g⁻¹)	0,36 ± 0,02
Energetska vrijednost (kJ100g⁻¹)	251

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je kvalitet mlijeka u skladu sa važećim Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mlijeka i starter kultura (33/2010, 69/2010 i 43/2013) kao i sa literaturnim podacima (Carić i Milanović 1997; Tamime 2006)

Karakteristike inokuluma kombuhe

U tabeli 23. prikazan je hemijski sastav inokuluma kombuhe. Evidentno je da kombuha inokulum sadrži značajnu koncentraciju minerala i vitamina C. Prema očekivanim rezultatima

dominantan šećer u uzorku korišćenog inokuluma saharoza, dok je sadržaj fruktoze i glukoze bio znatno niži.

Tabela 23. Hemijski sastav inokulumu kombuhe

Komponenta	Sadržaj
pH	3,17 ± 0,5
Suva materija (g100g⁻¹)	6,71 ± 0,9
Minerali (mgL⁻¹)	
Ca	97,38 ± 0,0
Na	27,16 ± 0,0
K	40,84 ± 0,0
Vitamin C (mg100g⁻¹)	0,5096 ± 0,02
Saharoza (g100g⁻¹)	4,176
Glukoza (g100g⁻¹)	0,4464
Fruktoza (g100g⁻¹)	0,4341
Galaktoza (g100g⁻¹)	0
Laktoza (g100g⁻¹)	0

Karakteristike fermentisanih mliječnih napitaka nakon proizvodnje

Karakteristike fermentisanih mliječnih napitaka (tradicionalni jogurt, probiotski jogurt i kombuha fermentisani mliječni napitak) prikazan je u tabeli 24. Može se vidjeti da je kvalitet fermentisanih mliječnih proizvoda u skladu sa literaturnim podacima (Tamime 2006) i važećim Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mlijeka i starter kultura (33/2010, 69/2010 i 43/2013)

Rezultati pokazuju da najveći sadržaj suve materije ima probiotski jogurt 12,01% a najmanji kombuha FMN 11,66%. Najveći sadržaj ukupnih proteina ima probiotski jogurt 3,07% a najmanje ima kombuha FMN 2,77%. Ukupna kiselost izražena preko sadržaja mliječne kiseline u uzorcima kreće se od 7,11 mgL⁻¹ kod kombuha FMN do 7,38 mgL⁻¹ u probiotskom jogurtu. Energetska vrijednost probiotskog jogurta iznosi 233 kJ100g⁻¹, a energetska vrijednost kombuha fermentisanog mliječnog napitka je 225 kJ100g⁻¹. Analogno vrijednosti pH, kiselost po Soxhlet-Henkel-u je približno ista u svim uzorcima i najveća kod probiotskog jogurta (31,9°SH), a najmanja kod tradicionalnog jogurta (31°SH).

Tabela 24. Fizičko-hemijske karakteristike fermentisanih mliječnih napitaka nakon proizvodnje

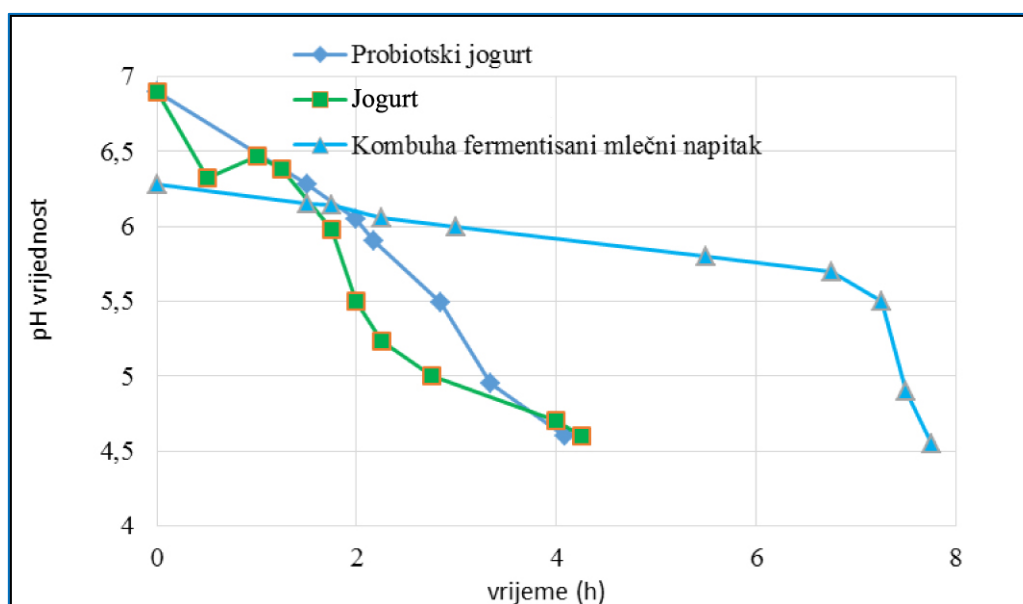
Hemijske karakterisitke	Jogurt	Probiotski jogurt	Kombuha FMN
pH	4,52 ± 0,03	4,57 ± 0,01	4,54 ± 0,02
Suva materija (g100g⁻¹)	11,91 ± 0,07	12,0 ± 0,02	11,60 ± 0,09
Mliječna mast (g100g⁻¹)	2,8 ± 0,00	2,8 ± 0,00	3,0 ± 0,00
Ukupni proteini (g100g⁻¹)	2,98 ± 0,06	3,07 ± 0,04	2,77 ± 0,05
Pepeo (g100g⁻¹)	0,73 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,69 ± 0,00
Ukupna kiselost (mliječna kiselina gL⁻¹)	7,24 ± 0,04	7,38 ± 0,04	7,11 ± 0,0211
Kiselost (°SH)	31,2	31,9	31
Energetska vrijednost kJ100g⁻¹	232	233	225

PROMJENE KOMPONENTA TOKOM PROCESA FERMENTACIJE

pH vrijednost

Proces fermentacije mlijeka tokom proizvodnje fermentisanih mliječnih proizvoda predstavlja veoma važnu operaciju za formiranje optimalnih fizičko-hemijskih i senzornih osobina proizvoda. Poznato je da promjena pH vrijednosti u uzorcima fermentisanog mliječnog napitka zavisi prije svega od:

- hemijskog sastava mlijeka (sadržaja mliječne masti, proteina, suve materije, laktoze)
- fizičko-hemijskih svojstava mlijeka (pH i kiselosti),
- vrste starter kulture,
- temperature inokulacije i inkubacije (Tamime 2006).



Slika 18. Tok fermentacije mlijeka u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda

Fermentacija mlijeka sa 2,8 % mliječne masti primjenom 10% (v/v) inokuluma kombuhe na temperaturi 42°C do vrijednosti pH=4,6 trajala je 7 časova i 45 minuta (slika 18), dok je dodatkom probiotske i jogurtne starter kulture ovaj proces znatno kraći i traje svega 4h. Nakon dodatka inokuluma kombuhe, pH vrijednost mlijeka se sa 6,9 smanjila na 6,4 usled kiselosti dodatog inokuluma kombuhe.

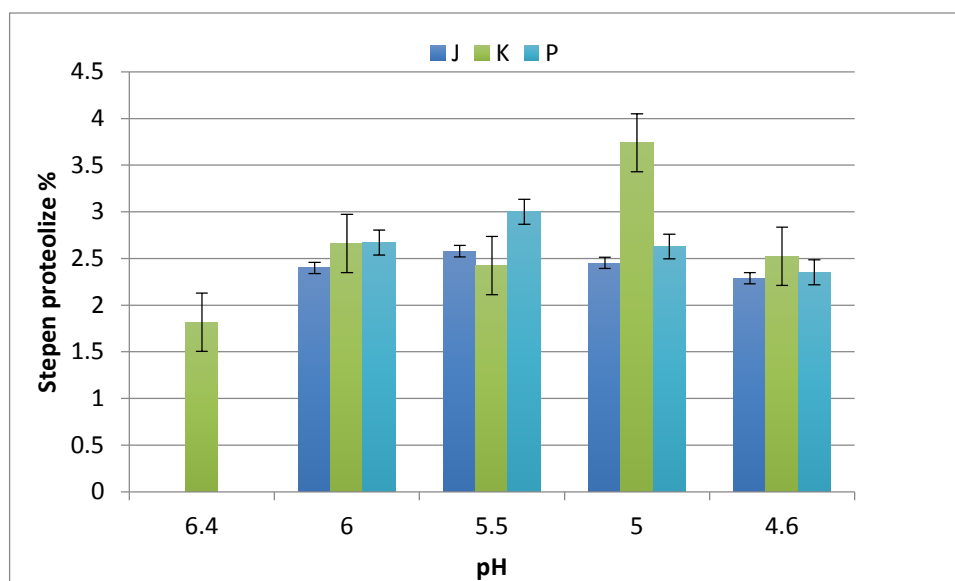
Naša dosadašnja ispitivanja procesa fermentacije mlijeka primjenom kombuhe kultivisane na crnom čaju pokazala su da je vrijeme fermentacije kraće u slučaju kada je supstrat sa višim sadržajem mliječne masti (Iličić i sar. 2012). Iličić (2010) je ispitala uticaj različitog sadržaja mliječne masti, kao i vrste i koncentracije inokuluma na proces fermentacije mlijeka. Najveća razlika je utvrđena između uzoraka sa 0,9 i 2,2% masti proizvedenim uz primjenu inokuluma koncentrovanog uparavanjem, ali je i kod uzoraka proizvedenih korišćenjem različitih koncentracija nativnog inokuluma sadržaj mliječne masti uticao na vrijeme fermentacije. Bellosa–Morales i Hernandez–Sanches (2003) su pratili proces fermentacije različitih vrsta surutke (slatka, kisela, rekonstituisana) dodatkom kombuhe kultivisane na crnom čaju pri temperaturi 32°C do postizanja pH=3,3). Ovi rezultati ukazuju da pH vrijednost u navedenim supstratima opada različitom dinamikom ali značajno sporije nego kod uzoraka dobijanih fermentacijom mlijeka i nakon 50 sati pH iznosi 4. Razlike između fermentacije mlijeka i surutke dodatkom kombuhe rezultat su različitog hemijskog sastava surutke i mlijeka, odnosa prisutnih sojeva kvasaca i bakterija kao i temperature fermentacije (Bellosa–Morales i Hernandez–Sanches 2003).

Dobijeni rezultati su potvrda da kombuha, kao asocijacija autohtonih vrsta kvasaca i bakterija sirćetne i mliječne kiseline, zahtjeva neko vrijeme za adaptaciju na mlijeko kao supstrat, te je vrijeme potrebno za fermentaciju značajno duže u odnosu na dejstvo jogurtne/probiotske starter kulture. Vrijeme potrebno da se dostigne željena pH vrijednost (pH=4,6) kod jogurtne i probiotske starter kulture iznosilo je 4h i 4h 15min respektivno, dok je kod kombuha fermentisanog mliječnog napitka iznosilo 7h 45min. Osim toga različiti oblici krive fermentacije, sigmoidalan za kombuha i linearan za uzorke tradicionalnog jogurnog i probiotskog fermentisanog mliječnog napitka ukazuju na razlike u fiziologiji i metabolizmu primjenjenih startera.

Stepen proteolize

TCA metod

Tokom procesa fermentacije praćen je stepen proteolize (SP) TCA metodom kako bi se utvrdio uticaj različite starter kulture na sam proces fermentacije kao i njihov doprinos u realizaciji pojedinačnih proteinskih frakcija odnosno manjih peptidnih frakcija kao značajnih nosioca biološke aktivnosti fermentisanih mliječnih proizvoda. Osnovne promjene strukture kazeinskih micela dešavaju se snižavanjem pH vrijednosti metaboličkom aktivnošću dodatih starter kultura. Sam proces fermentacije, vrijeme trajanja, temperatura kao i produkti nastali aktivnošću starter kulture u velikoj mjeri određuju kvalitet krajnjeg proizvoda. Kako se može vidjeti sa priloženog grafika (slika 19), ne postoji trend promjene u stepenu proteolize pod uticajem različitih upotrebljenih starter kultura. Međutim, trend razgradnje proteina dejstvom kombuhe se značajno razlikuje od uticaja komercijalnih starter kultura. Stepenu proteolize na fermentacionoj tački pH 5,0 u kombuha FMN iznosi čak 3,74 +0,02 %. Iz gore prikazanih rezultata može se primjetiti da je na prvoj tački, pH=5,0, došlo i do naglog pada pH vrijednosti što može da bude posledica drugačije aktivnosti starter kulture. Ovi metaboliti se nastavkom fermentacije, različito iskorišćavaju od strane samih mikroorganizama, čime se do postizanja završne vrijednosti pH=4,5 stepen proteolize izražen kao procenat rastvorljivih proteina u 8% TCA smanjuje i iznosi približno isto za sve tri starter kulture.



Slika 19. Promjene stepena proteolize tokom fermentacije u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K)

SDS-PAGE kapilarna elektroforeza

Relativni sadržaj proteinskih frakcija fermentisanih mliječnih napitaka na odabranim fermentacionim tačkama prikazan je u tabeli 25. Tokom fermentacije dolazi do smanjenja sadržaja α - laktalbumina u svim uzorcima do postizanja najniže vrijednosti u tački pH=4,6. Zanimljivo je da na fermentacionoj tački pH =5,5 dolazi do povećanja sadržaja kod sve tri varijante fermentisanih mliječnih napitaka, posle čega je nastavljen trend pada do kraja fermentacije. Isti trend promjena uočava se i kod frakcija β - laktoglobulina. Promjene u sadržaju lizozima tokom fermentacije su takođe iste kod svih varijanti fermentisanih mliječnih napitaka, te tokom fermentacije dolazi do blagog pada sa izuzetkom na tački pH=5,5. Lizozim je poznat kao prirodni antimikrobni enzim, jer katalizuje hidrolizu glikozidnih veza mikopolisaharida ćelijskog zida bakterija (Chiavari i sar. 2005). Ovaj enzim zajedno sa ostalim faktorima uključujući imunoglobuline, laktoferin i laktoperoksidaze smanjuju infekcije gastrointestinalnog trakta (Businco i sar. 2000). Stoga je njegov, iako relativno nizak sadržaj u mlijeku i fermentisanim mliječnim napicima, od velike važnosti za funkcionalne osobine ovih proizvoda. Najveći sadržaj lizozima na kraju fermentacije imao je kombuha fermentisani mliječni napitak (0,514%), dok je uzorak proizveden sa tradicionalnom jogurtom imao najnižu vrijednost od 0,287%. Zanimljivo je da je i u našim prethodnim istraživanjima pokazano da kod kombuha fermentisanih mliječnih napitaka na fermentacionoj tački pH=5,5 dolazi do promjena u fazi koagulacije kazeina u vidu nastajanja klastera koji su uočljivi na promjenama mikrostrukture (Vukic i sar. 2014). Pri ovoj pH

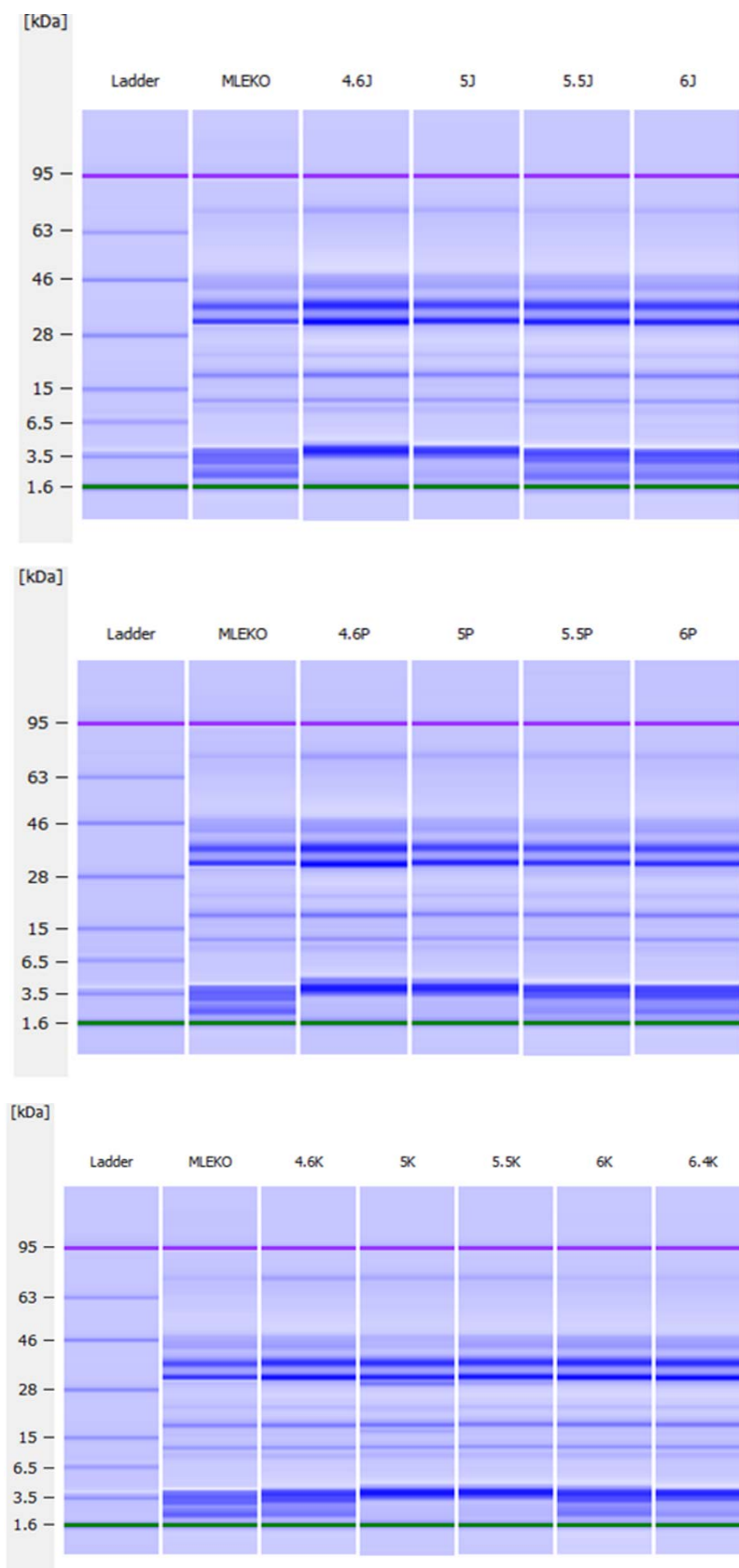
vrijednosti dolazi i do promjena u sadržaju laktoferina, koji kontinualno opada od pH 6,0 do fermentacione tačke pH 5,5 posle čega relativni udio laktoferina raste u svim fermentisanim mliječnima napicima. Analizirani stepen proteolize TCA metodom takođe pokazuje najveći stepen proteolize na ovoj tački kod probiotskog i tradicionalnog jogurta (slika 19).

Kako je i očekivano tokom fermentacije dolazi do povećanja sadržaja α - i β - kazeinskih frakcija u svim uzorcima. Na kraju fermentacije na fermentacionoj tački pH=4,6 udio α -kazeina je porastao sa 33,56% u mlijeku na 35,79%, 36,11 i 35,56% u jogurtu probiotskom jogurtu i kombuha fermentisanom mliječnom napitku, redom. Sadržaj κ - kazeina se tokom fermentacije smanjuje, ali između uzoraka ne postoje statistički bitne razlike (tabela 25).

Na osnovu dobijenih rezultata SDS-PAGE kapilarne elektroforeze može se zaključiti da postoji statistički značajna razlika u promjenama udjela pojedinačnih proteinskih frakcija tokom procesa fermentacije mlijeka primjenom različitih starter kultura. Metodom kapilarne elektroforeze dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima stepena proteolize dobijenih primjenom TCA metode, koji ukazuju na složenost promjena proteina mlijeka tokom fermentacije, bez obzira na vrstu primjenjene starter kulture. Primjer dobijenog elektroforegrama uzoraka fermentisanih mliječnih napitaka prikazan je na slici 20.

Tabela 25. Relativni sadržaj proteinskih frakcija u mlijeku (M), jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom fermentacije

Proteinske frakcije	Sadržaj (%)													
	M	J6,0	J5,5	J5,0	J4,6	P6,0	P5,5	P5,0	P4,6	K6,4	K6,0	K5,5	K5,0	K4,6
α-laktalbumin	6,36	4,67	5,02	4,94	4,01	5,51	6,36	4,73	3,85	4,62	4,71	4,93	4,62	4,34
lizozim	0,78	0,52	0,39	0,48	0,29	0,43	0,70	0,51	0,40	0,37	0,30	0,52	0,17	0,51
β-laktoglobulin	11,13	9,02	9,26	8,90	8,57	10,28	10,08	8,80	8,46	8,97	9,54	9,36	9,75	8,88
β-kazein	33,31	38,61	39,04	40,15	39,90	35,47	38,73	41,39	40,06	39,73	39,01	39,55	39,90	38,38
α-kazein	33,57	35,93	35,73	34,58	35,79	36,37	33,44	34,63	36,11	36,12	36,18	35,22	35,79	35,55
k- kazein	8,13	7,31	6,89	6,25	6,77	7,37	6,08	5,68	6,18	6,78	7,02	6,18	2,77	6,44
laktoferin	1,47	1,41	1,10	1,92	2,13	1,59	1,77	1,89	2,22	0,71	0,67	1,74	1,80	2,29



Slika 20. SDS-PAGE elektroforegram jogurta (J) probiotskog jogurta (P) i kombuha fermentisanog mliječnog napitka (K) tokom fermentacije

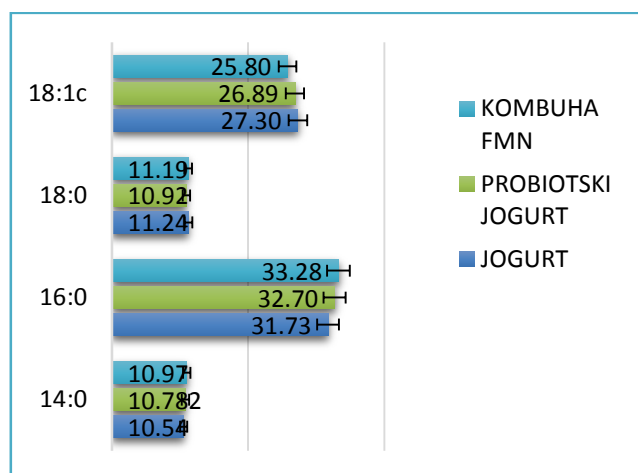
Šećeri

Tokom fermentacije mlijeka, starter kulture transformacijom laktoze proizvode proste šećere i kiseline, prvenstveno mliječnu, te samim tim snižavaju pH vrijednost fermentacionog supstrata. Stepent razgrađene laktoze na početnim tačkama fermentacije bio je najniži u kombuha FMN i pri tački pH=6,0 iznosio je svega 8,8% dok je pri istoj pH vrijednosti od strane probiotske i tradicionalne starter kulture iznosio 11,8 i 13,5% redom u odnosu na početni sadržaj laktoze u mlijeku. Transformacija laktoze kombuha starter kulturom je u očekivanim granicama u skladu sa dobijenim rezultatima promjene pH vrijednosti i stepena proteolize. Sporija razgradnja laktoze posledica je sporije adaptacije i metaboličke aktivnosti kombuha startera na supstratu bogatom laktozom. Probiotska i tradicionalna jogurtna starter kultura pokazuju veću aktivnost i bržu transformaciju laktoze, te je u krajnjim proizvodima najniži sadržaj laktoze imao probiotski jogurt a potom tradicionalni jogurt. Laktoze se u probiotskom jogurtu transformišu čak 28,06% a u kombuha FMN 25,19%. Prema literaturnim podacima jogurtna starter kulture (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) tokom fermentacije mlijeka transformišu do 30% laktoze (Tamime i Robinson 2007). Dobijeni rezultati u ovim istraživanjima su u skladu sa navedenim literaturnim podacima.

Sadržaj galaktoze i glukoze se tokom fermentacije povećava analogno smanjenju sadržaja laktoze u svim varijantama FMN. Najveći sadržaj galaktoze imao je probiotski jogurt pri krajnjoj fermentacionoj tački pH 4,6, dok između kombuha FMN i tradicionalnog jogurta nije bilo statistički značajnih razlika. Kako se inokulacijom mlijeka kombuha starterom, unosi određen sadržaj fruktoze i saharoze prisutan u samom inokulumu kombuhe, detektovan je i značajan sadržaj fruktoze i saharoze na početnim tačkama fermentacije. Sadržaj ovih šećera se tokom procesa fermentacije smanjuje što je posledica njihove dalje transformacije, metaboličkom aktivnošću startera. Sadržaj galaktoze u krajnjoj tački iznosio je 0,463, 0,451 i 0,559 g100g⁻¹ u kombuha fermentisanom mliječnom napitku, tradicionalnom jogurtu i probiotskom jogurtu redom. U uzorku kombuha FMN detektovano je 0,221 g100g⁻¹ saharoze i 0,0127g100g⁻¹ fruktoze. Trend promjene sadržaja šećera u svim varijantama FMN ne pokazuje statistički značajne razlike (P<0,05).

Masne kiseline

Relativni maseni udio masnih kiselina u mlijeku i uzorcima tokom procesa fermentacije, uzimanim pri odabranim pH vrijednostima prikazan je u tabelama 26 i 27. U svim uzorcima fermentisanih mliječnih napitaka tokom fermentacije najzastupljenije masne kiseline bile su: palmitinska (16:0), oleinska (18:1c), stearinska (18:0) i miristinska (14:0) (slika 20). Pokazalo se da je tokom fermentacije palmitinska kiselina dominantna zasićena masna kiselina sa maksimalnim sadržajem od 31,73% u jogurtu (J), 32,70% u probiotskom jogurtu (P) i 33,28% u kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) (slika 21.). Palmitinska kiselina je najzastupljenija zasićena masna kiselina u mlijeku i najčešći je uzročnik povećanja nivoa holesterola u krvi dok oleinska kiselina ima pak pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje (Mensink 2005). Oleinska kiselina je najzastupljenija nezasićena masna kiselina sa maksimalnim vrijednostima od 27,30% (J), 26,89% (P) i 25,80% (K). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjema koje su sproveli Serafeimidou i sar. (2013) primjenom jogurtne starter kulture na različitim vrstama mlijeka.



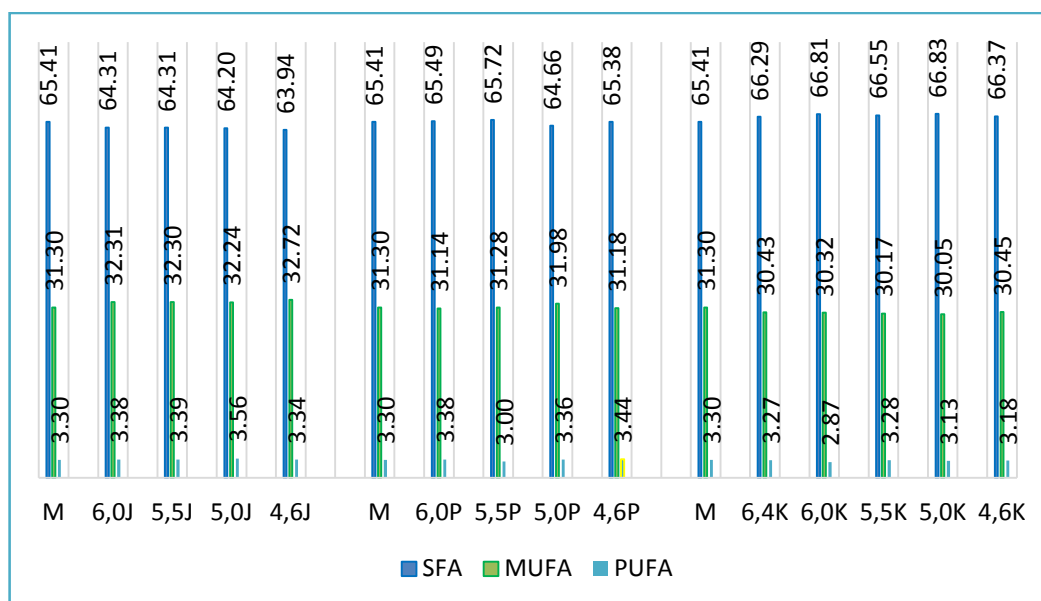
Slika 21. Najzastupljenije masne kiseline u fermentisanim mliječnim napicima, izražene kao srednja vrijednost masenih udjela (%) posmatrane masne kiseline tokom fermentacije

Udio zasićenih (saturated fatty acids - SFA), mononezasićenih (monounsaturated fatty acids - MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (polyunsaturated fatty acids - PUFA) tokom fermentacije mlijeka tradicionalnom jogurtnom kulturom kretao se u intervalima od 63,94-64,31%; 32,24-32,72% i 3,34-3,56%, redom. Pri korišćenju probiotske kulture sadržaj SFA, MUFA i PUFA iznosio je 64,66-65,72%; 31,14-31,98% i 3,00-3,44%, respektivno.

Korišćenjem kombuhe kultivisane na crnom čaju za proizvodnju mliječnih napitaka procenat SFA, MUFA i PUFA kretao se u intervalima od 66,29-66,83%; 30,05-30,45% i 2,87-3,28%, respektivno (slika 22.). Ove vrijednosti se nalaze u intervalima vrijednosti koje su (Brezo i sar. 2011; Vitas i sar. 2011) prikazali za mliječne napitke proizvedene fermentacijom kravljeg mlijeka pomoću kombuhe kultivisane na čaju koprive i mente. Naime, sadržaj zasićenih masnih kiselina u tim uzorcima kretao se u opsegu 62,86-70,42%, mononezasićenih 27,85-32,62% i polinezasićenih 1,56-4,25%. Primijenom kombuhe za fermentaciju mlijeka, najpovoljniji sadržaj SFA se postiže na samom početku fermentacije (pH=6,4), maksimalni sadržaj MUFA na kraju fermentacije (pH=4,6), a najviši sadržaj PUFA pri pH=6,0. Udio SFA u fermentisanim mliječnih napicima proizvedenim jogurtom, odnosno probiotskom starter kulturom je manji, a MUFA i PUFA je jednak ili veći u poređenju sa uzorkom mlijeka iz kojeg su proizvedeni.

U slučaju primjene kombuhe, sadržaj SFA je porastao, dok su se sadržaji MUFA i PUFA smanjili u poređenju sa uzorkom mlijeka. Vitas i sar. (2011) su takođe dobili slične rezultate kada su ispitali sastav masnih kiselina u fermentisanim mliječnim napicima dobijenim primjenom kombuhe prethodno kultivisane na rtanjskom čaju, što ukazuje da vrsta čaja za inokulaciju ne utiče značajno na sastav masnih kiselina u kombuha fermentisanim mliječnim napicima.

Na slici 21 se može uočiti da se najpovoljniji masno-kiselinski sastav sa najnižim sadržajem zasićenih i najvišim sadržajem mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina postiže primjenom tradicionalne jogurtne kulture. Takođe, tokom procesa fermentacije, pad pH vrijednosti je u slučaju jogurta praćen povoljnim blagim padom vrijednosti SFA, i porastom MUFA, do postizanja maksimalnih vrijednosti pri pH=4,6. Maksimalni sadržaj PUFA se postiže na fermentacionoj tački pH=5,0. Kod probiotskog jogurta se pak najniži sadržaj SFA i najveći sadržaj MUFA postiže pri vrijednosti pH=5,0, dok je udeo PUFA najveći pri 4,6.



Slika 22. Maseni udio, (% g 100g⁻¹ izražen kao srednja vrijednost) zasićenih masnih kiselina – SFA, mononezasićenih masnih kiselina – MUFA i polinezasićenih masnih kiselina – PUFA u kontrolnom uzorku mlijeka i uzorcima fermentisanih mliječnih napitaka tokom procesa fermentacije

Pregled masnih kiselina izraženih kao maseni udio u mlijeku i uzorcima fermentisanih mliječnih napitaka tokom fermentacije prikazan je u tabelama 26 i 27.

Tabela 26. Relativni maseni udio masnih kiselina u mlijeku

Naziv	Oznaka	Maseni udio %
buterna	4:0	1,18 ± 0,01
kapronska	6:0	1,04 ± 0,02
kaprilna	8:0	0,74 ± 0,0004
kaprinska	10:0	2,12 ± 0,02
laurinska	12:0	2,79 ± 0,01
miristinska	14:0	10,80 ± 0,03
miristoleinska	14:1	0,75 ± 0,01
	15:0iso	0,17 ± 0,01
	15:0anteiso	0,36 ± 0,02
pentadekanska	15:0	1,12 ± 0,01
	16:0iso	0,19 ± 0,01
palmitinska	16:0	32,63 ± 0,09
palmitoleinska	16:1	1,46 ± 0,005
	17:0iso	0,23 ± 0,08
	17:0anteiso	0,35 ± 0,001

margarinska	17:0	0,59 ± 0,01
stearinska	18:0	11,11 ± 0,08
oleinska	18:1t	2,44 ± 0,03
oleinska	18:1c	26,65 ± 0,07
linolna	18:2c	2,94 ± 0,02
linolenska	18:3n3	0,36 ± 0,01

pH	6,4	6			5,5			5			4,6		
MK	K	J	P	K	J	P	K	J	P	K	J	P	K
	%	Maseni udio %			Maseni udio %			Maseni udio %			Maseni udio %		
4:0	1,25	0,83	1,14	0,70	0,93	0,78	1,03	1,22	1,05	0,94	0,88	1,07	1,22
6:0	1,17	0,91	1,04	0,82	0,97	0,90	1,07	1,11	1,01	0,97	0,87	1,00	1,11
8:0	0,84	0,71	0,78	0,67	0,73	0,72	0,78	0,81	0,76	0,71	0,65	0,76	0,78
10:0	2,30	2,03	2,18	2,06	2,07	2,12	2,21	2,19	2,17	2,13	1,96	2,18	2,22
12:0	2,99	2,71	2,89	2,84	2,71	2,86	2,90	2,83	2,83	2,80	2,62	2,81	2,89
14:0	11,11	10,58	10,81	11,06	10,57	10,96	10,81	10,59	10,57	11,00	10,44	10,79	10,88
14:1	0,80	0,78	0,78	0,76	0,79	0,76	0,80	0,83	0,77	0,70	0,69	0,73	0,74
15:0iso	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,17	0,19	0,18	0,18	0,17	0,15	0,16	0,18
15:0anteiso	0,40	0,39	0,39	0,40	0,40	0,39	0,41	0,40	0,38	0,37	0,34	0,36	0,39
15:0	1,14	1,13	1,13	1,17	1,13	1,13	1,16	1,16	1,10	1,05	1,07	1,08	1,14
16:0iso	0,20	0,20	0,19	0,22	0,22	0,20	0,22	0,22	0,21	0,19	0,18	0,19	0,21
16:0	32,34	32,15	32,52	33,85	31,93	33,00	33,28	30,81	32,35	33,89	32,05	32,94	33,01
16:1	1,53	1,52	1,54	1,49	1,52	1,52	1,53	1,65	1,52	1,45	1,39	1,48	1,45
17:0iso	0,26	0,26	0,21	0,23	0,20	0,34	0,28	0,26	0,26	0,26	0,26	0,28	0,22
17:0anteiso	0,37	0,38	0,38	0,39	0,37	0,38	0,38	0,40	0,37	0,34	0,32	0,35	0,37
17:0	0,61	0,64	0,65	0,62	0,63	0,60	0,64	0,67	0,61	0,60	0,55	0,58	0,60
17:1	0,20	0,22			0,21			0,23	0,20	0,16	0,16	0,17	
18:0	10,94	11,21	11,01	11,60	11,11	11,17	11,03	11,21	10,82	11,24	11,43	10,67	11,15
18:1t	2,16	2,54	2,17	2,24	2,55	2,15	2,26	2,63	2,20	2,07	2,40	2,05	2,13
18:1c	25,75	27,24	26,65	25,84	27,22	26,86	25,59	26,77	27,29	25,66	27,95	26,75	26,13
18:2													
18:2c	2,92	3,00	3,03	2,87	3,05	3,00	2,94	3,17	3,00	2,81	2,99	3,03	2,86
18:3n3	0,35	0,37	0,34		0,35		0,33	0,39	0,36	0,32	0,35	0,41	0,32
20:0	0,17				0,16		0,16	0,15		0,17	0,16	0,19	
20:1								0,13			0,13		
SFA	66,29	64,31	65,49	66,81	64,31	65,72	66,55	64,20	64,66	66,83	63,94	65,38	66,37
MUFA	30,43	32,31	31,14	30,32	32,30	31,28	30,17	32,24	31,98	30,05	32,72	31,18	30,45
PUFA	3,27	3,38	3,38	2,87	3,39	3,00	3,28	3,56	3,36	3,13	3,34	3,44	3,18

SFA-saturated fatty acids/ zasićene masne kiseline MUFA- monounsaturated fatty acids/mononezasićene masne kiseline PUFA polyunsaturated fatty acids/ polinezasićenih masnih kiselina

Tabela 27. Relativni udio masnih kiselina u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom fermentacije

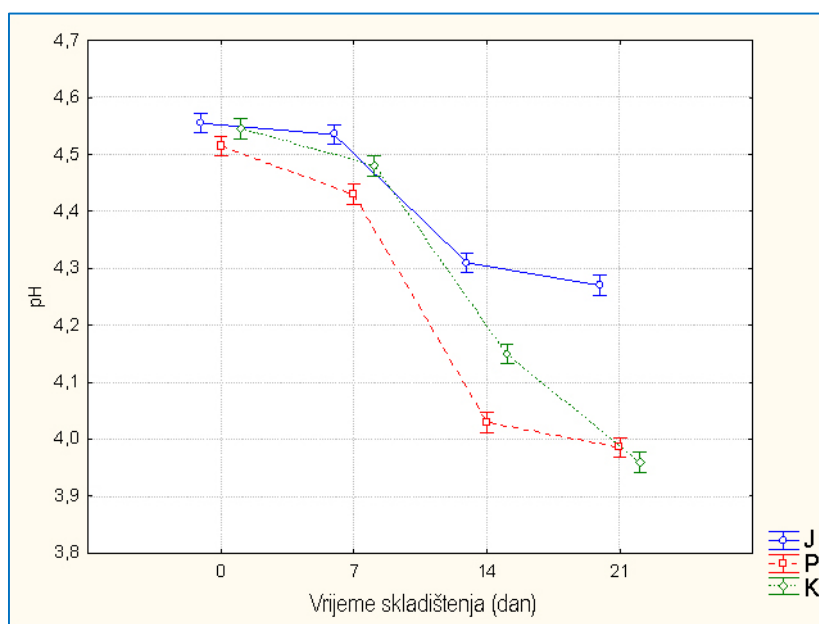
PROMJENE KOMPONENATA TOKOM SKLADIŠTENJA

pH vrijednost i fizičko-hemijske karakteristike

Kao što je već prikazano pH vrijednost fermentisanih mliječnih napitaka nakon proizvodnje varira od 4,52 do 4,57 u zavisnosti od starter kulture (slika 23). U prvoj nedjelji skladištenja nije došlo do statistički značajnih promjena pH vrijednosti ali se u drugoj nedjelji primjećuje blagi pad pH vrijednosti praćen istovremenim porastom titracione kiselosti izražene kao sadržaj mliječne kiseline. Generalno posmatrano, brža postacidifikacija zabilježena je u uzorcima dobijenim upotrebom probiotske i kombuha starter kulture nego u uzorcima dobijenim korišćenjem jogurtne starter kulture (slika 23). Na kraju perioda skladištenja pH vrijednost se kretala od 4,00 u probiotskom, 4,10 u kombuha do 4,35 u uzorku sa tradicionalnom jogurtnom starter kulturom što je u skladu sa važećim Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mlijeka i starter kultura (33/2010, 69/2010 i 43/2013) i ukazuje na stabilnost proizvoda. Rezultati ukupne kiselosti i sadržaja mliječne kiseline, takođe su u skladu sa rezultatima promjene pH i prikazani su u tabeli 28.

Tabela 28. Promjena pH vrijednosti i ukupne kiselosti u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Vrijeme skladištenja (dan)	Ukupna kiselost (°SH)	Mlijecna kiselina (gL ⁻¹)	Ukupna kiselost (°SH)	Mlijecna kiselina (gL ⁻¹)	Ukupna kiselost (°SH)	Mlijecna kiselina (gL ⁻¹)
	J		P		K	
0	31,20 ±0,91	7,05 ±0,41	32,00 ±0,85	7,38 ±0,39	31,00 ±1,0	7,11 ±0,54
7	32,00 ±0,89	7,20 ±0,15	34,60 ±0,84	7,79 ±0,27	31,60 ±0,95	7,83 ±0,48
14	33,80 ±1,01	7,61 ±0,19	36,40 ±1,15	8,19 ±0,35	34,80 ±0,98	9,29 ±1,02
21	34,00 ±1,05	7,66 ±0,31	38,00 ±1,08	8,56 ±0,86	37,00 ±1,10	8,33 ±0,90



Slika 23. Promjena pH vrijednosti u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Postacidifikacija fermentisanih mliječnih napitaka nastaje kao posljedica metaboličke aktivnosti primjenjenih starter kultura i sa aspekta senzornog i hemijskog kvaliteta proizvoda dijelom je i nepoželjan proces. Neki mikroorganizmi (kao što su bakterije mliječne kiseline) mogu da ostanu metabolički aktivni i tokom dužeg perioda skladištenja (Considine i sar. 2000). Rezultati dobijeni u ovom radu u skladu su sa literaturom i ukazuju na različit uticaj vrste mikroorganizama na stepen postacidifikacije skladištenih uzoraka (Considine i sar. 2000). Dalja istraživanja o ulozi pojedinačnih mikroorganizama u ovome procesu su takođe neophodna. Shodno dobijenim krajnjim vrijednostima ukupne kiselosti i pH vrijednosti dobijeni rezultati ukazuju na opravdanost upotrebe kombuha starter kulture za dobijanje fermentisanog mliječnog napitaka sličnih fizičko-hemijskih karakteristika kao i proizvoda dobijenih korišćenjem konvencionalnih starter kultura. Rezultati ukazuju na statistički značajan ($p \leq 0,05$) uticaj kombinacije faktora starter kultura i vrijeme skladištenja na pH vrijednost (tabela 29).

Tabela 29. Statistička značajnost uticaja različitih parametara na vrijednost pH

Parametri	SS	DF	MS	F	p
Intercept	446,603*	1*	446,602*	66405,560*	0,000*
Vrijeme skladištenja	0,959*	3*	0,320*	47,540*	0,000*
Starter kultura	0,137*	2*	0,068*	10,170*	0,003*
Ponavljanje	0,000	1	0,000	0,000	0,980
Vrijeme skladištenja*starter kultura*ponavljanje	0,003	6	0,000	0,060	0,998
Greška	0,074	11	0,007		

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

MS – mean of square / srednje kvadratno odstupanje;

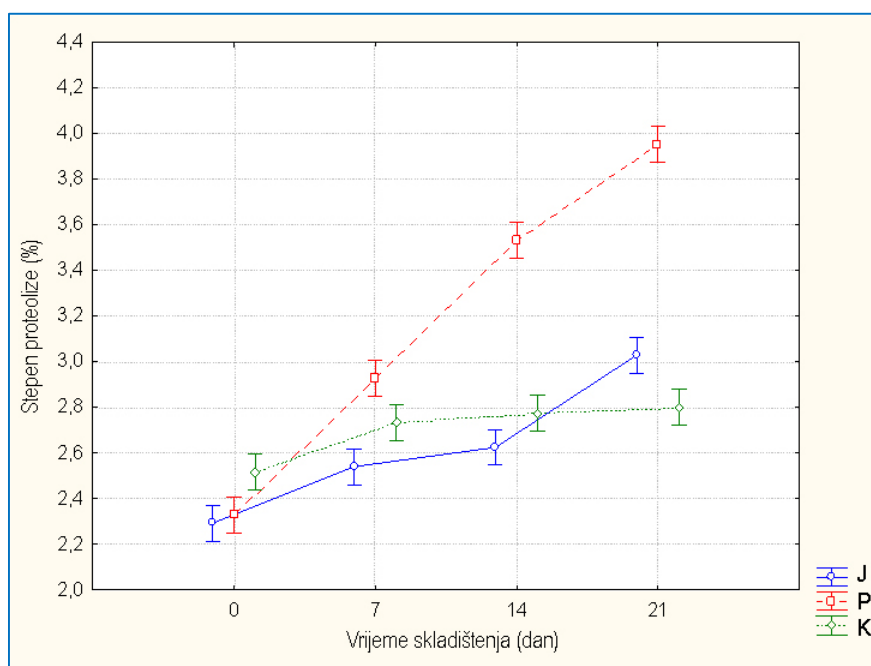
SS- suma kvadrata odstupanja

F-test p = p vrijednost, *p<0,05

Stepen proteolize

TCA metod

Promjene proteolize u analiziranim uzorcima tokom skladištenja prikazane kao stepen proteolize (SP) izražene su kao indeks rastvorljivih proteina u 8% TCA. Kombinacija faktora vrijeme skladištenja i vrste starter kulture prikazana je na slici 24.



Slika 24. Promjena stepena proteolize u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Fermentisani mliječni napici tipa tradicionalnog jogurta, zbog načina proizvodnje i tipa fermentacije, nemaju izraženu proteolizu što je u potvrđeno i rezultatima dobijenim u ovome radu. Proteolitički sistem starter kulture svakako je najvažniji faktor koji utiče na promjene stepena proteolize kako nakon procesa proizvodnje tako i tokom procesa skladištenja. U poređenju sa vrijednostima stepena proteolize mlijeka kao početne sirovine koja je iznosila $1,7 \pm 0,02\%$, u frementisanim mliječnim napicima nakon proizvodnje ova vrijednost raste do $2,25 \pm 0,034\%$ u jogurtu, $2,35 \pm 0,041\%$ u probiotskom jogurtu i $2,56 \pm 0,151\%$ u kombuha fermentisanom mliječnom napitku. Tokom skladištenja stepen proteolize raste u svim uzorcima sa značajnim međusobnim varijacijama (slika 23). Fermentisani mliječni napici tipa probiotika imali su kontinualan rast stepena proteolize tokom cijelog perioda skladištenja dostižući vrijednosti $3,903 \pm 0,201\%$ na kraju testiranog perioda skladištenja. Uzorci dobijeni upotrebom tradicionalne jogurtne i kombuha starter kulture imali su sličan trend rasta stepena proteolize tokom prve i druge nedjelje skladištenja. Nakon blagog rasta tokom prve nedjelje u uzorcima se ne bilježi izraženiji rast tokom druge nedjelje skladištenja. Međutim u trećoj nedjelji u uzorcima sa jogurtnom starter kulturom došlo je do značajnog rasta stepena proteolize sa krajnjom vrijednosti $3,027 \pm 0,232\%$ dok u uzorcima sa kombuha starter kulturom nije došlo do značajnog rasta stepena proteolize i na kraju ovog perioda iznosi $2,746 \pm 0,198\%$. Rezultati ukazuju da analizirani faktori starter kultura i vrijeme skladištenja imaju statistički značajan ($p < 0,005$) uticaj na vrijednost stepena proteolize (Tabela 30). Kako proteoliza najvećim dijelom zavisi od aktivnosti proteolitičkih enzima starter kultura (Ravula i Shah 1998; Shah i Ravula 2001) na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da probitska starter kultura posjeduje razvijeniji proteazni/peptidazni sistem u poređenju sa jogurtnom i kombuha starter kulturom. Ipak, manji stepen proteolize u uzorcima sa jogurtnom i kombuha starter kulturom, može biti posledica simbiotičkog djelovanja prisutnih bakterijskih vrsta u ovim starterima. Na primjer, poznato je da *S. termophilus* može da koristi peptide i amino kiseline prethodno oslobođene proteolitičkom aktivnošću *L. bulgaricus* čime se umijesto akumulacije ovi produkti dalje konzumiraju i time nemaju uticaj na ukupni stepen proteolize u proizvodima (Slocum i sar. 1988)

Tabela 30. Statistička značajnost uticaja različitih parametara na vrijednost stepena proteolize

Parametri	SS	DF	MS	F	p
Intercept	193,280*	1*	193,280*	1812,846*	0,000*
Vrijeme skladištenja	2,523*	3*	0,841*	7,889*	0,004*
Starter kultura	1,480*	2*	0,740	6,943*	0,011*
Ponavljjanje	0,000	1	0,000	0,004	0,950
Vrijeme skladištenja*starter kultura*ponavljanje	0,008	6	0,001	0,013	0,999

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

MS – mean of square / srednje kvadratno odstupanje;

SS- suma kvadrata odstupanja

F-test p = p vrijednost, *p<0,05.

Generalno, na osnovu rezultata promjene pH i stepena proteolize tokom 21 dan skladištenja tri vrste fermentisanih mliječnih proizvoda, može se zaključiti da probiotska starter kultura uslovljava veće promjene pH vrijednosti i stepena proteolize u poređenju sa jogurtom i kombuha starter kulturom. Dobijeni rezultati, takođe potvrđuju pozitivne efekte upotrebu kombuha inokuluma kao starter kulture u produkciji fermentisanih mliječnih proizvoda, podjednako dobrih kvalitativnih karakteristika kao onih dobijenih upotrebom konvencionalnih starter kultura- jogurtne odnosno probiotske.

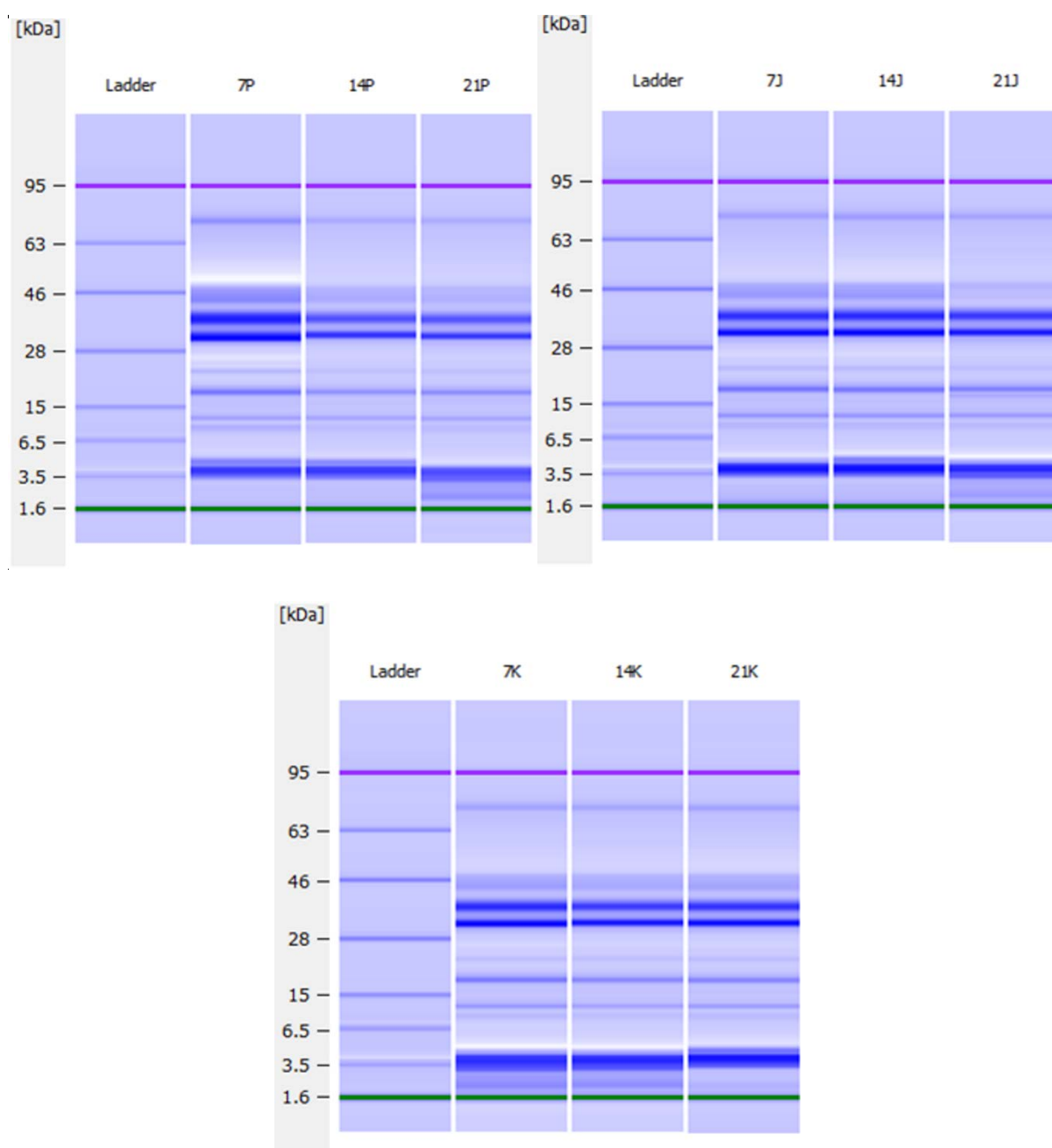
SDS-PAGE kapilarna elektroforeza

Relativni sadržaj pojedinačnih proteinskih frakcija u fermentisanim mliječnim napicima tokom skladištenja utvrđen je kapilarnom elektroforezom. Podložnost proteina hidrolizi određuje njihovu biološku aktivnost u smislu sadržaja proteina koji ljudski organizam može da upotrijebi za sintezu sopstvenih proteina. Osim toga proteoliza proteina surutke, kao osnovnih alergena u mlijeku u velikoj mjeri doprinosi nutritivnoj vrijednosti i upotrebi ovih proizvoda u ljudskoj ishrani.

Iz rezultata navedenih u tabela 31. može se zaključiti da period skladištenja ne utiče značajno na relativni udio pojedinačnih frakcija proteina mada su njihove varijacije evidentne. Iako tokom fermentacije mlijeka dolazi do značajnog smanjenja relativnog udjela frakcija α -laktalbumina i β -laktoglobulina u konačnim proizvodima u odnosu na mlijeko (za 37 % kod J0; 39,4% kod P0 i 31,9 % kod K0 uzorka), tokom skladištenja dolazi do oscilacija u

trendu promjena njihovog sadržaja. Najveće smanjenje α -laktalbumina zabilježeno je kod uzorka sa probiotskom starter kulturom za čak 40,5% nakon 14 dana skladištenja u odnosu na udio u mlijeku. Najveći procenat smanjenja β - laktoglobulina, kao glavnog alergena mlijeka zabilježen je u uzorku P7 za 40,76% u odnosu na relativni udio u mlijeku. Kombuha fermentisani mliječni napici pokazuju značajne varijacije u procentu hidrolizovanih frakcija β - laktoglobulina tokom perioda skladištenja i variranje se kreće u opesgu od 20,23% u uzorku K0 do 29,12% u uzorku K21 (nakon 21 dan skladištenja). β - laktoglobulin ima veoma važnu ulogu u transportu malih hidrofobnih liganada kao što su retinol, masne kiseline i vitamin D (Kontopidis i sar. 2004; Yang i sar. 2009) što ga u velikoj mjeri čini izuzetno bitnim proteinom mlijeka, te je stoga i poželjan u isharni ljudi koji nemaju alergijske reakcije na ovu frakciju proteina mlijeka. Sadržaj β - laktoglobulina je bitan i sa tehnološkog aspekta stabilnosti koaguluma, shodno njegovom afinitetu da se vezuje za kazein i time mijenja njegove hidrofilne karakteristike. Istovremeno sa smanjenjem sadržaja proteina surutke dolazi do povećanja relativnog udijela α - i β - kazeina kao dominantnih frakcija proteina mlijeka, dok se sadržaj κ - kazeina takođe smanjuje. Ipak ove promjene ne pokazuju jasan trend promjena tokom skladištenja.

Na osnovu rezultata analize proteinskih frakcija identifikovanih kapilarnom elektroforezom, generalno se može zaključiti da ne postoji uniforman trend promjena niti jedne frakcije analiziranih proteina mlijeka u predviđenom periodu skladištenja, iako se relativni sadržaj svih frakcija mijenja. Međutim, pored identifikovanih proteinskih frakcija, elektroforegrami pokazuju i pikove neidentifikovanih frakcija nižih molekularnih masa koje su mogući nosioci različitih bioloških i funkcionalnih karakteristika i takođe utiču na indeks TCA rastvorljivih proteina koji je pokazao značajan uticaj kombinacije faktora vremena skladištenja i starter kulture. Dalja izolacija i identifikacija ovih frakcija od ključnog je značaja za utvrđivanje uticaja kombuha startera na proteolizu proteina mlijeka i njihovu biološku aktivnost i poređenja sa uticajem jogurtne i probiotske starter kulture. Elektroforegrami fermentisanih mlčiječnih proizvoda tokom skladištenja prikazani su na slici 25.



Slika 25. SDS-PAGE elektroforegram: jogurta (J) probiotskog jogurta (P) i kombuha fermentisanog mliječnog napitka (K) nakon 7. 14. i 21. dana skladištenja

Tabela 31. Relativni sadržaj proteinskih frakcija u mlijeku (M) jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Protenske frakcije	Sadržaj (%)												
	M	J0	J7	J14	J21	P0	P7	P14	P21	K0	K7	K14	K21
α-laktalbumin	6,357	4,009	4,680	3,969	4,598	3,852	1,991	3,789	4,371	4,338	4,263	4,004	3,934
Lizozim	0,782	0,287	0,478	0,551	0,532	0,401	0,365	0,536	0,447	0,514	0,550	0,558	0,595
β-laktoglobulin	11,128	8,516	9,229	8,163	10,443	8,458	6,592	7,919	8,769	8,876	7,967	8,023	7,887
β-kazein	33,306	39,904	40,449	40,780	40,690	40,064	36,914	40,070	39,569	38,375	41,166	42,645	41,781
α-kazein	33,565	35,794	34,483	35,221	35,799	36,109	35,727	35,909	35,645	35,545	35,484	34,848	35,510
k-kazein	8,129	6,772	5,729	5,799	2,091	6,183	7,299	6,561	4,627	6,441	5,259	5,139	5,373
Serum albumin	0,185	0,223	0,402	0,221	0,292	0,348	0,135	0,254	0,149	0,201	0,202	0,429	0,215
Laktoferin	1,468	2,125	2,511	2,521	2,323	2,217	2,506	2,711	2,305	2,292	2,190	2,605	2,505

Masne kiseline

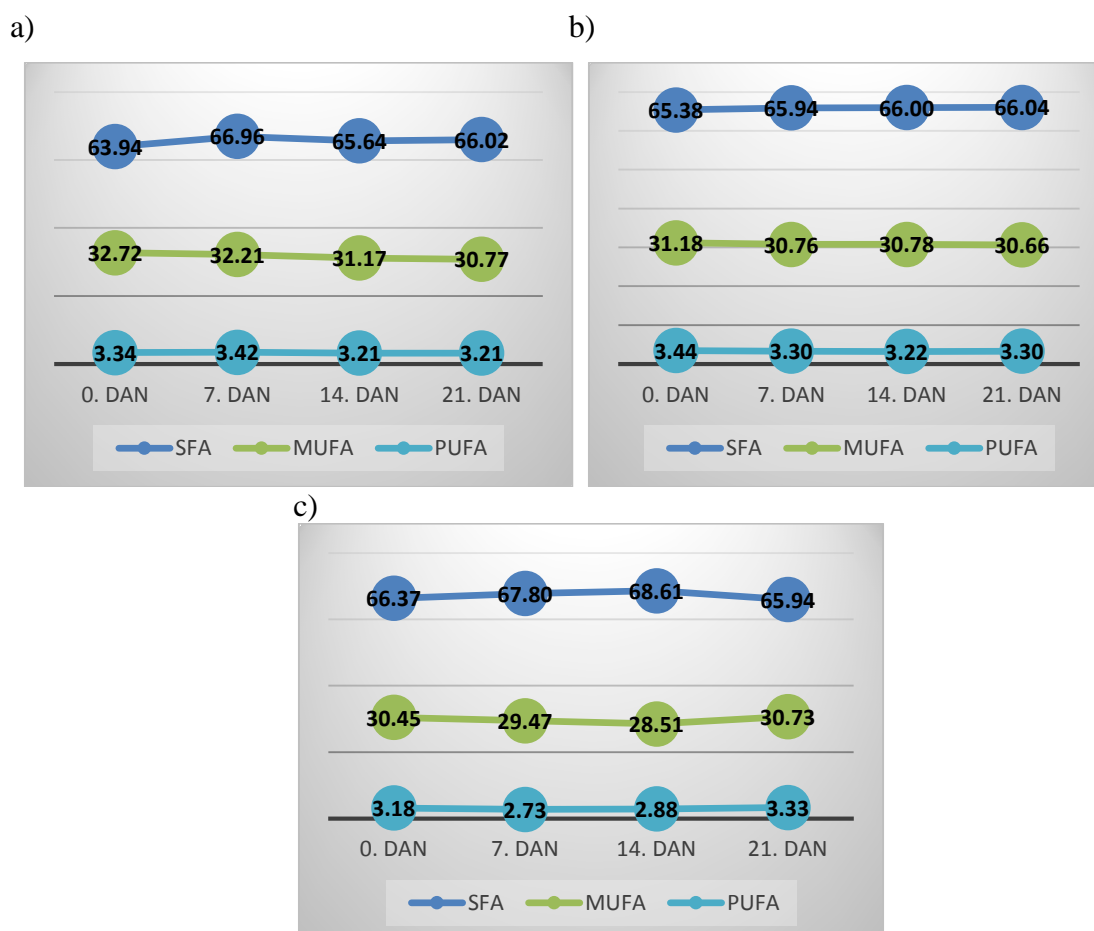
Promjene relativnog sadržaja masnih kiselina u fermentisanim mliječnim proizvodima tokom skladištenja prikazane su tabeli u 32. Dominantna masna kiselina u svim uzorcima tokom skladištenja je palmitinska (16:0), a najveći sadržaj zabilježen je u kombuha fermentisanim mliječnim napicima. U uzorcima sa tradicionalnom jogurtnom i probiotskom starter kulturom detektovan je nizak sadržaj masnih kiselina 17:1 i 20:0, dok u kombuha fermentisanim mliječnim napicima ove masne kiseline nisu detektovane.

Tabela 32. Relativni udio masnih kiselina u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Vrijeme skladištenja	0			7			14			21		
Starter kultura	J	P	K	J	P	K	J	P	K	J	P	K
MK	Maseni udio %			Maseni udio %			Maseni udio %			Maseni udio %		
4:0	0,88	1,07	1,22	1,11	1,51	1,19	1,38	1,34	1,07	1,56	1,02	1,15
6:0	0,87	1,00	1,11	1,06	1,31	1,08	1,19	1,18	1,03	1,39	0,97	1,12
8:0	0,65	0,76	0,78	0,80	0,88	0,76	0,81	0,84	0,75	0,92	0,75	0,80
10:0	1,96	2,18	2,22	2,17	2,31	2,19	2,20	2,26	2,20	2,30	2,17	2,18
12:0	2,62	2,81	2,89	2,82	2,91	2,93	2,80	2,94	2,96	2,88	2,87	2,82
14:0	10,44	10,79	10,88	10,58	10,80	11,24	10,79	10,94	11,44	10,85	10,99	10,89
14:1	0,69	0,73	0,74	0,83	0,83	0,73	0,78	0,82	0,79	0,79	0,74	0,86
15:0iso	0,15	0,16	0,18	0,19	0,19	0,19	0,17	0,20		0,17	0,17	0,20
15:0anteiso	0,34	0,36	0,39	0,42	0,40	0,36	0,39	0,40	0,40	0,38	0,37	0,41
15:0	1,07	1,08	1,14	1,17	1,14	1,09	1,15	1,14	1,15	1,12	1,10	1,16
16:0iso	0,18	0,19	0,21	0,23	0,22	0,20	0,20	0,21	0,20	0,20	0,19	0,22
16:0	32,05	32,94	33,01	31,37	32,17	34,13	32,32	32,37	34,54	32,16	33,17	32,50
16:1	1,39	1,48	1,45	1,58	1,56	1,40	1,51	1,53	1,46	1,49	1,45	1,56
17:0iso	0,26	0,28	0,22	0,25	0,26	0,20	0,24	0,24	0,33	0,29	0,29	0,30
17:0anteiso	0,32	0,35	0,37	0,40	0,36	0,34	0,34	0,37	0,37	0,35	0,36	0,40
17:0	0,55	0,58	0,60	0,66	0,62	0,56	0,60	0,62	0,62	0,60	0,55	0,66
17:1	0,16	0,17		0,22	0,21		0,20	0,21		0,19		0,21
18:0	11,43	10,67	11,15	11,00	10,72	11,34	10,93	10,82	11,56	10,69	11,07	10,96
18:1									26,26			
18:1t	2,40	2,05	2,13	2,59	2,15	1,64	2,38	2,09		2,31	2,01	2,29
18:1c	27,95	26,75	26,13	26,98	26,01	25,69	26,29	26,13		26,00	26,47	25,65
18:2												
18:2c	2,99	3,03	2,86	3,06	2,95	2,73	2,85	2,89	2,88	2,86	2,87	2,98
18:3n3	0,35	0,41	0,32	0,36	0,35		0,34	0,33		0,36	0,43	0,35
20:0	0,16	0,19		0,15	0,14		0,14	0,13		0,15		0,18
20:1	0,13											0,15
SFA	63,94	65,38	66,37	66,96	65,94	67,80	65,64	66,00	68,61	66,02	66,04	65,94
MUFA	32,72	31,18	30,45	32,21	30,76	29,47	31,17	30,78	28,51	30,77	30,66	30,73
PUFA	3,34	3,44	3,18	3,42	3,30	2,73	3,21	3,22	2,88	3,21	3,30	3,33

SFA-saturated fatty acids/ zasićene masne kiseline ;MUFA- monounsaturated fatty acids/mononezasićene;PUFA polyunsaturated fatty acids/ polinezasićenih masnih kiselina

Na slici 26a. može se vidjeti da tokom skladištenja u fermentisanom mliječnom napitku tipa jogurta dolazi do opadanja sadržaja MUFA i PUFA, dok sadržaj SFA blago raste. Praćenjem sadržaja zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u probiotskom FMN tokom skladištenja, uočava se isti trend promjena (slika 26b.). Takođe, kod kombuha FMN kao i u slučaju uzoraka sa jogurtom i probiotskom starter kulturom dolazi do istih promjena u sadržaj SFA, MUFA i PUFA tokom skladištenja (slika 26c) te se uočava rast SFA i opadanje MUFA i PUFA tokom ovoga perioda. Ova istraživanja su u skladu sa rezultatima koje su dobili (Serafeimidou i sar. 2013) ispitivanjem sastava masnih kiselina jogurta tokom 14 dana skladištenja. Kao i u navedenom istraživanju i u ovome radu u svim ispitanim uzorcima dominantne zasićene masne kiseline su i miristinska (14:0), palmitinska (16:0), stearinska (18:0) a od monozasićenih oleinska (18:1c). Međutim, nakon 14. dana skladištenja, dolazi do smanjenja sadržaja zasićenih, odnosno povećanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina. Minimalan sadržaj SFA i maksimalan sadržaj MUFA i PUFA zabilježen je 21. dana skladištenja (slika 26).

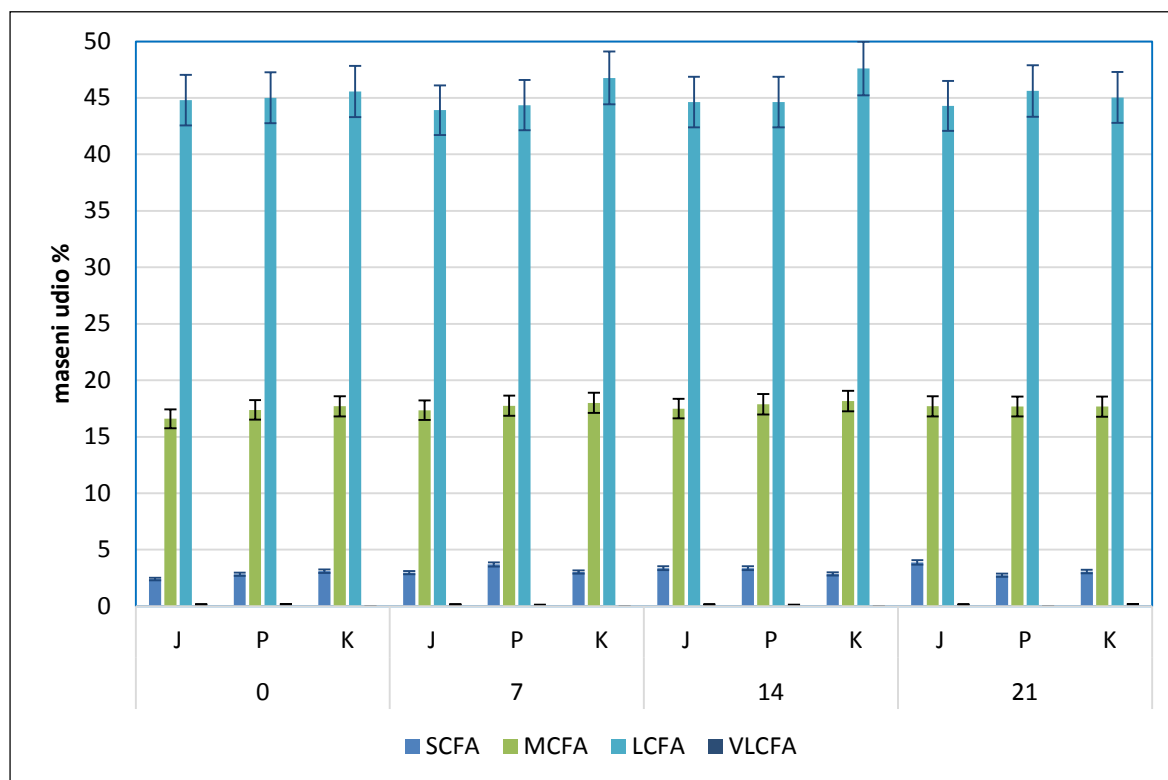


Slika 26. Promjene sadržaja SFA, MUFA i PUFA tokom skladištenja: a) jogurt, b) probiotski jogurt i c) kombuha FMN

Dobro je poznato da različite starter kulture svojim metabolizmom tokom fermentacije mlijeka utiču na profil masnih kiselina konačnog proizvoda (Coşkun i Ondül 2004; Yadav i sar. 2007; Ekinci i sar. 2008). Kako bi poboljšali masnokiselinski profil, odnosno odnos nezasićenih, mono i polinezasićenih masnih kiselina u fermentisanim mliječnim napicima tipa jogurta, veliki broj istraživača je ispitivao uticaj različitih dodatka. Tako su do Espirito Santo i sar. (2010) zaključili da dodatak açaı bobica značajno povećava sadržaj polinezasićenih masnih kiselina kao i prekursora konjugovane linoleinske kiseline (CLA). Takođe, Xu i sar. (2005) su zaključili da dodatak 0,1 % linolne kiseline značajno utiče na povećavanje sadržaja CLA u fermentisanom mliječnom proizvodu dobijenom kombinovanom upotrebom *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ali ne i proizvodima dobijenim upotrebom pojedinačnih starter kultura. Ova istraživanja ukazuju na mogućnost dobijanja različitih fermentisanih mliječnih napitaka sa modifikovanim i povoljnijim sastavom masnih kiselina dodatkom različitih biljnih vlakana i nus proizvoda industrije voća, što može biti predmet daljih istraživanja i unapređenja kombuha fermentisanog mliječnog proizvoda. Međutim, povećanje sadržaja polinezasićenih masnih kiselina može biti štetno sa aspekta lipidne oksidacije. Naime, poznato je da oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do nastajanja produkata u vidu slobodno radikalskih jedinica čiji sadržaj može značajno da se poveća tokom perioda skladištenja. Do lipidne oksidacije dolazi pod uticajem svjetlosti, prisustnih metala, sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta, a zavisi i od vrste pakovanja i perioda skladištenja (Gutierrez 2014). Zbog toga je posebno bitno da proizvod posjeduje najadekvatniji odnos PUFA i MUFA masnih kiselina (Niki i sar. 2005).

Na slici 27. prikazana je promjena ukupnih masnih kiselina kratkog lanca SCFA (short chain fatty acid), srednjeg MCFA (medium-chain fatty acids), dugog LCFA (long-chain fatty acids) i veoma dugog VLCFA (very long-chain fatty acids) tokom skladištenja u svim vrstama fermentisanih mliječnih napitaka. Masne kiseline kratkog lanca postaju interesantno polje za istraživanja poslednju deceniju. Nastaju fermentacijom vlakana u debelom crijevu i posebno su značajne kao izvor energije za mikrofloru i prevenciju kancera debelog crijeva (Maslowski i sar. 2009). U svim fermentisanim napicima dominantne su kiseline dugog lanca, čiji se sastav ne mijenja značajno tokom 21 dan skladištenja, što je u skladu sa istraživanjima (Serafeimidou i sar. 2013) koji takođe nisu zabilježili statistički značajne promjene tokom 14 dana skladištenja u uzorcima jogurta. Međutim, evidentno je da do relativnog smanjenja sadržaja masnih kiselina dugog lanca dolazi tokom prve nedjelje skladištenja, ali je tokom sledećih 14 dana skladištenja njihov ukupni udio dostigao početnu vrijednost. Masne kiseline kratkog i srednjeg lanca zauzimaju značajno manji udio i najpovoljnije promjene se dešavaju

u napitku dobijenom upotrebom jogurtne starter kulture, gdje dolazi do značajnog povećanja sa 2,39 % prvog dana na 3,9% nakon 21. dana skladištenja. Upotrebom probiotske i kombuha starter kulture nije došlo do statistički značajnih promjena u udjelu SCFA u proizvedenim FMN tokom skladištenja (slika 27).

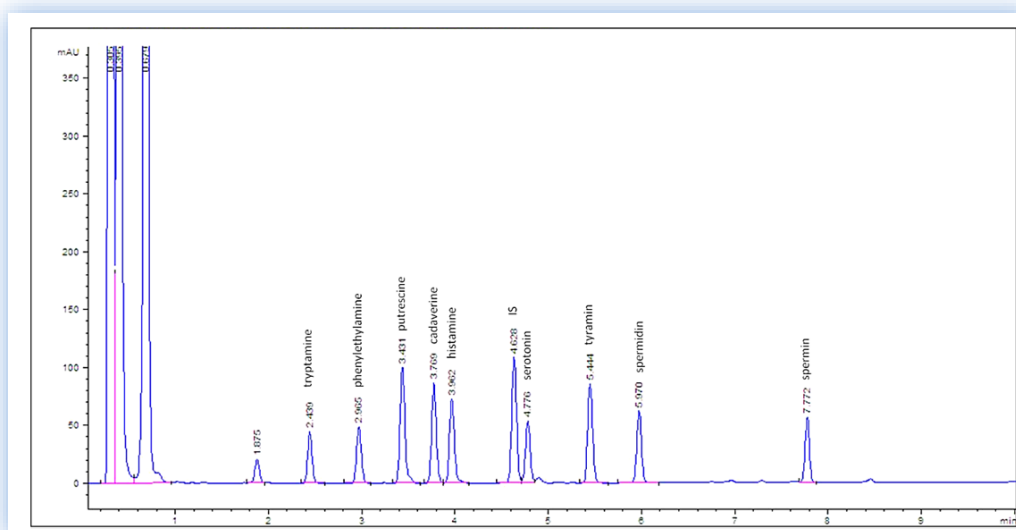


Slika 27. Promjene sadržaja masnih kiselina kratkog lanca SCFA (short chain fatty acid), srednjeg MCFA (medium-chain fatty acids), dugog LCFA (long-chain fatty acids) i veoma dugog VLCFA (very long-chain fatty acids) u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Biogeni amini

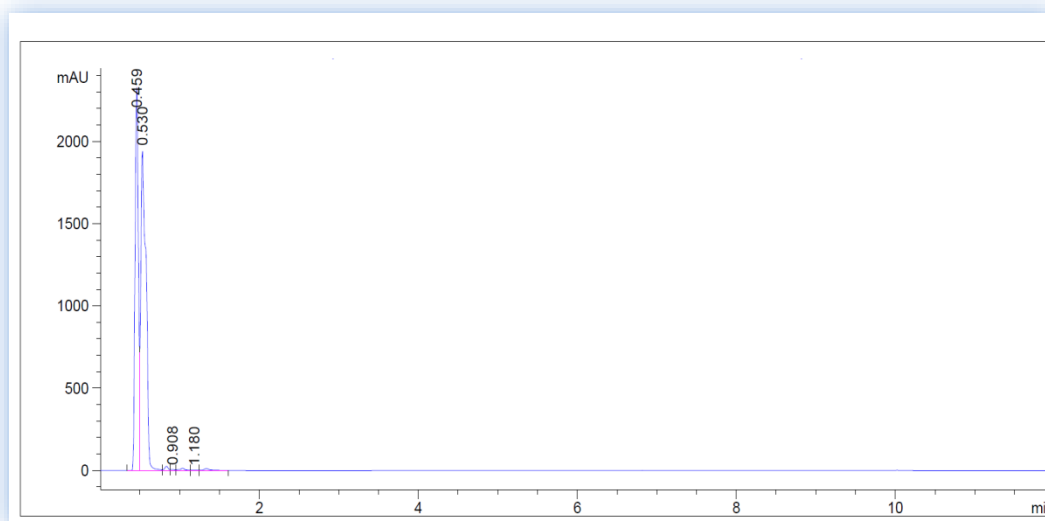
Biogeni amini (BA) su neisparljive, nisko molekulske azotne baze nastale dekarboksilacijom odgovarajućih amino kiselina, koje se usled mikrobiološke aktivnosti mogu akumulirati u visokoj koncentraciji u hrani i izazvati toksične efekte na zdravlje ljudi. U nekim vrstama fermentisanih proizvoda teško je sprečiti akumulaciju BA usled mikrobioloških / hemijskih / fizičkih uslova fermentacije koji se ne mogu lako modifikovati. Najvažnije BA u hrani su histamin, tiramin, putrescin, kadaverin i feniletilamin, koji nastaju dekarboksilacijom histidina, tirozina, ornitina, lizina i fenilalanina, respektivno. Putrescin se takođe može formirati deaminacijom agmatina. Gram-pozitivne bakterije, naročito BMK, su uglavnom odgovorne za proizvodnju BA u fermentisanim proizvodima (Linares i sar. 2011). Ovi sojevi BMK su često dio starter kulture koja se koristi u proizvodnji fermentisanih proizvoda i odgovorni su za promjene senzornih svojstava hrane. Neki sojevi *Lactococcus lactis* su vremenom izgubili specifičnost stvaranja putrescina, kao rezultat adaptacije na mlijeko procesom reduktivne genske evolucije (Ladero i sar. 2012). Za razliku od sira, kao pogodnog supstrata za nastanak BA, fermentisani mliječni napici tipa jogurta, ne bi trebalo da sadrže značajnu koncentraciju BA. Shodno upotrebljenoj starter kulturi kombuhe koja pored bakterija sadrži i kvasce, važno je bilo ispitati moguće formiranje BA u proizvedenom fermentisanom mliječnom napitku.

Biogeni amini (triptamin, feniletilamin, putrescin, kadaverin, histamin, serotonin, tiramin, spermidin i spermin) derivatizovani danzil hloridom razdvojeni su hromatografski za 8 minuta. Izgled hromatograma za smiješu standarda i primjer za odabrani uzorak prikazani su na slikama 28 i 29. Određeni limiti detekcije ispitivanih biogenih amina, iznosili su: $0,1 \mu\text{g}^{-1}$ za putrescin i spermidin, $0,167 \mu\text{g}^{-1}$ za kadaverin i tiramin, $0,25 \mu\text{g}^{-1}$ za triptamin, feniletilamin i histamin i $0,5 \mu\text{g}^{-1}$ za serotonin i spermin. Prema postavljenim hromatografskim uslovima ispitivani biogeni amini su eluirali sledećim redoslijedom: triptamin (2,430 min), feniletilamin (2,906 min), putrescin (3,431 min), kadaverin (3,700 min), histamin (3,962 min), serotonin (4,770 min), tiramin (5,444 min), spermidin (6,970 min) i spermin (7,772 min).



Slika 28. HPLC profil smješe standarda biogenih amina

Prema dobijenim rezultatima niti u jednom uzorku fermentisanih mliječnih napitaka dobijenih primjenom različitih starter kultura, biogeni amini nisu detektovani u opsegu detekcije, što se može uočiti na odabranom hromatogramu kombuha fermentisanog mliječnog napitka prikazanom na slici 29.



Slika 29. HPLC profil analize biogenih amina uzorka kombuha FMN nakon 21 dan skladištenja

Iz prikazanih rezultata u tabeli 33 vidi se da triptamin, feniletilamin, putrescin, kadaverin, histamin, serotonin, tiramin, spermidin i spermin nisu detektovani tokom skladištenja ni u jednoj grupi ispitanih FMN (tabela 33). Dobijeni rezultati su dodatni pokazatelj kvaliteta fermentisanih mliječnih proizvoda, s obzirom da sadržaj biogenih amina može da se koristi kao indikator svježine ili kvara prehrambenih proizvoda, pošto mogu

nastati kao rezultat aktivnosti dekarboksilaza kontaminirajućih mikroorganizama (Halász i sar. 1994).

Tabela 33. Sadržaj formiranih biogenih amina u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku(K) tokom skladištenja

Dani skladištenja	0			7			14			21		
Starter kultura	J	P	K	J	P	K	J	P	K	J	P	K
triptamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
feniletilamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
putrescin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
kadaverin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
tiramin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
spermin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
spermidin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
histamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND-nije detektovano

Šećeri

Analizirani sadržaj šećera tokom skladištenja ukazuje na značajno niži sadržaj laktoze u uzorcima nakon 21 dana skladištenja u poređenju sa tek proizvedenim uzorcima. Posmatrano u odnosu na početni sadržaj laktoze u mlijeku, u finalnim proizvodima došlo je do smanjenja sadržaja laktoze za 23,075% u kombuha fermentisanom mliječnom napitku i 28,074% u probiotskom jogurtu. Kao metabolički produkti razgradnje laktoze u fermentisanim mliječnim napicima se u značajnim koncentracijama nalazi i galaktoza čiji se sadržaj tokom 14 dana skladištenja neznatno povećava. Osim galaktoze u kombuha fermentisanim mliječnim napicima, prisutni su i D-glukoza, D-fruktoza i saharoza, dok u fermentisanom mliječnom proizvodu dobijenom korišćenjem probiotske odnosno tradicionalne jogurtne kulture ovi šećeri nisu detektovani. Veći sadržaj glukoze u odnosu na fruktozu u svim kombuha FMN može se objasniti činjenicom da fruktoza nastaje biohemijskom transformacijom saharoze, dok se glukoza dobija iz oba šećera, i laktoze i saharoze. Sadržaj fruktoze se tokom skladištenja smanjuje da bi na kraju 21. dana skladištenja iznosio svega 0,087% u poređenju sa početnih 0,127% (tabela 34).

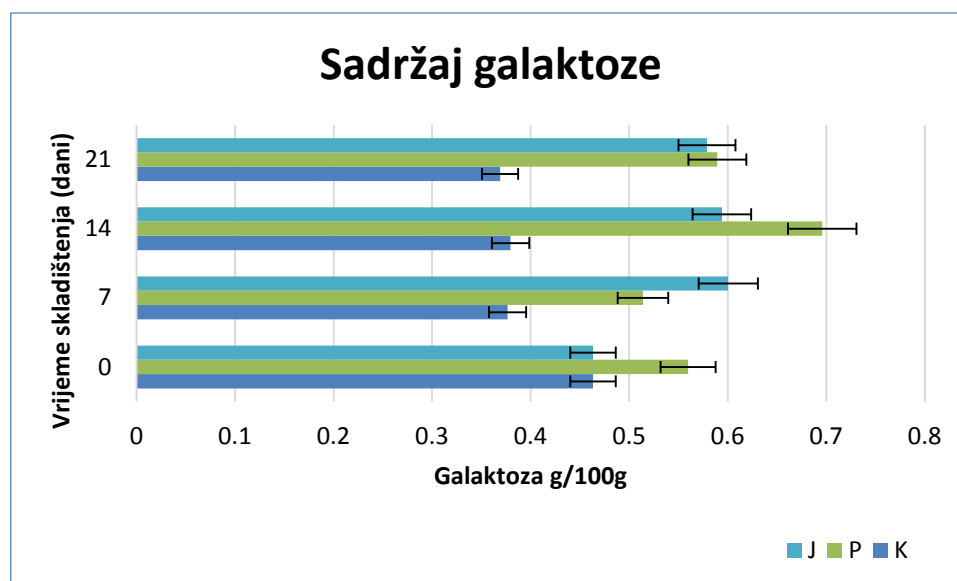
Tebila 34. Sadržaj šećera u uzorcima kombuha fermentisanog mliječnog napitka tokom skladištenja

Uzorak	Laktoza	Galaktoza	Glukoza	Fruktoza	Saharoza
K0	3,647	0,463	0,127	0,127	0,221
K7	2,854	0,376	0,053	0,135	ND
K14	2,850	0,379	0,050	0,094	ND
K21	2,787	0,369	0,026	0,087	ND

ND-nije detektovano

Tokom svih dana skladištenja, sadržaj galaktoze je najniži u uzorcima proizvedenim sa kombuha starter kulturom (slika 30.). Sadržaj galaktoze nakon proizvodnje u kombuha i tradicionalnom jogurtnom FMN bio je bez statistički značajnih razlika.

Generalno posmatrano, dobijene razlike u sadržaju šećera između uzoraka proizvedenih sa tri vrste starter kultura, posledica su njihovog različitog mikrobiološkog sastava i samim tim i metaboličkih puteva razgradnje.

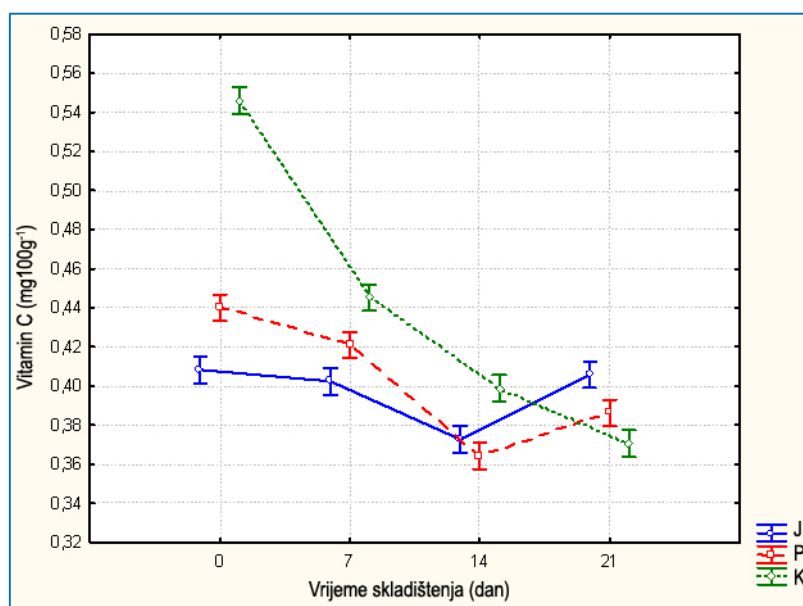


Slika 30. Promjena sadržaja galaktoze u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K), tokom skladištenja

Vitamin C

Shodno dokazanoj antioksidativnoj aktivnosti vitamina C, praćen je njegov sadržaj kako bi se utvrdila korelacija između njegovog sadržaja i antioksidativnog kapaciteta u fermentisanim mliječnim napicima. Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje imali su uzorci sa kombuha starter kulturom ($0,5457 \pm 0,017 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$), dok su uzorci sa probiotskom i tradicionalnom jogurnom starter kulturom imali $0,4404 \pm 0,014 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$ i $0,4078 \pm 0,013 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$, redom. Fermentacija mlijeka kombuhom povećava sadržaj vitamina C zbog unosa istog dodatkom 10% inokuluma kombuhe u kojoj je koncentracija iznosi $0,5096 \pm 0,02 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$. Vrijeme skladištenja značajno utiče na promjene sadržaja vitamin C u svim FMN. Tokom samo 14 dana skladištenja koncentracija vitamina C u svim uzorcima se značajno smanjila i to za 18,2% u probiotskom jogurtu, 8,7% u jogurtu i 26,8% u kombuha fermentisanom mliječnom napitku. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima koja je sproveo Oberman (1985) a koji je zaključio da fermentacija mlijeka bakterijama mliječne kiseline značajno smanjuje sadržaj vitamina C. Tokom prvih 14 dana skladištenja, sadržaj vitamina C u uzorcima sa kombuha starter kulturom je značajno veći nego u uzorcima dobijenim konvencionalnim starter kulturama (slika 31). Zanimljivo je da se ove vrijednosti sadržaja vitamin C u uzorku K14 statistički ne razlikuju od uzoraka Y0 i P0 nakon proizvodnje, što potvrđuje dodatnu nutritivnu vrijednost kombuha FMN. Međutim tokom nastavka skladištenja do 21 dana sadržaj vitamina C u ovim uzorcima nastavlja da opada, dok se kod

probiotskog jogurta i jogurta bilježi porast. Visok sadržaj vitamina C u kombuha FMN doprinosi njihovoj značajno većoj DPPH antioksidativnoj vrijednosti.



Slika 31. Promjene sadržaja vitamina C u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K), tokom skladištenja

Minerali

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 34. može se zaključiti da je kalijum najzastupljeniji mineral u svim varijantama fermentisanih mliječnih napitaka i nakon proizvodnje i tokom perioda skladištenja. Tokom procesa skladištenja sadržaj minerala u svim uzorcima opada.

Nakon procesa fermentacije kombuha fermentisani mliječni napici imali su najveći sadržaj analiziranih minerala. Pozitivan uticaj kombuha startera na ukupan sadržaj minerala posledica je njihovog sadržaja u korišćenom starteru kombuhe. Takođe, sadržaj minerala u svim uzorcima je značajno veći nego u uzorcima mlijeka kao početne sirovine (tabela 35). Proces acidifikacije tokom procesa proizvodnje uzoraka značajno utiče na distribuciju kalcijuma. Kalcijum vezan za kazeinske micide se oslobađa čime se povećava koncentracija slobodnog oblika. Stoga je zabilježen porast sadržaja kalcijuma u odnosu na svježe mlijeko upotrebjeno za proizvodnju FMN. Nakon sedam dana skladištenja najveći sadržaj kalijuma imao je probiotski jogurt $164,35 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, potom slijede kombuha fermentisani mliječni napitak i jogurti FMN sa $119,37$ i $111,42 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, redom. Fermentisani mliječni napici sa

tradicionalnom jogurtnom kulturom nakon 21 dan skladištenja imali su najveći sadržaj minerala dok su uzorci kombuha FMN imali najniži sadržaj minerala.

Rezultati sadržaja minerala su u skladu sa literaturnim podacima de la Fuente i sar. (2003). Imajući u vidu značaj minerala u ishrani može se reći da sve varijante fermentisanih mliječnih napitaka predstavljaju veoma bogat izvor kalcijuma, kalijuma i natrijuma. Kombuha fermentisani mliječni napici prema dobijenim rezultatima imaju značajno povoljniji sadržaj ispitivnih minerala nakon proizvodnje i tokom 7 dana skladištenja što daje prednost upotrebe kombuha startera u odnosu na tradicionalnu jogurtu i probiotsku starter kulturu.

Tabela 35. Promjene sadržaja minerala u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K), tokom skladištenja

Vrijeme skladištenja (dan)	J			P			K		
	Ca	Na	K	Ca	Na	K	Ca	Na	K
	(mg 100g ⁻¹)			(mg 100g ⁻¹)			(mg 100g ⁻¹)		
0	160,7 ±3,1	55,42 ±0,4	164,67± 1,2	124,57± 4,1	63,28 ±0,2	168,20± 1,9	191,4 ±3,7	64,65 ±0,5	199,7 ±1,8
7	81,28 ±5,8	30,03 ±0,8	111,42± 8,5	102,27± 3,4	54,54 ±9,1	164,35± 4,7	98,67 ±4,6	44,34 ±6,5	119,37± 4,3
14	63,94 ±4,6	40,15 ±1,0	115,68± 3,5	66,11 ±4,6	35,83 ±1,5	111,60± 0,5	55,99 ±1,53	33,97 ±0,2	93,48 ±0,2
21	76,24 ±0,5	30,75 ±0,5	111,6 ±0,5	55,99 ±3,6	35,48 ±0,3	106,15± 3,1	49,48 ±1,53	31,68 ±2,6	97,86 ±9,0

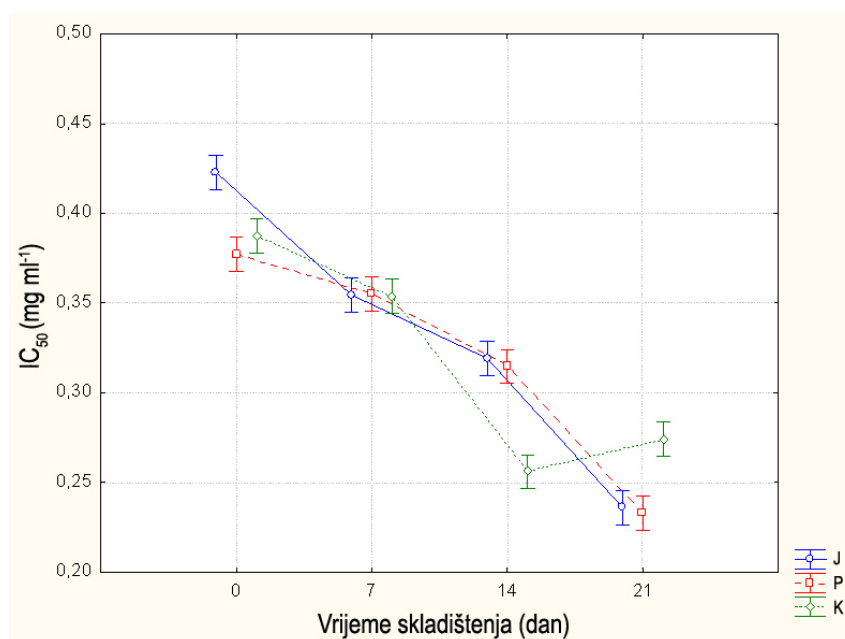
PROMJENE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI TOKOM SKLADIŠTENJA

Inhibitorna aktivnost angiotenzin konvergirajućeg enzima (AKE)

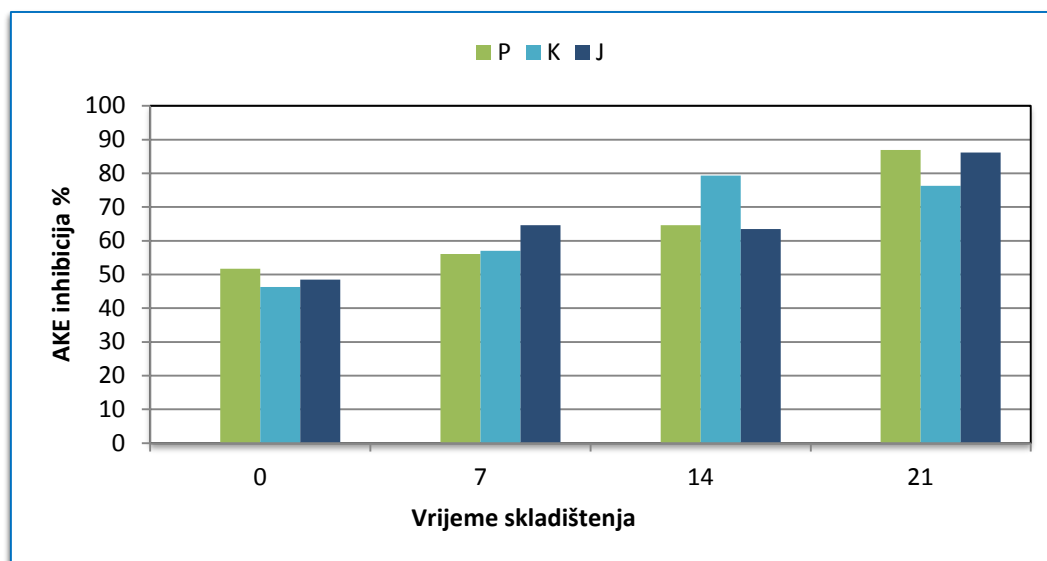
AKE (EC 3.4.15.1) *peptidaza P, dipeptidna hidrolaza*, predstavlja peptidazu ACE (EC 3.4.15.1) koja ima važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska konverzijom angiotensin I u angiotensin II, čime se povećava vazokonstriktorsko dejstvo. Kaptopril i drugi sintetički inhibitori AKE, koji se koriste za liječenje arterijske hipertenzije, mogu imati neželjene uticaje na ljudsko zdravlje (Acharya i sar. 2003). Stoga, prirodni AKE inhibitori kao komponente hrane imaju sve veći značaj u liječenju i prevenciji ove bolesti. Peptidi izolovani iz različite proteinske hrane, kao što su kazokinini i laktokinini imaju veliki potencijal u kontroli hipertenzije kao komponente funkcionalne hrane.

AKE inhibitorna aktivnost vodenih ekstrakata fermentisanih mliječnih proizvoda izražena je za koncentraciju proteina od 0,2 do 1 mgmL⁻¹. U svim uzorcima, analizirana inhibitorna aktivnost nakon proizvodnje raste tokom 14 dana skladištenja dok u poslednjoj nedjelji skladištenja u kombuha FMN dolazi do pada vrijednosti. Prvog dana skladištenja, nakon proizvodnje, AKE inhibitorna aktivnost kombuha FMN je značajno manja ($46,27 \pm 0,694\%$; $p < 0,05$) u poređenju sa tradicionalnom jogurtu i probiotskom jogurtu ($48,48 \pm 0,724$ and $51,70 \pm 1,034\%$, redom).

Nakon sedam dana skladištenja sva tri tipa FMN pokazuju porast AKE inhibitorne aktivnosti i imaju približno jednake vrijednosti. Ovakav trend rasta nastavljen je i u drugoj nedjelji skladištenja, nakon koje uzorci sa konvencionalnim starter kulturama imaju približno jednake vrijednosti (IC_{50} prosiječno 0,33 mgmL⁻¹) dok su uzorci sa kombuha starterom imali najveću aktivnost sa nižom vrijednošću IC_{50} ($IC_{50} = 0,25$ mgmL⁻¹), (slika 32). Međutim, tokom poslednje nedjelje skladištenja AKE inhibitorna aktivnost u uzorcima sa konvencionalnim starterima nastavlja trend porasta dok u uzorcima sa kombuha starterom ova aktivnost opada u poređenju sa vrijednostima dobijenim nakon 14 dana skladištenja (slika 33).



Slika 32. AKE inhibitorna aktivnost u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja izražena kao IC_{50} vrijednost



Slika 33. AKE inhibitorna aktivnost FMN u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K), tokom skladištenja izražen kao % inhibicije

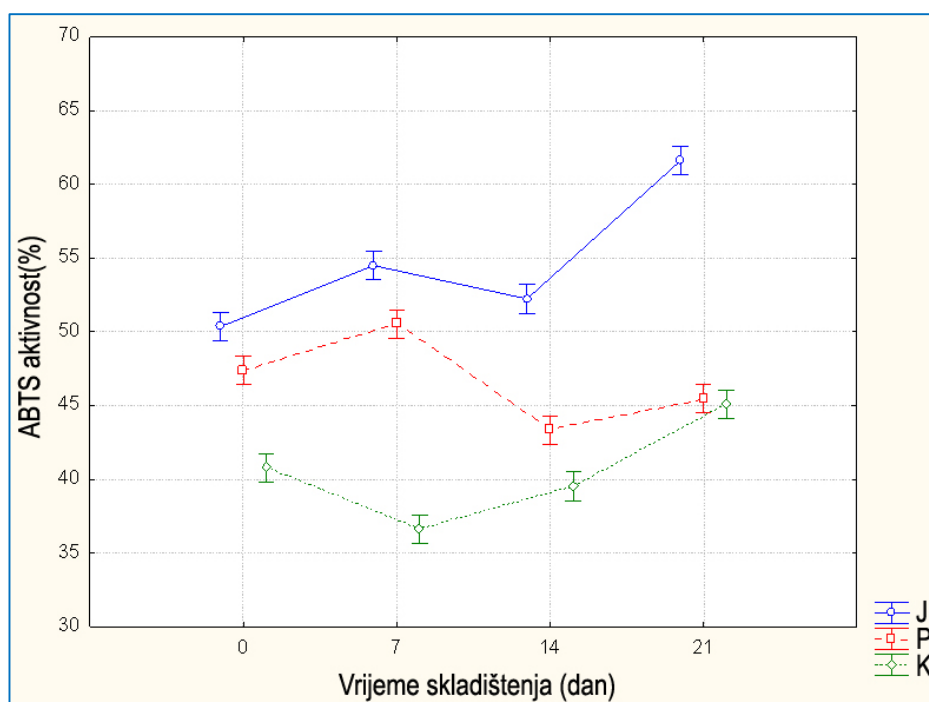
Dobijene IC_{50} vrijednosti su u skladu sa literaturnim podacima dobijenim od strane drugih autora (Hernandez-Ledesma i sar. 2005; Papadimitriou i sar. 2007; Shah i sar. 2007). Shah i sar. (2007) Donkor i sar. (2007) su takođe ustanovili povećanje inhibitorne aktivnosti nakon dvije nedjelje skladištenja u uzorcima sa probiotskom i jogurtom starter kulturom, iako je u probiotskom jogurtu nakon prve nedjelje skladištenja zabilježeno smanjenje ove aktivnosti.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da različite starter kulture utiču na različitu AKE inhibitornu aktivnost tokom skladištenja što ukazuje na različitu proteolitičku aktivnost starter kultura i njihovu sposobnost da hidrolizom proteina mlijeka proizvode širok spektar različitih funkcionalnih peptida, a između ostalih i onih sa AKE inhibitornom aktivnosti. Ipak i pored toga, ne postoji jasna korelacija između AKE inhibitorne aktivnosti i stepena proteolize niti u jednom uzorku, iako oba parametra pokazuju trend rasta tokom skladištenja. Shodno tome da su AKE inhibitorni peptidi većinom di- i tri- peptidi nastali od dugih lanaca poli i oligo peptida, vrlo je vjerovatno da se njihova produkcija nastavlja i tokom skladištenja ali da se njihova ukupna koncentracija ne odražava na ukupni indeks TCA rastvorljivih peptida koji je korišćen za praćenje stepena proteolize. Osim toga, treba uzeti u obzir da pored peptida i druge bioaktivne komponente, kao što su na primjer kalcijum i polifenolna jedinjenja u zavisnosti od koncentracije mogu da utiču na ukupnu AKE inhibitornu aktivnost analiziranih uzoraka (Gonzalez-Gonzalez i sar. 2013). Ove pretpostavljene aktivnosti zahtjevaju dalja istraživanja. I pored dobijenih slabih *in vitro* antihipertenzivnih aktivnosti, bioaktivni peptidi mlijeka se smatraju 'pro-drugs' - pro-lijekovima, kao bitnim prekursorima AKE inhibitora tokom fiziološkog procesa hidrolize u gastrointestinalnom traktu (Udenigwe i Mohan 2014).

Dobijeni rezultati antihipertenzivne aktivnosti različitih fermentisanih mliječnih napitaka dobijenih upotrebom konvencionalne jogurtne i probiotske starter kulture I nekonvencionalne starter kulture, kombuhe, ukazuju na visok AKE potencijal analiziranih proizvoda.

Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost (AA) odnosno sposobnost hvatanja slobodnoradikaliskih jedinica, vodenih ekstrakata fermentisanih mliječnih napitaka, ispitana je na ABTS^{•+} i DPPH radikale. Obe analize ukazuju na mogućnost supstrata da donira elektrone ili H atome u slobodnoradikaliskim reakcijama. Sposobnost kombuha čajnog napitka kao hvatača različitih slobodnih (hidroksi, superoksid anjon, itd.) radikala pripisuje se polifenolnim jedinjenjima, vitaminu C i vitaminima grupe B prisutnim u inokulumu (Jayabalan i sar. 2008). Svi analizirani uzorci pokazuju sposobnost stabilizacije ABTS^{•+} katjona. Najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti nakon proizvodnje pokazali su uzorci sa tradicionalnom jogurtom starter kulturom (TEAC vrijednost 6,74 mmolmg⁻¹), potom slijede uzorci sa probiotskom (6,34 mmolmg⁻¹) i kombuha starter kulturom (5,40 mmolmg⁻¹). Tokom prve nedjelje skladištenja neznatan porast AA zabilježen je u uzorcima sa konvencionalnim starterom dok uzorci sa kombuhom nisu imali značajnije promjene (slika 34). Međutim tokom druge nedjelje skladištenja, AA na ABTS^{•+} katjone opada u uzorcima sa konvencionalnim starterima i ima statistički značajno nižu vrijednost u poređenju sa onom zabilježenom odmah nakon proizvodnje (tabela 36). Međutim u uzorcima sa kombuha starter kulturom dolazi do porasta AA i na kraju perioda skladištenja imala približno je jednaka aktivnosti zabilježenoj u uzorcima sa probiotskom starter kulturom. Najveći antioksidativni potencijal imali su uzorci sa jogurtom starter kulturom nakon 21 dan skladištenja (TEAC vrijednost 8,922 mmolmg⁻¹).



Slika 34. Promjena AA izražene kao aktivnost na ABTS⁺ radikale u jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha fermentisanom mliječnom napitku (K) tokom skladištenja

Tabela 36. Statistički test značajnosti uticaja različitih parametara na vrijednost ABTS inhibicije

Parametri	SS	DF	MS	F	p
Intercept	53666,84*	1*	53666,84*	3503,602*	0,000*
Vrijeme skladištenja	108,28*	3*	36,09*	2,356*	0,127*
Starter kultura	807,47*	2*	403,74*	26,358*	0,000*
Ponavljanje	0,13	1	0,13	0,009	0,927
Vrijeme skladištenja*starter kultura*ponavljanje	0,71	6	0,12	0,008	0,999

DF – degree of freedom / stepeni slobode;

MS – mean of square / srednje kvadratno odstupanje;

SS- suma kvadrata odstupanja

F-test, p = p vrijednost, *p<0,05.

Sposobnost stabilizacije DPPH slobodnih radikala prikazana je u tabeli 37. Kombuha FMN je imao značajno veću ($p > 0,05$) aktivnost nakon proizvodnje ($17,88 \pm 0,17\%$) nego jogurt i probiotski jogurt ($9,46 \pm 0,3$ i $13,23 \pm 0,04\%$ redom). Kombuha starter kultura povećava sposobnost FMN da stabilizuju DPPH radikale tokom perioda skladištenja najvećim djelom zahvaljujući sopstvenom antioksidativnom kapacitetu (Jayabalan i sar. 2008; Vitas i sar. 2013). Trend promjene DPPH AA tokom skladištenja varira u zavisnosti od vrste starter

kulture, ali tokom druge nedjelje skladištenja kao i kod ABTS⁺ AA dolazi do značajnog smanjenja. Kombuha FMN imali su i nakon 14 i 21 dan skladištenja značajno veću aktivnost u odnosu na konvencionalne startere i DPPH AA je iznosila 7,48±0,34% i 8,25±0,41% redom (tabela 37). Osim toga značajna korelacija između DPPH antioksidativne vrijednosti i sadržaja vitamina C zabilježena je u svim uzorcima, dok uzorci sa kombuhom imaju najveći koeficijent korelacije ($R^2=0,997$).

Table 37. Promjena antioksidativne aktivnosti tokom skladištenja izražena kao sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala

Vrijeme skladištenja (dan)	AA _{DPPH} %		
	Jogurt	Probiotski jogurt	Kombuha FMN
0	9,459±0,301 ^a	13,230±0,043 ^b	17,883±0,172 ^c
7	9,884±0,381 ^a	19,495±0,645 ^b	12,318±0,373 ^c
14	6,113±0,301 ^a	4,957±0,043 ^b	7,482±0,344 ^c
21	6,721±0,425	7,055±0,421	8,242±0,202

^{a,b,c} - razlike između vrijednosti u istom redu su značajne sa 95% vjerojatnoće ($p < 0,05$)

Upotrebom ABTS⁺ metode, sposobnost stabilizacije slobodnih radikala svih uzoraka se nalazila u opsegu 36-55%, dok je DPPH metodom ova aktivnost ispod 18%. Dobijene razlike AA između ove dvije analize mogu biti posljedica nedostatka (neadekvatnosti) DPPH metodeu slučajevima određivanja antioksidativne aktivnosti hidrofилnih antioksidanata kao što su hidrolizati proteina (Chang i sar. 2007; Tang i sar. 2009). Razlog ovih nedostataka je činjenica da DPPH radikali mogu biti rastvoreni jedino u organskom rastvaraču (posebno u alkoholu), što može dovesti do precipitacije proteina čija antioksidativna aktivnost je ispitivana. Nasuprot tome, ABTS⁺ slobodni radikali mogu biti rastvoreni i u vodenim i u organskim medijima, te se može mjeriti sposobnost hvatanja ovih slobodnih radikala od strane lipofilnih i hidrofилnih komponenata (Tang i sar. 2009). Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa ovim podacima i ukazuju na veću adekvatnost ABTS metode za mjerenje antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih napitaka. Uopšteno, dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih napitaka mjerene ABTS⁺ i DPPH testom ukazuju na značajan uticaj upotrebene starter kulture. Nepostojanje korelacije između antioksidativne aktivnosti i stepena proteolize, ukazuje na to da bioaktivni peptidi nisu jedini nosioci sveukupne ispitivane antioksidativne aktivnosti ili se pak ne nalaze u koncentracijama u kojima bih imali značajniji uticaj na AA ispitivanih ekstrakata. Ovi rezultati ukazuju da i

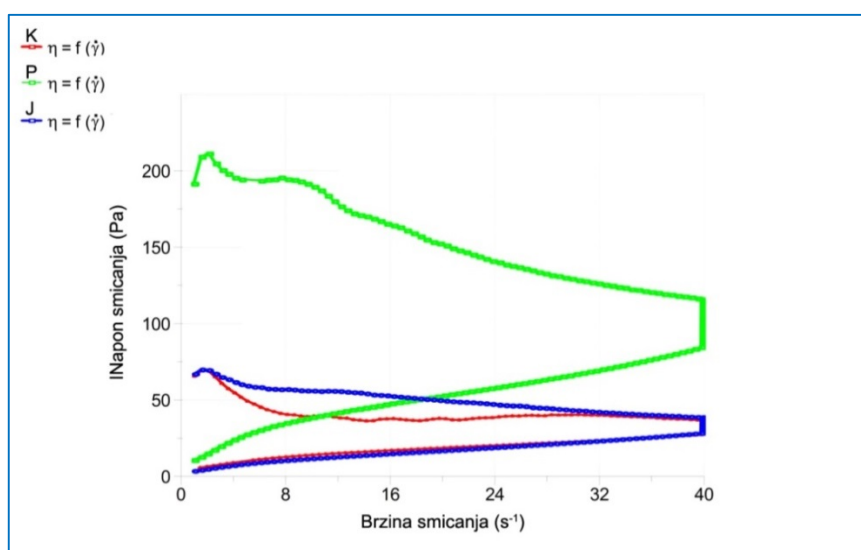
druge aktivne komponente kao što su polifenoli i vitamini trebaju biti dalje analizirani kao potencijalni antioksidanti u analiziranim uzorcima.

PROMJENE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA TOKOM SKLADIŠTENJA

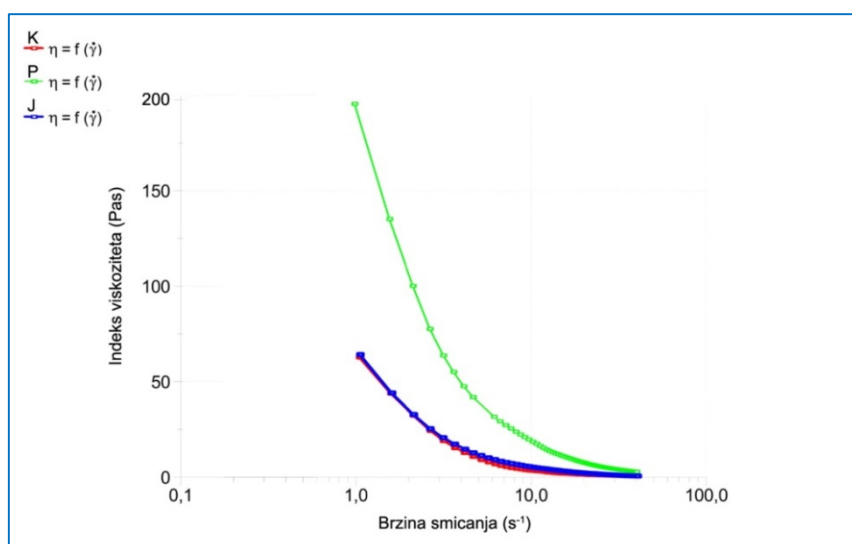
Viskozitet

Fermentisani mliječni napici tipa jogurta, su primjeri disperzija koje se sastoje od agregata kazeina i masnih globula, čije reološko ponašanje zavisi prvenstveno od interakcije ovih čestica. Za razliku od fermentisanih mliječnih napitaka sa visokim sadržajem mliječne masti kao što su punomasni proizvodi koji pokazuju izražene viskoelastične karakteristike, fermentisani mliječni napici od obranog mlijeka ispoljavaju niže vrijednosti .

Reološke karakteristike fermentisanih mliječnih napitaka praćene su nakon proizvodnje prije homogenizacije, i poslije homogenizacije tokom skladištenja. Krive proticanja fermentisanih mliječnih napitaka prije homogenizacije prikazane su na slici 35. Evidentno je da uzorci probiotskog jogurta imaju najveće vrijednosti prinosnog napona i pokazuju najbolje reološke karakteristike. Sa slike 36 može se vidjeti da nakon proizvodnje prije homogenizacije FMN sa probiotskom starter kulturom imaju najveću vrijednost viskoziteta dok napici sa kombuha i tradicionalnom jogurtnom starter kulturom imaju približno iste vrijednosti, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima promjene napona smicanja u funkciji brzine smicanja.



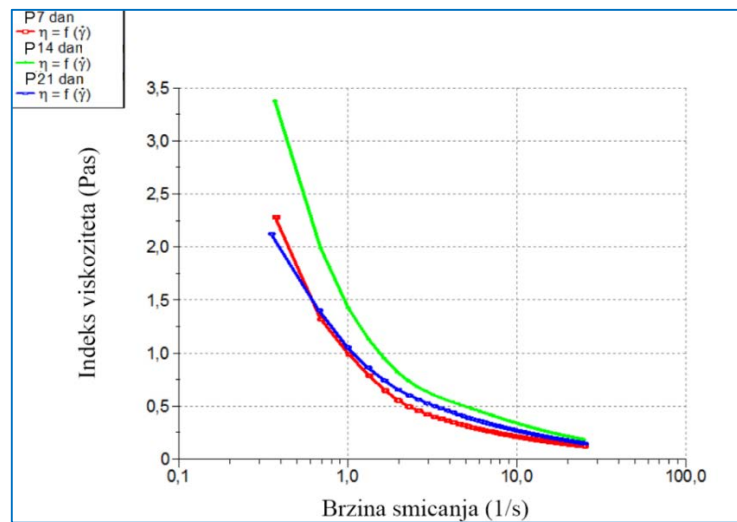
Slika 35. Krive proticanja fermentisanih mliječnih proizvoda : jogurta(J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) nakon proizvodnje prije homogenizacije



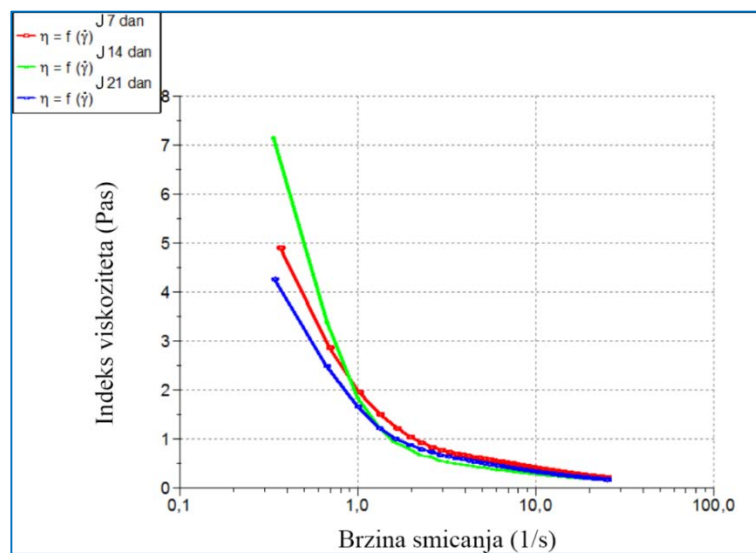
Slika 36. Promjena viskoziteta fermentisanih mliječnih proizvoda : jogurta(J), probiotskog jogurt (P) i kombuha FMN (K) nakon proizvodnje prije homogenizacije u funkciji brzine smicanja

Tokom skladištenja dolazi do različitog trenda promjena viskoziteta FMN-a dobijenih primjenom različitih starter kultura. Evidentno je da sa porastom brzine smicanja dolazi do smanjenja viskoziteta u svim uzorcima što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima i ukazuje na Nenjutnovsko ponašanje (proticanje) fermentisanih mliječnih napitaka (Iličić 2010; Jacob i sar. 2011). Zanimljivo je da su najveće vrijednosti viskoziteta pri istim početnim brzinama smicanja u svim varijantama fermentisanih mliječnih napitaka imali uzorci nakon 14 dana skladištenja (slika 37a,b,c), potom slijede uzorci nakon 7 dana i 21 dan skladištenja. Sa povećanjem brzine smicanja izjednačavaju se vrijednosti viskoziteta tokom skladištenja u svim uzorcima. Lucey (2002) zaključuje da je to rezultat pucanja slabijih veza i smanjenja ukupnog elektrostatičkog odbijanja i hidrofobnih interakcija između molekula gela. Povećanje brzine smicanja i smanjenje viskoziteta dešava se usled razbijanja makromolekulske strukture djelovanjem sile smicanja (Karazhiyan i sar. 2009).

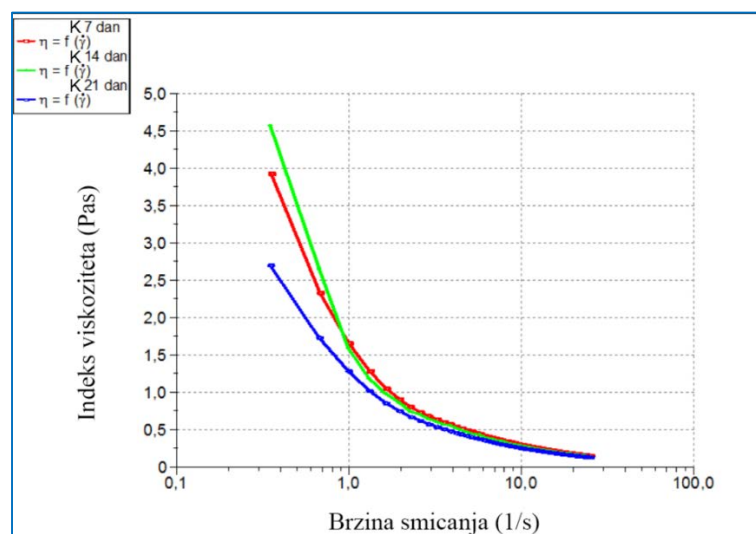
a)



b)



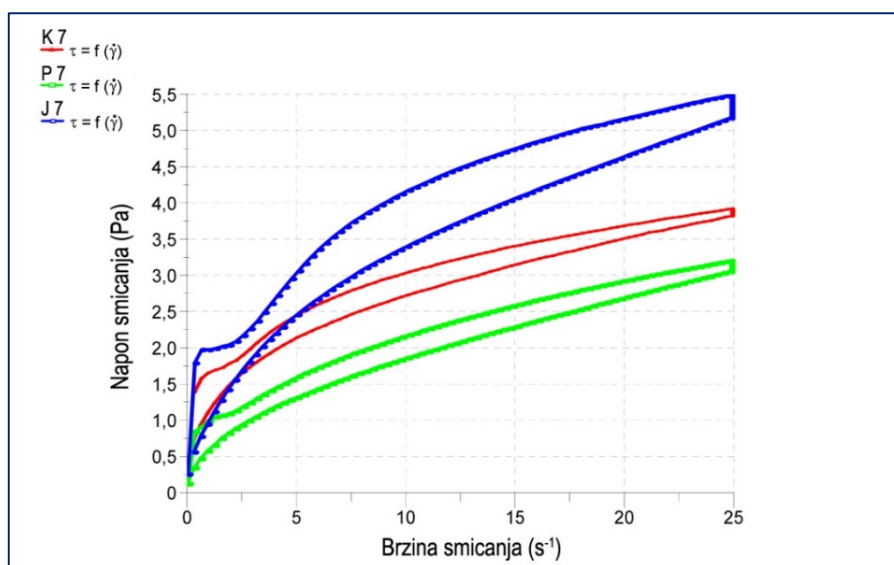
c)



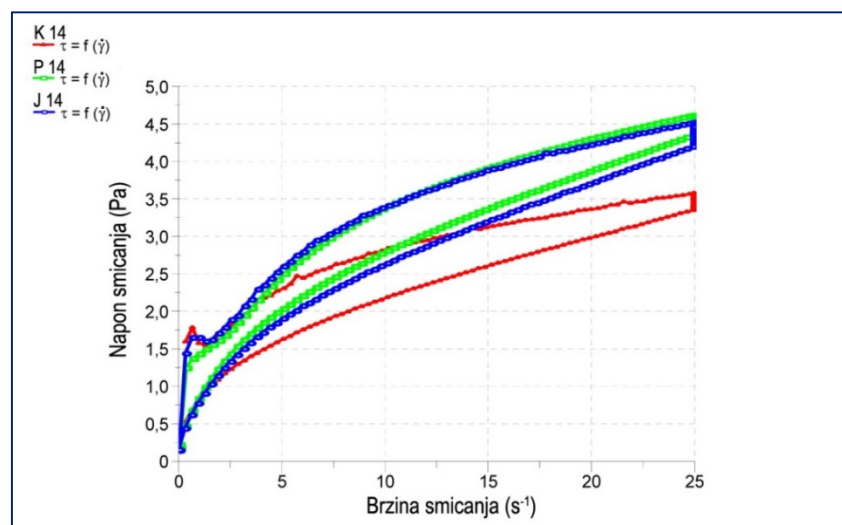
Slika 37. Promjena viskoziteta fermentisanih mliječnih proizvoda tokom skladištenja u funkciji brzine smicanja: a) probiotički jogurt (P) b) jogurt (J) c) kombucha FMN (K)

Na slici 38 prikazane su krive proticanja fermentisanih mliječnih napitaka tokom skladištenja. Najveću vrijednost prinosnog napona nakon sedam dana skladištenja imali su uzorci sa tradicionalnom starter kulturom: 0,5 Pa. Nakon istog perioda skladištenja, vrijednosti napona smicanja u funkciji brzine smicanja su najveće kod FMN sa jogurnom starter kulturom, dok su znatno niže kod FMN sa probiotskom i kombuha starter kulturom što je u saglasnosti sa dobijenim vrijednostima viskoziteta. Nakon 14 dana skladištenja vrijednosti napona smicanja kao i prinosnog napona su znatno niže u svim uzorcima. Najveće vrijednosti napona smicanja imaju uzorci sa probiotskom i tradicionalnom jogurnom starter kulturom, koji pri nižoj, povratnoj vrijednosti brzine smicanja imaju približno jednake vrijednosti, 0,44 Pa, 0,47 Pa i 0,52 Pa u jogurtu, probiotskom jogurtu i kombuha FMN, redom. Trend opadanja napona smicanja je nastavljen i tokom skladištenja do 21 dan. Kombuha FMN su imali najniže vrijednosti dok uzorci sa tradicionalnom jogurnom i probiotskom starter kulturom nisu pokazali statistički značajne razlike. Smanjenje viskoziteta sa povećanjem brzine smicanja može biti posledica više faktora.

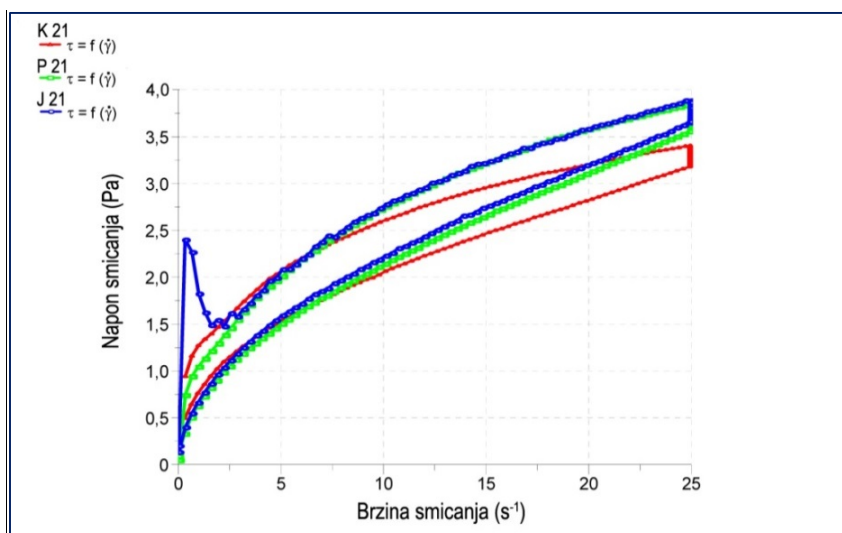
a)



b)



c)



Slika 38. Krive proticanja fermentisanih mliječnih proizvoda: jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja: a) nakon 7 dana b) 14 dana i c) 21 dan skladištenja

Razlike u krivim proticanja između različitih varijanti FMN direktno utiču i na različite vrijednosti površine histerezisne petlje (tabela 38). Površina histerezisne petlje ukazuje na strukturu unutrašnjih veza, njihovog raskidanja i ponovnog obnavljanja u funkciji promjene brzine smicanja, te je stoga i pokazatelj tečljivosti analiziranog proizvoda. U skladu sa dobijenim rezultatima viskoziteta i površina histerezisne petlje ima najveće vrijednosti u probiotskom jogurtu, dok je najniža vrijednost kod kombuha FMN. Nakon sedam dana skladištenja FMN sa tradicionalnom jogurtnom starter kulturom imao je najveću vrijednost, dok nakon 21 dana skladištenja nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka sa probiotskom i tradicionalnom strater kulturom. Iako je tokom 7 dana skladištenja kombuha

FMN imao najniže vrijednosti histerezisne petlje, vrijednost relativne histerezisne površine odnosno koeficijenta tiksotropije (K_d) bila je najveći upravo kod ovoga uzorka. Relativna histerezisna površina se prema nekim autorima smatra boljim pokazateljem tiksotropije posebno pri komparativnim analizama različitih sistema (Dolz i sar. 2000). Nakon proizvodnje, a prije homogenizacije probiotski jogurt ima najveću vrijednost indeksa tiksotropije (0,667). Tokom skladištenja vrijednost K_d raste te najveću vrijednost ima nakon 21 dan skladištenja (0,180). Kako je koeficijent tiksotropije pokazatelj energije potrebne za raskidanje strukture gela, rezultati prikazani u tabeli 39 ukazuju na dobru reološku stabilnost kombuha fermentisanog mliječnog napitka tokom predviđenog vremena skladištenja.

Tabela 38. Promjene vrijednosti histerezisne petlje fermentisanih mliječnih napitaka: jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Vrijeme skladištenja (dan)	Histerezisna petlja Pas^{-1}		
	K	J	P
0 / prije homogenizacije	910,7±10,2	1290±15,3	4045±25,97
7	6,683±0,95	15,74±1,25	6,69±0,25
14	13,42±1,32	15,75±1,43	11,89±0,84
21	11,48±0,94	12,35±0,59	12,64±0,48

Tabela 39. Promjene vrijednosti koeficijenta tiksotropije fermentisanih mliječnih napitaka: jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Vrijeme skladištenja (dan)	K_d		
	K	J	P
0	0,567	0,660	0,667
7	0,218	0,156	0,124
14	0,190	0,187	0,142
21	0,176	0,177	0,180

Na osnovu dobijenih rezultata reoloških karakteristika može se zaključiti da su uzorci dobijeni upotrebom konvencionalnog, jogurnog odnosno probiotskog startera imali bolje reološke osobine pri ispitanim uslovima tokom 21 dan skladištenja, te i da su uzorci sa tradicionalnom jogurnom kulturom tokom cijelog ispitivanog perioda imali gotovo ujednačene vrijednosti navedenih reoloških parametara.

Teksturalne karakteristike

U skladu sa postavljenim ciljevima, tokom perioda skladištenja pored reoloških promjena viskoziteta i krive proticanja, praćene su i promjene teksturalnih karakteristika kao bitnih parametara kvaliteta samog proizvoda sa aspekta prihvatljivosti. Teksturalne karakteristike fermentisanih mliječnih proizvoda nakon proizvodnje, prije homogenizacije prikazane su u tabeli 40.

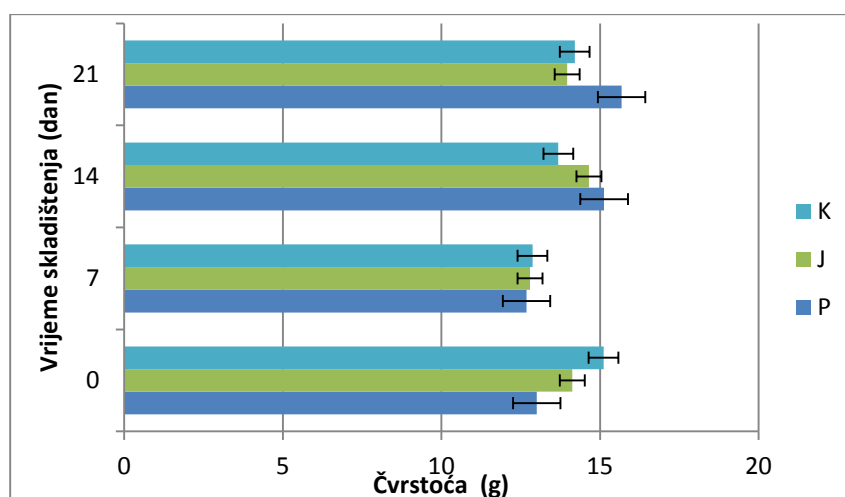
Tabela 40. Teksturalne karakteristike fermentisanih mliječnih proizvoda nakon proizvodnje prije homogenizacije

Uzorak	Čvrstoća (g)	Konzistencija (gs)	Kohezivnost (g)	Indeks viskoziteta (gs)
Jogurt	129,14±1,17	3396,17±2,26	-128,77±0,86	-307,32±0,61
Probiotski jogurt	130,74±1,25	3209,65±3,78	-122,77±0,85	-94,20±0,36
Kombuha FMN	71,27±0,99	1598,96±2,25	-51,38±1,25	-125,23±1,20

Sveobuhvatni rezultati teksture nakon proizvodnje, prije homogenizacije ukazuju na slabije teksturalne karakteristike kombuha fermentisanog mliječnog napitka. Iz rezultata prikazanih u tabeli 38 evidentno je da je čvrstoća uzoraka sa tradicionalnom i probiotskom starter kulturom prije homogenizacije približna, dok je kod kombuha fermentisanog mliječnog napitka, znatno manja što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Iličić i sar. 2013). Najveću vrijednost konzistencije imali su FMN sa konvencionalnom jogurtnom starter kulturom (3396,174gs), a najmanju sa kombuha starterom (1598,961gs). Najveća kohezivnost je takođe kod tradicionalnog jogurta -128,770g, a najmanja kod kombuha FMN -51,384 g, dok je indeks viskoziteta najveći kod tradicionalnog, a najmanji kod probiotskog jogurta. Rezultati čvrstoće i konzistencije probiotskog i kombuha fermentisanog mliječnog napitka su veći u poređenju sa rezultatima našeg tima publikovanih u radu Iličić i sar. 2013. Navedene razlike mogu se objasniti činjenicom da su u ovom radu (Iličić i sar. 2013) ispitivane teksturalne osobine fermentisanih mliječnih proizvoda dobijenih iz mlijeka sa nižim sadržajem mliječne masti (0,9%).

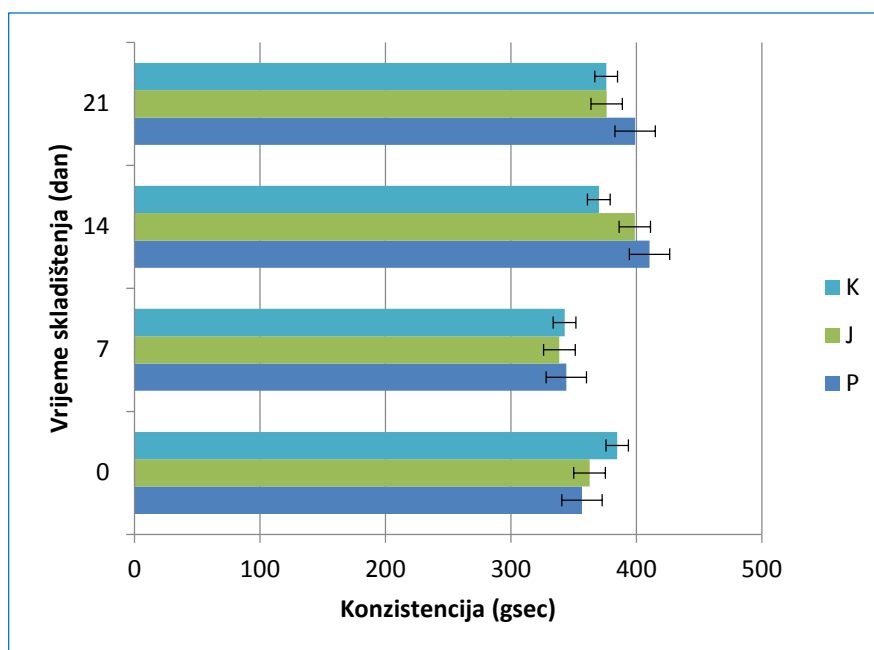
Teksturalne karakteristike fermentisanih mliječnih proizvoda nakon homogenizacije praćene tokom skladištenja prikazane su na slikama 39,40,41 i 42. Najveću čvrstoću (slika 39) nakon proizvodnje, posle homogenizacije ima kombuha FMN (15,11 g), a najmanju probiotski jogurt (13,01 g). Tokom skladištenja čvrstoća se znatno mijenja. Nakon 7 dana skladištenja čvrstoća se znatno smanjila, tako da je najveću čvrstoću i dalje imao kombuha

FMN, a najmanju probiotski jogurt. Nasuprot tome, nakon 14 dana čvrstoća se povećava u svim uzorcima kao posledica strukturnih promjena. Najveću čvrstoću nakon 14 dana skladištenja ima probiotski jogurt, a najmanju kombuha FMN. Ovaj trend razlika među uzorcima se zadržao i nakon 21 dana skladištenja. Rezultati ovih istraživanja su potvrda prethodno publikovanim rezultatima ispitivanja čvrstoće fermentisanih mliječnih napitaka dobijenih korišćenjem kombuha starter kulture za fermentaciju mlijeka sa 0,9 i 2,2% mliječne masti (Iličić i sar. 2013; Milanović i sar. 2013).



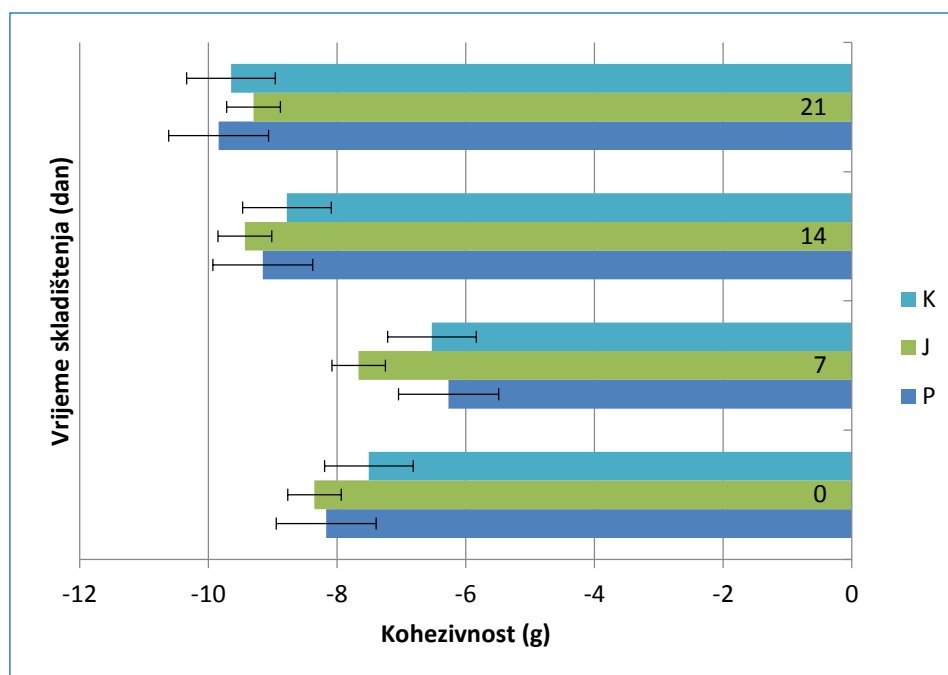
Slika 39. Promjena čvrstoće jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Vrijednost konzistencije ukazuje na gustinu proizvoda. Konzistencija tradicionalnog i probiotskog fermentisanog napitka posle homogenizacije je približno ista (slika 40), a kod kombuha FMN je veća za 6,5% u odnosu na prethodna dva uzorka. Nakon 7 dana skladištenja konzistencija svih varijanti fermentisanih mliječnih napitaka opada. Konzistencija probiotskog i tradicionalnog jogurta nakon 14 dana skladištenja se prosječno povećala za 15,5%, a kod kombuha FMN za 7,4%. Najveću vrijednost konzistencije nakon 14 dana skladištenja ima probiotski jogurt (410,457 gs), a najmanju kombuha FMN (370,049 gs). Na kraju perioda skladištenja najveću vrijednost konzistencije imao je probiotski jogurt (399,075g) dok su tradicionalni jogurt i kombuha FMN imali približno jednake vrijednosti konzistencije (376,239 i 375,963 g, redom).



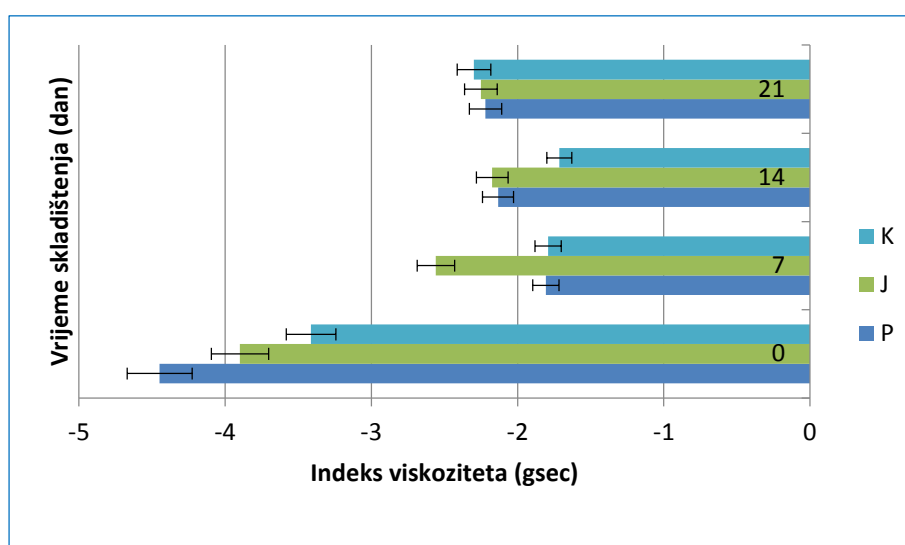
Slika 40. Promjena konzistencije jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Vrijednost kohezivnosti se predstavlja kao mjera unutrašnje sile otpora usled povlačenja djela mase uzorka pri povratnom kretanju mjernog diska u početni položaj, te je njena vrijednost negativna. Stoga uzorci sa manjom (negativnijom) vrijednosti imaju bolju (veću) kohezivnost. Sa slike 41 vidi se da je posle homogenizacije kohezivnost uzoraka najveća kod tradicionalnog jogurta, a najmanja kod kombuha FMN. Nakon 7 dana, kohezivnost se značajno smanjila kod probiotskog jogurta. Najveću kohezivnost imao je tradicionalni jogurt, a najmanju probiotski jogurt. Daljim skladištenjem do 21 dana kohezivnost se konstantno povećavala. Nakon predviđenog perioda skladištenja najveću kohezivnost imao je probiotski jogurt -9,8405 gsec, a potom slijede kombuha FMN -9,64888 i jogurt -9,29944.



Slika 41. Promjena kohezivnosti jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Kao i kohezivnost, primjenjenom metodom mjerenja, indeks viskoziteta kao pokazatelj sile kohezije analiziranog uzorka, predstavlja površinu u negativnom djelu grafika. Stoga se negativnije vrijednosti interpretiraju kao bolje vrijednosti indeksa viskoziteta, odnosno bolje kohezivne i viskozne osobine uzorka. Nakon proizvodnje, najveći indeks viskoziteta (slika 42.) ima probiotski jogurt, a najmanji kombuha FMN, što je u saglasnosti sa dobijenim reološkim vrijednostima viskoziteta pri promjenama brzine smicanja. Nakon 21 dan skladištenja sve varijante FMN imale su približne vrijednosti indeksa viskoziteta.



Slika 42. Promjena indeksa viskoziteta jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

Ovi rezultati su potvrda da se se korišćenjem kombuhe kao starter kulture za fermentaciju mlijeka sa 2,8% mliječne masti, dobija proizvod dobrih i stabilnih reoloških karakteristika.

PROMJENE SENZORNIH KARAKTERISTIKA TOKOM SKLADIŠTENJA

Analiza boje

Tristimulus kolorimetri su dizajnirani tako da reprodukuju fizičko-hemijsku osjetljivost ljudskog oka na boju mjereći razliku između standarda i uzorka. Prednost ovoga mjerenja boje prehrambenih proizvoda je u mogućnosti stalne i konstantne reprodukcije metode mjerenja boje. Shodno tome da je vizuelno određivanje boje podložno uticaju različitih faktora kao što je jačina svjetlosti, ugao posmatranja, upotreba ovih senzora koji koriste isti izvor svjetlosti, i način osvjetljenja, pruža mogućnost objektivnijeg i tačnijeg mjerenja. Pored senzorne evaluacije, boja svih uzoraka je analizirana CIE i CIE $L^* a^* b^*$ kolorimetrijskim sistemom boja. Iako postoji više sistema za definisanje boja, CIE je najpoznatiji preporučeni sistem, kojim se kvantifikuje boja u smislu tristimulusnih vrijednosti, koji su obračunati u CIE $L^* a^* b^*$ prostoru boja. L^* služi kao psihometrijska korelacija percepcije boje u rasponu od bele (100) do crne (0), koja se može opisati pomoću termina jake, umjerene i blijede, duž sive skale.

Na suprot senzornoj analizi, koja je više subjektivna metoda, analiza boje CIE i CIE $L^* a^* b^*$ sistemom, pokazala je značajne razlike između analiziranih uzoraka. Psihometrijska sjajnost (Y) uzoraka nakon proizvodnje kretala se od 63,51 % u K0 do 67,03 % u uzorku Y0 i značajno se mijenjala tokom skladištenja ($p < 0,05$). Raspon dominantnih talasnih dužina kretao se od $568,53 \pm 0,04$ u uzorku P0 do $571,72 \pm 0,01$ u uzorku K0, što ukazuje na sličnu hromatičnost. Vrijednosti dominantne talasne dužine $\lambda(\text{nm})$ u svim uzorcima bile su u rasponu 566-572nm, što na osnovu dijagrama hromatičnosti znači da se svi analizirani uzorci nalaze u istom, žutom, djelu spektra (tabela 41).

Tabela 41. Uticaj različite starter kulture na vrijednosti parametara boje u mlijeku (M) i fermentisanim mliječnim napicima: jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha FMN (K) prema CIE sistemu boja, tokom skladištenja

Uzorak	Y (%)				λ (nm)			
	1.dan	7.dan	14.dan	21. dan	1.dan	7.dan	14.dan	21.dan
M	66,08 ±0,04	-	-	-	566,57 ±0,03	-	-	-
P	66,91 ±0,018	67,46 ±0,05	66,98 ±0,04	66,88 ±0,04	569,19 ±0,03	568,53 ±0,04	569,79 ±0,01	569,86 ±0,01
Y	67,03 ±0,32	67,22 ±0,06	66,76 ±0,19	66,66 ±0,20	569,39 ±0,04	568,65 ±0,05	569,65 ±0,01	569,95 ±0,02
K	63,51 ±0,03	64,76 ±0,08	64,49 ±0,09	64,49 ±0,043	571,72 ±0,01	571,05 ±0,01	571,54 ±0,04	571,61 ±0,02

Analizom prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu vrijednost psihometrijske svijetlosti, L^* se nije značajno mijenjala tokom perioda skladištenja ali je bila značajno veća kod uzoraka sa jogurtom i probiotskom starter kulturom. Vrijednost psihometrijske nijanse, parametra a^* , koji označava opseg dominantnih talasnih dužina (analogna parametru λ u CIE sistemu) nakon proizvodnje u svim uzorcima je imala negativnu vrijednost, što ukazuje na dominantan udio zelene boje (tabela 42). Tokom perioda skladištenja raste udio crvene boje, pa se i vrijednost parametra a^* kreće u pozitivnim vrijednostima, sa blagim porastom tokom prvih 7 dana, a potom opada sa produžetkom perioda skladištenja. Na osnovu vrijednosti psihometrijske zasićenosti (hroma) parametra b^* evidentno je da u svim uzorcima dominira žuta nijansa sa blagim padom vrijednosti tokom skladištenja. Kombuha fermentisani mliječni napici imaju najveću vrijednost parametra b^* i najnižu vrijednost parametra a^* (psihometrijski ton), što je vjerovatno posledica boje inokuluma upotrebljenog za proces fermentacije.

Ukupna promjena boje ΔE , računata u odnosu na uzorak nakon proizvodnje odnosno prvog dana skladištenja, nije imala statistički značajne razlike kako između različitih vrsta uzoraka tako ni tokom skladištenja u istoj grupi napitaka. Nakon 21 dan skladištenja ukupna promjena boje iznosila je 0,412, 0,485 i 0,498 za jogurt, probiotski jogurt i kombuha FMN redom.

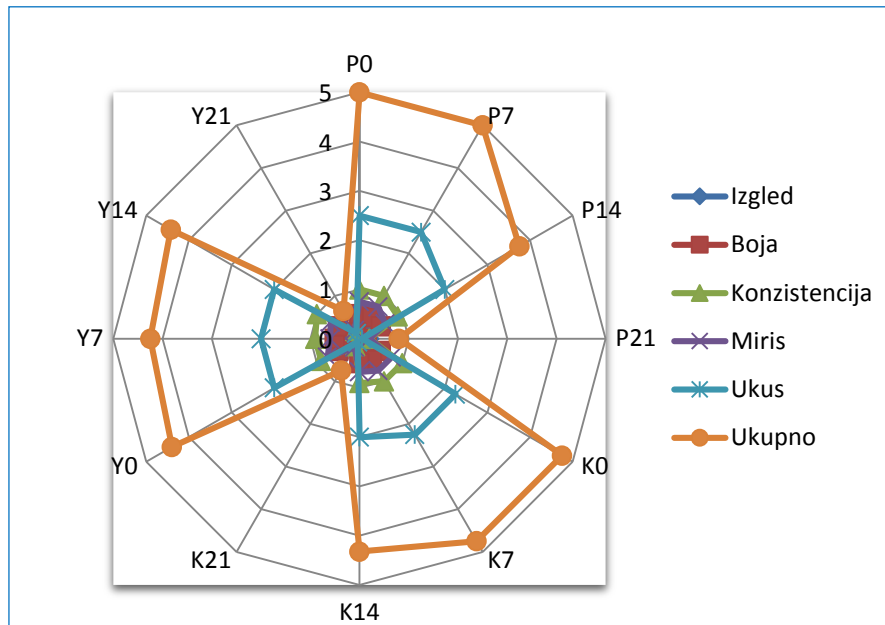
Table 42. Uticaj različite starter kulture na vrijednosti parametara boje u mlijeku (M) i fermentisanim mliječnim napicima: jogurtu (J), probiotskom jogurtu (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja prema CIE L* a* b* sistemu

Uzorak	L*				a*				b*			
	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
M	85,04 ±0,02	-	-		-3,3 ±0,02	-	-		5,86 ±0,03	-	-	
P	85,46 ±0,09	85,73 ±0,03	85,50 ±0,02	85,45 ±0,02	-2,94 ±0,02	-3,09 ±0,01	-2,67 ±0,01	-2,47 ±0,01	6,90 ±0,02	6,67 ±0,02	6,79 ±0,01	6,78 ±0,01
Y	85,52 ±0,17	85,62 ±0,03	85,38 ±0,02	85,28 ±0,01	-2,92 ±0,02	-3,00 ±0,02	-2,75 ±0,04	-2,65 ±0,02	7,03 ±0,02	6,58 ±0,02	6,85 ±0,02	6,83 ±0,03
K	83,71 ±0,17	84,36 ±0,04	84,22 ±0,01	84,20 ±0,01	-1,97 ±0,01	-2,21 ±0,02	-2,06 ±0,02	-2,06 ±0,06	7,09 ±0,02	6,93 ±0,02	7,12 ±0,01	7,11 ±0,02

Senzorna ocijena

Upotreba termina kvalitet sa aspekta senzorne analize prehrambenih proizvoda najčešće se povezuje sa bezbjednošću proizvoda, stvaranjem osjećaja zadovoljstva (izgled, boja, viskozitet/konzistencija/tekstura, miris i ukus) kod potrošača, tj. opšte prihvatljivosti-dopadljivosti proizvoda (Popov-Rajić 2013). Na slici 42 prikazane su kvalitativne osobine fermentisanih mliječnih proizvoda nakon proizvodnje i nakon 21 dana skladištenja. Prema dobijenim rezultatima deskriptivne senzorne ocjene ne postoji značajna razlika u izgledu, mirisu, ukusu i ukupnim senzornim osobinama fermentisanih mliječnih proizvoda nakon proizvodnje. Probiotski fermentisani mliječni napitak imao je homogenu konzistenciju bez grudvica sa izraženijom punoćom ukusa u poređenju sa kombuha FMN i jogurtom. Kombuha fermentisani mliječni napitak imao je karakterističan, prepoznatljiv blago kiseli, osvežavajući ukus i karakteristično naglašenu aromu, dok je tradicionalni jogurt imao karakterističan miris i ukus svojstven ovom tipu fermentisanih mliječnih napitaka. Tokom prvih 14 dana skladištenja kombuha starter je imao pozitivan uticaj na konzistenciju. U svim uzorcima boja i miris su tokom ovoga perioda bili nepromjenjeni, dok su ukus i miris dobili niže ocijene, prvenstveno zbog izraženih kiselih karakteristika. Nakon 21 dana skladištenja svi proizvodi imali su niže senzorne ocijene što je posledica šaržnog načina proizvodnje u laboratorijskim uslovima.

Rezultati senzorne evaluacije proizvoda takođe su potvrdili pozitivne efekte primjene kombuhe u dobijanju fermentisanog mliječnog napitka dobrih senzornih, fizičko-hemijskih, pa čak i boljih funkcionalnih karakteristika u poređenju sa fermentisanim mliječnim napicima dobijenim komercionalnim starter kulturama.



Slika 43. Senzorna analiza fermentisanih mliječnih proizvoda jogurta (J), probiotskog jogurta (P) i kombuha FMN (K) tokom skladištenja

5.ZAKLJUČCI

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

- Fermentacija mlijeka sa 2,8% mliječne masti primjenom 10% inokuluma kombuhe na temperaturi 42 °C trajala je 7 časova i 45 minuta, dok je dodatkom probiotske i jogurtne starter kulture ovaj proces znatno kraći i traje svega 4h. Nisu konstatovane statistički značajne razlike u sadržaju osnovnih komponenata fermentisanih mliječnih napitaka na različitim temperaturama fermentacije kao ni upotrebom različitih starter kultura .
- Tokom procesa skladištenja sadržaj kalcijuma natrijuma, kalijuma u uzorcima dobijenim primenom kombuhe i komercijalnih starter kultura opada.
- Najveći sadržaj vitamina C nakon proizvodnje i 14 dana skladištenja imali su uzorci sa kombuha starter kulturom ($0,546 \pm 0,017 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$), dok su uzorci sa probiotskom i tradicionalnom jogurnom starter kulturom sadržali $0,440 \pm 0,014 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$ i $0,408 \pm 0,013 \text{ mg}100\text{g}^{-1}$, redom.
- Proteinski profil dobijen metodom kapilarne elektroforeze pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promjenama udjela pojedinačnih proteinskih frakcija tokom procesa fermentacije mlijeka primjenom kombuhe kao i komercijalnih starter kultura. Trend promjena pojedinačnih frakcija je u skladu sa rezultatima stepena proteolize dobijenih primjenom TCA metode. Tokom perioda od 21 dana skladištenja brža postacidifikacija i veći stepen proteolize zabilježen je u uzorcima dobijenim upotrebom probiotske, nego u uzorcima dobijenim korišćenjem kombuha i jogurtne starter kulture.
- Tokom fermentacije u svim varijantama fermentisanih mliječnih napitaka palmitinska kiselina je dominantna zasićena masna kiselina sa maksimalnim sadržajem od 31,73% u jogurtu, 32,70% u probiotskom jogurtu i 33,28% u kombuha fermentisanom mliječnom napitku, dok je oleinska kiselina najzastupljenija nezasićena masna kiselina sa maksimalnim vrijednostima od 27,30%, 26,89% i 25,80%, u jogurtu, probiotskom jogurtu i kombuha napitku, redom. Tokom skladištenja u kombuha fermentisanom mliječnom napitku kao i napicima dobijenim sa jogurnom i probiotskom starter kulturom dolazi do porasta zasićenih i opadanja mono- i poli- nezasićenih masnih

kiselina. Dominantne su kiseline dugog lanca sa ukupnim udjelom oko 45%, čiji se sastav značajno ne mijenja tokom 21 dan skladištenja.

- Biogeni amini: triptamin, feniletilamin, putrescin, kadaverin, histamin, serotonin, tiramin, spermidin i spermin nisu detektovani tokom skladištenja ni u jednoj grupi proizvedenih napitaka. Dobijeni rezultati su dodatni pokazatelj kvaliteta fermentisanih mliječnih proizvoda, s obzirom da se sadržaj biogenih amina može koristiti kao indikator bezbjednosti proizvoda.
- Različite starter kulture utiču na različitu AKE inhibitornu aktivnost tokom skladištenja što ukazuje na različitu proteolitičku aktivnost starter kultura i njihovu sposobnost da hidrolizom proteina mlijeka proizvode širok spektar različitih funkcionalnih peptida, a između ostalih i onih sa AKE inhibitornom aktivnosti. Neposredno nakon proizvodnje, AKE inhibitorna aktivnost kombuha fermentisanog mliječnog napitka je značajno manja ($46,27 \pm 0,69$ %; $p < 0,05$) u poređenju sa jogurtom i probiotskim jogurtom ($48,48 \pm 0,72$ o $51,70 \pm 1,03$ %, redom). U svim uzorcima, analizirana inhibitorna aktivnost raste tokom 14 dana skladištenja, pri čemu uzorci proizvedeni primjenom kombuhe imaju najveću AKE inhibitornu aktivnost - 79,4%, dok su u jogurtu i probiotskom jogurtu te vrijednosti iznosile 63,4 i 64,6%, redom.
- Antioksidativna aktivnost (AA) odnosno sposobnost hvatanja slobodnih radikala, vodenih ekstrakata fermentisanih mliječnih napitaka, ispitana je na ABTS⁺ i DPPH radikale. Obe analize ukazuju na mogućnost supstrata da donira elektrone ili H atome u slobodnoradikalnim reakcijama. Kombuha fermentisani mliječni napitak je imao značajno veću ($p \leq 0,05$) antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom nakon proizvodnje ($17,88 \pm 0,17$ %) u odnosu na jogurt i probiotski jogurt ($9,46 \pm 0,3$ i $13,23 \pm 0,04$ %, redom). Kombuha starter kultura povećava sposobnost napitka da stabilizuje DPPH radikale tokom skladištenja najvećim djelom zahvaljujući sopstvenom antioksidativnom kapacitetu. Najveći antioksidativni potencijal metodom ABTS⁺ slobodno radikalne inhibicije imali su uzorci sa jogurnom starter kulturom nakon 21 dana skladištenja (TEAC vrijednost $8,92 \text{ mmolmg}^{-1}$). Dobijeni rezultati antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih napitaka mjerene ABTS⁺ i DPPH testom ukazuju na značajan uticaj upotrebljene starter kulture. Nepostojanje korelacije između antioksidativne aktivnosti i stepena proteolize ukazuje na to da bioaktivni peptidi nisu jedini nosioci ukupne ispitivane antioksidativne aktivnosti, ili se pak ne nalaze u koncentracijama u kojima bi imali značajniji uticaj na AA ispitivanih ekstrakata. Ovi rezultati takođe ukazuju na veću adekvatnost ABTS⁺ metode za

mijerenje antioksidativne aktivnosti fermentisanih mliječnih napitaka u odnosu na DPPH metodu.

- Reološke i teksturalne karakteristike uzoraka u korelaciji su sa rezultatima senzorne analize.
- Rezultati instrumentalnog određivanja boje ukazuju na statistički značajan ($p \leq 0,05$) uticaj kombinacije faktora starter kultura i vrijeme skladištenja na parametre boje. Instrumentalnom analizom boje prema CIE $L^*a^*b^*$ sistemu vrijednost psihometrijske svijetlosti, L^* se nije značajno mijenjala tokom perioda skladištenja, ali je bila značajno veća kod uzoraka sa jogurnom i probiotskom starter kulturom, dok vrijednosti psihometrijske zasićenosti (hroma) parametra b^* ukazuju na dominantnost žute nijanse u svim uzorcima. Nakon 21 dan skladištenja ukupna promjena boje iznosila je 0,412, 0,485 i 0,498 za jogurt, probiotski jogurt i kombuha fermentisanog mliječnog napitka, redom.
- .
- Na osnovu dobijenih rezultata biološke aktivnosti i promijena kvaliteta kombuha fermentisanog mliječnog napitka tokom skladištenja, u odnosu na karakteristike proizvoda dobijenih upotrebom konvencionalnih starter kultura može se objasniti opravdanost upotrebe kombuha starter kulture u fermentaciji mlijeka sa ciljem dobijanja novog funkcionalnog fermentisanog mliječnog proizvoda visokog sadržaja bioaktivnih komponenata, karakterističnih nutritivnih, reoloških i senzornih osobina.

6. LITERATURA

1. Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 81(12): 3131-3138.
2. Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F., Ehlers, M. R. (2003). Ace revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2(11): 891-902.
3. Amirdivani, S., Baba, A. S. (2011). Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT - Food Sci Tech* 44(6): 1458-1464.
4. Andallu, B., Shankaran, M., Ullagaddi, R., Allagadda, V. K. (2011). Efficacy of curry (*Murraya koenigii*) leaves in scavenging free radicals in vitro and controlling oxidative stress in vivo. *Biomed Prev Nutri* 1(4): 263-267.
5. Ashar, M. N., Chand, R. (2004). Fermented milk containing ACE inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, 59: 363–366.
6. Ashwell, M. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. *Public Health Nutr* 4(3): 859-862.
7. Bal dit Sollier, C., Drouet, L., Pignaud, G., Chevallier, C., Caen, J., Fiat, A. M., Izquierdo, C. i sar. (1996). Effect of kappa-casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea-pig. *Thromb Res* 81(4): 427-437.
8. Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT - Food Sci Tech* 47(1): 71-77.
9. Beermann, C., Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct* 4 (2): 185-199.
10. Belem, M. A., Gibbs, B. F., Lee, B. H. (1999). Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J Dairy Sci* 82(3): 486-493.
11. Bellosa–Morales, G., Hernandez–Sanches, H. (2003). Manufacture of a beverage from cheese whey using a tea fungus fermentation. *Rev Latinoam Microbiol* 45(1-2): 5-11.
12. Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P. C. (2011). Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via

- suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology* 18(3): 221-234.
13. Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P. C. (2013). Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 60: 328-340.
 14. Bhattacharya, S., Manna, P., Gachhui, R., Sil, P. C. (2011). Protective effect of kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. *Indian J Exp Biol* 49(7): 511-524.
 15. Blanc, P. J. (1996). Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotech Lett* 18(2): 139-142.
 16. Brezo, T. Ž., Kravić, S. Ž., Suturović, Z. J., Karišik-Đurović, A. D., Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Milanović, S. D. (2011). Influence of kombucha inoculum on the fatty acid composition of fermented milk products. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi* 22: 21-24.
 17. Businco, L., Giampietro, P. G., Lucenti, P., Lucaroni, F., Pini, C., Di Felice, G., Iacovacci, P. i sar. (2000). Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 105(5): 1031-1034.
 18. Carić, M. (1997). Savremeni razvoj tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda, Jugoslovenski mlekarSKI simpozijum: 26-55.
 19. Carić, M., Milanović, S. (1997). *Topljeni sir*, IP Nauka, Beograd.
 20. Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D. (2000). Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Novi Sad Prometej.
 21. Cetojevic-Simin, D. D., Bogdanovic, G. M., Cvetkovic, D. D., Velicanski, A. S. (2008). Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. *J Buon* 13(3): 395-401.
 22. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3): 527-605.
 23. Chandan, C., Kilara, A. (2013). *Manufacturing yogurt and fermented milks*, Wiley-Blackwell.
 24. Chang, C.-Y., Wu, K.-C., Chiang, S.-H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem* 100(4): 1537-1543.
 25. Chen, C., Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* 89(5): 834-839.

26. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem* 46(1): 49-53.
27. Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., Grazia, L. (2005). Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Le Lait* 85(6): 481-490.
28. Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1-4): 217-246.
29. Chu, S.-C., Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chem* 98(3): 502-507.
30. Cifelli, C. J., German, J. B., O'Donnell, J. A. (2011). Nutrition and Health | Nutritional and Health-Promoting Properties of Dairy Products: Contribution of Dairy Foods to Nutrient Intake. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 1003-1008.
31. Conney, A. H., Lu, Y. P., Lou, Y. R., Huang, M. T. (2002). Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2: S28-36.
32. Considine, T., Healy, A., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H. (2000). Proteolytic specificity of elastase on bovine α_{s1} -casein. *Food Chem* 69(1): 19-26.
33. Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J* 19(10): 566-573.
34. Coşkun, H., Ondül, E. (2004). Free fatty acid accumulation by mesophilic lactic acid bacteria in cold-stored milk. *J Microbiol (Seoul, Korea)* 42(2): 133-138.
35. Costa, E. L., Almeida, A. R., Netto, F. M., Gontijo, J. A. R. (2005). Effect of intraperitoneally administered hydrolyzed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 38: 1817-1824.
36. Čanadanović-Brunet, J. M. (1997). Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Doktorska teza.

37. de la Fuente, M. A., Montes, F., Guerrero, G., Juárez, M. (2003). Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yoghurts. *Food Chem* 80(4): 573-578.
38. Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., Van Camp, J. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int Dairy J* 18(5): 436-457.
39. Diaz, M., Decker, E. A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J Agric Food Chem* 52(26): 8208-8213.
40. Dionysius, D. A., Milne, J. M. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J Dairy Sci* 80(4): 667-674.
41. Diplock, A. T., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., Roberfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional food science in Europe: Consensus document. *Brit J Nutri* 1: 1-28.
42. Dipti, P., Yogesh, B., Kain, A. K., Pauline, T., Anju, B., Sairam, M., Singh, B. i sar. (2003). Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea. *Biomed Environ Sci* 16(3): 276-282.
43. do Espirito Santo, A. P., Silva, R. C., Soares, F. A. S. M., Anjos, D., Gioielli, L. A., Oliveira, M. N. (2010). Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. *Int Dairy J* 20(6): 415-422.
44. Dutta, D., Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 8): 1899-1903.
45. Đorđević, J. (1982). Mleko – hemija i fizika mleka. 1-59.
46. Ebringer, L., Ferenčík, M., Krajčovič, J. (2008). Beneficial health effects of milk and fermented dairy products—review. *Folia microbiologica* 53(5): 378-394.
47. Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E., T., H. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J AOAC Int* 76: 575-577.
48. Ekinci, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B., Guzel-Seydim, Z. (2008). Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *Eur J Lipid Sci Tech* 110 (3): 216-224.
49. El-Salam, S. S. A. (2012). 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea kombucha. *New York Sci. J.* 5: 55-61.
50. Eskin, N. A. M., Shahidi, F. (2012). *Biochemistry of foods*, Academic Press.

51. Farrell, H. M. (2011). Milk Proteins | Casein Nomenclature, Structure, and Association. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 765-771.
52. Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2–Characterisation of peptide fractions. *Food Chem* 123(4): 1090-1097.
53. FitzGerald, R. J., Murray, B. A., Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134(4): 980S-988S.
54. Foltz, M., Meynen, E. E., Bianco, V., van Platerink, C., Koning, T. M., Kloek, J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J Nutri* 137(4): 953-958.
55. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*, Springer Science & Business Media.
56. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (2007). *Advanced Dairy Chemistry Volume 2: Lipids*, Springer US.
57. Frank, G. W. (1995). *Das Teepilz-Getränk*, Ennsthaler Verlag, A-4402 Steyr.
58. Fuglsang, A., Nilsson, D., Nyborg, N. C. (2002). Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3566-3569.
59. Fujita, H., Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 44(1-2): 123-127.
60. Geerlings, A., Villar, I. C., Hidalgo Zarco, F., Sanchez, M., Vera, R., Zafra Gomez, A., Boza, J. i sar. (2006). Identification and characterization of novel angiotensin-converting enzyme inhibitors obtained from goat milk. *J Dairy Sci* 89(9): 3326-3335.
61. Gilliland, S. E. (1993). Properties of Yoghurt. *Therapeutic Properties of fermented Milks*. R. K. Robinson. New York, Elsevier Applied Science: 65-80.
62. Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol* 66(9): 3898-3904.

63. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int J Dairy Tech* 57(2-3): 173-188.
64. Gonzalez-Gonzalez, C., Gibson, T., Jauregi, P. (2013). Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. *Int J Food Microbiol* 167(2): 131-137.
65. Gregurek, L., Tonković, K. (2008). Jogurt-potrošnja i trendovi. *Prehrambena industrija-mleko i mlečni proizvodi* 19: 7-9.
66. Gutierrez, A. M. (2014). Effects of lipid oxidation initiators and antioxidants on the total antioxidant capacity of milk and oxidation products during storage, Iowa State University. Master of Science.
67. Swaisgood H.E, (1986). Chemistry of milk protein. Developments in dairy chemistry. P. Fox, F., Elsevier Applied Science Publisher, London.
68. Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Tech*5(2): 42-49.
69. Hall iii, C. (2001). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. *Antioxidants in Food*. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, Woodhead Publishing: 159-209.
70. Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32(3): 125-130.
71. Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 64(5): 767-771.
72. Haukland, H. H., Vorland, L. H. (2001). Post-antibiotic effect of the antimicrobial peptide lactoferricin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 48(4): 569-571.
73. Havemose, M. S., Weisbjerg, M. R., Bredie, W. L. P., Nielsen, J. H. (2004). Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *Int Dairy J* 14(7): 563-570.
74. Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 52(6): 1504-1510.
75. Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 53(3): 588-593.

76. Hesseltine, C. W. (1965). A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia*: 149-197.
77. Hirota, T., Ohki, K., Kawagishi, R., Kajimoto, Y., Mizuno, S., Nakamura, Y., Kitakaze, M. (2007). Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res* 30(6): 489-496.
78. Hugenholtz, J. (2013). Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol* 24(2): 155-159.
79. ISO6731:2010- IDF21:2010 Milk, cream and evaporated milk. Determination of the total solids content (Reference Method). Brussels, Belgium
80. IDF 90:1979. Rennet caseins and caseinates – Determination of ash (Reference method). Brussels, Belgium
81. Iličić, M. (2010). Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog mlečnog napitka. Novi Sad, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu. Doktorska disertacija.
82. Iličić, M., Kanurić, K., Milanović, S., Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R. (2012). Lactose fermentation by Kombucha—a process to obtain new milk-based beverages. *Rom Biotech Lett* 17(1): 7013-7021.
83. Iličić, M. D., Milanović, S. D., Carić, M. Đ., Vukić, V. R., Kanurić, K. G., Ranogajec, M. I., Hrnjez, D. V. (2013). The Effect of Transglutaminase on Rheology and Texture of Fermented Milk Products. *J Text Stud* 44(2): 160-168.
84. Ioannides, C., Yoxall, V. (2003). Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(6): 649-656.
85. Jacob, M., Nöbel, S., Jaros, D., Rohm, H. (2011). Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloid* 25(5): 928-934.
86. Jäkälä, P., Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals* 3(1): 251-272.
87. Jayabalan, R., Chen, P.-N., Hsieh, Y.-S., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S., Thangaraj, P. i sar. (2011). Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells-- Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian J Biotech* 10(1): 75-82.

88. Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Compr Rev Food Sci F* 13(4): 538-550.
89. Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* 102(1): 392-398.
90. Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* 109(1): 227-234.
91. Jean-Marc, C., Khaled, E.-Z., Mahmoud, S., Michèle, D., François, M., Yvan, C., Thomas, H. (2005). Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine β -lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait* 85(3): 141-152.
92. Jha, A., Mishra, V. K., Mohammad, G. (2008). Immunomodulation and anticancer potentials of yogurt probiotic. *EXCLI Journal* 7:177-184
93. Kanurić, K. (2014). Promene komponenata i strukture mleka tokom fermentacije dodatkom nekonvencionalnog startera, Tehnološki fakultet Novi Sad.
94. Kanurić, K., Hrnjez, D., Ranogajec, M., Milanović, S., Iličić, M., Vukić, V., Milanović, M. (2011). The effect of fermentation temperature on the functional dairy product quality. *Acta Periodica Technologica* 42: 63-70.
95. Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., Phillips, G. O., Fang, Y., Al-Assaf, S., Nishinari, K., Farhoosh, R. (2009). Rheological properties of *Lepidium sativum* seed extract as a function of concentration, temperature and time. *Food Hydrocolloids* 23(8): 2062-2068.
96. Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 83(2): 255-263.
97. Kitts, D. D., Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 9(16): 1309-1323.
98. Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004). Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci* 87(4): 785-796.
99. Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Func Foods* 1(2): 177-187.

100. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* 16(9): 945-960.
101. Korpela, R., Peuhkuri, K., Lahteenmaki, T., Sievi, E., Saxelin, M., Vapaatalo, H. (1997). *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft* 52(9): 503-505.
102. Kravić, S. (2010). Određivanje transmasnih kiselina u prehrambenim proizvodima gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom, Tehnološki fakultet, Novi Sad. Doktorska disertacija.
103. Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., Oki, T. (2001). Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *J Jap Soci Food Sci Tech* 48(1): 44-50.
104. Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol* 72(3): 215-224.
105. Kwak, N. S. a., Jukes, D. J. (2001). Functional Foods. Part 1: The Development of a Regulatory Concept. *Food Control* 12: 99-107.
106. Ladero, V., Cañedo, E., Pérez, M., Martín, M. C., Fernández, M., Alvarez, M. A. (2012). Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine-producing lactic acid bacteria in dairy products. *Food Control* 27(2): 307-313.
107. Laffineur, E., Genetet, N., Leonil, J. (1996). Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 79(12): 2112-2120.
108. Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., Fernández, M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Crit Rev Food Sci Nutri* 51(7): 691-703.
109. Lindmark-Månsson, H., Åkesson, B. (2000). Antioxidative Factors in Milk. *Brit J Nutri* 84(S1): 101-110.
110. Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L. J., Klačnja, M. (2006). Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. *Food Bioprod Process* 84(3): 186-192.
111. Lončar E., Kanurić K., Malbaša R., Đurić M., S., M. (2013). Kinetics Of Saccharose Fermentation By Kombucha. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 20: 345-352.
112. Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N. i sar. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the

- biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chem* 125(2): 355-368.
113. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
114. Lucey, J. A. (2002). ADSA Foundation Scholar Award. Formation and physical properties of milk protein gels. *J Dairy Sci* 85(2): 281-294.
115. Tratnik LJ., Božanić, R. (2012). *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
116. Roussin M.R. (1996). *Analyses of Kombucha ferments: report of growers*. Information Resources, LC, Salt Lake City, Utah.
117. Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 79(8): 1316-1321.
118. Malbaša, R. (2009). *Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe*. Tehnološki fakultet, Novi Sad: 93.
119. Malbaša, R. V., Milanović, S. D., Lončar, E. S., Djurić, M. S., Carić, M. Đ., Iličić, M. D., Kolarov, L. (2009). Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chem* 112(1): 178-184.
120. Markov, S., Cvetković, D., Velićanski, A. (2012). The availability of lactosemedium for tea fungus culture and kombucha fermentation. *Arch Biol Sci, Belgrade* 64(4): 1439-1447.
121. Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* 38: 171-178.
122. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., Suzuki, H. (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agri Biological Chem* 49(5): 1405-1409.
123. Maruyama, S., Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agri Biological Chem* 46(5): 1393-1394.
124. Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C. i sar. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461(7268): 1282-1286.
125. Masuda, O., Nakamura, Y., Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutri* 126(12): 3063-3068.

126. Matar, C., Amiot, J., Savoie, L., Goulet, J. (1996). The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. *J Dairy Sci* 79(6): 971-979.
127. Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Inter Dairy J* 12(2-3): 173-182.
128. Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr Med Chem* 12(16): 1905-1919.
129. Meisel, H., FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* 9(16): 1289-1295.
130. Mensink, R. P. (2005). Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in humans. *Lipids* 40(12): 1201-1205.
131. Miguel, M., Muguera, B., Sanchez, E., Delgado, M. A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M. A. (2005). Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br J Nutr* 94(1): 36-43.
132. Milanović, S., Carić, M., Lončar, E., Panić, M., Malbaša, R., Dobrić, D. (2002). Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi* 13(2): 8-13.
133. Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V., Hrnjez, D., Iličić, M., Ranogajec, M., Milanović, M. (2012). Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. *African J Biotech* 11: 2320-2327.
134. Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Malbaša, R., Tekić, N., Iličić, M., Duraković, K. (2008). Low energy kombucha fermented milk-based beverages. *Acta Periodica Technologica* 40: 47-53.
135. Milanović, S. D., Iličić, M. D., Ranogajec, M. I., Hrnjez, D. V., Vukić, V. R., Kanurić, K. G. (2013). The influence of a selected starter culture on the quality of fermented dairy beverages during storage. *Prehrambena industrija-mleko i mlečni proizvodi* 24(1): 23-28.
136. Minervini, F., Bilancia, M. T., Siragusa, S., Gobbetti, M., Caponio, F. (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiol* 26(6): 559-564.
137. Miočinović, J., Trung Le, T., Fredrick, E., Dewettnick, K., Puđa, P. (2010). Metode izolacije i tehnološki aspekti membrana masnih globula. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 21: 28-34.

138. Mizuno, S., Matsuura, K., Gotou, T., Nishimura, S., Kajimoto, O., Yabune, M., Kajimoto, Y. i sar. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr* 94(1): 84-91.
139. Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., Yamamoto, N. (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J Dairy Sci* 87(10): 3183-3188.
140. Mizushima, S., Ohshige, K., Watanabe, J., Kimura, M., Kadowaki, T., Nakamura, Y., Tochikubo, O. i sar. (2004). Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens* 17(8): 701-706.
141. Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 47(4): 171-182.
142. Morales, F. J., Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chem* 72: 119-125.
143. Nakamura, Y., Masuda, O., Takano, T. (1996). Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 60(3): 488-489.
144. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci* 78(6): 1253-1257.
145. Ng-Kwai-Hang, K. F. (2011). Milk Proteins | Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 751-764.
146. Nielsen, M. S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K. I., Otte, J. (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Inter Dairy J* 19(3): 155-165.
147. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 668-676.
148. Oberman, H. (1985). Fermented milks. *Microbiology of Fermented Foods*. Wood B.J.B., Elsevier Applied Science Publishers London. 1: 167-195.

149. Ong, L., Henriksson, A., Shah, N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait* 87(2): 149-165.
150. Pan, D., Luo, Y., Tanokura, M. (2005). Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chem* 91(1): 123-129.
151. Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A.-M., Malcata, F. X., Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem* 105(2): 647-656.
152. Park, A. M., Dong, Z. (2003). Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol* 36(1): 66-77.
153. Parodi, P. W. (2007). A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr Pharm Des* 13(8): 813-828.
154. Patton, S., Jensen, R. G. (1975). Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Prog Chem Fats Other Lipids* 14(4): 163-277.
155. Persichetti, E., De Michele, A., Codini, M., Traina, G. (2014). Antioxidative capacity of *Lactobacillus fermentum* LF31 evaluated in vitro by oxygen radical absorbance capacity assay. *Nutrition* 30(7-8): 936-938.
156. Petrović S, L. E., Ružić N, Kolarov Lj. (1995). Nutritive characteristics of tea fungus metabolites. *Preceedings* 26-27,: 257-269.
157. Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharm Therap* 22(6): 495-512.
158. Pihlanto-Leppala A, Rokka T, H., K. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Inter Dairy J* 8: 325-331.
159. Piletić, M. V., Milić, B. L., Đilas, S. M. (1993). *Organska hemija II deo*. Prometej, Novi Sad, .
160. Popov-Rajić, J. (2013). *Senzorna analiza hrane i pića*.
161. *Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura* (2010): Službeni glasnik Republike Srbije, broj 33/2010 i 69/2010.
162. Power, O., Jakeman, P., FitzGerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential

- applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids* 44(3): 797-820.
163. Qian, Z. J., Jung, W. K., Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresour Technol* 99(6): 1690-1698.
164. Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J Dairy Sci* 88(10): 3480-3487.
165. Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001). *Senzorna analiza prehrambenih proizvoda.*, Poljoprivredni fakultet, Beograd i Tehnološki fakultet, Novi Sad.
166. Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y., Kim, S.-K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Inter* 38(2): 175-182.
167. Ravula, R., Shah, N. (1998). Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts *Australian J Dairy Tech* 53: 175-179.
168. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1231-1237.
169. Reiss, J. (1987). The tea fungus and its metabolites. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (Germany, FR).
170. Reiss, J. (1994). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 198(3): 258-261.
171. Rival, S. G., Boeriu, C. G., Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 49(1): 295-302.
172. Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* 88 Suppl 2: S133-138.
173. Robert, M. C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M. A. (2004). Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J Agric Food Chem* 52(23): 6923-6931.
174. Rokka, T., Syvaöja, E.-L., Tuominen, J., Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT-milk. *Milchwissenschaft* 52: 675-678.

175. Sah, B. N., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chem* 156: 264-270.
176. Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci* 83(7): 1434-1440.
177. Santillo, A., Kelly, A. L., Palermo, C., Sevi, A., Albenzio, M. (2009). Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. *Inter Dairy J* 19(11): 655-660.
178. Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 77(2): 326-330.
179. Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Kritikos, G., Tourianis, A. (2013). Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *Jof Food Comp Analysis* 31(1): 24-30.
180. Shah, N., Ravula, R. (2001). Freezing conditions frozen out. *Dairy Ind Inter*: 1-7.
181. Shah, N. P., Bhullar, Y. S., Uddin, M. A. (2002). Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. *Milchwissenschaft* 57(6): 328.
182. Shah, N. P., Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait* 87(1): 21.
183. Shori, A. B., Baba, A. S. (2013). Antioxidant activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by *Azadirachta indica*-yogurt. *J Saudi Chem Soc* 17(3): 295-301.
184. Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B., Wechsler, D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Sci Techn* 90(1): 47-73.
185. SRPS EN ISO 8968-1:2008 Mleko - Određivanje sadržaja azota - Deo 1: Metoda po Kjeldalu
186. SRPS ISO 488:2013 Određivanje sadržaja masti — Butirometri po Gerberu
187. SRPS ISO 13580:2008 Određivanje sadržaja ukupne suve materije (Referentna metoda)
188. Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., Teuber, M. (1995). Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained

- from a tea fungus fermentation. *Systematic and applied microbiology* 18(4): 590-594.
189. Simpson, G. R., Blay, R. A. (1966). Rapid method for determination of metals cooper, zinc, tin, iron and calcium in foodstuffs by atomic absorption. *Food Trade Review* 36: 35.
 190. Sipola, M., Finckenberg, P., Santisteban, J., Korpela, R., Vapaatalo, H., Nurminen, M. L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 52(4 Pt 2): 745-754.
 191. Slocum, S. A., Jasinski, E. M., Kilara, A. (1988). Processing Variables Affecting Proteolysis in Yogurt During Incubation. *J Dairy Sci* 71(3): 596-603.
 192. Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J Dairy Sci* 88(7): 2289-2294.
 193. Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000). Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 48(6): 2589-2594.
 194. Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2001). Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotech* 21(1): 49-56.
 195. Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., Satyanarayana, U. (2013). Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomed Prev Nutri* 3(1): 53-58.
 196. Stamatova, I., Meurman, J. H. (2009). Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent* 22(6): 329-338.
 197. Streiger, K. E., Steinegger, E. (1957). Uber den Teepilz. *Pharm Acta Helv.* 32: 133- 154.
 198. Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem* 11(3): 128-131.
 199. Surono, I. S., Hosono, A. (2011). Fermented Milks | Types and Standards of Identity. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 470-476.
 200. Surono, S., Hosono, A. (2011). Fermented Milks | Starter Cultures. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 477-482.

201. Takano, T. (2002). Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1-4): 333-340.
202. Takano, T., Yamamoto, N. (2002). Fermented Milks | Health Effects of Fermented Milks. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. J. W. Fuquay. San Diego, Academic Press: 483-488.
203. Tamime, A. Y. (2006). *Fermented Milks*, Wiley.
204. Tamime, A. Y. (2007). *Structure of Dairy Products*, Wiley.
205. Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology*, CRC Press.
206. Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2004): *Yoghurt, Science and Technology*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, p.619.
207. Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology*, Elsevier Science.
208. Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., Chen, J. (2009). Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 58(1): 587-593.
209. Tasić, T. (2012). Formiranje biogenih amina u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici (Petrovska klobasa) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta, Univerzitet u Novom Sadu Tehnološki fakultet, Novi Sad. Doktorska disertacija.
210. Teschemacher, H., Koch, G., Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43(2): 99-117.
211. Tidona, F., Criscione, A., Guastella, M., Zuccaro, A., Bordonaro, S., Marletta, D. (2009). Bioactive peptides in dairy products. *Italian J Animal Sci* 3: 1003-1009.
212. Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D., Vegarud, G. E. (2011). Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Inter Dairy J* 21(3): 158-165.
213. Tratnik, Lj. Božanić, R., (2012). *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mlijeckarska udruga, Zagreb.
214. Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. (2011). *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydrate Polymers* 86(3): 1417-1420.

215. Tumbas, V. (2005). Antioksidativna i biološka aktivnost ekstrakata biljaka iz familije Laminaceae. Novi Sad., Tehnološki fakultet, Novi Sad. Magistarski rad.
216. Udenigwe, C. C., Mohan, A. (2014). Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *J Func Foods* 8(0): 45-52.
217. Ulvatne, H., Samuelsen, O., Haukland, H. H., Kramer, M., Vorland, L. H. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 237(2): 377-384.
218. Unal, G. (2012). Antioxidant activity of commercial dairy products. *AgroFOOD industry hi-tech* 23(1): 39-41.
219. Urista, C. M., Fernández, R. Á., Rodriguez, F. R., Cuenca, A. A., Jurado, A. T. (2011). Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci Technol Inter* 17(4): 293-317.
220. Urso, M. L., Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189(1): 41-54.
221. van der Zander, K., Jakel, M., Bianco, V., Koning, M. M. (2008). Fermented lactotripeptides-containing milk lowers daytime blood pressure in high normal-to-mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 22(11): 804-806.
222. Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 92(3): 357-366.
223. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 102(1): 106-115.
224. Vitas, J. S. (2013). Antioksidativna aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet. Doktorska disertacija.
225. Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Grahovac, J. A., Lončar, E. S. (2013). The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chem Industry Chem Engin Quarterly* 19(1): 129-139.
226. Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Kravić, S. Ž., Milanović, S. D. (2011). Masne kiseline u mlečnim proizvodima dobijenim pomoću kombuhe kultivisane na rtanjskom čaju. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi* 22: 25-28.

227. Vukic, V. R., Hrnjez, D. V., Kanuric, K. G., Milanovic, S. D., Iličić, M. D., Torbica, A. M., Tomic, J. M. (2014). The effect of kombucha starter culture on the gelation process, microstructure and rheological properties during milk fermentation. *J Texture Studi* 45(4): 261-273.
228. Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. A., MacDonald, J., Pentzien, A. K., Wright, G. A., Wal, J. M. i sar. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin beta-lactoglobulin fragment (142-148). *J Dairy Sci* 87(11): 3845-3857.
229. Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S., Tan, H. (2010). Determination of D-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(3-4): 371-374.
230. Wu, W., Gai, B.-c., Ji, B.-p. (2004). Study on the Isolation and Identification of Microbes of Kombucha [J]. *Food Sci* 4: 010.
231. Xu, S., Boylston, T. D., Glatz, B. A. (2005). Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *J Agric Food Chem* 53(23): 9064-9072.
232. Yadav, H., Jain, S., Sinha, P. R. (2007). Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *Inter Dairy J* 17: 1006-1010.
233. Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem* 61(8): 1244-1251.
234. Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 77(4): 917-922.
235. Yamamoto, N., Ejiri, M., Mizuno, S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Curr Pharm Des* 9(16): 1345-1355.
236. Yamamoto, N., Takano, T. (1999). Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung* 43: 159-164.
237. Yang, M. C., Chen, N. C., Chen, C. J., Wu, C. Y., Mao, S. J. (2009). Evidence for beta-lactoglobulin involvement in vitamin D transport in vivo--role of the gamma-turn (Leu-Pro-Met) of beta-lactoglobulin in vitamin D binding. *FEBS J* 276(8): 2251-2265.
238. Yang, Z. W., Ji, B. P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2009). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *J Sci Food Agric* 89(1): 150-156.

239. Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). 3 - Inhibiting oxidation. Antioxidants in Food. J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, Woodhead Publishing: 22-70.
240. Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y., Wasche, A. (2004). Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *J Agric Food Chem* 52(25): 7681-7689.
241. Zhang, H.-c., Zhang, Z.-t., Xin, X.-l. (2011). Isolation and identification of microorganisms from kombucha fungus culture. *Journal of Beijing Union University (Natural Sciences)* 2: 011.
242. Zheng, H., Jimenez-Flores, R., Everett, D. W. (2014). Lateral lipid organization of the bovine milk fat globule membrane is revealed by washing processes. *J Dairy Sci* 97(10): 5964-5974.
243. Živković, J. V., Sunarić, S. M., Trutić, N. V., Pavlović, R. M., Kocić, G. M., Nikolić, G. S., Jovanović, T. V. (2009). DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk. *Prehrambena industrija-mleko i mlečni proizvodi* 20(1-2): 45-47.