

Prehrambena industrija

MLEKO I MLEČNI PROIZVODI

ČASOPIS SAVEZA HEMIČARA I TEHNOLOGA

VOL. 20

BEOGRAD, 2009.

BROJ 1-2

Izdavači:

SAVEZ HEMIČARA I TEHNOLOGA (SHT)
TEHNOLOŠKI FAKULTET (TF), NOVI SAD

Za izdavača:

Tatijana Duduković, sekretar SHT
Prof. dr Zoltan Zavargo, dekan TF

Glavni urednik:

Spasenija Milanović

Uredništvo:

Marijana Carić, Dragojlo Obradović,
Ljerka Gregurek, Zdenko Puhar
Adnan Tamime, Gyula Vatai

Izdavački savet:

Živanko Radovančev (predsednik),
Marijana Carić, Spasenija Milanović,
Dušan Grujić, Dragan Šašić,
Nataša Tucović, Zoran Đerić,
Branko Popović, Bratislav Banjanac,
Zoran Golubović, Dubravka Bajić,
Gizela Korhec, Dušan Pajkić,
Jelisaveta Raić

Publikovanje časopisa finansijski su pomogli:

Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj
Republike Srbije

Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj

Izlazi kao dvobroj dva puta godišnje

Redakcija:

Tehnološki fakultet
21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Tel: +381 21 485 3712
Fax: + 381 21 450 413

Pretplata:

Za čitaoc u SRB 300 din po dvobroju
Za inostranstvo 20 USD
Žiro račun: 840-1647666-56

Korektor:

Vilma Beker-Gačeša

Priprema i štampa:

VERZAL, Novi Sad
Tel./faks: 021/505-103

Tiraž: 250 primeraka

SADRŽAJ

D. Obradović, D. Radin, Z. Radulović, Saccharomyces boulardii jedini kvasac probiotik	3
I. Stanković, I. Miletić, B. Đorđević, Specijalne formulacije mleka za osobe sa posebnim nutritivnim potrebama	5
R. Popović, Strukturne promene na tržištu mlečnih proizvoda u Srbiji	7
S. Markov, N. Ivljanin, D. Cvetković, Korelacija vrednosti ATP sa bakterijskim populacijama kopanih bunara pogona prehrambene industrije	11
G. Reithmayer, D. Stojsavljević, Ispitivanje rezidua antibiotika u mleku	18
P. Puđa, J. Miočinović, Sirevi sa dijetetskim i funkcionalnim svojstvima	20
R. Malbaša, E. Lončar, Lj. Kolarov, Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe	31
S. Bulajić, Z. Mijačević, Biološki hazard – rezistencija na antibiotike mikroorganizama izolovanih iz namirnica	35
G. Niketić, A. Kasalica, D. Miočinović, A. Popović-Vranješ, Osobine mleka proizvedenog na principima "organske proizvodnje"	41
J. Živković, S. Sunarić, N. Trutić, R. Pavlović, G. Kocić, G. Nikolić, T. Jovanović, Skevdžing aktivnost pasterizovanog kravljeg mleka na DPPH radikal	45
M. Bojanić-Rašović, S. Mirecki, N. Nikolić, R. Rašović, Uticaj ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija mlijeka na randman polutvrdog sira	48
S. Samardžić, Sir iz mijeha iz Hercegovine: stari recept – nova perspektiva	52
S. Popović, M. Tekić, Mogućnosti unapređenja membranskih procesa primenjenih u industriji mleka	57
M. Iličić, S. Milanović, M. Carić, M. Đurić, M. Tekić, V. Vukić, K. Duraković, S. Popović, Primena kombuhe u tehnologiji funkcionalnih fermentisanih mlečnih proizvoda	65
T. Vučić, S. Jovanović, A. Jovčić, I. Zdravković, Karakteristike sladoleda sa smanjenim sadržajem masti	70
V. Pavlović, P. Puđa, G. Trpković, J. Miočinović, Primena tehnika elektronske mikroskopije u proučavanju sireva	78
A. Alijagić, T. Dizdarević, L. Biber, Z. Sarić, Proizvodnja i kvalitet mliječnog namaza sa dodatkom začina	87
A. Odobašić, S. Čatić, H. Keran, H. Pašalić, I. Šestan, ISP metod za kontrolu sadržaja kalcijuma u mleku	91
R. Relić, M. Ostojić, V. Vuković, G. Jež, Uslovi smeštaja i kvalitet mleka krava sa područja Golije	95
S. Milanović, M. Carić, M. Iličić, Pregled istraživanja mikrostrukture mlečnih proizvoda	100
Z. Radulović, M. Iličić, D. Radin, D. Paunović, N. Mitrović, M. Petrušić, D. Obradović, Karakterizacija mikroflore kombuhe u fermentisanim mlečnim napicima	106
B. Pejić, S. Milanović, V. Lazić, J. Vitas, T. Marinkov, Kvalitet i održivost kombuha fermentisanog mlečnog napitka pakovanog u različitoj ambalaži	110
M. Stijepić, J. Glušac, D. Milošević-Đurđević, Prebiotičko djelovanje meda na fermentaciju i svojstva kozjeg i kravljeg probiotičkog jogurta	116
O. Mačej, S. Seratlić, S. Jovanović, D. Radin, T. Vučić, Z. Miloradović, Karakteristike sireva sa dodatkom lekovitog i aromatičnog bilja	123
J. Stojiljković, Uticaj tehnoloških operacija na dinamiku broja bakterija mlečne kiseline u belom mekom siru	130

Food industry

MILK AKD DAIRY PRODUCTS

JOURNAL OF CHEMISTS AND TECHNOLOGISTS ASSOCIATION

VOL. 20

BEOGRAD, 2009.

No 1-2

Publishers:

CHEMISTS AND TECHNOLOGISTS
ASSOCIATION (CTA)
FACULTY OF TECHNOLOGY (FT)

For publisher:

Tatjana Duduković, secretary CTA
Prof. dr Zoltan Zavargo, dean FT

Editor-in-Chief:

Spasenija Milanović

Editorial board:

Marijana Carić, Dragojlo Obradović,
Ljerka Gregurek, Zdenko Puhan
Adnan Tamime, Gyula Vatai

Advisory board:

Živanko Radovančev (chairman),
Marijana Carić, Spasenija Milanović,
Dušan Grujić, Dragan Šašić,
Nataša Tucović, Zoran Đerić,
Branko Popović, Bratislav Banjanac,
Zoran Golubović, Dubravka Bajić
Gizela Korhec, Dušan Pajkić,
Jelisaveta Raič

The Journal is financially supported by:

Ministry of Science and Technological
Development, Republic of Serbia

Provincial Secretariat for Science and
Technological Development

Published semiannually.

Editorial:

Faculty of Technology
21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Tel: +381 21 485 3712
Fax: + 381 21 450 413

Subscription:

300 din per issue or 20 USD
Bank account: 840-1647666-56

Text proof-reader:

Vilma Beker-Gaćeša

Prepress & printed by:

VERZAL, Novi Sad
Phone/Fax: +381 21 505 103

Copies: 250

CONTENTS

D. Obradović, D. Radin, Z. Radulović, <i>Saccharomyces boulardii</i> the only probiotic yeast	3
I. Stanković, I. Miletić, B. Đorđević, <i>Special formulations of dairy products intended for consumers with particular nutritive needs</i>	5
R. Popović, <i>Structural changes on Serbian milk market</i>	7
S. Markov, N. Ivljanin, D. Cvetković, <i>Correlation between bacterial populations in shallow well water from food factory and ATP value</i>	11
G. Reithmayer, D. Stojavljević, <i>Analysis of antibiotics residues in milk</i>	18
P. Puđa, J. Miočinović, <i>Cheeses with dietetic and functional properties</i>	20
R. Malbaša, E. Lončar, Lj. Kolarov, <i>Determination of vitamin C in kombucha-based fermented milk products</i>	31
S. Bulajić, Z. Mijačević, <i>Biological hazard – antibiotic resistance of microorganisms isolated from food</i>	35
G. Niketić, A. Kasalica, D. Miočinović, A. Popović-Vranješ, <i>The evaluation of organic milk quality</i>	41
J. Živković, S. Sunarić, N. Trutić, R. Pavlović, G. Kocić, G. Nikolić, T. Jovanović, <i>DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk</i>	45
M. Bojanić-Rašović, S. Mirecki, N. Nikolić, R. Rašović, <i>The influence of total bacteria count and somatic cells count on the semihard cheese yield</i>	48
S. Samardžić, <i>Mijeha cheese from Herzegovina: old recipe – new perspectives</i>	52
S. Popović, M. Tekić, <i>Improvement of membrane processes applied in the dairy industry</i>	57
M. Iličić, S. Milanović, M. Carić, M. Đurić, M. Tekić, V. Vukić, K. Duraković, S. Popović, <i>Application of kombucha in functional fermented milk beverages technology</i>	65
T. Vučić, S. Jovanović, A. Jovčić, I. Zdravković, <i>Characteristics of ice cream with lower fat content</i>	70
V. Pavlović, P. Puđa, G. Trpković, J. Miočinović, <i>Application of electron microscopy techniques in studying of cheeses</i>	78
A. Alijagić, T. Dizdarević, L. Biber, Z. Sarić, <i>Production and quality of dairy spreads with spices</i>	87
A. Odobašić, S. Čatić, H. Keran, H. Pašalić, I. Šestan, <i>ISP – method of control content of Ca in milk</i>	91
R. Relić, M. Ostojić, V. Vuković, G. Jež, <i>Housing conditions and milk quality of cows from mountain Golija region</i>	95
S. Milanović, M. Carić, M. Iličić, <i>A review of dairy products microstructure investigations</i>	100
Z. Radulović, M. Iličić, D. Radin, D. Paunović, N. Mitrović, M. Petrušić, D. Obradović, <i>Characterization of kombucha microflora in fermented milk beverages</i>	106
B. Pejić, S. Milanović, V. Lazić, J. Vitas, T. Marinkov, <i>Quality and shelf-life of kombucha fermented dairy beverage packed in various packagings</i>	110
M. Stijepić, J. Glušac, D. Milošević-Đurđević, <i>Prebiotic effect of honey addition on fermentation and physico-chemical properties of probiotic drink produced from goat milk</i>	116
O. Mačej, S. Seratlić, S. Jovanović, D. Radin, T. Vučić, Z. Miloradović, <i>Cheeses with medicinal and aromatic plants, produced in Europe</i>	123
J. Stojilković, <i>Influence of technological operations on the number of lactic acid bacteria in white soft cheese making from milk of summer lactation</i>	130

DRAGOJLO B. OBRADOVIĆ
DRAGOSLAVA D. RADIN
ZORICA T. RADULOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet, Institut za
prehrambenu tehnologiju,
Katedra za tehnološku
mikrobiologiju

NAUČNI RAD

UDK: 637.047:663.12

Saccharomyces boulardii JEDINI KVASAC PROBIOTIK*

Probiotici danas predstavljaju pravi hit u proizvodnji funkcionalne hrane i parafarmaceutskih proizvoda. Po pravilu, svi ovi proizvodi zasnovani su na bakterijama mlečne kiseline (BMK) i bifidobakterijama, a rezultati velikog broja istraživanja opravdavaju njihovu sve veću primenu. Međutim, kod parafarmaceutskih proizvoda često je prisutan kvasac *Saccharomyces boulardii* koji je intenzivno testiran u pogledu probiotskih svojstava, a koji je prema najnovijim molekularnim ispitivanjima veoma blizak vrsti *Saccharomyces cerevisiae*. Prema nekim autorima, radi se o varijetetu navedene vrste. *Saccharomyces boulardii* pokazuje terapeutska svojstva kod dijareja izazvanih delovanjem antibiotika, prisustvom *Clostridium difficile*, pojave iritabilnog kolona, kod osoba obolelih od AIDS-a, itd. Kako je navedena vrsta nađena u kulturama čajne gljive kombuhe i kefira, učinjeni su prvi pokušaji u pogledu primene ove vrste u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka u zajednici sa BMK. Iako nije u stanju da koristi laktozu, *Saccharomyces boulardii* je koristio prisutne organske kiseline, galaktozu i glukozu nastalu u toku metabolizma BMK. Pojava gasa i alkohola i dalje predstavlja glavni problem za dalju primenu ove vrste, ali istraživanja treba nastaviti jer se potencijalno mogu dobiti proizvodi sa visokom nutritivnom vrednošću.

Ključne reči: *Saccharomyces boulardii* • probiotik • antidijarealni efekat

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
Prof. dr Dragojlo Obradović, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet,
Nemanjina 6, Zemun, tel.: 011 2615-315
e-mail: dobradovic@agrif.bg.ac.rs

UVOD

Saccharomyces boulardii je jedina vrsta kvasaca za koju je dokazano da poseduje svojstva koja karakterišu probiotike. Izolovao ju je francuski naučnik Anri Boulard 1923. u francuskoj Indokini sa plodova mangosteena i ličija. Naime, Boulard je primetio da domorodci zvačući navedeno voće ublažavaju simptome kolere. Ova vrsta se odlikuje sposobnošću prolaska kroz gastrointestinalni trakt, temperaturni optimum je 37°C, a deluje inhibitory na brojne patogene mikroorganizme. Isto tako, treba imati u vidu da *Saccharomyces boulardii* pripada eukariotima i da se zato razlikuje od brojnih probiotskih bakterija koji su prokarioti. Danas se liofilizovane kapsule *S. boulardii* u većini zemalja prodaju kao generisani suplementi pod imenom Reflor, Repoflor, Florastor, DiarSafe, Magicflora, UltraLevure, Perenterol, Pediarol i Biolatte Boulardii, a ima podataka o prisustvu ove vrste u čajnoj gljivi kombuhi i kefiru.

Jedan od razloga uspešne i veoma raširene primene *Saccharomyces boulardii* u parafarmaciji je veoma prisutna pojava antimikrobne rezistencije od strane patogenih bakterija u slučajevima terapije sa antibioticima (Snydman, 2008). S tim u vezi, prirodna rezistencija kvasaca u odnosu na antibiotike je jedan od glavnih argumenata za njihovu primenu u slučaju terapije pacijenata sa antibioticima. Antimikrobna rezistencija javlja se i vertikalno (nasledna rezistencija bakterijskih vrsta ili rodova) i horizontalno zbog transfera gena između bakterija. Kako crevni trakt predstavlja povoljnu sredinu za transfer genetskog materijala između mnogih vrsta bakterija, što znači da geni rezistencije mogu biti preneti ne samo u ok-

viru domicilne mikroflore, već taj proces može biti prisutan i u oba pravca kada su u pitanju probiotski sojevi. Kako su u zadnje vreme identifikovani geni koji nose rezistenciju na tetraciklin, eritromicin i vankomicin kod nekih sojeva enterokoka i laktobacila, koji su označeni kao probiotici, jasno je da rezistencija može biti preneti na patogenu mikrofloru (Mathur & Singh, 2005). Takav vid prenosa genetskog materijala nije prisutan između bakterija i kvasaca, čineći bezbednu primenu ovih drugih za vreme terapije antibioticima.

Saccharomyces boulardii je prvobitno identifikovan kao zasebna vrsta, ali su skorašnja ispitivanja na molekularnom nivou potvrdila da *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces boulardii* skoro pripadaju istoj vrsti, mada su razlike na fiziološkom i metaboličkom nivou značajne (McFarland, 1996). *Saccharomyces boulardii* bolje podnosi niže pH vrednosti, ima veći temperaturni optimum, bolju temperaturnu rezistenciju, bolje podnosi mikroekološke uslove u gastrointestinalnom traktu, mada se mora priznati da je nakon prestanka uzimanja kapsula, održavanje konstantne koncentracije kolonizovanih ćelija u kolonu iznosilo 3 dana (Elmer et al., 1999).

Uticaj *Saccharomyces boulardii* na gastrointestinalne bolesti

Veliki broj kliničkih studija posvećen je delovanju *Saccharomyces boulardii* u odnosu na gastrointestinalne smetnje (Czerucka et al., 2007; McFarland et al., 1995), koja su pokazala antidijarealni efekat navedene vrste, prvenstveno u redukciji broja dijareja nakon oralne primene. Ova vrsta vrši razgradnju toksina A i B proizvedenih od strane *Clostridium difficile* i inhibira njihova receptorske pozicije na crev-

nom epitelu. Ovo dovodi do redukcije enterotoksigenog i citotoksičnog efekta infekcije uzrokovane sa *Clostridium difficile*. Isto tako, ispitivanja su pokazala da kombinacija *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, u značajnoj meri utiče na prevenciju pojave putničke dijareje (McFarland, 2007). Takođe, nađena je smanjena učestalost dijareje u slučajevima sindroma iritabilnog kolona, kao i u prevenciji pojave procesa zapaljenja kolona koji često dovodi do Kronove bolesti. Pored toga, evidentan je uticaj i na smanjenu pojavu dijareje kod osoba obolelih od AIDS-a i onih kojih koji uzimaju antibiotike, pogotovo kada su deca u pitanju (Naspghan, 2006). Ova sposobnost delovanja *Saccharomyces boulardii* objašnjena je na osnovu farmakogenetičkih i farmakodinamičkih ispitivanja koja su pokazala da su acidorezistencija i proteolitička aktivnost, s jedne strane, i sposobnost delovanja na mesta vezivanja bakterijskih toksina, kao i stimulacija odbrambenog sistema intestinalnih ćelija, s druge strane, glavni indikatori pozitivnog delovanja navedene vrste (Czerucka et al., 2007). Naime, *Saccharomyces boulardii* proizvodi poliamine koji dovode u ispravno stanje mukoznu membranu i intestinalne ćelije. Ovi poliamini takođe potpomažu aktivnost masnih kiselina sa malim brojem C atoma, a isto tako i disaharidnih enzima.

Značaj vrsta iz roda

Saccharomyces za mleko i mlečne proizvode

Vrste iz roda *Saccharomyces*, odnosno *S. burnetii*, *S. kluyveri*, *S. byanus*, *S. rosinii*, *S. Cerevisiae* i *S. bou-*

lardii, mogu biti izolovane iz velikog broja mlečnih proizvoda uključujući mleko, jogurt, pavlaku, dahi, kefir i sir. Kvasci retko rastu u mleku čuvanom na temperaturama hlađenja, jer ih brzo prerastu psihrotrofne bakterije, ali zato mogu biti prisutni u tvrdim, polutvrdim i mekim sirevima zahvaljujući svojim lipolitičkim i proteolitičkim svojstvima, a takođe i sposobnosti korišćenja mlečne kiseline. Poznato je da kvasci ulaze u sastav startera za proizvodnju kefira, kumisa, lebana, acidofilnog mleka sa kvascima, taet- tea, a kada je u pitanju *Saccharomyces boulardii* pokazano je da je moguć rast u fermentisanom napitku sa i bez voća u zajednici sa *L. acidophilus* i *Bifidobacterim sp.* *Saccharomyces boulardii* ne fermentiše laktozu, ali koristi galaktozu a isti je i slučaj sa mlečnom kiselinom, ali ne i limunskom i čilibarnom (Lourens & Viljoen, 2001). Isto tako, ne poseduje proteolitička i lipolitička svojstva. Bolji rast u voćnom fermentisanom napitku je posledica prisustva glukoze i fruktoze, a takođe i saharoze dodate i cilju povećanja slatkosti. Sve je ovo dovelo do povećanog prisustva alkohola i pojave gasa, što je apsolutno nepoželjno, ali je pH ostao stabilan zahvaljujući korišćenju mlečne kiseline kao izvora ugljenika od strane *S. boulardi*.

ZAKLJUČAK

Kvasci kao prokarioti imaju mnogo raznovrsniji enzimski profil nego bakterije mlečne kiseline. Oni omogućavaju zaštitu u odnosu na patogene bakterije i toksična jedinjenja vezivanjem za površine. *Saccharomyces boulardi*, nepatogeni kvasac koristi se kao preventivni i terapijski agens u cilju tretiranja različitih bolesti koje do-

vode do dijareje. Eksperimentalne studije su jasno pokazale da *Saccharomyces boulardii* poseduje specifična probiotska svojstva i skorašnja istraživanja otvorila su vrata za nove terapijske primene ovog kvasca. Danas su na tržištu prisutni brojni farmaceutski preparati (kapsule, prahovi, tablete, granule) koji se distribuiraju uglavnom preko apoteka. Iako je primena *Saccharomyces boulardii* kao probiotika obećavajuća, naročito kod mleka i mlečnih proizvoda, za sada najveći problem predstavlja određena produkcija alkohola i gasa.

LITERATURA

- Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P.: Yeast as probiotics -*Saccharomyces boulardii*, review. *Aliment Pharmacol Ther.*, 15; 26 (6) (2007) 767-78.
- Elmer, G. W., McFarland, L. V., Surawicz, C. M., et al.: Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment Pharmacol Ther.*, 13 (1999) 1663-8.
- Lourens, A., Viljoen, B. C.: Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, 34 (2001) 791-796.
- Mathur, S., Singh, R.: Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria, review. *Int Journal Food Microbiol*, 105 (2005) 281-95.
- McFarland, L.: Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med. Infect Dis.*, 5 (2007) 97-105.
- McFarland, L. V., Surawicz C. M., Greenberg R. N., et al.: Prevention of b-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am Journal Gastroenterol*, 90 (1995) 439-448.
- McFarland, L. V.: *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin. Infect. Disease*, 22 (1996) 200-201.
- Naspghan nutrition report committee: Clinical efficacy of probiotics. Review of the evidence with focus on children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 43 (2006) 550-557.
- Snydman, D. R.: The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (2008) 104-111.

SUMMARY

Saccharomyces boulardii THE ONLY PROBIOTIC YEAST

Dragojlo B. Obradović, Dragoslava D. Radin, Zorica T. Radulović

University of Belgrade, Faculty of Agriculture

Yeasts as eukaryotes do have a more diverse enzymatic profile than lactic acid bacteria. They provide protection against pathogenic bacteria and toxic compounds by surface binding. *Saccharomyces boulardii*, a non-pathogenic yeast, has been used both as a preventative and therapeutic agent for the treatment of a variety of diarrheal diseases. Experimental studies clearly demonstrate that *S. boulardii* has specific probiotic properties, and recent data has opened the door for new therapeutic uses of this yeast. Today, a considerable number of pharmaceutical preparations (capsules, powders, tablets, pellets) containing probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* cells are commercially available, and are marketed mainly via pharmacies. Also, the application of the *Saccharomyces boulardii* as a probiotic microorganism seems promising especially in milk and yogurts, the production of amounts of alcohol and gas formation, however, are for the moment major problem.

Key words: *Saccharomyces boulardii* • probiotic • anti-diarrheal effect

IVAN M. STANKOVIĆ
IVANKA Đ. MILETIĆ
BRIŽITA I. ĐORĐEVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet, Institut za
bromatologiju

NAUČNI RAD

UDK: 634.144:637.03

SPECIJALNE FORMULACIJE PROIZVODA OD MLEKA ZA OSOBE SA POSEBNIM NUTRITIVNIM POTREBAMA*

Specijalne formulacije proizvoda od mleka za osobe sa posebnim nutritivnim potrebama svrstavaju se u: konvencionalne namirnice sa izmenjenim sastavom, funkcionalne namirnice, dijetetske proizvode i dijetetske suplemente. Deklaracije ovih namirnica obično sadrže odgovarajuće nutritivne i zdravstvene izjave. Naša legislativa kojom se regulišu zahtevi za bezbednost, kvalitet, deklarisanje i označavanje ovih proizvoda nije kompletna i samo je delimično usaglašena sa regulativom EU i međunarodnim standardima. To otežava njihovu prozodnju i promet, a samim tim i njihovu dostupnost i benefit za osobe sa posebnim nutritivnim potrebama kojima su namenjene.

Ključne reči: mlečni proizvodi • formule za odojčad • preosetljivost

UVOD

Osobe sa posebnim nutritivnim potrebama kao što su odojčad, mala deca, osobe preosetljive na sastojke mleka, osobe sa digestivnim i kardiovaskularnim problemima, sportisti i dr. imaju potrebu za posebnim formulacijama proizvoda od mleka koji se svrstavaju u: konvencionalne namirnice sa izmenjenim sastavom, funkcionalne namirnice, dijetetske proizvode i dijetetske suplemente.

Namirnice sa izmenjenim sastavom i funkcionalna hrana

Od konvencionalnih namirnica sa izmenjenim sastavom najzastupljenije su namirnice sa smanjenim sadržajem mlečne masti i namirnice obogaćene vitaminima, mineralima i drugim sastojcima sa hranljivim ili fiziološkim efektom.

Namirnice sa smanjenim sadržajem mlečne masti namenjene su osobama sa kardiovaskularnim problemima i onima koje žele da smanje unos animalnih masti i holesterola. Za obogaćivanje proizvoda od mleka, od vitamina najviše se koriste vitamini A i D, od minerala kalcijum, a od drugih supstanci sa fiziološkim efektom probiotici, prebiotici, L-karnitin, koenzim Q10 i dr. Mnogi od ovih proizvoda smatraju se funkcionalnim namirnicama jer imaju veći benefit za zdravlje potrošača od namirnica koje zamenjuju u ishrani.

Dodavanje vitamina i minerala namirnicama regulisano je u EU Regulativom (EC) No 1925/2006. Ovaj propis daje listu supstanci koje se mogu koristiti kao izvori vitamina i minerala za obogaćivanje namirnica i posebne zahteve za deklarisanje obogaćenih namirnica. Vitamini i minerali mogu se dodavati namirnicama samo u obliku koji je iskoristljiv u ljudskom organizmu. Pri tome se posebno uzima u obzir:

1) postojanje deficita jednog ili više vitamina i/ili minerala u populaciji ili specifičnim populacionim grupama koji se može dokazati kliničkim ili subkliničkim dokazima ili na njega ukazuje nizak nivo unosa hranljivih sastojaka,

2) njihov potencijal da poboljšaju nutritivni status populacije ili specifičnih

nih populacionih grupa ili da isprave moguće deficite u dijetarnom unosu vitamina i minerala usled izmene navika u ishrani,

3) opšte prihvaćena naučna saznanja o ulozi vitamina i minerala u ishrani i njihovim efektima na zdravlje ljudi.

Vitamini ili minerali se ne smeju dodavati namirnicama u količini koja može da ugrozi zdravlje potrošača, uzimajući u obzir i vitamine i minerale prirodno prisutne u namirnicama.

Proizvodi za osobe preosetljive na sastojke mleka

Direktiva EU 2003/89/EC propisuje obavezno deklarisanje prisustva mleka i proizvoda od mleka u namirnicama, što predstavlja korisnu informaciju za preosetljive osobe. Preosetljivost pojedinih osoba na sastojke mleka može da se podeli na alergije na proteine mleka i intolerancije na laktozu.

Alergije na proteine mleka su inicirane imunološkim mehanizmima. Najveći broj alergija uključuje produkciju IgE antitela. Ova vrsta alergijskih reakcija označava se kao IgE-posredovana alergija, ili reakcija preosetljivosti tipa I. Simptomi se javljaju vrlo brzo nakon unošenja alergena i mogu da budu vrlo burni. Drugi mehanizam kod alergija na mleko je reakcija kasne preosetljivosti celularnog tipa, ili preosetljivost tipa IV. Ona se razvija posle nekoliko sati ili dana nakon unošenja alergena i nije posredovana IgE antitelima, već su ključni mehanizmi reakcije između određenih ćelija i hemijskih medijatora. Iz ishrane osoba preosetljivih na proteine mleka isključuju se mleko i mlečni proizvodi. Ove osobe nisu preosetljive na hidrolizate

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
Prof. dr Ivan Stanković, Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet, Institut za bromatologiju,
Vojvode Stepe 450, 11 221 Beograd, Srbija
tel: +381 11 24 73 224; fax: +381 11 39 72 840
e-mail: istank@pharmacy.bg.ac.rs

proteina mleka koji sadrže samo aminokiseline, jer da bi neka proteinska struktura bila antigen, mora da bude najmanje veličine peptida.

Intolerancija na laktozu se javlja kao posledica metaboličkih abnormalnosti i deli se na deficit laktaze i galaktozemiju.

Kod deficita laktaze, koji može da bude urođen ili stečen, nehidrolizovana laktoza previre i izaziva fermentativne dijaree što dovodi do gubitka elektrolita i nemogućnosti iskorišćavanja drugih hranljivih sastojaka.

Galaktozemija je urođeni nedostatak galaktozo-1-fosfat-uridil-transferaze koja prevodi galaktozu u glukozu. Posledice unošenja laktoze su: pojava katarakte kod obolele dece (4-8 nedelja) usled nagomilavanja dulcitolu koji nastaje redukcijom nemetabolisane galaktoze i mentalna retardiranost ukoliko se mleko na vreme ne isključi iz ishrane. Manifestacije su: povraćanje, dijareja, žutica i hipoglikemija.

Za osobe sa intolerancijom na laktozu pripremaju se proizvodi od mleka iz kojih je laktoza uklonjena ili enzimski hidrolizovana do glukoze i galaktoze. Osobe sa galaktozemijom ne smeju da uzimaju mleka sa hidrolizovanim laktozom jer je kod njih intolerancija na laktozu posledica poremećaja u metabolizmu galaktoze.

Dijetetski proizvodi

Posebne formulacije i proizvodi od mleka su najznačajniji sastojci mnogih dijetetskih namirnica. Mleko je najvažniji izvor proteina u formulama za odojčad, dečijoj hrani, namirnicama za posebnu medicinsku namenu i dr.

Početne formule za odojčad (*infant formulae*) specijalno su formulisane za odojčad tako da u potpunosti zadovolje njihove nutritivne potrebe tokom prvih 6 meseci života, do uvo-

đenja dopunske ishrane, a prelazne formule za odojčad (*follow-on formulae*) specijalno su formulisane za odojčad u periodu uvođenja dopunske ishrane tako da čine glavnu tečnu namirnicu za odojčad stariju od 6 meseci u periodu postepenog prelaska na raznovrsnu ishranu. Njihov sastav i drugi zahtevi propisani su u EU direktivom 2006/141/EC, a kod nas Pravilnikom o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih namirnica koje se mogu stavljati u promet (Sl. list SFRJ, br. 4/85, 70/86 i 69/91). Kao izvori proteina u formulama za odojčad mogu se koristiti proteini kravljeg mleka, hidrolizati proteina mleka ili izolati proteina soje. Formule za odojčad proizvedene isključivo od proteina kravljeg mleka mogu se puštati u promet pod nazivom »početno mleko za odojčad« i »prelazno mleko za odojčad«.

Dijetetski suplementi

Dijetetski suplementi (dodaci ishrani) su namirnice koje dopunjuju normalnu ishranu i predstavljaju koncentrovane izvore vitamina, minerala ili drugih supstanci sa hranljivim ili fiziološkim efektom, pojedinačno ili u kombinaciji, a u prometu su u doziranim oblicima dizajnirane da se uzimaju u odmerenim pojedinačnim količinama (kapsule, tablete, kesice praška, ampule tečnosti, bočice za doziranje u kapima i sl.).

Najzastupljeniji dijetetski suplementi na tržištu koji sadrže proizvode od mleka su suplementi sa goveđim kolostrumom. Oni se preporučuju za poboljšanje imuniteta i otpornosti organizma a koncentri proteina mleka za suplementaciju ishrane sportista koji žele da povećaju mišićnu masu. Laktoza i kazein se često koriste u proizvodnji dijetetskih suplemenata za

dispervogvanje aktivnih sastojaka, za povećanje zapremine i iz drugih tehnoloških razloga.

Deklaracije specijalnih formulacija proizvoda od mleka za osobe sa posebnim nutritivnim potrebama obično sadrže nutritivne i zdravstvene izjave. Nutritivne i zdravstvene izjave regulisane su u EU regulativom (EC) No 1924/2006, a u Srbiji regulisane su, za sada, samo nutritivne izjave Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica (Sl. list SCG, br. 4/2004, 12/2004 i 48/2004). Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti dijetetskih namirnica koje se mogu stavljati u promet (Sl. list SFRJ, br. 4/85, 70/86 i 69/91) je zastareo i neusaglašen sa regulativom EU i međunarodnim standardima. Novi pravilnik koji je u pripremi regulisaće bolje i detaljnije zahteve za bezbednost, nutritivnu adekvatnost, kvalitet i deklarisanje dijetetskih namirnica i suplemenata.

LITERATURA

- REGULATION (EC) No 1925/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods, Official Journal of the European Union L 404, 26-38.
- COMMISSION DIRECTIVE 2006/141/EC on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC, Official Journal of the European Union L 401, 1-33.
- REGULATION (EC) No 1924/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on nutrition and health claims made on foods, Official Journal of the European Union L 404, 9-25.
- DIRECTIVE 2003/89/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs, Official Journal of the European Union L 308, 15-18.

SUMMARY

SPECIAL FORMULATIONS OF DAIRY PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS WITH PARTICULAR NUTRITIVE NEEDS

Ivan M. Stanković, Ivanka Đ. Miletić, Brižita I. Đorđević

University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Institute of Bromatology, Serbia

Special formulations of dairy products intended for consumers with particular nutritive needs can be comprehended as: conventional food with altered composition, functional food, dietetic products and dietetic supplements. Labels of these food products usually contain corresponding nutritive and health-oriented data. Our legislative which regulates requirements for safety, quality and labeling of these products is not complete and is only partially adjusted to the EU legislation and international standards, what impedes their production and marketing, as well as their availability to and benefits for the consumers with particular nutritive needs, who they were intended for.

Key words: dairy products • infant formulae • particular nutritive needs

RADE I. POPOVIĆ

Univerzitet u Novom Sadu,
Ekonomski fakultet Subotica

NAUČNI RAD

UDK: 637.1:338.439 (497.1)

STRUKTURNE PROMENE NA TRŽIŠTU MLEČNIH PROIZVODA U SRBIJI*

Proizvodnja, prerada i prodaja mleka i mlečnih proizvoda jedan je od najznačajnijih segmenata agrobiznis sektora u Srbiji. U radu su analizirane strukturne promene na tržištu mlečnih proizvoda u periodu od 2006. do 2008. godine. Ove promene obuhvataju tržišne pozicije mlekara, kao i njihovu proizvodnu strukturu. Utvrđeno je da su dve mlekare iz grupe velikih, kao i one iz grupe mlekara srednjeg kapaciteta, povećale svoj tržišni udeo i ostvarile bolju konkurentsku poziciju. Struktura proizvodnje pet najvećih mlekara koje prerađuju više od 60% otkupljenog sirovog mleka, značajno je promenjena u ovom kratkom vremenskom periodu. Fokus u strukturi njihove proizvodnje je premešten sa proizvodnje sireva na proizvodnju široke palete fermentisanih mlečnih napitaka. Udeo proizvodnje UHT i pasterizovanog mleka je zadržan u istom obimu, ali uz rastući značaj proizvodnje UHT mleka na račun smanjenja proizvodnje pasterizovanog mleka.

Ključne reči: tržište • formalno tržište • mleko • mlečni proizvodi • prerada • mlekare • ponuda

UVOD

Učešćem od 11% u vrednosti autoputa poljoprivrede, proizvodnja mleka je jedna od najznačajnijih grana poljoprivrede Srbije.

U preradi mleka u prethodnim godinama učestvovalo je oko 200 privrednih subjekata, koji čine ukupnu domaću ponudu na zvaničnom (formalnom) tržištu mleka. Formalno tržište mleka u Srbiji raste iz godine u godinu i 2008. godine je dostiglo 53,8% od ukupno proizvedenog mleka namenjenog ljudskoj ishrani. Preostalo mleko delom se koristi za potrebe ishrane članova poljoprivrednih gazdinstava, a delom se plasira direktno potrošačima mleka i mlečnih proizvoda putem različitih kanala direktne prodaje. Osim jačanja formalnog tržišta mleka, u prethodnom periodu došlo je i do pomeranja konkurentskih pozicija mlekara, kao i do određenih izmena u strukturi prerade mleka u mlečne proizvode.

MATERIJAL I METODI

Analiza strukturnih promena na tržištu mlečnih proizvoda u Srbiji je sprovedena u dva segmenta, korišćenjem dve grupe podataka. U prvom segmentu analizirani su struktura i promene tokom poslednjih godina na formalnom tržištu mleka, koje čini industrijska prerada mleka. Drugi segment tržišta mleka i mlečnih proizvoda je proizvodnja za sopstvene potrebe i direktnu prodaju potrošačima. Cilj istraživanja je bio da se identifikuju promene i trendovi u proizvodnji i ponudi mlečnih proizvoda na nacionalnom tržištu. U radu su korišćeni metodi ankete i polu-strukturiranog intervjua sa predstavnicima prerađivačke industrije

mleka, i poljoprivrednicima koji se bave proizvodnjom mleka. Statistički podaci prikupljeni su iz više izvora: Republički zavod za statistiku Srbije (RZS), Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (MPŠV), Svetska prehrambena organizacija (FAO), Eurostat, PU Zajednica stočarstva, i International farm comparison network – Dairy (IFCN – Dairy).

REZULTATI I DISKUSIJA

Proizvodnja mleka u Srbiji relativno je stabilna i kreće se na godišnjem nivou od 1,53 do 1,6 milijardi litara kravljeg mleka namenjenog ljudskoj ishrani. Kozije i ovčije mleko predstavljaju marginalne proizvode koji čine oko 2% ukupne proizvodnje mleka u Srbiji. Formalno tržište mleka, koje čini ona količina sirovog mleka koja se preradi u industrijskim kapacitetima, jača iz godine u godinu. Industrija mleka je 2008. godine otkupila 825 miliona litara mleka, što čini 53,8% od ukupno proizvedene količine. Struktura prerađivačke industrije mleka može se analizirati u tri segmenta: velike mlekare, mlekare srednjeg kapaciteta i mini mlekare. Pojedinačni udeli (tabela 1) ova tri segmenta na formalnom tržištu sirovog mleka, 2008. godine, iznosili su redom: 60,9%, 20,8% i 18,3%. U posmatranom trogodišnjem periodu, velike i mlekare srednjeg kapaciteta su povećale otkupljene količine mleka u apsolutnom iznosu, dok je otkup mleka od strane mini mlekara ostao na istom nivou. Pri tome, relativni udeli pomenutih grupa mlekara, na formalnom tržištu sirovog mleka kretali su se u nešto drugačijem pravcu. Polazeći od toga da je, osim profitabilnosti, jedan od najčešćih načina merenja konkurentnosti na nivou priv-

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta „Funktionalni fermentisani mlečni napitak nova tehnologija“, evidencioni broj TR-20008, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
Doc. dr Rade Popović, Univerzitet u Novom Sadu, Ekonomski fakultet Subotica, Departman za agrarnu ekonomiju i agrobiznis
Segedinski put 9–11, Subotica 24000
tel.: 024/628 064
e-mail: popovicr@ef.uns.ac.rs

rednih subjekata ostvareni tržišni udeo (Jeffrey et al., 2001), moguće je izvući određene indikativne zaključke o promeni nivoa konkurentnosti pojedinih mlekarara, kao i grupa mlekarara.

dalje dominantnu konkurentsku poziciju. Smanjenje njihovog tržišnog ude- la je ključni razlog zbog čega je tržišni udeo pet najvećih mlekarara smanjen u trogodišnjem periodu sa 62,5 na

jem 2007. godine pripojio Novosadsku mlekaru. Početkom 2008. godine fran- cuski Bongren koji je vlasnik „Mleko- produkta“ iz Zrenjanina kupio je „Ki- kindsku industriju mleka“, koja se na-

Tabela 1. STRUKTURA FORMALNOG TRŽIŠTA MLEKA U SRBIJI U PERIODU 2006 – 2008. GODINE
Table 1. FORMAL MILK MARKET STRUCTURE IN SERBIA IN PERIOD 2006 – 2008

	Mlekara/Dairy	Isporučeno mlekararama (u litrima) / Milk delivered (in liters)			Tržišni udeo (u %)/ Market share (%)		
		2006	2007	2008	2006	2007	2008
1.	Mlekare u sastavu: / Dairies in structure of: DANUBE FOODS GROUP BV	350,374.975	361,959.880	354,904.468	47,4	44,4	43,0
	- IMLEK, IMPAZ i Zemunski mlekarara	230,587.554	243,462.640	296,928.067	31,2	29,9	36,0
	- Novosadska mlekarara	60,697.564	61,205.680	*	8,2	7,5	*
	- Mlekara Subotica	59,089.857	57,291.560	57,976.401	8,0	7,0	7,0
2.	„Mlekara Šabac“, Šabac	43,187.653	56,945.950	67,627.936	5,8	7,0	8,2
3.	„Somboled“, Sombor	40,256.713	43,665.250	52,212.275	5,4	5,4	6,3
4.	„Mlekoprodukt“, Zrenjanin	28,977.976	28,720.080	27,646.386	3,9	3,5	3,4
5.	Mlekare sa kapacitetom od 5 do 20 miliona litara prerađenog mleka / Middle size dairies 5 to 20 million l of processed milk	126,563.765	158,097.080	171,970.915	17,1	19,4	20,8
6.	Mini mlekarare sa kapacitetom manjim od 5 miliona litara prerađenog mleka / Small size dairies less than 5 million l of processed milk	150,584.654	165,139.540	150,736.043	20,4	20,3	18,3
	UKUPNO / TOTAL:	739,945.736	814,527.780	825,098.022	100,0	100,0	100,0

Izvor / Source: MPŠV Registar

*Krajem 2007. godine Imlek je pripojio Novosadsku mlekaru / Imlek takeover Novosadska Dairy in 2007

Tabela 2. PRERADA MLEKA U 2008. GODINI NA FORMALNOM TRŽIŠTU SRBIJE
Table 2. PROCESSING OF RAW MILK IN SERBIAN DAIRY INDUSTRY IN 2008

	Fermentisani mlečni proizvodi/ Fermented milk products	Pasterizovano mleko / Pasteurized milk	UHT mleko / UHT milk	Sirevi, pavlaka, namazi, maslac, mleko u prahu i dr./ Cheese, cream, butter, SMP, WMP,	Ukupno: Total:
(U hiljadama litara) / (In thousands liters)					
Velike mlekarare (5)*/ Big dairies	185.617	85.381	140.039	91.355	502.391
Mlekare srednjeg kapaciteta (17)*/ Middle capacities dairies	47.820	32.697	2.316	89.138	171.971
Mini mlekarare (171)*/Small size dairies	52.758	22.610	0	75.368	150.736
Ukupno / Total:	286.194	140.689	142.355	255.861	825.098
Udeli pojedinih grupa proizvoda u ukupnoj preradi / Shares in total production					
Velike mlekarare (5)* /Big dairies	36,95%	17,00%	27,87%	18,18%	100,00%
Mlekare srednjeg kapaciteta (17)*/ Middle capacities dairies	27,81%	19,01%	1,35%	51,83%	100,00%
Mini mlekarare (171)*/ Small size dairies	35,00%	15,00%	0,00%	50,00%	100,00%
Ukupno / Total:	34,69%	17,05%	17,25%	31,01%	100,00%

* Broj mlekarara u grupi / Number of dairies in the group

Imajući u vidu takav kriterijum, proizilazi da je nivo konkurentnosti u posmatranom trogodišnjem periodu najviše unapredila „Mlekara Šabac“, koja je tržišni udeo povećala sa 5,8 na 8,2%. Zatim sledi „Somboled“ koji je povećao svoj tržišni udeo sa 5,4 na 6,3% u istom periodu. Mlekare u sastavu „Danube foods group BV“, iako su smanjile svoj udeo na tržištu sirovog mleka sa 47,4 na 43%, imaju i

60,9%. Mlekare srednjeg kapaciteta su poboljšale svoju konkurentsku poziciju povećavši svoj udeo u otkupu sirovog mleka sa 17,1 na 20,8%. Mini mlekarare, čiji se ukupan broj smanjio sa 188 na 171 u poslednje tri godine, smanjile su udeo u otkupu mleka sa 20,4 na 18,3%.

Osim promena na tržištu otkupa sirovog mleka, došlo je i do ukupnjavanja kapaciteta prerade. Imlek je kra-

lazi u grupi mlekarara srednjeg kapaciteta, sa otkupom od 13 miliona litara mleka i tako učvrstio svoju poziciju na 5. mestu po kapacitetima prerade, odnosno na 4. mestu po vlasništvu. Struktura prerade mleka, prikazana u tabeli 2, ukazuje na različitu orijentisanost pojedinih grupa mlekarara na pojedine tipove mlečnih proizvoda. Radi pojednostavljenja analize ukupne otkupljene količine sirovog mleka su

alocirane na četiri grupe mlečnih proizvoda: fermentisani mlečni proizvodi, pasterizovano mleko, UHT mleko i ostali mlečni proizvodi. Mlekare velikih kapaciteta (Imlek, Mlekara Subotica, Mlekara Šabac, Somboled i Mleko-produkt) u proseku su orijentisane prvenstveno na proizvodnju tečnih mlečnih proizvoda i to: fermentisanih mlečnih proizvoda, UHT i pasterizovanog mleka, dok je proizvodnja drugih mlečnih proizvoda (razne vrste sireva, pavlaka, namazi, maslac, mleko u prahu i dr.) u drugom planu.

sečne strukture proizvodnje. Mlekare iz ove grupe su najčešće orijentisane na proizvodnju sireva, namaza, mleka u prahu, maslaca i fermentisanih mlečnih proizvoda. Proizvodnja pasterizovanog mleka ima najmanji značaj u njihovoj proizvodnoj strukturi.

Na osnovu podataka iz ranijeg istraživanja (Popović, 2007) moguće je sagledati promene u strukturi proizvodnje, odnosno proizvodne trendove u grupi velikih mlekara (tabela 3). Tokom 2006. godine, najveće količine sirovog mleka su utrošene u proizvod-

koji su sa udelom od 36,95% postali najznačajnija grupa proizvoda. Kod ovih proizvoda je u posmatranom periodu, osim povećanja proizvodnje, ostvaren najveći stepen diversifikacije kako proizvoda, tako i pakovanja. Time je zadovoljena rastuća domaća tražnja za proizvodima iz grupe jogurta, aromatizovanih jogurta i fermentisanih mlečnih proizvoda sa dodatkom probiotika. Tržišni viškovi aromatizovanih jogurta u 2008. godini u količini od 6,2 miliona kg (<http://webzrs.stat.gov.rs/axd/spoljna/izbor.htm>, preuze-

Tabela 3. PROMENE U STRUKTURI PROIZVODNJE PET NAJVEĆIH MLEKARA U PERIODU 2006-2008
Table 3. PRODUCTION STRUCTURE CHANGES IN 5 BIGGEST DAIRY COMPANIES IN PERIOD 2006-2008

	Fermentisani mlečni proizvodi/ Fermented milk products	Pasterizovano mleko/ Pasteurized milk	UHT mleko/ UHT milk	Sirevi, pavlaka, namazi, maslac, mleko u prahu i dr./ Cheese, cream, butter, SMP, WMP,	Ukupno: Total:
(U hiljadama litara) / (In thousands liters)					
Velike mlekare - 2006. god / Biggest dairies in 2006	117.057	89.748	108.687	141.682	457.174
Velike mlekare - 2008. god / Biggest dairies in 2008	185.617	85.381	140.039	91.355	502.391
Struktura proizvodnje - 2006. god (u %) / Production share	25,61	19,63	23,77	30,99	100,00
Struktura proizvodnje - 2008. god (u %) / Production share	36,95	17,00	27,87	18,18	100,00

Od svih pomenutih mlekara jedino je „MlekoProdukt“ zadržao istu proizvodnu strukturu, koja je usmerena na proizvodnju sireva. Grupa od 17 mlekara srednjeg kapaciteta orijentisana je prvenstveno na proizvodnju raznih vrsta sireva, pavlake i kajmaka. Zatim slede fermentisani mlečni proizvodi, pasterizovano mleko i UHT mleko.

Za mini mlekare je, na bazi prikupljenih podataka, urađena procena pro-

nji: raznih vrsta sireva, pavlake, namaza, maslaca i mleka u prahu. Fermentisani mlečni proizvodi su bili najznačajnija grupa tečnih mlečnih proizvoda sa udelom od 25,6%. Sledeći po značaju su bili UHT mleko (23,77%) i pasterizovano mleko (19,63%).

Struktura proizvodnje istih mlekara u 2008. godini značajno je izmenjena. Fokus u proizvodnji je preusmeren na grupu fermentisanih mlečnih napitaka

to 03.09.2009. godine) plasirani su na tržište zemalja u okruženju.

Ogroman rast u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda ostvaren je na uštrb proizvodnje sireva. Najveće smanjenje proizvodnje sireva je ostvario Imlek, dok je jedino Mlekara Šabac značajnije povećala sopstvenu proizvodnju sireva. U proizvodnji sireva u Srbiji se utroši 31% otkupljenog sirovog mleka, dok je taj pro-

Tabela 4. PONUDA MLEKA NA TRŽIŠTU SRBIJE U 2008. GODINI
Table 4. MILK SUPPLY ON SERBIAN MARKET IN YEAR 2008

	Fermentisani mlečni proizvodi/ Fermented milk products	Pasterizovano mleko/ Pasteurized milk	UHT mleko / UHT milk	Sirevi, pavlaka, namazi, maslac, mleko u prahu i dr./ Cheese, cream, butter, SMP, WMP,	Ukupno: Total:
(U hiljadama litara) / (In thousands liters)					
Industrijska prerada / Industrial processing	286.194	140.689	142.355	255.861	825.098
Sopstvena potrošnja i direktna prodaja*/ Self consumption and direct market	182.500	183.500	0	345.682	708.902
Izvoz** / Export	5.953	0	28.251	44.674	78.878
Uvoz** / Import	1.513	0	3.009	45.847	50.369
Ukupno (Ind. prerada + sopst. potr. i dir. prod.-Izvoz+Uvoz): Total national market:	464.254	324.189	117.113	602.716	1.505.491
Potrošnja po stanovniku (u l): Per capita consumption (l):	63,16	44,11	15,93	82,00	204,82

*Izveštaj RZS Saopštenje PM-13 (SRB 44 od 25.02.2009) i procena autora / Author estimate
**Preračunato u mlečne ekvivalente (ME) (Hemme, 2008) / In milk equivalents

cenat u zemljama regiona EU-25 veći i iznosi 40%.

Kod proizvodnje pasterizovanog i sterilizovanog (UHT) mleka struktura se izmenila u smislu daljeg povećanja proizvodnje sterilizovanog mleka sa 23,77 na 27,87%, a smanjenja u proizvodnji pasterizovanog mleka. Udeo proizvodnje pasterizovanog mleka kod grupe velikih mlekara je smanjen sa 19,63 na 17% (Popović, 2008).

Količina mleka namenjena sopstvenoj potrošnji i direktnoj prodaji (tabela 4) još uvek je značajna na tržištu Srbije i iznosila je 46,2% od ukupne proizvodnje u 2008. godini. U istoj godini neformalno tržište mleka u EU-25 iznosilo je svega 6,9%. Ovaj segment tržišta mleka se smanjuje kao posledica jačanja formalnog tržišta. Količina mleka namenjena sopstvenoj potrošnji je direktno povezana sa brojem poljoprivrednih gazdinstava koja se bave proizvodnjom mleka. Imajući u vidu trend smanjenja broja gazdinstava u Srbiji, realno je očekivati da će se količina mleka namenjena sopstvenoj potrošnji smanjivati i narednih godina.

Neformalno tržište mleka i mlečnih proizvoda obuhvata više kanala distribucije i prodaje potrošačima. Među njima najznačajniji su: zelene pijace, prodaja na poljoprivrednom gazdinstvu i prodaja od vrata do vrata. Količine mleka namenjene direktnoj prodaji potrošačima je teško proceniti pošto procene postoje samo za prodaju na pijacama. Prema podacima RZS prodaja mleka i mlečnih proizvoda na pijacama (<http://webzrs.stat.gov.rs/axd/arhiva1.php?NazivSaopštenja=PM13&ind=3>, preuzeto 03.09.2009. godine) je bila relativno stabilna u periodu od 2002 do 2008. godine i kretala se na nivou od 90 miliona litara računato u mlečnim ekvivalentima. Direktna prodaja mleka i mlečnih proizvoda postoji u većini drugih zemalja, ali je po pravilu izuzetno niska kod razvijenih zemalja. Na primer, u EU-25 direktna prodaja ovih proizvoda iznosi 1,9 milijardi litara, što predstavlja svega 1,25% od ukupnog tržišta sirovog mleka (http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/milk/2007_en.pdf).

Neto spoljna trgovina mlečnim proizvodima je pozitivna i količinski (preračunato u mlečne ekvivalente) iznosi 1,86% od ukupne proizvodnje mleka u Srbiji, namenjenog ljudskoj ishrani. Vrednosno posmatrano, neto spoljna trgovina Srbije sa mlečnim proizvodima iznosi 32 miliona dolara. Izvoz je orijentisan sa 97% na tržišta

tri zemlje: Crne Gore, Bosne i Hercegovine i Makedonije. Ključne grupe mlečnih proizvoda u izvozu, prema vrednosti su redom: UHT mleko, sir, sladoled i fermentisani mlečni proizvodi sa dodacima. Učešće ovih proizvoda u ukupnom izvozu je bilo 91% 2008. godine. Tržišta sa kojih se najviše uvoze mlečni proizvodi u Srbiju su: region EU (Nemačka, Republika Češka, Slovačka, Poljska, Francuska), Bosna i Hercegovina i Hrvatska. Vrednosno najznačajniji proizvodi u uvozu bili su redom: mleko u prahu, sir, fermentisani mlečni proizvodi, maslac i UHT mleko. Ovi proizvodi su činili 81% od vrednosti ukupnog uvoza (Popović, 2009).

Prema podacima RZS, procenjen prosečan broj stanovnika u Srbiji 2008. godine je iznosio 7,350.222. Ukoliko se zanemare promene u zalihama mlečnih proizvoda na početku i kraju 2008. godine, proizilazi da je na tržištu Srbije ponuda mleka po stanovniku iznosila 204,8 litara. Uz iste pretpostavke o zalihama u 2006. godini, ponuda mleka po stanovniku je iznosila 206,5 litara, što ukazuje na minimalan pad potrošnje mleka. Neki od mogućih razloga koji su doveli do blagog smanjenja potrošnje mleka po stanovniku jesu: visoke cene mleka i mlečnih proizvoda tokom 2008. godine, kao i smanjenje potrošnje mleka iz sopstvene proizvodnje, koja je iznad prosečne, a što je direktna posledica smanjivanja broja poljoprivrednih gazdinstava.

ZAKLJUČAK

Tokom prethodnih godina završena je privatizacija industrije mlekara i izvršena su velika investiciona ulaganja u obnovu i proširenje proizvodnih kapaciteta. U periodu nakon završene privatizacije, nastale strukturne promene na tržištu mleka mogu se posmatrati kroz promene u konkurentskim pozicijama mlekara i njihovih proizvodnih struktura. Bolje konkurentске pozicije tokom analizirane tri godine zauzele su: Mlekara Šabac, Somoled i 17 mlekara sa srednjim kapacitetima prerade. Dominantnu poziciju na tržištu mleka u Srbiji imaju i dalje mlekare u vlasništvu Danube foods group BV, iako je njihov tržišni udeo smanjen za 4,4%. Smanjenje udela na tržištu sirovog mleka su ostvarile i mini mlekare.

Prema strukturi proizvodnje u 2008. godini, grupa velikih mlekara je

bila orijentisana prvenstveno na proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda, UHT i pasterizovanog mleka. Mlekare srednjeg kapaciteta i mini mlekare više su bile usmerene na proizvodnju raznih vrsta sireva, a zatim fermentisanih mlečnih proizvoda i pasterizovanog mleka.

Mlekare velikih kapaciteta su u trogodišnjem periodu značajno izmenile strukturu proizvodnje. Fokus u proizvodnji je prebačen sa proizvodnje čvrstih mlečnih proizvoda na proizvodnju široke palete fermentisanih mlečnih proizvoda. Udeo otkupljenog mleka upotrebljenog za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda povećan je sa dodatnih 11,3% na ukupno 37%. Time je smanjena uvozna zavisnost za ovim proizvodima iz ranijeg perioda, a zadovoljena je takođe i rastuća domaća tražnja. Proizvodnja pasterizovanog mleka ima opadajući trend, dok proizvodnja UHT mleka raste bržim tempom.

Neformalno tržište mleka u Srbiji, iako je u opadanju, još uvek ima visok udeo od 46,2%. Osnovni trendovi na ovom tržištu su utvrđeni u dva segmenta i to kada je u pitanju prodaja na pijacama i sopstvena potrošnja. Prodaja mleka i mlečnih proizvoda na pijacama je u prethodnom višegodišnjem periodu bila relativno stabilna i kreće se na nivou od 90 miliona litara mleka, računato u ME. Sopstvena potrošnja mleka je u opadanju usled trenda smanjenja ukupnog broja poljoprivrednih gazdinstava koja se bave proizvodnjom kravljeg mleka.

Spoljnotrgovinski bilans Srbije u trgovini mlečnim proizvodima je bio pozitivan u prethodnom trogodišnjem periodu i kretao se na nivou od nešto preko 30 miliona USD. Glavna izvozna tržišta su: Crna Gora, BiH i Makedonija, dok se najveće količine mlečnih proizvoda uvezu sa tržišta EU. Ključni izvozni proizvodi su: UHT mleko, sirevi, sladoled i fermentisani mlečni proizvodi sa dodacima, pri čemu je poslednja grupa proizvoda zabeležila najbrži rast izvoza.

Procenjena ponuda mleka na tržištu Srbije u 2008. godini iznosila je 204,82 litra mleka po stanovniku. Od toga oko 60% potrošeno je u vidu tečnih mlečnih napitaka (fermentisani mlečni proizvodi i mleko), a oko 40% u vidu sireva, pavlake, namaza, maslaca, mleka u prahu i sl.

Fermentisani mlečni proizvodi su najznačajnija grupa u strukturi ponude i potrošnje na domaćem tržištu. Rast svesti potrošača o potrebi za zdravom

ishranom doveo je do rasta tražnje za proizvodima ove grupe. Učesnici na formalnom tržištu mleka, a prvenstveno mlekare velikih kapaciteta, prateći ovakav trend tražnje na domaćem tržištu, kao i rast tražnje na tržištima zemalja u okruženju, pravovremeno su reagovale i strukturu svoje proizvodnje prilagodile potrebama tržišta.

LITERATURA

European Commission: Milk and milk production in the European Union, Luxemburg, http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/milk/2007_en.pdf (2006).

Hemme, T. et al.: IFCN Dairy Report 2008, International farm comparison network, Dairy research center, Kiel, Germany (2008).

Jeffrey, S. and Grant H.: An economic analysis of productive efficiency in Alberta dairy production, Project report, Department of rural economy, University of Alberta, Edmonton, Canada (2001).

Popović, R.: Tipovi pakovanja svežeg i UHT mleka i tečnih mlečnih proizvoda na tržištu Srbije. Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 18 (1-2) (2007) 65-69.

Popović R.: Analiza lanca snabdevanja mlekom na tržištu Srbije. Strategijski menadžment, 13 (4) (2008) 63-67.

Popović, R.: Effects of market structure changes on dairy supply chain in Serbia, Agribusiness and Agro-industries development in Central and Eastern Europe, A joint FAO – IAMA

Workshop at International food and agribusiness management association, 19th Annual World Forum & Symposium, Budapest, 20-21 June 2009, 113-124.

Republički zavod za statistiku – Republike Srbije, (2009), Baze podataka, Beograd, <http://webzrzs.stat.gov.rs/axd/en/index.php>

SUMMARY

STRUCTURAL CHANGES ON SERBIAN MILK MARKET

Rade I. Popović

University of Novi Sad, The Faculty of Economics Subotica

Production, processing and retail of milk and milk products is one of the most important segments of Serbian agribusiness. In this article structural changes on Serbian milk market in period 2006 – 2008 were analyzed. Those changes include market positions of dairies, as well as their structure of production. Data revealed that two among the biggest dairies, and middle sized dairies increased their market share. Production structure of 5 biggest dairies, which process 60% of delivered milk, significantly changed in that period. Focus in structure of their production was moved from cheese production to diversified range of fermented milk products. Share of liquid milk production remains on the same level, but with divergent movement. Production of UHT milk increased and pasteurized milk production decreased.

Key words: market • formal market • milk • milk products • processing • dairies • supply

¹SINIŠA L. MARKOV
²NATAŠA R. IVLJANIN
¹DRAGOLJUB D. CVETKOVIĆ

¹Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet,
²Alfa-lab, Aleksandrovac,

NAUČNI RAD

UDK: 628.1.034.2:628.1.36:579.68

KORELACIJA VREDNOSTI ATP SA BAKTERIJSKIM POPULACIJAMA KOPANIH BUNARA POGONA PREHRAMBENE INDUSTRIJE

UVOD

Pogoni prehrambene industrije su veliki potrošači vode kvaliteta za piće. Da bi racionalizovali izdvajanja za vodu i da bi se smanjila zavisnost od lokalne zajednice često se pribegava delimičnom vodosnabdevanju iz sopstvenih resursa. U tu svrhu se kopaju plići ili dublji bunari i ta voda se koristi kao tehnička – za sve aktivnosti gde voda neće doći u kontakt sa proizvodima. Često ta voda nije obuhvaćena ni redovnim kontrolama zdravstvene ispravnosti, pa je u dostupnoj stručnoj i naučnoj literaturi veoma malo podataka o njenom mikrobiološkom kvalitetu. Stoga su preduzeta ispitivanja mikrobiološkog statusa vode iz tri kopana bunara u jednom pogonu prehrambene industrije. U uzorcima sirove vode određivan je ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija sa dve metode – standardizovanom i Petrifilm metodom koja je kod nas i dalje alternativna metode. Pored toga, ispitana je brojnost populacije aerobnih psihrotrofnih bakterija. Istovremeno u uzorcima vode je određen nivo ATP. Za klasičnu mikrobiološku metodu i brzu metodu procene mikrobiološkog statusa ispitana je korelaciona veza. Utvrđeno je da su metode određivanja broja obe grupe bakterija povezane sa koeficijentom korelacije većim od 0,99. U većini uzoraka vode veći broj bakterija je formirao koloniju primenom Petrifilm metode. Veza između brojnosti bakterija i nivoa ukupne i slobodne ATP vrednosti nije statistički značajna, dok se veza sa razlikom ovih vrednosti (Δ ATP) može opisati kao visoka direktna linearna korelacija.

Ključne reči: bunarska voda • aerobne mezofilne bakterije • Petrifilm metoda • ATP vrednost

Industrijski pogoni za svoje potrebe često koriste sopstvene bunare, odnosno vodu iz plićeg ili dubljeg podzemlja, a u nekim pogonima to je jedini izvor vode. Poznato je da vode iz plitkih bunara češće sadrže veći broj mikroorganizama nego vode iz dubokih bunara gde se brojnost uglavnom kreće od nekoliko do nekoliko stotina po mL (Đukić i sar., 2000). Međutim, i vrlo duboki bunari takođe mogu da budu kontaminirani ako se u njih sliva voda koja je kontaminirana na bilo koji način. U plićim bunarima sadržaj bakterija u vodi zavisi od uslova filtriranja kroz zemlju, a sam proces zavisi od brojnih faktora, u koje se ubrajaju propustljivost zemljišta, hidraulični gradijent podzemne vode i klimatski uslovi (Gačeša & Klašnja, 1994). Jedan deo mikroorganizama su normalne mikroobne populacije vode i njihovo prisustvo u vodi se ne može izbeći (Markov, 1998). Pored ovih mikroorganizama u vodu mogu da dospu na razne načine i drugi mikroorganizami. Vode plitkih bunara često pored mikroorganizama sadrže organske i neorganske materije koje potiču iz industrije i domaćinstva, a mogu da utiču na uvećanje broja mnogih patogenih mikroorganizama (Žakula, 1980). Iz ovakve vode mikroorganizmi kao i organske i neorganske materije mogu da se prenesu u proizvode, ukoliko se ta voda koristi kao tehnička voda i postoji mogućnost da se stvori direktan ili indirektan kontakt sa proizvodima (Žakula, 1980; Karakašević i sar., 1987).

Voda koja se koristi kao tehnička mora po kvalitetu da odgovara vodi za piće, u suprotnom ova voda ne bi smela da se koristi u prehrambenoj industriji (Markov, 2005). Ispravnost

tehničke vode se ogleda u zdravstvenom i tehnološkom značaju. Zdravstveni značaj proizilazi iz (ne)mogućnosti da voda sadrži mikroorganizme kao i organske i neorganske materije koji mogu da izazovu razna oboljenja ljudi (Đukić i sar., 2000). Tehnološki značaj proizilazi iz mogućnosti da ti mikroorganizmi uzrokuju kvarenje namirnica, a organske i neorganske materije mogu da izazovu probleme kod uređaja i potrošača (Klašnja & Markov, 2000). Međutim, nisu sporadični slučajevi da ova voda ne ispunjava zdravstvene uslove i da se u vanrednim situacijama koristi u proizvodnom procesu. Zbog toga je od posebnog značaja za takve pogone prehrambene industrije da obezbede podatke o kvalitetu te vode, kako bi mogli upravljati sa takvim rizikom i obezbediti kvalitetan finalni proizvod (Markov i sar., 2007a).

U određenim slučajevima ispunjavanje osnovnih mikrobioloških zahteva, odnosno odsustvo direktnih indikatora fekalne kontaminacije, ne podrazumeva da je voda pogodna za korišćenje u prehrambenoj industriji, najčešće zbog izrazitog kapaciteta stvaranja biofilмова (Markov i sar., 2007b). Prisustvo saprofitnih organizama, iz rodova *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Bacillus* (Žakula, 1980; Karakašević i sar., 1987) zbog njihove sposobnosti rasta na raznim materijama životinjskog ili biljnog porekla, mora se ograničiti ili eliminisati. Grupa uslovno patogenih bakterija, odnosno predstavnici rodova *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* se mogu naći u vodi koja se koristi u prehrambenoj industriji, ali i njih karakteriše saprofitni način ishrane pa se i njihovo prisustvo mora držati pod

Adresa autora:
Prof. dr Siniša Markov, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet,
Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad
tel.: 021/485 3729; fax: 021/450 413
e-mail: sinisam@tf.uns.ac.rs

kontrolom (Đukić i sar., 2000; Karakašević i sar., 1987).

Mikrobiološki pregled vode, u slučaju rutinskih ispitivanja, se izvodi pre svega da se utvrdi da li je voda zagađena fekalijama. U slučaju odsustva direktnih indikatora fekalnog zagađenja (*E. coli*, enterokoki, sulfitoredukujuće klostridije, *Pseudomonas aeruginosa*) potrebno je da se mikrobiološkim analizama prati stanje zaštitnog vodonosnog sloja od spoljnog bakterijskog zagađenja, a to se postiže određivanjem broja aerobnih mezofilnih bakterija. Stanje vode u odnosu na zagađenje fekalijama po određenoj dinamici prate zdravstvene ustanove, dok stanje vodonosnog sloja mogu da prate razni subjekti, pa i sami pogoni (Škunca–Milovanović i sar., 1990). Manje variranje broja aerobnih mezofilnih bakterija, u slučaju odsustva fekalnih kontaminanata, može biti dobar pokazatelj da nije došlo do rekontaminacije (Markov, 1998). Na osnovu ovih činjenica jasno je da bi proizvođači hrane sa sopstvenim bunarima mogli i trebali bar da prate ukupnu bakterijsku populaciju svoje vode kako bi mogli brzo da reaguju i delom spreče širenje kontaminacije.

Najznačajniji nedostatak praćenja ukupnog broja bakterija, urađenog klasičnom ili nekom savremenijom metodom kao što je npr. Petrifilm koja je validovana od strane nekih nacionalnih tela za standardizaciju kao što su AFNOR (Francuska), NordVal (skandinavske zemlje), DIN (Nemačka) i AOAC (Uputstvo za korišćenje Petrifilmova) je što se rezultati dobijaju za minimalno 24 sata, što je previše kasno za proces proizvodnje (Vrbaški & Markov, 1992). Primenom ovih metoda mogu da se uklanjaju samo posledice, ali ne i da se deluje promptno. Da bi se moglo pratiti stanje kontaminiranosti na ili u nekom matriksu razvijena je metoda na bazi ATP, odnosno ključnoj komponenti svih metaboličkih reakcija svih organizama.

Metoda merenja ATP-a je u osnovi enzimatska reakcija i u prirodi se događa u telu svica – poznata bioluminiscencija. Upotreba ATP bioluminiscencije za detekciju mikroorganizama i organskih ostataka opisana je 1964. g., a već od 1980. g. laboratorije je primenjuju u kontroli kvaliteta (Stojanović i sar., 1998a). Suština metoda zasniva se na određivanju ukupne koncentracije ATP-a, što se postiže njegovim otpuštanjem iz svih ćelija uz pomoć enzima (luciferaza). Drugi en-

zim sa stabilizirajućim efektom, ima zadatak da se veže za svaki molekul ATP-a i na taj način omogući fluorescentni efekat, koji se na kraju meri instrumentom za merenje intenziteta svetlosti – luminometar (3M Biotrace). Bioluminiscencija se preporučuje i kao jedna od brzih indirektnih metoda bakteriološkog ispitivanja vode (Stojanović i sar., 1998b). Ovom metodom određujemo kontaminaciju vode ATP jedinicama poreklom od organskih ostataka, a time možemo da odredimo i prisustvo mikroorganizama pa tako za veoma kratko vreme dobijamo sliku o kvalitetu vode na osnovu sadržaja ATP-a (3M Biotrace).

Cilj ovog rada je da se sagleda bakteriološki profil vode iz plitkih bunara jednog pogona prehrambene industrije gde se iscrpljena voda prevashodno koristi kao tehnička voda. Praćenje bakteriološkog statusa usmereno na određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija na različitim temperaturama, klasičnom metodom i metodom Petrifilma koja je kod nas alternativna metoda. Pored toga, utvrdiće se da li postoji korelacija između klasičnih bakterioloških rezultata i merenja nivoa ukupne i slobodne ATP vrednosti.

MATERIJAL I METODI

Za mikrobiološka ispitivanja korišćena je voda iz tri kopana bunara. Bunari iz kojih su uzimani uzorci su obeleženi kao bunar I, bunar II i bunar III. U periodu dok su uzimani uzorci za mikrobiološke i fizičko-hemijske analize bunar II i bunar III su još uvek bili u završnoj fazi realizacije, jedino je bunar I bio u potpunosti završen. Osnovne karakteristike bunara su: bunar I je dubok 9 m sa dotokom vode od 4 L/s; bunar II se nalazi na udaljenosti 300 m od bunara I, i dubok je 7 m sa dotokom vode od 2 L/s; bunar III se nalazi na udaljenosti 350 m od bunara I, dubok je 8 m sa dotokom vode od 3 L/s.

Iz svakog od bunara uzeto je po 10 uzoraka u periodu sredina aprila - kraj maja i to u prve tri nedelje uziman je po jedan uzorak nedeljno iz svakog bunara, a kasnije po dva uzorka nedeljno. Postupak uzorkovanje vode je vršeno na osnovu uputstva datog u aktuelnom Priručniku za izvođenje metoda (Škunca–Milovanović i sar., 1990).

Za svaki uzorak, u po dva ponavljanja, određivan je ukupan broj svih

živih bakterija na temperaturi od 37°C i 22°C. Ovo određivanje rađeno je klasičnom metodom koja se može smatrati standardizovanom metodom koja je data u aktuelnom Priručniku za izvođenje metoda (10) primenom podloge Hranljivi agar (HiMedia) i Petrifilm metodom primenom podloge Aerobic Count Plate (procedura proizvođača 3M) (Uputstvo za korišćenje Petrifilmova).

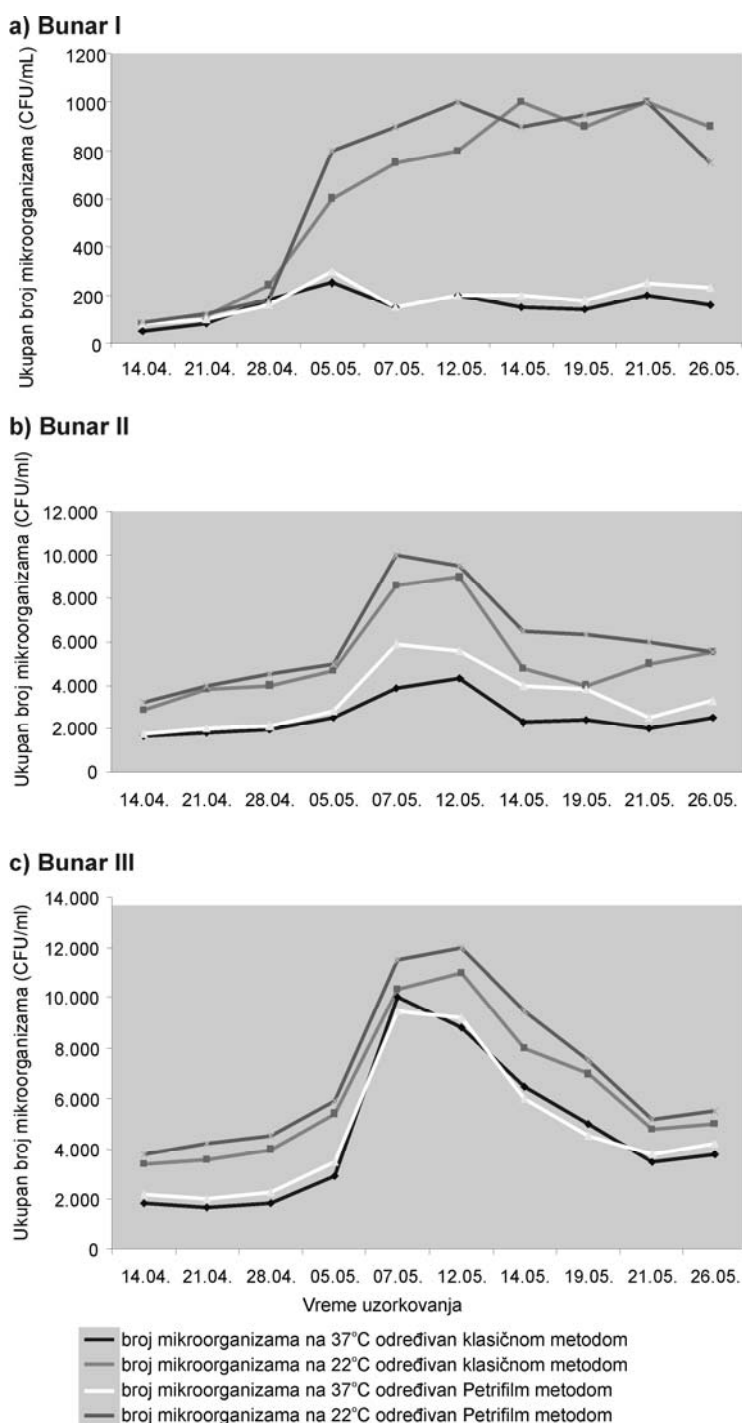
Za utvrđivanje nivoa ATP vrednosti (ukupan i slobodan) u svim uzorcima vode u potpunosti je sleđena procedura od strane proizvođača UNILITE NG (3M BIOTRACE) (3M Biotrace).

Statistička obrada dobijenih podataka urađena je primenom softverskog paketa STATISTICA 6, a kao mera vrednosti koeficijentata proste linearne korelacije primenjene su sledeće vrednosti: manje od 0,7 označava da nema linearne veze; 0,7-0,8 izražena direktna; 0,8-0,9 visoka direktna i 0,9-0,999 veoma visoka direktna linearne korelacija (Žižić i sar., 2007).

REZULTATI I DISKUSIJA

U načelu, pa i u konkretnom pogonu prehrambene industrije tehnološka voda se prevashodno koristi za pranje kruga i kamiona, za hlađenje mašina, za hlađenje motora i uređaja, itd. Povećanje proizvodnje je proteklih pet godina bilo skoro deset puta povećano, a potrošnja vode se za oko osam puta se uvećala. Pored toga, zapažena je sve veća neravnomernost u potrošnji vode po mesecima unutar jedne godine. Naime, povećana potrošnja vode počinje u julu i u narednom tromesečju je maksimalna, odnosno 1,7-2 puta veća nego tokom zimskog perioda. Navedene činjenice upućuju da i državne ustanove kao i menadžment pogona moraju posvetiti posebnu pažnju kvalitetu tehničke vode jer se u interventnim ili akcidentalnim situacijama ta voda koristi i za druge potrebe, odnosno koristi se umesto vode kvaliteta za piće. Ovakav postupak nije izuzetak osobito kada se uzme u obzir cena vode kvaliteta za piće i njeni transportni troškovi.

Rezultati određivanja ukupnog broja mikroorganizama, odnosno aerobnih mezofilnih bakterija, zato što je to jedan od parametara na osnovu kog se može dati orijentaciona procena higijenske ispravnosti, na temperaturama od 37 i 22°C za svaki bunar dati su na slici 1.



Slika 1. UKUPAN BROJ MIKROORGANIZAMA KOJI SU FORMIRALI KOLONIJE NA 37°C I 22°C ODREĐIVAN KLASIČNOM I PETRIFILM METODOM

Figure 1. TOTAL NUMBER OF MICROORGANISAMS WHICH FORMED COLONIES ON 37°C AND 22°C DETERMINED WITH CLASICAL AND PETRIFILM METHOD

Prema Pravilniku (Sl. List SRJ br. 42/98 i 44/99, 2007) određuju se „aerobne mezofilne bakterije“ na čvrstoj hranljivoj podlozi posle inkubacije od 48 h na 37°C u jednom mililitru vode. Veoma korisni su i podaci o brojnosti psihrofila i psihrotrofa (prelazna grupa

između mezofila i psihrofila) pa je određivan odnos između ovih grupa bakterija. Osnovni razlog određivanja ovih grupa je da se može proceniti poreklo bakterija u vodi. U slučaju znatno veće brojnosti psihrotrofa/psihrofila, kao i oligotrofnih bakterija dominantan iz-

vor kontaminacije vode je zemljište, a u suprotnom odnosu može opet biti zemljište, ali sa značajnim udelom antropogenog zagađenja. Zapaža se da je nivo tzv. ukupne bakterijske kontaminacije u širokom rasponu, od 50 do 12.000 CFU/mL, sa izrazitim razlikama između bunara i vremena uzorkovanja. Izvesna sličnost po brojnosti bakterija u vodi u bunara II i III u odnosu na vodu bunara I moguće je delimično objasniti lokacijskom bliskošću i nivoom kontaminiranosti zemljišta, odnosno razlike za 1 do 2 log jedinice upućuju i na iznuđenost mesta kopanja. S druge strane, ukoliko bi se pristupilo obradi tih voda velike razlike u brojnosti nameću nalaženje rešenja za najkontaminiraniju vodu, što povećava investicione i eksploatacione troškove. Prema brojnosti pojedinih grupa bakterija vidljivo je sa slike 1, da je neznatno više psihrotrofa u vodi bunara II i III što dodatno upućuje na zagađenost zemljišta izazvanu ljudskom aktivnošću. U vodi sva tri bunara koncentracija obe grupe bakterija je izrazito različita u odnosu na vreme uzorkovanja. U prva četiri, kao i poslednja dva vremena uzorkovanja brojnost bakterija je istog nivoa, dok je u ostalim vremenima znatno viša (do 1,5 log jedinica). Ovi rezultati se mogu dovesti u vezu sa meteorološkom situacijom u tom periodu, ali se ne bi smeli u potpunosti objašnjenja vezati za tzv. „kišni period“ jer bi to značilo da su bunari vrlo bliski variranju svojstvenom za površinske vode.

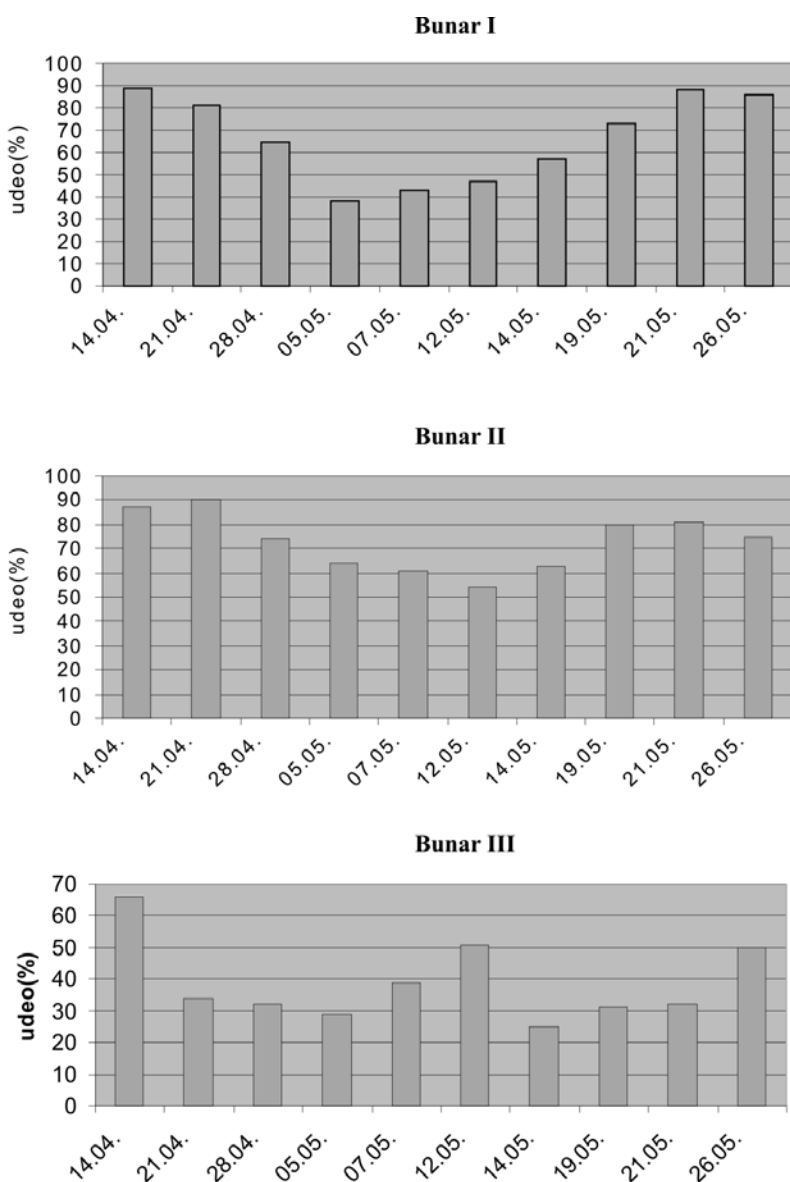
U većini ispitivanih uzoraka vode veći broj kolonija se formirao primenom Petrifilm metode u odnosu na klasičnu metodu. Jedina bitna razlika u primenjenim metodama je manji nivo manipulacija, odnosno manji broj koraka u realizaciji procedure zasejanja, pa se tom činjenicom mogu objasniti dobijene razlike. Nije isključena ni mogućnost da je Petrifilm sa boljom aerobnošću u odnosu na petrijevke zasejane Kohovom metodom, ali ova pretpostavka bi zahtevala dodatna ispitivanja i potvrdu.

Dobijeni rezultati su značajni za menadžment fabrike jer ukazuju na realno sagledavanje mikrobiološke slike tehničke vode. Ta voda u većini pogona može posredno ili neposredno da dođe u kontakt sa proizvodima, odnosno postoji mogućnost da se neka od ispitivanih bakterija nađe u gotovom proizvodu, pa bi dobijeni rezultati trebalo da omoguće kvalitetniju procenu rizika od bakteriološke kontaminacije.

Tabela 1. NIVO ATP VREDNOSTI (RLU) U UZORCIMA VODE
Table 1. LEVEL OF ATP VALUE (RLU) IN SAMPLES OF WATER

r.br. uzorka	datum uzorkovanja	Bunar I			Bunar II			Bunar III		
		ATP ukupni	ATP slobodni	Δ ATP*	ATP ukupni	ATP slobodni	Δ ATP*	ATP ukupni	ATP slobodni	Δ ATP*
1.	14.04.	110	98	12	1,332	1,158	174	238	156	82
2.	21.04.	150	121	39	1,081	975	106	534	184	350
3.	28.04.	130	85	45	1,135	836	299	432	138	294
4.	05.05.	172	65	107	1,160	744	416	451	130	321
5.	07.05.	205	89	116	1,374	844	490	1,565	604	961
6.	12.05.	193	91	102	1,480	805	475	1,501	770	731
7.	14.05.	202	116	86	1,071	674	397	609	150	459
8.	19.05.	200	146	84	1,040	833	171	460	144	316
9.	21.05.	223	197	96	1,140	924	216	427	137	290
10.	26.05.	190	164	89	940	710	230	392	198	194

Δ ATP*: ukupni ATP – slobodni ATP



Slika 2. UDEO SLOBODNOG ATP U ODNOSU NA UKUPAN ATP U UZORCIMA VODE
Figure 2. PERCENT OF FREE ATP RELATED TO TOTAL ATP IN SAMPLES OF WATER

Među metodama za brzu procenu mikrobiološkog kvaliteta vode često se preporučuje i metoda bioluminiscencije, koja je u potpunosti opravdala svoju primenu na drugim mestima pogona prehrambene industrije (Stojanović i sar., 1998a). Merenja u uzorcima vode vršena su sa brisevima za određivanje ukupnog i slobodnog ATP-a (3M Biotrace) da bi se dobile što potpunije informacije o kvalitetu vode bunara, a rezultati su dati u tabeli 1 i slici 2.

Na osnovu izmerenih vrednosti ATP, datih u tabeli 1, može se konstatovati da postoje jasne razlike između bunara. Vrednost ATP ukupnog u uzorcima vode bunara I je u rasponu od 110 do 230 jedinica, dok je vrednost za ATP slobodni za nekoliko desetina niži. Nasuprot toga, u uzorcima vode bunara II je izmerena od 5 do 15 puta veća vrednost ATP ukupnog, a ATP slobodni je 4 do 10 puta veći. Ako se izuzmu 2 vremena uzorkovanja, vrednosti ATP ukupni i slobodni u vodi bunara III je za nekoliko puta veći nego u vodi bunara I, odnosno za nekoliko puta manji nego u vodi bunara II. Razlika izmerenih vrednosti ATP je najveća za uzorke bunara III, a najmanja za uzorke bunara I. Ne zapaža se pravilnost u promeni vrednosti ATP u odnosu na vreme uzorkovanja. Na osnovu svih dobijenih rezultata može se konstatovati da se u većini uzoraka vode nalaze organski ostaci eukariotskih viših organizama, ali i značajan broj živih mikroorganizama. Indirektno ovi rezultati ukazuju na potencijal ove vode kao staništa u kome će se dobro razvijati i alohtoni mikroorganizmi, tj. organizmi sa višim zahtevima u ishrani,

Udeo slobodnog ATP u odnosu na ukupni ATP (slika 2) se kreće u širokom rasponu i uglavnom nije manji od 30%, a ni veći od 90%. Ne zapaža se

pravilnost promene udela između bunara, a ni prema vremenu uzorkovanja.

Za pojedinačne uzorke vode pojedinih bunara zapaža se veza između brojnosti bakterijskih populacija i izmerenih ATP vrednosti. Tako na primer, u vodi bunara I najniže vrednosti ATP su izmerene na početku praćenja, a tada je i ukupan broj bakterija najmanji. S druge strane, najveće vrednosti ukupnog ATP u uzorcima bunara II i III prati najveći broj bakterija po mL uzorka.

Na osnovu dobijenih rezultata mikrobioloških analiza i merenja ATP, koji pokazuju izvesnu sličnost i neke razlike bilo je potrebno određenim statističkim aparatom proveriti značajnost zapaženih veza. Prvi deo korelacione analize u ovom radu se odnosio na utvrđivanje da li postoji kvalitetno slaganje između dobijenih mikrobioloških rezultata. Korelacija je rađena za ukupan broj mikroorganizama na hranljivom agaru i Petrifilmu koji su formirali kolonije na 22 i 37°C, a rezultati su predstavljeni u tabeli 2. Drugi deo

analize odnosio se na sagledavanje veze nivoa ATP ukupni i razlike nivoa ATP (ukupni – slobodni) sa mikrobiološkim rezultatima, što je predstavljeno tabelama 3 i 4.

Iz korelacionog odnosa za ukupan broj mikroorganizama na hranljivom agaru i Petrifilmu kod sva tri bunara na obe temperature se vidi da postoje veoma visoke direktne linearne veze (tabela 2). Na osnovu vrednosti faktora korelacije može se konstatovati da se sličan broj kolonija javlja primenom obe metode, odnosno da ne postoje statistički značajne razlike u rezultatima u slučajevima kada se u uzorku nalazi nekoliko desetina ili nekoliko stotina ćelija po mL.

Korelacioni odnos između ukupnog broja mikroorganizama na Petrifilmu i nivo ATP (ukupni) vrednosti je ispod granice direktne linearne korelacije kod bunara I i bunara II dok je kod bunara III vrlo visoka direktna linearna korelacija za ukupan broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na 37°C i visoka direktna linearna korelacija za ukupan broj mikroorganizama

koji su formirali kolonije na 22°C (slika 1). Sa porastom ukupnog broja mikroorganizama u uzorcima vode iz bunara I i bunara II na Petrifilmu u većem broju uzoraka se nije povećavao nivo ATP (ukupni) vrednosti, dok se u uzorcima iz bunara III sa porastom ukupnog broja mikroorganizama koji su formirali kolonije na 22 i 37°C u većem broju uzoraka povećavao i nivo ATP ukupni. Može se zaključiti da nivo kontaminiranosti zemljišta oko bunara sa organskim ostacima i živim mikroorganizmima direktno utiče na vezu između brojnosti detektovanih bakterija i nivoa ATP.

Iz korelacije ukupnog broja mikroorganizama na Petrifilmu i razlike nivoa slobodnog i ukupnog ATP (tabela 1) se vidi da je kod sva tri bunara na obe temperature značajna, odnosno izražena direktna linearna korelacija, visoka direktna linearna korelacija ili veoma visoka direktna linearna korelacija. Kada se povećavao broj mikroorganizama na Petrifilmu povećavala se i razlika nivoa slobodnog i ukupnog ATP-a, ali se ta veza kreće u rasponu 0,744 do 0,919 izraženo preko koeficijenta korelacije. Dobijeni rezultati ukazuju da je razlika izmerenih vrednosti ATP dobra mera za procenu mikrobiološkog opterećenja u slučaju uspostavljenog monitoringa nad nekim bunarom.

Tabela 2. KOEFICIJENTI KORELACIJE ZA ODNOS UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA ODREĐIVANOG KLASIČNOM I PETRIFILM METODOM
Table 2. COEFFICIENT OF CORRELATION FOR RELATIONS OF TOTAL NUMBER OF MICROORGANISAMS DETERMINED WITH CLASICAL AND PETRIFILM METHOD

Pojava koje se ispituje	bunar I	bunar II	bunar III
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na HA i Petrifilmu na 37°C	0,904	0,935	0,991
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na HA i Petrifilmu na 22°C	0,948	0,941	0,996

Tabela 3. KOEFICIJENTI KORELACIJE ZA ODNOS UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA ODREĐIVANOG PETRIFILM METODOM I UKUPNOG ATP-A
Table 3. COEFFICIENT OF CORRELATION FOR RELATIONS OF TOTAL NUMBER OF MICROORGANISAMS DETERMINED WITH PETRIFILM METHOD AND TOTAL ATP

Pojava koje se ispituje	bunar I	bunar II	bunar III
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na Petrifilmu na 37°C i ATP(ukupni)	0,596	0,472	0,923
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na Petrifilmu na 22°C i ATP(ukupni)	0,408	0,513	0,887

Tabela 4. KOEFICIJENT KORELACIJE ZA ODNOS UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA ODREĐIVANOG PETRIFILM METODOM I RAZLIKA NIVOVA SLOBODNOG I UKUPNOG ATP

Table 4. COEFFICIENT OF CORRELATION FOR RELATIONS OF TOTAL NUMBER OF MICROORGANISAMS ESTIMATED WITH PETRIFILM METHOD AND VARIANCES OF LEVELS OF FREE AND TOTAL ATP

Pojava koje se ispituje	bunar I	bunar II	bunar III
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na Petrifilmu na 37°C i Δ ATP (ukupni – slobodni)	0,745	0,749	0,901
Broj mikroorganizama koji su formirali kolonije na Petrifilmu na 22°C i Δ ATP (ukupni – slobodni)	0,919	0,744	0,886

LITERATURA

- Đukić D., Gajin S., Matavulj M., Mandić L.: Mikrobiologija voda, Prosveta, Beograd (2000).
- Gačeša S., Klašnja M.: Tehnologija vode i otpadnih voda. Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd (1994).
- Karakašević B. i saradnici: Mikrobiologija i parazitologija, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb (1987).
- Klašnja M., Markov S.: Dezinfekcija vode za tehnološki proces proizvodnje u mlekari. Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi, 11 (3-4) (2000) 7-18.
- Markov S.: Mikrobiološka analitika vode, u „Voda u pivarstvu“ (ur. M. Klašnja), jugoslovensko udruženje pivara, Beograd, 66-74 (1998).
- Markov S.: Dezinfekcija u prehrambenoj industriji, u „Dezinfekcija vode“ (ur. B. Dalmacija, J. Agbaba, M. Klašnja), PMF, Departman za hemiju, Novi Sad (2005) 243-251.
- Markov S., Cvetković D., Veličanski A.: Dezinfekcija i biofilmovi, u „Voda i biofilm“ (ur. B. Dalmacija, J. Agbaba, O. Petrović), PMF, Departman za hemiju, Novi Sad (2007a) 291-306.
- Markov S., Veličanski A., Cvetković D.: Biofilmovi u prehrambenoj industriji i njihova kontrola, u „Voda i biofilm“ (ur. ur. B. Dalmacija, J. Agbaba, O. Petrović), PMF, Departman za hemiju, Novi Sad (2007b) 270-285.
- Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće Sl. list SRJ br. 42/98 i 44/99.
- Stojanović E., Zec M., Raić J., Knežević P., Mačak G.: Procena higijene ruku klasičnom metodom i metodom bioluminiscencije, Dani mikrobiologa Jugoslavije, Igalo, 17-19. Jun 1998a, Zbornik radova i sažetaka, 204

Stojanović E., Raič J., Maćak G., Knežević P.: Kontrola higijene linija i vode u pogonu Mlekare, klasičnom metodom i metodom ATP bioluminiscencije, VII Kongres veterinarara Jugoslavije, Beograd, 27-29. Oktobar 1998b, Zbornik radova I, 31.

Škunca-Milovanović S., Feliks R., Đurović B. (urednici): Voda za piće, Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti, Savezni

zavod za zdravstvenu zaštitu i NIP „Privredni pregled“, Beograd (1990).

Uputstvo za korišćenje Petrifilmova: Interpretation Guide Petrifilm™ Aerobic Count Plate. Vrbaški Lj., Markov S.: Praktikum iz mikrobiologije, Prometej, Novi Sad (1992).

Žakula R.: Mikrobiologija hrane, Tehnološki fakultet, Novi Sad (1980).

Žižić M., Lovrić M., Pavličević D.: Metodi statističke analize, Prosveta, Beograd (2007).

3M Biotrace: Uputstvo za korišćenje UN – LITE^RNG-a, Prevod S.E.Ver kd, Novi Sad.

SUMMARY

CORRELATION BETWEEN BACTERIAL POPULATIONS IN SHALLOW WELL WATER FROM FOOD FACTORY AND ATP VALUE

¹Siniša L. Markov, ²Nataša Ivljanin, ¹Dragoljub Cvetković,

¹ University of Novi Sad, Faculty of Technology, ²Alfa-lab, Aleksandrovac

Factories of food industry are big users of water, having quality of drinking water. In order to rationalise water costs and to reduce dependence from local community it is not rare to use a partial water supply from own resources. For that purpose wells are dugged for technical water, not coming into contact with products. Often that water is not subjected to health safety control, so there is a lack of scientific references about its microbiological quality. Therefore researches have been carried out about microbiological status of water from three wells in a particular food factory. In raw water samples total number of aerobic mesophilic bacteria was determined with two methods – standardized and Petrifilm method which is in our country still an alternative method. Number of population of aerobic psychotrophic bacteria was also tested. ATP level was also analysed. For classical microbiological method and quick method of evaluation of microbiological status correlation was researched. Results show that coefficient of correlation was higher than 0.99 for the two applied methods. In most water samples the higher number of bacteria formed colonies when Petrifilm method was used. Connection between number of bacteria and level of total and free ATP value is not statistically significant, while connection with variation of these values (Δ ATP) can be described as high direct linear correlation.

Key words: shallow well water • aerobic mesophilic bacteria • Petrifilm method • ATP value

¹GEORG REITHMAYER
²DUŠANKA STOJSAVLJEVIĆ

¹DSM Food Specialties
²NOVI TRADING NS

NAUČNI RAD

UDK: 637.12:637.07:615.281

ISPITIVANJE REZIDUA ANTIBIOTIKA U MLEKU

Visoki kvalitet mleka i mlečnih proizvoda doprinosi zdravlju potrošača. Upotreba antibiotika u cilju terapije i preventive bolesti goveda dovodi do poboljšanja proizvodnje mleka u kvantitativnom i kvalitativnom pogledu. Međutim, mana ovakvog tretmana je rizik od prisustva rezidua antibiotika u mleku sa farmi koje snabdevaju industriju mleka. Rezidue antibiotika mogu negativno da utuče na zdravlje potrošača, a takođe prouzrokuju probleme prilikom proizvodnje sira i jogurta. Da bi garantovali da je mleko slobodno od bilo kakvih rezidua antibiotika sprovode se sistematske mere i podržavaju od strane redovnih državnih organa, međunarodnih organizacija i, na kraju, ali ne manje značajno, od strane industrije mleka i samih proizvođača.

Kvalitetno gazdovanje u pristupu sprečavanja rezidua antibiotika u proizvodnji mleka na farmama počinje od sirovog mleka i ide do krajnjeg proizvoda. Kvalitet kontrolnog sistema u industriji mleka u svrhu kontrole rezidua antibiotika, u osnovi se zasniva na dva principa:

1. Procena kvaliteta mleka na farmi od koje zavisi cena što ima direktan povratni uticaj na proizvođače mleka.

Ključne reci: mleko • antibiotici • kvalitet • testovi

2. Procena dovezene mleka u fabriku mleka pre istovara u cisterne. Dalje kontrole pri preradi mleka mogu se vršiti na nivou cisterne ili za vreme prerade. Krajnji proizvodi takođe podležu kontroli od strane mlečne industrije i državnih inspeksijskih službi.

Ovi sistematski načini kontrole u toku procesa proizvodnje od sirovog mleka do krajnjih proizvoda (od paše do čaše) trenutno su utvrđeni i primenjuju se u većini mlečnih industrija razvijenih zemalja. Međutim, postoje izvesne razlike od zemlje do zemlje. Metodologija i učestalost analiza utvrđenih parametara kontrole mogu se razlikovati uglavnom kao posledica istorijskih i praktičnih pristupa.

Za oba kontrolna sistema kvaliteta mora biti na raspolaganju metodologija koja ispunjava zahteve u pogledu parametara kontrole kvaliteta i praktične primene. Delvotest® ACCELERATOR je test širokog spektra na rezidue antibiotika.

Poređenje između različito utvrđenih bezbednih odnosno tolerantnih nivoa pokazuje da postoje razlike u lekovima a takođe u njihovim prihvatljivim nivoima rezidua. Na internacionalnom nivou to zahteva diskusiju za usaglašavanje.

Široka i intenzivna upotreba dijagnostičkih testova za utvrđivanje rezidua antibiotika u mleku od paše do čaše u mnogome pomažu visokom standardnom kvalitetu mleka za potrošače, a

Delvotest® ACCELERATOR je najnoviji iz spektra ovih testova koji se koristi u referentnim laboratorijama, zbog svoje mogućnosti da istovremeno analizira 400 uzoraka sirovog mleka.

Primer liste od dva utvrđena nivoa u svetu za izvesne antibiotike
 Example of particular antibiotics level in USA and EU

Preparat	USA (bezbedan nivo)	EU (maks. nivo rez.)
Penicillin G	5 ppb	4 ppb
Amoxicillin	10 ppb	4 ppb
Cloxacillin	10 ppb	30 ppb
Cephapirin	20 ppb	10 ppb
Cephalonium	Ne	10 ppb
Cefuroxim	Ne	Ne
Tetracycline	* 300 ppb	100 ppb
Neomycin	* 150 ppb	500 ppb
Sulfamrthazine	* 10 ppb	100 ppb

Ne= trenutno nije utvrđen nivo

*= nije određen nivo u Appendix N programu za transportna vozila

Adresa autora:
 Dušanka Stojšavljević, NOVI TRADING NS,
 Bulevar Oslobođenja 54, 21 000 Novi Sad
 tel.: +381 21 444 102; fax: +381 21 477 80 13
 e-mail: info@ntns.co.rs

SUMMARY**ANALYSIS OF ANTIBIOTICS RESIDUES IN MILK**

¹Georg Reithmayer, ²Dužanka Stojisavljević

¹DSM Food Specialties, ²NOVI TRADING NS

High quality of milk and dairy products improves consumers' health. Usage of antibiotics for preventing and curing bovine illnesses improves milk quality and increases its quality. However, this treatment causes risk of antibiotics presence in milk processed in dairy industry. Antibiotics residues may negatively affect consumers' health and generate problems during cheese and yoghurt production. In order to ensure that there is no antibiotics residues in milk, constant action are being undertaken by the state, international organizations, dairy industry and milk producers.

Quality control system concerning the antibiotics residues is based on two principles:

1. evaluation of milk quality,
2. evaluation of milk delivered to the factory.

Further control can be carried out in delivery tanks or during processing. Final products are controlled by the dairy industry and state inspections.

The aforementioned way of control is being applied in most developed countries. Nevertheless, certain differences from country to country do exist, mostly due to different historical and practical approaches.

Methodology which fulfils requirements concerning quality control parameters and practical application is Delvotest ® ACCELERATOR with a wide spectra of antibiotics residues.

Key words: antibiotics residues • milk • dairy products • quality • Delvotest ® • consumers' health

PREDRAG D. PUĐA
JELENA B. MIOČINOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet, Institut za
prehrambenu tehnologiju i
biohemiju

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.3:637.046/.047

Savremena kretanja u medicini ukazuju na značaj načina ishrane u očuvanju i poboljšanju zdravlja ljudi. S tim u vezi, poslednjih godina prisutno je izraženo interesovanje za sagledavanje mogućnosti proizvodnje sireva sa dijetetskim i funkcionalnim svojstvima. U radu su prikazana dosadašnja istraživanja o proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti i soli, kao i sireva sa probiotskim bakterijama i prehrambenim vlaknima koji pripadaju grupi proizvoda sa izraženim dijetetskim i funkcionalnim svojstvima.

Ključne reči: sirevi sa smanjenim sadržajem masti • sirevi sa smanjenim sadržajem soli • probiotske bakterije • prehrambena vlakna

UVOD

Proizvodi od mleka, uključujući sireve, podesan su materijal za razvijanje proizvoda sa dijetetskim i funkcionalnim svojstvima koji mogu imati pozitivan učinak u održavanju i poboljšanju zdravlja ljudi.

Savremeni koncept ishrane, poslednjih godina, podrazumeva sve veću popularnost proizvoda kod kojih je prisustvo komponenata, kao što su mlečna mast i kuhinjska so, koje mogu imati negativne efekte na zdravlje potrošača, svedene na minimum.

S tim u vezi, aktuelna istraživanja obuhvataju ispitivanja mogućnosti proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem masti i soli.

Adresa autora:
Prof. dr Predrag Puđa,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet,
Nemanjina 6, Zemun – Beograd
tel: +381 11 2615-315 / lok 270
e-mail: pudja@agrif.bg.ac.rs

SIREVI SA DIJETETSKIM I FUNKCIONALNIM SVOJSTVIMA

Pored važnih nutritivnih i dijetetskih svojstava namirnica, poslednjih godina se potenciraju i njihova funkcionalna svojstva, koja se prevashodno odnose na pozitivne efekte na zdravlje ljudi. U grupi proizvoda izraženih funkcionalnih svojstava ističu se proizvodi sa probiotskim bakterijama i prehrambenim vlaknima. S tim u vezi, istraživanja o mogućnosti inkorporiranja probiotika, u kombinaciji sa prehrambenim vlaknima, u proizvodnji sireva su poslednjih nekoliko godina veoma aktuelna tema.

U proizvodnji prehrambenih proizvoda sa izraženim dijetetskim i funkcionalnim svojstvima neophodno je obezbediti i adekvatan kvalitet proizvoda U okviru toga se posebno izdvajaju senzorna svojstva, što je kod ovakvih proizvoda veoma važno za njihovu prihvatljivost od strane potrošača.

U radu su prikazana dosadašnja istraživanja mogućnosti proizvodnje različitih vrsta sireva koji se odlikuju izraženim dijetetskim i funkcionalnim svojstvima. Ona obuhvataju sireve sa smanjenim sadržajem masti i soli, sireve sa probiotskim bakterijama i prehrambenim vlaknima.

SIREVI SA DIJETETSKIM SVOJSTVIMA

U pogledu dijetetskih svojstava najznačajnije komponente proizvoda od mleka, uključujući sireve, su mlečna mast i kuhinjska so. S obzirom da su ove komponente sastava mlečnih proizvoda često nepoželjne i mogu imati negativne implikacije na zdravlje ljudi, poslednjih godina se veliki broj tehnoloških istraživanja bavi izučavanjem mogućnosti smanjenja sadržaja mlečne masti i soli u siru.

Sirevi sa smanjenim sadržajem masti

Mlečna mast je značajna nutritivna komponenta mleka i sira i u velikoj meri doprinosi formiranju specifičnih senzornih i funkcionalnih svojstava pojedinih mlečnih proizvoda. Smanjenje sadržaja masti u sirevima, posebno onih sa zrenjem, rezultira često u formiranju atipičnih svojstava, kao npr. neadekvatne teksture, nedovoljno izraženog i gorkog ukusa i sl.

Poslednjih godina veliki broj naučnih radova bavio se pitanjem iznalaženja rešenja za probleme koji se javljaju u proizvodnji različitih vrsta sireva sa smanjenim sadržajem masti u siru, a sve sa ciljem poboljšanja njihovih svojstava. Ispitivani sirevi uključuju vrste kao što su čedar (Banks i sar., 1989, Metzger i Mistry, 1994, 1995, Mistry i sar., 1996, Guinee i sar., 1998, 2000, Fenelon i sar., 2000, Fenelon i Guinee, 2000, Nelson i Barabano, 2004); mocarela (Fife i sar., 1996, McMahon i sar. 1996, Poduval i Mistry, 1999, Dave i sar. 2003); feta (Katsiari i Voutsinas, 1994a, Michalidou i sar., 2003a); sirevi u salamuri (Romeih i sar., 2002, Madadlou i sar., 2007); kefalograviera (Katsiari i Voutsinas, 1994b, Michalidou i sar., 2003b, Kondyli i sar., 2003); edam (Tungjaroenchai i sar., 2001); danbo (Madsen i Ardo, 2001); havarti (Lo i Bastian, 1998), ras (Kebary i sar., 1999), i sirevi od UF mleka (Đerovski i sar., 2007, 2008, Puđa, 2008).

Sastav i svojstva sireva sa smanjenim sadržajem masti

Smanjenje sadržaja masti u mleku i siru rezultuje u izmenjenom odnosu pojedinih komponenata hemijskog sa-

stava u odnosu na odgovarajuću vrstu sira sa uobičajenim sadržajem masti. Generalno, sirevi sa smanjenim sadržajem masti imaju veći sadržaj vode i proteina, a manji sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira (VBMS), masti u svojoj materiji sira (MSM) i soli u vodenoj fazi sira (S/VF) u odnosu na odgovarajuće vrste punomasnih sireva. Ipak, u malom broju slučajeva postoje izvesna odstupanja u pogledu sastava niskomasnih sireva (Katsiari i Voutsinas, 1994, Michaleidou i sar. 2003a).

Razlike u sastavu sireva sa različitim sadržajem masti se značajno reflektuju na njihova senzorna i funkcionalna svojstva. Naime, veliki sadržaj proteina i mali sadržaj MSM sireva sa smanjenim sadržajem masti često rezultira u formiranju izrazito čvrste i, kao takve, nepodesne teksture proteinskog matriksa.

Ukus i miris sireva sa smanjenim sadržajem masti, posebno sireva sa zrenjem, često je atipičan, gorak i nedovoljno izražen. Razlozi pojave defekata ukusa i mirisa sireva sa smanjenim sadržajem masti su brojni.

Sirevi sa smanjenim sadržajem masti se odlikuju manjim obimom lipolitičkih promena, koje doprinose manjem obimu nastajanja slobodnih masnih kiselina i drugih aromatskih jedinjenja koja su važna za ukus i miris sireva. Pored toga, nedostatak masti kao rastvarača brojnih aromatskih jedinjenja doprinosi formiranju neizraženog ukusa i mirisa sira (Katsiari i Voutsinas, 1994). Izmenjeni parametri sastava i strukture sireva sa smanjenim sadržajem masti, kao što su struktura proteinskog matriksa, tok proteolitičkih promena tokom perioda zrenja, pH vrednost i sadržaj soli u vodenoj fazi masti mogu takođe indirektno uticati na stvaranje defekata arome sira (Mistry, 2001).

Jedan od najčešćih problema u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti je pojava gorkog ukusa kao posledica formiranja hidrofobnih gorkih peptida, a koji nastaju aktivnošću različitih proteinaza, posebno enzima startera, na kazein. Smatra se da se gorki hidrofobni peptidi u siru formiraju neadekvatnom razgradnjom α_{s1} i β kazeina, posebno delovanjem proteinaza na hidrofobni region C-terminalnog dela β kazeina, i/ili ukoliko su prisutni u izrazito visokim koncentracijama (McSweeney, 1997). Mistry i Kasperon (1998) navode da je sadržaj soli u siru manji od 4,5% S/VF i upotreba startera sa malom proteolitičkom aktivnošću najpodesnija kom-

binacija za proizvodnju sireva sa smanjenim sadržajem masti. Za razliku od sireva sa smanjenim sadržajem masti, u sirevima sa velikim sadržajem masti gorki peptidi se apsorbuju u masnu fazu, što takođe smanjuje pojavu gorčine u ovim sirevima.

Ukus i miris sireva sa smanjenim sadržajem masti zavise od aromatskih komponenti koje su osnovni nosioci arome određene vrste sira. S tim u vezi, Katsiari i Voutsinas (1994) navode da niskomasni feta sir ima zadovoljavajuća senzorna svojstva, jer su generalno nosioci ukusa ovog sira niska pH vrednost, odnosno izražena kiselost, veliki sadržaj soli, kao i ograničen obim proteolize koji su prisutni i kod sireva sa smanjenim sadržajem masti.

Izmenjen hemijski sastav sireva sa smanjenim sadržajem masti odražava se na tok i obim proteolitičkih promena tokom zrenja, kao i na stvaranje defekata teksture sira. Proteinski matriks, koji predstavlja osnovu strukture sira, zahvaljujući prisustvu inkorporirane masti, obezbeđuje tzv. "gladak" ukus punomasnih sireva. Kada se mast odstrani ili njen sadržaj smanji, tendencije kazeina ka agregiranju postaju izraženije, te snažnije utiču na formiranje teksture sira, što najčešće rezultira nastankom izrazito čvrstog i tvrdog sirnog testa. Tekstura sireva sa smanjenim sadržajem masti najčešće se opisuje kao atipična, i to sa sledećim terminima: "slaba", "gumena", "piskovita" i dr. Što je smanjenje masti u siru veće to su negativni efekti na teksturu sira izraženiji.

Razgradnja proteina tokom zrenja sireva usko je povezana sa sadržajem vode i soli u siru. Sirevi sa smanjenim sadržajem masti, kao što su feta (Katsiari i Voutsinas, 1994, Michaelidou i sar., 2003a), kefalograviera (Michaelidou i sar., 2003b), čedar (Fenelon i sar., 2000, Fenelon i Guinee, 2000) imaju manji sadržaj rastvorljivih azotnih materija u odnosu na odgovarajuću vrstu sira sa većim sadržajem masti. Manji sadržaj rastvorljivih azotnih materija je delimično posledica manjeg sadržaja VBMS sireva sa smanjenim sadržajem masti, razlike u zadržavanju koagulanata, odnosno izmenjenom odnosu koagulant:kazein.

Visoka pH vrednost prilikom odli-vanja surutke i niže temperature do-grevanja, koje se često koriste u pro-izvodnji sireva sa smanjenim sadržaj-em masti, doprinose zadržavanju ma-nje količine koagulanata u sirnom tes-tu. Ova činjenica bi jednim delom mo-

gla biti razlog manjeg obima razgrad-nje proteina tokom zrenja sireva sa smanjenim sadržajem masti. Ipak, uti-caj smanjenja sadržaja masti na tok proteolitičkih promena je različit u za-visnosti od vrste sira i primenjenog tehnološkog postupka proizvodnje Mi-chaelidou i sar., (2003b).

Razgradnja proteina, posmatrana elektroforetskim metodama, pokazuje razlike među sirevima sa različitim sadržajem masti. Čedar sa smanjenim sadržajem masti se odlikuje sporijom degradacijom α_{s1} kazeina i bržom razgradnjom β kazeina. S druge strane, veći sadržaj intaktnog α_{s1} i β kazeina prisutnih u sastavu sira je verovatno posledica većeg sadržaja proteina, kao i izmenjenog odnosa rezidualnog himozina i proteina kod sireva sa smanjenim sadržajem masti (Fenelon i Guinee, 2000).

Izmenjen hemijski sastav, tok i obim proteolitičkih promena sireva sa smanjenim sadržajem masti, u velikoj meri se odražavaju na funkcionalna svojstva sira. Funkcionalna svojstva sireva, kao što su sposobnost topljenja, stepen izdvajanja ulja, raste-gljivost i dr., posebno su značajna ukoliko se sirevi koriste kao ingredijenti u pripremi pica, sendviča i sl. Funkcio-nalna svojstva sireva zavise od vrste i sastava sira, stepena zrelosti, odnos-no obima razgradnje proteina u siru (Miočinović i Puđa, 2005, Đerovski i sar., 2006).

Uticao smanjenja sadržaja masti na funkcionalnost sireva je najviše proučavana kod mocarele (Fife i sar., 1996, Dave i sar., 2003) i čedra (Guinee i sar., 2000, Awad i sar., 2005). Generalno, sirevi sa smanjenim sadržajem masti pokazuju lošija funkcio-nalna svojstva (Tunick i sar., 1993, Fife i sar., 1996). Pogoršanje funkcio-nalnih svojstava je posledica smanje-nog sadržaja VBMS, ograničenog obi-ma proteolize, manje količine izdvo-jene masti i većeg sadržaja intaktnog kazeina u siru sa smanjenim sadržaj-em masti. Funkcionalna svojstva sire-va sa smanjenim sadržajem masti se mogu poboljšati modifikacijom potup-ka proizvodnje, upotrebom EPS+ star-ter kultura (Broadbent i sar., 2001, Awad i sar., 2005) ili adekvatnom formulacijom sastava sira, posebno u pogledu sadržaja kalcijuma (Sheehan i Guinee, 2004).

Proizvodnja sireva sa smanjenim sadržajem masti

U cilju optimizacije i dobijanja pri-hvatljivih senzornih i funkcionalnih

svojstava proizvoda, tehnološki postupak proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem masti u velikoj meri podrazumeva izmene u odnosu na tradicionalan, uobičajan način dobijanja odgovarajuće vrste sira. Izmene tehnološkog postupka proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem masti podrazumevaju izmene pojedinih operacija, dodavanje dopunskih kultura i upotrebu aditiva - zamjenjivača masti.

Modifikacija pojedinih operacija tehnološkog postupka proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem masti veoma je jednostavan i ekonomičan način za postizanje odgovarajućih senzornih svojstava sireva sa smanjenim sadržajem masti.

Početni korak u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti je standardizacija mleka, pri čemu se sadržaj mlečne masti, tj. odnos kazein : mast, dovode na željeni nivo, zavisno od željenog sadržaja masti u siru (Puđa i sar., 2000). Sastav mleka namenjenog proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti se, pored uobičajenog načina standardizacije, može postići i dodavanjem kondenzovanog mleka (Anderson i sar., 1993), ultrafiltriranog ili mikrofiltriranog koncentrata u prahu i direktnom ultrafiltracijom (Banks 2004). Ipak, alternativne metode standardizovanja sastava mleka često rezultiraju u stvaranju neadekvatne teksture proizvoda (Anderson i sar., 1993).

Jedan od osnovnih zadataka u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti je povećanje sadržaja vode u siru što omogućava poboljšanje teksture sira. S druge strane, veoma je važno uskladiti sadržaj VBMS i S/VF, kao ključnih faktora brojnih promena u toku zrenja sireva (Rodriquez, 1998). U proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti poželjno je sadržaj VBMS dovesti na nivo istovetan kao kod punomasnih sireva (Miočinović i Puđa, 2009). Smanjenje sadržaja masti u čedru rezultira većim sadržajem vode i proteina, ali manjim sadržajem VBMS (Guinee i sar., 2000).

Veći sadržaj vode u siru se delimično može postići izmenama pojedinih operacija tehnološkog postupka proizvodnje. Takve operacije, alternativne ili modifikovane u odnosu na tradicionalan postupak proizvodnje, moraju biti strogo kontrolisane kako bi se sprečili problemi tokom sirišne koagulacije mleka, ostvarilo postizanje zadovoljavajućeg randmana proizvodnje i omogućilo formiranje senzornih

svojstava karakterističnih za pojedine vrste sireva.

Zadržavanje većeg sadržaja vode u čedru (Banks i sar., 1989) i kefalograviera siru (Katsiari i Voutsinas, 1994b) može se postići primenom nižih temperatura dogrevanja i povišenjem pH vrednosti prilikom mlevenja sirne grude čedra (Guinee i sar., 1998).

U USA najzastupljenija izmena tradicionalnog postupka za proizvodnju čedra sa smanjenim sadržajem masti je operacija ispiranja sirne grude hladnom vodom (22°C). Ovim postupkom smanjuje se sinerezis i odstranjuje rezidualna laktoza, što smanjuje mogućnost povećanja kiselosti grude i doprinosi dobijanju grude većeg sadržaja vode i manje kiselosti. Ispiranje sirne grude takođe doprinosi većoj rastvorljivosti kalcijum fosfata i hidratisanosti kazeina, što rezultira mekšim sirnim testom. Negativni efekti ovog postupka su gubici aromatskih jedinjenja, što se često odražava u stvaranju slabo izraženog i netipičnog ukusa zrelog sira (Banks i sar., 1989).

Veći sadržaj vode u sirevima sa smanjenim sadržajem masti se može postići inkorporacijom serum proteina, koji imaju izraženu sposobnost vezivanja vode (Miočinović, 2004). Primenom strogog režima termičke obrade mleka postiže se inkorporacija denaturisanih serum proteina, dok se primenom postupka ultrafiltracije zadržavaju nativni serum proteini u siru. Najveće zadržavanje vode u siru postiže se primenom oba postupka pri čemu se strogim režimom termičke obrade povećava sadržaj denaturisanih serum proteina, a procesom UF sadržaj ukupnih proteina (Lo i Bastian, 1998, Rodriquez i sar., 1998). Negativni efekti primene strogog režima termičke obrade i/ili UF procesa u proizvodnji sireva su izmenjen profil proteolitičkih promena, odnosno smanjen obim razgradnje kazeina, posebno α_{s1} kazeina (Lo i Bastian, 1998, Puđa, 1992, Puđa i Guinee, 1998). U proizvodnji mocarele primena strogog režima termičke obrade ne pokazuje negativne efekte na fizička i senzorna svojstva sira (Punidades i sar., 1999, Kebary i sar., 1999).

Proizvodnja sireva sa smanjenim sadržajem masti je, u nekoliko istraživanja, zasnovana na primeni homogenizacije mleka ili pavlake. Homogenizacijom mleka se povećava površina masnih globula, što može uticati na poboljšanje teksture sireva sa smanjenim sadržajem masti. Među-

tim, homogenizacija mleka može imati neželjene efekte na proteinsku strukturu sira i interakcije kazein-mast. To nepovoljno utiče na sposobnost formiranja gela, sinerezis, odnosno obradu grušta i senzorna svojstva sira. Homogenizacija mleka ili pavlake pri odgovarajućem pritisku primenjena je u proizvodnji čedra (Metzger i Mistry, 1994, 1995), mocarele (Tunick i sar., 1993, Rowney i sar., 2003), iranskog belog sira u salamuri (Madadlou i sar., 2007).

Primena homogenizacije mleka pri nižem pritisku i nižim temperaturama dogrevanja doprinosi većem zadržavanju vode u siru i dobijanju zadovoljavajućih teksturalnih i funkcionalnih svojstava mocarele sa smanjenim sadržajem masti, koje su uporedive sa svojstvima punomasnih sireva (Tunick i sar., 1993). Rudan i sar. (1998) navode da homogenizacija mleka ili pavlake ne utiče značajno na teksturalna i funkcionalna svojstva sira, ali poboljšava izgled sireva pre termičkog tretmana. Mocarela proizvedena od homogenizovanog mleka ili pavlake ima izrazito belu boju i manji stepen izdvajanja masti (Poduval i Mistry, 1999), ali pokazuje ograničenu sposobnost topljenja i intenzivnu promenu boje prilikom zagrevanja sira (Rudan i sar., 1998).

U proizvodnji čedra sa smanjenim sadržajem masti, standardizacija obranog mleka sa homogenizovanom pavlakom (Metzger i Mistry, 1994, 1995) doprinosi zadržavanju većeg sadržaja vode u sirnom testu, dobrim teksturalnim i funkcionalnim svojstvima sira, kao i dobrom randmanu proizvodnje. Madadlou i sar., (2007) su u proizvodnji iranskog belog sira u salamuri dodavali homogenizovanu pavlaku tokom standardizacije obranog mleka. Sirevi proizvedeni uz dodatak homogenizovane pavlake su pokazali bolja teksturalna, funkcionalna i senzorna svojstva, posebno pri primenjenom nižem pritisku homogenizacije, od sireva proizvedenih od mleka standardizovanog dodavanjem nehomogenizovane pavlake.

Slatka mlačenica koncentrovana primenom ultrafiltracije je korišćena za proizvodnju čedra (Mistry i sar., 1996) i mocarele (Poduval i Mistry, 1999) sa smanjenim sadržajem masti. Proizvodnja sireva sa smanjenim sadržajem masti uz dodatak UF mlačenice rezultira povećanjem sadržaja vode u siru, čime se postiže mekša i prihvatljiva tekstura sira. Upotreba UF mlačenice u proizvodnji mocarele sa sma-

njenim sadržajem masti, rezultira smanjenjem stepena izdvajanja masti i topivosti sira, ali uz istovremeno postizanje zadovoljavajuće teksture sira.

Nelson i Barbano (2004) razvili su novi proces odstranjivanja masti iz zrelog čedra različite starosti, koji su upotreбили za proizvodnju čedra sa 50% smanjenim sadržajem masti. Aroma čedra sa smanjenim sadržajem masti u potpunosti odgovara zrelog sira (Whetstine i sar., 2006). Takvi rezultati ukazuju da aromatske komponente, koje opredeljuju aromu zrelog sira, ostaju i u sira sa smanjenim sadržajem masti nakon njenog uklanjanja razvijenim postupkom.

Jedan od načina poboljšanja svojstava sireva sa smanjenim sadržajem masti, posebno arome sira, je upotreba dopunskih kultura. Ispitivanja o uticaju dopunskih kultura na svojstva sireva sa smanjenim sadržajem masti, korišćenjem različitih sojeva mikroorganizama, vršena su na brojnim vrstama sireva, kao što su čedar (Fenelon i sar., 2002); edam (Tungjaroenchai i sar., 2001); feta (Katsiari i sar., 2002a, b, Michaelidou i sar., 2003a); kefalograviera (Katsiari i sar., 2002b), sirevi od UF mleka (Đerovski i sar., 2008).

Dopunske kulture koje se dodaju u proizvodnji sireva trebalo bi da ispunjavaju zahteve za malom acidogenom i izraženom proteolitičkom aktivnošću. Slabija acidogena sposobnost ovih kultura je neophodna kako bi se sprečio intenzivni razvoj kiselosti, što bi usled većeg prisustva vode u sirevima sa smanjenim sadržajem masti, omogućilo stvaranje defekata ukusa. S druge strane, izražena i kontrolisana proteolitička a posebno peptidazna aktivnost dopunskih kultura, smanjuje mogućnost pojave gorčine usled formiranja većeg sadržaja željezinih peptida koji su osnovni nosioci arome sira. Generalno, dopunske kulture značajno ubrzavaju proteolitičke promene i povećavaju sadržaj malih peptida i slobodnih aminokiselina tokom zrenja velikog broja različitih vrsta sireva.

U proizvodnji čedra sa smanjenim sadržajem masti Fenelon i sar. (2002) ustanovili su da se tokom zrenja sireva sa dopunskim kulturama formira viši nivo niskomolekularnih peptida i slobodnih aminokiselina. Najizraženiji pozitivan efekat na senzorna svojstva sireva pokazali su *L. helveticus*, *Leuc. cremoris* i *Lc. lactis* var. *Diacetylactis*. Slične rezultate navode Tungjaroenchai i sar. (2001) koji su ispitivali uticaj različitih dopunskih kultura na sastav i

senzorna svojstva edamskog sira sa smanjenim sadržajem masti. Sirevi proizvedeni sa *L. helveticus* i *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* imali su veći obim proteolitičkih promena, dok su sirevi sa *L. helveticus* i *L. reuteri* imali najbolja teksturalna svojstva. Shodno rezultatima autori zaključuju da je *L. helveticus* najadekvatnija dopunska kultura sa izraženim pozitivnim efektima na svojstva sireva.

Primena komercijalnih dopunskih kultura koje sadrže *Lc. lactis* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* subsp. *lactis* u proizvodnji niskomasnog feta sira, utiče na poboljšanje senzornih svojstava sira. Poboljšanje senzornih svojstava nastaje verovatno kao posledica stvaranja većeg obima malih peptida i slobodnih aminokiselina kao prekursora ukusa i mirisa, posebno u kasnijim fazama zrenja (Katsiari i sar., 2002a, Michaelidou i sar., 2003a). U modifikovanom tehnološkom postupku proizvodnje kefalograviera sira dodavanje dopunskih kultura koje sadrže *L. casei* ssp. *rhamnosus*, *Lc. lactis* subsp. *Lactis* i *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ne utiču na sastav i tok primarne proteolize, ali značajno utiču na sekundarnu proteolizu, formirajući veći sadržaj malih peptida, slobodnih aminokiselina, kao i drugih brojnih aromatskih komponenti sira (Kondyli i sar., 2003, Michaelidou i sar., 2003b). Izražena lipoliza i sekundarna proteoliza, kao posledice dopunskih kultura, reflektuju se na formiranje veoma dobrih senzornih svojstava eksperimentalnih sireva (Katsiari i sar., 2002b).

Poseban segment korišćenja dopunskih kultura je mogućnost inkorporacije probiotskih bakterija. S obzirom da su sirevi pogodan medijum za inkorporaciju probiotskih bakterija u cilju dobijanja proizvoda multi funkcionalnih svojstava, neophodno je proizvodnju sireva sa smanjenim sadržajem masti povezati sa primenom probiotika (Miočinović i Puđa, 2004). Primena probiotskih dopunskih kultura u sirevima sa smanjenim sadržajem masti može doprineti poboljšanju njihovih senzornih svojstava, s jedne strane, i postizanju funkcionalnih svojstava, s druge strane (Ryhänen i sar., 2001, Miočinović i Puđa, 2007, Puđa i sar., 2008, Đerovski i sar., 2008). Đerovski i sar., (2008) navode da dodavanje probiotskih bakterija utiče na poboljšanje senzornih svojstava, posebno ukusa i mirisa, niskomasnih sireva od UF mleka.

Dodavanje aditiva u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti

takođe je jedan od puteva kojim se može postići poboljšanje senzornih svojstava ovih sireva. Aditivi, koji se dodaju radi maskiranja nedostatka određene količine masti klasifikuju se kao zamenjivači i imitatori masti. Zamenjivači masti su u osnovi materijali zasnovani na masti koja poseduje slične fizičke i funkcionalne osobine kao i prirodne masti, ali smanjuju kalorijsku vrednost proizvoda. Imitatori masti, koji su znatno primenjiviji u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti, imitiraju prirodne masti i imaju izraženu sposobnost vezivanja vode, što povoljno utiče na svojstva, posebno teksturu, i randman proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem masti (Rodriguez, 1998).

Dairy Lo, komercijalni proteinski preparat za imitaciju masti, utiče na promenu mikrostrukture i na povećanje sadržaja vode i VBMS, što rezultira u mekšoj konzistenciji čedar sira (Fenelon i Guinee, 1997, Aryana i Haque, 2001), ali ne utiče na tok i obim primarne proteolize tokom zrenja sireva sa smanjenim sadržajem masti.

U proizvodnji mocarele sa smanjenim sadržajem masti, imitatori masti kao što su ugljenohidratni aditivi Stellar i Novagel i proteinski imitatori masti Dairy Lo i Simplese, doprinose zadržavanju većeg sadržaja vode, što utiče na poboljšanje funkcionalnih svojstava sira. Topivost sireva se znatno povećava upotrebom Stellar i Simplese imitatora masti, dok se korišćenjem Novagela i Dairy Lo pogoršavaju funkcionalna svojstva sira (McMahon i sar., 1996). Romeih i sar. (2002) navode da u proizvodnji sireva u salamuri sa smanjenim sadržajem masti imitatori masti Simplese D-100 i Novagel NC-200 utiču na zadržavanje većeg sadržaja vode, poboljšanje teksturalnih svojstava sira i povećanje randmana proizvodnje. U pogledu senzornog kvaliteta, najbolja svojstva je pokazao sir proizveden sa Novagelom.

Kao potencijalni zamenjivači masti u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti mogu se koristiti i različite vrste prehrambenih vlakana.

Sirevi sa smanjenim sadržajem soli

Sirevi, posebno sirevi Mediteranskog pojasa kao što su sirevi u salamuri, su namirnice koje su veoma često opterećene velikim sadržajem soli. Povećano prisustvo soli se delimično opravdava tehnološkim zahte-

vima, koji su pretežno usvojeni iz tradicionalne proizvodnje sireva u salamuri, a delimično su proizašli iz tradicije ishrane ovim sirevima, koja je velikim delom vezana za topla područja za koja je karakterističan povećan dnevni unos soli.

So u siru ima višestruku ulogu i utiče na brojne aspekte kvaliteta kao što su: senzorna i nutritivna svojstva sireva; rast i aktivnost mikroorganizama, posebno patogenih, što utiče na povećanje bezbednosti proizvoda; aktivnost pojedinih enzima u siru; sinerezis sirne grude, pri čemu se vrši regulacija sadržaja vlage u sirevima, što indirektno utiče na aktivnost mikroorganizama i enzima; promene na proteinima koje uzrokuju promene teksture sira, rastvorljivosti proteina i njihovu konformaciju (Miočinović i sar., 2003).

U ishrani ljudi jedna od osnovnih uloga kuhinjske soli je obezbeđivanje potrebnih količina natrijuma neophodnih za neometano odvijanje metaboličkih procesa u organizmu. Smatra se da prosečna fiziološka potreba ljudskog organizma iznosi oko 200 mg natrijuma odnosno 0,5g NaCl (IFT, Dillon, 1987). U USA preporučena gornja granica za dnevni unos natrijuma iznosi 2,3 g/dan, što čini oko 6,0 g NaCl (max. 8,3g) (Dietary Guidelines for Americans, 2005). U svakodnevnoj ishrani ljudi obično se unosi veća količina natrijuma od potrebne, odnosno oko 4–5g Na/dan što čini 10–12 g NaCl (Dillon, 1987).

Preterani unos natrijuma može izazvati razne fiziološke poremećaje, od kojih su najznačajniji hipertenzija i izlučivanje kalcijuma iz koštanog tkiva, što dovodi do osteoporoze (Berlin, 1999, Kaplan, 2000). Poslednjih godina, u skladu sa savremenim trendovima u ishrani ljudi, postoji značajan interes za ispitivanja mogućnosti smanjenja sadržaja soli u brojnim prehrambenim proizvodima, uključujući i sireve, (Schroeder i sar., 1988, Katsiari i sar. 2000). Preporuka za smanjenje konzumiranja natrijuma, posebno za osetljive grupe potrošača, doprinela je da se u pojedinim zemljama sveta uvede obaveza klasifikovanja namirnica prema sadržaju natrijuma, koji mora biti označen na deklaraciji (sa velikim, srednjim i malim sadržajem natrijuma).

Smanjenje sadržaja soli, s obzirom na njen veliki značaj za kvalitet, najčešće zahteva savremeni naučni i tehnološki pristup u proizvodnji sireva. Većina aktuelnih istraživanja iz ove

oblasti usmerena su u nekoliko sledećih pravaca: određivanje maksimalne granice u smanjenju sadržaja soli u siru sa osvrtom na potencijalno stvaranje neprihvatljivog ukusa (Rulikowska i sar., 2008, Kaya i sar., 1999), mogućnost potpune ili delimične zamene NaCl drugim solima (KCl, MgCl₂, CaCl₂, mešavina soli iz surutke) (Güven i Karaca, 2001, Katsiari i sar., 1997, 2000a,b, 2001), upotreba poboljšivača ukusa radi maskiranja potencijalnih defekata nastalih smanjenjem sadržaja soli (Reddy i Marth, 1993).

Ispitivanja o mogućnosti proizvodnje sireva sa smanjenim sadržajem soli, odnosno natrijuma, vršena su na brojnim vrstama sireva.

Schroeder i sar., (1988) pokazali su da čedar proizveden sa 75% smanjenim sadržajem soli (0,73%NaCl) pokazuje zadovoljavajuća svojstva i može biti označen kao sir sa smanjenim sadržajem natrijuma. Prema Morris-u (1961) pojava neizraženog tj. bljutavog ukusa čedra se može prevazići sa min. 0,8% soli.

Fitzgerald i Buckley (1985) ispitivali su uticaj različitih soli (KCl, MgCl₂, CaCl₂) i njihovih mešavina sa NaCl, u odnosu 1:1, na kvalitet čedra tokom 4 meseca zrenja. Pojedinačno dodavanje zamena kuhinjske soli značajno utiče na stvaranje gorkog i neprihvatljivog ukusa sira, kao i mekše konzistencije sirnog testa. Sirevi soljeni sa MgCl₂, CaCl₂ i njihovim mešavinama pokazali su veći obim proteolize i lipolize, što je rezultiralo pogoršanjem njihovog senzornog kvaliteta. Najbolja svojstva imao je sir soljen mešavinom KCl/NaCl.

Brojna istraživanja vršena su na temu smanjenog sadržaja soli u proizvodnji kotidž sira (Demott i sar., 1984, Wyatt, 1983). Kotidž sa 35% smanjenim sadržajem soli pokazuje zadovoljavajuća senzorna svojstva, veoma prihvatljiva od strane potrošača, dok smanjenje sadržaja soli od 50% u značajnoj meri umanjuje njegov senzorni kvalitet (Wyatt, 1983).

Lefier i sar., (1987) ustanovili su da primena MgCl₂ za supstituciju NaCl ne utiče značajno na proteolizu i sadržaj slobodnih masnih kiselina, ali utiče na formiranje gorkog ukusa i stvaranje mekše teksture sirnog testa.

Güven i Karaca (2001) ispitivali su uticaj različitih mešavina soli (CaCl₂, KCl, MgCl₂ sa NaCl u odnosu 1:1) na tok i obim proteolitičkih promena turkog belog sira u salamuri tokom 12 nedelja skladištenja. Sadržaj RN/UN,

kao osnovni pokazatelj zrenja sira, bio je najviši kod kontrolnog sira, a najmanji kod sireva soljenih u salamuri sa CaCl₂. Takođe, sadržaj kazeinskog azota je veći kod ovih sireva nego kod kontrolnog na kraju zrenja, što autori povezuju sa uticajem CaCl₂ na smanjenu razgradnju kazeina.

U setu ogleđa Katsiari i sar. (1997, 2000a, 2000b) su u proizvodnji feta sira, koji se tradicionalno odlikuje veoma velikim sadržajem soli (3–3,5%), ispitivali mogućnost smanjenja sadržaja soli, odnosno zamene NaCl drugim solima u različitim odnosima. Delimična zamena NaCl sa KCl (oko 50%) ne utiče značajno na tok proteolitičkih (Katsiari i sar., 2000a) i lipolitičkih (Katsiari i sar., 2000b) promena tokom zrenja feta sira.

SIREVI SA FUNKCIONALNIM SVOJSTVIMA

Funkcionalna svojstva prehrambenih proizvoda odnose se na njihov pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Proizvodi do mleka, zahvaljujući svom sastavu, predstavljaju veoma dobru osnovu za razvijanje proizvoda dobrih funkcionalnih svojstava. U grupi proizvoda sa izraženim funkcionalnim svojstvima ističu se mlečni proizvodi, uključujući sireve, sa probiotskim bakterijama i prehrambenim vlaknima.

Sirevi sa probiotskim bakterijama

Primena probiotskih bakterija je do danas veoma rasprostranjena u proizvodnji brojnih fermentisanih mlečnih napitaka. Ipak, sve veća tražnja za proizvodima sa izraženim funkcionalnim svojstvima dovela je do zahteva za proširenje asortimana ovih proizvoda. Iz ovih razloga, poslednjih godina vrše se brojna ispitivanja mogućnosti inkorporacije probiotskih bakterija pri proizvodnji različitih vrsta sireva, sa posebnim osvrtom na mogućnosti njihovog preživljavanja tokom zrenja i/ili skladištenja.

Svojstva probiotskih bakterija

Probiotske bakterije su živi mikroorganizmi koji u dovoljnom broju poseduju pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Funkcionalna svojstva probiotika su brojna a neka od njih se ogledaju u jačanju imunog sistema, održavanju balansa gastrointestinalne mikroflore, antikancerogenoj aktivnosti, smanjenju sadržaja holesterola u krvi, prevenciji dijareja, raznih oblika alergija i

dr. (Mattila - Sandholm i Saarela, 2000).

Najznačajnije vrste iz grupe probiotičkih bakterija, a koje se koriste u proizvodnji mlečnih proizvoda, su iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* sp. (Mattila-Sandholm i Saarela, 2000).

Probiotici, da bi ostvarili svoju osnovnu terapeutsku ulogu, moraju biti zastupljeni u odgovarajućem broju, odnosno održavati neophodnu vijabilnost tokom proizvodnje, zrenja i skladištenja, uključujući i period do konzumiranja proizvoda. Broj probiotičkih bakterija neophodan u proizvodu je još uvek u fazi usaglašavanja. Prema različitim literaturnim izvorima navodi se da njihov broj u momentu konzumiranja mora biti $\geq 10^6$ cfu/g (w.w.w.us-probiotics.org), odnosno 10^7 cfu/g (De Vuyst, 2000).

Na održivost probiotika utiču mnogobrojni faktori: vrsta i osobine probiotika, sastav namirnice, temperatura, pH vrednost, sadržaj soli, kao i prisustvo drugih mikroorganizama. Nivo tolerancije prema spoljašnjim faktorima varira između vrsta, ali zavisno od soja mikroorganizama i unutar pojedinih vrsta. S tim u vezi, veoma je važan odabir vrste i soja bakterija, jer pojedini sojevi mogu biti nepraktični i stvarati probleme vezane za malu vijabilnost tokom fermentacije, proizvodnje i skladištenja proizvoda (www.us-probiotics.org).

Stabilnost probiotika i njihova vijabilnost u prehrambenim proizvodima može se poboljšati na nekoliko načina: podešavanjem procesnih parametara proizvodnje i uslova skladištenja, bez negativnih efekata na kvalitet proizvoda; optimizacijom medijuma rasta; dodavanjem poboljšivača rasta kao npr. prebiotika; enkapsulacionim tehnikama i dr. (Mattila-Sandholm i Saarela, 2000).

Proizvodnja sireva sa probiotičkim bakterijama

Pri proizvodnji sireva sa probiotičkim mora se voditi računa o vrsti i soju probiotičkih bakterija i njihovim osnovnim osobinama, a sve sa ciljem postizanja željene vijabilnosti i njihove metaboličke aktivnosti tokom proizvodnje i potrošnje proizvoda. Takođe, veoma je važno utvrditi uticaj probiotičkih bakterija na profil i tok promena tokom zrenja, kao i na senzorna svojstva i kvalitet sireva (Gomes i Xavier, 1999, Mattila-Sandholm i Saarela, 2000).

Sirevi kao medijum za prenos probiotičkih bakterija, od namirnice do gastrointestinalnog trakta čoveka, imaju brojne prednosti u odnosu na fermentisane mlečne napitke. Prednosti sireva se ogledaju u boljoj zaštiti probiotika u gastrointestinalnom traktu i većoj mogućnosti njihovog opstanka, a što je rezultat više pH vrednosti, čvršće konzistencije i većeg sadržaja mlečne masti. Pored toga, sirevi imaju i veći puforni kapacitet u odnosu na jogurt i druge fermentisane proizvode (Gomes i Xavier M., 1999, Ross i sar., 2002).

U proizvodnji mlečnih proizvoda, uključujući i sireve, probiotičke bakterije se, s obzirom na njihovu relativno malu acidogenu sposobnost, najčešće dodaju kao dopunske starter kulture (Gomes i Xavier M., 1999, Ross i sar., 2002). Takođe, važna činjenica za uspešnu implementaciju probiotika u siru je izbor vrste sira kao potencijalnog nosača probiotika, kao i kompatibilnost probiotika sa sastavom namirnice i parametrima tehnološkog postupka proizvodnje (Gomes i Xavier M., 1999, Ross i sar., 2002).

Veliki sadržaj mlečne masti u proizvodu rezultira u visokoj kalorijskoj vrednosti odgovarajućeg proizvoda i stoga može imati negativne posledice na zdravlje potrošača. S obzirom da su sirevi sa probiotičkim namirnicama kod kojih zdravstveni aspekti imaju poseban značaj, preporučljivo je da se oni proizvode sa smanjenim sadržajem mlečne masti. Kao što je ranije napomenuto, primena probiotika u proizvodnji sireva sa smanjenim sadržajem masti, pored zadovoljenja funkcionalnih svojstava, može doprineti i poboljšanju njihovih senzornih svojstava (Đerovski i sar., 2007, Đerovski i sar., 2008, Puđa i sar., 2008).

Veliki broj sojeva probiotičkih bakterija su neotporni na visoke koncentracije soli. Iz tih razloga, kao nosioce ovih bakterija nije poželjno birati sireve sa velikim sadržajem soli, ili je pak proizvodnju takvih sireva potrebno modifikovati u cilju dobijanja proizvoda sa manjim sadržajem soli.

Prva istraživanja vezana za inkorporiranje probiotičkih bakterija u sireve su bila vezana za kiseloo koagulišuće sireve, zbog njihove sličnosti sa fermentisanim mlečnim napicima. Brojna istraživanja vršena na različitim vrstama kiselokoagulišućih sireva, kao što su kvark (Panić 2004), «fresco» sir (Boylston i sar., 2004., Vinderola i sar., 2000), pokazuju da ovi proizvodi mogu biti dobri nosioci probiotičkih

bakterija. Roy i sar., (1997) i Gobbetti i sar., (1998) navode da vijabilnost probiotika zavisi od upotrebljenog soja, kao i temperature zrenja ili skladištenja sireva.

Kada govorimo o mogućnosti inkorporacije probiotika u proizvodnji tvrdih i polutvrdih sireva, najveći broj istraživanja je vršen na sirevima tipa čedra kao jedne od najzastupljenijih grupa sireva širom sveta.

Gardiner i sar., (1998) ustanovili su da *L. paracasei* pokazuje dobru vijabilnost tokom 8 meseci zrenja čedra, dok *L. salivarius* izumire, što ukazuje na nepodesnost korišćenja ove vrste u proizvodnji sireva sa dugim zrenjem. Sirevi proizvedeni sa dopunskim kulturama pokazuju veći obim nastajanja slobodnih aminokiselina, verovatno usled prisustva intracelularnih peptidaza koje se oslobađaju nakon liziranja ćelija. Breatry i sar., (2001) navode da prisustvo bifidobakterija u čedru utiče na brže opadanje pH vrednosti, brže formiranje slobodnih aminokiselina i intenzivnije formiranje senzornih svojstava sira.

Corbo i sar., (2001) su modifikacijom tehnološkog postupka proizvodnje italijanskog tvrdog kozijeg sira (Canevato Pugliese), koja je podrazumevala izmenjen temperaturni režim pri obradi gruš, uticali na poboljšanje vijabilnosti bifidobakterija.

Gomes i sar., (1995) modifikovali su postupak proizvodnje gaude u cilju pospešenja rasta probiotičkih bakterija *Bifidobacterium* i *L. acidophilus*. U toku zrenja sireva broj probiotičkih bakterija varirao je u zavisnosti od dela sira, koncentracije soli i obima proteolize, ali se i nakon 9 meseci skladištenja zadržao na nivou $\geq 10^7$ cfu/g.

Bergamini i sar. (2006) ispitivali su vijabilnost i uticaj probiotičkih laktobacila (*L. acidophilus* i *L. paracasei* ssp. *paracasei*), kao i načina njihove pripreme na proteolizu polutvrdog sira (Pategra Argentino). Vijabilnost oba soja laktobacila, bez obzira na način pripreme, održavala se na potrebnom nivou od 10^7 cfu/g tokom 60 dana zrenja. Primena probiotičkih dopunskih sojeva nije pokazala značajan uticaj na tok primarne proteolize, ali je uočen značajno različit uticaj sojeva na tok i obim sekundarne proteolize, što je verovatno posledica njihove različite proteolitičke aktivnosti. Dodavanje *L. acidophilus* u velikoj meri menja tok sekundarne proteolize, odnosno povećava nastajanje niskomolekularnih azotnih jedinjenja. Shodno tome, primena ovog soja, u formi dopunske

kulture, može služiti za ubrzanje zrenja sireva i poboljšanje njihovih senzornih svojstava, uz istovremeno osiguravanje funkcionalnih efekata proizvoda usled prisustva probiotika u velikom broju.

U našoj zemlji istraživanja inkorporacije probiotika u polutvrde i tvrde sireve su veoma oskudna (Tucović i sar., 2004) i još uvek su bez većeg komercijalnog značaja.

Poboljšanje vijabilnosti probiotika može se postići tehnikama imobilizacije na različitim vrstama nosača. Ōzer i sar., (2009) navode da se ekstruzionim i emulzionim tehnikama imobilizacije povećava broj *B. bifidum* BB-12 i *L. acidophilus* LA-5 tokom zrenja belog sira u salamuri. Autori navode da primena mikroenkapsuliranih probiotskih bakterija ne utiče značajno na senzorna svojstva sireva, te se stoga mogu uspešno koristiti kao jedan od načina poboljšanja vijabilnosti probiotika u siru.

Sirevi sa prehrambenim vlaknima

Poslednjih godina, primena prehrambenih vlakana u proizvodnji hrane sve više dobija na značaju te su stoga istraživanja o mogućnosti njihove primene u brojnim proizvodima od mleka veoma savremena i aktuelna. Prehrambena vlakna se odlikuju brojnim funkcionalnim svojstvima koja se ogledaju u održavanju i poboljšanju zdravlja ljudi. Funkcionalna svojstva prehrambenih vlakana zavise od vrste i porekla vlakana, njihovog sastava i strukture. Dokazani pozitivni efekti vlakana na zdravlje ljudi uključuju laktaciju i/ili smanjenje holesterola u krvi i/ili smanjenje glukoze u krvi, kao i brojne druge efekte.

Prehrambena vlakna se, prema definiciji, označavaju kao jestivi delovi biljaka ili analogni ugljeni hidrati, koji su otporni prema digestiji i absorpciji u tankom crevu (humanom malom intestinalnom traktu), ali se potpuno ili delimično fermentišu u debelom crevu. U ovu kategoriju spadaju polisaharidi (celuloze, hemiceluloze, beta glukani i dr.), oligosaharidi, lignin i drugi delovi pojedinih biljaka (Report AACC, 2001).

Da bi vlakna ostvarila svoje pozitivne efekte na zdravlje potrošača, potrebno je obezbediti odgovarajuć nivo njihovog konzumiranja. Prema preporukama Američke asocijacije za ishranu smatra se da bi odrasle osobe trebalo da konzumiraju 20–35 g vlakana po danu, a deca u količini koja

se izračunava kada se na broj godina starosti doda 5g (npr. 4 godine, odnosno 9 g/dan). Britanska fondacija za ishranu preporučuje da bi minimalna količina konzumiranih vlakana trebalo da iznosi 12–24 g/dan u ishrani odraslih ljudi (www.wikipedia.org/dietary-fiber). Prosečan unos prehrambenih vlakana u svakodnevnoj ishrani ljudi je najčešće značajno ispod zahtevanog nivoa (Van Loo i sar., 1995, www.wikipedia.org/dietaryfiber).

Kada govorimo o namirnicama kao potencijalnim izvorima prehrambenih vlakana, važno je napomenuti propisane norme koje takvi proizvodi moraju da ispunjavaju kako bi bili deklarirani kao dobar, odnosno bogat izvor vlakana. Naime, prema regulativi Codex alimentarius – u (Proposal ALINORM 04/27/26; 2003), da bi proizvod bio označen kao dobar izvor vlakna - inulina mora da sadrži min. 3 g na 100 g za čvrste, odnosno 1,5 g na 100 ml za tečne proizvode, ili 1,5 g po porciji, odnosno po 100 kcal proizvoda. Proizvod označen kao bogat izvor inulina mora da sadrži min. 6 g na 100 g za čvrste, odnosno 3 g na 100 ml za tečne proizvode, ili 3 g po porciji, odnosno po 100 kcal.

Svojstva prehrambenih vlakana

Najznačajnija vrsta prehrambenih vlakana je inulin koji u potpunosti zadovoljava zahteve propisane definicije. Naime, kao i ostala prehrambena vlakna, inulin je digestivan samo u debelom crevu i poseduje brojna funkcionalna svojstva koja mogu imati pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Izražena nutritivna i posebno funkcionalna svojstva, kao i važni tehnološki potencijali, inulin svrstavaju u najzastupljenije i danas komercijalno najznačajnije vrste prehrambenih vlakana.

Inulin se prirodno nalazi u različitim vrstama biljaka, kao što su cikorija, artičoka, beli i crni luk, praziluk, pšenica, banana i dr. Po strukturi, inulin pripada grupi ugljenih hidrata, poznatih kao fruktani (Fn), koji su izgrađeni od jedinica fruktofuranoze povezanih β 2,1–vezom, a lanac se najčešće završava glukozom (GF_n) (Karlson, 1988). Osnovna specifičnost u strukturi inulina je β 2,1 glukozidna veza, koja je u najvećoj meri odgovorna za njegovu nesvarljivost i smanjenu kalorijsku vrednost. Stepent polimerizacije, koji značajno opredeljuje funkcionalna svojstva prirodnih inulina sa strukturom GF_n kreće se u inter-

valu od 3 do 60 (prosečan DP = 10). Delimičnom hidrolizom inulina nastaju oligofruktoze, koje se odlikuju prosečnim stepenom polimerizacije od 2 do 8 (prosečno DP = 4).

Jedno od najznačajnijih obeležja inulina su njegova nutritivna svojstva. U brojnim prehrambenim proizvodima (mlečni, konditorski i pekarski proizvodi) inulin ne umanjuje senzorna svojstva proizvoda i može se uspešno koristiti kao zamena za masti i šećere. Usled toga, primena inulina omogućava formulaciju prehrambenih proizvoda koji se mogu deklarirati kao dobar ili bogat izvor vlakana, bez negativnih efekata na svojstva i kvalitet proizvoda u koje se ugrađuje.

Specifična struktura inulina doprinosi da se ova vrsta vlakana odlikuje veoma malom kalorijskom vrednošću. Naime, inulin se ne razlaže digestivnim enzimima, te kao nerazgrađen prolazi kroz usta, želudac i tanko crevo i nepromenjen dospeva u debelo crevo, gde podleže fermentaciji od strane određenih bakterija.

Ukus inulina je prijatan, veoma blag, slatkast, što dopušta da se ovaj ingredijent koristi kao zamena za šećer. Različite strukturne forme i dužine lanaca inulina i oligofruktoze rezultiraju u njihovim različitim funkcionalnim svojstvima. S tim u vezi, primena inulina ili oligofruktoze u najvećoj meri zavise od željenih efekata i očekivanih osobina gotovog proizvoda.

Inulin je, usled veće dužine lanca, manje rastvorljiv u odnosu na oligofruktozu. Ukoliko se rastvara u vodi ili mleku, inulin ima sposobnost da formira mikrokristale. Ovi kristali se ne opažaju u ustima, ali oni indirektno utiču na formiranje glatke, kremaste strukture proizvoda i omogućavaju stvaranje osećaja punijeg ukusa pri konzumiranju proizvoda, posebno onih sa smanjenim sadržajem masti (Niness, 1999).

Zdravstveni aspekti inulina se, usled brojnih fizioloških osobina, ogledaju u poboljšanju zdravlja potrošača. Neki od pozitivnih učinaka inulina na zdravlje ljudi se ogledaju u sledećem: poboljšanje bioiskoristivosti i ravnoteže minerala; povećanje apsorpcije minerala, posebno kalcijuma (Abrams i sar., 2005), a u manjoj meri i magnezijuma (Coudray i sar., 2003); sprečavanje pojave osteoporoze (Ninnes, 1999.); smanjenje holesterola i nivoa glukoze u krvi; mogućnost sprečavanja pojedinih vrsta kancera (Taper i sar., 1997, Rowland i sar., 1998). S obzirom da se uobičajenom digestijom

inulin ne razgrađuje do monosaharida, njegova upotreba kao zamjenjivača šećera pokazuje minimalni uticaj na nivo šećera u krvi, te stoga može uspješno biti korišćen u ishrani dijabetičara (Ninnes, 1999).

Sigurno najvažniji i do sada najviše izučavani zdravstveni aspekti su tzv. prebiotski efekti inulina i ostalih prehrambenih vlakana, usled čega se oni često nazivaju terminom „prebiotik“ (Gibson i Roberfroid, 1995). Kriterijumi koji dozvoljavaju da se neki ingredijent klasifikuje kao prebiotik su sledeći: ne smeju da se hidrolizuju ni apsorbuju u gornjem delu gastrointestinalnog trakta; trebalo bi da budu selektivni supstrat za potencijalne „korisne“ bakterije u debelom crevu; trebalo bi da imaju pozitivan uticaj na sastav mikroflore kolona, odnosno da dovode do izmene u pravcu povećanja „korisnih“ i smanjenja patogenih vrsta mikroorganizama; trebalo bi da imaju u celosti pozitivne efekte na zdravlje ljudi (Fooks i sar., 1999).

Poznato je da debelo crevo predstavlja složen mikrobn sistem sa značajnom ulogom u brojnim fiziološkim funkcijama koje utiču na zdravstveno stanje ljudi. Kako pojedini sastavni činioci mikroflore kolona mogu da imaju preventivnu ulogu u sprečavanju pojedinih neželjenih pojava, velika pažnja je posvećena delovanju onih mikroorganizama za koje se smatra da su korisni. Među „korisnim“ bakterijama, koje unapređuju zdravlje ljudi, su svakako najpoznatiji laktobacili i bifidobakterije, koje pripadaju grupi probiotskih bakterija.

Bifidobakterije su veoma osetljivi mikroorganizmi, i u poređenju sa laktobacilima, njihova primena je u brojnim prehrambenim proizvodima veoma ograničena. Usled toga, postoji veliki interes za iznalaženje bifidogenih faktora, koji podnose odgovarajuće tretmane prisutne u okviru postupka proizvodnje određene namirnice, a pospešuju rast ovih bakterija i pokazuju pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Inulin, kao važan predstavnik prebiotika, poseduje izražene bifidogene efekte, odnosno mogućnost stimulacije upravo osetljivih bifidobakterija. Pozitivni efekti inulina i oligofruktoze na povećanje vijabilnosti bifidobakterija dokazani su u brojnim *in vitro* (Wang i Gibson, 1993, Gibson i Wang, 1994) i *in vivo* istraživanjima (Gibson i sar., 1995, Roberfroid i sar., 1998, Kolida i sar., 2002). Roberfroid i sar. (1998) navode da je konzumira-

nje 5–10 g inulina dnevno dovoljno za značajno povećanje bifidobakterija.

Prebiotski efekti inulina su verovatno osnovni razlog zašto je danas primena vlakana najčešće povezana sa primenom probiotskih bakterija u proizvodnji brojnih prehrambenih proizvoda. Ipak, kada se govori o simbiotskom delovanju prebiotika i probiotika, veoma je važno znati koje vrste bakterija najbolje rastu na odgovarajućim podlogama Huebner i sar., (2007).

Primena prehrambenih vlakana u proizvodnji mlečnih proizvoda

Primena vlakana u proizvodnji brojnih prehrambenih proizvoda kao što su pića, konditorski proizvodi, pekarski proizvodi, supe i sosovi i dr. zasnovana je na njihovim funkcionalnim i nutritivnim svojstvima. Ovi dodaci se u proizvodnji prehrambenih proizvoda, pored obogaćivanja proizvoda vlaknima, najčešće dodaju kao zamjenjivači masti i šećera, poboljšivači teksturalnih svojstava, kao i usled njihovih prebiotskih svojstava (Steinbüchel i Ki Rhee, 2005).

Kada govorimo o primeni vlakana u proizvodnji određenih prehrambenih proizvoda, posebno je važno da se ispune zahtevi njihove kompatibilnosti sa tehnološkim postupkom proizvodnje odgovarajuće namirnice. Naime, neophodno je da su oni stabilni u pogledu delovanja pojedinih procesnih parametara, kao npr. temperature, pH vrednosti i sl.

Proizvodi od mleka predstavljaju dobru osnovu za implementaciju prehrambenih vlakana, koja poboljšavaju njihova funkcionalna svojstva. U proizvodnji mlečnih proizvoda primena vlakana je aktuelna tema tek poslednjih nekoliko godina i najčešće je povezana sa proizvodnjom fermentisanih mlečnih napitaka. U proizvodnji sireva, primena vlakana je veoma slabo zastupljena, pretežno na istraživačkom nivou, bez većeg komercijalnog značaja. Stoga su literaturni podaci o mogućnosti primene vlakana u proizvodnji sireva veoma oskudni.

Najznačajnija primena inulina je zasnovana na njegovim prebiotskim efektima, odnosno pozitivnoj stimulaciji rasta probiotskih bakterija. Primena inulina, kao potencijalnog zamjenjivača masti i šećera, može biti veoma značajna sa aspekta poboljšanja senzornih i funkcionalnih svojstava proizvoda. Kao dobri zamjenjivači masti i šećera, inulin i ostala vlakna

značajno utiču na poboljšanje teksture i ukusa, a smanjuju kalorijsku vrednost proizvoda. Tako npr. jedan od načina poboljšanja često inferiornih svojstava proizvoda sa smanjenim sadržajem masti, uključujući sireve, može se ostvariti dodavanjem prehrambenih vlakana, konkretno inulina. U proizvodnji voćnih fermentisanih mlečnih napitaka i dezerata inulin se može koristiti kao zamena za šećer.

Veliki broj istraživanja je vezan za ispitivanja efekata dodavanja vlakana u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka, posebno onih sa smanjenim sadržajem masti. Prema rezultatima Spiegel i sar., (1994), dodavanje inulina poboljšava teksturu i ukus jogurta sa malim sadržajem masti, dok Robinson (1995) navodi da dodavanje inulina poboljšava senzorna svojstva i „običnog“ jogurta. Kip i sar., (2006) ustanovili su da se najizraženiji pozitivan učinak na svojstva niskomasnog jogurta postiže dodavanjem 1,5–4% inulina dužeg lanca. Aryana i McGrew (2007) takođe su ustanovili da dužina lanca inulina značajno utiče na svojstva jogurta bez masti, kao što su stepen izdvajanja surutke i senzorna svojstva, kao i na rast mikroorganizama. Güven i sar. (2005) ustanovili su da dodavanje više od 1% inulina negativno utiče na konzistenciju niskomasnog jogurta promovišući izdvajanje surutke, kao i na njegova ukupna senzorna svojstva. Uticaj vlakana iz različitih izvora na senzorna i reološka svojstva jogurta izučavali su Dello Staffolo i sar. (2004). Jogurt obogaćen inulinom ne pokazuje sinerezis posle 21 dan skladištenja pri 4°C.

Guggisberg i sar., (2009) ispitivali su uticaj dodavanja inulina (0–4%) na sastav, pH, teksturu i mikrostrukturu jogurta sa različitim sadržajem masti (0,2%–3,5%) u toku 6 dana skladištenja pri 5°C. Ustanovili su da inulin značajno utiče na reološka i senzorna svojstva jogurta i poboljšava tehnološka i nutritivna svojstva proizvoda. Jogurt proizveden sa većom količinom inulina pokazuje izraženu čvrstoću i mazivost (eng. creaminess). Naime, autori navode da je dodavanjem 4% inulina u niskomasnom jogurtu sa 0,2% masti moguće postići konzistenciju sličnu punomasnom jogurtu. Kada razmatramo primenu rastvorljivih vlakana u proizvodnji sireva, važno je ispitati uticaj njihovog delovanja na koagulaciju mleka. Dodavanje vlakana značajno utiče na tok koagulacije, ali promene u velikoj meri zavise od vrste dodatih vlakana (Fagan i sar., 2005).

Dodavanje veće količine inulina (1–3%) značajno smanjuje vreme geliranja i povećava čvrstinu gela.

U proizvodnji niskomasnog čedar sira β glukani potencijalno deluju kao zamenjivači masti, promovišu sposobnost povećanog zadržavanja vlage i soli u siru (Konuklar i sar., 2004). Poboljšana senzorna svojstva moca-rele sa smanjenim sadržajem masti usled dodavanja inulina ustanovili su Pagliarini i Beatrice (1994). Hennelly i sar. (2006) su ispitivali mogućnost zamene masti i uticaj gelova i termički tretiranih rastvora inulina na svojstva imitacija sireva. Ustanovili su da dodavanje inulina ne utiče negativno na sposobnost topljenja. Autori smatraju da inulin može zameniti do 63% masti u imitacijama sireva, bez narušavanja njihovog kvaliteta. Bolja svojstva pokazuje inulin dodat u vidu termički tretiranog rastvora.

Tehnološki postupak proizvodnje krem sireva omogućava simbiotsku primenu prebiotika i probiotika. *Buriti i sar. (2007)* navode da inulin pozitivno utiče, odnosno pospešuje rast *S. thermophilus* i posebno probiotika *L. paracasei* u proizvodnji svežeg sira. Veliki sadržaj nerazgrađenog fruktana, čak oko 7%, koji se zadržava i nakon 21 dana skladištenja, ukazuje da ove vrste nisu sposobne da vrše njegovu razgradnju. Cardarelli i sar. (2008) ispitivali su uticaj ingredijenata sa izraženim prebiotskim efektima (inulin, oligofruktoza i oligosaharidi) na senzorna svojstva i vijabilnost probiotika (*L. acidophilus* i *B. animalis* subsp. *lactis*) i na sadržaj fruktana potencijalnog probiotskog «petit suisse» sira tokom 28 dana skladištenja. Sir proizveden uz dodavanje oligofruktoze samostalno, ili u kombinaciji sa inulinom, pokazuje visok prebiotski potencijal, dobru vijabilnost probiotičkih bakterija i veoma prihvatljiva senzorna svojstva. Dodavanje 2,5% inulina u proizvodnji svežeg sira značajno utiče na pospešenje rasta *L. plantarum* 14, potencijalnog probiotika. Sirevi proizvedeni sa probiotskim bakterijama i inulinom pokazuju veoma dobra svojstva te autori smatraju da primena prebiotika u proizvodnji mekog sira može predstavljati dobru osnovu za dobijanje novog proizvoda funkcionalnih svojstava (Modzelewska-Kapituta i sar., 2007).

U zaključku ovog razmatranja možemo istaći da se inulin kao ingredijent, zahvaljujući brojnim pozitivnim efektima, može uspešno koristiti u proizvodnji niskomasnih proizvoda,

kao i proizvoda sa izraženim zdravstvenim efektima.

ZAKLJUČAK

Razvoj tehnologije sireva sa dijetetskim i funkcionalnim svojstvima najčešće zahteva modifikaciju tehnološkog postupka proizvodnje, upotrebu dopunskih kultura ili različitih vrsta dodataka sa ciljem dobijanja dobrih i prihvatljivih senzornih svojstava. Takođe, za ostvarivanje pozitivnih učinaka sireva sa dijetetskim i funkcionalnim svojstvima na zdravlje potrošača neophodno je poštovanje regulativnom propisanih normi sastava kao i sadržaja pojedinih funkcionalnih komponenti. Generalno, različite vrste sireva predstavljaju dobru osnovu za dobijanje proizvoda sa izraženim dijetetskim i funkcionalnim svojstvima, što upućuje na neophodnost istraživanja u ovoj oblasti.

LITERATURA

- Abrams, S., Griffin, I., Hawthorne, K., Liang, L., Gunn, S., Darlington, G., Ellis, K.: A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82 (2) (2005) 471–6.
- Anderson, D.L., Mistry, V.V., Brandsma, R.L., Baldwin, K.A.: Reduced fat cheddar cheese from condensed milk. 2. Manufacture, composition and yield. *J. Dairy Sci.*, 76 (1993) 2832–2844.
- Aryana, K.J., Haque, Z.U.: Effect commercial fat replacers on the microstructure of low-fat Cheddar cheese. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 36 (2001) 169–177.
- Aryana, K.J., McGrew, P.: Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT Food Science and Technology*, 40 (2007) 1808–1814.
- Awad, S., Hassan, A.N., Halaweish, F.: Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: composition and proteolysis. *J. Dairy Sci.*, 88 (2005) 4195–4203.
- Banks, J.M.: The technology of low fat cheese manufacture. *Int. J. Dairy Tech.*, 57 (4) (2004) 199–207.
- Banks, J.M., Brechany, E.Y., Christie, W.W.: The production of low fat Cheddar cheese types. *Journal of Society of Dairy Technology*, 42 (1989) 6–9.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Zalazar, C.A.: Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 856–866.
- Berlin, L.J.: Lifestyle and hypertension-an overview. *Clin. Exper. Hypertension*, 21 (1999) 749–762.
- Boylston, T., D., Vinderola, C., G., Ghoddusi, H., B., Jarge, A., R.: Incorporation of *bifidobacteria* into cheeses challenges and rewards. *Int. Dairy Journal*, 14 (2004) 375–387.
- Breatry, S. Mc., Ross, R., P., Fitzgerald, G., F., Collins, J., K., Wallance, J., M., Stanton, C.: Influence of two commercially available *bifidobacteria* cultures on cheddar cheese quality. *Int. Dairy Journal*, 11 (2001) 599–610.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Welker, D. L.: Use of exopolysaccharide-

producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *Int. Dairy Journal*, 11 (4–7) (2001) 433–439.

- Buriti, F. C. A., Cardarelli, H. R., Filisetti, T. M. C. C., Saad, S. M. I.: Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food chemistry*, 104 (2007) 1605–1610.
- Butel, M. J., Waligora-Dupriet, A. J.: Oligofructose and experimental model of neonatal necrotising Enterocolitis. *British Journal of Nutrition*, 87 (2) (2002) 213–219.
- Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castrob, I. A., Saada, S. M. I.: Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT*, 41 (2008) 1037–1046.
- Corbo, M., R., Albenzio, M., De Angelis, M., Seni, A., Gobbeti, M.: Microbiological and biochemical properties of «canestrato pugliese» hardcheese supplemented with *bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.*, 84 (2001) 551–561.
- Coudray, C., Demigné C., Rayssiguier Y (2003): Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. *The Journal of Nutrition*, 133, 1, 1–4.
- Daigle, A., Roy, D., Belanger, G., Vuilleumard, J.C.: Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *J. Dairy Sci.*, 82 (1999) 1081–1091.
- Dave, R. I., McMahon, D. J., Oberg, C. J., Welker, D. L.: Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification. *J. Dairy Sci.*, 86 (2003) 114–126.
- De Vuyst, L.: Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38 (2) (2000) 105–112.
- Dello Staffolo, M., Bertola, N., Martino, M., Bevilacqua, A.: Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yoghurt. *Int. Dairy Journal*, 14 (2004) 263–268.
- Demott, B. J., Hitchcock, J. J., Sanders, O. G.: Sodium concentration of selected dairy products and acceptability of a sodium substitute in Cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, 67 (1984) 1539–1543.
- Dietary Guidelines for Americans: U.S. Department of Health and Human Services, U. S. Department of Agriculture, (2005), www.healthier.us.gov/dietaryguidelines.
- Dillon, J. C.: Cheese in the diet. Eck, A. *Cheesemaking: Science and technology*, Lavoisier Publishing Inc., New York, (1987) 499–512.
- Đerovski, J., Kolar, B., Puđa, P.: Funkcionalne karakteristike različitih vrsta komercijalnih sireva. *Prehrambena industrija– Mleko i mlečni proizvodi*, 17 (1–) (2006) 19–25.
- Đerovski, J., Puđa, P., Radulović, Z., Obradović, D., Martinović, M.: Zrenje sireva od UF mleka sa probiotskim kulturama. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 18 (3–4) (2007) 76–81.
- Đerovski, J., Radulović, Z., Paunović, D., Puđa, P.: Uticaj dopunskih kultura na svojstva niskomasnog sira u salamuri. *Prehrambena industrija–Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1–2) (2008) 92–97.
- Fagan, C. C., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., Brennan, C. S.: The effect of dietary fibre inclusion on milk coagulation kinetics. *J. Food Eng.*, 77 (2005) 261–268.
- Fenelon, M.A., Beresford, T.P., Guinee, T.P.: Comparison of different bacterial culture systems for the production reduced-fat Cheddar cheese. *Int. J. Dairy Tech.*, 55 (4) (2002) 194–203.

- Fenelon, M.A., Guinee, T.P.: The compositional, textural and maturation characteristics of reduced fat Cheddar cheese made from milk containing added Dairy-Lo. *Milchwissenschaft*, 52 (1997) 385–389.
- Fenelon, M. A., Guinee, T. P.: Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *Int. Dairy Journal*, 10 (2000) 151–158.
- Fenelon, M. A., O'Connor, P., Guinee, T. P.: The effect of fat content on the microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*, 83 (2000) 2173–2183.
- Fife, R. L., McMahon, D. J., Oberg, C. J.: Functionality of low fat mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 79 (1996) 1903–1910.
- Fitzgerald, E., Buckley, J.: Effect of total and partial substitution of sodium chloride on the quality of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 68 (1985) 3127–3134.
- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R.: Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy Journal*, 9 (1999) 53–61.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Stanton, P.: Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. Applied and environmental microbiology, (1998) 2192–2199.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B.: Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125 (1995) 1401–1412.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Yocchetti, A., De Angelis, M.: Production of crescenza cheese by incorporation of *bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 37–47.
- Gomes, A. M., Xavier M., P. F.: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in food science & technology*, 10 (1999) 139–157.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M., Grande, H. J.: Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 49 (1995) 71–95.
- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., Eberhard, P.: Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *Int. Dairy Journal*, 19 (2) (2009) 107–115.
- Guinee, T. P., Auty, M. A. E., Fenelon, M. A.: The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *Int. Dairy Journal*, 10 (2000) 277–288.
- Guinee, T. P., Fenelon, M. A., Mulholland, E. O., O'Kennedy, B. T., O'Brien, N., Reville, W. J.: The influence of milk pasteurization temperature and pH at curd milling on the composition, texture and maturation of reduced fat Cheddar cheese. *Int. J. Dairy Tech.*, 1 (1998) 1–10.
- Güven, M., Karaca, O. B.: Proteolysis levels of white cheeses salted and ripened in brines prepared from various salts. *Int. J. Dairy Tech.*, 54 (1) (2001) 29–33.
- Güven, M., Yasar, K., Karaca, O. B., Hayaloglu, A. A.: The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (2005) 180–184.
- Hennelly, P. J., Dunne, P. G., O'Sullivan, M., O'Riordan, E. D.: Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *J. Food Engineering*, 75 (2006) 388–395.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Hutkins, R. W.: Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy Journal*, 17 (2007) 770–775.
- IFT: Dietary salt — a scientific status summary by the Institute of Food Technologists' expert panel on food safety and nutrition and the committee on public information. *Food Technology*, 34 (1) (1980) 85–91.
- Kaplan, N. M.: The dietary guideline for sodium: should we shake it up? *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (2000) 1020–1026.
- Katsiari, M. C., Alichanidis, E., Voutsinas, L. P., Roussis, I. G.: Proteolysis in reduced sodium feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy Journal*, 10 (2000) 635–646.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P.: Manufacture of low-fat Feta cheese. *Food Chemistry*, 49 (1994a) 53–60.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P.: Manufacture of low-fat Kefalograviera cheese. *Int. Dairy Journal*, 4 (6) (1994b) 533–553.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Alichanidis, E., Roussis, I. G.: Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy Journal*, 7 (6–7) (1997) 465–472.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Alichanidis, E., Roussis, I. G.: Lipolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy Journal*, 10 (5–6) (2000b) 369–373.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Kondyli, E.: Improvement of sensory quality of low-fat Kefalograviera-type cheese with commercial adjunct cultures. *Int. Dairy Journal*, 12 (9) (2002b) 757–764.
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Kondyli, E., Alichanidis, E.: Flavour enhancement of low fat Feta-type cheese using a commercial adjunct culture. *Food Chemistry*, 79 (2002a) 193–198.
- Kaya, S., Kaya, A., Oner, M. D.: The effects of salt concentration on rancidity in gaziantep cheese. *J. Sci. Food and Agriculture*, 79 (1999) 213–219.
- Kebary, K. M. K., EL-Sonbaty, A. H., Badawi, R. M.: Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free amino acids development. *Food Chemistry*, 64 (1999) 67–75.
- Kip, P., Meyer, D., Jellema, R. H.: Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *Int. Dairy Journal*, 16 (2006) 1098–1103.
- Kolida, S., Tuohy, K., Gibson, G. R.: Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87 (2002) 193–197.
- Kondyli, E., Massouras, T., Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P.: Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures. *Int. Dairy Journal*, 13 (1) (2003) 47–54.
- Konuklar, G., Inglett, G., Carrier, C., Felker, F.: Use of a β glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat cheddar cheese: manufacture, composition, yield and microstructure. *Int. J. Food Sci. and Technology*, 39 (2004) 109–119.
- Lefier, D., Grappin, R., Grosclaude, G., Curtat, G.: Sensory properties and nutritional quality of low sodium Gruyere cheese, Lait, 67 (1987) 451–464.
- Lo, C. G., Bastian, E. D.: Incorporation of native and denatured whey proteins into cheese curd for manufacture of reduced fat Havarti-type cheese. *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 16–24.
- Madadlou, A., Mousavi, M.E., Khosrowshahi A., Emam-Djome, Z., Zargarani, M.: Effect of cream homogenization on textural characteristics of low-fat Iranian White cheese. *Int. Dairy Journal*, 17 (5) (2007) 547–554.
- Madsen, J. S., Ardo, Y.: Exploratory study of proteolysis, rheology and sensory properties of Danbo cheese with different fat contents. *Int. Dairy Journal*, 11 (2001) 423–431.
- Martens, R., Vanderpoorten, R., Naudts, M.: Manufacture, composition, and properties of Gouda cheese with a reduced sodium content. *Revue de l'Agriculture*, 29 (3) (1976) 681–698.
- Mattila-Sandholm, T., Saarela, M.: Functional dairy products. Woodhead publishing, Cambridge, England (2000).
- McMahon, D. J., Alleyne, M. C., Fife, R. L., Oberg, C. J.: Use of fat replacers in low fat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 79 (1996) 1911–1921.
- McSweeney, P. L. H.: The flavour of milk and dairy products. III Cheese: taste. *Int. J. Dairy Tech.*, 50 (1997) 123–127.
- Metzger, L. E., Mistry, V. V.: A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. 1. Manufacture, Composition and Yield. *J. Dairy Sci.*, 77 (1994) 3506–3515.
- Metzger, L. E., Mistry, V. V.: A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat Cheddar cheese. 1. Microstructure, Fat globule distribution and free oil. *Journal of Dairy Science*, 78 (1995) 1883–1895.
- Michaelidou, A., Katsiari, M. C., Kondyli, E., Voutsinas, L. P., Alichanidis, E.: Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *Int. Dairy Journal*, 13 (2–3) (2003a) 179–189.
- Michaelidou, A., Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Kondyli, E., Alichanidis, E.: Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *Int. Dairy Journal*, 13 (9) (2003b) 743–753.
- Miočinović, J.: Uticaj termičkog tretmana mleka na odabrane karakteristične soljenja i zrenja sireva, Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu (2004).
- Miočinović, J., Puđa, P.: Funkcionalne karakteristične sireva, Zbornik radova II Simpozijuma "Mleko i proizvodi od mleka", Poljoprivredni fakultet, Beograd 2005, 12–20.
- Miočinović, J., Puđa, P.: Proizvodnja sireva sa probiotskim bakterijama. *Mlekarstvo*, 35 (2004) 1079–1087.
- Miočinović, J., Puđa, P.: Neobjavljeni podaci (2009).
- Miočinović, J., Vučić, T., Puđa, P.: Značaj soli u proizvodnji sireva, Zbornik radova Simpozijuma „Savremeni trendovi u mlekarstvu“, (2003) 91–96.
- Mistry, V. V.: Low fat cheese technology. *Int. Dairy Journal*, 11 (2001) 413–422.
- Mistry, V. V., Kasperon, K. M.: Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 1214–1221.
- Mistry, V. V., Metzger, L. E., Maubois, J. L.: Use of ultrafiltered sweet buttermilk in the manufacture of reduced fat cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 79 (1996) 1137–1145.
- Modzelewska-Kapitula M., Klebukowska L., Kornacki K.: Influence of inulin and potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain on microbiological quality and sensory properties of soft cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57 (2) (2007) 143–146.
- Morris, T., A.: Observations on the salting of Cheddar and Gouda cheese. *Aust. J. Dairy Technology*, 16 (1961) 31–32.
- Nelson, B. K., Barbano, D. M.: Reduced fat cheddar cheese manufactured using a novel fat removal process. *J. Dairy Sci.*, 87 (2004) 841–853.
- Niness: Inulin and Oligofructose: What Are They? *Journal of Nutrition*, 129 (7) (1999) 1402–1406.
- Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer, M., Hayaloğlu, A.: Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int. Dairy Journal*, 19 (2009) 22–29.
- Pagliarini, E., Beatrice, N.: Sensory and rheological properties of low-fat filled "pasta filata" cheese. *J. Dairy Research*, 61(1994)299–304.

- Panić, M.: Razvoj tehnologije kvarka uz primenu probiotika, Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu (2004).
- Poduval, V. S., Mistry, V. V.: Manufacture of reduced fat Mozzarella cheese using ultrafiltered sweet buttermilk and homogenized cream. *J. Dairy Sci.*, 82 (1999) 1–9.
- Puđa, P.: Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu (1992).
- Puđa, P., Đerovski, J., Radulović, Z., Obradović, D.: Effects of probiotics cultures and salt reduction on the characteristics of UF white brined cheeses, *Knjiga apstrakata, «5th IDF Symposium on cheese ripening»*, Bern, Švajcarska (2008).
- Puđa, P., Guinee, T.P.: Uticaj visoke termičke obrade mleka na karakteristike sireva proizvedenih od ultrafiltriranog mleka 2. Proteolitičke promene u toku zrenja sireva. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 9 (3–4) (1998) 79–85.
- Puđa, P., Radovanović, M., Miočinović, J.: Značaj standardizacije proteina u proizvodnji sireva. *Zbornik radova Simpozijuma "Proizvodnja i prerada mleka"*, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2000, 167.
- Punidades, P., Feirtag, J., Tung, M. A.: Incorporating whey proteins into Mozzarella cheese. *Int. J. Dairy Tech.*, 52 (1999) 51–62.
- Reddy, K. A., Marth, E. H.: Proteolysis in Cheddar cheese made with sodium chloride, potassium chloride or mixtures of sodium and potassium chloride. *LWT*, 26 (1993) 434–442.
- Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association of Cereal Chemists: The Definition of Dietary Fiber, *Cereal Foods World*, 46 (3) (2001) 112–126.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J., Gibson, G. R.: The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.*, 128 (1998) 11–19.
- Robinson, R. K.: The potential of inulin - a functional ingredient. *British Food Journal*, 97 (1995) 30–32.
- Rodriguez, J.: Recent advances in the development of low fat cheeses. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (1998) 249–254.
- Romeih, E. A., Michaelidou, A., Biliaderis, C. G., Zerfiridis, G. K.: Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *Int. Dairy Journal*, 12 (6) (2002) 525–540.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K., Stanton, C.: Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *Austr. J. Dairy Tech.*, (2002) 71–78.
- Rowland, I. R., Rummey, C. J., Coutts, J. T., Lievense, L. C.: Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19 (1998) 281–285.
- Rowney, M. K., Hickey, M. W., Roupas, P., Everett, D. W.: The effect of homogenization and milk fat fractions on the functionality of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 86 (2003) 712–718.
- Roy, D., Mainville, I., Mondou, F.: Selective enumeration and survival of *Bifidobacteria* in fresh cheese. *Int. Dairy Journal*, 7 (1997) 785–793.
- Rudan, M. A., Barbano, D. M., Kindstedt, P. S.: Effect of fat replacer (salatrim) on chemical composition, proteolysis, functionality, appearance, and yield of reduced fat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 2077–2088.
- Rulikowska, A., Kilcawley, K. N., Doolan, I., Alonso-Gomez, M., Beresford, T. P., Wilkinsson, M. G.: Influence of sodium chloride on the quality of cheddar cheese, Poster, 5th IDF Symposium of cheese ripening, 9–13 mart 2008, Bern, Švajcarska, *Knjiga apstrakata*.
- Ryhänen, E. L., Leppälä, A., Pahkala, E.: A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy Journal*, 11 (2001) 441–447.
- Schroeder, C. L., Bodyfelt, F. W., Wyatt, C. J., McDaniel, M. R.: Reduction of sodium chloride in Cheddar cheese: Effect on sensory, microbiological and chemical properties. *J. Dairy Sci.*, 71 (8) (1988) 2011–2020.
- Sheehan, J. J., Guinee, T. P.: Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. *Int. Dairy Journal*, 14 (2004) 161–172.
- Spiegel, J. E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V. H., Schmitt, D. F.: Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*, 48 (1994) 61–65.
- Steinbüchel, A., Ki Rhee, S.: Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry, Vol. 1, Wiley – VCH (2005).
- Taper, H. S., Delzenne, N., Roberfroid, M.: Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non digestible carbohydrates. *Int. J. Can.*, 71 (1997) 1109–1112.
- Tucović, N., Radulović, Z., Karić, A., Čuk, M., Ipač, N., Obradović, D.: Primena probiotika u proizvodnji edamskog sira, *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 15 (1-2) (2004) 12–15.
- Tungjaroenchai, W., Drake, M. A., White, C. H.: Influence of adjunct cultures on ripening of reduced fat Edam cheeses. *J. Dairy Sci.*, 84 (2001) 2117–2124.
- Tunick, M. H., Malin, E. L., Smith, P. W., Shieh, J. J., Sullivan, B. C., Mackey, K. L., Holsinger, V. H.: Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized mil. *J. Dairy Sci.*, 76 (1993) 3621–3628.
- Van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G.: On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 35 (1995) 525–552.
- Vinderola, C., Proselld, K., Ghiberto, D., Reinheier, J. A.: Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.*, 83 (2000) 1905–1911.
- Wang, X., Gibson, G. R.: Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, 75 (1993) 373–380. www.usprobiotics.org.
- www.wikipedia.org/dietaryfiber
- Wyatt, C. J.: Acceptability of reduced sodium in breads, cottage cheese, and pickles. *J. Food Sci.*, 48 (1983) 1300–1302.

SUMMARY

CHEESES WITH DIETETIC AND FUNCTIONAL PROPERTIES

Predrag D. Puđa, Jelena B. Miočinović

University of Belgrade, Faculty of Agriculture

Modern medicine indicates the strong importance of diet in the preservation and the improvement of people's health. Hence, during the last few decades, a substantial interest for the production of cheeses with dietetic and functional properties has been present. Current investigations on production of cheeses with reduced fat and salt content, as well as cheeses with probiotic bacteria and dietary fibre are shown.

Key words: reduced fat cheeses • cheeses with reduced salt content • probiotic bacteria • dietary fibre

RADOMIR V. MALBAŠA
EVA S. LONČAR
LJILJANA A. KOLAROV

Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet

NAUČNI RAD

UDK: 637.146.1:637.146.3:637.047:577.164.2

Ispitana je mogućnost određivanja vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima dobijenim fermentacijom kombuhe na mleku sa 0,9 i 2,2% mlečne masti. Za određivanje je korišćena tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) na obrnutim fazama sa UV-DAD detekcijom. Uzorci su analizirani nakon proizvodnje, kao i nakon petodnevnog i desetodnevnog skladištenja.

Prosečna vrednost sadržaja vitamina C u kombuha fermentisanim mlečnim proizvodima je iznosila 13,47 mg/100 g, uz prosečnu vrednost testa povrata od 82,9%.

Standardne analize fermentisanih mlečnih proizvoda od kombuhe pokazale su da njihove karakteristike odgovaraju aktuelnom Pravilniku.

Ključne reči: kombuha • fermentisani mlečni proizvodi • vitamin C • kvalitet proizvoda

UVOD

Proizvodnja fermentisanih mlečnih napitaka danas je zastupljena širom sveta, a proizvedeni napici imaju različite nazive, u zavisnosti od regije u kojoj se proizvode: u Evropi kao jogurt, kiselo mleko, acidofilno mleko, kefir; u Aziji dahi, karunga; u Africi kao bongo, leben i dr.

Adresa autora:
Doc. dr Radomir Malbaša
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
tel: 021/485-3645; fax: 021/450-413
e-mail: bingula@yahoo.com

ODREĐIVANJE VITAMINA C U FERMENTISANIM MLEČNIM PROIZVODIMA OD KOMBUHE

Razvoj industrije mleka, svakodnevni napredak nauke i tehnologije doprineli su proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka u strogo kontrolisanim i tehnološki definisanim uslovima, uz korišćenje termofilnih i mezofilnih bakterija mlečne kiseline (starter kultura). Jogurtne starter kulture pripadaju rodovima *Streptococcus* i *Lactobacillus*.

Ova mikroflora za svoj metabolizam koristi laktozu, koja se preko niza jedinjenja transformiše do mlečne kiseline. Stvorena mlečna kiselina podstiče peristaltiku creva i poboljšava resorpciju kalcijuma i fosfora u organizmu, te produžava trajnost proizvoda, a nastali diacetil i acetaldehid daju proizvodu karakterističan izgled i aromu (Carić, 1997; Milanović i sar., 2001).

Mlečna kiselina snižava vrednost pH mleka, dolazi do izdvajanja kalcijuma i fosfora iz kazeina, tako da kazeinska micela gubi stabilnost, koaguliše i uklapa u sebe ostale sastojke mleka. Do destabilizacije kazeina mleka dolazi pri vrednosti pH od 5,3, dok se gel stvara na izoelektričnoj tački (IET) kazeina pri vrednosti pH od 4,6. Kada je vrednost pH gotovog proizvoda 4,3-4,5, transformisano je samo oko 1% laktoze (Tamime & Robinson, 2004).

Kombuha je simbiotska asocijacija kvasaca i bakterija sircetnog vrenja, koja metaboličkom aktivnošću od crnog čaja zaslađenog saharozom stvara prijatan, blago gaziran nakiseo napitak, koji sadrži brojne nutritivne i farmakološki značajne komponente. Pozitivan uticaj tih komponenta na zdravlje ljudi je opisan i u literaturi (Dufresne & Farnworth, 2000).

Ranije je utvrđena mogućnost fermentacije kombuhe na laktozi (Reiss, 1994). Lončar i sar. (2001), Milanović i

sar. (2002), Malbaša i sar. (2008, 2009), Duraković i sar. (2008) istraživali su metaboličku aktivnost kombuhe na mleku, dok su Beloso-Morales i Hernández-Sánchez (2003) objavili rad o proizvodnji napitka od kombuhe iz surutke.

Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin rastvorljiv u vodi, a prisutan je u svežem voću i povrću. U mleku se nalazi malo vitamina C. Učestvuje u brojnim biološkim procesima, kao što su sinteza kolagena i karnitina i metabolizam masnih kiselina. Uz vitamin E je najjači antioksidans među vitaminima (Du Toit et al., 2001).

Apsorpcija vitamina C se odvija u sluznici usne duplje i u gornjem delu tankog creva. Apsorpciju vitamina C pomažu kalcijum, magnezijum, svi vitamini i minerali, a odmažu stres, visoka temperatura tela, duvan, alkohol, antibiotici, salicilati, kortizon i oralna kontraceptivna sredstva.

Preporučene doze vitamina C za muškarce i žene su 60 mg dnevno, a za trudnice i dojilje 100 mg dnevno (Tauler et al., 2003).

Cilj ovog rada je da se ispita mogućnost određivanja vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima dobijenim fermentacijom kombuhe na mleku sa 0,9 i 2,2% mlečne masti. Za određivanje je korišćena tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) na obrnutim fazama sa UV-DAD detekcijom. Uzorci su analizirani nakon proizvodnje i nakon petodnevnog i desetodnevnog skladištenja. Kvalitet uzoraka je dodatno praćen standardnim analizama fizičko-hemijskih karakteristika, merenjem sposobnosti vezivanja vode i sinerezisa surutke.

MATERIJAL I METODI

Inokulum

1. Tradicionalni inokulum kombuhe – kultivacija kombuhe na supstratu sa saharozom, koncentracije 70 g/L, uz dodatak crnog čaja, 1,5 g/L. U ohlađen čaj je dodato 10% (v/v) nativnog inokuluma, fermentativne tečnosti, iz prethodne fermentacije. Inkubacija je trajala 7 dana na 28°C. Tako dobijena fermentaciona tečnost je korišćena kao inokulum za fermentaciju mleka.

Proizvodnja fermentisanih mlečnih napitaka

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka u laboratorijskim uslovima korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 0,9 i 2,2% mlečne masti, proizvođača "Novosadska mlekarica" Novi Sad.

U mleko sa 0,9 i 2,2% je dodato 10% (v/v) tradicionalnog inokuluma kombuhe. Fermentacija je izvedena na 42°C do postizanja pH od 4,5. Gel je potom ohlađen na temperaturu od 8°C i homogenizovan mešalicom. Dobijeni uzorci, označeni K-0,9% i K-2,2%, redom su skladišteni na 4°C tokom deset dana.

Metode analize

U dobijenim proizvodima određeni su suva materija, mlečna mast, ukupni proteini, pH, ukupna kiselost i pepeo, metodama koje su sistematizovali Carić i sar. (2000).

Sinerezis surutke, izražen u mL, određen je nakon 3 sata filtracije 50 g uzorka na sobnoj temperaturi (Atamer i sar., 1996).

Sposobnost vezivanja vode (SVV) predstavlja količinu surutke (%) izdvojene nakon centrifugiranja 20 g uzorka tokom 30 minuta, na sobnoj temperaturi (Guzman-Gonzales et al., 1999).

Standardi i reagensi za određivanje vitamina C metodom HPLC

Kao standard je korišćen vitamin C proizvođača J.T. Baker (Holandija). Standard i uzorci su rastvarani/ekstrahovani 3%-nim rastvorom meta-fosforne kiseline (Riedel-de Haën, Nemačka), koja je rastvarana u 8%-nom rastvoru sirćetne kiseline (Zorka, Šabac, Srbija). Rastvor amonijum-acetata (Kemika, Zagreb, Hrvatska), koncentracije 0,1 mol/L, pH 5,1, korišćen je

kao pokretna faza u HPLC analizi. Rastvori su pripremani u bidestilovanoj vodi, koja je odgovarala HPLC kvalitetu.

HPLC sistem

Korišćen je HPLC sistem »Agilent 1100«, SAD, sa petljom injektora od 20 µL, C-18 kolonom, prečnika čestica 5 µm, i UV-DAD detektorom. Protok pokretne faze je bio 0,4 mL/min, a temperatura kolone 37°C. Analize su trajale 4 minuta i ponavljane su tri puta. Uslovi analize su preuzeti sa zvaničnog sajta firme Merck, Nemačka.

Priprema uzoraka za analizu vitamina C

Odmereno je tačno oko 1 g uzorka fermentisanih mlečnih proizvoda od kombuhe u normalni sud od 10 mL, koji je do crte dopunjen 3%-nim rastvorom meta-fosforne kiseline u 8%-noj sirćetnoj kiselini. Takav rastvor je ručno mućkan, odnosno vitamin C ekstrahovan, tokom 5 minuta. Nakon toga je rastvor profiltriran kroz filter hartiju plava traka, a zatim fino prečišćen propuštanjem kroz membranski filter, prečnika pora 0,45 µm (Econofilter, Agilent). Filtrat je analiziran tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Senzornim ocenjivanjem od strane kvalifikovanih ocenjivača, proizvedeni fermentisani mlečni napici su okarakterisani kao senzorno potpuno prihvatljivi, slični tradicionalnom i probiotičkom jogurtu, blagog i prijatnog ukusa. Fizičko-hemijske karakteristike dobijenih uzoraka, nakon proizvodnje i tokom petodnevog i desetodnevog skladištenja, prikazani su u tabeli 1.

Na osnovu vrednosti fizičko-hemijskih parametara (tabela 1), zaključuje se da je kvalitet analiziranih uzoraka, poredeći ih sa jogurtom, u skladu sa Pravilnikom (Sl. List SRJ, 26/2002).

Tokom sinerezisa, surutka prolazi kroz proteinski matriks, što se može objasniti Darsijevim zakonom. Permeabilnost gela ima značajan uticaj na intenzitet sinerezisa. Permeabilnost raste tokom koagulacije. Ovaj parametar zavisi od nekoliko faktora, kao što su stepen umreženosti grušta, koncentracija kazeina i temperatura. Povećanjem pH i koncentracije kazeina

opada permeabilnost i sinerezis, dok povećanje temperature izaziva suprotan efekat (Jovanović i sar., 2004). Iz tabele 1 se vidi da se sinerezis surutke u svim uzorcima kreće u uskom intervalu i prosečno iznosi 32,2 mL.

Što se tiče apsorbirane vode, na nju najviše utiču fizičko-hemijski parametri koji direktno utiču na proteine i osobine površine njihovih molekula. To bi značilo da sposobnost vezivanja vode ne zavisi samo od veličine pora i kapilara nego i od naelektrisanja molekula proteina (hidrofobnih interakcija, vodoničnih veza, S-S veza, kiselina, baza i cviter jona), kao i od Van der Valsovih sila. Takođe, na proteine utiču jonske vrste, jonska jačina rastvora, pH, temperatura i vreme potrebno za postizanje ravnoteže sistema protein/voda. Supstance male molarne mase (laktoza i mineralne soli) isto imaju značajan uticaj na sposobnost vezivanja vode nekih proteina. Zadržana voda utiče od različitih uspostavljenih umreženih struktura proteina, koje imobilizuju vodu (Kneifel et al., 1991).

Vrednosti SVV ispitivanih uzoraka bile su prilično visoke, od 63,50 do 78,00% (tabela 1), što govori o njihovom veoma dobrom kvalitetu.

Na slici 1 prikazani su reprezentativni HPLC hromatogrami određivanja vitamina C u uzorku fermentisanog mlečnog proizvoda od kombuhe, bez dodatka i sa dodatkom standarda vitamina C, u cilju utvrđivanja procenta povrata supstance (Eng. Recovery test).

Vitamin C je identifikovan poređenjem retencionih vremena pika standarda vitamina C i odgovarajućeg pika supstance iz uzorka. Pomoću komercijalnog softvera »Agilent«, poređeni su spektar vitamina C iz baze podataka, i spektar supstance pika i na taj način, na osnovu verovatnoće poklapanja od preko 90%, potvrđena je identifikacija. Retenciono vreme vitamina C bilo je oko 2,7 min.

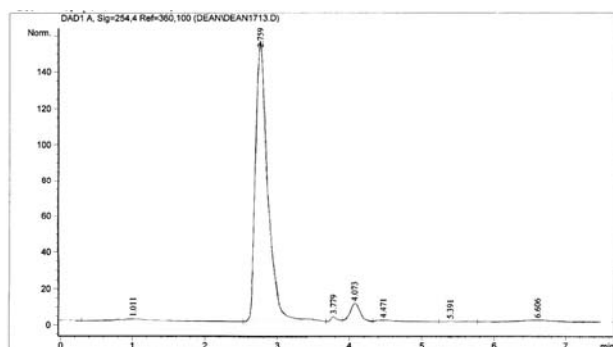
Na osnovu rezultata hromatografske analize (slika 1) može se uočiti da je visina i površina pika mnogo veća u uzorku sa dodatim unutrašnjim standardom, što je i očekivano za analizu koja ima visok procenat povrata supstance. Pikovi su oštri, karakterističnog oblika, jasno uočljivi, što govori o kvalitetu HPLC metode, odnosno da su primenjeni odgovarajući uslovi analize.

Rezultati određivanja sadržaja vitamina C u uzorcima kombuha fer-

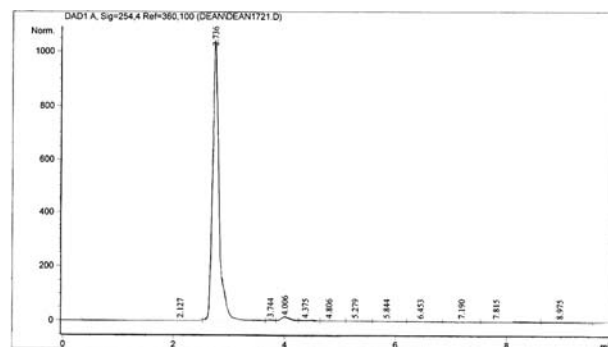
Tabela 1. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE KOMBUHA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA NAKON PROIZVODNJE I TOKOM SKLADIŠTENJA

Table 1. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF KOMBUCHA FERMENTED MILK BEVERAGES AFTER PRODUCTION AND DURING STORAGE

KOMPONENTA	UZORAK					
	K-0,9% Nakon proizvodnje	K-2,2% Nakon proizvodnje	K-0,9% 5 dana skladištenja	K-2,2% 5 dana skladištenja	K-0,9% 10 dana skladištenja	K-2,2% 10 dana skladištenja
pH	4,5	4,5	4,4	4,4	4,3	4,4
Mlečna mast (%)	0,9	2,2	0,9	2,2	0,9	2,2
Suva materija (%)	9,63	10,64	9,63	10,64	9,63	10,64
Pepeo (%)	0,80	1,83	0,80	1,83	0,80	1,83
Kiselost, °SH	25,61	27,81	24,61	25,01	27,71	24,72
Ukupni proteini (%)	3,14	3,01	3,14	3,01	3,14	3,01
SVV (%)	65,00	69,50	63,50	64,00	78,00	73,50
Sinerezis, mL	36	35	29	32	32	29



a)



b)

Slika 1. HPLC HROMATOGRAMI KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG PROIZVODA (a) I KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG PROIZVODA SA DODATIM VITAMINOM C (b)

Figure 1. HPLC CHROMATOGRAMS OF KOMBUCHA FERMENTED MILK BEVERAGE (a) AND KOMBUCHA FERMENTED MILK BEVERAGE WITH VITAMIN C ADDITION (b)

mentisanih mlečnih proizvoda i vrednosti recovery testa prikazani su u tabeli 2.

Srednja vrednost vrednost testa povrata od 82,9% (tabela 2) govori o tome da je primenjena metoda pripreme uzorka za HPLC analizu bila dobra, naročito ako se uzme kompleksnost matriksa uzorka.

Prosečna vrednost sadržaja vitamina C u kombucha fermentisanim

mlečnim proizvodima je iznosila 13,47 mg/100 g (tabela 2). U literaturi nema podataka o sadržaju vitamina C u ovakvoj vrsti proizvoda, te su rezultati mogli biti poređeni sa jogurtom i kefirom. U jogurtu proizvedenom od kravljeg mleka sadržaj vitamina C je oko 1 mg/100 g. Najviši sadržaji ovog vitamina zabeleženi u literaturi iznose 2,32 mg/100 g za jogurt i 2,10 mg/100 g za kefir proizvedene od ovčijeg mle-

ka (20), što je za oko 6 do 6,5 puta manje u odnosu na kombucha fermentisane mlečne proizvode (tabela 2). To je pokazatelj veoma dobrog kvaliteta kombucha proizvoda sa stanovništa sadržaja vitamina C, koji nije karakterističan za mleko i proizvode od mleka, naročito ne u značajnijim količinama. Takođe, interesantno je da sadržaj mlečne masti nije drastično uticao na sadržaj vitamina C, jer je

Tabela 2. SADRŽAJ VITAMINA C U FERMENTISANIM MLEČNIM PROIZVODIMA OD KOMBUHE
Table 2. VITAMIN C CONTENT IN FERMENTED MILK-BASED KOMBUCHA PRODUCTS

KOMPONENTA	UZORAK SAMPLE					
	K-0,9% Nakon proizvodnje	K-2,2% Nakon proizvodnje	K-0,9% 5 dana skladištenja	K-2,2% 5 dana skladištenja	K-0,9% 10 dana skladištenja	K-2,2% 10 dana skladištenja
Vitamin C (mg/100g)	13,53	13,02	14,21	12,49	13,87	13,68
Vitamin C recovery (%)	83,01	78,90	84,46	87,12	83,33	80,58

hidrosolubilni vitamin, gde je najveća razlika u proizvodima zapažena nakon 5, a najmanja nakon 10 dana skladištenja (tabela 2). Dobra održivost vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima tokom skladištenja, osim za uzorke proizvedene u ovom radu, potvrđena je i za kefir i jogurt od ovčijeg mleka nakon 14 dana skladištenja (Bonczar et al., 2004), što praktično govori o metaboličkoj aktivnosti proizvodnih mikroorganizama i na nižim temperaturama.

ZAKLJUČAK

Proizvedeni su kombuha fermentisani mlečni proizvodi od mleka sa 0,9 i 2,2% mlečne masti i u njima je određen sadržaj vitamina C.

Vitamin C je ekstrahovan iz uzoraka meta-fosforom kiselinom, prečišćavan filtracijom i membranskom filtracijom i hromatografski određen HPLC-UV-DAD metodom.

Prosečan sadržaj vitamina C u kombuha fermentisanim mlečnim proizvodima od 13,47 mg/100 g, jedan je od pokazatelja boljeg kvaliteta ovih proizvoda u poređenju sa jogurtom i kefirom.

Promene sadržaja vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe, tokom desetodnevnog skladištenja, bile su neznatne.

ZAHVALNICA

Zahvaljujemo Ministarstvu nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za finansiranje istraživanja prikazanih

u ovom radu, a koja su izvedena u okviru projekta TR-20008, Funkcionalni fermentisani mlečni napitak - nova tehnologija.

LITERATURA

- Atamer, M., Carić, M., Milanović, S., Gavarić, D.: Kvalitet jogurta proizvedenog iz UF mleka, Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, Matica srpska Novi Sad, 91 (1996) 19-26.
- Belloso-Morales, G., Hernández-Sánchez, H.: Manufacture of a beverage from cheese whey using "tea fungus" fermentation. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45 (1-2) (2003) 5-11.
- Bonczar, G., Regula, A., Grega, T.: The vitamin C content in fermented milk beverages obtained from ewe's milk, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 7 (1) Available Online* <http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue1/food/art-06.html> (2004).
- Carić, M.: Savremeni razvoj tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda u monografiji: Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda, Jugoslovenski mlekarski simpozijum, Zlatibor, (1997) 26-55.
- Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D.: Standardne analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad (2000).
- Dufresne, C., Farnworth, E.: Tea, Kombucha and health: A review. *Food Research International*, 33 (2000) 409-421.
- Duraković, K., Milanović, S., Carić M., Iličić, M., Đurić, M., Tekić, M., Lenđel, J.: Funkcionalni niskoenergetski fermentisani mlečni napitak proizveden uz primenu kombuhe. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2) (2008) 66-73.
- Du Toit, R., Volsteed, Y., Apostolides, Z.: Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 166 (1-2) (2001) 63-69.
- Guzman-Gonzalez, M., Morais, F., Ramons, M., Amigo, L.: Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (1999) 1117-1122.
- Jovanović, S., Mačej, O., Barać, M.: Influence of various coagulation factors on chemical composition of sera gained by centrifugation from casein gel. *Journal of Agricultural Sciences*, 49 (2) (2004) 219-232.
- Kneifel, W., Paquin, P., Abert, T., Richard, J.-P.: Water-Holding Capacity of Proteins with Special Regard to Milk Proteins and Methodological Aspect – A Review. *Journal of Dairy Science*, 74 (1991) 2027-2041.
- Lončar, E., Milanović, S., Carić, M., Malbaša, R., Panić, M.: Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 12 (1-2) (2001) 13-17.
- Malbaša, R., Minić, S., Lončar, E., Kolarov, Lj.: Uticaj inokuluma kombuhe na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2) (2008) 43-46.
- Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Djurić, M., Carić, M., Iličić M., Kolarov, Lj.: Milk – based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, 112 (2009) 178-184.
- Milanović, S., Carić, M., Panić, M., Vukanić, A.: Dijetalni kvark sa funkcionalnim aromama. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 12 (1-2) (2001) 48-50.
- Milanović, S., Carić, M., Lončar, E., Panić, M., Malbaša, R., Dobrić, D.: Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 13 (1-2) (2002) 8-13.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture, Sl. list SRJ, 26/2002.
- Reiss, J.: Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 198 (1994) 258-261.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K.: *Yoghurt-Science and Technology*, Pergamon Press, Oxford, England (2004).
- Tauler, P., Aguilo, A., Gimeno, I., Fuentespina, E., Tur, J. A. and Pons, A.: Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 446 (6) (2003) 658-664.

SUMMARY

DETERMINATION OF VITAMIN C IN KOMBUCHA-BASED FERMENTED MILK PRODUCTS

Radomir V. Malbaša, Eva S. Lončar, Ljiljana A. Kolarov

University of Novi Sad, Faculty of Technology

Determination of vitamin C in fermented milk products obtained by kombucha fermentation in milk with 0.9 i 2.2% of milk fat was researched. RP-HPLC with UV-DAD detection was used. Samples were analyzed after production and after 5- and 10-days storage.

Average content of vitamin C in fermented milk products obtained by kombucha fermentation was 13.47 mg/100 g, with average recovery test value of 82.9%.

Standard analysis of obtained kombucha products shows characteristics which are in accordance with current quality regulations.

Key words: kombucha • fermented milk products • vitamin C • product quality

SNEŽANA B. BULAJIĆ
ZORA M. MIJAČEVIĆ

Univerzitet u Beogradu, Fakultet
veterinarske medicine

NAUČNI RAD

UDK: 637.047+637.05:615.33

BIOLOŠKI HAZARD – REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE MIKROORGANIZAMA IZOLOVANIH IZ NAMIRNICA

UVOD

Literaturni podaci u poslednjih nekoliko godina osiguravaju dokaz o visokoj prevalenci sojeva mikroorganizama rezistentnih na antibiotike, kako kod populacije farmakskih životinja, tako i u namirnicama animalnog porekla. Molekularne analize, u situacijama kada su moguće, pokazuju da se mikroflora namirnica animalnog porekla, sa aspekta profila antibiotske rezistencije i utvrđene genetske baze rezistencije, ne razlikuje od sojeva mikroorganizama poreklom od ljudi.

Sve ovo ukazuje da je antibiotska rezistencija problem globalnih dimenzija, kao i na činjenicu da se ne može rešiti ukoliko postoji konstantni priliv gena rezistencije u humanu mikrofloru putem lanca hrane.

Iz tog razloga, Evropska agencija za bezbednost hrane („European Food Safety Authority -EFSA“) je zatražila od Panela zaduženog za karakterizaciju biološkog hazarda da, sa perspektive zaštite zdravlja ljudi, identifikuje u kojoj meri hrana služi kao izvor rezistentnih mikroorganizama, odnosno gena rezistencije, pritom izvrši kategorizaciju identifikovanog rizika kao i da označi kontrolne mere za smanjenje rizika. U radu je dat sažet prikaz definicije i karakterizacije hazarda, procene rizika kao i mogućih preventivnih i kontrolnih mera u minimizaciji te vrste hazarda.

Ključne reči: antibiotska rezistencija • namirnice

Kada su antibiotici prvi put predstavljeni 50-tih godina prošlog veka u praksi, pri lečenju mikrobnih infekcija, genetičari toga vremena su smatrali malo verovatnim razvoj antibiotske rezistencije usled veoma niske frekvencije mutacija koje bi vodile ka uspostavljanju fenotipa rezistencije. Ipak, nekoliko godina po primeni penicilina u kliničkoj praksi, Abraham i Chain (1940) identifikuju bakterijski enzim koji katalizuje hidrolizu β -laktamskog prstena antibiotika i time eliminiše antibakterijsku aktivnost. Njihovo predviđanje se obistinilo u meri koju niko, u to vreme, nije mogao predvideti; enzim penicilinaza, i njegovi mnogi izozimi, od tog vremena, uspešno inhibiraju akciju β -laktamskih antibiotika, i još uvek su glavni uzrok rezistencije na ovu klasu antibiotika.

Isto tako, nije se očekivalo da bakterije u našem prirodnom okruženju mogu prikupljati i pritom izmenjivati genetsku informaciju sa tako izvanrednom lakoćom i nepostojanjem specifičnosti u odnosu na vrstu. Zahvaljujući horizontalnom transferu gena rezistencije, sve više smo u prilici da u centar problema stavljamo pojavu epidemije gena rezistencije, mada je prisutna i epidemija visoko i multiplo rezistentnih klonova mikroorganizama (*Salmonella typhimurium* DT104). Širenje rezistencije, u ovom slučaju, ne poštuje filogenetske, geografske ili ekološke barijere. Rezistencija na antibiotike odavno više ne predstavlja isključivo problem kliničara, već se sagledava globalni aspekt ove pojave, a o samom fenomenu rezistencije diskutuje kao o ekološkom problemu.

Iako su predložene razumne hipoteze o poreklu determinanti rezisten-

cije na antibiotike, kao i postavke o njihovoj inkorporaciji u stabilne replikativne i prenosive genetske forme mikroorganizama, demonstracija u smislu *FLAGRANTE DELICTO* nije, bar za sada, moguća (Amabile-Cuevas, 1993). Rešavanje ove problematike predstavlja veoma težak, ako ne i nemoguć zadatak ukoliko uzmemo u obzir diverzitet mikrobnog sveta. Do danas, mikrobiolozi su identifikovali manje od 5% populacije mikroorganizama u prirodi. Geni rezistencije na antibiotike bivaju predstavljeni od strane, nama danas nepoznatih bakterijskih vrsta. Pasaža gena rezistencije kroz mikrobn svet do patogene bakterije, kao odgovor na selektivni pritisak globalne primene antibiotika, uključuje kaskadni sled transfera gena između velikog broja nama nepoznatih i različitih mikrobnih vrsta. Kompletna karakterizacija ovog scenarija bi predstavljala neku vrstu eksperimentalnog košmara, kako postoje brojni, do danas neidentifikovani, izvori determinanti rezistencije, kao i veliki broj različitih mehanizama njihove diseminacije.

Antibiotska rezistencija kod mikroorganizama, uzročnika alimentarnih oboljenja, predstavlja realnost, mada postoje značajne kvantitativne i kvalitativne razlike. Rezistencija na antibiotike kod pojedinih vrsta dostiže nivo od 100%. Na primer, rezistencija na tetracikline, hloramfenikol, streptomycin i sulfonamide kod sojeva *S. typhimurium* DT104, odnosno 80% za iste antibiotike kod sojeva *E. coli*, i 50% za ampicilin i penicilin kod sojeva *Staphylococcus aureus*. Utvrđeni su identični geni rezistencije i mehanizmi molekularnog transfera gena rezistencije na antibiotike kod mikroorganizama izolovanih iz namirnica te patogenih

Adresa autora:

Doc. dr Snežana Bulajić, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd
tel.: +381 11 2685 653,
e-mail: snezab@vet.bg.ac.rs

bakterija poreklom ljudi i životinja (Teuber i sar., 1996; Teuber i sar., 1999).

U današnje vreme mnogi istraživači ističu hipotezu o tome da komenzalne bakterije, pre svega bakterije mlečne kiseline, mogu predstavljati rezervoar gena rezistencije na antibiotike (Perreten i sar., 1997; Levy i Salyers, 2002). Upravo iz ovog razloga, populacija komenzala je veoma značajna u spoznavanju mehanizama perzistencije i širenja gena rezistencije u svetu mikroorganizama. Takvi mikroorganizmi koji se označavaju kao „rezervoari“ mogu se naći u različitim namirnicama, pre svega fermentisanim proizvodima od mleka i mesa, koji su u velikom broju opterećeni nepatogenim bakterijama kao rezultat njihovog prirodnog procesa proizvodnje. Prema ovoj teoriji, lanac hrane se može smatrati jednim od glavnih puteva transmisije rezistentnih bakterija između populacije ljudi i životinja (Witte, 1997).

Neosporno je da prisustvo rezistentnih sojeva mikroorganizama izolovanih iz namirnica, bilo uzročnika alimentarnih oboljenja, ili pak komenzalnih bakterija, kao i potencijal prenosa determinanti rezistencije na daleko patogenije vrste, predstavlja hazard. Iz tog razloga, Evropska agencija za bezbednost hrane („European Food Safety Authority -EFSA“) zatražila je od Panela zaduženog za karakterizaciju biološkog hazarda da, sa perspektive zaštite zdravlja ljudi, identifikuje u kojoj meri hrana služi kao izvor rezistentnih mikroorganizama, odnosno gena rezistencije, pritom izvrši kategorizaciju identifikovanog rizika kao i da označi kontrolne mere za smanjenje rizika (EFSA, 2008).

Definicija rezistencije

Identifikacija i procena rizika, u ovom slučaju, odnosi se isključivo na mikrobiološku rezistenciju. Sojevi mikroorganizama koji raspolažu stečenim mehanizmima rezistencije (transfer gena ili mutacija), mogu tolerisati više koncentracije antibiotika nego većina osetljive tzv. „wild-type“ populacije, i definišu se kao mikrobiološki rezistentni sojevi. Posledično, rezistentni sojevi mikroorganizama pokazuju veće vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK). Mikrobiološke granične vrednosti, o kojima Evropski komitet za testiranje antimikrobne osetljivosti (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) izveštava kao o epidemio-

loškim „cut-off“ vrednostima, koriste se za razlikovanje populacije mikroorganizama sa stečenim genima rezistencije od populacije koja nije opskrbljena istim genima (White i sar., 2001). Ovakva kategorizacija je specifična za svaku kombinaciju određene vrste mikroorganizama i primenjenog antibiotika i zasniva se na distribuciji MIK vrednosti za reprezentativan broj sojeva; 300 – 600 sojeva prema White i sar. (2001). Teoretski, uniformna MIK distribucija pri nižim koncentracijama antibiotika ukazuje da su svi sojevi ispitivane vrste mikroorganizama osetljivi; uniformna distribucija sa višim MIK vrednostima za sve sojeve ispitivane vrste mikroorganizama smatra se intrinzičnim svojstvom rezistencije. Kao zadnja mogućnost, bimodalna MIK distribucija ukazuje da pojedini sojevi sa visokom, atipičnom MIK vrednosti mogu raspolagati mehanizmima stečene rezistencije. Primena epidemioloških „cut-off“ vrednosti daje odgovarajući nivo osetljivosti pri merenju razvoja rezistencije i time se može koristiti u predviđanju trenda ove pojave. Pri ovakvoj proceni rezistencije, kriterijumi su harmonizovani između zemalja članica Evropske unije. Stoga, EUCAST i EFSA predlažu primenu istih kriterijuma u monitoringu rezistencije mikroorganizama od značaja za humanu i veterinarsku medicinu (Kahlmeter i sar., 2003; EFSA, 2006).

Neophodno je praviti razliku između prirodne («intrinzič») i stečene (prenosive) rezistencije. Rezistencija na dati antibiotik može biti intrinzična u odnosu na bakterijsku vrstu ili rod (prirodna rezistencija), a karakteriše se sposobnošću jednog organizma da preživi u prisustvu određenog antimikrobnog agensa, usled urođene karakteristike rezistencije. Intrinzična rezistencija se ne prenosi horizontalno. Suprotno ovom tipu, stečena rezistencija je karakteristika pojedinih sojeva unutar vrste obično osetljive na primenjeni antibiotik, i može se horizontalnim putem prenositi među bakterijama. Stečena rezistencija na određeni antimikrobni agens proizlazi bilo iz mutacije u genomu bakterije ili usled sticanja dodatnih gena koji kodiraju mehanizam rezistencije. Ovakve genetske promene pojačavaju odbrambenu sposobnost bakterija. Geni koji kodiraju enzime odgovorne za modifikaciju strukture antibiotika obično su prenosive prirode (lokalizovani na mobilnim genetskim elementima), kao što su penicilinaze i cefalospori-

naze, acetil-transferaze, ili pak geni koji kodiraju modifikaciju ciljnog mesta delovanja antibiotika i time uspostavljaju rezistenciju na eritromicin, meticilin i glikopeptide.

Antimikrobni agensi predstavljaju heterogenu grupu molekula, a u odnosu na sličnost u strukturi i načinu delovanja grupišu se u klase. Unutar klase, ciljno mesto delovanja antibiotika u bakterijskoj ćeliji i mehanizam delovanja su isti ili slični, tako da pojedini mehanizmi podrazumevaju rezistenciju na većinu ili pak sve članove jedne klase antibiotika, u kom slučaju govorimo o unakrsnoj rezistenciji. Unakrsna rezistencija se može javiti i u slučaju nesrodnih klasa antibiotika ukoliko im se poklapaju ciljna mesta delovanja (makrolidi i linkozamidi) ili se radi o mehanizmu rezistencije niske specifičnosti (npr. utiče se na aktivnost „efflux“ pumpi).

Geni koji uslovljavaju rezistenciju na antibiotike su često lokalizovani na velikim genetskim elementima kao što su integroni, transpozomi i plazmidi, i kao takvi mogu biti „vezani“ na druge, nesrodne determinante rezistencije. U takvim slučajevima, multipli geni rezistencije mogu biti preneti u jednom, pojedinačnom transferu. Kada su dva ili više različitih gena rezistencije fizički vezani, takvu rezistenciju definišemo kao korezistenciju. Multipla rezistencija predstavlja fenomen rezistencije sojeva mikroorganizama na nekoliko različitih antimikrobnih agenasa ili antimikrobnih klasa.

Identifikacija hazarda

Direktni hazard, u ovom slučaju, predstavlja namirnica kontaminirana rezistentnim sojevima patogenih mikroorganizama koji kolonizuju ili inficiraju organizam čoveka po ingestiji hrane, ili pak ukoliko se osoba inficira rukujući sa kontaminiranom hranom. Indirektni transfer se tumači kao mogućnost transfera gena rezistencije pri komunikaciji rezistentnih sojeva komenzala sa patogenim mikroorganizmima, bilo direktno ili putem druge komenzalne bakterije. U ovom slučaju, determinante (geni) rezistencije se smatraju hazardom.

Transfer gena rezistencije se može realizovati u bilo kom delu lanca hrane, unutar organizma ljudi (intestinum) ili između sistema (sa intestinalnih bakterija na saprofitsku populaciju kože). Kod horizontalnog transfera gena identifikovana su tri mehanizma (Davies, 1994); prirodna transfor-

macija sa preuzimanjem i ugradnjom («inkorporacijom») slobodne DNA iz ekstracelularnog medijuma; konjugacija – mehanizam DNA transfera zavisen od ćelijskog kontakta koji kao takav postoji kod većine bakterijskih rodova; i transdukcija-transfer posredovan bakteriofagima. Veruje se da konjugacija predstavlja glavni način transfera gena (Salysers, 1995).

Tehnologije primenjive u industriji hrane i mogućnost razvoja antibiot-ske rezistencije

Većina tehnoloških rešenja u industriji hrane postavljena je tako da redukuje ukupan broj mikroorganizama kontaminiranih, uz sigurnu eliminaciju patogena, uzročnika alimentarnih oboljenja, uključujući i rezistentne sojeve. Nove tehnologije konzervisanja namirnica koje se ne zasnivaju na termičkom tretmanu (procesiranje visokim pritiskom, primena jonizujućeg i UV zračenja, kao i primena pulzacija električnih polja), dizajnirane su sa osnovnim ciljem proizvodnje bezbedne hrane uz održavanje nutritivne vrednosti i senzornih karakteristika namirnice. Eksperimentalne studije pokazuju da, usled oštećenja ćelijske membrane, enzima ili DNK, takve alternativne tehnologije mogu promovisati rezistenciju ili transfer determinanti rezistencije (Zenz i sar., 1998; Ceremonie i sar., 2004, 2006; Rodrigo i sar., 2005, 2007; McMahon i sar., 2007). Rezultati ovakvih studija su ipak spekulativne prirode, kako ostaju na nivou laboratorijskih ispitivanja, te ostaje da se ispita njihov značaj.

Povezanost rezistencije i virulencije kao hazard

Virulencija bakterija je generalno kodirana brojnim pojedinačnim genima ili pak klasterom gena, koji međusobno interferiraju pri različitim nivoima mehanizma patogenezе. U slučaju delecije pojedinih gena, od suštinske važnosti za patogenezu, virulencija može biti u potpunosti isključena. Veoma često, geni virulencije su kodirani na mobilnim genetskim elementima. U mehanizmu patogenezе učestvuju i drugi elementi, tzv. „ostrva patogenosti“, od kojih je dvanaest identifikovano kod sojeva *Salmonella enterica* (Hensel, 2004). Faktori virulencije kod pojedinih serovarova i fag tipova *Salmonella* spp. uključeni su u sistem sekvenciranja gvožđa, i time domaćinu omogućuju preživljavanje u

sredinama gde gvožđe nije na raspolaganju bakterijama (krv). Na ovaj način, povećana je invazivnost sojeva *Salmonella* spp. i dodatno se radi na virulenciji istih. Pored toga, genomska ostrva, kao što je SGI1 kod *S. Enterica*, mogu istovremeno nositi gene virulencije i gene koji kodiraju rezistenciju na antibiotike (Golding i sar., 2007). Kako o prisustvu gena virulencije i gena rezistencije na istim mobilnim genetskim elementima postoje izveštaji (Carlson i sar., 2007), transfer rezistencije i pritom simultani transfer korezidentnih gena virulencije, može opskrbiti bakteriju, pored svojstva rezistencije, i dodatnim mehanizmima virulencije.

Hazard – mikroorganizam kao nosač gena rezistencije

Sa aspekta antibiot-ske rezistencije mikroorganizama prisutnih u namirnicama, naučna javnost definiše tri različite grupe rezistentnih entiteta:

1. Uzročnici zoonoza i alimentarnih oboljenja – predstavljaju direktan hazard, budući da u određenim uslovima uzrokuju klinički manifestna oboljenja, a u slučaju njihove rezistencije, ne postoji mogućnost uspešnog antibiot-skog tretmana. Pored toga, u pojedinim slučajevima kolonizuju i perzistiraju u intestinalnom traktu ljudi, gde u komunikaciji sa drugim prisutnim mikroorganizmima mogu izmenjivati gene rezistencije (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Listeria* spp., verotoksična *E. coli* / *E. coli* O157H7, meticilin rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*).
2. Komenzalne bakterije – ispoljavaju hazarda, u ovom slučaju, velikim delom zavisi od kapaciteta komenzalnih mikroorganizama ingestiranih hranom da ostvare kontakt sa populacijom komenzala i patogena poreklom ljudi (*E. coli*, enterokoke).
3. Industrijski, ili tzv. tehnološki sojevi, najvećim delom bakterije mlečne kiseline, koje se sa namerom dodaju sistemu namirnica kao starteri kako bi vodile proces fermentacije ili kao probiotski dodaci. Primena takvih sojeva isključuje mogućnost da isti sojevi nose prenosive determinante rezistencije (FAO/WHO, 2001; EFSA, 2005; EFSA, 2007).

Primer hazarda

- **Mikroorganizmi koji se sa namerom dodaju kao starter, pomoćne, zaštitne ili probiotske kulture ili pak predstavljaju integralni deo namirnice (autohtona mikroflora)**

Mikrofloru fermentisanih proizvoda uglavnom predstavljaju bakterije mlečne kiseline, pre svega rodovi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. U sastav mnogih kultura ulazi i *Streptococcus thermophilus*, dok su enterokoke, kod velikog broja autohtonih proizvoda prisutne u značajnom broju. Pojedine vrste stafilokoka i mikrokoka (*S. carnosus*, *S. xylosus*, *M. varians*) primenjuju se u procesima fermentacije mesa kao producenti boje i arome. U probiotskim proizvodima, zastupljene su bakterije mlečne kiseline intestinalnog porekla, najvećim delom laktobacili i bifidobakterije, dok se enterokoke koriste kao probioci u ishrani životinja (Ouwehand i sar., 2002).

- **Identifikacija i karakterizacija hazarda**

U pojedinim izolovanim slučajevima, isključivo kod imunokompromitovanih osoba, laktobacili su utvrđeni kao uzročnici oportunističkih infekcija (Salminen i sar., 2006). Klinička oboljenja prouzrokovana sojevima laktobacila za industrijsku primenu, nisu zabeležena. Nekoliko slučajeva infekcija ljudi je etiološki dovedeno u vezu sa probiotskim sojevima *Lactobacillus rhamnosus* (Rautio i sar., 1999; de Groote i sar., 2005). Takve infekcije se ipak smatraju izolovanim incidentima, a pored toga nema indikacija neuspešne terapije usled antibiot-ske rezistencije ovih sojeva. Postoji svega nekoliko naučnih studija o prevalenci markera antibiot-ske rezistencije kod startera, ili sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz fermentisanih namirnica. U okviru projekta ACE-ART Šestog Framework Programa EU, približno 1400 izolata bakterija mlečne kiseline i bifidobakterija ispitano je na prisustvo markera tipične i atipične antibiot-ske rezistencije. Pojedini rezultati ove opsežne studije već su objavljeni (Florez i sar., 2006, 2007; Korhonen i sar., 2007; Matto i sar., 2007; Tosi i sar., 2007; Egervarn i sar., 2008). Generalni zaključak jeste da su slučajevi prenosive rezistencije u populaciji bakterija mlečne kiseline retki,

dok je najčešće zastupljen profil anti-biotske rezistencije, rezistencija na tetraciklin.

- **Izloženost riziku konzumacijom namirnica**

U radu Teuber i sar. (1999) navedeni su brojni primeri stečene rezistencije kod bakterija mlečne kiseline izolovanih iz namirnica. Najčešće su takvi mehanizmi zastupljeni kod enterokoka, koji, pored rezistencije na vankomicin, mogu preuzeti i akumulirati i druge determinante rezistencije, ali opet najčešće gene rezistencije na tetraciklin, eritromicin i hloramfenikol. Ove determinante rezistencije često se lokalizovane na konjugativnim plazmidima, što čini mogućim transfer istih, kako između enterokoka, tako i između različitih vrsta i rodova mikroorganizama. Pored enterokoka, sojevi laktokoka i laktobacila, koji nose multi-rezistentne plazmide, izolovani su iz proizvoda od mleka (Gfeller i sar., 2003; Teuber i sar., 1999). Utvrđena je visoka incidenca determinanti rezistencije na eritromicin i tetraciklin kod laktobacila izolovanih iz zanatski proizvedenih sireva sa područja Turske (Cataloluk i Gogebakan, 2004).

Klare i sar. (2007) ispitali su 473 soja bakterija mlečne kiseline, uključujući probiotske sojeve, poreklom ljudi i životinja, na prisustvo determinanti antibiotske rezistencije. Svojevito multirezistencije je utvrđeno kod šest probiotskih sojeva, koji su posedovali *tet(W)*, *tet(M)* ili *erm(B)* determinantu. U studiji sprovedenoj u Americi (Wang i sar., 2006), zapažena je visoka incidenca antimikrobne rezistencije, pre svega prisustvo *tet(S)/(M)* i *erm(B)* markera kod sojeva laktokoka i *St. thermophilus*, izolovanih iz proizvoda zastupljenih na tržištu. Frekvencija rezistentnih sojeva kretala se u opsegu 10^2 - 10^7 CFU/g proizvoda. Rezultati Bulajić (2007) potvrđuju prisustvo determinanti *tet(M)* i *erm(B)* kod rezistentnih sojeva enterokoka izolovanih iz sireva sa područja Srbije.

- **Rezistentni sojevi starter kultura i probiotskih mikroorganizama i infekcije ljudi**

Bakterije mlečne kiseline, rezistentne ili ne (sa izuzetkom enterokoka), ne predstavljaju klinički problem. Ono što predstavlja hazard u ovom slučaju, jeste činjenica da rezistentni sojevi mogu poslužiti kao rezervoar prenosivih determinanti antibiotske rezistencije. Takav scenario

ne isključuje mogućnost prenosa determinanti rezistencije na daleko patogenije vrste, i kompromitovanje tretmana infekcije, mada je dosta teško proceniti verovatnoću dešavanja i krajnji ishod sa kliničkim posledicama. Bez obzira na faktor nesigurnosti pri evaluaciji rizika u dotičnoj situaciji, izbegavanje primene sojeva sa prenosivim determinantama rezistencije u procesima fermentacija, ili kao probiotika, predstavlja opravdanu predostrožnost (von Wright, 2005). Takvi kriterijumi su prihvaćeni i u zakonskoj regulativi (SCAN, 2003; EFSA, 2005).

Tabela 1. PRIMER KATEGORIZACIJE HRANE NA OSNOVU RAZMATRANJA PROIZVODNIH USLOVA I FAKTORA PRERADE
Table 1. AN EXAMPLE OF CATEGORISATION OF FOOD INCLUDING PRODUCTION AND PROCESSING FACTORS

AMR (AntiMicrobial Resistance) kategorija Category concerning AMR (AMR Category)
Kategorija i subkategorija hrane Category and Subcategory of food
1. Mleko i proizvodi od mleka /kravlje, ovčije, kozije i bivolje mleko/ Milk and dairy products/cows, goats, sheep, buffalo/
1.1. Mleko Milk
1.2. Proizvodi od mleka (izuzev sireva) Dairy products (other than cheeses)
1.3. Sir Cheese

Kategorizacija namirnica u odnosu na rizik prisustva mikroorganizama rezistentnih na antibiotike

Fenomen antimikrobne rezistencije uslovljen je prisutnošću živih mikroorganizama i transferom gena rezistencije. Stoga, svaki korak u procesu proizvodnje i prerade hrane koji redukuje ili povećava kontaminaciju namirnica ima uticaja na rizik izloženosti rezistentnim sojevima mikroorganizama. Prepoznajući ovu uslovljenost, kategorizacija namirnica je izvršena na osnovu toga da li matriks namirnice podržava rast i omogućava preživljavanje mikroorganizama. Sledeći faktori se uzimaju u razmatranje: tretman od strane proizvođača (termički tretman i ostale procedure stabilizacije, primena konzervansa, fermentacija); mogućnost rekontaminacije posle navedenih tretmana i tip pakovanja koji se koristi; preporučeni period održivosti proizvoda; nameravana upotreba (konzumacija od strane definisanih grupa potrošača kao što je slučaj kod dijetalne hrane ili infant formula); kao i matriks namirnice definisan intrinzič i ekstrinzič faktorima uključujući pH vrednost, sadržaj NaCl, a_w vrednost, redoks potencijal, temperaturu i us-

love čuvanja. Prilikom subkategorizacije namirnica potrebno je uzeti u obzir i druge parametre, pre svega log redukciju populacije mikroorganizama od značaja, ukoliko do toga dolazi primenom odgovarajućih tehnoloških zahvata kroz proces proizvodnje. U tabeli 1 dat je skraćeni prikaz kategorizacije hrane, ograničavajući se samo na kategoriju mleka i proizvoda od mleka.

Procena rizika na području antimikrobne rezistencije

Procena rizika predstavlja mehanizam prosuđivanja, alat u rukama naučnika. Primenjuje se u procenivanju nivoa izloženosti određenom hazardu i posledičnom riziku po zdravlje ljudi, a usled prisustva specifičnog mikroorganizma ili posebnog tipa rezistencije. Podjednako dobro služe i kvantitativni i kvalitativni model procene rizika, pri čemu nam na raspolaganju stoje mnoge pisane smernice i prihvaćene procedure (Codex Alimentarius Commission, 1999) za procenu rizika u odnosu na mikrobiološki profil namirnice sa aspekta bezbednosti hrane, odnosno za procenu rizika koji, po zdravlje ljudi, nosi rezistentna populacija mikroorganizama (OIE, 2007). Evaluacija rizika je moguća jedino u slučaju dobre baze podataka, što situaciju na ovom području čini izuzetno kompleksnom. Dosta je nedostataka i nejasnoća koji otežavaju prikupljanje potrebnih informacija. Pre svega, nedostaje jedinstvena metodologija određivanja profila antibiotske rezistencije, uvek postoji pitanje prikladnosti fenotipskih metoda ili pak neophodnosti molekularnih, potom

harmonizacije MIC vrednosti, odnosno graničnih vrednosti pri izvođenju disk difuzionog testa. Veliko pitanje jeste i veličina uzorka, a svakako da problem predstavlja i nedovoljno podataka o primeni antimikrobnih agenasa u sektoru veterinarske i humane medicine.

Preventiva i kontrolne mere

Za mikrobiologe namirnica je van svake sumnje da se distribucija bakterija sa prenosivim determinantama rezistencije treba izbeći. Pažljiva i opravdana upotreba antibiotika, kako u veterini, poljoprivrednom sektoru i humanoj medicini, uz pasterizaciju ili drugi termički tretman sirovih supstrata (mleka ili mesa) predstavlja neophodne mere u rešavanju problema rezistencije na antibiotike. Neophodnim se smatra i zabrana korišćenja antibiotika, promotora rasta u uzgoju životinja, pre svega onih koji se klinički primenjuju, kako u veterinarskoj, tako i u humanoj medicini. Od posebnog značaja je i kontinuirana upotreba antibiotika u formi masovne medikacije pri tretmanu infektivnih bolesti kod životinja koje se drže u intenzivnim sistemima produkcije.

Sistematičan pristup problemu podrazumeva i primenu dobre proizvodjačke i higijenske prakse. Program monitoringa antimikrobne rezistencije, kao i podaci o kvantumu upotrebe antimikrobnih materija u humanoj medicini i sektoru animalne proizvodnje mogu dati značajne informacije u definisanju trenda antimikrobne rezistencije i prevalencije rezistencije kod relevantnih bakterija, uključujući patogene, ali i komenzale.

ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi poreklom iz namirnica, uključujući poznate patogene, uzročnike alimentarnih oboljenja, ali i komenzale, pokazuju rastući trend antibiotičke rezistencije uz veliki diverzitet utvrđenih profila rezistencije.

Fenomen antibiotičke rezistencije u namirnicama egzistira kao direktni i indirektni hazard usled mogućnosti transfera rezistencije.

Procena rizika u mnogim slučajevima je otežana kako nedostaju relevantni podaci.

Preventivne i kontrolne mere u cilju redukcije rizika neizostavno se sagledavaju u kontekstu kritičke i nezamenjive uloge kontinuirane administracije antimikrobnih materija u glo-

balnom sistemu proizvodnje. Posledica toga jeste selektivni pritisak koji favorizuje preživljavanje rezistentnih sojeva, diseminaciju determinanti rezistencije i aktivaciju prastarih mehanizama zaštite zapisanih u genomu.

LITERATURA

- Amabile-Cuevas, C. F.: Origin, Evolution and Spread of Antibiotic Resistance Genes. Landes, Austin, TX (1993).
- Bulajić, S.: Mogućnost primene enterokoka u proizvodnji sireva i njihov potencijal u prenošenju gena rezistencije na antibiotike. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2007.
- Carlson, S. S., Sharma, V. K., McCuddin, Z. P., Rasmussen, M. A. and Franklin, S. K.: Involvement of an SGI1 gene in the rumen protozoa-mediated enhancement of invasion for multiple antibiotic resistant *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 75 (2007) 792-800.
- Cataloluk, O. and Gogebakan, B.: Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236 (2004) 7-12.
- Ceremonie, H., Buret, F., Simonet, P. and Vogel, T. M.: Isolation of lightning-competent soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2004) 6342-6346.
- Ceremonie, H., Buret, F., Simonet, P. and Vogel, T. M.: Natural electrotransformation of lightning-competent *Pseudomonas* sp. Strain N3 in artificial soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2006) 2385-2389.
- Codex Alimentarius Commission, Principles and Guidelines for the Conduct of a Microbiological Risk Assessment. FAO, Rome. CAC/GL-30 (1999).
- Davies, J.: Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes., *Science*, 64 (1994) 375-382.
- De Groote, M. A., Frank, D. N., Dowell, E., Glode, M. P. and Pace, N. R.: *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with the probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 24 (2005) 278-80.
- Abraham, E. P. and Chain, E.: *Nature* 146, 837 (1940).
- EFSA: Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, 223 (2005) 1-12.
- EFSA: Report of the Task Force of Zoonoses Data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkey and pigs and *Campylobacter jejuni* i *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal*, 493 (2006) 1-16.
- EFSA: Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 187 (2007) 1-16.
- EFSA: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazard on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard, *The EFSA Journal*, 765 (2008) 1-87.
- Egervarn, M., Danielsen, M., Roos, S., Lindmark, H. and Lindgren, S.: Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *J. Food Protect.*, 70 (2008) 412-418.
- FAO/WHO: Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 2001, www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.
- Florez, A. B., Danielsen, M., Korhonen, J., Zycka, J., von Wright, A., Bardowski, J., and Mayo, B.: Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of susceptibility-resistance cut-off values. *J. Dairy Res.*, 74 (2007) 1-7.
- Florez, A. B., Egervarn, M., Danielsen, M., Tosi, L., Morelli, L., Lindgren, S. and Mayo, B.: Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* strains to six antibiotics and definition of new susceptibility-resistance cut off values. *Microbiol. Drug Resist.*, 12 (2006) 252-256.
- Gfeller, K. Y., Roth, M., Meile, L. and Teuber, M.: Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin and dalpofristin resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1. *Plasmid*, 50 (2003) 190-201.
- Golding, G. R., Olson, A. B., Doublet, B., Cloeckert, A., Christianson, S., Graham, M. R. and Mulvey, M. R.: The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on in vitro global gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Microbes Infect.*, 9 (2007) 21-27.
- Kahlmeter, G., Brown, D. F. J., Goldstein, F. W., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., Vatopoulos, A.: European harmonisation of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 (2003) 145-148.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W., and Goossens, H.: Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pedococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59 (2007) 900-912.
- Korhonen, J.M., Scivagnotis, J. and von Wright, A.: Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from fecal samples of weaning piglets. *J. Appl. Bacteriol.*, 103 (2007) 2496-2503.
- Levy, S. B., Salyers, A. A.: Reservoirs of antibiotic resistance (ROAR) Network, 2002, www.healthsci.tufts.edu/apua/Roar/roarhome.htm.
- Matto, J., van Hoek, A. H. A. M., Domig, K. J., Saarela, M., Florez, A. B., Brockmann, E., Amtmann, E., Mayo, B., Aarts, H. J. M. and Danielsen, M.: Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* ssp. to selected antibiotics as determined by the E-test methods. *Int. Dairy J.*, 17 (2007) 1123-1131.
- McMahon, M. A. S., Blair, I. S., Moore, J. E. and Mc Dowell, D. A.: The rate of horizontal transmission of antibiotic resistance plasmids in increased in food preservation-stressed bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 103 (2007) 1883-88.
- OIE: Terrestrial animal health code. Guidelines for the responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine (2007).
- Ouweland, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E.: Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Leeuwenhoek*, 82 (2002) 279-289.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M.: Antibiotic resistance spread in food. *Nature*, 389 (1997) 801-802.
- Rautio, M., Jousemies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkynen, S. and Koskela, M.: Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from

- L. rhamnosus* strain GG., Clin. Infect. Dis. 28 (1999) 1159-1160.
- Rodrigo, D., Zuniga, M., Rivas, A., Martinez, A. and Notermans, S.: Microbiological aspects: adaptation potential. Food preservation by pulsed electric fields: from research to application. ISBN: 1-84569-058-3 Lelieveld, H. L. M., Notermans, S. And De Haan, S. W. H. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge.UK (2007).
- Rodrigo, D., Zuniga, M., Rivas, A., Polain, V., Perez Martinez, G., Rodrigo, M. and Martinez, A.: Assessment of the risk of transformation by pulsed electric field of *E. Coli* in as a model organisms. IFT annual meeting. New Orleans, USA (2005).
- Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkyen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V. and Jarvinen, A.: *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. Clin. Infect. Dis., 42 (2006) e35-44.
- Salyers, A. A.: Antibiotic Resistance Transfer in the Mammalian Intestinal Tract: Implications from Human Health, Food Safety and Biotechnology. Springer-Verlag (1995).
- SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition): Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance, adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F.: Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek, 76 (1999) 115-137.
- Teuber, M., Parreten, V., Wirsching, F.: Antibiotikumresistente Bakterien: Eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. Lebensmitteltechnologie, 29 (1996) 182-199.
- Tosi, L., Berrut, G., Danielsen, M., Wind, A., Huys, G. and Morelli, L.: Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek, 92 (2007) 21-28.
- Von Wright, A.: Regulating the safety of probiotics – the European approach. Current. Pharm. Design., 11 (2005) 17-23.
- Wang, H. H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T. E., Yousef, A. and Bakaletz, L.: Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. FEMS Microbiol. Lett., 254 (2006) 226-231.
- Witte, W.: Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread, Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, pp. 61, 1997, www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_3.9.3.htm.
- Zenz, K. I., Neve, H., Geis, A. and Heller, K. J.: *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in milk products. Syst. Appl. Microbiol., 21 (1998) 28-32.

SUMMARY

BIOLOGICAL HAZARD – ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM FOOD

Snežana B. Bulajić, Zora M. Mijačević

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine

References from the last few years provide evidence that antibiotic resistance traits have entered the microflora of farm animals and the food produced from them. Molecular analysis of the resistance genes, where available, shows that the food microflora is not separated from its human counterpart and conjugative transfer of resistance genes has been demonstrated *in vitro* and in a few cases *in vivo*.

This situation reveals the antibiotic resistance problem of global dimensions, highlighting the fact that the resistance problem will not be solved if there is a constant influx of resistance genes into the human microflora via the food chain.

Therefore, the European Food Safety Authority (EFSA) asked its Panel on Biological Hazards to identify, from a public health perspective, the extent to which food serves as a source for the acquisition, by humans, of antimicrobial-resistant (AMR) bacteria or bacteria-borne antimicrobial resistance genes, to rank the identified risks and to identify potential control options for reducing exposure.

In this paper, following the aforementioned instructions, we summarized the identification and characterization of biological hazard, risk assessment and recommended preventive and control measures in order to minimize the risk.

Key words: antibiotic resistance • food

¹GORDANA B. NIKETIĆ
¹ANKA J. KASALIĆA
¹DRAGICA Ž. MIOČINOVIĆ
²ANKA POPOVIĆ-VRANJEŠ

¹JPS Zavod za mlekarstvo, Novi
 Beograd
²Univerzitet u Novom Sadu,
 Poljoprivredni fakultet

NAUČNI RAD

UDK: 637.12:637.04/05

OSOBINE MLEKA PROIZVEDENOG NA PRINCIPIMA "ORGANSKE PROIZVODNJE"*

U Evropi, a i u svetu, na tržištu sve više postoji potreba za "organskom" hranom. U EU je još 1992. godine doneta regulativa koja definiše način sertifikovanja proizvodnje, korake u proizvodnji i prateći inspekcijski nadzor za ovu vrstu proizvoda. Međutim, i pored rastućeg trenda ova vrsta proizvodnje ima svoje i zagovornike i protivnike.

Imajući u vidu činjenicu da ova vrsta proizvodnje još nije zaživela u našoj zemlji u okviru projekta TR-20100 ispituje se kvalitet, zdravstvena ispravnost i tehnološka podobnost mleka proizvedenog na principima "organske proizvodnje" na farmama u našoj zemlji, da bi se sagledala mogućnost i ekonomska opravdanost proizvodnje ove specifične grupe proizvoda.

Ključne reči : "organsko" mleko • kvalitet • zdravstvena ispravnost

UVOD

Zdravstvena bezbednost hrane, intenzivna poljoprivredna proizvodnja i neophodnost zaštite čovekove okoline uticali su na uspon "organske hrane". Na uspon ove proizvodnje 90-tih godina prošlog veka je uticala pojava bolesti BSE (bolesti "ludih krava") i strah od konzumiranja hrane koja vodi pokretu sa farmi u Velikoj Britaniji.

Tako je u tom periodu u Evropskoj uniji proistekla inicijativa da termin "organska hrana" nađe svoje mesto u zakonskoj regulativi.

*Rad je deo istraživanja u okviru programa iz oblasti Tehnološkog razvoja „Organizovanje proizvodnje mleka i proizvoda od mleka na principima organske proizvodnje i održivog razvoja“, Ev. broj TR 20100

Adresa autora:
 Dr Gordana Niketić, JPS Zavod za mlekarstvo,
 Autoput 3, Novi Beograd
 e-mail: jpszavod@infosky.net

Regulativa iz 1992. godine definiše način sertifikovanja proizvodnje, korake u proizvodnji, inspekcijski nadzor i tržišni nastup unutar EU. Drugim rečima "organska proizvodnja" znači uzdržavanje od upotrebe mineralnih đubriva i pesticida, i korišćenje tradicionalnih metoda kao što su plodoshmena.

Prema podacima OECD-a razlozi koji navode ljude da konzumiraju ovu vrstu hrane su različiti, i mogu se svrstati u nekoliko kategorija:

- smanjenje rizika za zdravlje (36%),
- da je ova vrsta hrane boljeg kvaliteta (31%),
- da je više "prirodna" (25%),
- da bi se izbeglo konzumiranje genetski modifikovane proizvode (12%),
- da konzumiranje ove vrste hrane doprinosi zaštiti čovekove okoline (5%).

Prema statističkim podacima Evropske unije ima oko 5,7 miliona hektara sertifikovanog zemljišta za organsku proizvodnju, što čini 3,6% od ukupnih poljoprivrednih površina. Italija ima najviše zemljišta sa ovom vrstom proizvodnje (44.000 farmi), dok najveću proizvodnju ima Danska (5%), zatim Švedska (3%) i Nemačka (2,6%) (Haring, 2003).

Uprkos rastućem trendu, "organska proizvodnja" ima svoje protivnike koji sumnjaju u zdravstvenu korisnost ovih proizvoda. U Danskoj su 2003. godine izvršena istraživanja na državnom nivou i konstatovano je da mleko proizvedeno u uslovima "organske proizvodnje" sadrži visok nivo vitamina E, omega 3 esencijalne masne kiseline i antioksidante koji pomažu u suzbijanju infekcija.

U literaturi se mogu pronaći kontroverzni podaci o kvalitetu hrane proizvedene na konvencionalan način i "organski" proizvedene hrane. Tako Woese i sar. (1997) nisu konstatovali neke značajnije razlike, dok su Boer (2003) i Worthnigton (2001) utvrdili da je u konvencionalno proizvedenoj hrani niži sadržaj mineralnih materija i vitamina C.

Hansen (1990) i Lund (1991) su ispitivali mikrobiološku ispravnost i tehnološku podobnost mleka za dalju preradu u sir, i nisu konstatovali neke značajnije razlike, dok je koncentracija aflatoxina M₁ bila nešto viša u tradicionalno proizvedenom mleku u odnosu na mleko proizvedeno u "organskim uslovima" proizvodnje.

Grupa grčkih autora je konstatovala da u slučajevima kada je u ishrani muznih životinja korišćena hrana proizvedena pri "organskim uslovima" reproduktivna svojstva su bila nešto viša u poređenju sa primenom konvencionalnog načina ishrane (Magros i sar., 2003).

Hemijski sastav mleka proizvedenog u uslovima organske proizvodnje

Prema literaturnim podacima promene u sistemu čuvanja i ishrane muznih grla imale su uticaj i na promene sastava mleka. Zagorska (2007) je konstatovala statistički značajniju razliku u sadržaju laktoze, pepela, tiamina i riboflavina u uzorcima mleka proizvedenih u uslovima "organske proizvodnje" i literaturnih podataka za konvencionalno proizvedeno mleko. U tabeli 1 su prikazane razlike u sadržaju proteina, mlečne masti i laktoze u tradicionalno proizvedenom mleku i mleku

Tabela 1. SADRŽAJ PROTEINA, MLEČNE MASTI I LAKTOZE U SIROVOM MLEKU (Zagorska, 2007)
Table 1. PROTEIN, FAT AND LACTOSE CONTENT IN RAW MILK (Zagorska, 2007)

Komponenta	Mleko proizvedeno pri „organskim uslovima“			Tradicionalno proizvedeno mleko
		min	max	
Proteini	3,30	2,14	4,99	3,34
Mlečna mast	4,98	3,50	7,69	4,42
Laktoza	4,85	4,19	5,80	4,67

proizvedenom u "organskim uslovima" proizvodnje.

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1. može se konstatovati da razlika u sadržaju proteina nije značajna ($p > 0,05$). Do sličnih rezultata su došli Mogensen (2002) i Ellis i sar. (2005), dok su Hugar i Padel (1996) utvrdili da je sadržaj proteina viši u konvencionalno proizvedenom mleku u odnosu na mleko proizvedeno pri "organskim uslovima" proizvodnje.

Sadržaj mlečne masti i laktoze je značajno viši u "organskom" mleku u odnosu na literaturne podatke za konvencionalno proizvedeno mleko. Ovako visok sadržaj laktoze Zagorska (2007) objašnjava visokim sadržajem šećera u stočnoj hrani koja je korišćena.

Butler i sar. (2007) utvrdili su veću zastupljenost nutritivno poželjnih nezasićenih masnih kiselina (omega 3), antioksidanata u mleku proizvedenom u "organskim uslovima" proizvodnje u odnosu na mleko proizvedeno na konvencionalan način u Danskoj, Švedskoj, Engleskoj i Italiji. Veća količina silaže korišćena u ishrani muznih grla u Italiji i Švedskoj je imalo uticaja na niži sadržaj nutritivno vrednih komponenti u mleku u odnosu na mleko proizvedeno u Engleskoj gde je silaža mnogo manje korišćena u kraćem vremenskom periodu. Saglasno sa

ovim podacima, Ellis i sar. (2006) su utvrdili uticaj silaže na sastav masnih kiselina u sirovom mleku.

Za razliku od prethodnih autora, Bergamo i sar. (2003) su ispitivali sastav masnih kiselina u proizvodima dobijenim od "organskog" mleka i tradicionalno proizvedenog mleka i konstatovali značajne razlike u pasterizovanom mleku i maslacu (tabela 2).

Kada se govori o sadržaju vitamina Zagorska i Ciprovia (2008) su utvrdile niži sadržaj tiamina ($0,20-0,32 \text{ mgL}^{-1}$) i riboflavina ($1,70 \text{ mgL}^{-1}$) u "organskom" mleku za 34-35% u odnosu na konvencionalno proizvedeno mleko i literaturne podatke. Za razliku od ovih rezultata na osnovu izvršenih istraživanja na državnom nivou u Danskoj konstatovano je da mleko proizvedeno u "uslovima organske" proizvodnje sadrži visok nivo vitamina E.

Koncentracija lizozima je važan parametar koji definiše kvalitet mleka i njegovu podobnost za dalju preradu. Izvršenim istraživanjima autori nisu konstatovali značajniju razliku u koncentraciji lizozima u uzorcima i jedne i druge vrste mleka, i ona se kretala u intervalu od $0,02$ do $0,77 \text{ mgL}^{-1}$.

Tabela 2. SASTAV MASNIH KISELINA (Bergamo i sar., 2003)
Table 2. FATTY ACIDS COMPOSITION (Bergamo i sar., 2003)

Amino kiselina	Pasterizovano mleko	UHT mleko	Maslac	Mozzarella sir
Tradicionalno proizvedeno mleko				
Linoleinska	30,2	28,9	22,9	24,6
Konjugovana linoleinska kiselina	5,1	6,2	5,7	5,0
Linolna	5,2	5,6	5,5	5,5
„Organsko“ mleko				
Linoleinska	14,5	20,4	16,1	17,6
Konjugovana linoleinska kiselina	6,3	11,2	9,8	5,8
Linolna	6,0	11,0	10,5	6,9

Mikrobiološka ispravnost mleka proizvedenog u uslovima organske proizvodnje

Poznato je da i pored održavanja najvišeg nivoa zdravstvenih i higijenskih mera nije moguće proizvesti mleko bez mikroorganizama. Tako sveže pomuženo mleko zdravih muznih grla može imati nekoliko stotina do nekoliko hiljada mikroorganizama/mL. Sirovo mleko zdrave krave, osim primarne mikroflore vimena, može biti izvor mikroorganizama koji vode poreklo iz okoline sa kojom su došli u dodir tokom ili nakon muže.

Da bi se utvrdili higijenski uslovi na farmama koje se bave i jednom i drugom vrstom proizvodnje, autori su određivali ukupan broj mikroorganizama. Utvrđeno je da je 27% od ukupnog broja ispitanih uzoraka "organskog" mleka bilo u skladu sa regulativom 853 EEZ iz 2004. godine, i bio je ispod $100\ 000 \text{ cfu mL}^{-1}$ (Zagorska i Ciprovia, 2008). Autori su takođe konstatovali da je sirovo mleko odmah hlađeno nakon muže na temperaturu $+4$ do $+6^\circ\text{C}$ u toku 20 do 30 minuta.

Gedek i sar. (1981) i Gravert i sar. (1989) nisu utvrdili značajnije razlike u mikrobiološkoj ispravnosti kod uzoraka jedne i druge vrste mleka i njihove tehnološke podobnosti za dalju preradu u sireve.

U proizvodnji mleka na principima "organske proizvodnje" posebna pažnja se obraća na koncentraciju aflatoxina M_1 . Zagorska i Ciprovia (2008) nisu konstatovali značajnije razlike, dok su Gravert i sar. (1989) ustanovili manju koncentraciju aflatoxina M_1 u "organskom" mleku u odnosu na tradicionalno proizvedeno mleko. Na osnovu ovih rezultata autori zaključuju da su razlike posledica različitog nivoa aflatoxina M_1 u korišćenoj silaži.

Različiti su podaci o broju somatskih ćelija u mleku, što je i razumljivo, imajući u vidu da na broj somatskih ćelija u prvom redu utiče zdravstveno stanje muznih grla. Mastitis višestruko negativno deluje na higijensku ispravnost mleka i njegovu podobnost za dalju preradu. Obolenja vimena prema literaturnim podacima izaziva više od stotinu mikroorganizama, a subkliničke mastitise najčešće izazivaju *Staph. aureus*, *Str. agalactiae* i *Str. uberis* (Katić i Stojanović, 1998, Bisato i sar., 2000).

Studije velikog broja autora ukazuju da je prisustvo većeg broja somatskih ćelija u mleku povezano sa fizičko-hemijskim promenama mleka,

ali su različiti podaci o intenzitetu dekompozicije pojedinih sastojaka mleka. Tako je utvrđeno da povećan broj somatskih ćelija u mleku utiče na smanjenje količine mlečne masti i laktoze, dok se najveće promene uočavaju u povećanju količine sadržaja mineralnih materija (Mitić i sar., 1983; Niketić i sar., 2006).

Goff i Griffiths (2006) su utvrdili da je mala razlika u broju somatskih ćelija u zbirnom mleku na farmama koje proizvode mleko na tradicionalan način i na farmama koje proizvode mleko na principima "organske proizvodnje".

Ispitivanjem broja somatskih ćelija u Litvaniji na farmama koje proizvode mleko na tradicionalan način i na farmama koje proizvode mleko na "principima organske" proizvodnje, utvrđeno je da se broj somatskih ćelija kretao u intervalu od 4.000 do 1.413.000 ml⁻¹. Tako je broj somatskih ćelija u "organskom" mleku u 351 uzorku bio niži nego u konvencionalno proizvedenom mleku. Zagorska (2007) je takođe izolovala *Staph. aureus* u 46% uzoraka tradicionalno proizvedenog mleka i 63% uzoraka "organskog" mleka, i utvrdila zavisnost između broja somatskih ćelija i broja *Staph. aureus*.

Nauta i sar. (2006) su konstatovali da je broj somatskih ćelija u zbirnom mleku na farmama koje proizvode mleko na tradicionalan način bio niži u odnosu broj somatskih ćelija u mleku na farmama koje se bave proizvodnjom na principima "organske proizvodnje".

ZAKLJUČAK

Na osnovu literaturnih podataka može se konstatovati da postoje razlike u kvalitetu i zdravstvenoj ispravnosti "organskog" i tradicionalno proizvedenog mleka. Razlike u mikrobiološkoj ispravnosti ove dve vrste mleka su najmanje izražene i posledica su primenjenih higijenskih uslova na farmi.

Konstatovane su statistički značajne razlike u hemijskom sastavu, i to u sadržaju proteina, laktoze, mlečne masti, pepela, riboflavina i tiamina u ispitivanim uzorcima mleka.

Utvrđena je veća zastupljenost nutritivno poželjnih nezasićenih masnih kiselina u mleku proizvedenom u "organskim uslovima" proizvodnje u odnosu na mleko proizvedeno na tradicionalan način, što se objašnjava uticajem primene silaže u ishrani.

Različiti su podaci o broju somatskih ćelija u mleku, što je i razumljivo, imajući u vidu da na broj ovih ćelija u prvom redu utiče zdravstveno stanje muznih grla. Mastitis višestruko negativno deluje na higijensku ispravnost mleka i njegovu podobnost za dalju preradu. Od posebnog je značaja da se utvrde razlike u kvalitetu i zdravstvenoj ispravnosti mleka proizvedenog na principima "organske proizvodnje" i tradicionalno proizvedenog mleka, kako bi se definisala tehnološka podobnost i ekonomska opravdanost proizvodnje ove grupe proizvoda.

LITERATURA

- Bisato, A., Trachsel, P., Schallibaum, M. and Blum, J.W.: Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, 44 (3-4) (2000) 205-220.
- Bergamo, P., Fedele, E., Marzillo, G.: Fat soluble vitamin content and fat acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*, 82 (2003) 625-631.
- Boer, I.J.M.: Environmental impact assessment of conventional and organic milk production. *Livestock Production Science*, 80 (1/2) (2003) 79-88.
- Butler, G., Stergiadis, S., Eyre, M., Lafert, C., Borsari, A., Canever, A., Slots, T. and Nielsen, J.H.: Effect of production system and geographic location on milk quality parameters. 3th QLCF Congress, Germany, (2007).
- Ellis, K.A., McLean, W.G., Grove-White, D.N., Cripps, P.J., Howard, C.V., Mihm, M.: Studies comparing the composition of milk produced on organic and conventional dairy farm in the UK. *Proceeding of the 4th SAFGO workshop*, (2005) pp 41-45.
- Ellis, K.A., Innocent, G., Grove-White, D., Cripps, P., Mclean, W.G., Howard, C., Mihm, M.: Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J. of Dairy Sci.*, 89 (6) (2006) 1938-1950.
- Gedek, W., Knoppler, H.O., Averdunk, G.: Vergleichende Qualitätsuntersuchungen von Milch aus landwirtschaftlichen Betrieben mit konventioneller und alternative Wirtschaftsweise. *Arch Lebensmittelhyg*, 32 (1981) 149-151.
- Gravert, H.O., Pabst, K., Ordolff, D., Treitel, U.: Milchzeugung im alternativen Landbau. *Kiel. Milchwirtschaft Forschungsber*, 41 (1989) 211-223.
- Goff, H.D. and Griffiths, M.W.: Major Advances in Fresh Milk and Milk Products: Fluid Milk Products and Frozen Desserts. *J. Dairy Sci.*, 89 (2006) 1163-1173.
- Haring, A.M.: Organic dairy farms in the EU: production systems, economics and future development. *Livestock Production Science*, 80 (1/2) (2003) 89-97.
- Hansen Frank, L.: Characterization of organically produced milk. In: *Alternativ odling No 5-Proc. Ecological Agriculture NJF-Seminar 166*, Miljøvard, ed Granstedt A. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sweden, (1990) pp. 219-222.
- Huggar, R., Padel, S.: Conversion to Organic Milk Production. *Iger Tehnc. Review*, 4 (1996) 86-96.
- Katić, V., Stojanović, L.: Uticaj mastitisa na higijensku ispravnost mleka, Jugoslovenski mlekarški simpozijum "Savremeni trendovi u mlekarstvu", Zlatibor, 1998, Zbornik radova 7-15.
- Lund, P. (1991): Characterization of alternatively produced milk. *Milchwissenschaft* 46, 166-169.
- Magros, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. (2003): Organic food: Nutritious food or food for thought? A review of the evidence, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 54, (5), 357-371.
- Mitić, S., Jakimov, N., Milinković, D., Miočinović, D. (1983): 7. jugoslovenski mlekarški simpozijum "Savremena proizvodnja i prerada mleka", Portorož, zbornik radova 181-188.
- Mogensen, L. (2002): Organic milk production home-Grown feed. PhD. thesis. Denmark: danish Institute of Agricultural Science-8th Royal Veterinary and Agricultural University, pp 17-18.
- Nauta, W.J., Baars, T., Bovenhuis, H. (2006): Converting to organic dairy farming: Consequences for production, somatic cell score and calving interval of first party Holstein cows, *Livestock Science* 99 (2-3), 185-195.
- Niketić, G., Oljačić, E., Gavrić, M. (2006): Hemijska i bakteriološke analize mleka od kog se proizvodi Somborski sir, *Prehrambena industrija* 17, 3-4, 52-54.
- Zagorska, J. (2007): The evaluation of organic milk quality, doctoral thesis, Faculty of Food Technology, Jelgava, Latvia.
- Zagorska, J., Ciprova, I. (2008): The chemical composition of organic and conventional milk in Latvia, 3th Convergence in Food and technology FOODBALT, Jelgava, p. 10-14.
- Woese, K., Lange, D., Boese, C. and Bögl, U.W. (1997): Comparison of organically and conventionally grown foods-Results of the review of the relevant literature. *Journal of the Science food and Agriculture*, 74, 281-293.
- Worthington, V. (2001): Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables and grains. *Journal of Alternative and Complementary medicine*, 7, 161-173.

SUMMARY

THE EVALUATION OF ORGANIC MILK QUALITY

¹Gordana B. Niketić, ¹Anka J. Kasalica, ¹Dragica Ž. Miočinović, ²Anka Popović-Vranješ

¹JPS Dairy institut, New Belgrade, ²University of Novi Sad, Faculty of Agriculture

The main reason for rapid increase in the organic food consumption is the perception that organic foods have a superior nutritional composition and convey health benefits. The study presented here analysed chemical composition and microbiological quality of milk from organic and conventional production system.

Key words: organic milk • chemical composition • microbiological quality

¹ŽIVKOVIĆ V. JELENA
¹SUNARIĆ M. SLAVICA
¹TRUTIĆ V. NATAŠA
¹PAVLOVIĆ M. RADMILA
²KOČIĆ M. GORDANA
¹NIKOLIĆ S. GORAN
³JOVANOVIĆ V. TATJANA

¹Medical Faculty of Niš,
Department of Pharmacy
²Medical Faculty of Niš,
Department of Biochemistry
³Medical Faculty of Niš,
Department of Physics

NAUČNI RAD

UDK: 637.1:637.043:543.645

DPPH RADICAL-SCAVENGING ACTIVITY OF PASTEURIZED COW MILK

The oxidative stability of milk and dairy products is an important issue for the dairy industry. Oxidation processes in milk can result in strong off-flavours and deterioration of the nutritional quality of milk. Antioxidants are considered important nutraceuticals on account of many health benefits, and high antioxidative activity of milk is a recommended characteristic. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of pasteurized cow milk of domestic producer was carried out. Pasteurised milk samples of most representative producers in Serbia were collected from lokal shops. They had different fat content, and some of them were enriched with vitamins (A+D₃). The reduction of DPPH (60 µM) in methanol was followed by monitoring a decrease of its absorbance at 515 nm after 45 min. Significant negative correlation ($r=-0.85$) was obtained between (DPPH) radical-scavenging activity and fat content, which means that antioxidative capacity rises with fat content. In milk sample with 2.8% fat, EC₅₀ is 3.89 ml milk mg⁻¹ DPPH. Higher antioxidant activity was gained in milk with the addition of vitamins (A+D₃). The EC₅₀ value for ascorbic acid was 37.5 µM. DPPH method was very useful in research of the total antioxidative capacity of milk without distinguishing the contributions from individual compounds.

Key words: total antioxidative capacity • milk • fat content • DPPH method

Adresa autora:
Dr Jelena Živković, Medical Faculty of Niš,
Department of Pharmacy,
Bulevar Zorana Đinđića 81, 18000 Niš,
e-mail: jelenazi2003@yahoo.com

INTRODUCTION

The reactive oxygen species, such as: superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, and peroxide radical, are known to cause oxidative damage in living systems (Frenkel, 1992). Free radical oxidative stress, usually resulting from deficient natural anti-oxidant defenses (Halliwell & Gutteridge, 1984), has been implicated in pathogenesis of a wide variety of clinical disorders, such as the degenerative diseases (Cross, 1987), aging (Beckman, 1998) and progressive decline of immune functions (Pike, 1995). As a result, there is an increasing interest in finding natural antioxidants from food, because it is believed that they can protect the human body from the attack of free radicals and retard the progress of many chronic diseases, as well as retarding the lipid oxidative rancidity in foods (Liu et al., 2005). Consequently, oxidation of lipids in food is responsible for the formation of off-flavours and undesirable chemical compounds which may be detrimental to health.

Dairy products can be beneficial for the oxidative defence of consumers by several mechanisms, and milk antioxidants have important roles in preventing lipid peroxidation and maintaining milk quality (Lindmark-Månsson & Åkesson, 2000). Several dairy products and their fractions from them have been found to be antioxidative, e.g. milk, skim milk, whey, casein and lactoferrin. Among antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, and the selenium-containing glutathione peroxidases (GSHPx) are demonstrated in milk. The iron-binding

protein lactoferrin, vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (tocopherols and tocotrienols) and carotenoids with provitamin A action are non-enzymatic antioxidants. So, milk contains a number of antioxidants, many reactions are possible and the specific function of each antioxidant cannot easily be defined. Therefore measurement of antioxidative activity should be a useful tool in evaluating their relative roles.

There are many methods in evaluating free radical scavenging activity of tested compounds. One of the widely used procedures, which facilitates analysis of various antioxidants is based on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) bleaching (Bondet et al., 1997). Conventionally, DPPH method has been used as one of basic screening steps in search of new antioxidant compounds in organic solvent extracts from natural resources including spices, herbs, fruits, and vegetables (Bandoniene et al., 2002; Paulova et al., 2004; Kim & Kim, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Reagents

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate and L-ascorbic acid were obtained from Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany. The standard L-ascorbic acid solution 0.2 mM in water was prepared. The solution of DPPH[•] in methanol (6×10^{-5} mol dm⁻³) was prepared daily, before UV measurements.

Milk sample

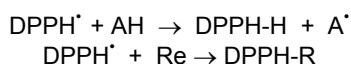
Pasteurised milk samples of most representative producers in Serbia

were collected from local shops. They had different fat content, and some of them were enriched with vitamins (A+D₃). For milk **deproteinsation**, in the aliquot of milk, absolute ethanol was added (1:1; v/v). The sample was kept for 20 min at -20°C, and centrifuged (4000 g) for 30 min at 4°C to remove turbidity. After separation of supernatant the process of ethanol addition, cooling and centrifugation were repeated. Furthermore, the finally obtained supernatant was analysed.

DPPH radical scavenging assay

Radical scavenging activity of milk against stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), was determined spectrophotometrically. It is reduced when DPPH[•] reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen.

Unlike laboratory-generated free radicals such as superoxide radical and hydroxyl radical, DPPH reaction has the advantage of being free of additive induced complications such as metal chelation and enzyme inhibition. The reduction of organic, stable DPPH[•] radical indicated below is followed by monitoring the decrease in its absorbance at characteristic wavelength during the reaction (Ancerewicz et al., 1998). In its radical form, DPPH[•] absorbs at wavelength of 515–517 nm, but upon reduction by antioxidant (AH) or radical species (Re), the absorption disappears (Brand-Williams et al., 1995).



The changes in colour (from deep-violet to light-yellow) were measured at 515 nm on a UV/visible light spectrophotometer (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc. USA) in 1 cm path length disposable microcuvettes.

Radical scavenging activity of milk samples was measured by the slightly modified method of Miliauskas et al. (2004). The 1 ml of standard solution of DPPH[•] in methanol was mixed with 2 ml of obtained milk supernatant (or defined volume of milk supernatant in which methanol was added to enrich total volume of 2 ml). The samples were kept in the dark for 45 min at room temperature and then the decrease in absorption was measured. Absorption of blank sample containing the same amount of methanol and DPPH[•] solution was measured.

Radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

were:

A_B-absorption of blank sample (t=0 min);

A_A-absorption of tested extract solution (t=45 min).

The antioxidative capacity of milk was defined as the EC₅₀ value (ml milk mg⁻¹ DPPH), which is the amount of milk necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (Smet et al., 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of antioxidative activity of pasteurised milk are shown in table 1.

Table 1. ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF PASTEURISED MILK
Tabela 1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PASTERIZOVANOG MLEKA

N ^o	Sample	Fat content %	EC ₅₀ ml milk mg ⁻¹ DPPH
1.	P 1	1.6	4.97
2.	P 1	2.8	3.93
3.	P 1	3.2	3.35
4.	P 2	2.8	3.89
5.	P 2	3.2	3.66
6.	P 2 (Vitamins A + D ₃ added)	3.2	2.54
7.	P 3	2.8	4.63

*P - Producer

Significant negative correlation ($r = -0.85$) was obtained between (DPPH) radical-scavenging activity and fat content, which means that antioxidative capacity rises with fat content. Significant antioxidant activity was gained in milk with addition of vitamins (A+D₃) (2.54 ml milk mg⁻¹ DPPH) in comparison with milk sample with the same fat content (3.35 ml milk mg⁻¹ DPPH). For standard antioxidant ascorbic acid, determined EC₅₀ value was 37.5 μM. This is similar to the result obtained by Kolečkář et al., (2007) (34 μM).

Bovine milk fat comprises several classes of lipids. Besides mono-, di- and triacylglycerols containing a great variety of fatty acids, there are also free fatty acids, phospholipids, glycolipids and steroids (including cholesterol esters) present in milk lipids (Molkentin, 2000). Minor constituents include waxes, alcohols, carotenoids, vitamins and lipoproteins. In this section substances with known bioactive

properties (except for fat-soluble vitamins) comprising positive as well as negative effects are reviewed.

Lipid auto-oxidation in milk is affected by a complex interplay of pro- and antioxidants. Several of these compounds are also important nutrients in the human diet and may have other physiological effects on the gastrointestinal tract and other tissues (Przybylska et al., 2007). Effective antioxidants in food having a suppressive effect against oxidative stress *in vivo*. There is a demand for developing methods to investigate the total antioxidative capacity of milk without distinguishing the contributions from individual compounds. We concluded that the DPPH radical scavenging assay is an applicable method for measuring total antioxidative capacity of milk. Furthermore, we will continue to investigate contribution of particular antioxidant in total antioxidant capacity of milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Science, Technology, and Development of Republic of Serbia Grant N^o19042.

REFERENCES

- Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P. A., Testa, B., Bree, F., Zini, R., et al.: Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 25 (1) (1998) 113–120.
- Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P. R. and Gruzdiene, D.: Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods, *European Food Research and Technology*, 214 (2002) 143–147.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C.: Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free radical method. *Food Science and Technology International*, 30 (1997) 609–615.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C.: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28 (1995) 25–30.

- Cross, C.E.: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, 107 (1987) 526–545.
- Frenkel, K.: Carcinogen-mediated oxidant formation and DNA damage. *Pharmacology & Therapeutics*, 53 (1992) 127–166.
- Halliwel, B. and Gutteridge J. M. C.: Lipid peroxidation, oxygen radicals; cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 23 (1984) 1396–1397.
- Kim, S. J. and Kim, G. H.: Quantification of quercetin in different parts of onion and its DPPH radical scavenging and antibacterial activity. *Food Science and Biotechnology*, 15 (1) (2006) 39–43.
- Kolečkář, V., Jun, D., Opletal, L., Jahodář, L. and Kuča, K.: Assay of radical scavenging activity of antidotes against chemical warfare agents by DPPH test using sequential injection technique. *Appl. Biomed.*, 5 (2007) 81–84.
- Lindmark-Månsson, H. and Åkesson, B.: Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (1) (2000) 103–110.
- Liu, J. R., Chen, M. J. and Lin, C. W.: Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. *J. Agric. Food Chemistry*, 53 (2005) 2467–2474.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and van Beek, T.A.: Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85 (2004) 231–237.
- Molkentin, J.: Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition*, 84 (1) (2000) 47–53.
- Paulova, H., Bochorakova, H. and Taborska, E.: In vitro methods for estimation of the antioxidant activity of natural compounds. *Chemické listy*, 9 (2004) 174–179.
- Pike, J. and Chandra R. K.: Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in healthy elderly. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65 (1995) 117–121.
- Przybylska, J., Albera, E. and Kankofer, M.: Antioxidants in Bovine Colostrum. *Reprod. Dom. Anim.*, 42 (2007) 402–409.
- Smet, K., Block, J. D., Campeneere, S. D., Brabander, D. D., Raes, L. H., Dewettinck, K. K. and Coudijzer, K.: Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. *International Dairy Journal*, 19 (2009) 380–385.

IZVOD

SKEVINDŽING AKTIVNOST PASTERIZOVANOG KRAVLJEG MLEKA NA DPPH RADIKAL

¹Živković V. Jelena, ¹Sunarić M. Slavica, ¹Trutić V. Nataša, ¹Pavlović M. Radmila, ²Kocić M. Gordana, ¹Nikolić S. Goran, ³Jovanović V. Tatjana

¹Medicinski fakultet, Niš, Departman za farmaciju, ²Medicinski fakultet, Niš, Departman za biohemiju,

³Medicinski fakultet, Niš, Departman za fiziku

Oksidativna stabilnost mleka i mlečnih proizvoda je značajan parametar u industriji mleka. Proces oksidacije mleka može izazvati negativne senzorne karakteristike koje umanjuju nutritivnu vrednost mleka. Utvrđeno je da su antioksidansi značajne komponente kojima se pripisuju mnogi pozitivni uticaji na zdravlje, a visoka antioksidativna aktivnost mleka je poželjna karakteristika. Ispitana je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal skevedžing aktivnost pasterizovanog mleka domaćih proizvođača. Pasterizovano mleko najpoznatijih proizvođača u Srbiji je nabavljeno u lokalnim prodavnicama. Uzorci mleka poseduju različit sadržaj masti, a neki od uzoraka su obogaćeni vitaminima (A+D₃). Redukcija DPPH (60 μM) u metanolu je praćena smanjenjem apsorbancije na 515 nm nakon 45 min. Značajna negativna korelacija ($r = -0.85$) utvrđena je između DPPH radikal-skevedžing aktivnosti i sadržaja masti, što ukazuje da antioksidativna aktivnost raste sa sadržajem masti. U uzorku mleka sa 2,8% masti EC₅₀ je is 3,89 ml mleka mg⁻¹ DPPH. Viša antioksidativna aktivnost je dobijena za mleko sa dodatkom vitamina (A+D₃). EC₅₀ vrednost za askorbinsku kiselinu je 37,5 μM. DPPH metod je veoma primenljiv za ispitivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta mleka bez utvrđivanja doprinosa pojedinih komponenata.

Ključne reči: ukupna antioksidativna aktivnost • mleko • sadržaj masti • DPPH metod

¹MIRJANA BOJANIĆ-RAŠOVIĆ
¹SLAVKO MIRECKI
¹NIKOLETA NIKOLIĆ
²RAJO RAŠOVIĆ

¹Biotehnički fakultet, Podgorica
²ZZ "Cijevna", Podgorica

NAUČNI RAD

UDK: 637.12:637.047:637.354

UTICAJ UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA I BROJA SOMATSKIH ČELIJA MLIJEKA NA RANDMAN POLUTVRDOG SIRA

UVOD

Cilj rada je bio da se ispita uticaj ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u zbirnom mlijeku krava na randman polutvrđog sira, proizvedenog u sirari ZZ "Cijevna" u Podgorici.

Ukupan broj mikroorganizama određivan je na aparatu Bactoscan FC 100, a broj somatskih ćelija na aparatu Fossmatic 5200.

Stvarni randman sira je određivan na osnovu količine mlijeka i dobijene mase sira i izražen u procentima.

Srednja vrijednost ukupnog broja mikroorganizama u ispitivanim uzorcima zbirnog mlijeka iznosila je 2.384.000 /mL, a broj somatskih ćelija 525.000/mL mlijeka.

Za prosječnu količinu mlijeka od 414,3 litra i masu sira od 46,66kg, stvarni randman sira iznosio je 11,26%.

Srednja pozitivna korelacija utvrđena je između ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u mlijeku (0,549317), kao i između ukupnog broja mikroorganizama i količine mlijeka (0,539122). Srednja negativna korelacija utvrđena je između ukupnog broja mikroorganizama i stvarnog randmana sira (-0,6755).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je ukupan broj mikroorganizama imao značajan negativan uticaj na randman dobijenog sira.

Ključne riječi: mlijeko • ukupan broj bakterija • broj somatskih ćelija • randman sira

Kvalitet mlijeka za proizvodnju sirova, osim hemijskog sastava, određuju parametri njegovog higijenskog kvaliteta: ukupan broj mikroorganizama i broj somatskih ćelija.

Razvitak inicijalne mikroflore u mlijeku u direktnoj je zavisnosti od brzine hlađenja i temperature čuvanja mlijeka. U hlađenom mlijeku, psihrotrofni mikroorganizmi predstavljaju dominantnu mikrofloru (80-90%) dok u neohlađenom čine 20-30% od ukupne populacije mikroorganizama. Ovi mikroorganizmi svojim enzimima i drugim produktima utiču na tehnološka svojstva mlijeka. Tokom svog rasta u mlijeku i proizvodima od mlijeka oslobađaju nepoželjne metabolite i termostabilne lipaze i proteaze, koje utiču na kvalitet i trajnost proizvoda. Broj termorezistentnih bakterija u sirovom mlijeku je u direktnoj vezi sa ukupnim brojem bakterija (Oljačić i Kasalica, 2006).

Među termorezistentnim mikroorganizmima postoje mezofilne i termofilne bakterije koje preživljavaju temperature pasteurizacije. Neki od ovih mikroorganizama posjeduju lipolitičko i proteolitičko dejstvo, pri čemu svojim enzimima, lipazama i proteazama dovode do neželjenih promjena u mlijeku i mliječnim proizvodima. Tako, na primjer, bakterije iz roda *Bacillus* imaju izraženu proteolitičku aktivnost prema beta kazeinu, kada dolazi do oslobađanja gorkih peptida.

Razgradnja proteina je poželjna kod zrenja sireva, ali samo do aminokiselina.

Veoma je bitno zaustaviti transformaciju proteina na nivou aminokiselina jer je dalja transformacija nepoželjna. Dekarboksilacijom aminokise-

lina nastaju toksični amini. Transformacijom triptofana nastaju indol i skatol, a transformacijom tirozina nastaju fenol i krezol. Transformacijom aminokiselina sa sumporom nastaju merkaptani.

Mlijeko namijenjeno za proizvodnju sira ne smije da sadrži više od 10^4 - 10^6 /mL psihrotrofa. Prisustvo psihrotrofnih mikroorganizama iznad 10^5 /mL utiče na gubitak randmana sira. U zavisnosti od stepena kontaminacije mlijeka psihrotrofnim mikroorganizmima, može doći do većih ili manjih promjena u ukusu mlijeka (Kasalica i sar., 2005).

Promjene na mastima i proteinima mlijeka u velikoj mjeri zavise od vrste prisutnih psihrotrofnih mikroorganizama u mlijeku.

Od psihrotrofnih mikroorganizama, u sirovom mlijeku se najčešće mogu naći bakterije iz rodova: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, kao i kvasci i plijesni. Od patogenih psihrotrofnih bakterija, iz sirovog mlijeka najčešće se mogu izolovati *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica* (Kasalica i sar., 2005).

Enzime amilaze posjeduju sporigene bakterije i plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Mucor* i *Rhizopus*.

Somatske ćelije mlijeka u najvećem procentu čine neutrofilni, makrofagi, limfociti i u manjem broju epitelne ćelije. Povećanjem broja somatskih ćelija u mlijeku dolazi do promjena sastava mlijeka koje se manifestuju smanjenjem sadržaja kazeina, laktoze i kalcijuma, a povećanjem sadržaja natrijuma, hlora i serumskih bjelančevina.

Adresa autora:
 Dr Mirjana Bojanić-Rašović, Biotehnički fakultet,
 Mihaila Lalića 1, 81 000 Podgorica, Crna Gora
 tel.: + 382 69 306 324
 e-mail: bojanic.m@t-com.me

Nastale promjene u sastavu mlijeka utiču na vrijeme koagulacije, čvrstinu gruš, povećanu aktivnost bakterija, promijenjen ukus gotovog proizvoda i smanjen randman sira.

Nativni proteolitički enzimi mlijeka, među kojima je posebno značajan plazmin, takođe utiču na intenzitet proteolize u sirovom mlijeku. Promjene na proteinima, posebno na beta kazeinu, utiču da koagulum od ovakvog mlijeka ima lošije karakteristike. (Niketić i sar., 2003). Aktivnost nativnih proteinaza mlijeka je veća u mlijeku krava oboljelih od mastitisa nego u mlijeku zdravih krava (Grieve et al., 1985)

Imajući u vidu navedene činjenice, cilj rada je bio da se ispita uticaj ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u mlijeku na randman polutvrdog sira.

MATERIJAL I METODI

Uzorci zbirnog mlijeka za ispitivanje uzeti su nakon njegovog prispjeća u siraru ZZ "Cijevna" u Podgorici u sterilne plastične posude i transportovani na ledu najduže za jedan sat do laboratorije. Ukupno je ispitano šest uzoraka zbirnog mlijeka krava uzetih uzastopno tokom šest dana proizvodnje sira.

Ispitivanja uzoraka mlijeka na ukupan broj mikroorganizama rađena su na aparatu Bactoscan FC 100, a ispitivanja ukupnog broja somatskih ćelija na aparatu Fossomatic 5200 u Laboratoriji za mljekarstvo Biotehničkog fakulteta u Podgorici.

Stvarni randman sira je određen na osnovu izmjerene količine sira nakon završenog presovanja i količine utrošenog mlijeka, prema sledećoj formuli:

Randman sira = količina sira/količina mlijeka x 100.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u zbirnom mlijeku krava prikazani su u tabeli 1.

Rezultati prikazani u tabeli 1 pokazuju da se ukupan broj mikroorganizama kretao od 410.000 do 6.727.000/mL mlijeka, a broj somatskih ćelija od 444.000 do 614.000/mL mlijeka. Srednja vrijednost ukupnog broja mikroorganizama je iznosila 2384.000/mL mlijeka, a broj somatskih ćelija

Tabela 1. REZULTATI ISPITIVANJA UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA I BROJA SOMATSKIH ĆELIJA U ZBIRNOM MLIJEKU KRAVA
Table 1. RESULTS OF EXAMINATION OF THE MICROORGANISMS COUNT AND TOTAL SOMATIC CELLS COUNT IN COW BULK MILK

Oznaka uzorka mlijeka	Ukupan broj mikroorganizama x 1000	Ćelije x 1000
6	1156	503
7	2105	444
8	651	552
9	410	552
10	893	489
11	6727	614
X	2384	525
Max	6727	614
Min	410	444
SD	2393.352	59.52702

525.000/mL mlijeka. Visoka vrijednost standardne devijacije za ukupan broj mikroorganizama ukazuje na značajno variranje ovog parametra između ispitivanih uzoraka mlijeka u odnosu na srednju vrijednost. Standardna devijacija utvrđena za ukupan broj somatskih ćelija u mlijeku ukazuje na statistički neznajčajno variranje broja somatskih ćelija između ispitivanih uzoraka mlijeka.

Rezultati ispitivanja stvarnog randmana sira prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. REZULTATI ISPITIVANJA STVARNOG RANDMANA SIRA
Table 2. RESULTS OF EXAMINATION OF THE ACTUAL CHEESE YIELD

Oznaka sira	Količina mlijeka (L)	Masa sira (kg)	Stvarni randman sira nakon presovanja(%)
6	482	55.485	11.51
7	401	43.935	10.95
8	389	44.360	11.40
9	382	44.905	11.75
10	371	41.095	11.07
11	461	50.200	10.88
X	414,3	46.66	11.26
max	482	55.485	11.51
min	371	41.095	10.88
SD	45.8243	5.237882	0.278693

Rezultati prikazani u tabeli 3 pokazuju da je srednja pozitivna korelacija utvrđena između ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u mlijeku (0,549317) kao i između ukupnog broja mikroorganizama i količine mlijeka (0,539122).

Srednja negativna korelacija je utvrđena između ukupnog broja mikroorganizama i stvarnog randmana sira (-0,6755).

Rezultati prikazani u tabeli 4 pokazuju da je za prosječnu količinu mlijeka od 414,3 litra i masu sira od 46,66 kg, stvarni randman sira iznosio 11,26%.

Proizvodnja sireva zahtijeva mlijeko određenih hemijskih i higijenskih svoj-

stava. Povećani broj mikroorganizama u mlijeku je pokazatelj loše higijene tokom muže i lošeg higijenskog stanja opreme i posuđa za čuvanje i manipulaciju mlijeka (Antunac i sar., 2008).

Mikroorganizmi koji se nalaze u mlijeku mogu poticati iz žive prirode (muzna stoka, ljudi, insekti) ali i nežive (oprema, voda, vazduh, stočna hrana itd). Mlijeko koje nastaje u mliječnoj žlijezdi je sterilno, a kontaminira se manjim brojem mikroorganizama tokom prolaska kroz sisni kanal. Ukoliko

je mliječna žlijezda muznih životinja zdrava, glavni izvor mikroorganizama u mlijeku je oprema koja dolazi u kontakt sa mlijekom, zatim voda, vazduh, stočna hrana, prostirka i sl.

Do povećanja broja somatskih ćelija u mlijeku najčešće dolazi usled zapaljenja mliječne žlijezde, kada se one u povećanom broju izlučuju putem mlijeka. U zdravoj mliječnoj žlijezdi ukupan broj somatskih ćelija je manji od 100.000/mL mlijeka (Sordillo et al., 1997). Tokom bakterijske infekcije, ukupan broj somatskih ćelija se za samo nekoliko sati povećava na 10^6 /mL mlijeka.

Prema Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu Sl.

list SRJ 26/93, maksimalno dozvoljen ukupan broj mikroorganizama je 3.000.000/mL mlijeka, dok prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture SI.list SRJ 26/2002, mlijeko mora imati manje od 1,000.000 mikroorganizama/mL.

Kada je u pitanju broj somatskih ćelija, Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture SI. list SRJ 26/2002 propisano je da mlijeko mora sadržavati manje od 400.000 somatskih ćelija/mL.

Prema Regulativi Evropske unije (92/46), ukupan broj mikroorganizama u sirovom mlijeku ne smije biti veći od 100.000/mL mlijeka, a broj somatskih ćelija ne veći od 400.00/mL mlijeka.

Srednja vrijednost za ukupan broj mikroorganizama dobijena u našim ispitivanjima uzoraka zbirnog mlijeka krava je iznosila 2.384.000/mL mlijeka. Ova vrijednost za ukupan broj mikroorganizama odgovarala je odredbama Pravilnika o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu SI. list SRJ 26/93, ali nije odgovarala odredbama Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture SI. list SRJ 26/2002. Od ukupno šest ispitivanih uzoraka zbirnog mlijeka krava, pet uzoraka (83,33%) je imalo broj mikroorganizama ispod 3000.0000, dok su tri uzorka mlijeka (50%) imala broj mikroorganizama ispod 1.000.000/mL. Ovi rezultati pokazuju da se higijena muže i manipulacija mlijekom nakon muže ne sprovode u higijenskim i kontrolisanim uslovima.

Uzorak mlijeka broj 11 je uzet od mlijeka nastalog sakupljanjem i čuvanjem mlijeka tokom poslednje tri muže krava, dakle mlijeka starog najmanje 24h. Ovom činjenicom se može objasniti nalaz velikog ukupnog broja mikroorganizama/ml mlijeka, koji je iznosio čak 6,727.000/mL mlijeka. Randman sira dobijen od ovog mlijeka je bio najmanji i iznosio je 10,88%.

Tokom produženog skladištenja sirovog mlijeka na niskim temperaturama dolazi do određenih fizičko-hemijskih, biohemijskih i mikrobioloških promjena koje utiču na produženje vremena koagulacije u proizvodnji sira i na randman (Niketić i sar., 2003).

Srednja vrijednost broja somatskih ćelija koju smo dobili u našim ispitivanjima (525.000/mL mlijeka) bila je ve-

Tabela 3. PRIKAZ KORELACIJA IZMEDJU HIGIJENSKIH PARAMETARA MLIJEKA I STVARNOG RANDMANA SIRA

Table 3. CORRELATIONS BETWEEN HYGIENIC PARAMETERS OF MILK AND THE ACTUAL CHEESE YIELD

Korelacija	Jačina korelacije	Izračunata vrijednost
Između broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija	Pozitivna -srednja	0,549317
Između ukupnog broja mikroorganizama i količine mlijeka	Pozitivna -srednja	0,539122
Između ukupnog broja mikroorganizama i stvarnog randmana sira	Negativna -srednja	- 0,6755
Između broja somatskih ćelija i randmana sira	Pozitivna -niska	0,093592

ća od maksimalno dozvoljene Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture SI. list SRJ 26/2002. Svih šest ispitivanih uzoraka mlijeka imala su broj somatskih ćelija iznad maksimalno dozvoljene vrijednosti određene Pravilnikom.

Između ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u mlijeku utvrđena je srednja pozitivna korelacija (0,549317). Jačina ove korelacije se može objasniti povećanjem broja mikroorganizama usled pojave mastitisa, pri čemu se iz oboljelog vimena izlučuje značajan broj mikroorganizama.

Dimitrovska i sar. (2008.) su u svojim ispitivanjima takođe utvrdili značajnu pozitivnu korelaciju između broja somatskih ćelija i ukupnog broja mikroorganizama u mlijeku, pri čemu je koeficijent korelacije u mlijeku krava u prvoj laktaciji iznosio 0,938, u drugoj laktaciji, u prvom mjesecu 0,510, u petom 0,697 i u šestom mjesecu 0,717.

Srednja pozitivna korelacija utvrđena između ukupnog broja mikroorganizama i količine mlijeka (0,539122) može se objasniti lošijom kontrolom higijene muže i manipulacije mlijekom nakon muže, kao i nemogućnošću adekvatnog hlađenja kada se radi o većoj količini mlijeka. Mlijeko se hladi u frižiderima i zamrzivačima, zbog čega se javlja problem hlađenja veće količine mlijeka.

Za prosječnu količinu mlijeka od 414,3 litra i masu sira od 46,66 kg po jednom proizvodnom procesu, stvarni randman sira iznosio je 11,26%.

Srednja negativna korelacija utvrđena je između ukupnog broja mikroorganizama i stvarnog randmana sira (-0,6755). Značajna negativna korelacija između ova dva parametra se može objasniti dejstvom lipaza i proteaza psihrotrofnih mikroorganizama koji su najbrojniji u hlađenom mlijeku. Pod

uticajem ovih enzima dolazi do razgradnje masti i proteina, koji čine osnovu suve materije mlijeka i sira (Doyle&Beuchat, 2007). Na ovaj način dolazi do značajnog smanjenja procenta randmana, odnosno količine dobijenog sira. S obzirom da je temperatura otkupljenog mlijeka bila u svim slučajevima iznad 10⁰C, koliko je po pravilu dozvoljeno, u mlijeku su se takođe razmnožavali i mezofilni mikroorganizmi, koji su svojim proteazama i lipazama takođe uticali na razlaganje komponenti mlijeka. (Direktiva EEC 92/46, Čobanović i Škrinjar, 2003, Oljačić i Kasalica, 2006).

S obzirom da je broj somatskih ćelija u mlijeku korišćenom za proizvodnju sira u svih šest proizvodnih procesa bio prilično ujednačen, nije utvrđena zavisnost između broja somatskih ćelija i randmana sira. Međutim, prema podacima iz literature, postoje značajne razlike u kvalitetu mlijeka koje potiče iz četvrti oboljelih od mastitisa i zdravih četvrti vimena (Niketić i sar., 2003).

ZAKLJUČAK

Srednja vrijednost za ukupan broj mikroorganizama dobijena u našim ispitivanjima uzoraka zbirnog mlijeka krava iznosila je 2,384.000/mL mlijeka, a srednja vrijednost broja somatskih ćelija 525.000/mL mlijeka.

Za prosječnu količinu mlijeka od 414,3 litra i masu sira od 46,66 kg, stvarni randman sira iznosio je 11,26%.

Srednja pozitivna korelacija je utvrđena između ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija u mlijeku (0,549317), kao i između ukupnog broja mikroorganizama i količine mlijeka (0,539122). Srednja negativna korelacija je utvrđena između ukupnog broja mikroorganizama i stvarnog randmana sira (- 0,6755).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je ukupan broj mik-

roorganizama imao značajan negativan uticaj na randman dobijenog sira.

LITERATURA

- Antunac, N., Mikulec, N., Bendelja D., Prpić, Z. and Barać, Z.: Karakterizacija i istraživanje kvalitete mlijeka u proizvodnji krčkog sira. *Mljekarstvo*, 58 (3) (2008) 203-22.
- Council directive 92/46 EEC, laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat treated milk and milk-based products.
- Dimitrovska, G., Srbinovska, S. i Presilski, S.: Zavisnost broja somatskih ćelija i ukupnog broja bakterija u kravljem mleku Holštajn-frizijske rase sa farme u Pelagoniji, *Prehrambena industrija- Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2) (2008) 116-118.
- Čobanović, K. i Škrinjar, M.: Mogućnosti smanjenja stepena mikrobiološke kontaminacije mleka. *Prehrambena industrija*, 14 (1-2) (2003) 133-137.
- Doyle, P. M. and Beuchat, R.L.: *Food Microbiology*, Third Edition, ASM Press, Washington, DC (2007).
- Grieve, A. P. and Kitchen, J. B.: Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, 52 (1) (1985) 101-112.
- Kasalica, A., Miočinović, D., Popović Vranješ, A. and Vuković, V.: Značaj psihrotrofnih mikroorganizama u mlekarstvu. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21 (2005) 53-64.
- Niketić, G., Kasalica, A., Miočinović, D. and Gavrić M.: Uticaj mastitisa na podobnost mleka za preradu u sir, *Prehrambena Industrija*, 14 (1-2) (2003) 118-120.
- Oljačić, E. i Kasalica, A.: Prisustvo termo-rezistentnih mikroorganizama u polutvrdom siru tokom skladištenja, *Prehrambena industrija*, 17 (1-2) (2006) 12- 14.
- Sordillo, L. M, Shafer-Weaver, K. and DeRosa, D.: Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 80 (1997) 1851-65.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF TOTAL BACTERIA COUNT AND SOMATIC CELLS COUNT ON THE SEMIHARD CHEESE YIELD

¹Mirjana Bojanić Rašović, ¹Slavko Mirecki, ¹Nikoleta Nikolić, ²Rajo Rašović

¹Biotechnical faculty, Podgorica, Crna Gora, ²“ZZ Cijevna”, Podgorica, Crna Gora

The purpose of this paper was to examine the influence of total bacteria count and the somatic cells count in bovine bulk milk on yield of semihard cheese produced in creamery ZZ “Cijevna” in Podgorica.

The total bacteria count was examined by Bactoscan FC 100 and somatic cells count by Fossomatic 5200.

The actual cheese yield was determined on the base of milk quantity and the produced cheese, and was expressed in percentages.

The average value of total bacteria in analyzed samples was 2.384.000/ml and the number of somatic cells was 525.000/ml. The actual cheese yield was 11,26%, for quantity of milk 414,3l and weight of cheese 46,66kg.

The average positive correlation was determined between total bacteria count and somatic cells count in milk (0.549317), and between the total bacteria count and quantity of milk (0.539122). The average negative correlation was determined between total bacteria count and the actual cheese yield (- 0.6755).

The results have showed that the total number of microorganisms has an important negative influence on cheese yield.

Key words: milk • total bacteria count • somatic cells count • cheese • cheese yield

SLAVICA M. SAMARDŽIĆ

Ministarstvo poljoprivrede,
šumarstva i vodoprivrede
Republike Srpske, Banja Luka

NAUČNI RAD

UDK: 637.33:637.05(497.15)

SIR IZ MIJEHA IZ HERCEGOVINE: STARI RECEPT – NOVA PERSPEKTIVA

UVOD

Moderni model razvoja ruralnih područja u prvi plan stavlja proizvode visokog kvaliteta sa dodanom vrijednosti. Ovakvi proizvodi imaju naročit značaj za područja gdje je bavljenje intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom ograničeno prirodnim i klimatskim uslovima. Proizvod čija unikatnost i jedinstvenost ni jednog posjetioca Hercegovine ne ostavlja ravnodušnim, u narednom periodu bi mogao postati pokretač ruralnog razvoja ove regije. Predmet istraživanja ovoga rada bili su originalna receptura i simbolički značaj sira iz mijeha kako za stanovnike Hercegovine, tako i za populaciju koja živi izvan granica ove teritorije. Istraživanje koje se odnosi na originalnu recepturu sira iz mijeha je obavljeno na teritoriji opštine Nevesinje putem otvorenog intervjua deset porodica proizvođača sira, dok je istraživanje koje se odnosi na simbolički značaj sira iz mijeha obavljeno jednim dijelom putem navedenog intervjua, a drugim dijelom iščitavanjem dostupne literature. Rezultati istraživanja navode na zaključak da je proizvodnja sira iz mijeha najvjerovatnije stara koliko i bavljenje stočarstvom, dok za populaciju Hercegovine sir iz mijeha predstavlja jednu od karakteristika njezinog identiteta.

Ključne riječi: sir iz mijeha • originalni recept • ruralni razvoj • tipični proizvod

Tipični proizvodi predstavljaju kulturno i istorijsko nasljeđe područja. S obzirom da se integralni ruralni razvoj temelji ne samo na intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji, nego mnogo više na revitalizaciji ekstenzivnih i zaboravljenih proizvodnih metoda, otvara se nova perspektiva gotovo zaboravljenim proizvodima kakav je sir iz mijeha iz Hercegovine da postanu generatori ruralnog razvoja područja. Za revitalizaciju sela jedna od najboljih metoda jeste sačuvati i nanovo valorizovati tradicionalne proizvode visoke vrijednosti.

Po definiciji (Marescoti, 2006) tipični proizvod je onaj koji je dobijen primjenom tradicionalnih proizvodnih metoda, upotrebom lokalnih specifičnih resursa koji proizvodu daju specifične i prepoznatljive kvalitativne karakteristike, i koji u svom nazivu nosi ime lokaliteta sa koga potiče.

Autohtono mljekarstvo nije nostalgija, već mljekarstvo što jeste i što će biti obilježje naroda i zemlje. Autohtoni mliječni proizvodi su bogatstvo i dio materijalne kulture svake zemlje (Dozet i sar., 1996).

Sir iz mijeha je proizvod koji se na prostorima Hercegovine proizvodi vjekovima. Zbog specifičnih anaerobnih uslova zrenja u posebno pripremljenoj mješini, ovaj sir ima specifične i prepoznatljive organoleptičke karakteristike, te svakako mora zauzeti centralno mjesto u ruralnom razvoju Hercegovine. Da bi to i postao, najprije se mora izučiti originalni način njegove proizvodnje i njegova simbolička vrijednost, kako za područje Hercegovine tako i izvan njezinih okvira.

Zbog toga je cilj ovog rada da doprinese revitalizaciji lokalnog znanja i lokalne tradicije, što će predstavljati

odskočnu dasku za daljnje procese valorizacije proizvoda i teritorije.

MATERIJAL I METODI

Istraživanje je obavljeno u selima Bratače i Krekovi na području opštine Nevesinje na području Istočne Hercegovine tokom aprila mjeseca 2009. godine. Putem otvorenog intervjua ispitani su članovi deset porodica koje proizvode sir po tradicionalnoj recapturi. Najveći dio (80 %) informacija relevantnih za ovaj rad dobiveno je od članova porodica starijih od 60 godina. Ispitivani su: omjer kravljeg i ovčijeg mlijeka u proizvodnji sira, način pripreme mješine, tehnologija procesa proizvodnje, simbolička vrijednost sira, te znanje i kompetentnost lokalne populacije pri pravljenju sira. Kroz pretraživanje dostupne literature došlo se do podataka koji govore u prilog tvrdnji da je sir iz mijeha najvjerovatnije star isto koliko i bavljenje stočarstvom na području Hercegovine. Takođe je nađeno da je kroz nekoliko inicijativa i projekata pokrenutih što od strane vladinog, što od strane nevladinog sektora, sir iz mijeha počeo sve više da se vrednuje i traži i izvan granica proizvodnog područja.

REZULTATI I DISKUSIJA

Imajuću u vidu činjenicu da su tipični proizvodi dio kulturne baštine teritorije, eksplicitno se nameće i obaveza društvene zajednice da se ona zaštiti i sačuva od zaborava. Azama i Battcocka (2001) navode da se „znanje o proizvodnji tradicionalnih proizvoda prenosi s majke na ćerku i nepravedno se svrstava u kategoriju *arhaično znanje* (indigenous knowled-

Adresa autora:

Mr Slavica Samardžić, Ministarstvo poljoprivrede,
šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske,
Trg Republike Srpske 1, 51 000 Banja Luka
tel.: +387 65 343 978
e-mail: s.samardzic@mps.vladars.net

ge)". Većina ovakvih znanja je „zabrojena“ unutar same proizvodne zajednice i nikad nije dokumentovana, što ih stavlja u opasnost da zauvijek budu i izgubljena.“ Isti autori dalje navode „da je pamćenje veoma krhko kao metod za čuvanje znanja“, te ukazuju na „hitnu potrebu da se informacije o tradicionalnim metodama proizvodnje sakupe i sačuvaju prije nego što bude prekasno“. Organizacija Slow Food, osnovana 1989. godine u Italiji u namjeri da zaštiti regionalnu proizvodnju hrane od homogenizacije kojom je prijetila industrija brze hrane i stila življenja, danas je prerasla u svjetski pokret koji se na globalnom nivou bori za očuvanje raznovrsnosti lokalnih znanja i zaštitu biodiverziteta. U proglasu pod naslovom „Slow Food slavi lokalnu hranu“ kojim pozivaju na obilježavanje dvadesetogodišnjice postojanja navode: „Svi ljudi moraju imati mogućnost da zaštite lokalni jezik, kulturu i tradicionalno znanje“ (www.slowfood.com/terramadreday/pagine/eng/pagina1.lasso?-id_pg=104).

U opštoj atmosferi nesigurnosti i nepovjerenja koji vladaju među potrošačima nakon skandala u proizvodnji hrane poslednjih godina kao što su kravlje ludilo, te ptičji i svinjski grip, potrošači nastoje zaštititi svoje zdravlje biranjem hrane proizvedene na što prirodniji način. „To se često preobrazilo“, kako ističe Cerruti (2006), „u ponovno otkriće tradicionalnih i tipičnih proizvoda koji bivaju doživljeni kao nosioci većih garancija u smislu prirodnosti i zdravlja, zahvaljujući snažnoj vezi sa sredinom u kojoj se proizvode“.

Istorija proizvoda

Vijekovima su stanovnici Dinarskog planinskog masiva preživljavali od stočarstva. Nomadi su izgonili svoja stada ovaca, krava, konja i sve druge živeži u planine i više od šest mjeseci godišnje. S obzirom da u vremenu od nekoliko vijekova unazad nije bilo ni prevoza, ni puteva, jedina hrana čobanima i njihovim familijama bili su mlijeko i mliječni proizvodi. Međutim, pitanje je bilo šta su mogli raditi sa tako velikim količinama mlijeka u vrućim ljetnim mjesecima bez hladnjaka i druge opreme koja bi im mogla poslužiti za čuvanje proizvoda na duži period. Ostajala im je domišljatost da se posluže svim onim, i samo onim što su mogli otrgnuti od prirode. Oprema ručno izrađena od drveta kao što su škipi za „razljevanje“ mlijeka, kace za zrenje kajmaka i sira, stap za

pravljenje putera, i danas su osnovno oruđe za proizvodnju ovih proizvoda od visoke vrijednosti u manjim količinama.

Poznato je još od najranijih vremena da se sipanjem mlijeka u ovčiju mješinu, mlijeko zasirava bez ikakvog dodavanja sirila. Pretpostavlja se da su ljudi željeli da iskoriste mješinu ne samo za zasiravanje mlijeka nego i za čuvanje sira na duži vremenski period. To je najvjerovatnije spontano profunkcionisalo i sir iz mješine je na neki način postao zaštitni znak Hercegovine.

U studiji koju je radio Sarić (2009) izrađenoj u okviru projekta „Zaštita i valorizacija poljoprivrednih tradicionalnih proizvoda od vrijednosti za Hercegovinu“ navodi se sljedeće: „Koliko je proizvodnja sira iz mijeha stara vidi se na osnovu podatka iz 1379. godine koji kažu da „ako bosansko domaće stanovništvo ne donese u Dubrovnik mesa i sira, u Dubrovniku nema ni mesa ni sira“. Prema istim podacima kaže se da je do kraja 16. vijeka Dubrovniku iz Hercegovine darovana stoka u neograničenim količinama, pa i sir u mješinama u količinama do 800 kg. Najstariji vlaški zakon u turskom tekstu u defteru za brničevski subašluk iz 1487/8. godine, u davanju od jednog katuna sandžak-begu (jedan šator, jedan sir, tri konopca, šest ulara, jednu mješinu sira i jednoga ovna) pokazuje da je to ranije morao biti poklon od katuna, odnosno od starješine katuna. Prema istom izvoru sir i kajmak spremni su u mješinu od ovčije kože i na konjima ili magarcima dopremani na hercegovačke trgove.“

U istoriji proizvodnje leži odgovor u izboru proizvodnih tehnologija i postupaka tokom različitih perioda kroz koje je prolazila proizvodna zajednica. Šturi zemljišni resursi, teški klimatski uslovi, nomađenje kao način življenja, domišljatost u preživljavanju, samo su neke od hipoteza koje objašnjavaju nastanak i opstanak „zanata“ proizvodnje sira iz mijeha na području Hercegovine, kao i na širem području dinarskog lanca.

Originalni recept

Sir iz mijeha pripada grupi sireva napravljenih od nepasterizovnog mlijeka. Može se praviti od čistog kravljeg, ovčijeg ili kozjeg mlijeka, ili od njihovih mješavina. U čitavoj Hercegovini prije Drugog svjetskog rata uzgajale su se dvije lokalne pasmine: krava Buša i ovca Pramenka. Objе ove pasmine spadaju u izrazito otpor-

ne i prilagođene na tešku planinsku klimu. Pasmına Buša po svojim genetskim karakteristikama spada u niskomliječna grla. Životinje su jako loše prehranjivane. U zimskim mjesecima davalo im se samo sijeno sakupljeno sa prirodnih livada, a ostala tri godišnja doba su provodile vani, najčešće u planini. Loša ishrana i genetska predisponiranost uticali su da se od ove pasmine dobijala vrlo mala količina mlijeka. Nerijetko, goveda su bila mužena samo u sezoni između maja i avgusta mjeseca, odnosno dok je bilo zelene paše.

Slična situacija je bila i kod prehrane ovaca i njihove mužе. Uglavnom su, više nego goveda, čak i zimu provodile na pašnjacima pa su mužene najviše četiri mjeseca u godini. Sve to navodi na zaključak da se sir pravio samo tokom nekoliko mjeseca u kojima je bila izobilna paša i da se mlijeko nije razdvajalo, nego da se sir pravio od mješavine ovčijeg i kravljeg mlijeka.

Što se tiče procentualnog udjela kravljeg i ovčijeg mlijeka u pravljenju sira, nemoguće je dati precizan odgovor. Moguće je jedino doći do približnih vrijednosti na osnovu broja životinja koje su se uzgajale u pojedinim familijama i količine mlijeka koje su životinje davale. U periodu između dva svjetska rata, svaka seoska porodica je uzgajala istovremeno i krave i ovce. Po pričanjima najstarijih, familije koje su se računale za bogate držale su oko pet krava i oko stotinu ovaca, dok su siromašnije imale najviše po dvije krave i oko dvadesetak ovaca. Najveća količina mlijeka u klimatskim uslovima Nevesinja dobivana je u junu. Prema njihovim sjećanjima, na najboljoj paši krave su davale oko šest litara, a ovce oko šesto grama mlijeka dnevno. To znači da su najbogatije familije dnevno mogle izmesti 30 litara kravljeg i 60 litara ovčijeg mlijeka, dok su one siromašnije mogle izmesti 12 litara kravljeg i 12 litara ovčijeg mlijeka dnevno. Sva ova saznanja navode na zaključak da je najveći udio ovčijeg mlijeka u siru mogao biti između 55% i 66%. Ako se još uzme u obzir da je broj bogatih familija bio neznatan (u selu Brataču u Nevesinju od ukupno sto familija samo tri od njih su imale 100 ovaca i 5 krava) i da se samo tokom juna mogla dobiti ova količina mlijeka, naprijed data kalkulacija udjela ovčijeg mlijeka u originalnom receptu sira iz mješine morala je biti znatno manja.

Odmah poslije muže mlijeko se cijedilo kroz dvostruku tkaninu i stavljalo na kraj šporeta da se malo podgrrije. U mlijeko je sipano domaće sirilo. Koristilo se samo ovčije sirilo koje se dobivalo tako što je ovčije sirište sušeno na dimu i potapano u surutku koja se onda koristila kao sirilo. Dužina podsiravanja zavisila je od „jačine“ sirila i temperature mlijeka i trajala je između 1 i 1,5 sati. Jedno sirilo se bez „prepiranja u vodi“, moglo koristiti 15 dana. „Jačina“ sirila se povećavala do 8. dana, a od 8. do 15. dana je počinjala gubiti svoju jačinu. Na 10 litara podgrijanog mlijeka kad je sirilo najmanje „jačine“, dodavao se 1 litar sirila. Kad je sirilo „staro“ između 7 i 9 dana na istu količinu mlijeka sipano je od 0,7 do 0,8 litara sirila. Za vrijeme sirenja drvenom kašikom bi se nekoliko puta promiješao gruš. Kraj sirenja je određivan prema boji surutke koja je postajala bistra, zeleno-žute boje, i slijeganju gruš na dno šerpe.

Kad bi se sir „staložio“ na dno šerpe, ocijedio bi se površinski sloj potpuno bistrer surutke, a preostala smjesa sira i surutke presipana je u drugi sud po kome bi se prethodno raširilo platno, tzv. cjedilo, koje je moralo biti od nekog „čvršćeg“ materijala. (Cjedilo se pralo najprije u suruci, a ispiralo u toploj vodi.) Sir se tad solio „rukom, otprilike“. Zatim bi se sastavili krajevi cjedila i sir lagano gnječio rukom da se iz sira izdvoji maksimalna količina surutke. Tako zamotana gruda, zajedno sa cjedilom, stavlja se pod veliki kamen gdje je ostajala „od jednog mlijeka do drugog“. Cijeđenje je trebalo obaviti „pravilno“, jer ako bi u siru zaostalo surutke, stvarale bi se rupice i dobijao se kiseo, neprijatan okus.

Najvažniji trenutak u proizvodnji sira iz mijeha je priprema mješine odgovarajućeg kvaliteta, a pravljenje mješine je umijeće koje se prenosi s koljena na koljeno. Poslije klanja ovce mješina se opere zajedno sa vunom. Zatim se vuna obrije i mješina izvrne tako da vanjska strana dođe unutra. Onda se špagom zavežu sve šupljine na mješini osim vratnog otvora kroz koji se naduva mješina i na kraju se i ta šupljina zaveže. Tako pripremljena mješina se stavlja na dim i suši 15-20 dana. Kad se mješina „zakori“ sa vanjske strane, odvezuju se svi čvorovi kako bi se zadimila i unutrašnjost mijeha. Zadimljen mijeh se skida sa dima, u mlakoj surutki se opere sa obje strane, i ispere se sa mlakom, čistom vodom. Zatim se opet zavežu sve ru-

pe, mijeh se naduva i dva dana se stavlja na dim da se mijeh prosuši do mjere koja omogućava lako manipulisanje mješinom.

U tako pripremljenu mješinu se stavlja sir i to na sljedeći način: grude se rukom izdrobe na sitnije komadiće i ako je potrebno dosole. Zatim se sir sloj po sloj ubacuje kroz otvor na vratu mješine i drvenim zbijaćem ili rukom sabije da bi se istisnuo sav vazduh iz mješine. Kad se do vrha napuni mješina sveže se i vratni otvor mješine i sir se prenosi u podrumsku prostoriju na zrenje. Zrenje sira traje dva do tri mjeseca.

Narativne legende u kontekstu tipičnosti teritorije Hercegovine

Slow Food je razvio model po kome sve narativne legende, u kontekstu teritorije sa koje proizvod dolazi, trebaju biti zabilježene i upotrebene u svrhu promocije i postizanja dodatne vrijednosti proizvoda. Autor ovog rada je u toku boravka 2007. godine u italijanskom gradu Bra, u kome se svake dvije godine održava manifestacija Cheese, imao priliku da prisustvuje predstavi koja se u restoranu izvodi u toku objeda i kojom se slavi i glorifikuje tipična talijanska kuhinja. Ovo je zaista zanimljiv model koji jednostavno „ostavlja utisak“ kakav teško izlazi iz pamćenja.

U toku istraživanja autor je zabilježio jednu priču koja je raširena u Hercegovini, a koju je ispričao Samardžić M. iz sela Bratača i koja govori u prilog tvrdnji da je svijest o vrijednosti sopstvenih proizvoda u Hercegovini prisutna.

Kad je Bog stvarao zemlju dade on svojim anđelima rešetio u kome bijaše nasuta zemlja i kamen pa im reče: „Idite i to ravnomjerno razaspite po zemlji“. Oni otidoše pa ne sipaše iz rešeta nego sijahu i sijahu, dok u rešetio ne ostade samo kamen. A kad vidješe da nisu učinili kako im Bog zapovijedi, vratiše se Bogu i rekoše: „Bože malo smo se zanjeli pa nam osta samo kamen u rešetio, te ne znadosmo šta da učinimo sa njim“. Bog se rasrdi, ali sam po sebi milostiv, ne htjede da ih kažnjava nego reče: „Idite i negdje prospite i to kamenje, nekome će i to biti od koristi.“ Odoše anđeli i isprazniše rešetio iznad Hercegovine.

Onda Bog stvori Hercegovca, pa kad ga doveo na zemlju koju je njemu namijenio, Hercegovac počeo ridati i naricati: „Bože, što mene osudi da živim u ovom jadu i čemeru? Ovo nije

ni za zvijeri, a kamoli za čovjeka!“ Na to mu Bog odgovori: „Istina je da sam te doveo da živiš u najgorim mogućim uslovima na zemlji, ali sve što proizvedeš u ovom kamenu biće blagoslovljeno da bude vrednije od zlata.“

Simbolički značaj sira iz mijeha za hercegovačku populaciju

Simbolički kapital se definiše kao kapacitet građenja sopstvenog identiteta. Identitet je simbolička prezentacija značenja koje socijalni akteri daju svojoj djelatnosti (Brunori, 2000).

Sir iz mijeha osim svojih nutritivnih vrijednosti, nosi i ogromni simbolički značaj za svakog Hercegovca.

U prehrambenoj navici mlijeko i mliječni proizvodi igraju neizbježnu ulogu za hercegovačku populaciju. Najmanje jedan kompletan obrok dnevno u Hercegovini sastoji se samo od mlijeka, kajmaka, sira i hljeba. U prilog tome govori i jedna tipična uzrečica u Hercegovini. Upitan šta je jeo, Hercegovac će odgovoriti „hljeba i sira“, iako je najverovatnije uz hljeb i sir jeo i još nešto kao dodatak. Jedna izreka kaže: „Dok je hljeba nije sirotinje, dok je sira nije suvočinje“. Samo pedeset godina unazad onaj ko je imao dovoljno sira za svoju familiju smatrao se bogatim čovjekom. U ovom kontekstu treba napomenuti da je već puter smatran „pozicionom robom“. U čijoj bi kući putnik ili namjernik bio počašćen sirom i maslom „čuvenje“ familije se prepričavanjem prenosilo i van granica Hercegovine.

Kao glavno jelo u Hercegovini sir se najčešće jede sa toplim hljebom, tek izvađenim iz rerne. Takođe, vrlo često se jede sa polovicama krompira, posoljenim i pečenim u rerni, tzv. „polama“. Nerijetko se jede i sa kuvanim, neguljenim, krompirom, tzv. „pod korom“.

Kad neko nekom u Hercegovini ide u posjetu, sira iz mijeha mu obavezno nosi kao poklon.

Kao dodatak koristi se u raznim jelima. Jedno od najstarijih, najpoznatijih i neizbježnih jela sa menija hercegovačke kuhinje, cicvara, nezamisliva je bez sira iz mijeha. Kao dodatak nekim globalno poznatim jelima kao što su pire krompir, kajgana, popara, čini ih potpuno drugačijim u pozitivnom smislu.

U granicama Hercegovine osnovnom nazivu sir iz mijeha dodaje se i naziv specifičnog lokaliteta sa koga potiče pa imamo npr. sir iz mijeha sa Morina, sir iz mijeha iz Bratača, sir iz

mijeha iz Rakitnog itd. Kad sir ide na tržište izvan granica Hercegovine kao na primjer u Sarajevo, Dubrovnik ili Vojvodinu, onda nosi samo svoj osnovni naziv sir iz mijeha iz Hercegovine.

Značaj sira iz mijeha izvan granica Hercegovine

Sir iz mijeha ima svoje potrošače na svim lokalitetima gdje žive stanovnici čije je porijeklo iz Hercegovine. Među takvim mjestima posebno se izdvajaju granični pojas Zapadne Hercegovine i hrvatske obale, Vojvodina, Crna Gora. Međutim pošto se sir prodaje najvećim dijelom direktno od strane samih proizvođača konačnom potrošaču, prihod od prodaje sira van granica Hercegovine je minimalan.

Veća uloga sira za posjetioce Hercegovine jeste u njenoj turističkoj atraktivnosti i on je svakako postao na neki način zaštitni znak Hercegovine. Zaista nema posjetioca koji se namjerno ili slučajno nađe u Hercegovini, a da odmah ne primijeti taj nevjerovatni hercegovački proizvod.

Evo citata iz teksta koji je napisao novinar Carlo Macchi koji je prvi put vidio i probao ovaj sir na sajmu vina Vinitali u Veroni 2006. godine: "...Takođe sam našao odgovor na mnoga mitološka pitanja. Oduvijek sam se pitao zašto su Arnauti bili radi da rizikuju i sopstveni život u potrazi za zlatnom ovčijom kožom, a sad sam otkrio i zašto: oni su tražili „sir“ a ne zlatno runo. Sa koliko nježnosti je grupa surovih ratnika čuvala običnu zgužvanu kožu. Oni su u stvari tražili nešto sa čim bi čistili sebe, čime bi nahranili svoja čula, i tako se osjetiti bliže bogovima..." (www.enotime.it/zoom/default.aspx?id=3476).

Slow Food je 24. aprila 2006. godine upisala Sir iz mijeha na listu Prezidia. (Prezidii su projekti koji pomažu malim proizvođačima da zaštite proizvode napravljene tradicionalnim proizvodnim metodama. Ovi projekti takođe vrednuju tradicionalno znanje, kulturu i specifične karakteristike regije.) Tom prilikom je između ostalog napisano: „Kvalitet sira iz mijeha i jedinstvena proizvodna procedura čine ovaj sir posebno vrijednim.“ (<http://slowfood.com/slowweb/ita/dettaglio.lasso?cod=3E6E345B0a5a627EB4IOP430020C>). Kao Prezidio, pod pokroviteljstvom Slow Fooda, sir iz mijeha se izlaže na sajmu prehrane Salone del Gusto koji se održava svake druge godine u Torinu, i na sajmu sira Che-

ese koji se, takođe, održava svake druge godine u talijanskom gradu Bra. Na taj način sir iz mijeha je pravno svrstan u porodicu najpoznatijih svjetskih sireva kao što su: Emmental, Parmigiano Reggiano, Mozzarella i sl.

Znanje i kompetentnost Hercegovačke populacije u pravljenju Sira iz mijeha

Hercegovina je zemlja puna legendi i priča koje govore o njezinom postanku i prenose se s koljena na koljeno. Evo nekih od priča sakupljenih u toku istraživanja.

Kad bi se Hercegovac odlučio ženiti i kad bi se zagledao u kakvu djevojku, onda bi neko od njegove rodbine, kao nekim slučajem, nenamjerno, „banuo“ u djevočinu kuću u vrijeme kad se siri sir. Neprimijetno, „ispod oka“, bi pogledivao koliko vješto djevojka pravi sir, cijedi surutku, savija cjedilo... Ako bi bio zadovoljan onim što je vidio, dolazio bi mladoženjinoj kući prenosio izvještaj, a onda bi se išlo u prosidbu.

Umijeće pravljenja sira iz mijeha prenošeno je s koljena na koljeno, iz generacije u generaciju. Do početka sedamdesetih godina svaka žena ili djevojka koja je živjela na selu znala je praviti sir iz mijeha. Pravljenje sira u Hercegovini je uvijek smatrano kao „ženski posao“, i, iako je sve više muškaraca koji se bave ovim poslom, žene su i danas „glavni“ majstori ovog zanata. Nove generacije koje stasavaju pod uticajem globalizacije i novih normi koje nameće društvo sve manje pažnje posvećuju očuvanju starih, tradicionalnih zanata kao što je umijeće pravljenja sira iz mijeha. Žene Hercegovke, srednjih godina ka starijim, još uvijek su veliki majstori ovog zanata i veliko blago ruralne zajednice.

Dok je pravljenje sira bio tradicionalno ženski posao, dotle je pravljenje mješine smatrano isključivo muškim poslom. Pretpostavlja se da je korišćenje ovčije kože u razne namjene staro isto koliko i bavljenje stočarstvom. Od ovčije kože se pravila odjeća. Koža je štafvljena i od nje su se pravile prostirke za pod. Mješina je korišćena i kao ambalaža za nošenje vode sa izvora, kao i drugih tečnosti kao što su vino ili mlijeko. Do početka sedamdesetih godina svaki muškarac koji je živio u hercegovačkim selima znao je praviti mješinu. Po izgledu mješine procjenjivana je visprenost i snalažljivost muškarca. Kad bi se za

neko pričalo da je neradan i neuk govorilo se: „Pogledaj mu samo mješinu pa sa njim traži sreću“, a kad bi se neko hvalio govorilo se: „Mješina mu kao vosak žuta“. U današnje vrijeme sve je manje onih koji znaju napraviti „urednu“ mješinu i uglavnom su to stariji ljudi. U familijama koje su bile predmet istraživanja bilo je i mladih ljudi do dvadeset godina koji su shvatili vrijednost očuvanja ovog umijeća i koji su znali vrlo umješno da prave mješinu pa su čak s ponosom pričali o svojim „tajnim tehnikama“ u pravljenju mješine.

ZAKLJUČAK

Kao što jedna poslovice kaže: „Ni jedno drvo ne raste do neba“, tako ni proces industrijalizacije koji je poslje Drugog svjetskog rata uzeo svoj zamah nije mogao rasti do beskonačnosti. Ovaj proces je uspio proizvesti dovoljne količine hrane ali je za sobom ostavio opustošena ruralna područja i izgubljenu raznolikost lokalnih kuhinja. Kao protivmjera procesu industrijalizacije, sredinom osamdesetih godina u Evropi su započeli procesi u reformi agrarne politike koji su rezultirali novim konceptom razvoja ruralnih područja integralnim ruralnim razvojem. U centru mnogih strategija ruralnog razvoja evropskih zemalja, centralnu ulogu imaju upravo tipični lokalni proizvodi.

Ruralna područja Hercegovine spadaju u najrjeđe naseljena područja Bosne i Hercegovine sa tendencijom daljnjeg raseljavanja, te je stoga potrebno hitno reagovati kako bi se ovaj negativni trend zaustavio. Jedna od mogućnosti svakako leži u stvaranju prepoznatljivosti teritorije i generisanja novih prihoda za život i opstanak njezinog stanovništva kroz valorizaciju, revitalizaciju i oživljavanje starih zanata kakav je i zanat proizvodnje sira iz mijeha. Time bi se očuvali proizvodi od visoke vrijednosti i stvorila mogućnost da se mlađe stanovništvo zadrži na selu.

Stanovnici Hercegovine su ponosni na svoj proizvod, a kroz ovo istraživanje pokazali su i da su spremni učiti u „borbu“ za zaštitu svoga proizvoda kojim ujedno štite i svoju kulturnu baštinu i svoj identitet. Mnogo je i onih izvan granica Hercegovine koji su prepoznali vrijednost ovog proizvoda i pokazali zainteresovanost za njegovu konzumaciju i promociju.

U okviru projekta „Zaštita i valorizacija poljoprivrednih tradicionalnih proizvoda od vrijednosti za Hercegovinu“ od strane talijanske NVO „Ukodep“, pokrenuto je dosta inicijativa na promociji sira pa je sir izlagan i na najvećim evropskim sajmovima hrane kao što Salone del gusto, sajam hrane u Torinu. U okviru istog projekta urađene su analize lokalnog proizvodnog sistema, osnovano udruženje proizvođača sira iz mijeha, a najvažniji događaj u „novom poglavlju svoga življenja“ svakako je upis sira iz mijeha na listu Presidia od strane Slow Foda.

Međutim ovo treba smatrati samo početkom nove perspektive za proizvod koji je vijekovima zaštitni znak područja Hercegovine. Naredna istraživanja i napore treba usmjeriti na edukaciju potrošača o nutritivnim i simboličkim vrijednostima sira iz mijeha,

ha, zatim na edukaciju proizvođača o sposobnostima promovisanja, i kao najvažnije, istraživanjima novih tržišta za ovaj unikatni proizvod. Neophodno je da ove inicijative poprat i legislativa o legalnom stavljanju u promet proizvoda napravljenih od nepasterizovanog mlijeka, kao i legislativa o načinima i modelima brendiranja i zaštite tipičnih proizvoda uz obavezan set higijensko-sanitarnih propisa.

LITERATURA

- Azzam, S. H., Battcock, M. J and A.: Promoting and protecting traditional food products, Crop post harvest programme, 4 (2001).
- Brunori, G.: Alternative trade or market fragmentation? Food circuits and social movements (Draft) published by University of Pisa, 6 (2000).
- Cerruti, R.: Guida per la valorizzazione dei prodotti agroalimentari tipici, Manuale, ARSIA-Firenze, 33 (2006).

- Dozet, N., Adžić, N., Stanišić, M., Živić, N.: Autohtoni mliječni proizvodi, Izd. Poljoprivredni institut, Podgorica i Sirmir, Beograd (1996).
- Marescotti, A.: Guida per la valorizzazione dei prodotti agroalimentari tipici, Manuale, ARSIA-Firenze, 13-20 (2006).
- Sarić, Z.: Analiza lokalnog proizvodnog sistema hercegovačkog sira iz mijeha; Projekat: „Zaštita i valorizacija poljoprivrednih tradicionalnih proizvoda od vrijednosti za Hercegovinu“, NGO UKODEP, Sarajevo (2009).
- www.ucodep.org
www.slowfood.com
www.winesurf.it

SUMMARY

MIJEHA CHEESE FROM HERZEGOVINA: OLD RECIPE – NEW PERSPECTIVES

Slavica M. Samardzic

Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of Republic of Srpska, Banja Luka

Modern model of rural areas development emphasizes products of high quality with added value. Such products have particular importance in areas where intensive agricultural production is restricted by poor climate and natural conditions. This product's uniqueness leaves no visitor of Herzegovina indifferent, and it could possibly become a driving force of rural development of this region in the future. Research has been carried out on the Municipality of nevesinje by interviewing its oldest cheese producers. The subject of this research was original technology of cheese in a sack. Results lead to the conclusion that production of cheese in a sack is as old as cattle breeding and presents a part of this area's population's identity.

Key words: *mijeha* cheese • original recipe • rural development

SVETLANA S. POPOVIĆ
MIODRAG N. TEKIĆ

Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.02:542.816

MOGUĆNOSTI UNAPREĐENJA MEMBRANSKIH PROCESA PRIMENJENIH U INDUSTRIJI MLEKA*

Membranski separacioni procesi, sa razlikom pritisaka kao pogonskom silom, nalaze široku primenu u industriji mleka koja datira od sredine 20. veka. Na efikasnost membranske filtracije utiče kako smanjenje fluksa usled prljanja membrane tokom same filtracije, tako i učestala potreba za čišćenjem membrana. Tokom ultrafiltracije i mikrofiltracije mlečnih sistema fluks je kontrolisan prljanjem prvenstveno nastalim postepenom adsorpcijom i taloženjem proteina na površini i u porama membrane. U ovom radu opisan je pregled dosadašnjih istraživanja fokusiranih na unapređenje membranskih procesa, primenjenih u industriji mleka, kako sa aspekta povećanja fluksa tokom same filtracije, tako i sa aspekta efikasne regeneracije fluksa tokom čišćenja membrana zaprljanih proteinima.

Ključne reči: Mikrofiltracija • ultrafiltracija • proteini mleka • proteini surutke • prljanje • čišćenje

UVOD

Membranski separacioni procesi, sa razlikom pritisaka kao pogonskom silom, nalaze široku primenu u industriji mleka koja datira iz sredine 20. veka. Nagli razvoj membranskih procesa je podstaknut svetskom energetskom krizom.

Naime, membranska filtracija predstavlja proces sa manjim utroškom energije i manjim uticajem na zagađenje životne sredine u odnosu na standardne tehnike prečišćavanja poput uparavanja, centrifugiranja i sl.

*Rad je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (Projekat br. 142045).

Adresa autora:
Mr Svetlana Popović, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet,
Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
tel.: 021/485-3675
e-mail: popovics@tf.uns.ac.rs

Do 2003. godine u industriji mleka je instalirana površina membrana iznosila 500 000 m². Procenjuje se da se 70% ove površine koristi za preradu surutke, a ostatak za koncentrisanje mleka. Tri evropske države, Nemačka, Francuska i Holandija, predstavljaju najveće prerađivače surutke sa proizvodnjom od 262 000 t surutke u prahu u prva tri meseca 2005 (D'Souza, 2005).

Smanjena rasprostranjenost membranskih procesa u industriji uslovljena je smanjenom efikasnošću membranske filtracije usled smanjenja fluksa, kao posledice prljanja membrane tokom filtracije, i učestale potrebe za čišćenjem membrana. Opadanje fluksa naročito je izraženo tokom koncentrisanja i frakcionisanja proteina mleka i surutke koji uzrokuju intenzivno prljanje membrana. Tokom ultrafiltracije i mikrofiltracije proteina fluks je kontrolisan prljanjem prvenstveno nastalim postepenom adsorpcijom i taloženjem proteina na površini i u porama membrane.

Savremena nauka usmerena je na istraživanja koja imaju za cilj unapređenje fluksa permeata tokom same filtracije (smanjenje prljanja) kao i unapređenje procedure čišćenja opet sa ciljem što efikasnije regeneracije fluksa. Ovaj rad daje pregled najnovijih tehnika čija primena ima za cilj smanjenje prljanja odnosno povećanje fluksa permeata i poboljšanje selektivnih karakteristika membrana primenjenih u industriji mleka.

MEMBRANSKA FILTRACIJA

Osnovni pojmovi

Membranska filtracija predstavlja razdvajanje multikomponentne fluidne smeše pomoću polupropustljive mem-

brane. Pod membranom se podrazumeva međufaza koja razdvaja dve faze i kontroliše selektivni transport materija između njih. Kao proizvodi membranske filtracije dobijaju se koncentrat (retentat), bogatiji komponentom koja se razdvaja, i filtrat (permeat), osiromašen komponentom koja se odvaja. Čestice koje se razdvajaju membranama su širokog spektra: od čvrstih, vidljivih okom, preko makromolekula do molekula i jona.

Membrane karakteriše: visok fluks permeata, dobra mehanička i hemijska otpornost i visoka selektivnost željene materije. Selektivnost membrane (S) predstavlja sposobnost membrane da vrši separaciju različitih komponentata i u direktnoj je vezi sa koeficijentom propuštanja:

$$S = \frac{C_p}{C_f} \quad (1)$$

gde su C_p i C_f koncentracije posmatrane komponente u permeatu i napojnoj smeši, respektivno.

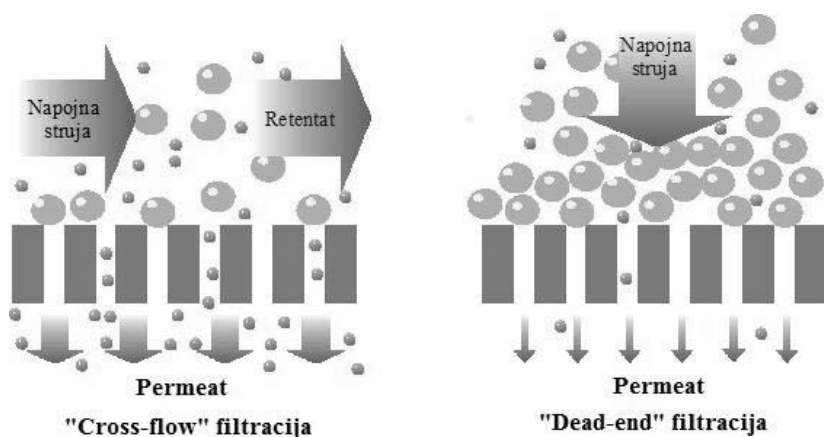
Permeabilnost neke komponente predstavlja brzinu kojom ona prolazi kroz membranu.

Zapreminski fluks permeata je povezan sa hidrauličkom permeabilnošću membrane:

$$L_p = \frac{J}{\Delta P} \quad (2)$$

gde je J fluks permeata (zapreminski protok u jedinici vremena i po jedinici aktivne površine membrane), a ΔP razlika transmembranskog pritiska.

Fluks permeata je obično niži od fluksa vode kroz membranu usled prljanja i pojave koncentracione polarizacije. Membrane se izrađuju od različitih materijala: polimera, metala i metalnih oksida, keramike, stakla ili tečnosti, u veoma širokom spektru oblika: kao ravne, cevne (cilindrične) ili u



Slika 1: ŠEMATSKI PRIKAZ "CROSS-FLOW" I "DEAD-END" FILTRACIJE
Figure 1. SCHEMATIC ILLUSTRATION OF THE CROSS-FLOW AND DEAD-END FILTRATION

obliku šupljih vlakana, kao i u različitim strukturama (simetrične, asimetrične, kompozitne), a sa ciljem poboljšanja karakteristika.

Membranski separacioni procesi mogu se grubo klasifikovati na osnovu dva kriterijuma: pogonske sile na osnovu koje dolazi do razdvajanja komponenata i na osnovu pravca glavnog toka napojne smeše.

Pogonska sila za izvođenje membranske filtracije može biti: gradijent pritiska, gradijent koncentracije, gradijent hemijskog ili električnog potencijala. Najčešće korišćeni membranski procesi su procesi sa razlikom pritiska kao pogonskom silom kao što je: ultrafiltracija, mikrofiltracija, nanofiltracija i reversna osmoza.

Osnovna razlika između ultrafiltracije i mikrofiltracije je u dimenzijama pora membrane i primenjenom trans-

membranskom pritisku (TMP). Membrane koje se koriste za ultrafiltraciju su srednjeg prečnika pora 0,05-0,1 μm i uklanjaju uglavnom makromolekule i submikronske čestice dok mikrofiltracione membrane sa srednjim prečnikom pora 0,1-10 μm uklanjaju veće čestice. TMP koji se primenjuje tokom izvođenja mikro- i ultrafiltracije, iznosi 0,05-0,2 MPa i 0,1-0,5 MPa respektivno.

Na osnovu pravca glavnog toka napojne smeše razlikujemo "dead-end" i "cross-flow" filtraciju (slika 1).

Kod tradicionalne, "dead-end" filtracije koncentracija zadržanih komponenti u napoju raste i akumulira se na površini membrane stvarajući pogaču i izazivajući znatno opadanje fluksa permeata. Kako bi se delimično izbeglo stvaranje filtracione pogače primenjuje se "cross-flow" filtracija.

"Cross-flow", ili filtracija sa unakrsnim tokom napojne smeše i permeata, koncipirana je tako da se napojni fluid usmerava tangencijalno preko površine membrane kako bi se delimično sprečilo nakupljanje čestica na površini membrane. Primenom "cross-flow" filtracije obezbeđuje se relativno manji pad fluksa koji se može regulisati protokom napojnog fluida i odgovarajućom konfiguracijom modula.

U poređenju sa konvencionalnim procesima, membranski procesi su uglavnom manje energetski zahtevni, jednostavniji za rukovanje i daju kvalitetniji proizvod. Osim toga, njihov uticaj na okolinu je relativno mali jer ne koriste opasne materije koje mogu predstavljati veliki ekološki problem i ne zahtevaju velike količine toplotne energije.

Međutim, postoje i određena ograničenja u primeni membranskih procesa. Membranski procesi ponekad zahtevaju predtretman same membrane zbog mogućnosti interakcija materijala membrane i materija u smeši koja se tretira usled čega dolazi do prljanja membrane. Membrane su, u zavisnosti od materijala od kog su napravljene, manje ili više podložne mehaničkim oštećenjima usled dugotrajnog tretiranja hemijskim agensima i dezinfekcionim sredstvima, ali i/ili usled primene velikih brzina proticanja i pritiska. Veoma bitan faktor su i troškovi procesa koji mogu biti veoma veliki (iako proces ne zahteva velike količine energije) zbog investicionih troškova. Dalji razvoj membranskih procesa je usmeren ka uklanjanju ovih nedostataka.

Primena membrana u industriji mleka

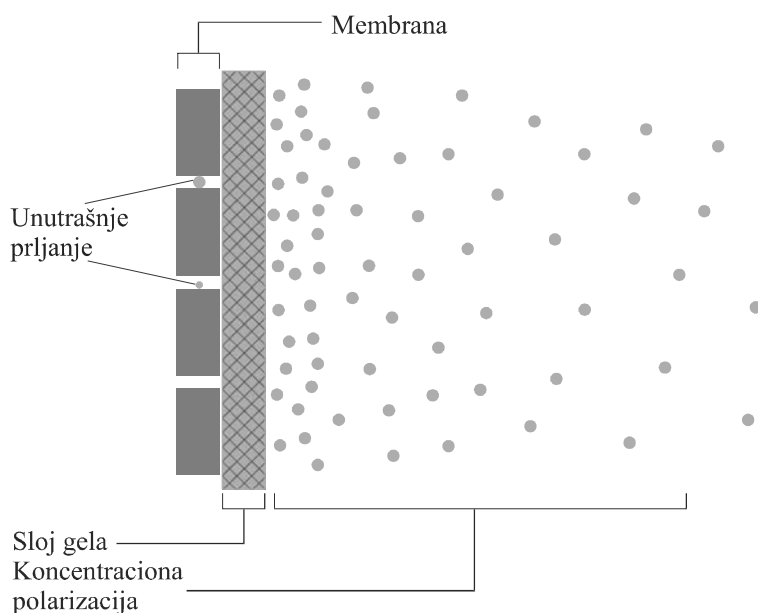
Membranski procesi sa razlikom pritiska kao pogonskom silom, nalaze široku primenu u industriji mleka. Pregled procesa dat je u tabeli 1. Kako se može primetiti, ultrafiltracija i mikrofiltracija primenjene su u velikom broju operacija pri čemu je ultrafiltracija zastupljenija od mikrofiltracije (Carrić et al., 2009). Razlog ovome može biti intenzivnije prljanje i blokiranje pora proteinima kod mikrofiltracionih membrana (Krstić, 2003).

Savremena industrija mleka koristi dva osnovna tipa membranskih filtera: spiralna vlakna sa polisulfonskim ili polietersulfonskim membranama i cevne keramičke membrane od aluminijum ili cirkonijum oksida (D'Souza and Mawson, 2005).

Tabela 1. NAJZNAČAJNIJI MEMBRANSKI PROCESI PRIMENJENI U INDUSTRIJI MLEKA (D'Souza and Mawson, 2005)

Table 1. MOST IMPORTANT MEMBRANE PROCESSES APPLIED IN DAIRY INDUSTRY (D'Souza and Mawson, 2005)

Membranski proces	Primena
UF (ultrafiltracija)	Proizvodnja koncentrata proteina mleka i surutke; frakcionisanje proteina. Standardizacija proteina, masti i ukupne suve materije u sirovom mleku. Proizvodnja mleka sa velikim sadržajem kalcijuma. Proizvodnja različitih svežih i mekih sireva. Poboljšanje specifičnih funkcionalnih osobina proteina surutke.
MF (mikrofiltracija)	Smanjenje količine mikroorganizama u mleku i pavlaci. Koncentracija ili frakcionisanje proteina. Smanjenje masti u koncentratima proteina surutke. Recikliranje surutke i rastvora za čišćenje.
RO (reversna osmoza)	Koncentrisanje pre isparavanja
NF (nanofiltracija)	Parcijalna demineralizacija Izdvajanje peptida i amino kiselina



Slika 2. ŠEMATSKI PRIKAZ GLAVNIH OTPORA PRENOSU MASE
Figure 2. SCHEMATIC ILLUSTRATION OF THE MASS TRANSFER RESISTANCES

U poređenju sa organskim membranama, keramičke membrane nalaze široku primenu zbog veće hemijske, termičke i mehaničke stabilnosti, kao i zbog toga što imaju antimikrobno dejstvo. Keramičke membrane podnose visoke temperature do 500°C, i ekstremne pH vrednosti od 0 do 14. Mogu se čistiti agresivnim hemikalijama i organskim rastvaračima kao i vrelom vodenom parom čime se obezbeđuje visoka regeneracija fluksa (Ogunbiyi et al., 2008).

Prljanje membrana

Glavni nedostatak ultrafiltracije i mikrofiltracije je opadanje fluksa permeata i promena selektivnosti membrane tokom izvođenja procesa usled smanjivanja pogonske sile i/ili povećanja otpora prenosu mase kroz membranu. Mehanizmi prljanja membrana mogu biti koncentraciona polarizacija i/ili adsorpcija u porama membrane. Otpori prenosu mase koji se mogu javiti kod membranskih separacionih procesa su šematski prikazani na slici 2.

Pored toga što sama membrana pruža otpor, otpori prenosu mase se mogu javiti usled taloženja čestica na površini membrane, zapušavanja pora molekulima rastvoraka i usled adsorpcije molekula rastvoraka na zidovima pora.

Konzentraciona polarizacija predstavlja reverzibilno akumuliranje rastvoraka ili suspendovanih čestica u bli-

zini membrane. Do pojave koncentracione polarizacije dolazi usled različite permeabilnosti rastvoraka i rastvarača u membrani i u graničnom sloju u blizini membrane. Rastvarač brže prolazi kroz membranu od rastvoraka, tako da je koncentracija rastvoraka na površini membrane i u graničnom sloju veća od koncentracije u masi rastvoraka.

Ukoliko koncentracija rastvoraka u sloju na granici postane dovoljno velika, veća od granične rastvorljivosti, može doći do formiranja sloja gela na površini membrane. Stvoreni gel predstavlja dodatni otpor prenosu mase i utiče na smanjenje fluksa i selektivnost membrane prema određenim komponentama.

Prljanje membrane obuhvata ireverzibilne procese kao što su adsorpcija rastvoraka na zidovima pora i na površini membrane, sužavanje i blokiranje pora. Posledice ovih pojava su promene u veličini pora, gustini i distribuciji pora čime se snižava fluks permeata. Mikrofiltracione membrane, sa porama većih dimenzija, podložnije su prljanju u porama od ultrafiltracionih.

Generalno se mogu uočiti tri odvojene faze opadanja fluksa usled prljanja membrane (slika 3):

Početna faza veoma brzog opadanja fluksa usled formiranja gel polarizacionog sloja.

U drugoj fazi fluks dalje opada zbog formiranja naslaga.

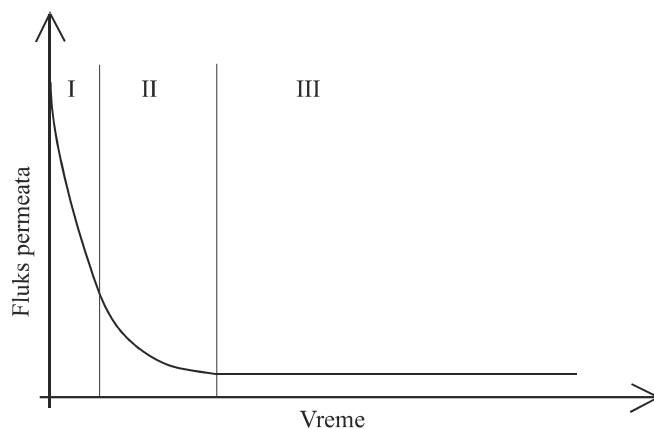
U trećoj fazi vrednost fluksa se ustali na približno konstantnoj, pseudo-stacionarnoj vrednosti.

Treba primetiti da je koncentraciona polarizacija manje-više reverzibilan fenomen koji se javlja u prvoj minuti filtracije, dok je prljanje generalno ireverzibilno i traje tokom filtracije. U drugoj fazi, fluks nastavlja da opada jer akumulirane supstance na površini membrane obrazuju dinamički sloj (gel) koji je čvrsto vezan za površinu membrane. Broj veza se samo povećava tokom vremena tako da se gel teško uklanja. U trećoj fazi fluks se približava stacionarnim vrednostima (Nigam et al., 2008).

Brzina i intenzitet prljanja zavise od velikog broja parametara:

- Specifičnih interakcija između membrane i različitih vrsta materije u napojnoj smeši;
- Hidrodinamičke sile uzrokovane kretanjem procesnog fluida.

Procesnim parametrima kao što su unakrsna brzina proticanja, transmembranski pritisak, koncentracija



Slika 3. TRI FAZE OPADANJA FLUKSA (Nigam et al., 2008)
Figure 3. FLUX REDUCTION DURING FILTRATION (Nigam et al., 2008)

napoja, veličine pora i temperature.

Problem prljanja membrana manifestuje se kao gubitak produktivnosti, povećanje materijalnih troškova čišćenja i kao problem zagađenja okoline usled rasta mikroorganizama.

Pojam adsorpcije proteina obuhvata sve proteine koji su u direktnom kontaktu sa membranom, čvrsto su vezani za nju i mogu se ukloniti samo čišćenjem. Na osnovu statičkih ispitivanja membrana (u odsustvu proticanja) može se zaključiti da kod većine membrana dolazi do formiranja monomolekularnog sloja adsorbovanih proteina na površini i/ili u unutrašnjosti membrane. Tokom ultrafiltracije i mikrofiltracije fluks je kontrolisan prljanjem prvenstveno nastalim postepenom adsorpcijom i taloženjem proteina mleka i/ili proteina surutke na površini membrane i unutar pora membrane (Carić et al., 2000; Carić et al., 1995; Ramachandra Rao, 2002).

S druge strane, pojam taloženja proteina se koristi za opisivanje akumulacije proteina na površini i/ili u unutrašnjosti membrane usled proticanja kroz sistem, međusobnih interakcija između proteina i dodatne adsorpcije, pri čemu ovi proteini nisu tako čvrsto vezani kao proteini adsorbovani direktno na membrani (Krstić, 2003). Ukoliko su proteini dosta manji od pora membrane (slučaj mikrofiltracije) molekuli proteina mogu da uđu u pore i da se adsorbuju i talože na njenim zidovima. U tom slučaju dolazi do smanjenja efektivnog prečnika pore, a može doći i do blokiranja pore.

Mikrofiltracione membrane uglavnom se prljaju proteinima surutke koji se adsorbuju u porama, dok se kazein praktično ne propušta (Al-Akoum et al., 2002). U početnom periodu formiranja naslaga najznačajniju ulogu imaju α -laktalbumin i β -laktoglobulin. α -laktalbumin ima najmanju molekulsku masu pa lako može da prođe u pore membrane i da ih blokira. Proteini prisutni u vidu aglomerata mogu izazvati pojavu prljanja membrane sa porama dimenzija većih od njihove veličine. Izuzetan značaj se pripisuje β -laktoglobulinu koji u najvećoj meri uzrokuje prljanje membrana zbog velike sklonosti ka formiranju dimera i oktamera (Mourouzis-Mourouzis and Karabelas, 2006).

Zaključak, na osnovu velikog broja ispitivanja na ultrafiltracionim i mikrofiltracionim membranama, je da dolazi do formiranja dinamičke membrane koja se sastoji pretežno od proteina. Primećeno je da se proteini talože i

unutar membrane što je kod mikrofiltracije izraženije.

REGENERACIJA FLUKSA TOKOM FILTRACIJE

Postupci koji se primenjuju kako bi se izbeglo ili kontrolisalo prljanje mogu biti različite prirode počevši od modifikacije membranske površine i predtretmana napojne smeše, preko primene različitih mehaničkih sila i insertovanja geometrijskih tela u membranu i modul.

Povećanje brzine proticanja kroz modul predstavlja jedan od najjednostavnijih načina da se povećanjem turbulencije smanji debljina sloja proteina na membrani a time i prljanje membrane. Međutim, promena velikih brzina 6-8 ms^{-1} predstavlja veliki utrošak energije oko 50-100 Wm^{-2} kod ultrafiltracije i do 1000 Wm^{-2} kod mikrofiltracije (Pedersen, 1992). Pošto ovakav način izvođenja mikrofiltracije dovodi do velikih padova pritiska, naročito na ulazu u membranu, razvijen je sistem sa uniformnim transmembranskim pritiskom (UTMP). Ovakav način izvođenja procesa preporučuje sa pri koncentrisanju obranog mleka za faktore koncentrisanja od 6-10 pri brzini proticanja od 7,1 ms^{-1} i TMP od 240 ± 10 kPa (Vadi and Rizvi, 2001).

Kako bi se prevazišao problem opadanja fluksa permeata usled prljanja, u poslednje vreme primenjuju se različite tehnike kao što su nestacionarni mlazevi, pulzaciono proticanje i vibracije (Kyllönen et al., 2005). U iste svrhe mogu se koristiti filteri sa magnetnim ili električnim poljem, što zahteva veliki utrošak energije i probleme u slučaju smeša sa jonima.

Smanjenje prljanja kod mikrofiltracije obranog mleka sa ciljem smanjenja broja bakterija, može se postići i tzv. "backflushing" tehnikom koja predstavlja povratno ispiranje kombinovano sa prolazom napojne smeše kroz spoljnu stranu membrane gde su pore većeg prečnika. Na ovaj način smanjeno je prljanje pri malim brzinama proticanja (0,5-1,0 ms^{-1}), ali je cena ovakvog načina izvođenja procesa visoka (Guerra et al., 1997).

Primenom rotirajućeg diska u neposrednoj blizini membrane, kao i upotrebom vibracionog modula, takođe se mogu ostvariti veće vrednosti fluksa permeata u odnosu na klasično izvođenje "cross-flow" filtracije. Stavljanjem pregrada na rotacioni disk dodatno se povećava fluks 56 % (Ding et al., 2002), dok se u slučaju primene vibracije ostvaruje stabilan fluks pri

faktoru koncentrisanja obranog mleka jednakom 2. Ograničena primena ovakvih rešenja sastoji se u složenosti samog sistema kao i veoma visokoj ceni opreme.

Iako se ultrazvučni talasi koriste u nekoliko oblasti hemijske industrije kao što je ekstrakcija, emulzifikacija, degazacija, ultrazvučni membranski filteri još nisu našli primenu. Izvođenjem ultrafiltracije surutke uz primenu ultrazvuka postižu se 20 do 70 % veći fluksevi. Potrošnja energije je u ovom slučaju bila relativno niska, oko 2W po litri tečnosti, ali ima značajnog ekonomskog uticaja u slučaju povećanja kapaciteta. Takođe je utvrđeno da kontinuirana niska frekvencija pozitivno utiče na povećanje fluksa, za razliku od pulsne visoke frekvencije (Muthukumar et al., 2005).

Pored različitih dinamičkih rešenja postoje i rešenja koja su po svojoj prirodi statička, a sastoje se u tome da se u membranu ili membranski modul insertuju različiti geometrijski oblici kako bi se promenila hidrodinamika i povećao fluks (Krstić et al., 2002; Krstić et al., 2003; Vatai and Tekić, 1995). Postavljanjem helikoidnih umetaka i umetaka u obliku cilindra u membranu, postiže se povećanje fluksa od 7 puta, ali je i pad pritiska bio srazmeran (Bellhouse et al., 2001). Insertovanjem Kenix statičkih miksera u mikrofiltracione membrane koje su korišćenje za koncentrisanje obranog mleka postignuto je poboljšanje fluksa pri 5 puta manjim brzinama. Povećanja fluksa od preko 300% ostvarena su pri gubitku snage od približno 1 W. Potrošnja energije tokom upotrebe statičkog mešača u uslovima kako recirkulacije tako i koncentrisanja napojne smeše značajno je smanjena (Krstić et al., 2001; Krstić et al., 2000; Krstić et al., 2002; Krstić et al., 2003). Statički promotori turbulencije imaju prednost u odnosu na dinamičke jer se mogu upotrebljavati u širokom opsegu protoka i viskoziteta, jednostavno se instaliraju, zanemarljivo habaju, investicioni i troškovi održavanja su niži kao i troškovi izvođenja procesa (Krstić, 2003).

REGENERACIJA FLUKSA ČIŠĆENJEM MEMBRANA

Bez obzira na korišćenje ovih tehnika, fluks u većini membranskih procesa opada na neprihvatljivo niske vrednosti te ga je potrebno regenerisati čišćenjem membrana u određenoj

nim vremenskim intervalima. Čišćenje je neophodan postupak kako bi se održala permeabilnost i selektivnost membranskih procesa odnosno treba da obezbedi uklanjanje naslaga i regeneriše normalan kapacitet rada i separacione karakteristike opreme (D'Souza and Mawson, 2005). Određivanje najbolje procedure čišćenja predstavlja metod probe i greške, što je veoma dugotrajan i skup postupak (Strugholtz et al., 2005). Takođe, procedura čišćenja membrana, preporučena od strane proizvođača membrana, ne mora biti optimalna za određenu primenu i obično je ista za sve, npr. keramičke membrane nezavisno od veličine pora i parametara procesa u kome se koriste. Dok sa druge strane, izbor metode čišćenja zavisi od konfiguracije modula, hemijske i fizičke izdržljivosti membrane i pomoćne opreme, a u najvećoj meri od prirode prljanja (Bartlett et al., 1995). U cilju optimizacije procesa čišćenja potrebna su detaljna istraživanja koja uključuju određivanje: efikasnosti čišćenja, potrošnju hemikalija, vode i energije i uticaja na životnu sredinu. Uspesna optimizacija procesa čišćenja membrana u mnogome zahteva i razumevanje i identifikaciju kompleksnih interakcija između naslaga proteina i površine membrane.

U cilju regeneracije fluksa, membrane se čiste hidrauličkim, hemijskim ili mehaničkim metodama, a u nekim slučajevima i biološkom metodom. Hidrauličko čišćenje se izvodi pomoću vode i/ili vazduha, dok se hemijsko čišćenje izvodi pomoću hemijskih agenasa. Obično se membrane čiste u samim modulima na liniji za filtraciju i ovakav tip čišćenja naziva se "cleaning in-place" (Blanpain-Avet et al., 2004). Generalno, hemijsko čišćenje može se izvoditi na nekoliko načina: sa tokom sredstva za čišćenje usmerenim suprotno od smera toka permeata ("back flush") i sa tokom u smeru toka permeata ("forward flush"), kao i potapanjem u sredstvo za čišćenje (te Poele and van der Graaf, 2005). Najčešće se primenjuje kombinacija hidrauličkog i hemijskog čišćenja.

Pored hemijskog čišćenja, primenjuju se metode koje omogućuju i dejstvo mehaničkih sila kao što su vibracija, rotacija, a u novije vreme se koriste i ultrazvučni talasi, jer se iste mehaničke sile koriste i za povećanje fluksa tokom same filtracije. Da bi se povećala efikasnost procesa čišćenja u pogledu smanjenja potrošnje vode i hemijskog agensa kao i perioda čiš-

ćenja, celokupan proces čišćenja membrane je podeljen u dva osnovna koraka: ispiranje (hidrauličko čišćenje) i čišćenje (hemijsko, mehaničko ili kombinacija) (Cabero et al., 1999).

Ispiranje

Ispiranje vodom izvodi se kako nakon same filtracije, tako i nakon hemijskog čišćenja. Ispiranje vodom nakon filtracije obezbeđuje uklanjanje najvećeg dela naslaga sa površine membrane koje nisu jako vezane za membranu kao što je sloj koncentracione polarizacije. Sem toga, na ovaj način membrana se priprema za sledeći korak hemijskog čišćenja. Čišćenje membrane tokom ispiranja sastoji se u mehaničkom delovanju i karakteristikama vode da je univerzalan rastvarač. Naime, uklanjanje naslaga tokom ispiranja odvija se na dva načina: kao rezultat smicanja koje nastaje proticanjem vode i rastvaranjem naslaga vodi (Bansal et al., 2006).

Ispiranjem destilovanom vodom može se ukloniti značajna količina proteina nataloženih na keramičkim ultrafiltracionim i polimernim mikrofiltracionim membranama (Bansal et al., 2006; Matzinos and Álvarez, 2002). Ipak, ispiranje nije bilo uspešno pri uklanjanju naslaga formiranih unutar pora. Rezultat je maksimalno postignuta regeneracija fluksa od 6% fluksa čiste vode (FČV) (Bansal et al., 2006; Popović et al., 2008; Popović et al., 2008).

Tokom ispitivanja uticaja radnih uslova (način rada, temperatura, TMP i "cross-flow" brzine) na ispiranje keramičke ultrafiltracione membrane zaprljane proteinima surutke pokazano je da su temperatura i TMP promenljive koje najviše utiču na efikasnost ispiranja [9]. Korišćenjem vode temperature 50°C dobijena je veća efikasnost ispiranja u odnosu na vodu temperature 20°C, prvenstveno zbog bolje rastvorljivosti proteina na višoj temperaturi.

Ispiranje vodom nakon čišćenja membrane hemijskim agensima obezbeđuje uklanjanje hemijskog agensa kao i ostataka naslaga, koje su razbijene dejstvom hemijskog agensa, i postizanje neutralne pH vrednosti. Takođe je izvestan broj autora pokazao da se ispiranjem posle čišćenja može značajno povećati fluks bilo zbog uklanjanja rastvorljivih materija ili desorpcije naslaga i aditiva (Bartlett et al., 1995; Munioz-Aguado et al., 1996). Treba napomenuti da voda

mora biti dobrog kvaliteta (demineralizovana ili filtrirana) kako ne bi došlo do dodatne kontaminacije tokom samog čišćenja i ispiranja usled prisustva mikroorganizama, organskih, ali i mineralnih materija (D'Souza and Mawson, 2005). Utrošak vode i dužina ispiranja zavisi od veličine postrojenja odnosno površine membrana.

Čišćenje hemijskim agensima

S obzirom da ispiranje vodom nakon filtracije nije dovoljan korak, potrebno je primeniti hemijsko čišćenje kako bi se postigao željeni nivo fluksa. U praksi se regeneracija fluksa postiže pomoću brojnih hemijskih i fizičkih interakcija između hemijskog agensa i naslaga na površini membrane.

Adekvatan hemijski agens treba da ima sledeće karakteristike (D'Souza and Mawson, 2005):

- da sadrži optimalnu količinu aktivne komponente dobre rastvorljivosti i da se lako može isprati vodom;
- potrebno je da dobro rastvara materije koje uzrokuju prljanje i održava ih rastvorenim kako ne bi došlo do ponovnog prljanja membrane;
- da ne peni ili vrlo malo peni;
- kompatibilnost sa materijalom membrane i ostatkom opreme kako ne bi došlo do oštećenja;
- dobra stabilnost u vremenu i u kontaktu sa naslagama i drugim deterdžentima;
- da ima dezinfekciono dejstvo;
- da ima sposobnost da očisti membranu u kratkom vremenskom intervalu i obezbedi što duži vek membrane (Argüello et al., 2005).

Komercijalno su dostupni različiti hemijski agensi za čišćenje membrana. Pre svega koriste se jednostavna hemijska sredstva kao što su baze (NaOH, KOH) i kiseline (azotna, fosforna), potom se koriste sredstva za čišćenje sa enzimskom bazom poput proteaze i/ili lipaze koja mogu biti neutralne, kisele ili bazne prirode. Takođe su dostupne i razne vrste deterdženata sa površinski aktivnim materijama (PAM) koji takođe mogu sadržati i enzime. Izbor najboljeg hemijskog agensa pre svega zavisi od sastava napojne smeše (materijala koji se filtrira) i prirode nataloženog materijala. Uticaj parametara na efikasnost čišćenja kao što su pH, koncentracija, vreme čišćenja i radni uslovi (temperatura, TMP, "cross-flow" brzina) takođe mora biti razmotren (Kazemimoghadam and Mohammadi, 2007).

Bazni hemijski agensi deluju tako da hidrolizuju i rastvaraju proteine, dok kiseli uklanjaju neorganske soli, a samo u nekim slučajevima hidrolizuju makromolekule. Pokazalo se da rastvor NaOH-a obezbeđuje visoku regeneraciju fluksa, naročito prilikom čišćenja membrana zaprljanih proteinima surutke (Bartlett et al., 1995; Nigam et al., 2008; Popović, 2008; Popović et al., 2009). Bazni rastvori, pored toga što obezbeđuju visoku efikasnost, ne uzrokuju oštećenje keramičkih membrana nakon većeg broja ciklusa, što nije slučaj sa polietersulfonskim ili polivinilidien di-fluorid membranama (Blanpain-Avet et al., 2004; Makardij et al., 1999; Weis et al., 2003).

Bird i Bartlett (2002) su ispitivali uticaj koncentracije natrijum hidroksida, temperature, "cross-flow" brzine i TMP na efikasnost čišćenja metalne i keramičke mikrofiltracione membrane zaprljane koncentratom proteina surutke. Pokazali su da koncentracija i temperatura imaju najveći uticaj na regeneraciju fluksa. Pri temperaturi od 20°C regeneracija fluksa je iznosila samo 20% vrednosti FČV dok je sa 50°C povećana na 80% FČV. Na ekstremnim temperaturama (iznad 50°C) novonastale protein-protein interakcije dovode do taloženja, solidifikacije i formiranja gela čime je onemogućeno efikasnije uklanjanje proteina. Takođe je ustanovljen koncentracioni optimum od 0,2% mas. rastvora NaOH-a pri čemu se postiže maksimalna regeneracija fluksa za disk membranu od nerđajućeg čelika, dok je za keramičku membranu koncentracioni optimum 0,4% mas. rastvora NaOH-a. Povećanje brzine protoka ne doprinosi značajnijem poboljšanju regeneracije fluksa. Fluks brzo raste samo u prvih nekoliko minuta pošto se tada uklanjaju naslage sastavljene uglavnom od β -laktoglobulina lako rastvorljivog u NaOH.

Kada su u pitanju cevne keramičke membrane takođe postoji mogućnost smanjenja koncentracije NaOH i iznosi 0,4% za membranu od 50 nm sa regeneracijom fluksa od preko 95% i 0,6% za membranu od 200 nm gde je regeneracija fluksa niska, svega 87%, ali ni povećanje koncentracije ne daje rezultate (Popović, 2008; Popović et al., 2008). Rezultati ispitivanja Nigama i sar. (2008) na polisulfonskoj ultrafiltracionoj membrani takođe pokazuju postojanje optimalne koncentracije NaOH-a koja iznosi 0,2% mas. Naslage proteina pod dejstvom

NaOH-a bubre i formiraju strukturu kojom se postiže najveća regeneracija fluksa. Rastvor veće koncentracije najverovatnije uvećava bubrenje naslaga proteina uzrokujući dodatno blokiranje pora i manju regeneraciju fluksa (Bird and Bartlett, 2002). Bansal i sar. (2006) smanjenje efikasnosti čišćenja sa porastom koncentracije NaOH-a objašnjavaju i formiranjem sloja gela i povećanim viskozitetom rastvora veće koncentracije.

Nasuprot efektu baznih rastvora, utvrđeno je da se čišćenje kiselim agensima negativno odražava na vrednost fluksa permeata naročito kada se radi o čišćenju proteina surutke (Bartlett et al., 1995; Blanpain-Avet et al., 2004; Mohammadi et al., 2002). S obzirom da ne reaguju sa mastima i proteinima, kiseline generalno nemaju pozitivan efekat. Međutim, kiseli agensi se koriste za uklanjanje precipitata neorganskih soli (Ca kazeinatni precipitat) i njihova upotreba je neophodna, ali se teži zameni agresivne azotne i fosforne kiseline limunskom koja se lako ispira i ne uzrokuje korodiranje prateće opreme (D'Souza and Mawson, 2005).

Savremena hemijska industrija nudi veoma veliki broj komercijalnih deterdženata koji sadrže uglavnom površinski aktivne materije. Verovatno najpoznatiji komercijalni deterdženti koji se koristi u industriji mleka poznati pod nazivom Ultrasil, nudi kompanija Henkel (Nemačka). Komercijalni deterdženti često pored PAM sadrže i enzime, proteolitičke i/ili lipolitičke, a mogu biti kisele, bazne ili neutralne prirode. Mehanizam dejstva površinski aktivnih materija se sastoji u tome da povećavaju kvašljivost i promovišu kontakt sa naslagama u membrani. Takođe učestvuju i u rastvaranju proteinske materije i sprečavaju ponovno taloženje. Učestvuju i u promeni naelektrisanja površine, a mogu uticati na hidrofilitnost membrane npr. Polisulfonske (D'Souza and Mawson, 2005; Mohammadi et al., 2002).

Uticaj koncentracije enzima, PAM-a i enzimskog deterdženta na čišćenje membrana zaprljanih proteinima ispitivali su Muñoz-Aguado i sar. (2006) i Argüello i sar. (2005). Uočena je optimalna koncentracija enzima kao i PAM koju je potrebno odrediti za svaki sistem jer aktivnost enzima zavisi od odnosa enzim-supstrat i prirode nataloženog materijala. Dalje povećanje koncentracije, iznad optimalne, samo doprinosi daljem prljanju membrane. Takođe, s obzirom da KPS sadrži po-

red proteina i druga jedinjenja, poput masti, prilikom čišćenja pored enzima, neophodnog da raskine veze proteina u sloju naslaga, od vitalnog značaja je i upotreba PAM-a kojima se uklanjaju lipidi sa površine membrane. Optimalan opseg pH, 9,6-10,2 je identičan optimalnoj vrednosti pH za hidrolizu proteina čime su potvrdili da je enzimska hidroliza proteina najodgovornija za čišćenje membrana. Najveća efikasnost čišćenja postignuta je za 20 minuta što se povezuje sa vremenom potrebnim za hidrolizu proteina. Takođe je potrebno napomenuti da temperatura enzimskog rastvora ne sme biti visoka (za proteolitičke enzime iznad 50°C) kako ne bi došlo do denaturacije enzima, čime se značajno umanjuje njihova aktivnost a samim tim i efikasnost čišćenja (Argüello et al., 2005).

U nekim istraživanjima je potvrđeno da kombinacije hemijskih agenasa daju najefikasniju regeneraciju fluksa. Tako je kombinacijom EDTA, SDS i NaOH obezbeđena 100% regeneracija fluksa polisulfonske membrane zaprljane proteinima mleka (Kazemimoghdam and Mohammadi, 2007), dok je čišćenje polimernih membrana u vidu spiralnih vlakana zaprljanih koncentratom proteina surutke bilo najefikasnije korišćenjem kombinacije čišćenja baznim, enzimskim i zatim ponovo baznim sredstvom. Pri tome se kao efikasan bazni deterdžent pokazala kombinacija P3-Ultrasil 10 i P3-Ultrasil 02, a kao enzimski P3-Ultrasil 67 + P3-Ultrasil 69 (Lipnizki et al., 2005).

Takođe je bitno napomenuti da sem TMP, temperature ili brzine proticanja, veoma bitan uticaj na efikasnost čišćenja membrana ima i vreme. Korišćenje optimalnog vremena čišćenja membrane može uticati na izbor ostalih uslova. Pri hemijskom čišćenju neophodno je neko vreme kako bi hemijski agens izreagovao sa precipitovanim materijalom te postoji donja granica ispod koje se ne može ići sa smanjivanjem vremena. Kako je pretpostavljeno da je regeneracija fluksa na samom početku čišćenja najveća, otkriveno je da ni veoma dugo vreme nema pozitivan efekat na povećanje fluksa (Mohammadi et al., 2002).

Generalno, hemijsko čišćenje membrana zaprljanih materijama organskog porekla, kao što su proteini, obezbeđuje visoku regeneraciju permeabilnosti i selektivnosti membrana. Primetno je da veliki broj parametara (priroda napojne smeše, priroda i

koncentracija hemijskog agensa, vreme, itd.) veoma utiče na regeneraciju fluksa, tako da je od vitalnog značaja identifikovati i optimizovati ih za određenu primenu.

Kako bi se unapredila procedura čišćenja, takođe se kontakt između sredstava za čišćenje i proteinskih naslaga može ostvariti primenom različitih mehaničkih sila poput vibracija, rotacija ili ultrazvuka. U novije vreme istražuje se mogućnost korišćenja ultrazvučnih talasa kako bi se ostvarilo što bolji kontakt između hemijskih agenasa i naslaga proteina. Kombinacija površinski aktivnih materija poput SDS i ultrazvuka obezbeđuje efikasniju regeneraciju fluksa u poređenju sa čišćenjem ultrazvukom i vodom (Muthukumaran et al., 2004). Dalje je ustanovljeno da i NaOH ima sinergističko dejstvo sa ultrazvukom u slučaju čišćenja cevnih keramičkih membrana ali obezbeđuje nižu regeneraciju fluksa u poređenju sa kombinacijom P3-ultrasil deterdženta i ultrazvuka (Popović et al., 2008). U ovom radu je takođe potvrđeno da se rastvorom relativno male koncentracije od 0,25% (mas) P3-ultrasil 67 + 0,4% (mas) P3-ultrasil 69 postiže praktično potpuna regeneracija fluksa izvođenjem čišćenja u stacionarnim uslovima uz primenu ultrazvuka. Ovakvo izvođenje čišćenja je ekonomski isplativije u odnosu na čišćenje primenom ultrazvuka uz proticanje rastvora za čišćenje pri odgovarajućem TMP i brzini proticanja.

ZAKLJUČAK

Membranski separacioni procesi nalaze primenu u velikom broju procesa koji se primenjuju u industriji mleka. Predviđa se značajno širenje instaliranih površina membrana bez obzira na negativne karakteristike vezane za opadanje fluksa usled intenzivnog prljanja. Savremena nauka intenzivno radi na pronalaženju praktičnih rešenja kako bi se unapredio proces membranske filtracije. Sam proces filtracije može se unaprediti primenom dodatnih sila poput vibracija ili ultrazvuka kao dinamičkih metoda. Na povećanje fluksa može se uticati i promenom hidrodinamike u modulu ili samoj membrani insertovanjem različitih geometrijskih oblika. Insertovanje geometrijskih oblika može značajno uticati na povećanje fluksa pri čemu je ekonomski isplativije, a tehnički jednostavnije rešenje u odnosu na dinamičke metode.

Ipak, prljanje membrana je za sada neizbežna pojava kao i njihovo čišćenje. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da se i procedura čišćenja može unaprediti sa aspekta potrošnje hemikalija. Pored toga, u nekim slučajevima kada se regeneracija fluksa ne može postići u jednom ciklusu čišćenja, postoji potreba za primenom i drugih metoda poput ultrazvuka koje obezbeđuju bolji kontakt reaktanta i naslaga proteina. Uz primenu ultrazvuka moguće je dodatno smanjiti količinu hemijskih sredstava. Ovo smanjenje ima uticaja na povećanje efikasnosti procesa i pozitivno se odražava na zaštitu životne sredine.

LITERATURA

- Al-Akoum, O., Ding, L., Chotard-Ghodsni, R., Jaffrin, M. Y. and Gesan-Guiziu, G.: Casein micelles separation from skimmed milk using a VSEP dynamic filtration module. *Desalination* 144 (2002) 325-330.
- Argüello, M. A., Alvarez, S., Riera, F. A. and Alvarez, R.: Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins. *Separation and Purification Technology* 41 (2005) 147-154.
- Bansal, B., Al-Ali, R., Mercade-Prieto, R. and Chena, X. D.: Rinsing and cleaning of alfa-lactalbumin fouled MF membranes. *Separation and Purification Technology* 48 (2006) 202-207.
- Bartlett, M., Bird, M. R. and Howell, J. A.: An experimental study for the development of a qualitative membrane cleaning model. *Journal of Membrane Science* 105 (1995) 147-157.
- Bellhouse, B. J., Costigan, G., Abhinava, K. and Merry, A.: The performance of helical screw-thread inserts in tubular membranes. *Separation and Purification Technology* 22-23 (2001) 89-113.
- Bird, M. R. and Bartlett, M.: Measuring and modelling flux recovery during the chemical cleaning of MF membranes for the processing of whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering* 53 (2002) 143-152.
- Blanpain-Avet, P., Migdal, J. F. and Benezech, T.: The effect of multiple fouling and cleaning Cycles on a Tubular Ceramic microfiltration Membrane Fouled with a Whey Protein Concentrate: Membrane performance and cleaning efficiency. *Food and Bioproducts Processing* 82 (2004) 231-243.
- Cabero, M. L., Riera, F. A. and Alvarez, R.: Rinsing of ultrafiltration ceramic membranes fouled with whey proteins: effects on cleaning procedures. *Journal of Membrane Science* 154 (1999) 239-250.
- Carić, M., Akkerman, J. C., Milanović, S., Kentish, S. E. and Tamime, A. Y.: Technology of Evaporators, Membrane Processing and Dryers. Chapter 3.: in *Dairy Powders and Concentrated Products*, ed. Tamime, A. Y., Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom (2009) pp. 99-148.
- Carić, M. D., Milanović, S. D., Krstić, D. N. and Tekić, M. N.: Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. *Journal of Membrane Science* 165 (2000) 83-88.
- Carić, M. D., Tekić, M. N., Vatai, G. N. and Milanović, S.: Ultrafiltration of Reconstituted Skim Milk in Hollow Fibers Plate and Frame Modules. *Acta Alimentaria* 24 (1995) 241-250.
- D'Souza, N. M. and Mawson, A. J.: Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (2005) 125-134.
- D'Souza, N. M.: Influence of Operating Conditions on Lifetime Performance of Membrane Systems in Whey Processing. The University of New South Wales, 2005.
- Ding, L., Al-Akoum, O., Abraham, A. and Jaffrin, M. Y.: Milk protein concentration by ultrafiltration with rotating disk modules. *Desalination* 144 (2002) 307-311.
- Guerra, A., Jonsson, G., Rasmussen, A., Nielsen, E. W. and Edelman, D.: *International Dairy Journal* 7 (1997) 849-861.
- Kazemimoghadam, M. and Mohammadi, T.: Chemical cleaning of ultrafiltration membranes in the milk industry. *Desalination* 204 (2007) 213-218.
- Krstić, D. M.: Pобољшanje "cross-flow" mikrofiltracije upotrebom statičkog mešača kao promotora turbulencije. University of Novi Sad, 2003.
- Krstić, D. M., Radenović, R. N., Carić, M. D., Milanović, S. D. and Tekić, M. N.: Uticaj promotora turbulencije na prljanje membrane tokom unkrnsne mikrofiltracije. *Hemijaska industrija* 55 (2001) 1-7.
- Krstić, D. M., Radenović, R. N., Tekić, M. N., Carić, M. D. and Milanović, S. D.: Povećanje fluksa upotrebom promotora turbulencije tokom mikrofiltracije obranog mleka. *Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 11 (2000) 22-27.
- Krstić, D. M., Tekić, M. N., Carić, M. D. and Milanović, S. D.: The effect of turbulence promoter on cross-flow microfiltration of skim milk. *Journal of Membrane Science* 208 (2002) 303-314.
- Krstić, D. M., Tekić, M. N., Carić, M. D. and Milanović, S. D.: Kenics Static Mixer as Turbulence Promoter in Cross-Flow Microfiltration of Skim Milk. *Separation Science and Technology* 38 (2003) 1549-1560.
- Kyllönen, H. M., Pirkonen, P. and Nyström, M.: Membrane filtration enhanced by ultrasound: a review. *Desalination* 181 (2005) 319-335.
- Lipnizki, J., Casani, S. and Jonsson, G.: Optimisation of ultrafiltration of a highly viscous protein solution using spiral-wound modules. *Desalination* 180 (2005) 15-24.
- Makardij, A., Chen, X. D. and Farid, M. M.: Microfiltration And Ultrafiltration Of Milk: Some Aspects Of Fouling And Cleaning. *Trans IChemE* 77 (1999) 107-113.
- Matzinos, P. and Alvarez, R.: Effect of ionic strength on rinsing and alkaline cleaning of ultrafiltration inorganic membranes fouled with whey proteins. *Journal of Membrane Science* 208 (2002) 23-30.
- Mohammadi, T., Madaeni, S. S. and Moghadam, M. K.: Investigation of membrane fouling. *Desalination* 153 (2002) 155-160.
- Mourouzis-Sourouzis, S. A. and Karabelas, A. J.: Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes - Pressure effects. *Journal of Membrane Science* 282 (2006) 124-132.
- Munioz-Aguado, M. J., Wiley, D. E. and Fane, A. G.: Enzymatic and detergent cleaning of a polysulfone membrane fouled with BSA and whey. *Journal of Membrane Science* 117 (1996) 175-187.
- Muthukumaran, S., Kentish, S. E., Ashokkumar, M. and Stevens, G. W.: Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 258 (2005) 106-114.
- Muthukumaran, S., Yang, K., Seuren, A., Kentish, S. E., Ashokkumar, M., Stevens, G. W. and Grieser, F.: The use of ultrasonic cleaning for ultrafiltration membranes in the dairy industry. *Separation and Purification Technology* 39 (2004) 99-107.
- Nigam, M. O., Bansal, B. and Chen, X. D.: Fouling and cleaning of whey protein con-

- centrate fouled ultrafiltration membranes. *Desalination* 218 (2008) 313-322.
- Ogunbiyi, O. O., Miles, N. J. and Hilal, N.: The effects of performance and cleaning cycles of new tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a model yeast suspension. *Desalination* 220 (2008) 273-289.
- Pedersen, P. J.: *Bulletin of IDF* 9201 (1992) 33-50.
- Popović, S. S.: Regeneracija fluksa pri membranskoj filtraciji proteina surutke. Univerzitet Novi Sad, 2008.
- Popović, S. S., Lukić, N. L., Jaramazović, Z. and Šijački, I. M.: Čišćenje membrana u industriji mleka primenom ultrazvuka. *Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 19 (2008) 59-65.
- Popović, S. S., Milanović, S., Iličić, M., Djurić, M. and Tekić, M. N.: Rinsing and cleaning of ceramic membranes fouled by whey proteins. *Proceedings of 35th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranske Matliare, Slovakia*, (2008).
- Popović, S. S., Milanović, S., Iličić, M., Nataša, L. and Ivana, Š.: Flux recovery of ceramic tubular membranes fouled with whey proteins: Some aspects of membrane cleaning. *Acta Periodica Technologica* 39 (2008) 101-109.
- Popović, S. S., Tekić, M. N. and Djurić, M.: Kinetic models for alkali and detergent cleaning of ceramic tubular membrane fouled with whey proteins. *Journal of Food Engineering* 94 (2009) 307-315.
- Ramachandra Rao, H. G.: Mechanisms of flux decline during ultrafiltration of dairy products and influence of pH on flux rates of whey and buttermilk. *Desalination* 144 (2002) 319-324.
- Strugholtz, S., Sundaramoorthy, K., Panglisch, S., Lerch, A., Brugger, A. and Gimbel, R.: Evaluation of the performance of different chemicals for cleaning capillary membranes. *Desalination* 179 (2005) 191-202.
- te Poele, S. and van der Graaf, J.: Enzymatic cleaning in ultrafiltration of wastewater treatment plant effluent. *Desalination* 179 (2005) 73-81.
- Vadi, P. K. and Rizvi, S. S. H.: Experimental evaluation of a uniform transmembrane pressure crossflow microfiltration unit for the concentration of micellar casein from skim milk. *Journal of Membrane Science* 189 (2001) 69-82.
- Vatai, G. N. and Tekić, M. N.: Convection promotion and gel formation in an ultrafiltration process. *Chemical Engineering Communications* 132 (1995) 141-149.
- Weis, A., Bird, M. R. and Nyström, M.: The chemical cleaning of polymeric UF membranes fouled with spent sulphite liquor over multiple operational cycles. *Journal of Membrane Science* (2003) 67-79.

SUMMARY

IMPROVEMENT OF MEMBRANE PROCESSES APPLIED IN THE DAIRY INDUSTRY

Svetlana S. Popović, Miodrag N. Tekić

University of Novi Sad, Faculty of Technology

Pressure driven membrane processes are widely employed in the dairy industry. Efficiency of membrane processes is affected by the flux reduction due to the membrane fouling and by frequent membrane cleaning. During ultrafiltration and microfiltration of milk systems permeate flux is influenced by the fouling caused by adsorption of proteins at the membrane surface and in the pores of membrane. The modern science is focused on the finding solutions in order to reduce fouling during filtration and improve membrane cleaning which would make membrane filtration more efficient. This manuscript provides a review of key techniques involved in fouling reduction during membrane processes applied in the dairy industry with newest achievements in the improvement of membrane cleaning process.

Key words: microfiltration • ultrafiltration • milk proteins • whey proteins • fouling • cleaning

MIRELA D. ILIČIĆ
 SPASENIJA D. MILANOVIĆ
 MARIJANA Đ. CARIĆ
 MIRJANA S. ĐURIĆ
 MIODRAG N. TEKIĆ
 VLADIMIR V. VUKIĆ
 KATARINA G. DURAKOVIĆ
 SVETLANA S. POPOVIĆ

Univerzitet u Novom Sadu,
 Tehnološki fakultet Novi Sad

NAUČNI RAD

UDK: 637.146.1:637.146.3:637.047

PRIMENA KOMBUHE U TEHNOLOGIJI FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA*

U radu je ispitan tok fermentacije mleka uz primenu tri vrste inokuluma čajne gljive (kombuhe): kultivisan na crnom čaju zaslađen saharozom (I), koncentrovan primenom mikrofiltracije (MFI) i koncentrovan uparavanjem (UPI). Sadržaj produkata metabolizma (laktose, galaktoze, glukoze, fruktoze, mlečne i sirćetne kiseline i etanola) i mikrostruktura funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka ispitani su nakon proizvodnje.

Na osnovu rezultata analize utvrđeno je da fermentacija mleka uz primenu 10% inokuluma čajne gljive traje 570 minuta, odnosno 90 minuta kraće nego pri proizvodnji funkcionalnog napitka dobijenog primenom 1,5% uparenog inokuluma.

Sadržaj laktose u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima tokom fermentacije manji je za 19,5% (uzorci 10% I i 1,5% UPI) i 32% u funkcionalnom fermentisanom mlečnom napitku sa 10% inokuluma čajne gljive koncentrovanog mikrofiltracijom. Sadržaj L-mlečne kiseline u proizvedenim varijantama prosečno iznosi 0,5 g/100g, dok je sadržaj sirćetne kiseline u svim napicima niži od 0,1 g/100g. Funkcionalni napitak 1,5%UPI sadrži najmanje etanola, dok uzorak 10% MFI ima najveću koncentraciju etanola - 0,06 g/100g.

Funkcionalni fermentisani napitak proizveden sa 10% inokuluma čajne gljive ima bolje fizičko-hemijske, tehnološke i strukturne karakteristike od uzoraka dobijenih primenom inokuluma koncentrovanog uparavanjem i mikrofiltracijom.

Ključne reči: funkcionalni fermentisani mlečni proizvodi • kombuha • tehnologija • kvalitet

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
 Mr Mirela Iličić, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
 tel.: 021/485-3705; fax.: 021/450-413
 e-mail: panim@uns.ac.rs

UVOD

Poznato je da se pored bakterija mlečne kiseline i kvasci koriste za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka kao što su kefir i kumis (Tamime, Robinson, 2004; Tamime, 2006; Dimiterlou i sar., 2008). Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da vrsta simbioze kvasaca i bakterija sirćetne kiseline poznata kao čajna gljiva može da se primeni kao nekonvencionalni starter u tehnologiji fermentisanih mlečnih napitaka. Metabolička aktivnost čajne gljive ispitivana je na različitim supstratima: crni i zeleni čaj zaslađen saharozom, koka kola, pivo, vino, surutka, pri čemu je utvrđeno da nastaje veliki broj produkata metabolizma koji imaju širok spektar profilaktičkih i terapijskih svojstava (Reiss, 1994; Milanović i sar., 2008; Iličić i sar., 2009; Greenwalt, Steinkraus, Ledford, 2000). U brojnim naučnim radovima analizirani su različiti faktori koji utiču na aktivnost čajne gljive: temperatura, uslovi proizvodnje, sadržaj odgovarajućih ugljenih hidrata, mikrobiološke karakteristike i dr. (Malbaša i sar., 2008; Cvetković i sar., 2008; Belloso-Morales, Hernandez - Sanchez, 2003; Jaziri i sar., 2009; Jajabalan, Marimuthu, Swaminthan, 2007; Malbaša i sar., 2009). Primenu čajne gljive u tehnologiji mleka ispitivali su Lončar i sar. (2001), Milanović i sar. (2002), Malbaša i sar. (2008) koji su konstatovali da proces fermentacije traje duže nego pri proizvodnji klasičnog jogurta (sa tradicionalnom starter kulturom) zbog specifičnog mikrobiološkog sastava inokuluma i složenog sastava mleka (koje čini laktosa, proteini, mlečna mast, minerali i vitamini).

Pri tome, vrsta, hemijske i mikrobiološke karakteristike inokuluma čajne gljive direktno utiču na tok i vreme fermentacije mleka, biohemijske procese tokom proizvodnje, kao i fizičko-hemijske i senzorne karakteristike funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka (Malbaša i sar., 2009).

Cilj rada je da se ispita dinamika metaboličke aktivnosti tri vrste inokuluma čajne gljive u mleku sa 0,9% mlečne masti tokom proizvodnje i kvalitet funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka.

MATERIJAL I METODI

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka u laboratorijskim uslovima korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 0,9% mlečne masti proizvođača AD IMLEK Beograd, ogranak Novosadska mlekar, Novi Sad.

Za inokulaciju je korišćen: 1) inokulum čajne gljive (I), pripremljen po postupku opisanom u radu autora Lončar i sar. (2001); 2) inokulum čajne gljive koncentrisan membranskom filtracijom (MFI), korišćenjem aparature koja sadrži modul sa keramičkom membranom (200 nm) u obliku cevi i pri parametrima procesa (temperatura 25°C, nadpritisak na ulazu i izlazu modula 40 kPa i protoku 5 L/min) i 3) inokulum čajne gljive koncentrisan uparavanjem (UPI). Koncentrisanje inokuluma čajne gljive (suve materije 6,5%) vršeno je pod vakuumom na temperaturi 40°C deset puta do suve materije 68%.

Proizvodnja funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka

Mleko sa 0,9% mlečne masti za-grejana je na temperaturu 42°C. Po-tom su u tri čaše sa po 1000 mL mle-ka inokulisani pripremljeni inokulumi čajne gljive (I, MFI i UPI). Fermenta-cija je trajala do postizanja pH 4,5, nakon čega je formirani gel ohlađen na temperaturu 8°C i homogenizovan električnom mešalicom.

Proizvedeni su sledeći uzorci:

- uzorak 1: fermentisani mlečni napitak dobijen primenom 10% inokuluma čajne gljive (10% I);

- uzorak 2: fermentisani mlečni napi-tak dobijen primenom 10% inokuluma koncentrisanog primenom mikrofiltra-cije (10% MFI);

- uzorak 3: fermentisani mlečni napi-tak dobijen primenom 1,5% inokuluma koncentrisanog uparavanjem (1,5% UPI).

Analize

pH vrednost i oksidoredukcioni po-tencijal (Eh) inokuluma, mleka i fer-mentisanih mlečnih napitaka meren je korišćenjem laboratorijskog pH metra (VARIO pH SET, Nemačka).

U različitim inokulumima čajne glji-ve korišćenim za proizvodnju funkcio-nalnih napitaka analiziran je sadržaj: D-fruktoze i D-glukoze (K-FRUGL 11/05); sirćetne kiseline (K-ACETAT 11/05) i etanola (K-ETOH 03/06) ko-rišćenjem odgovarajućih enzimskih te-stova Megazyme, Irska (14). Sadržaj proizvoda reakcije meren je spektro-fometrijski na spektrofotometru tip T80 + UV/VIS Spectrometer (PG In-struments Ltd, Engleska). U funkcio-nalnim fermentisanim napicima pored navedenih enzimskih testova analiza-iran je sadržaj sledećih komponenata: D-mlečna i L-mlečna kiselina (K-DLA-TE 11/05) i laktoza i D-galaktoza (K-

LACGAR 12/05).

Sadržaj suve materije inokuluma čajne gljive određen je refraktometrijski (Abbeov refraktometar, Carl Zeiss).

Mikrostruktura uzoraka fermenti-sanih mlečnih napitaka ispitana je pri-menom "scanning" elektronske mikro-skopije (SEM), korišćenjem elektron-skog mikroskopa Joel, JSM-6460LV Scanning Electrone Microscope (Ox-ford, Instruments). Priprema uzorka funkcionalnih fermentisanih napitaka za SEM analizu obuhvatila je: fiksira-nje u 2,8% rastvoru glutaraldehida, dehidrataciju u rastvoru etanola razli-čitih koncentracija, ekstrakciju pomo-ću $CHCl_3$, dehidrataciju u apsolutnom etanolu tokom 24 časa, sušenje pri-menom uređaja (CPD 030 "Critical Point Dryer", BAL-TEC, Nemačka) u toku 1 časa i prevlačenje uzorka slo-jem zlata (BAL-TEC, SCD 005, Sput-ter coater) (Iličić, Carić, Milanović, 2006; Gavarić, Carić, Kalab, 1989; Sandoval-Castilla i sar., 2004). Pri-premljeni uzorci posmatrani su elek-tronskim mikroskopom primenom SEM tehnike pri naponu od 25 kV.

REZULTATI I DISKUSIJA

Karakteristike inokuluma čajne gljive

Fizičko-hemijske karakteristike ko-rišćenih inokuluma čajne gljive za pro-izvodnju funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka date su u tabeli 1.

pH vrednost, sadržaj suve materije i ugljenih hidrata značajno se razlikuje između inokuluma koncentrovanog uparavanjem i druga dva inokuluma: I i MFI. Evidentno je da je sadržaj glu-koze i fruktoze značajno viši u upa-

renom inokulumu nego u mikrofiltri-ranom i polaznom inokulumu čajne gljive. Sadržaj glukoze je niži u svim uzorcima u poređenju sa sadržajem fruktoze. Navedeni rezultati su u skla-du sa ranijim istraživanjima (Malbaša, 2009), gde je takođe konstatovano da mikroorganizmi prisutni u čajnoj gljivi koriste više fruktozu tokom metabolič-kih procesa nego glukozu. Sadržaj sir-ćetne kiseline je najviši u polaznom inokulumu čajne gljive i iznosi 0,338 g/100g, dok je najniži u inokulumu koncentrovanom uparavanjem 0,125 g/100g. Sadržaj etanola u analiziranim uzorcima iznosi redom: 0,040 g/100g (MFI), 0,044 g/100g (I) i 0,060 (UPI).

Fermentacija mleka

Proces fermentacije mleka primenom tri vrste inokuluma čajne gljive prikazan je na slici 1.

pH vrednost uzoraka nakon do-datka inokuluma opadne za oko 0,2-0,35 pH jedinica. Tokom narednih 5 sati fermentacije mleka pH vrednost je konstantna. Fermentacija mleka je najsporija tokom proizvodnje funkcio-nalnog fermentisanog mlečnog napit-ka dobijenog primenom uparenog ino-kuluma čajne gljive, dok je brža u dru-ga dva uzorka (10% MFI i 10% I). Že-ljena pH vrednost od 4,5 prvo se po-stigne u uzorku sa 10% I gde vreme fermentacije iznosi 570 minuta. Fer-mentacija mleka uz primenu 10% MFI je sporija za 40 minuta, a u uzorku do-bijenom primenom uparenog inoku-luma fermentacija je naspornija i traje 660 minuta. Navedene razlike u vre-menu i toku fermentacije rezultat su različitog hemijskog sastava korišće-nih inokuluma (tabela 1). Proces fer-mentacije mleka povezan je sa trans-formacijom laktoze u mlečnu kiselinu, pri čemu pH vrednost opada.

Tabela 1. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE INOKULUMA KOMBUHE
Table 1. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF KOMBUCHA INOCULUMS

Inokulum kombuhe Kombucha inoculum	pH	Eh (mV)	Suva materija/Total Solids (g/100g)	Glukoza/ Glucose (g/100g)	Fruktoza/ Fructose (g/100g)	Sirćetna kiselina/ Acetic acid (g/100g)	Etanol/ Ethanol (g/100g)
Polazni (I) Initial (I)	3,07	226	6,68	0,924	0,525	0,338	0,044
Koncentrisan mikrofiltracijom (MFI) Concentrated by microfiltration (MFI)	3,17	201,6	6,41	0,755	0,504	0,125	0,040
Koncentrisan uparavanjem (UPI) Concentrated by evaporation	2,57	256	65,96	6,37	5,16	0,178	0,060

Parametri procesa fermentacije direktno su uticali i na sadržaj laktoze u funkcionalnim fermentisanim mlečnim napicima (slika 2). Uzorak 1,5% UPI ima najveći sadržaj laktoze nakon proizvodnje - 4,14 g/100g. U navedenom uzorku je takođe fermentacija najduže trajala, odnosno laktoza se najsporije transformisala. Uzorak proizveden uz primenu 10% mikrofiltriranog inokuluma ima najniži sadržaj laktoze - 3,73 g/100g. Stepenn razgradnje laktoze direktno je povezan sa fizičko-hemijским karakteristikama inokuluma (tabela 1).

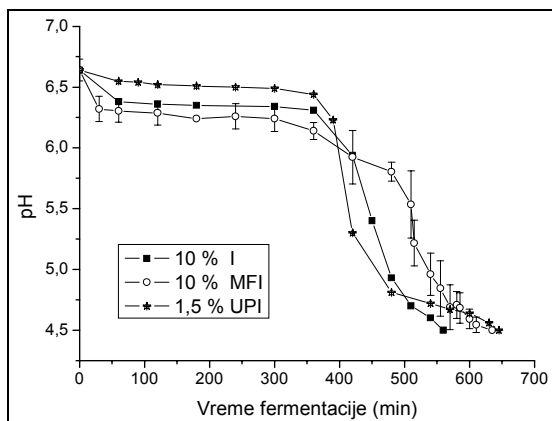
Razgradnjom laktoze nastaju monosaharidi glukoza i galaktoza, dok razgradnjom veoma male količine saharoze dobijaju se glukoza i fruktoza. Sadržaj navedenih komponenata se takođe veoma razlikuje u tri varijante funk-

cionalnog fermentisanog mlečnog napitka (slika 3).

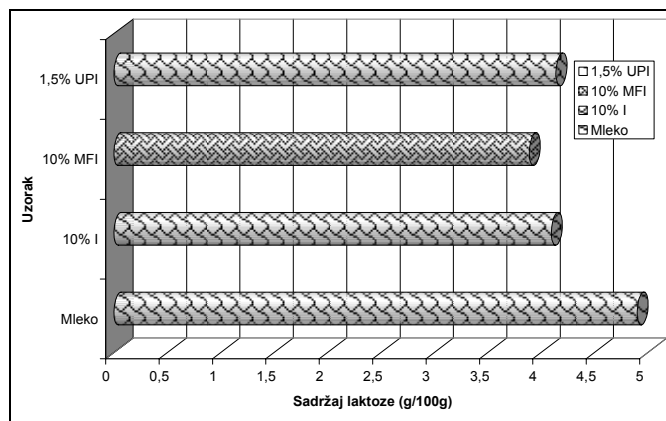
Sadržaj galaktoze je najviši u uzorku 10% MFI, pošto je u navedenom uzorku zabeležen najveći stepenn razgradnje laktoze. Sadržaj galaktoze u uzorcima 10% I i 1,5% UPI je za 50% niži nego u uzorku proizvedenom sa 10% inokuluma koncentrisanog mikrofiltracijom.

Sadržaj glukoze je najniži u uzorku 10% I (0,05 g/100g), dok u napitku proizvedenom sa inokulumom koncentrisanim uparavanjem, iznosi 0,220 g/100g. Sadržaj fruktoze u uzorcima 10% I i 1,5% UPI je niži od sadržaja glukoze, dok uzorak 10% MFI sadrži 50% više fruktoze od sadržaja glukoze. Znatno niži sadržaj fruktoze u odnosu na glukozu je rezultat povećanog afiniteta prisutnih mikroorgani-

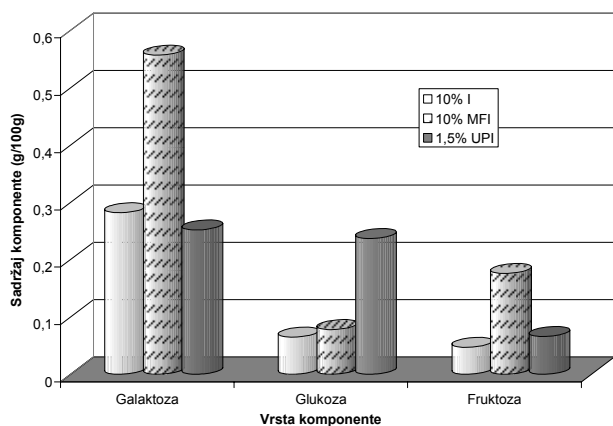
zama na fruktozi. Razgradnjom prikazanih monosaharida nastaje dominantno L-mlečna kiselina. Na slici 4 vidi se da uzorak proizveden inokulomom koncentrisanim uparavanjem sadrži najviše mlečne kiseline - 0,600 g/100g, dok je u uzorcima 10% MFI i 10% I niži i iznosi 0,510g/100g i 0,395 g/100g, respektivno. Sadržaj sirćetne kiseline ima suprotan trend, odnosno najviši je u uzorku 10% I, a najniži u uzorku 1,5% UPI. U uzorku 1,5% UPI najviši sadržaj L-mlečne kiseline je najverovatnije zbog znatno većeg sadržaja glukoze nego u ostala dva uzorka, dok je sadržaj sirćetne kiseline povezan sa količinom etanola koja nastaje kao rezultat aktivnosti kvasca. Sadržaj etanola (slika 5), a samim tim i sirćetne kiseline u uzorku 1,5% UPI manji je nego u uzorcima 10% I i



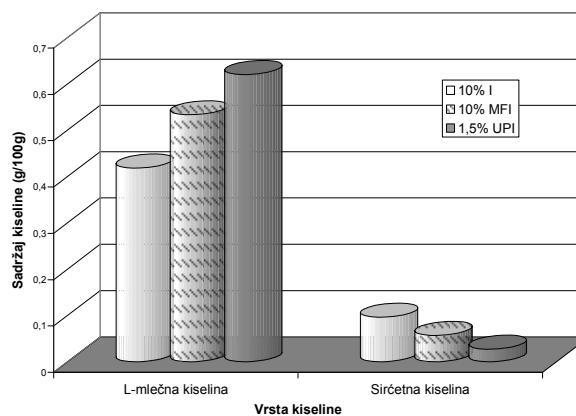
Slika 1. FERMENTACIJA MLEKA TOKOM PROIZVODNJE FUNKCIONALNOG FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA
Figure 1. MILK FERMENTATION DURING FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGE PRODUCTION



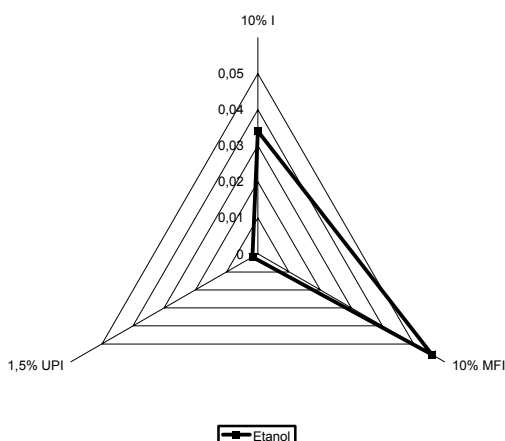
Slika 2. SADRŽAJ LAKTOZE U MLEKU I FUNKCIONALNIM FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA
Figure 2. LACTOSE CONTENT IN MILK AND FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES



Slika 3. SADRŽAJ GALAKTOZE, GLUKOZE I FRUKTOZE U FUNKCIONALNIM FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA
Figure 3. GALACTOSE, GLUCOSE AND FRUCTOSE CONTENT IN FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES

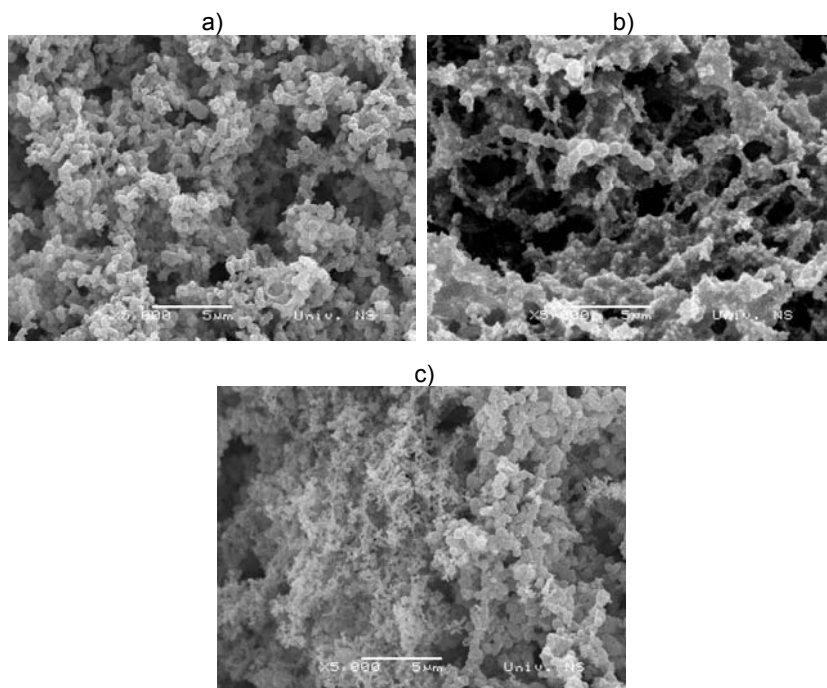


Slika 4. SADRŽAJ L-MLEČNE KISELINE I SIRĆETNE KISELINE U FUNKCIONALNIM FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA
Figure 4. L-LACTIC ACID AND ACETIC ACID CONTENT IN FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES



Slika 5. SADRŽAJ ETANOLA U FUNKCIONALNIM FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA

Figure 5. ETHANOL CONTENT IN FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES



Slika 6. MIKROSTRUKTURA FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA (uvećanje 5000×): a) 10% I b) 10% MFI c) 1,5% UPI

Figure 6. MICROSTRUCTURE OF FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES (magnification 5000×): a) 10% I b) 10% MFI c) 1,5% UPI

10% MFI, s obzirom da uzorak inokuluma UPI ima znatno manji broj kvasaca od inokuluma I i MFI.

Najviši sadržaj etanola je u uzorku 10% MFI (0,056 g/100g).

Fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka uslovile su i razlike u mikrostrukturi proizvoda dobijenih uz primenu tri vrste inokuluma čajne gljive (slika 6). Mikrostrukturu napitka proizvedenog korišćenjem

inokuluma čajne gljive kultivisanog na crnom čaju zaslađenom saharozom čine gusto isprepleteni proteinski lanci (slika 7a). Na površini i u unutrašnjosti uočava se prisustvo kvasaca. Međutim, mikrostruktura napitka proizvedenog sa inokulumom koncentrisanim mikrofiltracijom (slika 6b) značajno se razlikuje, odnosno proteinski matriks je manje kompaktan i rastresit i veće su šupljine između lanaca. Prisustvo bakterija i kvasaca je značajno izra-

ženo, kao rezultat korišćenja mikrofiltriranog inokuluma gde su navedeni mikroorganizmi koncentrovani. Funkcionalni fermentisani mlečni napitak sa 1,5% UPI je kompaktne strukture sa manje šupljina unutar matriksa i manje izraženim prisustvom mikroorganizama.

Generalno posmatrano, funkcionalni fermentisani mlečni napitak proizveden sa 10% inokuluma čajne gljive ima znatno bolje fizičko-hemijske, tehnološke i strukturne karakteristike u poređenju sa uzorcima dobijenim uz korišćenje inokuluma koncentrisanog uparavanjem ili mikrofiltracijom.

ZAKLJUČAK

Fermentacija mleka sa 0,9% mlečne masti uz primenu inokuluma čajne gljive (do postizanja pH 4,5) trajala je redom: 570 min tokom proizvodnje uzorka 10% I, 610 minuta za uzorak 10% MFI i 660 minuta u uzorku 1,5% UPI.

U uzorku 10% MFI transformiše se najviše laktoze (oko 32%). Sadržaj galaktoze je u svim uzorcima u skladu sa sadržajem laktoze i kreće se od 0,53 g/100g (uzorak 10% MFI) do 0,25 g/100g (1,5% UPI). Sadržaj glukoze je viši od sadržaja fruktoze u uzorcima 10% I i 1,5% UPI, osim u uzorku 10% MFI koji sadrži više fruktoze od glukoze. Sadržaj L-mlečne kiseline je najviši u uzorku 1,5% UPI, dok je za 54% niži u uzorku 10% I, a za 18% u uzorku 10% MFI.

Funkcionalni fermentisani mlečni napici sadrže prosečno 10 puta niži sadržaj sirćetne od sadržaja mlečne kiseline. Sadržaj etanola je najviši u uzorku 10% MFI, a najniži u uzorku 1,5% UPI.

Primenom inokuluma čajne gljive za fermentaciju mleka kultivisanog na crnom čaju zaslađenim saharozom, koncentrisanog primenom mikrofiltracije i koncentrisanog uparavanjem, uz korišćenje odabranog tehnološkog procesa dobijene su varijante funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka odgovarajućih hemijskih i mikrobioloških karakteristika. Dalja istraživanja fizičko-hemijskih, reoloških i strukturnih karakteristika navedene grupe proizvoda doprineće razvoju tehnologije funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka i proširenju asortimana niskoenergetskog, nutritivno visokovrednih funkcionalnih mlečnih proizvoda na tržištu.

LITERATURA

- Bellosa-Morales, G., Hernandez-Sanches, H.: Manufacture of a beverage from cheese whey using a tea fungus fermentation. *Rev Latinoam Microbiol*, 45 (1-2) (2003) 5-11.
- Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed., Vol. VI, pp. VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge UK, 1150 (1988).
- Cvetković, D., Markov, S., Djurić, M., Savić, D., Velićanski A.: Specific interfacial area as a key variable in scaling -up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*, 85 (2008)387-392.
- Dimitrellou, D., Tsasousi, K., Korkoutas, Y., Panas, P., Kanellaki, M., Koutinas, A.: Fermentation efficiency of thermally dried immobilized kefir on casein as starter culture. *Process Biochemistry* 43 (2008) 1323-1329.
- Gavarić, D., Carić, M., Kalab, M.: Effects of protein concentration in ultrafiltration milk retentates and type of protease used for coagulation on the microstructure of resulting gels. *Food Microstructure*, vol.8, (1989) 53-66.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A.: *Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects*. *Journal of Food Protection* 63 (7) (2000) 976-981.
- Iličić, M., Carić, M., Milanović, S.: Mikrostruktura kvarka proizvedenog uz primenu probiotika. *Prehrambena industrija –Mleko i mlečni proizvodi*, 17 (1-2) (2006) 6-9.
- Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Đurić, M., Tekić, M., Duraković, K., Vukić, V.: Quality optimisation of fermented dairy beverages produced by transglutaminase application. *EuroFoodChem XV-Food for the Future, The Contribution of Chemistry to Improvement of Food Quality*, Faculty of life Sciences, University of Copenhagen, Denmark. *Book II of Proceedings* (2009) 203-206.
- Jajabalan, R., Marimuthu, S., Swaminthan, K.: Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* 102 (2007) 392-398.
- Jaziri, I., Ben Slama, M., Mhadhbi, H., Urdaci, M., Hamdi, M.: Effect of green and black teas (*Camelia sinensis L.*) on the characteristic microflora of yoghurt during fermentation and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 112 (2009) 614-620.
- Lodder, J.: *The yeasts*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, (1974).
- Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M., Došenović, I.: Effect of sucrose concentration on kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*, 108 (2008) 926-932.
- Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Djurić, M., Carić, M., Iličić, M., Kolarov, Lj.: Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, 112 (2009) 178-184.
- Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Malbaša, R., Tekić, N., Iličić, M., Duraković, K.: Low energy kombucha fermented milk-based beverages. *Acta Periodica Technologica*, 39 (2008) 37-46.
- Reiss, J.: Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters Forsch* 198 (1994) 258-261.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon Carter, E.J.: Microstructure and texture of Yoghurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal* 14 (2004) 151-159.
- Tamime, A.Y.: *Fermented Milks*. Blackwell Science Ltd, UK, p. 262 (2006).
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K.: *Yoghurt, Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, p. 619 (2004).

SUMMARY

APPLICATION OF KOMBUCHA IN FUNCTIONAL FERMENTED MILK BEVERAGES TECHNOLOGY

Mirela D. Iličić, Spasenija D. Milanović, Marijana Đ. Carić, Mirjana S. Đurić, Miodrag N. Tekić, Vladimir V. Vukić, Katarina G. Duraković, Svetlana S. Popović

University of Novi Sad, Faculty of Technology

Three different kombucha inoculums: cultivated on black tea with addition of sucrose (10% I), concentrated by microfiltration (10% MFI) and concentrated by evaporation (1.5% UPI) were applied in functional fermented dairy beverage manufacture. Physico-chemical properties (pH, Eh) and chemical composition (lactose, galactose, glucose, fructose, L-lactic acid, acetic acid and ethanol) of samples were analyzed after production. Milk fermentation lasted 570 minutes during production of sample 10% I and was faster 40 minutes than sample 10% MFI and 90 minutes compared with beverage 1.5% UPI.

Lactose content in functional fermented milk beverages decreased for 19,5% (sample 10% I and sample 1.5% UPI) and 32.0 % in beverage produced by using 10% microfiltrated inoculum.

Average content of L-lactic acid in functional fermented milk beverages was about 0.5 g/100g, while content of acetic acid in all samples was lower than 0.1 g/100g. Functional fermented milk beverage produced with 1.5% evaporated inoculum contained the lowest level of ethanol, while sample 10% MFI had the highest ethanol concentration – 0.06 g/100g.

Fermented dairy beverages produced by different kombucha inoculums application could be classified as high valuable functional food with optimal chemical and microbiological characteristics.

Key words: functional fermented milk beverages • kombucha • technology • quality

TANJA R. VUČIĆ
SNEŽANA T. JOVANOVIĆ
ANA JOVČIĆ
IGOR R. ZDRAVKOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet,
Institut za prehrambenu tehnologiju
i biohemiju

PREGLEDNI RAD

UDK: 663.67:637.043

KARAKTERISTIKE SLADOLEDA SA SMANJENIM SADRŽAJEM MASTI

Velika popularnost sladoleda je zasnovana na vrlo specifičnim senzornim karakteristikama, a zbog velike energetske vrednosti koju sladoled ima usled prisustva šećera i mlečne masti, često se nalazio na meti nutricionista.

Potreba da se asortiman sladoleda neprekidno povećava i razvija uz primenu novih trendova u ishrani, rezultirala je osamdesetih godina prošlog veka pojavom sladoleda sa smanjenim sadržajem masti (light sladoled).

Proizvođači sladoleda su pred sobom imali veoma važan i ozbiljan zadatak da pronađu adekvatnu zamenu za mlečnu mast, koja u velikoj meri utiče kako na senzorne karakteristike, tako i na strukturu sladoleda. Trebalo je zadovoljiti zahtev potrošača da se dobije sladoled koji po svojim osobinama ne odstupa od karakteristika koje ima standardni sladoled.

Primenom novih ingredijenata kao što su koncentrat proteina surutke, "antifriz" proteini, odgovarajuće smeše E/S u kombinaciji sa primenom ekstrudera i podešavanjem parametara tehnološkog postupka proizvodnje sladoleda, uspešno su rešeni nedostaci koji su se javljali kod sladoleda sa smanjenim sadržajem masti.

Ključne reči: sladoled • mlečna mast • ekstruder • AFP

UVOD

Sladoled je veoma popularan mlečni proizvod, koji ne može da se tretira samo kao poslastica i kao proizvod sezonskog karaktera, već kao hrana koja se proizvodi i konzumira tokom cele godine.

Adresa autora:

Prof. dr Snežana Jovanović, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun
tel.: 011/2615-315
e-mail: snezanaj@agrif.bg.ac.rs

U razvijenim zemljama najveću prodaju imaju porodična pakovanja i sladoled se uglavnom koristi kod kuće, dok je za Latinsku Ameriku karakteristična veća potrošnja impulsa proizvoda.

Ukusi i navike potrošača su veoma različiti u zavisnosti od podneblja, kulture, starosne dobi. Ono što je zajedničko je činjenica da je današnji potrošač mnogo kompleksniji i zahtevniji jer zna više, insistira na zadovoljenju individualnih potreba, traži raznovrsnu ponudu, a ipak je okrenut ka zdravlju i o njemu sve više vodi računa (Tomić i sar., 2004). Danas u svetu postoje mnoge kategorije funkcionalnih sladoleda među kojima su najzastupljeniji: probiotski sladoledi, prebiotski sladoledi, sladoledi sa dodatkom različitih bioaktivnih supstanci, sladoledi sa dodatkom omega-3 i omega-6 masnih kiselina, kao i sladoledi obogaćeni vitaminima i kalcijumom (Tomić i sar., 2006a, 2006b, 2007, 2008).

Kako industrija sladoleda uvek prati trendove u ishrani potrošača koji su njena ciljna grupa, osamdesetih godina prošlog veka na američkom tržištu su se pojavili proizvodi sa smanjenom energetskom vrednošću, prvi niskomasni, odnosno "light" sladoled.

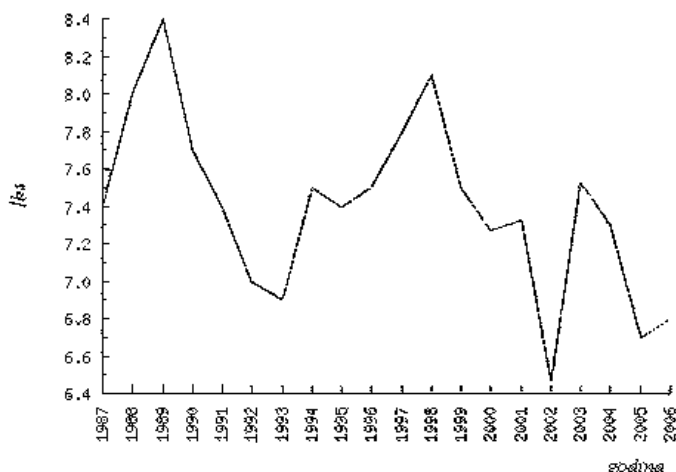
Na slici 1 dat je prikaz potrošnje niskomasnog sladoleda na kojem se uočava porast potrošnje do devedesetih godina XX veka. Međutim, problemi koji su se javljali pre svega u postizanju dobrih senzornih karakteristika i strukture ove vrste sladoleda uticali su na smanjenje njegove potrošnje. Kako je mast nosilac kremaste strukture koja omogućava postepeno oslobađanje arome prilikom konzumiranja i daje sladoledu punoću

ukusa, potrošači su se ipak opredeljivali za premijum proizvode, koji su im pružali navedene željene karakteristike. Godine naučnog istraživanja i velika finansijska sredstva uložena su u ispitivanje na koji način poboljšati strukturu niskomasnog i nemasnog sladoleda i bilo je neophodno mnogo truda da se vrati poverenje potrošača i pokaže da "zdraviji" sladoled ne mora da znači i neukusan proizvod. Povećanje potrošnje ove kategorije sladoleda je zabeleženo u periodu kasnih devedesetih godina i u manjem stepenu sredinom prve dekade XXI veka.

U skladu sa svetskim trendovima i domaći proizvođači sladoleda su upotrebili asortiman sladoledima sa smanjenim sadržajem masti namenjenih ciljnoj grupi potrošača koji prednost daju proizvodima manje energetske vrednosti, što je usklađeno i zakonskom regulativom. Prema našem Pravidniku (2002), date su karakteristike niskomasnog sladoleda po kome sladoledna smeša sadrži manje od 2,5% mlečne masti, manje od 2,5% proteina mleka i najviše 26% suve materije. Senzorne karakteristike ove vrste sladoleda treba da su: svojstven prijatan miris i osvežavajući ukus, ujednačena boja i nežna konzistencija bez grudvica i kristala leda. Kada su niskomasni sladoledni dezerti u pitanju, oni treba da imaju sve karakteristike kao i niskomasni sladoled, s tom razlikom da je sadržaj masti u skladu sa članom 190 manji od 2,5%.

Uloga mlečne masti u strukturi sladoleda

Mlečna mast i njeni supstituenti imaju veliki uticaj na strukturu, teksturu i senzorne karakteristike slado-



Slika 1. POTROŠNJA NISKOMASNOG SLADOLEDA U SAD U PERIODU OD 1987- 2006. GODINE (Windhab i Wildmoser, 2008)

Figure 1. PER CAPITA LOW FAT CONSUMPTION IN THE USA IN PERIOD 1987-2006. (Windhab i Wildmoser, 2008)

leda. Ona doprinosi mlečnom ukusu proizvoda i predstavlja nosač za dodate arome, dok se kremasta struktura pripisuje aglomeraciji masti, koja se javlja u procesu friziranja, i veličini masnih kapljica (Li i sar., 1997; Kilara, 1998; Ohmes i sar., 1998).

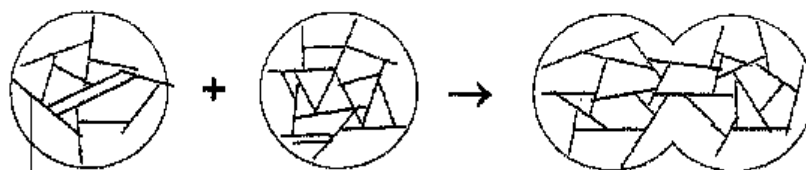
Najbitniji korak za formiranje strukture sladoleda je friziranje sladoledne smeše u kontinualnom ili šaržnom frizeru, nakon zrenja pasterizovane sladoledne smeše.

Kod dinamičkog kontinualnog frizera ohlađena smeša temperature 2 do 4°C ulazi u cilindar gde dolazi do naglog snižavanja temperature usled temperaturne razlike između rashladnog fluida i sladoledne smeše. Kada smeša dostigne temperaturu smrzavanja vode, kristali leda počinju da oblažu unutrašnji zid cilindra uređaja usled tendencije kristala da se adsorbuju na čvrstu površinu. Nastali led se struže noževima i mešanjem integriše u ostatak smeše dalje je hladeći. Već pri ulasku u cilindar, kada je pad temperature najznačajniji, dolazi do stvaranja prvih nukleusa leda, koji dalje rastu smrzavanjem dela vode. Poželjno je da kristali leda budu što manji. Kristali leda veći od 30µm osećaju se pri konzumiranju, što utiče na negativnu ocenu senzornih karakteristika od strane potrošača (Jovanović i sar., 1998).

Pri izlazu iz cilindra, oko 50% vode u sladolednoj smeši se nalazi u čvrstom agregatnom stanju, dok njen ostatak čini koncentrovani rastvor šećera, soli i proteina koji nije mogao da se smrznemo na temperaturama friziranja. Dok se deo vode smrznava istovremeno se inkorporira vazduh, a mlečna

mast destabilizuje. Destabilizacija masti u ovom slučaju podrazumeva uklanjanje dela proteina sa površine masne globule, što omogućava adsorpciju globula na površinu vazdušnih mehurića i obrazovanje agregata (Marshall i sar., 2003). Deo masti će obrazovati "mrežu", koja zapravo doprinosi kremastoj strukturi sladoleda sprečavajući vazduh da napusti sistem i kristalima leda da dalje rastu pri dužem skladištenju. Stvaranje aglomerata omogućavaju kristali masti, a kristalizacija započinje još u fazi zrenja sladoledne smeše. Kristali se obrazuju unutar masne globule narušavajući njenu površinu i približavanjem masnih globula prilikom mešanja dolazi do vezivanja ovih delova kristala koji obrazuju mrežu. U ovoj fazi dominira uloga dodatog emulgatora. Emulgatori se vezuju na površinu masti zamenjujući deo proteina odvojenog za vreme homogenizacije, smanjuju površinski napon i stabilnost globula stvarajući uslove za njihovu koalescenciju (Krog, 1997), što je prikazano na slici 2.

Pored koalescencije masti javlja se i koalescencija inkorporiranih mehurića uduvanog vazduha (Walstra i



Kristali mlečne masti

Slika 2. MEHANIZAM KOALESCENCIJE MASNIH GLOBULA (Vega i sar., 2003)
Figure 2. MECHANISM OF MILK FAT GLOBULES COALESCENS (Vega et al., 2003)

Jonkman, 1997). Usled razlike u pritisku između unutrašnjosti i spoljašnjosti mehurića (Laplaceov pritisak), oni imaju tendenciju da se spajaju stvarajući veće mehurove kako bi sistem postigao minimum energije. Ovu nepoželjnu pojavu sprečavaju upravo masne globule koje se vezuju za površinu mehurića vazduha.

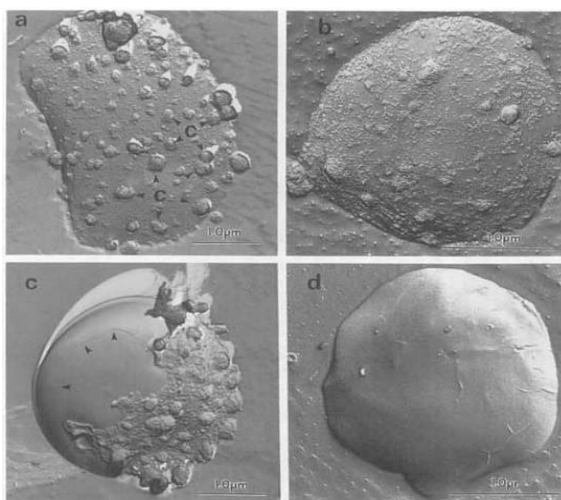
Ukoliko su ispunjeni svi uslovi u toku proizvodnje, naročito friziranja, postiže se željena struktura sladoleda, koja je stabilna tokom skladištenja i distribucije.

Kako je mast jedan od glavnih nosilaca poželjnih karakteristika sladoleda, njen nedostatak izaziva destabilizaciju strukture koja postaje mrvljiva i ledena. Topljivost sladoleda postaje lošija, a arome se brzo oslobađaju proizvodeći naknadni veštački ukus, "aftertaste".

Pri proizvodnji niskomasnog ili nemasnog sladoleda mast se zamenjuje jedinjenjima koja imaju slične karakteristike. Povećan sadržaj obranog mleka u prahu ili proteina surutke uslovljava povišen sadržaj laktoze u proizvodu. Pri skladištenju, laktoza postepeno kristališe stvarajući krupne kristale koji daju proizvodu peskovitu teksturu (Tomić i sar., 1998a; Lewis, 2007). Prilikom konzumiranja ovi kristali se jasno osećaju, a od kristala leda se razlikuju po odloženom topljenju u ustima. Ova mana proizvoda može se izbeći upotrebom koncentrata proteina surutke.

Još jedan problem koji se javlja u ovom proizvodu je rast kristala leda. Kako u punomasnom sladoledu mlečna mast deluje kao stabilizator strukture i blokira rast kristala, njen nedostatak omogućava njihov nesmetani razvoj. Ova pojava je naročito izražena pri temperaturnim kolebanjima kojima je sladoled izložen pri distribuciji.

Usled viših temperatura deo leda se topi čime se broj nukleusa smanjuje. Naknadnim smrzavanjem odmrznuta voda migrira ka postojećim nukleusima, smrznava i adsorbuje se na površini kristala izazivajući njihov



Slika 3. MEHANIZAM ODVAJANJA MLEČNIH PROTEINA SA MASNE GLOBULE (Gaonkar, 1995)
Figure 3. MECHANISM OF MILK PROTEINS SEPARATION FROM MILK FAT GLOBULE (Gaonkar, 1995)

rast. Usled ove pojave dolazi do povećanja kristala preko 50 μ m, koji se osećaju pri konzumiranju i loše utiču na senzorne karakteristike (Wildmoser i Windhab, 2003).

Uloga emulgatora i stabilizatora u proizvodnji nemasnih i niskomasnih sladoleda

U industriji sladoleda uobičajena je upotreba različite vrste stabilizatora i emulgatora. Kada su u pitanju niskomasni sladoledi i dezerti, akcenat se stavlja na one koji imaju stabilizujuć efekat na inkorporirani vazduh u procesu friziranja, sprečavaju rast kristala leda i doprinose kremastoj strukturi.

Emulgatori su aktivne supstance koje imaju sposobnost da se koncentrišu na graničnoj površini između dve faze, stvarajući stabilan elastični film koji obezbeđuje trajnost emulzije.

Osnovne funkcije emulgatora u sladoledu su: poboljšanje disperznosti masti, pospešivanje interakcije masti-protein, kontrola aglomeracije i koalescencije masnih kapljica, olakšano inkorporiranje vazduha, poboljšanje formiranja glatke strukture i konzistencije i poboljšanje svojstava otapanja (Arbuckle, 1986; Jovanović i sar., 1995; Marshall i sar., 2003; Tomić i sar., 2005). Osim toga, neophodno je odabrati optimalan pritisak homogenizacije kako bi se postigao maksimalan efekat emulgatora u sladolednoj smeši (Baer i sar., 1997).

U toku procesa friziranja sladoledne smeše emulgatori utiču na formiranje malih kristala leda i manjih mehurića vazduha, čime se obezbe-

đuje glatka struktura sladoleda (Arbuckle, 1986; Krog, 1997).

U proizvodnji nemasnih i niskomasnih sladoleda najčešće se koristi smeša mono- i diglicerida (E471). Njihova uloga je da omoguće masnim globulama da se adsorbuju na površinu vazdušnog mehurića (slika 3). Emulgatori zamenjuju proteine na masnoj globuli smanjujući njihovu stabilnost, što uslovljava flokulaciju masti i stvaranje mreže koja stabilno utiče na celokupnu strukturu sladoleda (Krog, 1997; Walstra i Jonkman, 1997). Osim toga, hidrofilni deo emulgatora vezuje vodu u niskomasnom sladoledu čime se smanjuje količina vode koja se smrzava, a kao rezultat toga javljaju se manji kristali leda (Baer i sar., 1997).

Stabilizator u velikoj meri utiče na teksturu, topivost i stabilnost sladoleda tokom skladištenja. Najčešće su u upotrebi hidrokoloidi koji vežu vodu povećavajući viskozitet smeše, što je kod niskomasnih sladoleda od velike važnosti, jer sprečavaju flokulaciju i rast vazdušnih mehurića tokom smrzavanja.

Od stabilizatora najčešće su u upotrebi karagenan, guar guma, rogačeva guma, metilceluloza, pektin i želatin (Tomić i sar., 1998a, 2005; Marshall i sar., 2003).

Guar guma je polisaharid biljnog porekla. Brzo hidrira u vodi pri niskim temperaturama stvarajući veoma viskoznu sredinu pri niskim koncentracijama. U sladoledu ima ulogu u formiranju njegove strukture, doprinosi poboljšanju senzornih karakteristika i ublažava promene temperaturnih fluk-

tuacija pri distribuciji. Sličnih karakteristika je i rogačeva guma.

Metil celuloza pokazuje svojstva termoželatinizacije, tj. da pri višim temperaturama formira gel koji hlađenjem prelazi u normalan rastvor. Zanimljivo je da ovaj stabilizator nije rastvorljiv, pa samim tim ne doprinosi energetskoj vrednosti proizvoda. U sladoledu se koristi, jer sprečava sinerezis i skupljanje proizvoda, što je prisutan defekt kod niskomasnih i nemasnih sladoleda i dezertata.

Karagenan je kompleksna mešavina od najmanje pet utvrđenih polimera, od kojih najveću primenu imaju κ i λ . Reaguje sa velikim brojem guma, pre svega sa rogačevom gumom i utiče na povećanje viskoziteta, jačinu gela i njegovu elastičnost. Pri višim koncentracijama sa guar gumom povećava jačinu gela, dok u manjim samom utiče na povećanje viskoziteta. Funkcioniše na taj način što anjonom reaguje sa proteinom obrazujući protein-karagenan kompleks, koji je stabilna koloidna disperzija. U niskomasnom i nemasnom sladoledu deluje kao inhibitor rasta kristala leda. Najčešće se koristi u kombinaciji sa karboksimetil celulozom, rogačevom gumom ili guar gumom. Kapa karagenan frakcije kao hidrokolid utiču na sprečavanje sinerezisa (Arbuckle, 1986; Marshall i sar., 2003; Tomić i sar., 2005).

Supstituenti mlečne masti

Željena struktura i senzorne karakteristike niskomasnog sladoleda ne mogu se postići samo upotrebom standardnih stabilizatora i emulgatora.

Oni u velikoj meri doprinose poboljšanju karakteristika proizvoda, ali nisu u mogućnosti da preuzmu ulogu masti u pogledu poboljšanja teksture i senzornih karakteristika. Zbog toga se koriste razne zamene za mast, koje mogu biti bazirane na proteinima i ugljenim hidratima. Dodatkom ovih jedinjenja snižava se tačka mržnjenja sladoleda čime se poboljšavaju svojstva otapanja (Ohmes i sar., 1998). Glavne karakteristike koje supstituenti treba da prikriju su razvoj arome niskomasnog sladoleda, njegova struktura i senzorne karakteristike tokom konzumiranja. U punomasnom sladoledu dodata aroma je vezana za mlečnu mast i postepeno se oslobađa pri konzumiranju, a uz mlečnu notu koja potiče od masti, utiče na formiranje punog i izbalansiranog ukusa u finalnom proizvodu. U slučaju nemasnih i

niskomasnih sladoleda, aroma je koncentrisana u vodenoj fazi sladoleda i dolazi do brzog i intenzivnog formiranja arome i ukusa sa kratkotrajnim efektom. Zbog toga se sladoledu često dodaju jedinjenja koja će reagovati sa aromama i postepeno ih oslobađati

strukture kristala leda i utiču na viskozitet sladoleda (Prindiville i sar., 1999). Delimično denaturisani koncentrat proteina surutke povećava viskozitet sladoledne smeše, a za razliku od standardnog koncentrata proteina surutke ne stvara "aftertaste" i ne koa-

mono- i digliceridi kao emulgatori, i kao stabilizatori: guar guma, karagenan, rogačeva guma, mikrokristalna celuloza, karboksimetil celuloza i ksantan. Ovoj sladolednoj smeši se na kraju dodaje koncentrat proteina surutke sa ciljem da se reguliše suva materija sladoleda, ali i da se utiče na odnos smrznute/nesmrznute vode u sladoledu na temperaturi od -12°C , kako bi se postigla tekstura i senzorne karakteristike standardnog proizvoda. Na slici 4 predstavljen je sadržaj smrznute vode u sladoledu sa 0% i 1% mlečne masti u odnosu na standardni proizvod. Uočava se da je sladoled sa 1% mlečne masti bliži sa svojim karakteristikama standardnom punomasnom proizvodu po količini smrznute vode, što direktno uslovljava i senzorne karakteristike sladoleda usled potrošnje određene količine toplote u ustima radi topljenja kristala.

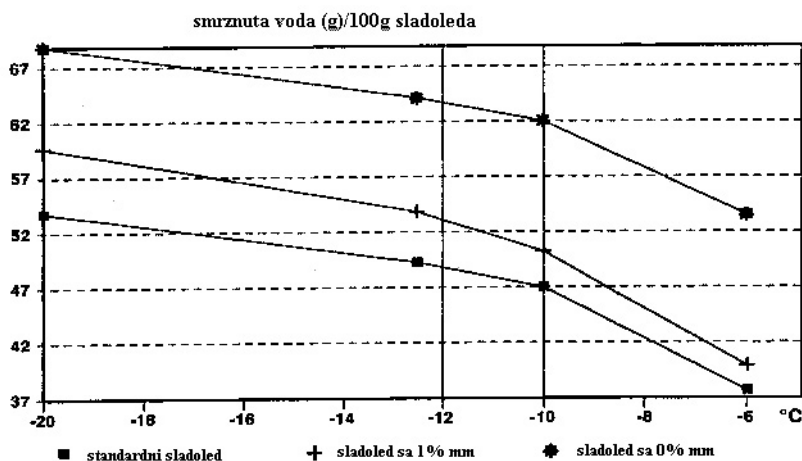
Dobijena sladoledna smeša se pasteurizuje na 78°C u trajanju od 10 minuta i dvostepeno homogenizuje. Prvi stepen homogenizacije je pod pritiskom od 17,23 MPa., a drugi korak pod pritiskom od 5,51 MPa (Yashavantkumar i Mollard, 1993). Nakon homogenizacije, sladoledna smeša se hladi do 4°C nakon čega se pumpa u tankove za zrenje, gde se obavlja proces zrenja u trajanju od 4 do 24h na temperaturama do maksimalno 7°C . Za vreme zrenja sladoledne smeše mast počinje da kristališe, a proteini i polisaharidi u potpunosti hidriratišu. Ovo olakšava kasnije uduvavanje vazduha i mehaničku obradu sladoleda. U procesu zrenja dodaju se arome i boje u zavisnosti od recepture sladoleda.

Nakon zrenja smeša se frizira u kontinualnom frizeru. Temperatura smeše se snižava sa 4° do -5°C uz istovremeno intenzivno mešanje i uduvavanje vazduha u količini od 40-80%. Od momenta kada smeša uđe u frizer do momenta njegovog napuštanja, smrzne najveći deo vode u roku od 30 sekundi. Dobijeni sladoled je kremast i lako se oblikuje u kalupu uz dodatak voća, lešnika i sličnih ingredijenata. Ostatak vode smrzava se u tunelu za smrzavanje na temperaturi od -35°C .

Nove tehnologije u proizvodnji nemasnih i niskomasnih sladoleda

Ekstruder

Poboljšanje strukture i teksture nemasnog i niskomasnog sladoleda da-



Slika 4. SADRŽAJ SMRZNUTE VODE U NISKOMASNOM I NEMASNOM SLADOLEDU U ODNOSU NA STANDARDNI SLADOLED PRI RAZLIČITIM TEMPERATURAMA (Yashavantkumar i Mollard, 1993)

Figure 4. FROZEN WATER CONTENT IN LOW-FAT AND NON-FAT ICE CREAM COMPARING TO STANDARD ICE CREAM AT DIFFERENT TEMPERATURES (Yashavantkumar and Mollard, 1993)

pri topljenju tokom konzumiranja. Najčešće su u pitanju proteini i ugljeni hidrati (Adapa i sar., 2000). Kremasta struktura nemasnog i niskomasnog sladoleda može se postići dodatkom polidekstroze i maltodekstrina (Hyvönen i sar., 2003; Roland i sar., 1999). U pogledu arome, proizvođači se uglavnom opredeljuju za one koje su pogodnije za niskomasne i nemasne sladolede. Na primer, lipolizovana mlečna mast i njeni destilatni doprinose mlečnom ukusu (Kappas, 1997).

Jedan od ingredijenata koji je pokazao povoljne rezultate u proizvodnji niskomasnih sladoleda kao supstituent mlečnoj masti, kako sa fizičko-hemijskog tako i sa ekonomskog aspekta jeste delimično denaturisan koncentrat proteina surutke (WPC). Ovaj ingredijent je posebno razvijen za potrebe niskomasnih mlečnih proizvoda, kada se pokazalo da veliki broj dodataka ne uspeva da zameni strukturne i senzorne karakteristike masti (Hyvönen i sar., 2003; Jovanović i sar., 2007). Termički denaturisani koncentrat proteina surutke koji se koriste u proizvodnji nemasnog i niskomasnog sladoleda vezuju se za molekule vode, proteina i jedinjenja nosioce ukusa, stabilizuju mehuru vazduha, sprečavaju pojavu igličaste

guliše pri procesu proizvodnje. Međutim, prema Adapa i sar. (2000) željena struktura niskomasnog sladoleda lakše se može postići kombinacijom mlečne masti, proteina i ugljenih hidrata u odgovarajućem odnosu, nego zamenom mlečne masti samo proteinima ili ugljenim hidratima.

Proizvodnja nemasnog i niskomasnog sladoleda

Proizvodnja sladoleda sa smanjenim sadržajem masti, osim po sastavu recepture, slična je procesu proizvodnje punomasnog sladoleda, uz podešavanje tehnoloških parametara u procesu proizvodnje. Tehnološki proces proizvodnje ove vrste sladoleda u najvećem broju slučajeva je zaštićen patentima i predstavlja poslovnu tajnu velikog broja proizvođača.

Prema patentu Yashavantkumar i Mollard-a (1993), prvi korak u proizvodnji nemasnog sladoleda je mešanje vode sa tečnim zaslađivačima, najčešće kukuruznim sirupom u duplikatoru sa mešalicom. Ovom rastvoru dodaje se prva smeša praškastih ingredijenata, tj. obrano mleko u prahu, šećer i razni supstituenti masti poput tapioka škroba i maltodekstrina. Kada se smeša homogenizuje dodaju se

nas se bazira na upotrebi većeg broja aditiva i dodataka. Međutim, problem koji se takođe javlja je nastojanje kupaca da izbegavaju proizvode sa velikim brojem aditiva.

Tehnologija koja je donekle uspela da poboljša reološke karakteristike sladoleda, a pre svega omogući njegovo lakše oblikovanje, jeste ekstruder za oblikovanje sladoleda, tj. Glacier mašina.

Glacier mašina se sastoji iz tri sekcije i to:

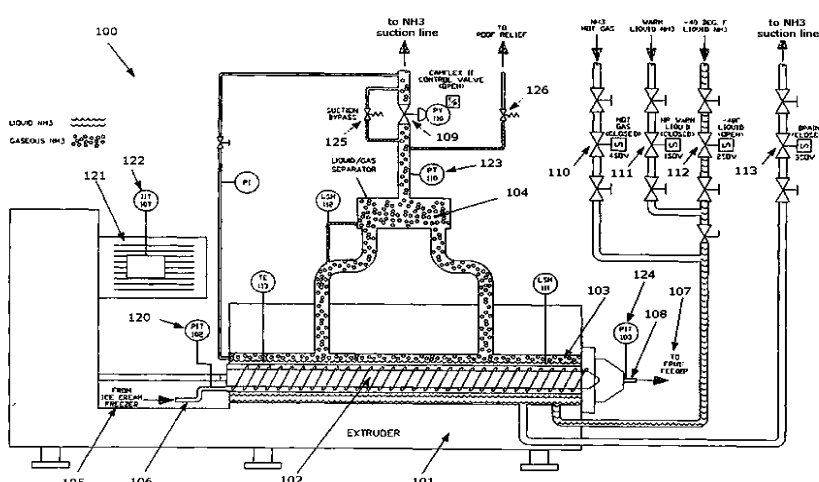
- Oblikovanje i smrzavanje proizvoda
- Obrada smrznutog proizvoda
- Pakovanje proizvoda

Sladoledna smeša koja se oblikuje ovom mašinom mora da sadrži minimum 85% saharoze od ukupne količine šećera zbog podešavanja temperature smrzavanja proizvoda (Tomić i sar., 1998b). Smeša emulgatora i stabilizatora, koja se uglavnom sastoji od guma i želatina, omogućava dobijanje veoma viskozne strukture proizvoda, koja je slična pudingu. Pripremljena smeša nakon pasterizacije i zrenja podvrgava se friziranju u kontinualnom frizeru. Kada se izvrši uduvavanje željene količine vazduha, dobijeni sladoled se oblikuje ekstruderom istiskivanjem smeše kroz kalup željenog oblika, nakon čega se oblaže čokoladom ili odmah dubinski smrzava u tunelu.

Prvi industrijski prototip novog modela ekstrudera našao je primenu 1993. godine i imao je kapacitet od 400-500L/h. U periodu 1993-1996. godine konstruisana su još tri tipa ekstrudera različitih kapaciteta, prikazanih u tabeli 1, a od 1996. godine u industriji se koriste ekstruderi sa maksimalnim kapacitetom od 1200kg/h (Windhab i Bolliger, 1997).

Ekstruder, poput frizera, vrši smrzavanje sladoledne smeše pri jakoj mehaničkoj obradi. Sastoji se od čeličnog cilindra sa duplim zidovima između kojih cirkuliše rashladni fluid, što je prikazano na slici 5.

Unutar cilindra postavljeni su puževi koji rotiraju i transportuju smešu, mešaju i vrše mehanički tretman istovremeno. Broj puževa može da varira u zavisnosti od recepture. Uglavnom se koristi jedan, ali uz upotrebu dva i više puževa postavljenih paralelno

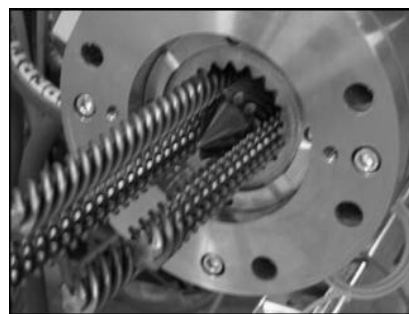
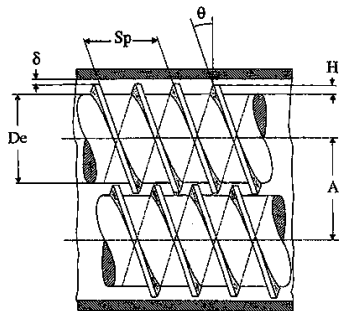


Slika 5. SISTEM EKSTRUDERA (D'Arcangelis i Tapfer, 2004)
Figure 5. EXTRUDER SYSTEM (D'Arcangelis i Tapfer, 2004)

(slika 6), postizu se bolji rezultati u pogledu poboljšanja mikrostrukture sladoleda.

Zbog uštede energije na ekstruderu i postizanja boljih reoloških karakteristika sladoleda, poželjno je da

kristala u standardnom proizvodu. Prolaskom smeše kroz cilindar, usled trenja, vazdušni mehurići se deformišu i dele na veliki broj 3-5 puta manjih u odnosu na veličinu mehurića dobijenih upotrebom samo frizera.



Slika 6. IZGLJED PUŽA UNUTAR CILINDRA EKSTRUDERA a) Windhab i Wildmoser (2008); b) Jovčić (2008)
Figure 6. SCREW INSIDE BARREL a) Windhab and Wildmoser (2008); b) Jovčić (2008)

se pre ekstruzije izvrši aeriranje smeše i delimično smrzavanje u frizeru. Tada udvana sladoledna smeša temperature od -5°C ulazi u cilindar ekstrudera, gde usled kontakta sa hladnim zidovima cilindra dolazi do naglog snižavanja temperature. Već u početnom delu ekstrudera dolazi do razbijanja nukleusa nastalih u frizeru i sekundarne nukleacije. Kako je koeficijent razmene toplote veoma visok, stvara se veliki broj malih i stabilnih nukleusa, tako da je veličina kristala na kraju procesa 2-3 puta manja od

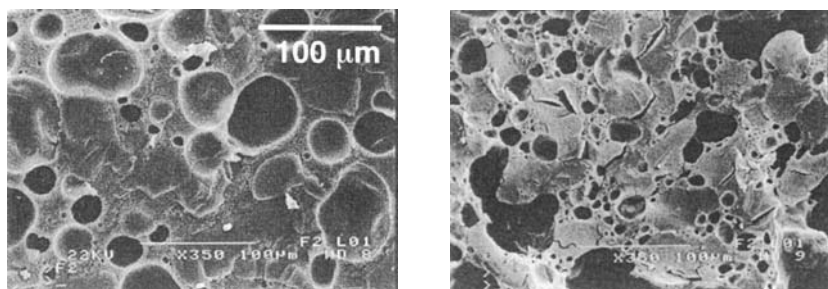
Kada su ekstruderi u pitanju, danas postoji tehnologija uz koju je moguće postići izuzetnu kremastu strukturu sladoleda, kako punomasnog tako i nemasnog sladoleda bez dodatka velikog broja aditiva (slika 7).



Slika 7. IZGLJED EKSTRUDERA
Figure 7. THE EXTRUDER APPEARANCE

Tabela 1. TIPOVI EKSTRUDERA (Windhab i Bolliger, 1997)
Table 1. EXTRUDER TYPES (Windhab i Bolliger, 1997)

Tip ekstrudera/ Extruder type	Maksimalni kapacitet/ Max. mass flow rate (kg/h)	Prečnik puža/ Screw diameter (mm)	Dužina cilindra/ Barrel length (mm)
TTE 100	100-120	65	1000
TTE 300	300-400	130	2000
TTE 1000	1000-1200	250	2500



Slika 8. MIKROSTRUKTURA SLADOLEDA DOBIJENA FRIZEROM I NA EKSTRUDERU (Windhab i Bolliger, 1997)
Figure 8. MICROSTRUCTURE OF ICE CREAM DERIVED BY FREEZER AND EXTRUDER (Windhab and Bolliger, 1997)

Ukoliko je mlečna mast prisutna u smeši, usled jakog mehaničkog tretmana dolazi do odvajanja proteina i emulgatora sa površina masnih globula, kao i njihove deformacije. Kao posledica ovoga, mast stvara izrazito hidrofobne interakcije i poseduje veći afinitet da se adsorbuje na površinu vazdušnog mehurića. Masne globule se delimično spajaju stvarajući agregate. Međutim, rast agregata je ograničen usled visoke viskoznosti smeše u ekstruderu i mast ostaje zarobljena u prostoru između mehurića. Ova zarobljena mast u velikoj meri doprinosi poboljšanju reoloških karakteristika sladoleda proizvedenog ekstruderom u odnosu na frizer. Na slici 8 prikazano je poboljšanje mikrostrukture sladoleda upotrebom ekstrudera u odnosu na frizer (Windhab i Bolliger, 1997).

Kada se mast nalazi u jako maloj količini ili uopšte nije prisutna u sladoledu, mali dijametar i dobra distribucija vazdušnih mehurića i kristala leda utiču na poboljšane reološke karakteristike nemasnog i niskomasnog sladoleda, a pre svega na kremastu strukturu.

Na izlasku iz ekstrudera temperatura smeše iznosi -15°C , a do 80% vode nalazi se u čvrstom agregatnom stanju. Zbog toga ne postoji potreba za dubinskim smrzavanjem sladoleda u glomaznim tunelima za zamrzavanje, već se direktno skladišti i distribuira.

Sladoled proizveden primenom ekstrudera je ne samo boljih karakteristika, već je i stabilniji tokom dužeg skladištenja, ne pokazuje veći stepen rekristalizacije i otporniji je na temperaturne fluktuacije.

Prema Hansenu (2003), prednosti upotrebe ekstrudera u industriji sladoleda se ogledaju u sledećem:

- Predstavlja zamenu za tunel za smrzavanje uz manju investiciju i prostor u pogonu;
- Jednostavna manipulacija uz male gubitke
- Dobija se proizvod visokog kvaliteta uz mogućnost uštede na ingredijentima (emulgatori/stabilizatori)
- Postizanje maksimalno dispergovane strukture otporne na temperaturne fluktuacije
- Visok koeficijent toplotne razmene.

"Antifriz" proteini kao novi ingredijent za inhibiciju rekristalizacije sladoleda

"Antifriz" proteini (AFP ili ISP - Ice Structuring Proteins) odnose se na klasu polipeptida koje sintetišu određene vrste životinja, biljaka i mikroorganizama sa ulogom da ih zaštite od smrzavanja pri temperaturama nižim od temperature smrzavanja telesnih tečnosti. AFP snižavaju tačku mržnjenja, vezuju se za male kristale leda onemogućavajući njihov dalji rast i rekristalizaciju (Marshall i sar., 2003).

Rekristalizacija leda je pojava kada manji kristali leda sublimiraju i ve-

zuju se za veće kristale omogućavajući njihov rast. Ova pojava se dešava uglavnom pri temperaturnim fluktuacijama kojima je sladoled izložen i naziva se Ostwaldovo zrenje (Lewis, 2007).

Vezivanje proteina za led utiče na termalni histerezis, tj. inhibiciju rekristalizacije i oblik leda kristala. U rastvorima u kojima je prisutan AFP u niskim koncentracijama uočeno je drugačije ponašanje prilikom smrzavanja i topljenja u odnosu na rastvore u kojima AFP nije prisutan (slika 9). Pri koncentracijama većim od 0,1% uočeno je snižavanje temperature smrzavanja, ali se temperatura topljenja ne menja (termalni histerezis). Ovaj efekat nastaje kao posledica vezivanja za protein.

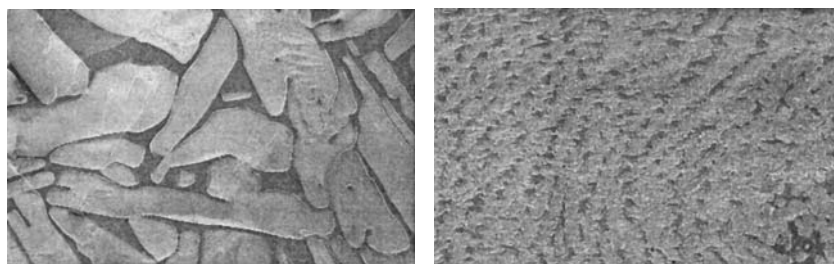
AFP, takođe, utiču na oblikovanje kristala leda u zavisnost od uslova pri kojima vezivanje nastaje. Kada se rastvor nalazi u blizini temperature topljenja dolazi do obrazovanja okruglastog oblika kristala leda. Pri nižim vrednostima, dolazi do obrazovanja drugačijih oblika, jer deo kristalne rešetke za koji se protein veže ne može da raste. Ukoliko je temperatura ispod vrednosti histerezisa, kristal naglo počinje da raste tako da protein više ne može da ga inhibira, ali i dalje može da ga oblikuje.

Zbog ovih karakteristika AFP je izazvao veliku pažnju u industriji sladoleda, gde bi njegova upotreba rešila problem rekristalizacije sladoleda i njegovu bolju održivost pri temperaturnim fluktuacijama. Takođe, mogućnost oblikovanje kristala leda u velikoj meri može da poboljša kremastu strukturu sladoleda.

Ukoliko bi se poredila dva uzorka, jedan sladoled bez AFP (standard) i drugi sa dodatkom AFP, veličina kristala leda bi bila ista (30-40 μm). Međutim, kada bi se uzorci sladoleda temperirali u intervalu od -20 do -10°C u trajanju od tri nedelje, došlo bi do značajne promene u strukturi standarda. Rekristalizacija bi bila izražena, a sladoled bi dobio zrnastu strukturu, dok bi uzorak sa AFP zadržao približno istu strukturu (Clarke i sar., 2003).

ZAKLJUČAK

Proizvodnja nemasnog sladoleda je u velikoj meri "evoluirala" u periodu od osamdesetih godina prošlog veka. Prvi proizvodi bazirali su se na dodatku većeg broja aditiva kako bi se poboljšala mrvljiva i nestabilna struktura sladoleda, koja nastaje u odsus-



Slika 9. POREĐENJE KRISTALA LEDA BEZ I SA AFP (Clarke i sar., 2003)
Figure 9. ICE STRUCTURE WITHOUT AND WITH AFP (Clarke i sar., 2003)

tvu mlečne masti. Međutim, i pored znatnih poboljšanja niskomasni i nemasni sladoled i sladoledni dezerti nisu naišli na veliki prijem kod potrošača. Senzorne karakteristike jednostavno nisu postizale efekat punomasnih proizvoda, a postojala je i odbojnost zbog velikog broja aditiva.

Danas je industrija sladoleda u mogućnosti da proizvede nemasni i niskomasni sladoled sa malim brojem aditiva, a da se postigne efekat koji daje punomasni sladoled pri konzumiranju. Primena ekstruzije pri niskim temperaturama predstavlja veliki napredak u proizvodnji sladoleda, gde se uz mala ulaganja postiže veliki pomak u kvalitetu i održivosti sladoleda. Ekstruder u kombinaciji sa "antifriz" proteinima (AFP) obezbeđuje kompaktnu mikrostrukturu sladoleda u kojoj su kristali leda, vazdušni mehurići i masne globule nekoliko puta manji u odnosu na standarni sladoled, a pri tome i održivi pri temperaturnim kolebanjima.

Danas niskomasni sladoledi i dezerti ispunjavaju prvobitnu ideju sladoleda sa manjom energetskom vrednošću koji svojim karakteristikama mogu da pariraju u potpunosti punomasnom proizvodu.

LITERATURA

- Adapa, S., Dingeldein, H., Schmidt, K.A., Herald, T.J.: Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. *J. Dairy Sci.*, 83 (2000) 2224-2229.
- Arbuckle, W.S.: *Ice cream*, fourth edition. Van Nostrand Reinhold, New York, (1986).
- Baer, R.J., Wolkow, M.D., Kasperson, K.M. (1997): Effect of emulsifiers on the body and texture of low fat ice cream. *J. Dairy Sci.* 80, 3123-3132.
- Clarke C. J., Buckley S., Lindner N.: Ice structuring proteins in ice cream, International Symposium on Ice Cream, Thessaloniki, 14-16 May 2003, Proceedings, pp. 33-44.
- D'Arcangelis, L. and Tapfer, U.: Process control scheme for cooling and heating compressible compounds. Patent application number: WO 2005/004626 A2 (2004).
- Gaonkar, A.G.: *Ingredient interactions-effects on food quality*, first edition. Marcel Dekker Inc. New York, (1995).
- Hansen, P.H.: Shaping the products of future, International Symposium on ice cream Thessaloniki, 14-16 May 2003, Proceedings, pp. 88-99.
- Hyvönen, L., Linna, M., Tourila, H., Dijksterhuis, G.: Perception of Melting and Flavour Release of Ice Cream Containing Different Types and Contents of Fat. *J. Dairy Sci.*, Vol. 86 (2003) 1130-1138.
- Jovanović, S., Mačej, O., Obradović, D., Mikuljanac A.: Savremeni pravci u proizvodnji sladoleda, IV međunarodni simpozijum "Savremeni trendovi u proizvodnji mleka", Kopaonik, 3-7 april 1995, Zbornik radova, pp. 75-77.
- Jovanović, S., Tomić, T., Mačej, D.: Uticaj procesa friziranja na kvalitet sladoleda, IV. III jugoslovenski simpozijum prehrambene tehnologije. Beograd, 4-6 februar 1998, Zbornik radova, pp. 110-114.
- Jovanović, S., Barać, M., Mačej, O., Vučić, T.: Serum proteini – tehnološko-funkcionalna svojstva. *Savremena poljoprivreda*, 56 (5) (2007) 114-125.
- Kappas, J.: Polidextrose, Fat Replacers and Functional Ingredients in Frozen Dairy Applications, International Symposium on Ice Cream, Athens, 18-19 September 1997, Proceedings, pp. 75-82.
- Kilara, A.: Fat mimetics in ice cream and frozen dessert manufacture, International Symposium on Ice Cream, Athens, 18-19 September 1997, Proceedings, pp. 65-74.
- Krog, N.: The use of emulsifiers in ice cream, International Symposium on Ice Cream, Athens, 18-19 September 1997, Proceedings, pp. 37-44.
- Lewis, D.F.: Microstructure of frozen and dairy-based confectionery products. Chapter 9, in: *Structure of dairy products*, ed. A. Tamime, Blackwell Publishing Ltd., Oxford (2007) pp. 236-257.
- Li, Z., Marshall, R., Heymann, H., Fernando, L.: Effect of milk fat content on flavour perception of vanilla ice cream. *J. Dairy Sci.* 80 (1997) 3133-3141.
- Marshall, R.T., Goff, H.D., Hartel, R.W.: *Ice cream*, sixth edition. Springer science, New York, (2003).
- Ohmes, R.L., Marshall, R.T., Heymann, H.: Sensory and physical properties of ice creams containing milk fat or fat replacers. *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 1222-1228.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture (2002), Službeni list SRJ br. 26
- Prindiville, E.A., Marshall, R.T., Heymann, H.: Effect of milk fat, cocoa butter, and whey protein replacers on the sensory properties of lowfat and nonfat chocolate ice cream. *J. Dairy Sci.*, 83 (2000) 2216-2223.
- Roland, A.M., Philips, L.G., Boor, K.J.: Effects of fat content on the sensory properties, melting, color and hardness of ice cream. *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 32-38.
- Tomić, T., Lekić, D., Mačej, O., Jovanović, S.: Važniji parametri tehnološkog procesa proizvodnje „soft“ sladoleda. Jugoslovenski mlekarSKI simpozijum "Savremeni trendovi u mlekarstvu", Zlatibor, 1-5 1998a, Zbornik radova, pp. 215-224.
- Tomić, T., Lekić, D., Mačej, O., Jovanović, S.: Specifičnosti proizvodnje ekstrudiranog sladoleda tipa „Mega“ u MDD „Frikom“, Beograd, Jugoslovenski mlekarSKI simpozijum "Savremeni trendovi u mlekarstvu", Zlatibor, 01-05 1998b, Zbornik radova, pp. 225-229.
- Tomić, T., Jovanović, S., Mačej, O.: Trendovi u proizvodnji sladoleda. *Mlekarstvo* 3 (27) (2004) 919-926.
- Tomić, T., Radojčić, D., Jovanović, S., Mačej, O.: Upotreba aroma i aditiva u proizvodnji sladoleda, Simpozijum „Mleko i proizvodi od mleka“, Tara, 6-10 april 2005, Zbornik radova, pp. 35-44.
- Tomić, T., Jovanović, S., Mačej, O.: Definisane tehnoloških parametara proizvodnje probiotskog sladoleda. *Prehrambena industrija*, 17 (1-2) (2006a) 90-95.
- Tomić, T., Jovanović, S., Mačej, O.: Characteristics of ice cream with high mineral and vitamin content, 37. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Lovran 26-29. novembar 2006, Zbornik sažetaka, pp. 16-17.
- Tomić, T., Jovanović, S., Mačej, O.: Definisane tehnoloških parametara proizvodnje light sladoleda za dijabetičare, Simpozijum „Mleko i proizvodi od mleka“, Kladovo. 09-13 maj 2007, Zbornik radova, pp. 7-9.
- Tomić, T., Jovanović, S., Mačej, O.: Definisane tehnoloških parametara proizvodnje prebiotskog sladoleda sa dodatkom prehrambenih vlakana. V simpozijum „Mleko i proizvodi od mleka“, Tara, 4-8 jun 2008, Zbornik radova, pp. 5-8.
- Yashavantkumar J.A. i Mollard M.A.: Process for producing low or non fat ice cream. Patent number: 5,215,777 (1993).
- Vega, C., Andrew, R. A., Goff, H.D.: Functionality of carageenan in ice cream mix formulations. International Symposium on Ice Cream, Thessaloniki, 14-16 May 2003, Proceedings, pp. 78-87.
- Walstra, P. and Jonkman, M.: The role of milk fat and protein in ice cream, International Symposium on Ice Cream, Athens, 18-19 September 1997, Proceedings, pp. 17-24.
- Wildmoser, H. and Windhab, E.J.: Impact of Mechanical Treatment of Ice Cream at Ultra-Low Temperature on Scoopability, Melting Behaviour and Creaminess, International Symposium on Ice Cream, Thessaloniki, 14-16 May 2003, Proceedings, pp. 159-177.
- Windhab, E.J. and Bolliger, S.: New Developments in Ice Cream Freezing Technology and Related On-line Measuring Techniques. International Symposium on Ice Cream, Athens, 18-19 September 1997, Proceedings, pp. 112-130.
- Windhab, E.J. and Wildmoser, J.: Low temperature extrusion process and device for optimized and viscosity adapted microstructuring of frozen aerated masses. Patent application number: US 2008/0254180 A1 (2008).
- www.buhlergroup.com

SUMMARY**CHARACTERISTICS OF ICE CREAM WITH LOWER FAT CONTENT**

Tanja R. Vučić, Snežana T. Jovanović, Ana Jovčić, Igor R. Zdravković

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Institute for Food Technology and Biochemistry

Popularity of ice cream is based on its highly specific sensory characteristics. However, because of high energetic value due to sugar and milk fat presence, ice cream is often criticized by nutritionists.

New nutrition trends and assortment development in ice cream industry resulted in appearance of ice cream with lower fat content, known as light ice cream. Since milk fat has a significant influence on sensory characteristics and structure of ice cream, producers had an important task to find adequate milk fat replacers. The consumer demand for low fat ice cream with characteristics similar to the standard ice cream, had to be satisfied.

By application of new ingredients such as WPC, AFP, adequate mixture of stabilizers and emulsifiers, as well as extruder application and correction of some parameters of technological production process, defects of the low fat ice cream were successfully solved.

Key words: ice cream • milk fat • extruder • AFP

VLADIMIR B. PAVLOVIĆ
 PREDRAG D. PUĐA
 GORAN A. TRPKOVIĆ
 JELENA B. MIOČINOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
 Poljoprivredni fakultet

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.3:637.07:543.456

PRIMENA TEHNIKA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U PROUČAVANJU SIREVA

U radu se analiziraju načini rada, kao i konstrukcija četiri tipa elektronskih mikroskopa: skenirajućeg elektronskog mikroskopa; krio-skenirajućeg elektronskog mikroskopa; transmisionog elektronskog mikroskopa i envajronmental skenirajućeg elektronskog mikroskopa, kao i konfokalno lasersko skenirajućeg mikroskopa, predstavnika svetlosne mikroskopije, koji se trenutno najviše koriste za analizu namirnica mlečnog porekla. Prikazane su razlike između pojedinih kategorija mikroskopije, ukazano je na prednosti i mane u pogledu analiziranja namirnica različitog porekla. Prikazane su opšte metode pripreme bioloških uzoraka za sve vidove elektronske mikroskopije, metode pripreme uzoraka sireva, kao i prikazi mikrografija. Primena elektronske mikroskopije ima značajnu ulogu u pručavanju namirnica, posebno njihove mikrostrukture. Istraživanje strukture će verovatno postati važna komponenta budućih biotehnoških istraživanja i koristiće se za posmatranje strukturalnih promena namirnica.

Ključne reči: skenirajući elektronski mikroskop • transmisioni elektronski mikroskop • envajronmental skenirajući elektronski mikroskop • konfokalno lasersko skenirajući mikroskop • sir • mikrostruktura

UVOD

Mikroskopija i ostale tehnike slikanjem su, kao jedinstveni analitički metodi iz kojih proizilaze rezultati u formi slike, najpodesnije tehnike za ocenu strukture namirnica. Mikroskopija se koristi kao važan alat za razumevanje veza koje doprinose uspostavljanju odgovarajućih fizičko-hemijskih stanja, kao i teksturalnih svojstava namirnica, kao što su: procesi koagulacije, praćenje efekata pojedinih procesa koji se primenjuju u preradi hrane (npr. toplotna denaturacija proteina), posmatranje uljne faze posle zagrevanja i rastezanja sireva parenog testa i sl. U pojedinim slučajevima, tehnike mikroskopije mogu biti korišćene i za praćenje procesa koji dovode do pojave posebnih struktura (pene, emulzije, disperzije, ekskrudata i vlakana) (Kalab, Allan-Wojtas, Miller 1995).

Mikroskopija je našla široku primenu u pručavanju i analiziranju strukture sireva, čime se dobija jasnija slika u pogledu elemenata koji sačinjavaju njihovu strukturu, dobijaju se informacije o stvarnom izgledu tih elemenata i njihovoj međusobnoj povezanosti, kao i mogućnost da se posmatraju promene mikrostrukture sirnog testa tokom zrenja (Claverie, Casanove 1998, Everett, Auty 2008, Kalab et al. 1995, Guinee et al. 1995, Pudja 1992). U tom smislu, mikroskopija ima jako veliku važnost pri kreiranju tehnoloških postupaka, u cilju dobijanja kvalitetnijih i u tehnološkom i senzornom smislu prihvatljivijih proizvoda.

U ovom radu izložene su najosnovnije informacije o konstrukciji i načinu rada četiri tipa elektronskih mikroskopa (skenirajućeg, krio-skenirajućeg, transmisionog i envajronmental

skenirajućeg elektronskog mikroskopa), kao i konfokalno lasersko skenirajućeg mikroskopa (predstavnika svetlosne mikroskopije), zatim pet tipova mikroskopa koji se trenutno najviše koriste za analizu namirnica mlečnog porekla. Prikazane su razlike između pojedinih tipova mikroskopije, ukazano je na prednosti i nedostatke u pogledu ispitivanja namirnica različitog porekla. Prikazane su metode pripreme bioloških uzoraka, uopšteno za sve vidove elektronske mikroskopije, kao i metode pripreme uzoraka sireva za pojedine tipove mikroskopije.

TIPOVI ELEKTRONSKIH MIKROSKOPA

Podela elektronske mikroskopije (EM) izvršena je na dva glavna tipa - transmisioni elektronski mikroskop (TEM) i skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Međutim, kombinovanjem ove dve tehnike međusobno, kao i kombinovanjem sa nekim drugim tehnikama, realizovano je više tipova EM, tako da je klasifikacija tehnika na određene kategorije EM prilično teška. Pored ova dva glavna tipa EM, opisani su još neki tipovi mikroskopa koji imaju veći značaj u ispitivanju namirnica:

Skenirajući elektronski mikroskop

SEM je tip elektronskog mikroskopa koji ispituje, odnosno slika površinu uzorka skenirajući je sa visokoenergetskim snopom elektrona (www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope). Elektroni intereaguju sa atomima koji sačinjavaju uzorak, proizvodeći signal koji sadrži informaciju o topografiji površine uzorka, kompoziciji i drugim osobinama, kao što je električna provodnost.

Adresa autora:
 Prof. dr Vladimir B. Pavlović, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun
 tel.: 011/2615-315/lok 445; 062/82-57-102
 e-mail: vpavlovic@sbb.rs

Proučavanje evolucije mikrostrukture primenom skenirajuće elektronske mikroskopije vrši se domenskom analizom, kao i analizom mikrostrukturnih konstituenata poput oblika i srednje veličine zrna, pora, kao i njihovog međusobnog rasporeda (Živković i sar. 1999, Ivetić i sar. 2008, Pavlović i sar. 2007a). Kvantitativna analiza raspodele veličina zrna uzorka može se obaviti korišćenjem linearne metode merenja odsečaka koje pravi testna linija sa granicama zrna, kao i primenom specijalnih metoda za automatsku mikrostrukturnu analizu (Pavlović i sar. 2006, Mitić i sar. 2004). Kod ove vrste analiza, da bi se izbeglo nagomilavanje negativnog naelektrisanja na površini uzorka, a koje skretanjem primarnih i emitovanih elektrona može dovesti do gubljenja slike, površina uzorka se prekriva tankim slojem zlata debljine 30-40 nm (Pavlović i sar. 2001).

Uporedo sa mikrostrukturnom analizom, primenom energijske disperzione spektrometrije (EDS analiza), može se vršiti i kvalitativna analiza pojedinih faza, prisutnih u mikrostrukтури (Mitić i sar. 2008, Pavlović i sar. 2007b). Za ovu vrstu ispitivanja koristi se EDS sistem koji je povezan sa elektronskim mikroskopom i kompjuterizovanim multikanalnim analizatorom (MCA). Ovakav tip analizatora omogućava analizu u oblasti x zračenja od 0,5 do 20 keV sa 10 V po kanalu.

SEM funkcioniše tako što elektronski top stvara elektronski snop koji prolazi kroz tri sistema sočiva pre nego što pogodi uzorak. Prvo prolazi kroz kondenzore (sočiva za kondenzovanje), koji fokusiraju elektrone u uzak snop, pa kroz skenirajući navoj koji omogućava da snop skreće, odnosno da šeta po površini uzorka, i objektiv (sočiva objektivna) koja pomaže u fokusiranju slike. Usmereni snop pogađa uzorak što dovodi do stvaranja nekoliko tipova naknadnih emisija. Emisije se prihvataju detektorom koji ima za cilj da pojača signale i da ih oblikuje u odgovarajuće slike na kompjuteru. Slika sa SEM-a se zasniva na elektronskim interakcijama na površini uzorka. SEM pruža mogućnost dobre 3D prezentacije strukture uzorka. Slike su crno-bele.

Kod SEM-a koristimo niske napone ubrzanja da sprečimo penetraciju snopa u uzorak, pošto se zahteva stvaranje sekundarnih elektrona sa površine uzorka. Stoga je za biološke uzorke uobičajeno da se koristi napon

od oko 1-5 kV i, ako je SEM sposoban, da koristi napone i do 30 kV.

U zavisnosti od vrste skenirajućeg elektronskog mikroskopa moguće je detektovati dve vrste signala na osnovu kojih se formira slika površine ispitivanog uzorka. Ovi signali potiču od sekundarnih i rasejanih elektrona: Sekundarni elektroni (eng. secondary electrons) - (SE) – elektroni koji su izbačeni iz K-orbitale uzorka neelastičnom interakcijom sa elektronskim zrakom. Oni imaju veoma malu energiju, manju od 50 eV, i mogu da prikažu detalje veličine od 1-5 nm. Ovi zraci, zbog svoje male energije, mogu veoma malo da se udalje od površine uzorka, pa kao rezultat toga daju najbolju rezoluciju slike. Zbog načina na koji je slika formirana, SEM mikrofotografiji imaju veliku dubinu posmatranja, tako da može da se dobije 3D slika, korisna za razumevanje površinske strukture uzorka. Moguć je širok opseg uveličanja, od 25 do 250.000x, što je za oko 250x više nego kod najboljih svetlosnih mikroskopa.

Rasejani elektroni (eng. backscattered electrons) - (BSE) su elektroni iz elektronskog snopa koji su rasejani sa uzorka elastičnim sudarom sa atomima uzorka. Oni imaju veliku energiju, koja u zavisnosti od napona ubrzanja, može varirati od 50 eV pa na više. Rasejani elektroni, koji potiču od teških elemenata (elemenata sa velikim atomskim brojem), imaju veću jačinu od elektrona koji potiču od lakih elemenata (elemenata sa malim atomskim brojem). Na ovaj način dolazi do jasne slike sa kontrastom, koji može da prikaže različite hemijske kompozicije. Njihova visoka energija rezultuje u većem specifičnom intenzitetu interakcije i time smanjuje rezoluciju slike nastale na ovaj način.

SEM i TEM su se pokazali korisnim u ispitivanju malih strukturalnih elemenata u siru, kao što su mikroorganizmi i kazeinski matriksi, kao i za posmatranje delimičnih promena koje se dešavaju na matriksu tokom proizvodnje i zrenja.

SEM se koristi za površinsku analizu uzorka, poseduje mogućnost visoke rezolucije, naročito pri posmatranju kazeinskog matriksa i masnih kapi, ali se u pojedinim slučajevima, zbog opsežne pripreme uzorka, proteini i masne kapi ne mogu videti sa sigurnošću (Noronha et al. 2008).

Transmisioni elektronski mikroskop TEM je tip elektronskog mikroskopa kod koga se slika formira na drugačiji način u odnosu na SEM.

Elektronski snop prolazi kroz kondenzor koji ga fokusira, a zatim pogađa ultra tanak, za elektrone poluprovodan uzorak intereagujući sa njim, dok prolazi kroz njega. Ideja za TEM nastala je od pretpostavke da elektronski snop, pored čestične, poseduje i talasnu prirodu, a da se uzorak ponaša kao difrakciona rešetka. Signal koji se detektuje i koji nosi informaciju o strukturi uzorka potiče od propuštenih (transmitovanih) elektrona (za razliku od SEM-a, kod koga potiče od SE i BSE). Signal se pojačava serijom magnetnih sočiva i fokusira na odgovarajući uređaj za stvaranje slike, kao što su fluorescentni ekran, sloj fotografskog filma ili senzor osetljiv na svetlo - CCD kamera (eng. charged-cupled device) (www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron-microscopy). Za razliku od SEM-a, koji se koristi za ispitivanje površine, TEM se koristi za ispitivanje unutrašnje strukture uzorka.

Elastična interakcija je veoma jaka, tako da debljina uzorka mora da bude veoma mala. Debljina povećava elektronsku energiju. Stoga, ukoliko želimo da umanjimo neelastične interakcije, uzorak ne sme biti deblji od 1 μ m. Za konvencionalni TEM debljina uzorka od oko 100 - 300 nm je dobra, dok veoma velika rezolucija, tzv. 'atomska rezolucija slike' zahteva debljinu ispod 10 nm (Claverie, Casanova 1998). Sposobnost da odredi poziciju atoma u materijalu, čini TEM nezamenljivim instrumentom u nanotehnološkim istraživanjima, uključujući heterogenu katalizu, kao i razvoj tehnološkog postupka proizvodnje poluprovodnika za elektroindustriju.

Rezolucija TEM-a je za red veličine bolja od rezolucije SEM-a, mada je u biološkim naukama priprema uzorka ta koja i dalje ograničava rezoluciju mikroskopa više od njega samog. Slike TEM-a su 2D, ali ako slikamo pod različitim uglovima i obradimo tu seriju pod određenim kontrastnim uslovima, možemo dobiti i 3D prezentaciju uzorka. Slike su crno-bele.

TEM se koristi za posmatranje unutrašnje strukture uzorka i najčešće poseduje mogućnost bolje rezolucije u odnosu na SEM. Međutim, u pojedinim slučajevima visoka rezolucija može biti i neadekvatna, jer su upravo mikrofotografije sa finom rezolucijom nepodesne za makroskopsku identifikaciju nekih materijala kao što je mast.

Envajromental skenirajući elektronski mikroskop (ESEM)

ESEM je tip skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Njegova glavna prednost leži u tome što analitičar može da menja okolinu (okruženje) uzorka putem različitih vrednosti pritiska, temperature i sastava atmosfere. ESEM zadržava sve prednosti konvencionalnog SEM-a, ali uklanja ograničenje visokog vakuuma u okruženju uzorka. U tom smislu, mokri, masni, prljavi, neprovodni uzorci mogu da se ispituju u njihovom prirodnom stanju, bez modifikacija ili pripreme.

Kroz celu kolonu (deo mikroskopa kroz koji prolazi snop, pre nego što pogodi uzorak) gde molekuli gasa mogu da raseju elektrone i unište snop, prisutan je visoki vakuum. Međutim, umesto korišćenja jednog otvora za kontrolu pritiska, kao kod konvencionalnog SEM-a, ESEM, da bi razdvojio komoru uzorka od kolone, koristi višestruke otvore za kontrolu pritiska.

ESEM koristi odgovarajući sekundarni detektor (eng. environmental secondary detector - ESD), koji funkcioniše u nevakuumskoj sredini, za razliku od Evrhart-Tonli (eng. Everhart-Thornley (ET) detektora korišćenog kod SEM-a.

Primenjujući pozitivan potencijal od nekoliko hiljada volti na detektor, SE ubrzavaju u polju detektora i sudaraju se sa molekulima gasa. Rezultujuća jonizacija stvara dodatne elektrone, pojačavajući originalan signal SE i pozitivnih jona. Detektor sakuplja signale SE i propušta ih direktno do elektronskog pojačavača. Kod neprovodnih uzoraka pozitivni joni, nastali u procesu jonizacije gasa, privučeni su ka površini uzorka i dobro sprečavaju naelektrisanje.

Prednosti ESEM-a nad konvencionalnim SEM-om zaista su velike (www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf):

1. Gasna jonizacija u komori za uzorak eliminiše naelektrisanje, koje je uobičajeno prisutno kod neprovodnih uzoraka, tako da nije potrebno da se uzorci naporavaju provodnim slojem, čime se ujedno sprečava i moguće oštećenje uzorka u toku pripreme.

2. ESEM može da slika mokre, prljave i masne uzorke. Kontaminacija neće oštetiti ili umanjiti kvalitet slike.

3. ESEM eliminiše potrebu pripreme uzorka i omogućava posmatranje

uzorka u procesima obrade, kao što su istezanje, sabijanje, deformacija, adhezija, zagrevanje, hlađenje, smrzavanje, topljenje, hidratacija, dehidratacija i sublimacija.

4. ESEM može da oformi sliku od uzorka zagrejanog i na 1500°C, zato što je ESD neosetljiv na toplotu.

5. ESD je takođe neosetljiv na svetlo, svetlost od toplotom usijanih uzoraka, katodoluminiscenciju i fluorescenciju, tako da ovakvi efekti ne ometaju kvalitet slike.

6. ESEM na većem naponu ubrzanja može da koristi i signal od x-zraka izolovanih uzoraka.

Mikroskopija pri niskoj temperaturi

Prethodno opisani tipovi mikroskopa (SEM, TEM i ESEM), u slučajevima kada je potrebno da se uzorak stabilise na temperaturi tečnog azota, imaju svoje modifikacije. Naime, modifikacija se ogleda u tome što se mikroskopima dodaje još jedan segment - tzv. krio komora, koja služi da se uzorak posle kriofiksacije održi na niskoj temperaturi. Ovako modifikovani SEM, TEM, odnosno ESEM nazivaju se LT-SEM (eng. low temperature SEM), LT-TEM, odnosno LT-ESEM, mada se često koriste i nazivi Krio-SEM, Krio-TEM i Krio-ESEM, koji označavaju da je uzorak stabilisan tehnikom kriofiksacije.

Konfokalni lasersko-skenirajući mikroskop (CLSM)

CLSM, koji se ponekad u literaturi označava i skraćenicom CSLM, ne pripada EM, već svetlosnoj mikroskopiji, ali je obrađen u radu zbog njegove česte upotrebe kod ispitivanja bioloških uzoraka i namirnica.

CLSM je jedan od tri komercijalno dostupna tipa konfokalne mikroskopije. To je tehnika za dobijanje slike visoke rezolucije sa dubokom selektivnošću. Za neprozirne uzorke korisna je za pripremanje površinskih profila, dok se kod prozirnih koristi za slikanje unutrašnjosti strukture. CLSM, za razliku od standardne konfokalne mikroskopije, kao izvor svetlosti koristi laserski zrak koji skenira tačku po tačku trodimenzionalne površine. Za biološke uzorke najčešće se koristi fluorescentno obeležavanje uzoraka. Zbog očuvanja intenziteta svetlosti koja se transportuje, svi delovi uzorka na optičkom putu su eksitovani, a fluorescencija se detektuje fotodetektorom ili kamerom (www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning-microscopy).

wiki/Confocal_laser_scanning-microscopy).

CLSM nudi nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalni svetlosni mikroskop, uključujući i poboljšanu rezoluciju (oko 0.2 nm), sposobnost da se optička sekcija spusti u uzorak, pribor da se 2D mikrofografije prevedu u 3D slike, kao i fluorescentno obeležavanje, kako bi se ispitala interakcija i relativna lokacija različitih komponenti u namirnicama (Everett, Auty 2008).

Proučavanja CLSM-om omogućila su ispitivanje strukture masnih kapi, geliranje mleka, topljenje sira, propustljivost gela mleka, efekat čedarizacije i parenja na stapanje masnih kapi u čedru, odnosno mocareli, lokalizaciju ćelija startera, odnosno probiotskih bakterija u siru, lokalizaciju EPS-a u siru itd. Područje analize hrane u kome CLSM pokazuje najviše prednosti, je ispitivanje visokomasnih namirnica koje je teško pripremiti za konvencionalnu mikroskopiju, a da se pri tome zadrži faza masti. Naime, u pripremi ovakvih uzoraka fiksacija i dehidratacija su često nepotrebni. CLSM je korisna tehnika za ispitivanje strukture namirnica, zato što nije ograničena na tanke uzorke. Omogućava procenu prostornog rasporeda strukturalnih komponenata, kao i praćenje dinamičnih procesa kao što su povezivanje, agregacija i separacija faza i njihovo upoređivanje sa rezultatima reoloških merenja. Pored navedenih prednosti, značajno je napomenuti i mogućnost rekonstrukcije neporemećene 3D mikrostrukture i njenog konstantnog praćenja, kao i fluorescentnog obeležavanja i identifikacije specifičnih komponenata unutar sistema.

TEHNIKE PRIPREME UZORAKA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Materijal koji bi trebalo da se analizira EM, generalno zahteva odgovarajući postupak pripreme uzorka. Specifičan pristup tokom pripreme uzorka je neophodan zbog toga što je celokupna unutrašnjost mikroskopa pod visokim vakuumom, pa neodgovarajuće pripremljen materijal može da onemogući elektronski snop da putuje pravolinijski. Takođe, za sliku na SEM-u, da bi se sprečila akumulacija električnog naboja na površini, uzorci moraju biti bar na površini elektroprovodni i električno uzemljeni. Neprovodni uzorci imaju težnju da se naelektrisu pri skeniranju elektronskim snopom, naročito u fazi detekcije SE, što izaziva greške u skeniranju, koje se odražavaju na kvalitet slike.

Tehnike koje se koriste u metodama za pripremu uzoraka za elektronsku mikroskopiju su (www.jic.ac.uk/microscopy/intro/EM.html):

Seciranje – priprema tankih slojeva uzorka. Za svetlosnu mikroskopiju seciranjem se može obezbediti uzorak debljine od nekoliko μm , ali za elektronsku mikroskopiju uzorci moraju biti veoma tanki, tako da su poluprovodni za elektrone, tipično oko 90 nm debljine. Ovi ultratanki preseki za elektronsku mikroskopiju se vrše na uređaju zvanom - ultramikrotom (engl. ultramicrotome).

Fiksacija – uopšteni termin korišćen da opiše proces očuvanja uzorka, a ukoliko se radi o biološkom uzorku da ga i stabilise i zaštiti od daljeg kvarenja. Na ovaj način je omogućeno da se posmatranje uzorka vrši što bliže njegovom prirodnom stanju. U hemijskoj fiksaciji za EM, najčešće se koristi glutaraldehyd - da poveže proteinsku strukturu, odnosno osmium tetroksid - da očuva lipide.

Dehidracija – uklanjanje vode iz uzoraka. Voda se generalno zamenjuje organskim rastvaračima, kao što je etanol, ili aceton, kao oslonac za totalno isušivanje za uzorke SEM-a, ili za učvršćivanje uranjanjem u smolu za uzorke TEM-a.

Učvršćivanje – uranjanje uzorka u vosak (za svetlosnu mikroskopiju), odnosno u smolu, kao što je araldit ili LR belo (za TEM), koje onda polimerizuju u tvrdi blok, čime se praktično omogućava ponovno seciranje, kao naredna faza pripreme uzorka.

Bojenje – bojenjem uzoraka teškim metalima (najčešće se koriste olovo ili uranijum), povećava se elektronska gustina, koja rezultira u povećanju broja interakcija između elektrona u elektronskom snopu i onih u uzorku, čiji naknadni signal uzrokuje kontrast na rezultujućoj slici.

Sušenje – predstavlja dodatno isušivanje uzorka u posebnoj sušnici (eng. critical point drier) do njegove kritične tačke.

Naparavanje – ultratanak premaz elektro-provodnog materijala nanosi se naparavanjem u uređaju za naparavanje (eng. sputter coater). Ovo se radi u cilju zaštite naboja uzorka, koji se javlja zbog akumulacije statičkog električnog polja, izazvanog zračenjem elektrona tokom slikanja. Takođe, povećava se iznos SE koji mogu biti detektovani sa površine uzorka na SEM-u, a time dolazi i do pojačavanja signala. Naparavanje se vrši

zlatom, kombinacijom zlato/paladijum, platinom, odnosno hromom.

Kriofiksacija – brzo smrzavanje uzorka potapanjem u tečni azot, najčešće na temperaturama od -197°C do -210°C . Posle kriofiksacije uzorak se stavlja u krio komoru mikroskopa, koja je pod vakuumom, da bi mu se održala niska temperatura i da bi se sprečilo odmrzavanje. Polje EM pod niskom temperaturom, zasniva se na primeni ove tehnike koja ujedno omogućava da se izbliza virtuelno posmatra bilo koji biološki uzorak, što bliže njegovom prirodnom stanju.

Hladno-prelamanje i hladno-nagrizanje (graviranje) – tehnika pripreme, posebno korisna za ispitivanje lipidnih membrana i proteina inkorporiranih u njih. Sveže tkivo, ili suspenzija ćelija brzo se zamrzava kriofiksacijom i prelama, dok se održava na temperaturi tečnog azota. Hladno prelomljena površina se nagriža (gravira) povišenjem temperature na oko -95°C u toku nekoliko minuta, da se dopusti površini leda da sublimira i 'otkrije' mikroskopske detalje. Za SEM, uzorak je na ovaj način pripremljen za posmatranje. Za TEM on može biti naparen platinom u visokovakuumsom isparivaču pod niskim uglom (tipično oko 6°), a zatim se dodatno naparava ugljenikom, normalno na površinu, čime se omogućava dobijanje kopije uzorka. Uzorak se potom vraća na sobnu temperaturu i pritisak, a ekstremno krhka metalna kopija izlomljene površine odvaja se od osnovnog biološkog materijala pažljivom hemijskom digestijom sa kiselinama, hipohloritnim rastvorom ili SDS detergentom. Kopija se zatim pere od zaostalih hemikalija, suši i posmatra pod TEM-om.

Inkapsulacija – tečni uzorci, kao i uzorci koji podležu dezintegraciji tokom pripreme za EM, zapečaćuju se u agar gel kapsule, da bi sa njima moglo da se rukuje kao sa čvrstim materijalom. Staklena Pasterova pipeta, spoljnog prečnika 1 mm, sterilise se plamenom. Agar (25g/l) se drži na 40°C i nekoliko kapi se stavlja na staklenu površinu da bi očvrstlo. Uzorak (npr. mleko ili pavlaka) uvlači se u pipetu (5 – 10 mm) i donji deo se zatvara malom količinom agra. Kapilara sa uzorkom se onda stavlja u vruć agar, da bi se oko nje napravio zid 0.5 mm debljine. Uzorak se potom premešta u rukavac od agra i gornji kraj se zatvara kapljicom agra. Inkapsulirani uzorci se fiksiraju glutaraldehydom i postfiksiraju osmijum tetroksidom, a potom dehidrišu u seriji etanola 20,

40, 60, 80 i 96 ml/100 ml (Kalab, Larocque 1996).

Korišćenje odgovarajućih tehnika je uslovljeno izborom tipa mikroskopa koji će se koristiti pri ispitivanju namirnica.

METODE PRIPREME UZORAKA SIRA ZA ELEKTRONSKU MIKROSKOPIJU

Metode pripreme uzoraka za SEM i TEM izložene su u tabeli 1, dok su postupci za ostala tri tipa EM prikazani u narednom tekstu.

Seciranje kao početna tehnika u pripremi uzoraka, malo se razlikuje u zavisnosti od tipa mikroskopa. Uzorci se iz centra sirnog bloka seku na kockice koje bi za TEM trebalo da budu do 1 mm po stranici, dok su za ostale metode uzorci nešto veći, uobičajeno 1 – 2 mm po stranici.

Krio-SEM:

Secirani uzorci se postavljaju na bakarni držač i zajedno sa njim kriofiksiraju na -210°C . Potom se premeštaju u krio komoru na -180°C , gde se unutrašnjost uzorka razotkriva koristeći skalpel. Polomljena površina se nagriža (gravira) povišenjem temperature na -88°C u trajanju od 5 do 40 min (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Kada je sublimirano dovoljno vode, uzorak se hladi na -180°C (Noronha et al. 2008), odnosno na -95°C (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Potom se u krio komori naparava zlatom (3 mA, 2 min) i ispituje koristeći napon od 10 kV (Montesinos-Herrero et al. 2006, Noronha et al. 2008), odnosno 3 kV (Hassan, Frank, Elsoda, 2003).

ESEM:

Za ovaj tip mikroskopa gotovo da nije potrebna nikakva priprema uzoraka. Oni se posle seciranja odmah postavljaju u mikroskop i posmatraju pod naponom od 20 kV (Noronha et al. 2008).

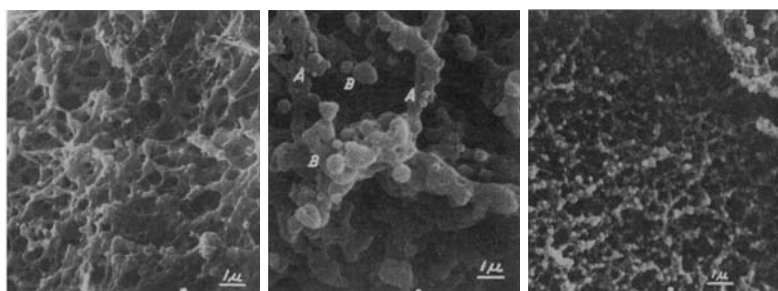
CLSM:

Uzorci kod kojih se prevashodno posmatra masna faza boje se 0,2 % rastvorom Nil plavog (engl. Nile Blue), koji sadrži tragove fluorescentne boje Nil crveno (engl. Nile Red), za bojenje masne faze (Ye, Hewitt 2009), dok se uzorci kod kojih se posmatra proteinska faza boje 0.2% rastvorom Nil plavog u toku 5 min. i 0,2 % brze zelene (engl. Fast Green FCF), koja boji proteinsku fazu.

Tabela 1. METODE PRIPREME UZORAKA ZA SEM I TEM
Table 1. METHODS OF SAMPLES PREPARATION FOR SEM AND TEM

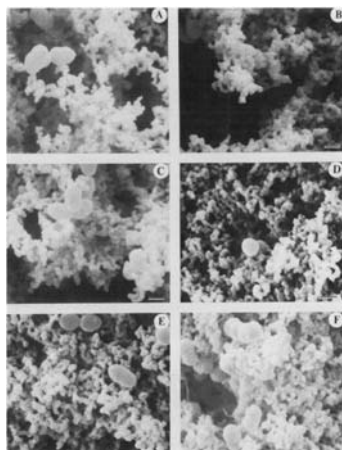
Tip mikroskopa, metode i referencije	Tehnike pripreme uzoraka										Napona ubrzanja
	Fiksacija	Postfiksacija	Dehidracija	Učvršćivanje	Bojenje	Obzmatšćivanje	Smrzavanje	Sušenje	Naparavanje	Napona ubrzanja	
SEM	Metod 1 (Meng, Sundaram 2009)	2,8g/100g Glutaraldehida u 0,05 mol/l Na-fosfatnog pufera pH 6,00, 48h, 7°C	-	Graduisana serija etanola (2,5, 50, 70, 80, 95, 100, 100 i 100 ml/100ml), 15 min	-	-	Hloroform, 3x po 15 min; apsolutni etanol, 10 min	Tečni azot -196°C; prelamanje; otapanje u apsolutnom etanolu	Sušenje do kritične tačke	Naparavanje zlatom	10 kV
	Metod 2 (Kanani et al. 2009)	2,5% (w/v) Glutaraldehida 3h, <10°C	-	-	-	-	-	Tečni azot -196°C; prelamanje	-	-	20 kV
	Metod 3 (Tavaria et al. 2006)	Formyl saline solution	-	Graduisana serija etanola (10 - 100%), 10 min	-	-	-	-	-	-	20 kV
TEM	Metod 1 (Kheudir et al. 2002)	0,05 % (w/v) Glutaraldehida u 0,1M Na-kakodilatnom puferu pH 7,2, 2h, 4°C; 2,5 % paraformaldehida, u 0,1M Na-kakodilatnom puferu pH 7,2, preko noći, 4°C; ispiranje Na-kakodilatnim puferom, 4x po 10 min	1% (w/v) Osmijum tetroksida u teroksid, 2h, 4°C; ispiranje Na-kakodilatnim puferom, 4x po 10 min	-	-	Uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	-	80 kV
	Metod 2 (Wium et al. 2003)	30g/l Glutaraldehida u 0,1M acetatnom puferu pH 4,6, 1h; ispiranje acetatnim puferom, 2x	(10g/l) Osmijum tetroksida u acetatnom puferu, 90 min u mraku; ispiranje acetatnim puferom, 2x	Graduisana serija etanola (30, 50, 70, 80, 95 i 100%)	Epon 812, (polimerizacija 48h, 65°C)	20g/l Uranyl acetat i 26,4g/l olovo citrat	-	-	-	60 kV	
	Metod 3 (Dabour et al. 2005)	Fiksativna mešavina*, 4°C, preko noći; ispiranje kakodilatnim puferom sa 0,15% rutenijum crvenim	1% (w/v) Osmijum tetroksid u kakodilatnim puferu sa 0,15% rutenijum crvenim, preko noći, 4°C; ispiranje u istom puferu	-	-	1% Toluidin plavo, uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	80 kV	
	Metod 4 (Iamime et al. 1999)	28g/kg Glutaraldehida; ispiranje sa 0,05 mol/l veronal-acetatnim puferom pH 6,75	20g/l Osmijum tetroksida u 0,05 mol/l veronal-acetatnom puferu pH 6,75, 2h; ispiranje u istom puferu	Sparovano nisko viskozno učvršćujuće sredstvo	-	Uranyl acetat i olovo citrat	-	-	-	60 kV	

Fiksativna mešavina*: 0,05% (v/v) Glutaraldehida; 2,5% (w/v) paraformaldehida; 2mM kalcijum hlorida; 1% (w/v) saharoze; 0,15% (w/v) rutenijum crvenog u 0,1 M matrijum kakodilatnom puferu, pH 7,2



Slika 1. SEM MIKROGRAFIJE STRUKTURE (SA LEVA NA DESNO) SIRIŠNO, KISELO-TOPLOTNO, ODNOSNO TOPLOTNOKOAGULISANOG GELA, FIKSIRANOG GLUTARALDEHIDOM, A – ČESTICE VELIČINE KAZEINSKIH MICELA, B – KRUPNE ČESTICE (VEĆE OD 1 μm). UVEĆANJE 6.000X.

Figure 1. SEM MICROGRAPHS OF THE STRUCTURE (FROM LEFT TO RIGHT) RENNED, ACID-HEAT AND HEAT-INDUCED GELS, RESPECTIVELY FIXED WITH GLUTARALDEHYDE, A - PARTICLES OF THE SIZE OF CASEIN MICELLES; B - LARGE PARTICLES (UP TO 1 μm). MAGNIFICATION 6.000X



Slika 2. SEM MIKROGRAFIJE: FAZE PROIZVODNJE SIRIŠNOKOAGULISANOG KOTIDŽ SIRA: A – RANI GEL; B – GEL NEPOSREDNO POSLE SEČENJA; C – GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 40°C; E – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 50°C; F – GEL NA KRAJU DOGREVANJA (55°C). UVEĆANJE 6.500X, LINIJA PREDSTAVLJA 1 μm .

Figure 2. SEM MICROGRAPHS: STAGES OF MANUFACTURE OF CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: A - EARLY GEL; B - AFTER CUTTING; C - END OF HEALING; D - DURING COOKING AT 40°C; E - DURING COOKING AT 50°C; F - END OF COOKING 55°C. MAGNIFICATION 650X, BAR REPRESENTS 1 μm .

Posle bojenja, uzorci se ispiraju destilovanom vodom i stavljaju na držače koji ne sadrže nikakvo fluorescentno sredstvo. Ar/Kr laser se koristi da pobudi Nil crvenu boju na 488 nm, odnosno Nil plavu boju na 568 nm (Buffa et al. 2001).

PRIMENA ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE U PROUČAVANJU SIREVA

Proučavanje koagulacije mleka i karaktera gela

Koagulacija mleka predstavlja prvu fazu u postupku proizvodnje sireva (Puđa, 2009). Način koagulacije mleka veoma bitno utiče na strukturu formiranog gela. Na slici 1 prikazane su SEM mikrografije gelova dobijenih

sirišnom (a) kiselotoplotnom (b), odnosno toplotnom (c) koagulacijom mleka (Kalab, Harwalker).

Sirišnokoagulišući gelovi sastoje se od velikog broja dugačkih lanaca. Ovi gelovi pokazuju strukturu neujednačene kompaktnosti, što je verovatno rezultat niskog sadržaja čvrstog materijala u gelu.

Kiselotoplotnokoagulišući gelovi se odlikuju grubljom strukturom. Gradivne jedinice gela su nekoliko puta veće u odnosu na dimenzije kazeinskih micela (slika 1, prikaz u sredini). Međutim, na mikrografiji se uočavaju i pozicije sa nepromenjenim dimenzijama kazeinskih micela (slika 1, prikaz u sredini). Porast volumena kazeinskih micela, otprilike od 100–300 μm , verovatno nastaje kao rezultat toplot-

nog tretmana mleka. Bitan momenat u nastanku gela je način na koji se čestice povezuju. Čestice formiraju deblje lance, zajedno sa sveričnim fragmentima različitih veličina vezanih za ove lance, što sve zajedno doprinosi nastanku udebljanih lanaca matriksa.

Toplotnokoagulišući gelovi sastoje se od kazeinskih micela povezanih kratkim i tankim lancima - mostovima (slika 1, desno).

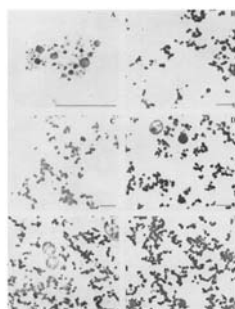
Proučavanje formiranja sireva

SEM mikrografije na slici 2 prikazuju razlike u strukturi uzoraka kotidž sira tokom pojedinih faza postupka izrade. Primećuje se mali obim promena u poroznosti sve do početka faze dogrevanja, gde se klastiranje i umrežavanje klastera primetno povećava. Zbog afiniteta micela jednih prema drugima, lanci i veze se prekidaju na najslabijim mestima. Remecenje grušta tokom sečenja, takođe favorizuje prekidanje lanaca i veza i povećava klastiranje, tako da umrežene veze više nisu toliko evidentne (B i C). Tokom dogrevanja susedne micelle se sve više agregiraju i često menjaju oblik iz sveričnog u eliptični izgled (D). Promene u poroznosti su mnogo očiglednije ako se posmatraju slike sa TEM-a (slika 3).

SEM mikrografija na slici 4 prikazuje da su strukture gelova pri proizvodnji kotidž sira kod kisele koagulacije (leva kolona) slične gelovima kod sirišne koagulacije (desna kolona). Razlike su očigledne samo u ranim fazama koagulacije, što se na mikrografijama uočava kao intenzivnije stvaranje lanaca kiselokoagulisano gela (Gel A) u odnosu na sirišnokoagulisano gel (Gel B). U ostalim fazama ne uočavaju se značajne razlike u strukturi posmatranih gelova. Posmatranjem dimenzija na pojedinim mikrografijama uočava se da se kazeinske micelle, kao i nagrađeni agregati uvećavaju tokom izrade u tri značajno različite faze. Dimenzije micela, odnosno lanaca matriksa su: 87,6 nm (u mleku), 181,6 nm (tokom rane faze koagulacije), 184,9 nm (pre početka dogrevanja), 206,1 nm (tokom dogrevanja), odnosno, 207,6 nm (na kraju dogrevanja) (Glaser et al. 1979).

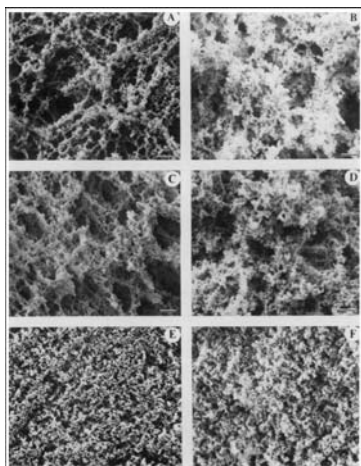
Proučavanje strukture sira mocarele tokom zrenja i lagerovanja

Slika 5 prikazuje mikrostrukturu defrostirane mocarele 2, 7, odnosno



Slika 3. TEM MIKROGRAFIJE: A – MLEKO; B-F FAZE U PROIZVODNJI SIRIŠNOKOAGULISANOG KOTIDŽ SIRA: B – GEL POSLE SEČENJA; C – GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 40°C; E – GEL TOKOM DOGREVANJA NA 50°C; F – GEL NA KRAJU DOGREVANJA (55°C). UVEĆANJE: A - 37.000X; B-F 10.000X. LINIJA PREDSTAVLJA 1 µm.

Figure 3. TEM MICROGRAPHS: A – MILK; B-F STAGES OF MANUFACTURE OF CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: B - AFTER CUTTING; C - END OF HEALING; D - DURING COOKING AT 40°C; E - DURING COOKING AT 50°C; F - END OF COOKING 55°C. MAGNIFICATION: A -37.000X; B-F 10.000X. BAR REPRESENTS 1 µm.



Slika 4. SEM MIKROGRAFIJE FAZA U PROIZVODNJI KOTIDŽ SIRA DOBIJENIH KISELOM, ODNOSNO SIRIŠNOM KOAGULACIJOM: A – RANI KISELOKOAAGULISANI GEL; B – RANI SIRIŠNOKOAGULISANI GEL; C – KISELOKOAAGULISANI GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; D – SIRIŠNOKOAGULISANI GEL NEPOSREDNO PRE DOGREVANJA; E – KISELOKOAAGULISANI GEL TOKOM DOGREVANJA; F – SIRIŠNOKOAGULISANI GEL TOKOM DOGREVANJA. UVEĆANJE 1.300X, LINIJA PREDSTAVLJA 5 µm.

Figure 4. SEM MICROGRAPHS STAGES IN MANUFACTURE OF ACID SET AND CULTURE SET CURD OF COTTAGE CHEESE: A - ACID SET EARLY GEL; B - CULTURE SET EARLY GEL; C - ACID SET GEL AFTER HEALING; D - CULTURE SET CURD AFTER HEALING; E – ACID SET CURD DURING COOKING; F - CULTURE SET CURD DURING COOKING. MAGNIFICATION 1.300X, BAR REPRESENTS 5 µm.

14 dana posle proizvodnje (Meng, Sundaram 2009).

Dva dana posle proizvodnje na slici 5 A se uočava veliki broj nepravilnih šupljika, raspoređenih nasumično kroz proteinski matriks. Unutar šupljika uočavaju se lanci bakterija, a zidovi šupljika su teksturirani velikim brojem nazubčenja, što je verovatno rezultat prisustva masnih kapi ili ćelija starter kulture. Filamentozni materijal

asociran oko okruglastih bakterija može biti poreklom od EPS-a, ili ostataka membrana masnih kapi.

Struktura šupljika i proteinskog matriksa posle 7 dana zrenja ukazuje na veću povezanost proteinskog materijala, koji povezuje zidove šupljika, tako da je sveričan oblik masnih kapi jasno definisan (slika 5 C i D).

Posle 14 dana zrenja šupljike, tipične za mlade sireve, nestaju. Umes-

to tih šupljika uočava se retikularna struktura (slika 5 E i F). Takođe se uočava da su masne kapi obložene proteinskim matriksom. Promene u strukturi rezultirale su i u promeni poroznosti. Promene u mikrostrukturi mocarela sira tokom skladištenja, verovatno su rezultat redistribucije proteina i vode. Pozicija masnih kapi se ne menja tokom zrenja. Akumulacije seruma, koje su vidljive kod 2 dana starog mocarela sira bivaju apsorbovane od strane proteinskog matriksa tokom rane faze zrenja. Ovo je praćeno bubrenjem proteinskog matriksa koje se nastavlja sve dok se prostor između masnih kapi kompletno ne popuni proteinskim matriksom, što je evidentno prilikom posmatranja retikularne strukture.

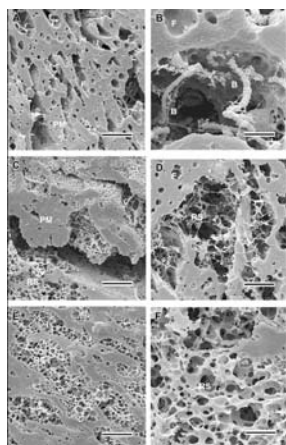
Detekcija prisustva EPS-a

Za proučavanje EPS-a pogodno je da se tokom pripreme uzoraka za TEM koristi boja rutenijum crveno. Na taj način moguće je vizuelizovati EPS koji je asociran za bakterijsku ćeliju ili je oslobođen u spoljašnju vodenu fazu. EPS se može zadržati u okruženju same bakterije, ili može formirati tegljive formacije, u zavisnosti koja ga vrsta bakterija proizvodi (slika 6). U odsustvu rutenijum crvenog, nemoguće je da se vizualizuje EPS u okviru sirmog matriksa posmatranog TEM-om (Dabour et al. 2005).

Korišćenje metode krio-skeniranja elektronske mikroskopije pruža veoma dobre mogućnosti za proučavanje EPS-a, koji se primećuje u vidu velikih masa gustih filamenata odvojenih od proteinske mreže (slika 7 A i B), dok se kod konvencionalnog SEM-a prisustvo EPS-a zapaža u vidu tankih filamenata nasumično izmešanih sa proteinskom mrežom (Hassan, Frank, Elsoda, 2003). Dobar prikaz EPS-a dat je na primeru fermentisanog mleka (slika 7 C i D).

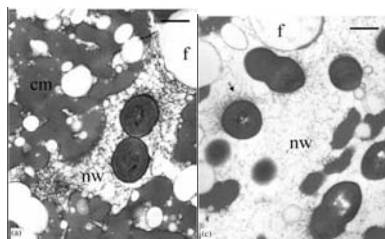
ZAKLJUČAK

Metode elektronske mikroskopije imaju veliku ulogu u proučavanju namirnica i sve više postaju nezaobilazni instrument u analizi prehrambenih proizvoda, posebno u razumevanju stanja, strukture i veza koje nastaju u procesima obrade i prerade hrane.



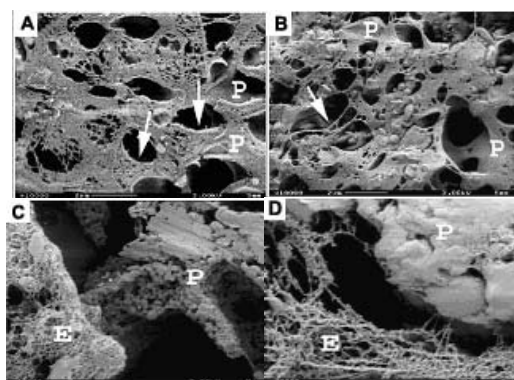
Slika 5. SEM MIKROGRAFIJE DEFROSTRIRANE MOCARELE POSMATRANE TOKOM ZRENJA; A I B, C I D, ODNOSNO E I F SU REPREZENTATIVI STRUKTURE POSLE 2, 7, ODNOSNO 14 DANA ZRENJA; PM - PROTEINSKI MATRIKS; F - MASNA KAP; RS - RETIKULARNA STRUKTURA; B - BAKTERIJA; SKALE PREDSTAVLJAJU A: 20 μ m, B: 5 μ m, C: 20 μ m, D: 10 μ m, E: 20 μ m, F: 8 μ m

Figure 5. SEM MICROGRAPHS OF DEFROSTED MOZZARELLA VIEW DURING RIPENING: A AND B, C AND D, AND E AND F ARE REPRESENTATIVES OF SAMPLE STRUCTURE AFTER 2, 7, AND 14 DAYS OF RIPENING, RESPECTIVELY; PM - PROTEIN MATRIX; F - FAT GLOBULE; RS - RETICULAR STRUCTURE, B - BACTERIA; SCALE BARS REPRESENT: A: 20 μ m, B: 5 μ m, C: 20 μ m, D: 10 μ m, E: 20 μ m, F: 8 μ m.



Slika 6. TEM MIKROGRAFIJE TEGLJIVE KULTURE SOJA *L. LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* JFR-1 PRISUTNE U SURUTKI ZAOSTALOJ U SURUTKINIM DŽEPOVIMA UNUTAR PROTEINSKOG MATRIKSA. UZORCI SU PRIPREMLJENI PO PROTOKOLU SA RUTENIJUM CRVENIM: CM - PROTEINSKI MATRIKS; F - MASNA KAP; NW - EPS UMREŽENA STRUKTURA. STRELIKA POKAZUJE NA EPS ASOCIRAN OKO ČELIJE; LINIJA JE PROMERA 500 nm.

Figure 6. TEM MICROGRAPHS OF ROPY STRAIN *L. LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* JRF-1 PRESENT IN RESIDUAL WHEY POCKETS IN THE PROTEIN MATRIX. SAMPLES WERE PREPARED BY THE RUTHENIUM RED PROTOCOL: CM - CASEIN MATRIX; F - FAT GLOBULE; NW - EPS NETWORK-LIKE STRUCTURE. ARROWS POINT TO CELL-ASSOCIATED EPS. BARS INDICATE 500 nm.



Slika 7. KRIO-SEM MIKROGRAFIJE FETA SIRA – SLIKE A I B I FERMENTISANOG MLEKA – SLIKE C I D: A – SIR IZRADEN SA BAKTERIJAMA KOJE NE PRODUKUJU EPS; B- SIR IZRADEN SA BAKTERIJAMA KOJE PRODUKUJU EPS; STRELIKA NA SLICI A POKAZUJE MASNU KAPLJICU; STRELIKA NA SLICI B PRIKAZUJE LED, VEROVATNO ASOCIRAN SA EPS-OM, P- PROTEINSKI MATRIKS, E – EPS.

Figure 7. CRYO-SEM MICROGRAPHS OF FETA CHEESE – PICTURES A AND B; AND FERMENTED MILK – PICTURES C AND D: CHEESE MADE FROM EPS NON-PRODUCING BACTERIA; B - CHEESE MADE FROM EPS PRODUCING BACTERIA; ARROW ON PICTURE A SHOWS A FAT GLOBULE; ARROW ON PICTURE B SHOWS ICE, POSSIBLY ASSOCIATED WITH THE PRESENCE OF EPS, P – PROTEIN MATRIX, E – EPS.

Posebno je značajno kombinovanje metoda mikroskopije sa reološkim merenjima, čime se ostvaruje suštinsko razumevanje fenomena teksture i konzistencije namirnica.

Procedura pripreme uzoraka za mikroskopsku analizu obuhvata više faza, koje su u pojedinim slučajevima kompleksne i veoma zahtevne. Savremenije metode elektronske mikroskopije su usmerene na pojednostavljene procedure pripreme, čime se ujedno omogućava da se uzorci, zahvaljujući pojednostavljenoj pripremi posmatraju u stanju koje je minimalno izmenjeno protokolom pripreme, čime se dobija realnija slika stvarnih stanja nastalih kao rezultat pojedinih procesa.

LITERATURA

- Buffa, M.N., Trujillo, A.J., Pavia, M. and Guamis, B.: Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *International Dairy Journal*, 11 (2001) 927-934.
- Claverie, A. and Casanove, M.J.: Transmission electron microscopy and related techniques for silicon based materials characterization. *Microelectronic Engineering*, 40 (1998) 239-250.
- Cogan, T.M.: Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5 (1995) 543-568.
- Dabour, N., LaPointe, G., Benhamou, N., Fliiss, I. and Kheadr, E.E.: Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal*, 15 (2005) 1044-1055.
- Everett, D.W. and Auty, M.: Cheese structure and current methods of analyses. *International Dairy Journal*, 18 (2008) 759-773.
- Glaser, J., Carroad, P.A. and Dunkley, W.L.: Electron microscopic studies of casein micelles and curd microstructure in Cottage cheese. *J Dairy Sci*, 63 (1980) 37-48.
- Guinee, T.P., Pudja, P.D., Rewille, W.J., Harrington, D., Mulholland, E., Cotter, M. and Cogan, T.M.: Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5 (1995) 543-568.
- Hassan, A.N., Frank, J.F. and Elsoda, M.: Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 13 (2003) 755-762.
- Ivetić, T., Vuković, Z., Nikolić, M.V., Pavlović, V.P., Nikolić, J.R., Minić, D. and Ristić M.M.: Morphology Investigation of Mechanically Activated ZnO-SnO₂ System. *Ceramics International*, 34 (2008) 639-643.
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P. and Miller, S.S.: Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis *Trends in Food Science & Technology*, 6 (1995) 177-186.
- Kalab, M. and Harwalker, V.R.: Milk gel structure. I. application of scanning electron microscopy

- to milk and other food gels. *Journal of Dairy Science*, 56 (1973) 835-842.
- Kalab, M. and Larocque, G.: Suitability of agar gel encapsulation of milk and cream for electron microscopy. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29 (1996) 368-371.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K. and Safari, M.: Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of ultrafiltered-Feta cheese. *Food Chemistry*, 113 (2009) 424-434.
- Kheadr, E.E., Vachon, J.F., Paquin, P. and Fliss, I.: Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12 (2002) 435-446.
- Meng, K.I. and Sundaram, G.: Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. *Food Science and Technology*, 42 (2009) 9-16.
- Mitić, V., Pavlović, V.B., Stojanović, B.D. and Nikolić, Z.: The influence of CaCO₃ on Microstructure and Dielectric Properties of BaTiO₃. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*. 29 (2004) 1167-1169.
- Mitić, V.V., Pavlović, V.B., Miljković, M., Paunović, V.V., Jordović, B. and Živković, Lj.M.: SEM and EDS analysis of BaTiO₃ doped with Yb₂O₃ and Ho₂O₃. 14th Europran Microscopy Congress, EMC 2008, Germany, (2008) 555-556.
- Montesinos-Herrero, C., Cottell, C.D., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M.: Partial replacement of fat by functional fibre in imitation cheese: Effects on rheology and microstructure. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 910-919.
- Noronha, N., Duggan, E., Ziegler, G.R., Stapleton, J.J., O'Riordan, E.D. and O'Sullivan, M.: Comparison of microscopy techniques for the examination of the microstructure of starch-containing imitation cheeses. *Food Research International*, 41 (2008) 472-479.
- Pavlović, V.B., Stojanović, B.D., Pavlović, V.P., Živković, Lj., Pejović, V.Z., Varela, J.A. and Ristić, M.M.: Microstructure of low temperature sintered BaTiO₃. *Materials Engineering*, 12 (2001) 341-346.
- Pavlović, V.P., Petrović, D., Nikolić, Z. and Pavlović, V.B.: Automatic Microstructure Analysis of Sintered Materials. *FME Transactions*, 34 (2006) 159-163.
- Pavlović, V.B., Nikolić, M.V., Nikolić, Z., Branković, G., Živković, Lj., Pavlović, V.B. and Ristić, M.M.: Microstructural Evolution and Electric Properties of Mechanically Activated BaTiO₃ Ceramics. *J.Eur.Ceram.Soc.*, 27 (2007a) 575-579.
- Pavlović, V.B., Mitić, V.V., Nikolić, A. and Ristić, M.M.: Microstructure Analysis of BaTiO₃ Sintered with Nb₂O₅ and LiF, VII Scientific Meeting "Physics and Technology of Materials", FITEM '07, Eds. G. Stanišić, V.B. Pavlović and A.M. Maričić, Čačak/Serbia, (2007b), p. 32
- Puđa, P.: Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. *Disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd*, (1992).
- Puđa, P.: *Tehnologija mleka 1, Sirarstvo, Poljoprivredni fakultet, Beograd*, (2009).
- Tamime, A.Y., Muir, D.D., Shenana, M.E., Kalab, M. and Dawood, A.H.: Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes 2. rheology, sensory perception of texture and microstructure. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32 (1999) 50-59.
- Tavaria, F.K., Reis, P.J.M., Malcata, F.X.: Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 895-902.
- Wium, H., Pedersen, P.S. and Qvist, K.B.: Effect of coagulation conditions on the microstructure and the large deformation properties of fat-free Feta cheese made from ultrafiltered milk. *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 287-296.
- www.jic.ac.uk/microscopy/intro_EM.html
- www.en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope
- www.en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy
- www.en.wikipedia.org/wiki/Confocal_laser_scanning_microscopy
- www.calce.umd.edu/general/Facilities/ESEM.pdf
- Ye, A. and Hewitt, S.: Phase structures impact the rheological properties of rennet-casein-based imitation cheese containing starch. *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 867-873.
- Živković, Lj., Stojanović, B.D., Pavlović, V.P., Nikolić, Z.S., Marinković, B.A. and Srećković, T.V.: SEM Investigation of Domain Structure in (Ba,Ca,Pb)TiO₃. *J.Europ.Ceram.Soc.*, 19 (1999) 1085-1087

SUMMARY

APPLICATION OF ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUES IN CHEESE RESEARCH

Vladimir B. Pavlović, Predrag D. Pudja, Goran A. Trpković, Jelena B. Miočinović
University of Belgrade, Faculty of Agriculture

Four types of electron microscopes, i.e. scanning electron microscope, cryo-scanning electron microscope, transmission electron microscope and environmental scanning electron microscope, as well as confocal laser scanning microscope, as a representative of light microscopy that is nowadays frequently being used in analyzing milk origin nutrition, are discussed. The differences between these categories of microscopes are presented here. The advantages in analyzing milk products are discussed. General methods of preparation of biological samples for all types of electron microscopes are introduced, as well as specific methods for preparation of cheese samples. Representative micrographs of different cheese samples are discussed. Use of the electron microscopy plays an important role in nutrition research, especially concerning microstructure. Electron microscopy will probably become a significant tool in future research of food.

Key words: scanning electron microscope • transmission electron microscope • environmental scanning electron microscope • confocal laser scanning microscope • cheese • microstructure

ALDIJANA H. ALIJAGIĆ
TARIK A. DIZDAREVIĆ
LEJLA M. BIBER
ZLATAN O. SARIĆ

Poljoprivredno-prehrambeni
fakultet Univerziteta u Sarajevu

NAUČNI RAD

UDK: 637.148:635.05:664.5

PROIZVODNJA I KVALITET MLIJEČNOG NAMAZA SA DODATKOM ZAČINA

Mliječni namaz, koji predstavlja jedan od proizvoda iz kategorije "nove generacije" sadrži koncentrovane sastojke mlijeka sa različitim dodacima. Cilj ovog rada je da se proizvede novi proizvod dobrih senzornih osobina, a koji će zadovoljiti zahtjeve modernog tržišta fokusiranog na zdravu ishranu. U tu svrhu eksperimentalno je proizveden mliječni namaz uz dodatak začinskog bilja.

Mliječni namaz je proizveden sa dodatkom slijedećih začina: kopar, bijeli luk, peršun, crvena paprika i kumin. Ukupno je urađeno 6 kombinacija: kontrola (bez dodataka začina), kopar, kopar + bijeli luk, peršun + bijeli luk, kumin + peršun i crvena paprika. Svi uzorci su ispitani fizičko-hemijskim analizama (sadržaj suhe materije, masti i pH) i senzorno ocijenjeni.

Nije bilo značajnijih promjena u fizičko-hemijskom sastavu i pH vrijednosti između pojedinih uzoraka. Senzorna analiza je dala dobre rezultate, a najvišu ocjenu je dobio uzorak sa peršunom i bijelim lukom, pa bi se za dalji razvoj proizvoda preporučilo ići u tom pravcu. Kopar se ne bi trebao upotrebljavati kao jedini nosioc arome već u kombinaciji s bijelim lukom ili bijelim lukom i peršunom.

Ključne riječi: začini • mliječni namaz • kopar • bijeli luk • peršun • kumin • crvena paprika

UVOD

Mliječni namaz je proizvod dobiven doradom fermentisane pavlake, a ima veoma širok raspon udjela mliječne masti, od 10 do 40%, što zavisi od toga da li je proizvod u grupi "light" ili punomasnih proizvoda. Pored mliječne komponente on sadrži dodanu kuhinjsku sol, emulgatore i eventualno ugušćivače (Puhan, cit. Fox i Mc Sweeney, 2006).

Začini su se kroz istoriju koristili da obogate okus hrane ali i kao ljekovite biljke za razna oboljenja. Kopar je biljka iz porodice *Umbelliferae*, *Apiaceae*, porijeklom iz jugoistočne Azije, ali se kao kultura uzgaja u južnim dijelovima Europe. Najveća koncentracija ljekovitih i aromatičnih tvari nalaze se u plodovima biljke, ali ima ih i u listovima i cvjetovima (www.whfoods.com/genpage). Kopar se u mliječni namaz ubacuje u obliku nasjeckanog osušenog lista neposredno prije pakovanja. Bijeli luk - *Allium sativum* je biljka čija su ljekovita i začinska svojstva poznata od davnina, a uzgaja se kao kultura već više od 4.000 godina. Sadrži oko 200 biološki aktivnih jedinjenja, od kojih su mnoga značajna u prevenciji bolesti. Tako supstanca alicin, koju sadrži bijeli luk, posjeduje antivirusna, antigljivična i antibakterijska svojstva. Tek nedavno je otkriveno da bijeli luk spada u jače antioksidanse, koji štite ljudski organizam od zagađenja i otrova (http://ljekovitebiljke.blogspot.com/search/label/Bijeli_luk).

Peršun je član porodice *Umbelliferae*, *Apiaceae* skupa s komoračem, kimom, koprom, anđelikom, mrkvom, paštrnjakom, celerom i korijanderom. Osim karakterističnog oštrog okusa zbog kojeg djeluje kao dobar stimu-

lans apetita, peršun ima još mnogo dobrih osobina. U listu su prisutne manje količine esencijalnih ulja, što se ne osjeti kad se izravno zagriže svježi list peršuna. List peršuna je, osim dobrog izvora vitamina A, iznimno bogat vitaminom C, ali u mliječnom namazu on se neće naći zbog toplotnog režima pri dodavanju začina. Eterična ulja peršuna sadrže isparljiva jedinjenja miristicin, limonen, eugenol, te flavanoide apin, apigenin, krisoeriol i luteolin (www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=100#healthbenefits).

Kumin - *Carum carvi* je član porodice *Umbelliferae*, *Apiaceae*, a potiče iz zapadne Azije gdje je uzgajan i prije 2.000 godina. Cijela je biljka mirisna i aromatična. Sadrži do 7% eteričnog ulja, oko 20% bjelančevina, 8% tanina, celulozu, šećer, boju i kalcijev oksalat. U eteričnom ulju ima oko 60% karvona, oko 30% terpena (www.emboline.org/cgi/content/full/233/11/140). Paprika spada u porodicu *Solanaceae* koja potiče iz Amerike. U tropskim dijelovima Amerike uzgajala se bar 3.000 godina p.n.e., i to pod nazivom *chilli* koji je označavao ogromnu grupu različitih varijeteta vrste *Capsicum*. Većina vrsta iz roda *Capsicum* sadrži kapsaicin (metil-vanilil-nonenamid), lipofilnu hemijsku supstancu bez mirisa i boje koja uzrokuje snažan žareći osjećaj u ustima konzumenta (<http://en.wikipedia.org/wiki/Paprika>).

Tehnološki proces proizvodnje mliječnog namaza

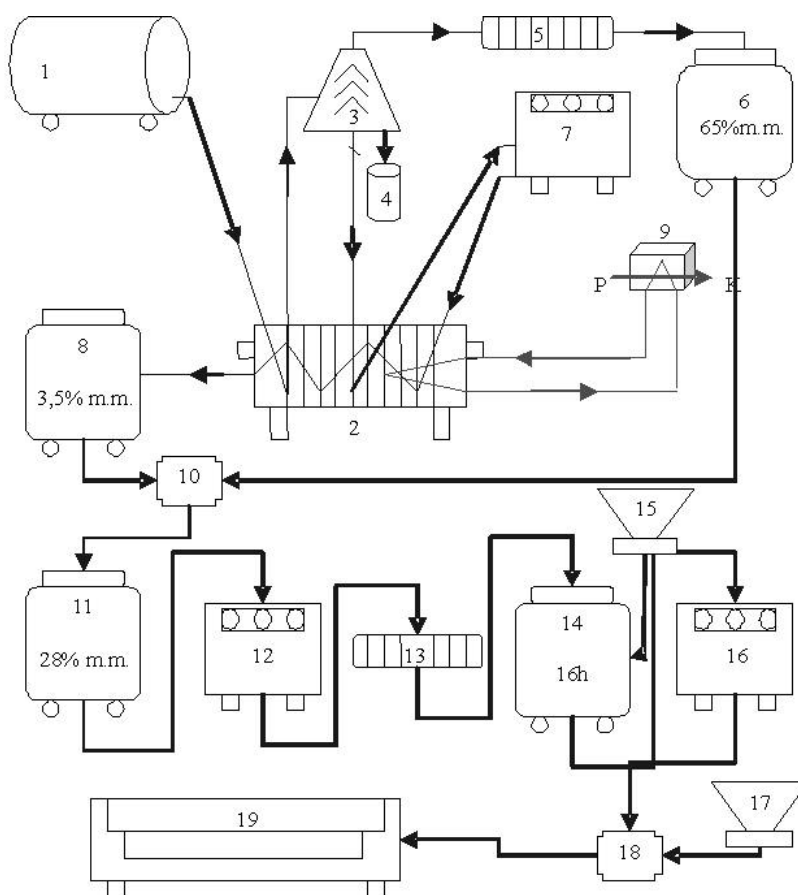
Proizvodnja mliječnog namaza obuhvata velik broj tehnoloških operacija, od primarne obrade mlijeka, do

Adresa autora:
Dr Zlatan Sarić, Institut za tehnologiju poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina
e-mail: zsaric@bih.net.ba

pakovanja namaza u pojedinačna pakovanja. Primarna obrada obuhvata slijedeće operacije: prijem mlijeka, separacija nečistoća, standardizacija sadržaja masti, homogenizacija i pasteurizacija mlijeka. Druga faza je sastavljanje i obrada smjese i ona se sastoji od slijedećih postupaka: standardizacija II, uparavanje, fermentacija, dodavanje emulgatora, zgušnjivača i soli, pasterizacija smjese, doziranje začina, pakovanje i hlađenje. Kod standardizacije II, nakon što su i mlijeko i pavlaka pasterizovani, procesor automatski prebacuje zadanu količinu mlijeka i pavlake da bi se dobila pavlaka sa 28% m.m., što je potrebna podloga za mliječni namaz. Uparavanje je proces kojim se podešava količina suhe materije potrebne za zadani proizvod. Uparivačka stanica je duplikator pod vakuumom, što eliminiše potrebu za visokim temperaturama.

U ovom slučaju na oko 62°C se usput vrši i dugotrajna pasterizacija kako bi se proizvodu omogućio duži rok trajanja. Suha materija se također može dodati u obliku mliječnog praha ili zgušnjivača, ovisno o zadanoj tehnologiji ili formulaciji. Ovako pripremljena smjesa se još jednom homogenizira, a zatim hladi, te dolazi u fermentor. U fermentoru se dodaju mezofilne maslačne starter kulture DL tipa, nakon čega slijedi fermentacija u trajanju od 16 sati. Temperatura u fermentoru zavisi od izabrane kulture, u ovom slučaju to je 24-27°C. Nakon što je fermentacija završena, u fermentor se preko dozatora dodaju ugušćivači, emulgatori i sol. Zgušnjivači se obično dobijaju iz endosperma leguminoza i služe kao dodatak suhe materije ili kao sredstva za povećavanje viskoziteta suspenzije tako što s kalcijem želiraju i uklopljavaju tečnu fazu unutar gela. Nakon što su dodani svi potrebni sastojci, smjesa se zagrijava do 70°C kako bi se još jednom pasterizirala, a zatim se homogenizira. Nakon ovog postupka, mliječni namaz je spreman za vruće pakovanje, ali ukoliko se dodaje začinsko bilje, ono se ubacuje preko procesora za protočno doziranje. Proces je prikazan na slici 1.

Začinsko bilje je potrebno unaprijed pripremiti i sipati u dozator, bilo da se radi o jednoj vrsti začina ili o smjesi različitih. Bitno je da temperatura pri pakovanju ne bude niža od temperature pasterizacije kako bi se začini pasterizovali u trenutku ubacivanja. U ovom slučaju radilo se o pet različitih začina: osušeni list kopra, osušeni list



Slika 1. PROCES PROIZVODNJE MLIJEČNOG NAMAZA
Figure 1. DAIRY SPREAD PRODUCTION PROCESS

- | | |
|---|---|
| 1- prijemni tank | 11 - uparivač |
| 2 i 5 - protočni izmjenjivač toplote (pasterizator) | 13 - pločasti hladnjak |
| 3 - separator | 14 - fermentor |
| 4 - posuda za izdvojene nečistoće | 15 - dozator (sol, emulgatori, zgušnjivači) |
| 6 - tank za pavlaku | 17 - dozator začina |
| 7, 12 i 16 - homogenizator | 18 - procesor za doziranje u protoku |
| 8 - tank za (standardizovano) mlijeko | 19 - pakerica |
| 9 - parni injektor | |
| 10 - procesor | P - ulaz pare |
| | K - izlaz kondenzata |

kopra i bijelog luka, osušeni list peršuna i bijelog luka, osušeni list peršuna i tucanih sjemenki kumina i crvena ljuta tucana paprika.

MATERIJAL I METODI

Prvo je proizveden mliječni namaz koji je služio kao baza u koju su dodavani začini. Za ovo istraživanje uzeto je:

- 4x5 litara od već pripremljenog mliječnog namaza
- 30g sušenog lista kopra
- 30g bijelog luka u prahu
- 30g sušenog lista peršuna
- 30g sušene tucane crvene paprike

- 30g sjemenki kumina
- ambalaža (čaišice i poklopci).

Kod dodavanja začina u prvu grupu uzoraka, količina začina određivana je metodom probanja, i ova količina je iznosila ukupno 4-6 g na litar namaza. Kako bi se utvrdila ova količina bilo je potrebno napraviti seriju uzoraka sa različitim količinama začina, i to postavljajući minimum od 1 g, preko srednjih 3 g i najzad maksimalno 5 g po začinu. Kod dodavanja kopra (uzorak 2) količina koja je dala dovoljnu aromu bila je maksimalna količina od 5 g i to pri pakovanju na nižim temperaturama, dok je kod povećanja temperature aroma kopra slabila. Na-

kon toga pokušano je dodavanje 7 g, ali razlika je bila neznatna, pa je odlučeno da se zadrži količina od 5 g kopra na litar namaza. Kod uzoraka 3 i 4, gdje se bijeli luk nalazio u kombinaciji s koprom i peršunom, idealna količina bijelog luka bila je 3 g, i miješana je u jednakom omjeru s njima. Povećanje količine kopra i peršuna nije doprinjelo boljoj izražajnosti istih jer je bijeli luk konstantno zadržavao svoju dominantnu aromu. Smanjenjem količine kopra i peršuna gubilo se na dekorativnoj ulozi ova dva začina pa je kod ovih uzoraka korišteno po optimalnih 3 g/l. Kod uzorka 5 nije bilo teško uočiti da je minimalna količina kumina od 1g bila sasvim dovoljno izražena u kombinaciji s 3 g peršuna. Veće količine kumina davale su previše snažnu aromu koja ne samo da je remetila ravnotežu s peršunom nego je u znatnoj mjeri maskirala aromu mliječnog namaza. Crvena paprika u uzorku 6 se kao i kopar slabo naglašavala, posebno nakon hlađenja, pa je zadržana maksimalna količina od 5 g.

U prvom seriji svi uzorci su pripremljeni tako što su miješani sa začinskim biljem na temperaturi ispod 70°C iz razloga što kopar zagrijavanjem gubi većinu aromatskih isparljivih jedinjenja. Tako je u ovim uzorcima omogućeno preživljavanje male količine mikroorganizama koji su uzrokovali skraćivanje roka trajanja proizvoda jer su se uzorci koji su ostavljeni 100 dana na temperaturi skladištenja (4±2°C) radi mjerenja pokvarili, sa izuzetkom onoga kojem je dodan bijeli luk.

Stoga je druga grupa uzoraka miješana sa začinskim biljem na temperaturi pasterizacije (72-74°C) kako bi se osigurao minimalan rok trajanja od 3 mjeseca.

Količina začina kod drugog dodavanja je bila slijedeća:

uzorak 1: nisu dodavani začini (kontrola)

uzorak 2: dodano je 5g sušenog lista kopra

uzorak 3: dodano je 3g sušenog lista kopra i 3g bijelog luka u prahu

uzorak 4: dodano je 3g sušenog lista peršuna i 3g bijelog luka u prahu

uzorak 5: dodano je 1g mrvljenih sjemenki kumina i 3g sušenog lista peršuna

uzorak 6: dodano je 5g sušene tucane crvene paprike

Na svim uzorcima su urađene fizičko-hemijske analize (sadržaj masti, suhe materije i pH), te senzorna ocje-

na. Sadržaj suhe materije je određivan sušenjem pri temperaturi od 105±2°C. Sušenje je obavljeno u sušnici Heraeus. Analiza mliječne masti rađena je Van Gulick-Gerber meto-

Dodavanje začinskog bilja nije imalo uticaja na pH vrijednost mliječnog namaza. Kada se posmatra tabela 2 i zna da su začini dodavani na istu bazu sa 37,42%SM, može se za-

Tabela 1. pH VRIJEDNOST UZORAKA MLIJEČNOG NAMAZA
Table 1. pH VALUE OF DAIRY SPREADS

Uzorak/Sample	pH vrijednost/pH value
Baza/Basis	4,33
+Kopar/Dill	4,35
+Kopar i bijeli luk/Dill and garlic	4,36
+Peršun i bijeli luk/Italian parsley and garlic	4,37
+Peršun i kumin/Italian parsley and cumin	4,33
+Crvena tucana paprika/Hungarian paprika	4.33

Tabela 2. SADRŽAJ SUHE MATERIJE (SM) U UZORCIMA MLIJEČNOG NAMAZA
Table 2. CONTENT OF DRY MATTER (DM) IN DAIRY SPREADS

Uzorak/Sample	Suha materija/Dry Matter (%)
Baza/Basis	37,42
+Kopar/Dill	36,57
+Kopar i bijeli luk/Dill and garlic	37,67
+Peršun i bijeli luk/Italian parsley and garlic	38,58
+Peršun i kumin/Italian parsley and cumin	38,22
+Crvena tucana paprika/Hungarian paprika	39,88

Tabela 3. SADRŽAJ MASTI I MASTI U SM U UZORCIMA MLIJEČNOG NAMAZA
Table 3. CONTENT OF FAT AND FAT IN DRY MATTER IN DAIRY SPREADS

Uzorak/Sample	Mast/Fat (%)	Mast u SM (%) Fat in DM (%)
Baza/Basis	24	64,13
+Kopar/Dill	24	65,62
+Kopar i bijeli luk/Dill and garlic	24	63,69
+Peršun i bijeli luk/Italian parsley and garlic	24	62,19
+Peršun i kumin/Italian parsley and cumin	24	62,79
+Crvena tucana paprika/Hungarian paprika	24	60,18

dom za kajmak i sir zato što sadržaj masti u mliječnom namazu najviše odgovara onom u kajmaku. Kao i kod određivanja sadržaja masti u kajmaku, uzima se po 1g uzorka umjesto 3g, a onda se vrijednost očitana sa vrata butirometra množi sa 3 (Dozet, Stanišić i Bijeljac, 1985). pH vrijednost je mjerena pomoću pH-metra Met-rohm/632 uz upotrebu pH elektrode WTW SenTix Sp. Za svaki uzorak mjerenje se ponavljalo dva puta i na osnovu toga upisana je srednja vrijednost. Senzorna analiza uzoraka obavljena je od strane četiri člana ocjenjivačke komisije i rezultati su uneseni u ocjenjivačke listiće. Sistem bodovanja određen je maksimalnim brojem bodova za svaku karakteristiku (izgled 1, boja 2, konzistencija 4, miris 3 i okus 10), tako da maksimalni broj bodova iznosi 20. Svi uzorci su proizvedeni u paralelama i dobivene vrijednosti predstavljaju prosjek dvije paralele.

REZULTATI I DISKUSIJA

pH vrijednost, te sadržaj suhe materije, masti i masti u suhoj materiji su prikazani u tabelama 1-3.

ključiti da je najviše suhe materije imala crvena paprika, a najmanje kopar. Međutim, te razlike nisu bile velike. Sadržaj masti je bio jednak u svim varijantama, a sadržaj masti u suhoj materiji je varirao usljed razlika u sadržaju suhe materije.

Kod dodavanja kopra (uzorak 2) količina koja je dala dovoljnu izražajnost arome bila je maksimalna količina od 5 g, a aroma se nije pojačavala povećanjem količine kopra. Kod uzorka 3 gdje se bijeli luk nalazio u kombinaciji s koprom, idealna količina bijelog luka bila je 3 g, i miješana je u jednakom omjeru s koprom. Povećanje količine kopra nije doprinjelo boljoj izražajnosti jer je bijeli luk konstantno zadržavao svoju dominantnu aromu. Smanjenjem količine kopra se, s druge strane, gubilo na dekorativnoj ulozi ovog začina.

Kod kombinacije peršuna i bijelog luka, miješanih u istom omjeru 3:3, ocjena nije snižena na okusu već na izgledu jer je došlo do kondenzacije vode i to za pola boda. Ovo izdvajanje vode bilo je uzrokovano povišenom temperaturom pri pakovanju, pa je uzorak poslije standardnog dobio najvišu ocjenu. Kod uzorka 5 nije bilo

teško uočiti da je minimalna količina kumina od 1g bila sasvim dovoljna u kombinaciji s 3 g peršuna. Veće količine kumina davale su previše snažnu aromu koja ne samo da je narušila ravnotežu s peršunom, nego je u potpunosti maskirala aromu mliječnog namaza. Ipak, peršun nije bio dovoljno izražen pa mu je pripisana samo dekorativna funkcija i ocjena je smanjena za pola boda na okusu, pola boda na mirisu, te pola boda zbog kondenzovane vode.

Crvena paprika u uzorku 6 se kao i kopar slabo osjetila, pa je ukupna ocjena od 18 bodova bila najniža u poređenju sa ostalim kombinacijama.

ZAKLJUČAK

Osnovni cilj ovog rada bio je proizvesti mliječni namaz sa dodatkom začinskog bilja i tako kreirati novi proizvod dobrih senzornih osobina sa poboljšanim zdravstvenim uticajem.

Fizičko-hemijske analize su pokazale slab uticaj dodavanja začina na fizičko-hemijske osobine namaza, što je dobar znak jer to ne zahtjeva prilagođavanje recepture svakom od začina pojedinačno. Također je bitno naglasiti podatak o pH stabilnosti mliječnog namaza, posebno ako se uzme u obzir da je mliječni namaz emulzija, i da svako pomjeranje pH vrijednosti

može narušiti njegovu stabilnost. Tokom čuvanja uzoraka pakovanih ispod temperature pasterizacije, bijeli luk je definitivno dokazao svoja antiseptička svojstva, jer je produžio rok trajanja namaza.

U senzornom smislu, dodatak svih začina je dao pozitivne i ohrabrujuće rezultate, s tim da je najvišu ocjenu dobio uzorak sa peršunom i bijelim lukom, pa bi se za dalji razvoj proizvoda preporučilo ići u tom pravcu. Kopar se ne bi trebao upotrebljavati kao jedini nosilac arome, već u kombinaciji s bijelim lukom ili bijelim lukom i peršunom. Kod izbora paprike trebalo bi se ići u pravcu odabira nešto pikantnije sorte tipa *chilli* pošto je ova koja je korištena bila preblaga da bi sama nosila "teret" začina.

LITERATURA

- Dozet, N., Stanišić, M., Bijeljac, S.: Praktikum iz mljekarstva, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Sarajevu (1985).
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H.: Advanced Dairy Chemistry, Volume 2, Lipids, Third edition, Springer, New York (2006).
- Jankuloovski, Ž., Muminović, Š., Arapčeska, M.: Začinski i ljekoviti rastenija (Proizvodstvo i upotreba), Univerzitet "Sv. Kliment Ohridski", Bitola, Makedonija (2005).
- Muminović, Š.: Proizvodnja ljekovitih i začinskih biljaka, Compact Publishing house, Sarajevo (1998).

- <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=71#healthbenefits>, preuzeto, decembar 2008.
- http://ljekovitebiljke.blogspot.com/search/label/Bijeli_luk, preuzeto, decembar 2008.
- <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=100#healthbenefits>, preuzeto, decembar 2008.
- <http://www.emboline.org/cgi/content/full/233/11/1403>, preuzeto, decembar 2008.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Paprika>, preuzeto, decembar 2008.

SUMMARY

PRODUCTION AND QUALITY OF DAIRY SPREADS WITH SPICES

Aldijana H. Alijagić, Tarik A. Dizdarević, Lejla M. Biber, Zlatan O. Sarić

Faculty of Agriculture and Food Science, University of Sarajevo

Dairy spread which represents one of the „new generation“ products contains concentrated milk components with different ingredients. At the same time it should comply with healthy food market requirements. The aim of this work was to manufacture a new product with high sensory characteristics. Dairy spreads with addition of spice herbs were produced for that purpose.

Dairy spreads were manufactured by adding following spices: dill, garlic, Italian parsley, Hungarian paprika and cumin. In total, 6 combinations were produced: control (no spices added), dill, dill + garlic, Italian parsley + garlic, cumin + garlic and Hungarian paprika. All samples were tested by physico-chemical (pH, dry matter and fat content) analyses and sensory evaluation was carried out. There were no significant variations in physico-chemical composition and pH value among samples. Sensory evaluation showed good results. The highest score was attributed to the sample with Italian parsley and garlic. Therefore, this combination could be recommended for further use. Dill should not be used as an exclusive carrier of aroma, but in combination with garlic or garlic and Italian parsley.

Key words: spices • dairy spread • dill • garlic • Italian parsley • cumin • Hungarian paprika

AMRA ODOBAŠIĆ
SEAD ČATIĆ
HUSEJIN KERAN
HATIDŽA PAŠALIĆ
INDIRA ŠESTAN

Univerzitet u Tuzli,
Tehnološki fakultet, BiH

NAUČNI RAD

UDK: 637.12:543.532:546.38

ISP METOD ZA KONTROLU SADRŽAJA KALCIJUMA U MLIJEKU

Mlijeko je prirodna hrana bogata kalcijem, bjelančevinama, vitaminima i mineralima, važnim za rast i pravilno funkcioniranje ljudskog organizma. Sastav mlijeka se razlikuje zavisno od porijekla odnosno životinje od koje potiče. U odnosu na sadržaj masti, proteina i laktoze, mineralne materije se nalaze u znatno manjoj količini. Međutim, njihova važnost u ishrani, njihov značaj za fizičko-hemijsku ravnotežu koloidnog sistema mlijeka i tehnološke osobine mlijeka je veliki. Kalcij (Ca^{2+}) spada u jedan od najznačajnijih makroelemenata čija je uloga nezamjenjiva u pravilnom rastu i razvoju kostiju, a sadržaj mu se kreće do 128 mg/100g mlijeka. Neki od kationa (Ca^{2+}) nalaze se u obliku soli sa proteinima, pa čak čine i konstitucione elemente njihove strukture. Zahvaljujući njima moguće je postojanje soli kazeina u mlijeku, a od njih zavisi i stabilnost koloidnog sistema mlijeka (kazeina). Iz ovih razloga važno je poznavati i kontrolisati sadržaj Ca u mlijeku. U radu će biti prezentirani rezultati određivanja sadržaja Ca u mlijeku primjenom standardne metode za određivanje Ca i primjenom jon selektivne potencijometrije (JSP), tačnije primjenom jon selektivne Ca elektrode. Cilj rada je pokazati prednosti primjene ion selektivne potencijometrije u kontroli sadržaja Ca u mlijeku, njenu osjetljivost i ekonomičnost.

Ključne reči: mlijeko • Ca • ion–selektivna potencijometrija

UVOD

Mlijeko se često definiše kao emulzija masti u koloidnom rastvoru proteina i pravom rastvoru laktoze i mineralnih materija. Prema tome, mlijeko predstavlja složeni polidisperzni sistem u kome se razlikuju četiri faze: grubo disperzna, koloidna, molekularno jonska i gasna. Fizička i hemijska stanja svake od komponenata mlijeka su međusobno tako povezana da promjena uslova za jednu komponentu izaziva i promjene kod drugih komponenta. Bez ove uzajamne povezanosti, komponente ne bi mogle obrazovati stabilan sistem. Sastav mlijeka je promjenjiv i zavisi od niza faktora (vrste izvora i rase, perioda laktacije, ishrane i dr.). Prosječan hemijski sastav mlijeka domaće krave dat je u tabeli 1.

Tabela 1. PROSJEČAN HEMIJSKI SASTAV MLIJEKA
Table 1. AVERAGE MILK COMPOSITION

Komponenta	Sadržaj g/100g	
	Srednja vrijednost	Opseg variranja
Voda	87,5	87-88
Proteini (kazein, proteini surutke),	3,13	3-3,2
Mast	3,76	3,6-3,8
Ugljeni hidrati	4,84	4,8-4,9
Minerali	0,8	0,7-0,97

U odnosu na sadržaj masti, proteina i laktoze, mineralne materije se nalaze u znatno manjoj količini. Međutim, njihova važnost u ishrani, njihov značaj za fizičko-hemijsku ravno-

težu koloidnog sistema mlijeka i tehnološke osobine mlijeka je veliki. Do danas je ustanovljeno oko 40 mineralnih sastojaka, koji se prema količini dijele na makro i mikroelemente. Ca spada u jedan od najznačajnijih makroelemenata. Pored Ca tu spadaju još K, Na, Mg, Cl i P. Sadržaj makroelemenata u mlijeku dat je u tabeli 2.

Najveći dio mineralnih materija u mlijeku se nalazi u obliku soli, a manji dio je adsorbovan od strane proteina ili se nalazi u sastavu nekih enzima. Takođe, mogu se nalaziti u obliku jona, više ili manje rastvorljivih nedisociiranih soli, organskih ili neorganskih soli. Neki od kationa (Ca^{2+}) nalaze se u obliku soli sa proteinima, pa čak čine i konstitucione elemente njihove strukture. Zahvaljujući njima moguće je postojanje soli kazeina u mlijeku, a

od njih zavisi i stabilnost koloidnog sistema mlijeka (kazeina). Kad je u pitanju Ca, njegova količina može da varira od 110-140mg/kg što govori da je mlijeko veoma bogato Ca i potreb-

Tabela 2. SADRŽAJ MAKROELEMENTATA U MLIJEKU
Table 2. MACROCOMPONENTS CONTENT IN MILK

Mineral	Sadržaj mg/100g
K	155
Ca	128
Cl-	90
P	87
Na	47

Adresa autora:
Dr. sc. Amra Odobašić, Univerzitet u Tuzli,
Tehnološki fakultet, Katedra za fizikalnu hemiju i
elektrohemiju
75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina
e-mail: amer.o@bih.net.ba

no je 0,5 L mlijeka da bi čovjek podmirio dnevne potrebe. Veliki dio Ca se nalazi u nerastvorljivom obliku. To je zbog toga što je mlijeko veoma bogato Ca i H_3PO_4 pa se obrazuju Ca-soli fosforne kiseline koja je vrlo slabo rastvorljiva, tako da se i reakcija u prvom redu odvija u tom pravcu. Najvažniji su citrati Ca i Mg zbog toga što su te soli, iako su najvećim dijelom rastvorljive, slabo dispergovane, što ima za posljedicu smanjenje $c(Ca^{2+})$. Veoma je značajna i ravnoteža između pojedinih jona u rastvoru i ovdje se opet najveći značaj pridaje Ca^{2+} , a zatim Mg^{2+} , PO_4^{3-} , $(C_6H_5O_7)^{3-}$. To je zbog toga što povećana količina Ca^{2+} i Mg^{2+} izaziva uvećanje kazeinskih micela, a samim tim i smanjenje njihove stabilnosti u sistemu. Kao protuteža Ca^{2+} i Mg^{2+} javljaju se fosfatni i citratni joni koji regulišu količinu ovih kationa u rastvoru u jonskom obliku. Zato se odnos Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , $(C_6H_5O_7)^{3-}$ naziva ravnotežom jona ili ravnotežom soli u mlijeku i jako je važan. S obzirom da Ca utiče na čitav niz tehnoloških osobina mlijeka, a važan je i za pravilan rast i razvoj čovjeka veoma je važno poznavati njegovu količinu u mlijeku. Jon-selektivna potenciometrija (JSP) je nedestruktivna metoda, što znači da se uzorak može iskoristiti za dalja ispitivanja. Jon-selektivne elektrode (JSE) poput kalcijumove, koja je korištena u ovom radu, kao detektori pružaju niz mogućnosti pri analizi bioloških uzoraka materijala. Koriste se pomoću automatiziranih uređaja kakav je jon-metar tip Microprocessor-pMX 3000 IONMETER WTW – na kojem su analizirani uzorci mlijeka na sadržaj kalcija u ovom radu. Funkcija jon – selektivnih elektroda bazira se na selektivnom prolazu naelektrisanih specija iz jedne faze u drugu, stvarajući razliku potencijala. Princip rada, se znači, zasniva na mjerenju elektrodnog potencijala (V) u ovisnosti od koncentracije ispitivanog jona u rastvoru. Referentna elektroda ima potencijal konstantan, dok se potencijal jon - selektivne elektrode mijenja sa koncentracijom određivanog jona. Mjerna elektroda sastoji se od tijela elektrode, ion-selektivne membrane, unutarnjeg elektrolita, i unutarašnje referentne elektrode. Odziv elektrode definisan je Nernstovom jednadžbom:

$$E = E_0 + \frac{2,303RT}{zF} \log a$$

Jon selektivna membrana je ključna komponenta kod svih jon-selek-

tivnih elektroda. Ona omogućava da jon koji se određuje prolazi kroz membranu u smjeru od rastvora sa vanjske površine membrane ka unutrašnjosti rastvora. Unutrašnji rastvor ima konstantan aktivitet jona za koji je membrana propustljiva. Kada se elektroda uroni u ispitivani rastvor, uspostavlja se trenutni tok kroz membranu u pravcu rastvora sa nižim aktivitetom mobilnih jona. Upotreba JSP /JSE ima niz prednosti u odnosu na standardne analitičke metode:

- mogu mjeriti aktivnost neke ionske vrste u uzorcima koji nisu posebno pripremani, dakle ne traže predtremen u mjenom analita.
- jeftinije su od drugih metoda poput atomske absorpcione spektrofotometrije, jonske hromatografije.
- nedestruktivna, kratko vrijeme odgovora, visoka osjetljivosti i do 10^{-7} mol/l.

MATERIJAL I METODI

U eksperimentalnom radu korištena je klasična analitička metoda, kompleksometrijsko određivanje, kao kontrolna metoda. Kao metoda izbora korištena je JSP kalcijumova elektroda TIP 500, koja je korištena kao ISE sastoji se od PVC membrane na bazi o-nitrofeniloktiletara. Pored jon selektivne korištena kje i referentna elektroda tip R502 WTW. U radu je određivan sadržaj Ca u termički obrađenom mlijeku primjenom Ca-ISE na jon metru tipa MICROPROCESSOR pH/ION Meter pMX 3000 WTW.

U procesu pripreme i analize korištene hemikalije su bile visokog ste-

1. $CaCl_2$ (kalcij hlorid) koncentracije 10mg/l kao standardni rastvor za pripremu rastvora za kalibracionu krivu
2. CH_3OH (methanol) – za čišćenje membrane
3. 2% ISA/FK - 5M $NaNO_3$ za podešavanje i održavanje konstantne jonske jačine.

REZULTATI I DISKUSIJA

U eksperimentalnom radu analizirana su tri različita uzorka termički obrađenog mlijeka.

Za kompleksometrijsko određivanje sadržaja Ca u mlijeku neophodna je bila priprema uzorka koja se sastojala od uparavanja 10mL mlijeka u cilju odstranjivanja velikog udjela vode. Nakon uparavanja uzorci su se na električnom grijalu spaljivali, a zatim žarili na $550^\circ C$ do bijelog pepela. Dobijeni pepeo se rastvarao sa 5mL HCl (1:2) ,a zatim grijao oko pola sata ispod temperature ključanja. Nakon pola sata, sadržaj/uzorak se prenio preko filter papira prethodno ispranog sa vrućom HCl (1:3) u odmjernu tikvicu od 25mL i nadopunio vodom do oznake. Ovako pripremljen uzorak se koristio za određivanje Ca uz komplekson III kao indikator.

U tabeli 3 dati su rezultati dobijeni kompleksometrijskim određivanjem i primjenom jednačine:

$$m_{Ca^{2+}} = M_{Ca^{2+}} \cdot C_{K_{III}} \cdot V_{K_{III}} \cdot R$$

gdje je: $M_{Ca^{2+}}$ - molekulska masa Ca; $C_{Ca^{2+}}$ – koncentracija kompleksona III; $V_{K_{III}}$ – utrošak kompleksona III ; R – razrijeđenje.

Tabela 3. KONCENTRACIJE Ca U MLIJEKU ODREĐENE KOMPLEKSOMETRIJSKI

Table 3. Ca CONCENTRATION IN MILK BY COMPLEXOMETRIC METHOD

Koncentracija Ca (mg/100mL)	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
	96,19	74,64	76,15

pena čistoće (s.p.) proizvođača Merck i Kemika.

Za kompleksometrijsko određivanje sadržaja Ca u mlijeku korišteni su slijedeći rastvori:

1. HCl (1:3) i (1:2)
2. amonijačni pufer
3. 0,01M komplekson III.

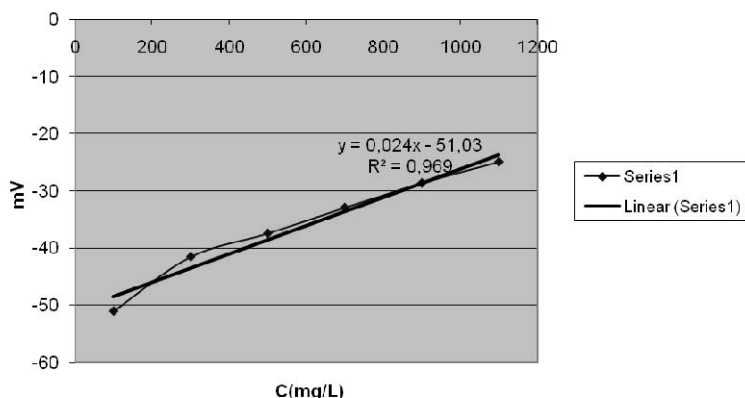
Za određivanje sadržaja Ca JSP-om korišteni su slijedeći rastvori:

Za određivanje sadržaja Ca u mlijeku primjenom JSP nije potrebna prethodna priprema uzorka. Prvo je snimljena kalibraciona kriva sa 6 rastvora poznatih koncentracija Ca, na osnovu koje je izračunata koncentracija u ispitivanom uzorku. Svim uzorcima dodat je 2%ISA/FK. Koncentracija 2% ISA/FK u uzorcima iznosila je 1mol/L.

U tabeli 4 date su koncentracije rastvora Ca i očitane vrijednosti potencijala u mV za kalibracionu krivu.

Tabela 4. VRIJEDNOSTI ZA KALIBRACIONU KRIVU
Table 4. CALIBRATION CURVE VALUES

Koncentracija rastvora Ca (mg/L)	Očitani potencijal (mV)
100	-51,1
300	-41,6
500	-37,5
700	-33,3
900	-28,7
1100	-25,0



Slika 1. KALIBRACIONA KRIVA
Figure 1. CALIBRATION CURVE

Tabela 5. VREDNOST POTENCIJALA U UZORCIMA MLIJEKA
Table 5. POTENTIAL VALUES OF MILK SAMPLES

Broj mjerenja	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
	mV	mV	mV
1	-24,9	-31,6	-30,9
2	-25,0	-31,7	-30,9
3	-24,5	-31,9	-31,5

Tabela 6. KONCENTRACIJA Ca U UZORCIMA MLIJEKA
Table 6. Ca CONCENTRATION OF MILK SAMPLES

Koncentracija Ca (mg/100mL)	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
	109,3	81,3	83,0

Na slici 1 data je dobijena kalibraciona kriva koja je korištena za izračunavanje koncentracije Ca u ispitivanim uzorcima.

U tabeli 5 su date očitane vrijednosti potencijala za ispitivane uzorke mlijeka.

U tabeli 6 date su srednje vrijednosti koncentracije Ca izračunate na osnovu rezultata dobijenih primjenom JSP na osnovu kalibracione krive.

Standardne metode određivanja sadržaja Ca su kompleksometrijska metoda i HPLC. Obje ove metode zahtijevaju skoro identičnu pripremu uzorka koja je zahtjevna u dugotrajna i iziskuje utrošak različitih hemikalija.

HPLC kao najnovija sofisticirana metoda je osim toga jako skupa i kao takva komercijalno teže dostupna. Rezultati dobijeni primjenom kompleksometrijske metode ukazuju na zadovoljavajuću tačnost ove metode, ali je osjetljivost niža, dugotrajnija je i zahtjeva utrošak više različitih hemikalija. Primjenom JSP su dobijeni rezultati sa visokom tačnošću, na što ukazuje i vrijednost R koja iznosi 0,969. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da je potenciometrijska metoda izuzetno osjetljiva. Mjerenja su brza, vrijeme stabilizacije potencijala se kretalo do 5 min., a nije neophodan ni predtretman ni priprema uzorka. Re-

zultati ukazuju da postoje određena odstupanja u rezultatima dobijenim jednom i drugom metodom kada su pitanju sva tri uzorka.

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata možemo zaključiti da JSP ima niz prednosti u odnosu na standardne metode. Znatno je jeftinija od HPLC metode, a tačnija i osjetljivija od standardne kompleksometrijske metode. Mjerenja su brza, tačna, nedestruktivna. Ne zahtjeva utrošak velikog broja različitih hemikalija što direktno utiče na dostupnost. Mjerenja su moguća i u viskozim i mutnim rastvorima kao što je mlijeko bez prethodne pripreme uzorka što nije slučaj ni kod jedne druge metode.

LITERATURA

- Mentus, S.: Elektrohemija, Belgrade (2008).
 Nurnberg, H. W.: Pollutants and their Ecotoxicological significance. John Wiley & Sons, (1985).
 Wang, J.: Electrochemical sensors for Environmental monitoring: A review of recent technology.
 Bratovčić, A., Odobašić, A., Čatić, S.: The advantages of the use of ion-selective potentiometry and ion – selective electrode, in relation to uv/vis spectroscopy. ZRNKO 2008, Tuhejske Toplice, Hrvatska 2008.

SUMMARY**ISP – METHOD OF CONTROL CONTENT OF Ca IN MILK**

Amra Odobašić, Sead Čatić, Husejin Keran, Hatidža Pašalić, Indira Šestan

University of Tuzla, Faculty of Technology, Bosnia and Herzegovina

Milk is natural food rich with calcium, proteins, vitamins and minerals, important for growth and proper functioning of a human organism. The composition of milk varies depending on its origin a propos the animals from which it was raised. In relation to the content of lipids, proteins and lactose, mineral substances were present in much smaller quantity. However, their importance in nourishment and their significance for physico-chemical balance of colloid system of milk as well as technological structure of milk is significant. Calcium (Ca^{2+}) belongs to one of the most important macro elements, whose main role is indispensable for the proper growth and development of bones, and its content can be even 128 mg/100g of milk. Some of cations (Ca^{2+}) were bound with proteins as salts, and even were constitutional elements of their structure. Thanks to them, the existence of casein salt in milk is possible, and also stability of the colloid system of milk (casein) depends from them. Due to this, it is important to know and to control the content of Ca in milk. In this work the results of determining Ca in milk will be presented, by using standard method for determining Ca (complexometry, HPLC) and using ion selective potentiometry (ISP), a propos using ion selective electrode of Ca. The aim of this work is to demonstrate the advantages of application of ion selective potentiometry in controlling content of Ca in milk, its sensitivity and efficiency.

Key words: milk • Ca • ion–selective potentiometry

¹RENATA R. RELIĆ
¹MIHAILO S. OSTOJIĆ
²VUJADIN M. VUKOVIĆ
¹GORAN M. JEŽ

¹Univerzitet u Beogradu,
 Poljoprivredni fakultet
²Naučni institut za veterinarstvo
 Srbije, Beograd

NAUČNI RAD

UDK: 636.2:636.083.32:637.12:637.05

USLOVI SMEŠTAJA I KVALITET MLEKA KRAVA SA PODRUČJA GOLIJE

U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja uslova smeštaja i držanja krava na šest farmi sa područja planine Golija, kao i higijenskog kvaliteta zbirnih uzoraka mleka iz svakog domaćinstva. U obzir su uzeti prostorni, mikroklimatski i higijenski uslovi smeštaja, a kvalitet mleka procenjen je na osnovu ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija.

Rezultati ispitivanja su pokazali da uslovi smeštaja odgovaraju u pogledu prostornih karakteristika, a da bi korekcije u pogledu mikroklimatskih i higijenskih uslova doprinele boljoj dobrobiti krava. Kvalitet mleka uglavnom odgovara po broju somatskih ćelija, ali ne i po ukupnom broju mikroorganizama.

Ključne reči: uslovi smeštaja • kvalitet mleka • mlečne krave

UVOD

Planinska područja Srbije pogoduju razvoju stočarstva i gajenju goveda (Beskorovajni i Radivojević, 2006), pri čemu posebnu prednost predstavlja obilje travnatih površina, mogućnost kretanja i prirodan način ishrane životinja na paši. Ovakvi uslovi pozitivno utiču na dobrobit mlečnih krava, njihovu produktivnost i dobro zdravstveno stanje (Hristov i sar., 2006a), što predstavlja potencijal za unapređenje proizvodnje mleka i mlečnih proizvoda u ovim krajevima.

Za dobijanje kvalitetnih proizvoda od mleka preduslov je postojanje sirovine vrhunskog kvaliteta jer se svaki njen nedostatak direktno odražava na finalni proizvod (Ostojić i Orlović, 2002). Upotrebljivost mleka za prerađivanje i održivost mlečnih proizvoda naročito zavisi od higijenskog kvaliteta sirovog mleka, zbog čega je neophodno poznavati faktore koji na njega utiču.

Broj somatskih ćelija (BSC) i ukupni broj mikroorganizama kao parametri higijenskog kvaliteta mleka, povezani su s velikim brojem činilaca. U tom pogledu, od posebnog je značaja uticaj higijene muže i vimena, kao i uslovi u kojima borave muzna grla (Barberg i sar., 2007; Hristov i sar., 2005; Ruegg, 2004; Srairi i sar, 2006; Wojcik, 2007). Smeštajni uslovi mogu biti izvor stresora koji utiču na povećanje BSC u mleku (Hristov i sar., 2006; Katić, 2007) ali i sredina pogodna za razvoj mikroorganizama koji mogu kontaminirati mleko dok je još u mlečnoj žlezdi ili posle muže (Hristov, 2002). Procena uslova smeštaja u različitim sistemima gajenja mlečnih krava poslednjih godina predstavlja predmet istraživanja koja se sprovode i u našoj zemlji (Hristov i sar., 2008; Hristov i Relić, 2009; Maksimović i sar., 2007; Relić i sar., 2008).

Cilj ovog rada je utvrđivanje prostornih, mikroklimatskih i higijenskih uslova smeštaja na farmama u planinskom području Srbije i sagledavanje njihovog mogućeg uticaja na higijenski kvalitet mleka krava.

MATERIJAL I METODI

Ispitivanje je izvršeno na šest farmi goveda ekstenzivnog tipa sa po-

dručja planine Golija. Na svim farmama krave se drže vezane u stajama zatvorenog tipa, sa mogućnošću boravka na pašnjaku u toku toplijeg dela godine (period maj-oktobar).

Uslovi smeštaja su analizirani u pogledu prostornih, mikroklimatskih i higijenskih karakteristika staja, a procenjena je i higijena tela i vimena muznih grla, kao i higijenski kvalitet mleka zbirnih uzoraka mleka iz svakog domaćinstva. Higijena muže na svim farmama sprovedena je pranjem vodom iz zajedničke kofe i brisanjem zajedničkom krpom, ali nije posebno ocenjivana jer su podaci prikupljeni anketiranjem. Muža se obavlja uglavnom ručno.

Procena prostornih uslova izvršena je merenjem dimenzija staja, ležišta, prozora, vrata, ispusta, ograda i valova za ishranu. Pri formiranju konačne ocene pojedinog parametra uzet je u obzir veći broj podataka osim merenih, kao što su položaj same staje, tip i stanje sistema za ventilaciju, zatim karakteristike materijala za izgradnju zidova, tavanice i podova, trenutno stanje u pogledu funkcionalnosti i eventualnih oštećenja, kao i vrsta i količina prostirke.

Mikroklimatski uslovi u staji procenjeni su na osnovu podataka dobijenih: merenjem temperature, relativne vlažnosti i brzine strujanja vazduha kombinovanim digitalnim aparatom, intenziteta osvetljenja merenim digitalnim Lux-metrom, vizuelnim utvrđivanjem količine čestica prašine, subjektivnim utiskom o intenzitetu buke i vibracija, kao i prisustvu štetnih gasova u vazduhu.

Procena higijenskih uslova izvršena je na osnovu vizuelne ocene higijene prostirke, ležišta i podova, zidova, tavanice, prozora, ispusta, ograda,

Adresa autora:
 Mr Renata Relić, Poljoprivredni fakultet,
 Univerzitet u Beogradu
 Nemanjina 6, Beograd-Zemun
 tel.: 011/2615-315,
 e-mail: rrelic@agrif.bg.ac.rs

hranilica i pojilica, kanala i hodnika za izdubavanje i ventilacionih kanala.

U proceni uslova smeštaja uzeti su u obzir minimalni standardi uslova gajenja kao i potrebe životinja (Webster, 1995, 2001; Bartussek-u i sar., 2000; Fregonesi i Leaver, 2001), a sama procena izvršena je prema metodi opisanoj u radu Hristova i Relić (2009). Na osnovu utvrđenog stanja, svaki ispitivani parametar ocenjen je sa minimalno 0 do maksimalno 5 bodova (5 - odličan, 4 - vrlo dobar, 3 - dobar, 2 - dovoljan, 1 - nedovoljan, ima resursa za poboljšanje, 0 - nedovoljan, nema resursa za poboljšanje). Deljenjem ukupnog broja poena sa brojem ocenjenih parametara dobijena je konačna ocena.

Procena higijene tela i vimena muznih krava izvršena je prema metodi koju su opisali Reneau i sar. (2005) i Cook i Reinemann (2007). Na osnovu stepena zaprljanosti korena repa, bokova, abdomena, vimena i zadnjih nogu dati su poeni od 1 do 5 (5 - čisto, 4 - malo prljavo, 3 - umereno prljavo, 2 - prljavo, 1 - veoma prljavo).

Higijenski kvalitet mleka procenivan je na osnovu ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija zbirnih uzoraka, uzetih iz posuda za čuvanje mleka u različitom vremenskom periodu posle muže. Uzorci su uzeti u sterilne posude sa poklopcem i analizirani prema Pravilniku o metodama analiza i superanaliza životnih namirnica Sl.list SFRJ 25/80 i II Postupku za određivanje prisustva, izolovanje i identifikaciju mikroorganizama.

Dobijeni podaci obrađeni su standardnim statističkim metodama.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja prostornih uslova smeštaja na farmama nalaze su u tabeli 1. Ocene pojedinih parametara objedinjene su za sve farme radi lakšeg prikaza utvrđenih nedostataka i date su kao prosečne ocene.

Podaci u tabeli 1 pokazuju da su, u pogledu prostornih karakteristika, u svim stajama najlošije ocenjeni sistem za ventilaciju i prozori (nedovoljan), a najbolje hodnik za raspodelu hrane, kao i oprema za hranjenje i napajanje (vrlo dobar). Kanali i hodnik za izdubavanje zadovoljavaju potrebe svojim dimenzijama i načinom izgradnje (dovoljan) dok su karakteristike ostalih ispitivanih parametara prosečno ocenjene kao dobre (vrata, ispušt, zidovi, tavanica, ležište, staja). Na osnovu

pojedinačnih prosečnih ocena pojedinih parametara, prostorni uslovi na farmama su ocenjeni kao dobri (ocena 2,79).

Tabela 1. OCENE PROSTORNIH USLOVA U STAJAMA
Table 1. RATING OF SPATIAL CONDITIONS IN STALLS

Parametar / Parameter	Prosečna ocena Average mark
Staja / Stall	3,33
Ležište / Bed	3,17
Hodnik za ishranu / Feeding corridor	3,50
Hodnik za izdubavanje / Corridor behind canal for manure	2,33
Oprema za ishranu / Feeders	4,00
Oprema za napajanje / Equipment for watering	4,00
Kanali za izdubavanje / Canals for manure removing	2,00
Ispust / Stall yard	3,00
Ventilacija / Ventilation	1,00
Prozori / Windows	1,33
Vrata / Doors	2,67
Zidovi / Walls	3,00
Krov (tavanica) / Roof (ceiling)	3,00
Ukupna prosečna ocena / Total average mark	2,79
0-1,99 nedovoljan /unsatisfactory; 2,00-2,49 dovoljan /satisfactory; 2,5-3,49 dobar /good; 3,5 - 4,49 vrlo dobar / very good; 4,5 - 5,00 odličan /excellent	

Nedostaci u izgradnji staja odrazili su se na ocenu pojedinih parametara mikroklima, što je prikazano u tabeli 2.

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 2 uočava se da u svim stajama problem predstavljaju osvetljenje i br-

nodnika za izdubavanje na svim farmama. Higijena ležišta, prostirke, zidova i tavanice ocenjena je kao dovoljna, dok je higijena ograda, valova,

napajalica i hodnika za ishranu ocenjena kao dobra. Ukupna prosečna ocena higijenskih uslova na svim farmama je 2,35 (dovoljan).

U sledećoj tabeli prikazani su rezultati za svaku ispitivanu farmu, i

Tabela 2. OCENE MIKROKLIMATSKIH USLOVA U STAJAMA
Table 2. RATING OF MICROCLIMATE CONDITIONS IN STALLS

Parametar / Parameter	Prosečna ocena Average mark
Temperatura vazduha / Air temperature	3,50
Relativna vlažnost vazduha / Relative humidity	3,50
Brzina strujanja vazduha / Air velocity	1,83
Čestice prašine / Air dust	3,00
Štetni gasovi / Harmless gasses	2,67
Buka i vibracije / Noise and vibrations	5,00
Osvetljenje / Lightening	1,17
Ukupna prosečna ocena / Total average mark	2,95
0-1,99 nedovoljan /unsatisfactory; 2,00-2,49 dovoljan /satisfactory; 2,5-3,49 dobar /good; 3,5 - 4,49 vrlo dobar / very good; 4,5 - 5,00 odličan /excellent	

zina strujanja vazduha, rezultirajući nedovoljnim prosečnim ocenama. Vrednosti većine ostalih parametara ocenjene su kao dobre (temperatura i relativna vlažnost vazduha, zastupljenost čestica prašine na predmetima i u vazduhu, prisustvo štetnih gasova u vazduhu), dok je odsustvo buke i vibracija ocenjeno kao odlično. To je uticalo da su mikroklimatski uslovi u stajama svih farmi ocenjeni prosečno kao dobri (2,95).

U tabeli 3 prikazane su prosečne ocene higijenskih uslova u stajama za pojedine parametre.

Rezultati iz tabele 3 ukazuju na nedovoljnu higijenu prozora, kanala i

to: ukupne ocene prostornih, mikroklimatskih i higijenskih uslova na osnovu kojih se farme mogu rangirati prema kvalitetu uslova smeštaja, kao i ocene higijene vimena i tela krava.

Rezultati ispitivanja uslova smeštaja pokazuju da 50% farmi ima zadovoljavajuće uslove smeštaja a ostale dobre. Uslovi na farmi C su se pokazali kao najlošiji u pogledu sva tri parametra, nasuprot farmi D, gde su najbolji. Ocene higijene vimena i tela životinja pokazuju da se nezi životinja u ovom pogledu najviše pažnje posvećuje na farmama E i F, a najmanje na farmi A i D. Prema ocenama iz tabele 4, 2-50% površine zadnjeg

Tabela 3. OCENE HIGIJENSKIH USLOVA U STAJAMA
Table 3. EVALUATION OF HYGIENIC CONDITIONS IN STALLS

Parametar / Parameter	Prosečna ocena Average mark
Higijena ležišta / Hygiene of bed	2,17
Higijena prostirke / Hygiene of bedding	2,33
Higijena ograda / Hygiene of fences	3,17
Higijena valova / Hygiene of feeders	3,00
Higijena napajalica / Hygiene of waterers	3,00
Higijena hodnika za ishranu / Hygiene of feeding corridor	2,8
Higijena kanala i hodnika za izđubranje / Hygiene of canals and corridors for manure	1,67
Higijena prozora / Hygiene of windows	0,83
Higijena zidova / Hygiene of walls	2,17
Higijena krova (tavanice) / Hygiene of roof (ceiling)	2,33
Ukupna prosečna ocena / Total average mark	2,35
0-1,99 nedovoljan /unsatisfactory; 2,00-2,49 dovoljan /satisfactory; 2,5-3,49 dobar /good; 3,5 – 4,49 vrlo dobar / very good; 4,5 – 5,00 odličan /excellent	

U sledećoj tabeli prikazani su rezultati ispitivanja jačine korelacije između pojedinih parametara uslova smeštaja, higijene tela i vimena krava, BSC i ukupnog broja mikroorganizama u mleku.

Rezultati prikazani u tabeli 6 ukazuju na slabu pozitivnu korelaciju između prostornih uslova staje sa nivoom higijene vimena i tela muznih životinja, a jaku pozitivnu korelaciju prostornih uslova sa higijenskim uslovima u staji. Srednje jaka negativna korelacija utvrđena je između prostornih uslova i BSC, kao i u odnosu na ukupan broj mikroorganizama u mleku, dok je statistički značajna jaka pozitivna korelacija na nivou $p < 0,05$ utvrđena između prostornih i mikroklimatskih uslova u staji.

Ovi podaci govore o povezanosti i međusobnom uticaju smeštajnih uslo-

Tabela 4. OCENE USLOVA SMEŠTAJA I HIGIJENE KRAVA NA FARMAMA
Table 4. EVALUATION OF HOUSING CONDITIONS AND COWS HYGIENE AT FARMS

Elementi ocenjivanja / Elements of evaluation	Farma/ Farm					
	A	B	C	D	E	F
Prostorni uslovi* / Spatial conditions	2,71	2,71	2,29	2,57	2,93	2,36
Mikroklimatski uslovi* / Microclimate conditions	2,75	2,63	1,88	2,13	3,13	2,25
Higijenski uslovi* / Hygienic conditions	2,20	2,20	2,10	2,30	3,10	2,00
Prosečna ocena uslova smeštaja* / Average mark of housing conditions	2,55	2,51	2,09	2,33	3,05	2,20
Higijena vimena i tela krava** / Cows udder and body hygiene	2	3	3	2	4	4

* 0-1,99 nedovoljan / unsatisfactory; 2,00-2,49 dovoljan/ satisfactory; 2,5-3,49 dobar/ good; 3,5 – 4,49 vrlo dobar/ very good; 4,5 – 5,00 odličan/ excellent

** 1 - veoma prljavo, > 50% površine/covered with mud and dirt, >50% of surface area; 2 - prljavo, 30-50% površine/covered with caked on dirt, 30-50% of surface area; 3- umereno prljavo, 10-30% površine/moderately covered with dirt, 10-30% of surface area; 4 - malo zaprljano, 2-10% površine/slightly dirty, 2-10% of surface area; 5 - čisto, bez nečistoća/clean, free of dirt.

Tabela 5. BROJ SOMATSKIH ČELIJA (BSC) I UKUPAN BROJ MIKROORGANIZAMA U ZBIRNIM UZORCIMA MLEKA
Table 5. SOMATIC CELLS COUNT (SCC) AND TOTAL NUMBER OF COLONY FORMING UNITS (CFU) IN BULK MILK

Farma/Farm	BSC/mL SCC/mL	Ukupan broj mikroorganizama/mL Total CFU/mL
A	137000	12000000
B	321000	21000000
C	436000	42000000
D	344000	50000000
E	400000	15000000
F	427000	18000000
Prosečno/Average	344166,7	26333330

dela tela i vimena kod svih ispitivanih krava bilo je pokriveno prljavštinom.

U tabeli 5 nalaze se rezultati analiza uzoraka iz sudova za čuvanje mleka u pogledu broja somatskih ćelija i ukupnog broja mikroorganizama.

Prema podacima iz tabele 6, broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka kretao se od 137×10^3 /mL (farma A) do 436×10^3 /mL (farma C), sa prosečnim brojem od oko 344×10^3 , što je u skladu sa našim propisima (Anon., 2002). Najveći BSC na farmi

C poklapa se i sa najnižom ocenom smeštajnih uslova koji su dodeljeni ovoj farmi. Ukupan broj mikroorganizama/ml zbirnih uzoraka mleka kretao se od 12×10^6 (farma A) do 50×10^6 (farma D), sa prosekom oko 26×10^6 , što je daleko iznad granice koja je određena Pravilnikom (Anon., 2002). Detalji u vezi sa načinom dobijanja mleka odgovarajućeg kvaliteta mogu se naći u publikaciji Ostojića i Relića (2006).

va i parametara koji odgovaraju higijenskom kvalitetu mleka. Odgovarajuće unutrašnje dimenzije staje, ležišta i saobraćajnica u staji omogućavaju životinjama mogućnost odmora na suvoj i čistoj površini, kao i neometano održavanje higijene životinja i staje, čime je i broj mikroorganizama u staji manji. Postojanjem povoljnih prostornih uslova, odnosno odgovarajućeg komfora, smanjuje se intenzitet delovanja uobičajenih stresora, čime je i imunitet životinje pod manjim opterećenjem, pa mlečna žlezda ne reaguje povećanjem BSC. Osim toga, način izgradnje staje direktno utiče na kvalitet vazduha u njoj. O značaju načina izgradnje staje i vrsti građevinskog materijala, funkcionisanja sistema za ventilaciju i drugim prostornim karakteristikama na mikroklimatske uslove u staji, može se naći u publikacijama Hristova i sar. (2006a) i Pajumägi i sar. (2007; 2008).

Prema rezultatima iz tabele 6, mikroklimatski uslovi su u slaboj pozitivnoj korelaciji sa higijenom vimena i tela, a

u srednje jakoj negativnoj korelaciji sa BSC. Mikroklimatski uslovi su u jakoj pozitivnoj korelaciji sa higijenskim uslovima u staji, a jaka negativna korelacija utvrđena je u slučaju uticaja mikroklimatskih uslova na ukupan broj mikroorganizama u mleku.

higijenskim uslovima, kako u svom radu prikazuje i Cempírková (2007). Međutim, loša higijena staje, vimena i tela životinja nije pokazala značajan uticaj na veliki broj mikroorganizama u mleku. To ukazuje da su ove vrednosti najverovatnije rezultat kontamina-

Tabela 6. KORELACIJE IZMEĐU USLOVA SMEŠTAJA, HIGIJENE VIMENA I TELA KRAVA I HIGIJENSKOG KVALITETA MLEKA
Table 6. CORRELATIONS BETWEEN HOUSING CONDITIONS, UDDER AND BODY HYGIENE OF COWS, AND HYGIENIC QUALITY OF MILK

Parametar Parameter	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
2	0,93*	-	-	-	-	-
3	0,79	0,72	-	-	-	-
4	0,01	0,23	0,34	-	-	-
5	-0,41	-0,39	0,11	0,70	-	-
6	-0,50	-0,77	-0,25	-0,41	0,37	-

- 1 - Prostorni uslovi/Spatial conditions;
2 - Mikroklimatski uslovi/Microclimate conditions;
3 - Higijenski uslovi/Hygienic conditions;
4 - Higijena vimena i tela/Cows udder and body hygiene;
5 - BSC/ml/SCC/ml;
6 - Ukupan broj mikroorganizama/Total CFU/ml
* statistički značajno na nivou $p < 0.05$

Higijenski uslovi u staji su, prema tabeli 6, u slaboj pozitivnoj korelaciji sa BSC. Između higijene staje i ukupnog broja mikroorganizama u mleku utvrđena je slaba negativna korelacija, a srednje jaka pozitivna korelacija sa higijenom vimena i tela životinja.

Za nivo higijene vimena i tela životinja utvrđeno je da je u jakoj pozitivnoj, ali ne i statistički značajnoj korelaciji sa BSC, što nije u skladu sa podacima koje su svojim radovima dali Barkema i sar. (1998, 1999) i Reneau i sar. (2005). Dobijanje ovakvog rezultata može se protumačiti ograničenim brojem podataka, malim brojem uzoraka ali i postojanjem nekog drugog faktora koji doprinosi povećanju BSC, kao što je postojanje subkliničnog mastitisa u fazi kada nije moguće utvrditi uzročnika u mleku. Ovakvi slučajevi latentne infekcije zapaženi su kod (hroničnih) stafilokoknih mastitisa (Harmon, 1994). Srednje jaka negativna korelacija zapažena je između higijene tela i vimena i ukupnog broja mikroorganizama.

Broj somatskih ćelija u mleku pokazao je srednje jaku pozitivnu korelaciju sa ukupnim brojem mikroorganizama.

Prema podacima u tabeli 6, najjači uticaj na ukupan broj mikroorganizama imali su mikroklimatski uslovi i broj somatskih ćelija. Takođe, rezultati ukazuju da se smanjivanje broja mikroorganizama može očekivati u boljim

cije mleka u toku muže i skladištenja. Higijenske mere čišćenja staje ili tela životinja, ukoliko se sprovode neposredno pre ili u toku same muže, mogu doprineti kontaminaciji mleka i sudova za mleko, pa ih treba sprovoditi bar sat vremena pre muže. Pranje vimena pre muže vodom, kao higijenska mera koja se primenjuje na farmama, ukoliko je nepravilno izvedeno i uz lošu higijenu vimena može doprineti kontaminaciji izmuzenog mleka, naročito pri ručnoj muži. Rezultati ispitivanja efekata pojedinih higijenskih mera na redukciju broja mikroorganizama na koži papila vimena prikazani su u radu Vukovića i sar. (2007). O izvorima i mogućnosti kontaminacije mleka, kao i uticaju načina i dužine skladištenja mleka na povećanje početnog broja mikroorganizama u mleku, može se naći u radu Hristova (2002).

Procenom uslova smeštaja, prema metodi koja je prikazana u ovom radu i analizom uzoraka mleka, dobijeni su podaci koji ukazuju na određene nedostatke u izgradnji i održavanju staja, kao i o načinu i učestalosti primene pojedinih mera. Slične rezultate i zapažanja u pogledu uslova držanja krava na farmama ekstenzivnog tipa u našem regionu opisali su u svojim radovima Ostojić i Orlović (2002) i Whitelock (2004).

ZAKLJUČAK

Iz podataka navedenih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

- Prostorni i mikroklimatski uslovi u stajama ocenjeni su kao prosečno dobri, pri čemu su najveći propusti: rešenje ventilacije staja i stanje prozora, intenzitet osvetljenja i brzina strujanja vazduha. Ovi parametri uslova smeštaja pokazali su statistički značajnu povezanost na nivou $p < 0,05$.
- Ukupna prosečna ocena higijenskih uslova na svim farmama je „dovoljan“, a niskoj oceni najviše doprinose higijena ležišta, prostirke, zidova i tavanice. Ocene higijene vimena i tela životinja pokazuju da se nezi životinja ne posvećuje dovoljna pažnja, kao ni higijeni muže.
- Utvrđen prosečan broj somatskih ćelija je u skladu sa našim propisima. Rezultati mikrobiološke analize ukazuju na loše higijenske uslove kojima je mleko izloženo, i kao takvo bez termičke obrade ne predstavlja pogodnu sirovinu za preradu.

Način izgradnje staja, gajenja goveda i muže na području Gollje spoj je tradicionalnih shvatanja i savremenih saznanja, što zahteva njihovo prilagođavanje uslovima ali i adekvatnu i stalnu obuku proizvođača. Postojeće stanje moguće je korigovati, pre svega, poboljšanjem higijene staje, životinja i muže, što će se pozitivno odraziti na poboljšanje kvaliteta mleka, a time i mlečnih proizvoda.

ZAHVALNICA

Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR-20111, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Anon. 1980. Pravilnik o metodama vršenja analiza i superanaliza životnih namirnica Sl. list SFRJ 25/80.
- Anon. 2002. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter culture. Službeni list SRJ, br. 26/02.
- Barberg A.E., Endres M.I., Salfer J.A., Reneau J.K.: Performance and Welfare of Dairy Cows in an Alternative Housing System in Minnesota J. Dairy Sci. 90 (2007) 1575-1583.
- Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J. G.M., Beiboer M.L., Benedictus G., Brand A.: Management practices associated with low, mid, and high bulk milk somatic cell count. J. Dairy Sci. 81 (1998) 1917-1927.

- Barkema H.W., Van der Ploeg J.D., Schukken Y.H., Lam T.J.G.M., Benedictus G., Brand A.: Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 82 (1999) 1655-1663.
- Bartussek H., Leeb Ch. and Held S.: Animal need index for cattle, ANI 35 L/2000 -cattle. Federal Research Institute for Agriculture in Alpine Regions BAL, Gumpenstein. Austria. (2000) www.gumpenstein.at/publikationen/ignreport/ani35lc.pdf.
- Beskorovajni Radmila, Radivojević M.: Stočarstvo u Zapadnoj Srbiji sa posebnim osvrtom na region Zlatara. Poglavlje u monografiji: Ostojić M.: Zlatarski sir. Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd, (2006) 79-92.
- Cempírková R.: Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 2007 (11) 387-393.
- Cook N.B., Reinemann D.J.: A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. Proceedings of the 46th Annual NMC Meeting, San Antonio, TX. January 21-24, Pages 31-43 (2007).
- Fregonesi J.A., Leaver J.D.: Behaviour, performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in straw yard or cubicle systems. *Livestock Production Science*, 68 (2001) 205-216.
- Harmon, R.J.: Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. *J. Dairy Sci.*, 77 (1994) 2103-2112.
- Hristov S.: Najznačajniji aspekti utvrđivanja ukupnog broja mikroorganizama u svežem mleku krava. *Mlekarstvo* (2002) 208 - 216.
- Hristov S., Relić Renata, Stanković B.: Propusti u sprovođenju higijene vimena. Zbornik naučnih radova XVI savetovanja DDD u zaštiti životne sredine. Banja Vrujci, (2005) 257-262.
- Hristov S., Relić Renata, Stanković B., Vuković D.: Uticaj pojedinih faktora na broj somatskih ćelija u mleku krava. Zbornik naučnih radova XX savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, Vol. 12 (2006) 3-4, 47-57.
- Hristov S., Relić Renata, Joksimović-Todorović Mirjana, Davidović Vesna. Mikroklimatski i higijenski uslovi gajenja goveda. Poglavlje u monografiji: Ostojić M.: Zlatarski sir. Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd. (2006a) 55-78.
- Hristov S., Stanković B., Relić Renata, Todorović-Joksimović Mirjana: Dobrobit i biosigurnost na farmama. *Biotehnologija u stočarstvu*. Vol. 24 (2008) 39 - 49.
- Hristov S., Renata Relić: Ocena uslova smeštaja sa osvrtom na dobrobit krava. Zbornik naučnih radova XXIII savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, Institut PKB Agroekonomik, Beograd, 5 (2009) 3-4, 79-87.
- Katić Vera: Broj somatskih ćelija u oceni kvaliteta mleka. *Savremena poljoprivreda*, vol. 56, 5 (2007) 33-41.
- Maksimović Nevena, Hristov S., Stanković B., Davidović Vesna (2007): Procena uslova gajenja i dobrobiti muznih krava. Tematski zbornik 1 Međunarodne konferencije o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Zemun, 14. i 15. novembar 2007, 141-147.
- Ostojić M., Orlović Jelena: Uticaj pripremnih postupaka muže na (higijenski i kompozitni) kvalitet mleka. *Savremena poljoprivreda*, Vol. 51 (2002) 3-4, 123-126.
- Ostojić M., Relić Renata: Kvalitet mleka za proizvodnju zlatarskog sira. Quality of milk for zlatar cheese production. Poglavlje u monografiji: Ostojić M.: Zlatarski sir. Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd. (2006) 115-134.
- Pajumägi A., Veermäe I., Praks J., Poikalainen V. and Miiljan J.: Spatial microclimate patterns in reconstructed and new large uninsulated loose housing cowsheds. *Building and Environment*, 42 (2007) 113-121.
- Pajumägi A., Poikalainen V., Veermäe I., Praks J. Spatial distribution of air temperature as a measure of ventilation efficiency in large uninsulated cowshed. *Building and Environment* 43 (2008) 1016-1022.
- Reneau, J.K., A.J. Seykora, B.J. Heins, M.I. Endres, R.J. Farnsworth and R.F. Bey: Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *JAVMA* 227 (2005) 1297-1301.
- Ruegg P.L. 2004. Managing for Milk Quality. http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/managing_for_milk_quality_english.pdf
- Srairi M.T., Moudnib J., Rahho L. and A. Hamama: How do milking conditions affect the hygienic quality of raw milk? Case study from Moroccan dairy farms. *Livestock Research for Rural Development* 18 (7) 2006.
- Vuković D., Relić Renata, Hristov S. (2007): Dezinfekcija vimena krava pre muže. Tematski zbornik 1 međunarodne konferencije o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Zemun, 14. i 15. novembar 2007, 277-281.
- Webster J.: Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *Vet J.*; 161, 3 (2001) 229-37.
- Webster J.: *Animal Welfare: Limping Towards Eden*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK (2005).
- Whitelock L. LAMP PROJEKT, Povezivanje poljoprivrednih tržišta i proizvođača, Bosna i Hercegovina. Poboljšanje kvalitete mlijeka, Land O'Lakes Avgust 12, 2004 <http://www.usaidlamp.ba/ba/consultants/Lindel-Whitelock-Final-Report-Milk-Quality-August2004.pdf>
- Wojcik P.: Udder conformation and housing system as related to somatic cell count in cow's milk. *Journal of Animal and Feed Sciences*, vol: 16, 2 (2007), 180-192.

SUMMARY

HOUSING CONDITIONS AND MILK QUALITY OF COWS FROM MOUNTAIN GOLIIJA REGION

¹Renata R. Relić, ¹Mihailo S. Ostojić, ²Vujadin M. Vuković, ¹Goran M. Jež

¹University of Belgrade, Faculty of Agriculture, ²Veterinary Institute of Serbia, Belgrade

In this work, results from examination of housing and keeping conditions of cows on six farms in the region of mountain Golija and the hygienic quality of the bulk milk samples from each of the households are presented. The factors taken into consideration were space, microclimatic and hygienic conditions of the housing. Milk quality was evaluated after collecting data of the total bacteria and somatic cells count.

Results of the research showed that housing conditions are appropriate space-wise, nevertheless better microclimatic and hygienic conditions could improve the welfare of the cows. Quality of milk was according to the standards considering somatic cells count. However, the same was not the case with total bacteria count.

Key words: housing conditions • milk quality • cows

SPAŠENIJA D. MILANOVIĆ
 MARIJANA Đ. CARIĆ
 MIRELA D. ILIČIĆ

Univerzitet u Novom Sadu,
 Tehnološki fakultet

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.1:637.05

PREGLED ISTRAŽIVANJA MIKROSTRUKTURE MLEČNIH PROIZVODA

Istraživanje mikrostrukture mlečnih proizvoda veoma je kompleksno i zahteva primenu visokosofisticiranih aparata. Najčešće se primenjuju dve tehnike: scanning i transmisiona elektronska mikroskopija, koje omogućavaju vizuelno praćenje transformacije mleka tokom procesa proizvodnje različitih mlečnih proizvoda. Razvoj elektronske mikroskopije doprineo je preciznijem definisanju strukturnih elemenata mleka i mlečnih proizvoda. Hemijski sastav, reološke karakteristike i senzorna svojstva u direktnoj su korelaciji sa mikrostrukturom proizvoda. Tehnološki proces proizvodnje i parametri procesa imaju značajan uticaj na formiranje strukturnih karakteristika finalnog proizvoda.

U radu je dat pregled primene elektronske mikroskopije u determinaciji kvaliteta fermentisanih mlečnih proizvoda, različitih vrsta sireva, topljenog sira, retentata, permeata, i mleka u prahu.

Ključne riječi: mleko • mlečni proizvodi • mikrostruktura • elektronska mikroskopija

UVOD

Mleko je složen fizičko-hemijski sistem podložan brojnim transformacijama pod dejstvom različitih parametara tehnološkog procesa. Dominantnu ulogu u determinaciji kvaliteta proizvoda imaju makro- i mikrokomponente mleka. Tokom procesa proizvodnje različitih mlečnih proizvoda dešavaju se kompleksne strukturne promene proteina, laktoze i mlečne masti (Kaláb i Carić, 1990; Kalab, 1995; Milanović, 1996; Panić, 2005).

Navedene komponente mleka mogu da se podele na strukturne elemente koji mogu da se vide pod elektronskim mikroskopom i sastojke nevidljive i uz najveća uvećanja. Najmanje vidljive čestice u mleku su kazeinske submicele, čiji je prečnik oko 10 nm. Kazeinske micle su veće i njihov prečnik se kreće od 100 do 300 nm. Masne globule imaju prečnik od nekoliko mikrometara, dok bakterije mlečne kiseline imaju veći prečnik koji iznosi oko 1 μm (Kaláb, 1990, Milanović, 1996, Brans i sar., 2004).

Proteini surutke i laktoza se ne vide ni pod elektronskim mikroskopom dok su rastvoreni u vodenoj fazi. Koagulirani proteini surutke i kristali laktoze su vidljivi, jer molekule tih supstanci delimično formiraju koagulat proteina surutke ili su pravilno raspoređeni u obliku čvrstih kristala sastavljenih od velikog broja molekula (Kaláb, 1990, Brans i sar., 2004). Prosečan sadržaj i veličina čestica mleka prikazani su u tabeli 1 (Brans i sar., 2004).

U fizičkom smislu mleko i mlečni proizvodi predstavljaju: njutnovske suspenzije, različite čvrste prahove, viskozne fluide, gelove, pene, emulzije, plastične i termoplastične supstrate (Kaláb, 1990). Mikrostrukturu mlečnih proizvoda karakterišu masne globule, membrane, koloidni agregati i kristali. Navedeni elementi tokom tehnološkog procesa mogu međusobno da intereaguju i formiraju veoma raznovrsne teksturalne karakteristike mlečnih proizvoda (Kaláb i Carić, 1990; Kalab, 1995; Milanović, Carić, Iličić, 2007).

Elektronska mikroskopija predstavlja savremenu tehniku koja omogućava vizuelno praćenje i upoređivanje strukturnih karakteristika mleka i mlečnih proizvoda sa drugim fizičko-hemijskim

osobinama proizvoda (čvrstoća, viskozitet, mazivost i dr).

Postoji nekoliko načina izvođenja elektronske mikroskopije, od kojih su najpoznatije: scanning elektronska mikroskopija (SEM), transmisiona elektronska mikroskopija (TEM), niskonaponska emisija scanning elektronska mikroskopija (povećava rezoluciju slike), scanning elektronska mikroskopija uz primenu visokog napona (omogućava posmatranje delimično vlažnih neprovodljivih supstrata u nativnom obliku bez prethodne pripreme uzorka), cryo-scanning elektronska mikroskopija (brzo zamrzavanje uzorka bez prethodne hemijske fiksacije i sušenja) i *environmental* scanning elektronska mikroskopija (uzorak okružen vodenom parom, pri čemu se kontroliše delimični vakuum u okolini uzorka) (Schneider, Parish, 2006). Imajući u vidu veoma kompleksnu strukturu mlečnih proizvoda, najčešće se za ispitivanje mikrostrukture koriste SEM i TEM tehnika. Postoje elektronski mikroskopi koji kombinuju tehnike SEM i TEM u jednom instrumentu (STEM) međutim češće se koriste odvojeni instrumenti (Schneider, 2006).

Mikrostruktura mlečnih proizvoda

Fermentisani mlečni proizvodi

Sposobnost proteina mleka da formira gel osnova je tehnologije fermentisanih mlečnih proizvoda i proizvodnje sira. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da strukturu gela čine kazeinske micle međusobno povezane tako da formiraju proteinske lance i nakupine. Međutim ipak postoje razlike u formiranju gela kod fermentisanih mlečnih proizvoda i gela dobijenog koagulacijom proteolitičkim enzimima.

Adresa autora:
 Prof.dr Spasenija Milanović
 Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
 Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad
 tel.: 021/485-3712
 e-mail: senadm@uns.ac.rs

Tabela 1. PROSEČAN SASTAV MLEKA: KONCENTRACIJA I VELIČINA ČESTICA (Brans i sar., 2004)
 Table 1. AVERAGE COMPOSITION OF MILK: CONCENTRATION AND SIZE DISTRIBUTION (Brans i sar., 2004)

Komponenta Components	Koncentracija u punomasnom mleku/ Concentration in full fat milk (g/l)	Prosečna veličina i težina čestica/ Average size and weight of particle
Voda	87,1	
Masna globula	4,0	0,1-15µm, prosečno 3,4 µm
Kazein (u micelama)	2,6	20-300 nm, prosečno 100 nm
Serum proteini	0,7	3-6 nm
α-laktoalbumin	0,12	14 kDa
β-laktoalbumin	0,32	18 kDa
BSA	0,04	66 kDa
Proteoso-peptoni	0,08	4-40kDa
Imunoglobulini	0,08	150-900 kDa
Laktoferin	0,01	76 kDa
Ostalo	0,04	
Laktoza	4,6	0,35kDa
Mineralne supstance	0,7	
Organske kiseline	0,17	
Drugo	0,15	

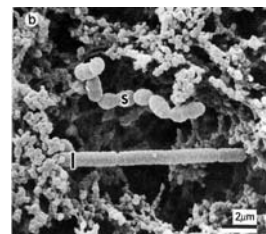
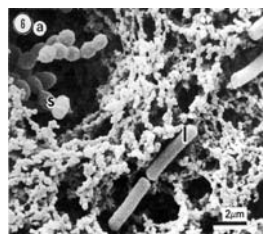
Osnovne strukturne promene tokom procesa proizvodnje jogurta odvijaju se na kazeinskoj miceli koja usled sniženja pH vrednosti disagregira, pri čemu se izdvajaju kalcijumovi joni, potom se odvija agregacija i formira se trodimenzionalna struktura gela.

Osnovne karakteristike gela su odgovarajuća čvrsta i homogena konzistencija, dobra sposobnost vezivanja vode -sinerezis i svojstvena mikrostruktura. Čvrtoća gela i smanjenje sinerezisa se postiže termičkim tretmanom i/ili dodatkom pojedinih ingredijenata. Navedene karakteristike se mogu poboljšati dodatkom obranog mleka u prahu, proteina surutke ili koncentrata proteina surutke.

U novijim istraživanjima Bhullar i sar. (2002) dokazali su da se najbolje karakteristike proizvoda postižu dodatkom koncentrata proteina surutke (KPS), obzirom da formira gusto isprepleten proteinski matriks sa veoma malim porama između lanaca i manje je podložan sinerezisu. Međutim, gel dobijen u proizvodnji jogurta proizveden uz primenu proteina surutke i obranog mleka u prahu je osetljiviji na sinerezis u poređenju sa uzorcima u kojima je dodavan KPS (Bhullar i sar., 2002).

Takođe, Antunes i sar. (2004) ispitivali su uticaj KPS i obranog mleka u prahu na fizičko-hemijske karakteristike jogurta. Potvrđeno je da dodatak koncentrata proteina surutke poboljšava čvrstoću i kohezivnost, redukuje sinerezis, poboljšava puferni kapacitet i vreme fermentacije u poređenju sa jogurtom dobijenim uz primenu obranog mleka u prahu. Mikrostruktura jogurta u koji su dodati koncentri pro-

teina surutke je kompaktna i pravilan je raspored proteinskih lanaca (Antunes et al., 2004).



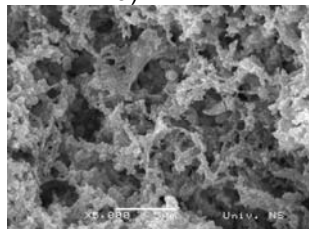
Slika 1. MIKROSTRUKTURA JOGURTA (Tamime, Robinson, 2004)
 Figure 1. MICROSTRUCTURE OF YOGHURT (Tamime, Robinson, 2004)

Pojedine karakteristike fermentisanih mlečnih proizvoda mogu se poboljšati i dodatkom skroba ili nekih drugih stabilizatora.

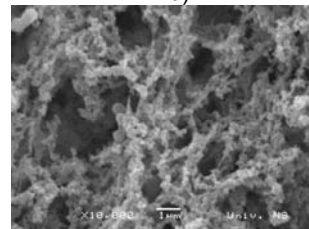
Tipična mikrostruktura jogurta sa vidljivim mikroorganizmima inkorporiranim unutar proteinskog matriksa prikazana je na slici 1.

Poslednjih godina veoma interesantna oblast za istraživanje je primena transglutaminaze za proizvodnju jogurta poboljšanih karakteristika.

a)

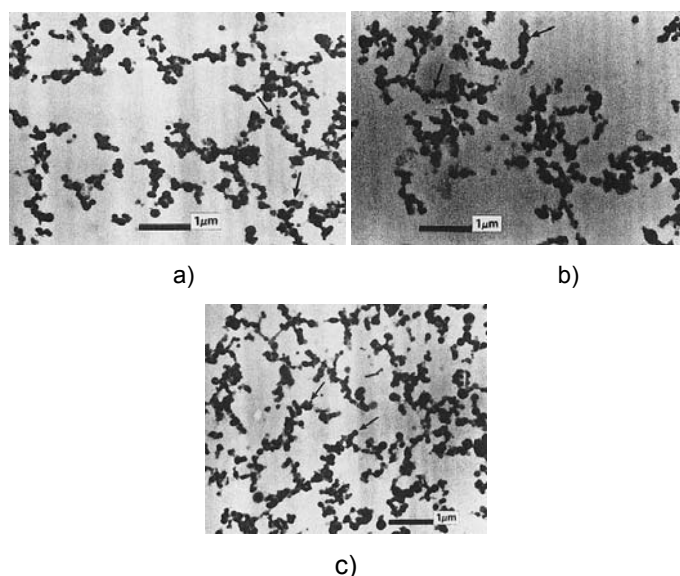


b)



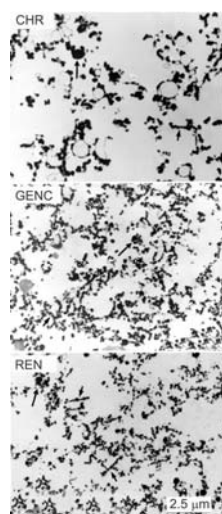
Slika 2. MIKROSTRUKTURA PROBIOTSKOG JOGURTA SA 0,02% TG (sa aktivacijom 40°C, 2 sata) PROIZVEDENOG IZ MLEKA SA: a) 0,1% MASTI I b) 0,5% MASTI

Figure 2. MICROSTRUCTURE OF PROBIOTIC YOGHURT PRODUCED WITH 0.02% TG ADDITION (activated at 40°C during 2 hours) PRODUCED FROM MILK OF: a) 0,1% FAT CONTENT AND b) 0,5% FAT CONTENT



Slika 3. PROTEINSKI MATRIKS GELA PROIZVEDENOG KOAGULACIJOM NEHOMOGENIZOVANOG UF RETENTATA SA RAZLIČITIM SADRŽAJEM PROTEINA: a) 5,0% b) 6,5% i c) 10% (Gavarić i sar., 1989)

Figure 3. DETAILS OF THE PROTEIN MATRICES IN GELS MADE BY RENNET FROM A NONHOMOGENIZED UF RETENTATE AT VARYING PROTEIN CONCENTRATIONS: a) 5.0% b) 6.5% i c) 10.0% (Gavarić i sar., 1989)



Slika 4. PROTEINSKI MATRIKS KAČKAVALJA DOBIJENOG KOAGULACIJOM ULTRAFILTRIRANOG MLEKA (RETENTATA) UZ KORIŠĆENJE RAZLIČITIH VRSTA ENZIMA ZA KOAGULACIJU: a) ENZIM (HA-BO, CHR. HANSEN'S LAB. A/S, Danska – CHR) b) REKOMBINOVANI HIMOZIN (*Kluyveromyces lactis*, Maxiren 15L, Gist brocades, Holandija – GENC); c) MICROBIAL PROTEASE (*R. miehei*, Rennilase 50I, Novo Industri A/S, Denmark – REN). (Milanović, 1993; Milanović i sar., 1998)

Figure 4. PROTEIN MATRICES OF KASHKAVAL CURDS OBTAINED BY COAGULATING UF MILK RETENTATE USING: a) RENNET (HA-BO, CHR. HANSEN'S LAB. A/S, Denmark - CHR); b) RECOMBINANT CHYMOSIN (*Kluyveromyces lactis*, Maxiren 15L, Gist brocades, The Netherlands - GENC); c) MICROBIAL PROTEASE (*R. miehei*, Rennilase 50I, Novo Industri A/S, Denmark - REN). (Milanović, 1993; Milanović et al., 1998)

mleka sa: a) 0,1% masti i b) 0,5% masti prikazana je na slici 2. Evidentno je da sadržaj masti u mleku za proizvodnju jogurta značajno ne utiče na strukturu proteinskog matriksa. U oba uzorka izgled i struktura proteinskih lanaca je karakteristična za jogurt dobijen iz punomasnog mleka. Proteinski matriks je homogen, lanci proteina su pravilno raspoređeni i grade kompaktnu konzistenciju proizvoda čak i pri dodatku TG u minimalnoj koncentraciji 0,02%.

Sirevi

Sir predstavlja kompleksan sistem jer nastaje složenom transformacijom mleka, odnosno kao rezultat interakcija kazeinskih micela, masnih glo

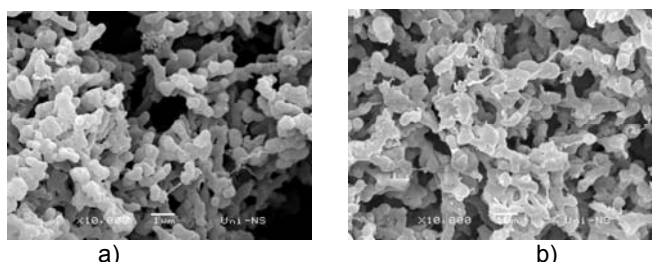
bula, bakterija mlečne kiseline i drugih konstituenata. Tokom procesa proizvodnje sira umrežavanje se odvija agregiranjem kazeinskih micela i formiranjem kompaktnog kazeinskog matriksa. Za razliku od jogurta u proizvodnji sira sinerezis je poželjna operacija, jer surutka treba da se izdvoji od gruša da bi se povećala suva materija proizvoda. Sirmi gruša se proizvodi koagulacijom najčešće nehomogenizovanog mleka koje je najblaže termički tretirano. Na taj način se formiraju nakupine koje se tokom procesa obrade lako razbijaju i omogućavaju lakše izdvajanje surutke (Kalab, Carić, 1990; Milanović, 1993).

U proizvodnji sira primenjeni procesi prerade menjaju teksturu gruša i utiču na mikrostrukturu proizvoda. Formiranje proteinskih vlakana i njihova orijentacija u jednom pravcu prisutna je u Cheddar siru, i kod sireva Mozzarella, Provolone i Kačkavalj.

Međutim, kod sireva Edam, Gouda, Brick orijentacija proteinskog matriksa nije prisutna. Meki sirevi sa belim plesnima imaju tipičnu teksturu, ukus i miris, a pomoću elektronskog mikroskopa vide se hife koje penetriju u proteinski matriks (Kaláb i sar., 1989).

Imajući u vidu značaj analize mikrostrukture sira u poboljšanje kvaliteta proizvoda saradnici na predmetu Tehnologija mleka i mlečnih proizvoda na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu počeli su pre nekoliko decenija sa istraživanjem strukture gela i gruša u pojedinim fazama tokom procesa proizvodnje sira.

Gavarić i sar. (1989) ispitivali su mikrostrukturu gela netretiranog UF retentata sa različitim sadržajem pro-



Slika 5. MIKROSTRUKTURA KVARKA PROIZVEDENOG PRIMENOM:
a) TRADICIONALNOG STARTERA, b) PROBIOTSKE STARTER KULTURE (Panić, 2005, Iličić i sar., 2006, Iličić i sar., 2006, Milanović i sar., 2007)

Figure 5. MICROSTRUCTURE OF QUARK PRODUCED BY APPLICATION OF:

a) TRADITIONAL STARTER b) PROBIOTIC STARTER CULTURE (Panić, 2005; Iličić et al., 2006, Iličić et al., 2006, Milanović i sar., 2007)

teina koaguliranih himozinskim preparatom. Navedeni autori su utvrdili da sa porastom koncentracije proteina u retentatu postiže se pravilan porast gustine pakovanja i ukupnog broja micela po jedinici površine (slika 3).

Primenom SEM tehnike ispitivana je struktura svežeg sira tipa Quark. Mikrostrukturu svežih sireva tipa Quark čine gusto isprepleteni proteinski lanci, a u unutrašnjosti se mogu uočiti pojedine bakterije i polisaharidi u vidu tankih niti koji su produkt metaboličke aktivnosti korišćenih starter kultura (Slika 5; Panić, 2005; Iličić i sar. 2006; Milanović i sar., 2007).

Pored navedenih nativnih sireva, posebnu grupu čine topljeni sirevi. Topljeni sirevi imaju takođe specifičnu mikrostrukturu koja zavisi od tipa korišćenog sira, kao i od vrste emulgjućeg agensa (Carić i sar., 1985; Carić, Milanović, 1997).

Topljeni sirevi proizvedeni sa natrijum citratom su čvršće konzistencije u odnosu na analogne topljene sireve proizvedene sa trinatrijum fofatom, pri čemu čvrstoća pravilno raste sa porastom koncentracije sira u smeši. Pri-

sustvo npr. belog sira do koncentracije od 8% u topljenom siru u vidu karakteristične strukture "jezgro i ljuska" detektovano je metodom transmisionne mikroskopije (slika 6).

Upotreba emulgjućih agenasa tokom topljenja omogućuje reemulzifikaciju masti, zbog obnavljanja emulgjućuće sposobnosti proteina vazivanjem kalcijuma koji je deo kazeinske micela (Carić, Milanović, 1997).

Mleko u prahu

Struktura mleka u prahu je specifična za razliku od ostalih mlečnih proizvoda i zavisi primarno od operacije sušenja. Danas se najčešće primenjuju 2 tehnike sušenja: sušenje na valjcima i sušenje raspršivanjem u komori sa toplim vazduhom. Sušenje na valjcima se koristi za proizvodnju obranog mleka ili za mleka u prahu namenjena za druge industrije (konditorski proizvodi, stočna hrana i dr.), zbog slabe rastvorljivosti proizvoda. Prah dobijen sušenjem na valjcima ima ljuspastu strukturu bez inkorporiranog vazduha, gde veličina čestica

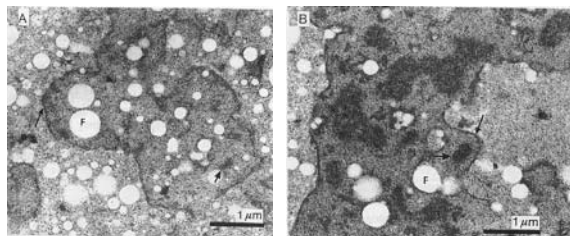
zavisi od debljine filma i od mlevenja suvog filma sa valjaka (slika 7a). Za razliku od ovih, čestice praha dobijene raspršivanjem koncentrovanog mleka u struji toplog vazduha imaju globularnu formu, najučestalijeg prečnika 10 do 50µm i sadrže jednu ili više vakuola uklopljenog vazduha. Površina čestica je obično glatka, ali može biti i nabrana u istom uzorku. Više naboranu površinu dobija prah pri višim temperaturama ulaznog vazduha. Veličina čestica i količina inkorporiranog vazduha zavisi od parametara procesa. Mikrostruktura mleka u prahu proizvedenog sušenjem raspršivanjem prikazana je na slici 7b.

Pored navedenih tehnika sušenja postoji postupak instantizacije, pri čemu se proizvodi instant mleko u prahu, koje ima bolju sposobnost rekonstitucije. Pobojšane fizičko-hemijske karakteristike instant mleka u prahu (rastvorljivost, sposobnost penetracije, sposobnost tonjenja i vlaženja, dispergovanja i vlaženja postiže se procesom aglomeracije, odnosno povećanjem količine vazduha inkorporiranog između čestica praha stvorenih aglomeracijom, koji se za vreme rekonstitucije zamenjuje vodom (slika 7c; Carić, 1990, Carić, 2002).

Demineralizovani permeat u prahu

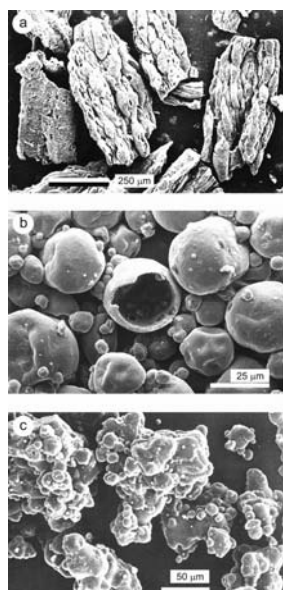
Ultrafiltracijom mleka izdvajaju se dve frakcije: retentat i permeat. Retentat sadrži supstance visoke molekulske mase (proteini imasti), dok niskomolekularne komponente kao što su laktoza i minerali ulaze u sastav permeata. Sastav permeata zavisi od fizičko-hemijskih osobina mleka i tehnoloških parametara tokom procesa ultrafiltracije (tipa membrane, stepena koncentrisanja, uključivanja dijafiltracije) i drugih faktora. Permeat prosečno sadrži 5-6% suve materije, od čega 80-85% čini laktoza, 8-10% pepeo i preko 6% su proteini. U poređenju sa surutkom i drugim sporednim proizvodima značajno je učešće laktoze, ali znatno manja je zastupljenost proteina mleka (Kalab i sar., 1989; Kalab i sar., 1991).

Kalab i sar. (1991) ispitivali su strukturu demineralizovanog permeata u prahu i otpornost praha (koji dominantno sadrži laktozu) pri relativnoj vlažnosti atmosfere na 85% i 100% (slike 8 i 9). Navedena istraživanja su pokazala da visok sadržaj laktoze i kristalizacija pre sušenja utiču na izgled permeata u prahu. Prekristalizacija doprinosi da je najveći deo lakto



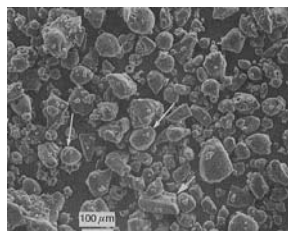
Slika 6. TOPLJENI SIR PROIZVEDEN KORIŠĆENJEM NATRIJUM CITRATA KAO EMULGUJUĆEG AGENSA SA DODATKOM BELOG SIRA: a) 16% b) 8% (Kalab i sar., 1991, Carić, Milanović, 1997; Carić, Milanović, 2006)

Figure 6. PROCESSED CHEESE PRODUCED USING BY POTASIJUM CITRATU WITH WHITE CHEESE ADDITION OF: a) a) 16% b) 8% (Kalab et al., 1991, Carić, Milanović, 1997; Carić, Milanović, 2006)



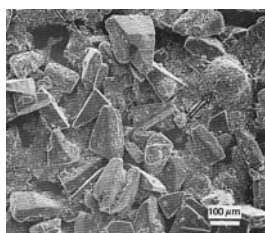
Slika 7. MIKROSTRUKTURA MLEKA U PRAHU (Carić, 1994; Carić, Milanović, 2002) a) SUŠENJE NA VALJCIMA; b) SUŠENJE RASPRŠIVANJEM; c) INSTANT MLEKO U PRAHU (Carić, 1994; Carić, Milanović, 2002)

Figure 7. MICROSTRUCTURE OF MILK POWDER ROLLER-DRIED; b) SPRAY-DRIED; c) INSTANT MILK POWDER (Carić, 1994; Carić, Milanović, 2002)



Slika 8. MIKROSTRUKTURA PERMEATA U PRAHU KOJI SADRŽI GLOBULARNE (MALE STRELICE) I KRISTALNE PARTIKULE (VELIKE STRELICE) (Kalab i sar., 1991)

Figure 8. PERMEAT POWDER CONSISTS OF GLOBULAR (SMALL ARROWS) AND CRYSTAL – LIKE PARTICLES (LARGE ARROWS) (Kalab et al., 1991)



Slika 9. PRIKAZ REKRISTALIZOVANE LAKTOZE U PERMEATU U PRAHU U ATMOSFERI 100% RELATIVNE VLAŽNOSTI TOKOM 24 SATA NA 25°C I DEZINTEGRISANE GLOBULARNE PARTIKULE (STRELICE) (Kalab i sar., 1991)

Figure 9. LACTOSE RECRYSTALLIZED IN A PERMEAT POWDER EXPOSED TO 100% RELATIVE HUMIDITY FOR 24 H AT 25°C AND GLOBULAR PARTICLES (ASTERISK) DISINTEGRATED (Kalab et al., 1991)

ze u formi α -monohidratnog kristala i da je rezistentna na rekristalizaciju pri relativnoj vlažnosti nižoj od 85% tokom 6 dana skladištenja, pošto prah ostaje nepromenjen. Strukturne pro-

mene praha su evidentne pri relativnoj vlažnosti 100% i temperaturi 25°C tokom 24 sata. Globularne partikule se dezintegrišu, a mikrokristali laktoze rekristališu (slika 9).

ZAKLJUČAK

Ispitivanje mikrostrukture mleka i mlečnih proizvoda omogućava detaljniju analizu strukturnih i tehnoloških karakteristika proizvoda. Na taj način se otklanjaju greške tokom pojedinih procesa proizvodnje i poboljšavaju nutritivne karakteristike, fizičko-hemijska svojstva i produžava trajnost proizvoda.

Primena elektronske mikroskopije u ispitivanju mikrostrukture mlečnih proizvoda veoma je značajna zbog utvrđivanja fizičkih parametara kvaliteta, kao što su sinerezis, sposobnost vezivanja vode, viskozitet, čvrstoća i trajnost proizvoda. Takođe, ispitivanje mikrostrukture mlečnih proizvoda doprinosi unapređenju i razvoju novih tehnologija u industriji mleka.

LITERATURA

- Antunes, A. E. C., Antunes, A. J., Cardello, H. M. A. B.: Chemical, physical, microstructural and Sensory Properties of Set Fat-Free Yoghurts Stabilized with Whey Protein Concentrate. *Milchwissenschaft*, 59 (3/4) (2004) 161-165.
- Bhullar, Y. S., Uddin, M. A. Shah, N. P.: Effects of Ingredients Supplementation on Textural Characteristics and Microstructure of Yoghurt. *Milchwissenschaft*, 57 (6) (2002) 328-332.
- Carić, M.: Concentrated and dried dairy products, VCH Publishers, New York, p. 249 (1994).
- Carić, M., Gantar, M., Kaláb, M.: Effects of Emulsifying Agents on the Microstructure and other Characteristics of Process Cheese, *Food Microstructure*, 4, 297-312, 1985.
- Carić, M., Milanović, S.: Topljeni sir, Nauka, Beograd, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 165 (1997).
- Carić, M., Milanović, S.: Processed Cheese, in: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, ed. by Hui, Y.H., Taylor and Francis, 151-1-151-11 (2006).
- Carić, M., Milanović, S.: Physical and functional properties of milk powders, ed. in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, eds. H. Roginski, J. W. Fuquay, P. F. Fox, Academic Press, London, 1874-1880 (2002).
- Gavarić, D., Carić, M., Kaláb, M.: Effects of Protein Concentration in Ultrafiltration Milk Retentates and the Type of Protease used for Coagulation on the microstructure of Resulting Gels. *Food Microstructure*, 8 (1989) 53-66.
- Iličić, M., Milanović, S., Carić, M.: Mikrostruktura kvarka proizvedenog uz primenu probiotika. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, 17 (2006) 6-9.
- Kaláb, M.: Studije strukture mlečnih proizvoda: Praktični aspekti. *Mljekarstvo*, 40 (9) (1990) 235-250.
- Kaláb, M.: Practical Aspects of Electron Microscopy in Cheese Research in Chemistry of Structure – Function Relationships in Cheese, eds. E. L. Malin, M. H. Tunick, Plenum Press, New York, 2470 (1995).
- Kaláb, M., Carić, M.: Food microstructure-Evaluation of interaction of Milk Components in Food Systems, *Proceedings of the XXIII Int. Dairy Congress*, Montreal, vol 2 (1990) 1457.
- Kaláb, M., Carić, M., Milanović, S.: Composition and Structure of Demineralized Spray-Dried

- Milk Permeate Powder. *Food Structure*, 10 (4) (1991) 327-332.
- Kaláb, M., Carić, M., Zaher, M., Harwalkar, V.R.: Composition and Some Properties of Spray-Dried Retentates Obtained by the Ultrafiltration of Milk. *Food Microstructure*, 8 (1989) 225-233.
- Kaláb, M., Modler, W., Carić, M., Milanović, S.: Structure, Meltability and Firmness of Process Cheese Containing White Cheese. *Food Structure*, 10 (3) (1991) 193-201.
- Kindstedt, P., Carić, M., Milanović, S.: Pasta-Filata Cheeses, in: *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, Major Cheese Groups, ed. by Fox, P.F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. Third edition, 251-277 (2005).
- Milanović, S.: Primena ultrafiltracije, genetski modifikovanog himozina i proteolitičkih enzima u tehnološkom procesu proizvodnje Kačkavalja, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 177 (1993).
- Milanović, S. Istraživanja mikrostrukture sira, V Međunarodni simpozijum: Savremeni trendovi u proizvodnji mleka, Kopaonik (1996) 89-93.
- Milanović, S., Kaláb, M., Carić, M.: Structure of Kashkaval Curd Manufactured from Milk or UF Retentate using Enzymes of Various Origin. *Lebensm.-Wiss.u-Technol.*, 31 (1998) 377-386.
- Milanović, S., Carić, M., Iličić, M.: Application of Electron Microscopy in Dairy Technology, 3rd Serbian Congress of Microscopy, 25-28 september, 2007, Belgrade (2007) 219-220.
- Panić, M.: Razvoj tehnologije kvarka uz primenu probiotika, Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2005).
- Schneider, K. R., Parish, M. E., Joy, J.: Conventional Microbial Testing Methods and Microscopy Techniques, in: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, ed. by Hui, Y.H., Taylor and Francis, 185-1 - 185-13, (2006).
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K.: *Yoghurt-Science and Technology*, Pergamon Press, Oxford, England, p.431 (2004).

SUMMARY

A REVIEW OF DAIRY PRODUCTS MICROSTRUCTURE INVESTIGATIONS

Spasenija D. Milanović, Marijana Đ. Carić, Mirela D. Iličić

University of Novi Sad, Faculty of Technology

Microstructure of dairy products presents a very complex system. Investigation of product structure demands the use of highly sophisticated equipment. Electron microscopy as one of the essential modern methods, is used to study the microstructure of milk components, changes and interactions among them and with other ingredients during processing

In this paper the experiences at Faculty of Technology, Novi Sad, Laboratory for Dairy Technology in application of SEM and TEM techniques for determination of different milk products structure: fermented dairy products, cheeses, processed cheese, milk powder and spray-dried permeate powder will be reviewed.

Generally, microstructure of dairy products depends on their chemical composition which is closely related to rheological and sensory characteristics of final products. Electron microscopy has been extensively used to investigate the development of different dairy products microstructure.

Key words: milk • dairy products • microstructure • electron microscopy

¹ZORICA T. RADULOVIĆ
²MIRELA D. ILIČIĆ
¹DRAGOSLAVA D. RADIN
¹DUŠANKA D. PAUNOVIĆ
¹NEMANJA L. MITROVIĆ
¹MILICA M. PETRUŠIĆ
¹DRAGOJLO B. OBRADOVIĆ

¹Univerzitet u Beogradu,
 Poljoprivredni fakultet
²Univerzitet u Novom Sadu,
 Tehnološki fakultet

NAUČNI RAD

UDK: 637.1461:637.146.3:637.047

KARAKTERIZACIJA MIKROFLORE KOMBUHE U FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA*

Primena čajna gljive je sve više rasprostranjena u svetu i koristi se za dobijanje fermentisanog čajnog napitka, sa potencijalnim terapijskim svojstvima. Poznato je da čajnu gljivu čini simbioza sirćetnih bakterija i kvasaca, ali su prisutne vrste veoma raznovrsne, zavisno od porekla i geografskog regiona. Identifikacijom prisutne mikroflore čajne gljive može se pokazati tipičnost same gljive, po kojoj se razlikuje od drugih. S obzirom da je dobijanje čajnog napitka primenom čajne gljive poznato veoma dugo, kao inovacija se javlja pitanje mogućnosti dobijanja fermentisanog mlečnog napitka.

U tom smislu, u radu je izvršena izolacija i identifikacija mikroflore čajne gljive, pri čemu je utvrđeno prisustvo sirćetnih bakterija *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter xylinum* i kvasaca koji pripadaju rodovima *Saccharomyces*, *Candida* i *Kloeckera*. Za dobijanje fermentisanog mlečnog napitka, primenjeni su inokulumi: fermentisani čaj, retentat dobijen ultrafiltriranjem i koncentrat dobijen uparavanjem, u mleku sa različitim sadržajem mlečne masti (0,9%, 1% i 2,2%) i različitim koncentracijama (10% i 15% čajnog napitka i retentata i 1,5% i 3% koncentrata).

Ispitana je sposobnost rasta sirćetnih bakterija i kvasaca u deset različitih varijanti fermentisanih mlečnih napitaka, gde je najbolja aktivnost bila u prisustvu 2,2% mlečne masti a vijabilnost sirćetnih bakterija i kvasaca pokazala se veoma dobrom u toku 15 dana čuvanja fermentisanog mlečnog napitka na 4°C.

Sa mikrobiološkog aspekta, primena čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka daje osnov za dobijanje novog fermentisanog mlečnog proizvoda, ali neophodna su dalja istraživanja sa hemijskog, tehnološkog, nutritivnog i senzornog aspekta.

Ključne reči: čajna gljiva • sirćetne bakterije • kvasci • fermentisani mlečni napici

UVOD

Napitak od čajne gljive ili kombuhe je proizvod fermentacije simbiotske zajednice kvasaca i sirćetnih bakterija, nastao fermentacijom zaslađenog zelenog ili crnog čaja. Ovaj proizvod ima najširu primenu u Kini, Rusiji, Japanu, a poslednjih godina širi se na celu Evropu, SAD i Australiju. Razlog ovakvoj ekspanziji popularnosti ovog napitka je sve veći broj preporuka njene primene kod jačanja imunostistema, suzbijanja artritisa, prevenciji karcinoma i dr. Međutim, mora se naglasiti da povećani interes za zdravstvene efekte čajne gljive pobuđuje sve veći broj istraživanja, ali još uvek ne postoje čvrsti naučni dokazi (Greenwalt i sar. 2000).

Ovakve pretpostavke pobuđuju istraživanja u oblasti identifikacije mikroflore kombuhe, kao i njene sposobnosti rasta na različitim supstratima, o čemu svedoče veliki broj literaturnih podataka (Zahoor i sar., 2006, Blanc, 1996, Lončar i sar., 2001). Međutim, o sposobnosti rasta mikroflore čajne gljive u mleku skoro da nema podataka, što otvara novo polje istraživanja o mogućnosti njene primene za dobijanje novih fermentisanih mlečnih napitaka. Kako su trendovi u razvoju novih tehnologija funkcionalne hrane sve aktuelniji, pro-

izvodnja fermentisanih mlečnih napitaka primenom čajne gljive bi mogla imati značajnog udela u ovoj oblasti (Milanović i sar., 2002).

Cilj ovog rada bio je da se identifikuje mikroflora čajne gljive i ispita mogućnost njene primene za proizvodnju novog fermentisanog mlečnog napitka, koji pripada grupi proizvoda visoke nutritivne vrednosti.

MATERIJAL I METODI

U radu je izvršena izolacija i identifikacija sirćetnih bakterija i kvasaca iz tri različita inokuluma čajne gljive (čajni napitak, retentat dobijen ultrafiltracijom i koncentrat dobijen uparavanjem). Ovi inokulumi su primenjeni u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka sa različitim sadržajem mlečne masti (0,9%, 1% i 2,2%). Inokulacija mleka je izvršena sa 10% i 15% inokuluma čajnog napitka, 10% i 15% retentata dobijenog ultrafiltracijom i 1,5% i 3% koncentrata dobijenog uparavanjem. Na ovaj način dobijeno je deset različitih fermentisanih mlečnih napitaka u kojima je praćen broj prisutnih ćelija kvasaca i sirćetnih bakterija.

Izolacija, a kasnije i određivanje broja ćelija sirćetnih bakterija i kvasaca izvršena je zasejavanjem na odgovarajućim selektivnim podlogama. Za rast sirćetnih bakterija korišćena je GYC podloga sledećeg sastava: 10 g kvašćevog ekstrakta, 50 g glukoze, 30 g CaCO₃, 25 g agar agara. Za rast kvasaca primenjena je selektivna podloga Saburov maltozni agar („Torlak“) koji sadrži 10 g peptona i 40 g maltoze. Za izolaciju čistih kultura bakterija i kvasaca izvršeno je zasejavanje na odgovarajućim selektivnim pod-

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
 Dr Zorica Radulović, Univerzitet u Beogradu,
 Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun,
 tel.: 011 2615-315
 e-mail: zradulovic@agrif.bg.ac.rs

logama i inkubacija na 30°C. Pojedinačne kolonije su pikirane i presejane na Saburov maltoznom agar za kvasce, a na GYC agaru samo one koje daju prosvetljene zone oko nastalih kolonija. Bojenjem po Gramu je proverena čistoća izolovanih kultura. Za karakterizaciju sirćetnih bakterija, ispitano je prisustvo enzima katalaze, katalaza testom, sposobnost rasta u anaerobnim uslovima, sposobnost oksidacije etanola do sirćetne kiseline (De Ley, 1984), oksidacije acetata do CO₂ i H₂O, (Swings, 1992) kao i sposobnost korišćenja Na-acetata, metanola i etanola kao izvora ugljenika (De Ley, 1984). Za identifikaciju sirćetnih bakterija primenjen je biohemijski niz API 20 NE sistem (Bio Merieux France), za Gram negativne štapičaste bakterije. Izolati su pripremljeni prema protokolu proizvođača, a očitavanje je izvršeno primenom API LAB PLUS softverskog sistema.

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

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

REZULTATI I DISKUSIJA

Izdvojene čiste kulture sirćetnih bakterija i kvasaca proverene su preparatom po Gramu, pri čemu su utvrđene i morfološke karakteristike izolovanih ćelija. Karakteristike sirćetnih bakterija koje su značajne za njihovu identifikaciju date su u tabeli 1.

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

Mikrobiološki sastav sirćetnih bakterija može da varira zavisno od geo-

Tabela 1: KARAKTERISTIKE SIRĆETNIH BAKTERIJA IZOLOVANIH IZ ČAJNE GLJIVE
Table 1: CHARACTERISTICS OF ACETIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TEA FUNGUS

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

grafskog porekla. Međutim rodovi *Acetobacter* i *Gluconobacter* su najrasprostranjeniji u kulturama kombuhe. Mnoga istraživanja su potvrdila da je *Gluconobacter xylinum* primarna bakterija u ovoj simbiozi (Sievers i sar., 1995), a takođe i prisustvo vrste *Acetobacter aceti* (Zahoor i sar., 2006).

Na osnovu identifikacije kvasaca koja je obuhvatala sposobnost stvaranja pseudomicelija i fermentacije različitih šećera, na kojoj je bazirana determinacija API 20 C AUX sistemom, utvrđeno je prisustvo rodova: *Saccharomyces*, *Candida* i *Kloeckera*. Mikroflora kvasaca je mnogo raznovrsnija u odnosu na sirćetne bakterije, tako da se u istraživanjima različitih autora pojavljuje veliki broj različitih rodova

jim fiziološkim karakteristikama značajno razlikovala od sličnih vrsta *Zygosaccharomyces bailii* i *Zygosaccharomyces lentus*.

Ispitivanjem ukupnog broja prisutnih sirćetnih bakterija i kvasaca utvrđeno je da se ukupan broj kvasaca u sva tri uzorka inokuluma kretao u intervalu od 10³ do 10⁵ cfu/ml, pri čemu je najveći broj utvrđen u retentatu, a kod uparenog inokuluma je broj najmanji. To je i očekivano s obzirom na uticaj temperature pri postupku uparivanja. Broj sirćetnih bakterija bio je približan u sva tri uzorka i kretao se 10²-10³ cfu/mL (tabela 2).

Rezultati ukupnog broja sirćetnih bakterija i kvasaca u fermentisanim mlečnim napicima prikazani su u tabeli 3.

Tabela 2: UKUPAN BROJ SIRĆETNIH BAKTERIJA I KVASACA U INOKULUMU ČAJNE GLJIVE
Table 2: ACETIC ACID BACTERIA AND YEASTS TOTAL CELL COUNT IN TEA FUNGUS INOCULUM

INOKULUM	Sirćetne bakterije broj ćelija/mL	Kvasci broj ćelija/mL
1. čajni napitak	1 x 10 ²	4,2 x 10 ⁵
2. retentat	2 x 10 ³	8 x 10 ⁵
3. koncentrat	1 x 10 ³	1 x 10 ³

(Herrera i Calderon-Villagomez, 1989). Ai Leng Teoh i sar. (2004) utvrdili su prisustvo *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces*, *Candida*. Mayers i sar., (1995) pokazali su da su najčešći rodovi kvasaca koji se javljaju u sastavu uzoraka kombuhe sakupljenih iz različitih regiona Nemačke, najčešće *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces*. Steels i sar., (2002) su utvrdili specifičnost vrste *Zygosaccharomyces kombuchaensis* koja se svo-

Evidentno je da u fermentisanim mlečnim napicima sa sadržajem mlečne masti od 0,9% i 1% nisu utvrđene značajne razlike u broju sirćetnih bakterija, dok je u fermentisanom napitku sa 2,2% mlečne masti, broj sirćetnih bakterija bio znatno veći i kretao se od 10³-10⁴, zavisno od koncentracije inokuluma. Isti uticaj sadržaja mlečne masti je utvrđen i u odnosu na broj prisutnih kvasaca, tako da je ovaj broj najveći u fermentisanom napitku sa 2,2% mlečne masti. Takođe je poka-

Tabela 3: UKUPAN BROJ SIRČETNIH BAKTERIJA I KVASACA U FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA

Table 3: TOTAL COUNT NUMBER OF ACETIC ACID BACTERIA AND YEAST IN FERMENTED MILK BEVERAGE

FERMENTISANI MLEČNI NAPICI	Sirčetine bakterije broj ćelija/mL	Kvasci broj ćelija/mL
Sa 0,9 % mlečne masti		
1. 10% inokuluma	2×10^2	$5,6 \times 10^3$
2. 15% inokuluma	$2,7 \times 10^3$	9×10^3
3. 10% retentata	$4,5 \times 10^4$	9×10^4
4. 15% retentata	$1,7 \times 10^4$	9×10^4
5. 1,5% koncentrata	6×10^4	$3,3 \times 10^4$
6. 3% koncentrata	$7,6 \times 10^4$	1×10^5
Sa 1% mlečne masti		
7. 10% inokuluma	2×10^2	$1,7 \times 10^3$
8. 15% inokuluma	2×10^2	$4,5 \times 10^3$
Sa 2,2 % mlečne masti		
9. 10% inokuluma	7×10^3	$1,3 \times 10^4$
10. 15% inokuluma	$2,5 \times 10^4$	5×10^4

zano da je u napicima koji su inokulisani retentatom i uparenim koncentratom čajne gljive, broj sirčetnih bakterija i kvasaca veći nego u napitku koji je inokulisan čajnom gljivom bez primene ovih tretmana.

Interesantni su podaci poređenja broja ćelija prisutne mikroflore u fermentisanom čaju (koji je u radu primenjen kao inokulum) i fermentisanom mlečnom napitku (tabela 4).

njenicom da je crni čaj kompleksan rastvor, koji sadrži različite metil ksantane, polifenole i druga brojna jedinjenja, od kojih neka mogu imati inhibitorski efekat na rast organizama (Taylor i McDowell, 1993).

Utvrđivanje vijabilnosti sirčetnih bakterija i kvasaca tokom čuvanja fermentisanog mlečnog napitka na 4°C je od velike važnosti ako se ima u vidu značaj određivanja dužine roka tra-

Tabela 4: POREĐENJE UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA ČAJNE GLJIVE U ČAJNOM I MLEČNOM NAPITKU

Table 4: COMPARASION OF TEA FUNGUS MICROORGANISMS TOTAL CELL COUNT IN TEA AND MILK FERMENTED BEVERAGES

Supstrat	Mikroorganizmi	Ukupan broj (cfu/mL)
Čajni napitak	Sirčetine bakterije	$1,52 \times 10^3$
	Kvasci	$3,5 \times 10^2$
Mlečni napitak	Sirčetine bakterije	$1,52 \times 10^3$
	Kvasci	$1,2 \times 10^2$

Broj ćelija kvasaca u mlečnom napitku je niži u odnosu na broj u čaju, što je verovatno posledica slabije sposobnosti prisutne mikroflore kvasaca da fermentišu laktozu iz mleka (Malbaša i sar., 2008, 2009).

Nasuprot tome, broj sirčetnih bakterija u mlečnom napitku veći je u odnosu na čaj, što se može objasniti čiji-

janja fermentisanih mlečnih napitaka.

Sposobnost preživljavanja prisutnih mikroorganizama tokom čuvanja mlečnog napitka na temperaturi od 4°C u toku 15 dana, prikazana je u tabeli 5.

Utvrđeno je da prisutna mikroflora kvasaca i sirčetnih bakterija veoma dobro podnosi temperaturu hlađenja

Tabela 5: PROMENE BROJA KVASACA I SIRČETNIH BAKTERIJA TOKOM ČUVANJA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA PRI TEMPERATURI OD 4°C

Table 5: YEAST AND ACETIC ACID BACTERIA CELL COUNT CHANGES DURING FERMENTED MILK BEVERAGE STORAGE AT 4°C

Ukupan broj	0. DAN	10. DAN	15. DAN
Sirčetine bakterije	$1,52 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$9,4 \times 10^2$
Kvasci	$1,2 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$

od 4°C, što potvrđuje veoma blag trend opadanja broja sirčetnih bakterija ($1,52 \times 10^3$ - $9,4 \times 10^2$ cfu/mL), dok se broj kvasaca uz neznatna variranja održavao na nivou od 10^2 cfu/mL. Dobljeni podaci o vijabilnosti mikroorganizama čajne gljive u fermentisanom mlečnom napitku ukazuju na mogućnost dubljih istraživanja sa hemijskog, mikrobiološkog, nutritivnog i senzornog aspekta, sa ciljem dobijanja novih fermentisanih mlečnih proizvoda koji bi doprineli proširenju asortima razvoju novih tehnologija.

ZAKLJUČAK

Na osnovu izolacije i identifikacije kvasaca i sirčetnih bakterija iz čajne gljive, utvrđeno je da mikroflora sirčetnih bakterija sačinjavaju vrste *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* i *Gluconobacter xylinum*. Od kvasaca utvrđeno je prisustvo vrsta koje pripadaju rodovima *Saccharomyces*, *Candida* i *Kloeckera*.

U fermentisanim mlečnim napicima privedenim sa različitim sadržajem mlečne masti, utvrđeno je da je najbolji porast mikroorganizama čajne gljive postignut u fermentisanom mlečnom napitku sa 2,2% mlečne masti.

U napicima koji su inokulisani retentatom i uparenim koncentratom čajne gljive, broj sirčetnih bakterija i kvasaca je bio veći nego u napitku koji je inokulisan čajnom gljivom bez primene ovih tretmana.

Poređenjem broja prisutnih mikroorganizama kombuhe u fermentisanom čaju i mlečnom napitku pokazano je da je broj kvasaca veći u čaju, a sirčetnih bakterija u mleku.

Utvrđivanjem vijabilnosti mikroorganizama u fermentisanom mlečnom napitku tokom 15 dana čuvanja na temperaturi od 4°C, ustanovljeno je da ovi uslovi čuvanja nemaju značajan uticaj na promene broja prisutne mikroflore.

Dalja istraživanja u ovoj oblasti bi mogla doprineti proširenju asortimana i razvoju novih tehnologija fermentisanih mlečnih proizvoda.

LITERATURA

- Blanc, P.: Characterization of the Tea Fungus metabolites. *Biotechnology Letters* 18 (1996) 139-142.
- De Lay J.: Family VI Acetobacteriaceae, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds. Kreig R.N., Holt, G.J., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1984), pp. 267-278.

- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H. and Ledford, R.: Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition and Claimed health Effects. *Journal of Food Protection* 63(7) (2000) 976-981.
- Harrera, T., Calderon-Villagomez, A.: Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus. *Rev. Mex. Microbiol.*, 5 (1989) 205-210.
- Lodder, J.: The yeasts. North Holland Publishing Company, Amsterdam. (1974).
- Lončar E., Milanović S., Carić, M., Malbaša R., Panić M.: Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija–Mleko i mlečni proizvodi*, 12 (1-2) (2001) 13-17.
- Malbaša, R., Lončar, E. and Đurić, M.: Comparison of the products of Kombucha fermentation on source and molasses. *Food Chemistry*, 106 (2008) 1039-1045.
- Malbaša, R., Milovanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M. and Kolarov, Lj.: Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, 112 (2009) 178-184.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C. and Grunder, K.: The yeast spectrum of the "tea fungus Kombucha". *Mycoses*, 38 (1995) 289-295.
- Milovanović, D. S., Carić, Đ. M., Lončar, S. E., Panić, D. M., Malbaša, V. R., Dobrić, Đ. D.: Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija–Mleko i mlečni proizvodi*, 13 (1-2) (2002) 8-13.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U. and Teuber, M.: Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation System. *Appl. Microbiol.*, 18 (1995) 590-594.
- Steels, H., James, A. J., Bond, C. J., Roberts, N. I., Stratfore, M.: *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast research*, 2(2) (2002) 113-121.
- Swings J.: *The Prokaryotes*, 2nd ed, eds. By A. Balows, Springer-Verlag, p. 2268-2286 (1992).
- Taylor, S. and McDowell, I.: *Tea. Chemistry. Encyclopedia of Food Science, Technology and Nutrition*, 7 (1993) 4527-4533.
- Zahoor, T., Siddique, F. and Farooq U.: Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter acetii*) from indigenous sources. *British Food Journal*, 109 (6) (2006) 429-439.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF KOMBUCHA MICROFLORA IN FERMENTED MILK BEVERAGES

¹Zorica T. Radulović, ²Mirela D. Iličić, ¹Dragoslava D. Radin, ¹Dušanka D. Paunović, ¹Nemanja L. Mitrović, ¹Milica M. Petrušić, ¹Dragojlo B. Obradović

¹University of Belgrade, Faculty of Agriculture

²University of Novi Sad, Faculty of Technology

Application of tea fungus has been increasing world-wide as it is useful for obtaining fermented tea beverages with potential therapeutic characteristics. It is known that tea fungus is composed of acetic acid bacteria and yeasts, but involved species in these consortia are various, depending on its origin and the geographical region from which it comes from. By identifying present microflora of some tea fungus, it is possible to show its typicality and differentiate it from others. Considering that obtaining tea beverages by application of tea fungus has been known for a long time, possibility of fermented milk beverages appeared as an innovative question.

Hence, in this paper isolation and identification of tea fungus microflora, where presence of acetic acid bacteria *Acetobacter acetii*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter xylinum* and yeasts belonged to the genera *Saccharomyces*, *Candida* and *Kloeckera* was noted, has been carried out. For the making of fermented milk beverages, subsequent inoculums were applied: fermented tea, retentate obtained by ultrafiltration and concentrate obtained by evaporation in milk with different fat content (0.9%, 1% and 2.2%) and different concentration (10%, 15% fermented tea and retentates and 1.5%, 3% concentrates). Growth ability of acetic acid bacteria and yeasts in 10 different fermented milk beverages was examined, and best activity was detected in the sample with 2.2% milk fat. During 15 days storage of the fermented milk beverages at 4°C, viability of acetic acid bacteria and yeasts was very good. From microbiological aspect, application of tea fungus in fermented milk beverages production could be the base for obtaining new fermented milk beverages, but additional research of the chemical, technological, nutritive and sensorial aspects are necessary.

Key words: tea fungus • acetic acid bacteria • yeast • fermented milk beverages

¹BILJANA J. PEJIĆ
²SPAŠENIJA D. MILANOVIĆ
²VERA L. LAZIĆ
²JASMINA S. VITAS
²TAMARA M. MARINKOV

¹AD IMLEK, Beograd
²Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet

NAUČNI RAD

UDK: 637.146.3:637.146.1:637.05:621.798.188

KVALITET I ODRŽIVOST KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA PAKOVANOG U RAZLIČITOJ AMBALAŽI*

Cilj rada je ispitivanje kvaliteta funkcionalnog niskoenergetskog fermentisanog mlečnog proizvoda dobijenog iz mleka sa 0,9% mlečne masti uz dodatak 10% (v/v) inokuluma kombuhe i uticaja različitih načina pakovanja na kvalitet proizvedenih napitaka tokom skladištenja.

Nakon proizvodnje napitak je pakovan u polipropilenske (PP) čaše, zatvoren aluminijumskim poklopcem i u komparativni materijal, kesice od koekstrudirane barijerne folije tipa poliamid/polietilen (PA/PE). Primenjeni uslovi pakovanja su atmosferski (ATM) i modifikovana atmosfera (MAP, 40% CO₂ i 60% N₂).

Kvalitet proizvoda je ispitivan standardnim metodama određivanja fizičko-hemijskih karakteristika, hemijskog sastava, energetske vrednosti i senzornih karakteristika nakon proizvodnje. Produkti metaboličke aktivnosti kombuhe u mleku analizirani su ispitivanjem sadržaja laktoze, D-galaktoze, L-mlečne kiseline, D-mlečne kiseline i etanola nakon proizvodnje i tokom 15 dana skladištenja.

Fermentisani mlečni napitak proizveden uz primenu inokuluma kombuhe sadrži sve visoko vredne komponente mleka. Fermentacija tokom skladištenja napitka pakovanog u smeši CO₂/N₂ u poređenju sa drugom dva pakovanja je sporija, što se i pokazalo u trendu promene pH vrednosti.

Sadržaj L-mlečne kiseline u proizvodu je značajno viši u odnosu na sadržaj D-mlečne kiseline i iznosio je 0,807 g/100 g nakon proizvodnje. Tokom skladištenja najveći porast L-mlečne kiseline detektovan je u proizvodima pakovanim u PP ambalažu u atmosferi vazduha.

Ključne reči : fermentisani mlečni proizvodi • kombuha • ambalaža • pakovanje • kvalitet

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:
Biljana J. Pejić, dipl.inž., AD Imlek mlekarar,
Padinska skela bb, 11 000 Beograd.
e-mail: Biljana.Pejic@imlek.rs

UVOD

Fermentisano mleko sadrži brojne mikronutritivne komponente koje, pojedinačno ili u kombinaciji, mogu da utiču na održavanje ili poboljšanje zdravlja ljudi. U najznačajnije primere funkcionalne hrane spadaju upravo fermentisani mlečni proizvodi, koji sadrže probiotske bakterije i prebiotike.

Kombuha je dobro poznata simbiotska asocijacija kvasaca i bakterija sirćetne kiseline, koja metaboličkom aktivnošću crnog čaja zaslađenog saharozom stvara prijatan, blago gaziran, nakiseo napitak, koji sadrži brojne nutritivne i farmakološki značajne komponente.

Kombuha ili čajna gljiva poznata je širom sveta kao gljiva za dugovečnost, ruska, kineska, japanska ili indijska čajna gljiva. Najčešće kultiviše na crnom ili zelenom čaju, ali može i na drugim supstratima: koka-kola, pivo, vino, razni aromatični napici i dr. Kombuha je debela, sluzava, belosmeđa, pihtijasta konzistencija koja pliva na površini zaslađene tečnosti zbog izdvajanja ugljenik (IV)-oksida, koji je produkt metabolizma (Reiss, 1987). Čitav proces se odvija u staklenoj tegli koja je prekrivena gazom, a vremenom se masa povećava i prilagođava obliku suda u kome se nalazi.

Optimalna temperatura rasta kombuhe je 25°C do 30°C, iako raste i na nižim temperaturama, ali mnogo sporije. Vreme delovanja kombuhe u kultivacionoj tečnosti određuje se na osnovu željenog ukusa napitka. Ako je napitak suviše kiseo, fermentacija se mora obnoviti. Napitak je najdelotvorniji posle 7 do 10 dana. Tečnost koja se odvoji odlivanjem predstavlja slatkast, blago gaziran i osvežavajući napitak.

Kombuhu čini simbioza dve vrste mikroorganizama: kvasci i bakterije sirćetne kiseline (Konovalov, Semenova, 1955). Tokom kultivacije stvara se celuloza koja čini plutajuću opnu i u njoj se nalaze kvasci i bakterije. U ovoj simbiozi jedni mikroorganizmi zavise od drugih, jer kvasci razgradnjom šećera stvaraju alkohol, a bakterije stvoreni alkohol koriste kao izvor energije i pretvaraju ga u sirćetnu kiselinu. Kvasci saharozu pretvaraju u glukozu i fruktozu čime omogućuju bakterijama da stvaraju glukonsku kiselinu, koja kvasce štiti od konkurentnih mikroorganizama. Vrsta kvasaca koja učestvuje u ovoj simbiozi zavisi od geografskog područja u kome se kombuha gaji.

Uobičajeni supstrat za gajenje kombuhe je crni čaj zaslađen saharozom, tj. belim šećerom. Čaj za mikroorganizme predstavlja izvor azota i mineralnih materija, a saharozu predstavlja izvor ugljenika. Količina saharoze u supstratu kreće se od 5% do 8%, a količina čaja od 1,5 g/l do 4,5 g/l (Greenwalt i sar., 2000; Petrović i sar., 1999). Kultivacija kombuhe je moguća i na crnom čaju koji je zaslađen glukozom, fruktozom ili laktozom (Reiss, 1994).

Kultivacija kombuhe odvija se na temperaturi od 25°C do 30°C u aerobnim uslovima, u posudama od stakla ili porcelana. Frank (1995) ističe da mogu da se koriste i drugi materijali za posude: glazirano (bez olova) posuđe od zemlje, nerđajući čelik, polietilen visoke gustine (HDPE) i polipropilen (PP) (en.wikipedia.org/wiki/kombucha). Posude treba da budu sa širokim otvorima zbog dobrog kontakta sa vazduhom i prekriveni gazom zbog zaštite od prašine i sirćetnih mušica.

Kombuha stvara različite nutritivne i farmakološki korisne supstance, kao što su: glukoza, fruktoza, vitamini: B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, B₁₅, C, biotin, folna kiselina, zatim lecitin, mlečna kiselina, glukonska kiselina, glukuronska kiselina, voćne kiseline (vinska, oksalna, limunska, sirćetna, malonska), pojedini enzimi, 14 aminokiselina, biogeni amini i neki antibiotici. Napitak od kombuhe sadrži malu količinu alkohola (nešto veću od 1%), koji se proizvodi tokom fermentacije i male količine metilksantin stimulanata.

Aktivnost kombuhe na mleku se sve više istražuje. Značajno je da primena laktoze iz mleka kao izvora ugljenika za fermentaciju kombuhe bitno utiče na stvaranje L-mlečne kiseline, jednog od fiziološki najznačajnijih metabolita.

Prethodna istraživanja mogućnosti primene kombuhe za fermentaciju mleka (Lončar i sar., 2001; Milanović i sar, 2002; Milanović i sar, 2007; Malbaša i sar, 2008) pokazuju da se iz mleka sa 1,0 i 2,2 % mlečne masti može dobiti osvežavajući napitak visoke nutritivne vrednosti.

Za očuvanje nutritivnih svojstava tokom deklarisanog perioda skladištenja, odgovorni su odabrani i pravilno primenjeni ambalažni materijali i ambalaža (Bureau, Multon, 1996; Robertson, 1993).

Ambalaža mora da sačuva visok kvalitet proizvoda tokom najdužeg roka upotrebe. U tu svrhu, imajući u vidu različite proizvode, specifične tehnologije, specifične uslove skladištenja distribucije i primene, biraju se različiti ambalažni materijali, odnosno njihove kombinacije. Takođe se primenjuju specifični uslovi pakovanja (atmosferski uslovi, vakuum, modifikovana atmosfera, aktivno, inteligentno pakovanje (Seydim i sar., 2004; Goursaud).

Različiti fermentisani mlečni proizvodi pakuju se u različitu ambalažu, kao što su kese od polietilenske folije (PE), ambalažu tipa "tetra rex", plastične čaše ili boce od različitih polimernih materijala. Takođe se primenjuju specifični uslovi pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera), ili savremeni postupci aktivnog pakovanja (Kosikowski, 1982; Buys, 2004).

Kvalitativna svojstva ambalažnih materijala i ambalaže, kao što su ravnomernost debljine, zatezna jačina i izduženje pri kidanju, bitna su za pravilno formiranje, prohodnost na pakercama, ponašanje pri transportu i skladištenju, a barijerna svojstva di-

rektno utiču na održivost upakovanog proizvoda.

Razvojem nauke o pakovanju došlo se do saznanja da se može postići bolji zaštitni efekat ambalažnih materijala primenom različitih uslova pakovanja. Danas, u prehrambenoj industriji, zastupljeni su sledeći načini pakovanja: pakovanje pod atmosferskim, normalnim uslovima, pri čemu iznad upakovanog proizvoda zaostaje određena količina vazduha, i pakovanje u zoni zaštitnog gasa ili smeše zaštitnih gasova, odnosno pakovanje u modifikovanoj atmosferi. Nova tehnologija pakovanja je pakovanje u modifikovanoj atmosferi. Ovaj postupak pakovanja podrazumeva izmenu atmosfere iznad proizvoda. Odstranjuje se vazduh, a dodaje inertni gas (N₂, CO₂) ili njihova smeša. Promene sastava gasa u ambalaži iznad proizvoda direktno su zavisne od propustljivosti ambalažnih materijala, hermetičnosti formirane ambalaže i biohemijskih procesa koji se dešavaju na proizvodu tokom skladištenja (Gvozdenović, Lazić, 2008).

U radu je ispitan uticaj različitih načina pakovanja napitka proizvedenog iz mleka sa 0,9% mm uz dodatak 10% inokuluma kombuhe, na kvalitet fermentisanog mlečnog proizvoda nakon proizvodnje i u toku 15 dana skladištenja.

MATERIJAL I METODI

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka u laboratorijskim uslovima korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 0,9% mlečne masti proizvođača AD IMLEK Beograd, ogranak Novosadska mlekara Novi Sad sledećih karakteristika: 8,86 % SMBM, 3,02% proteina, 4,76% laktoze i pH=6,9.

Za inokulaciju mleka korišćen je inokulum kombuhe, dobijen sedmodnevnom kultivacijom kombuhe na supstratu crni čaj (1,5g/L) uz dodatak saharoze (70 g/l) po ranije opisanom postupku (Lončar i sar, 2001).

Za pakovanje su korišćene:

1. PP čaše, zatvaranje je vršeno termozavarivanjem sa aluminijumskim poklopcima u atmosferskim uslovima, oznaka uzoraka PP-ATM.

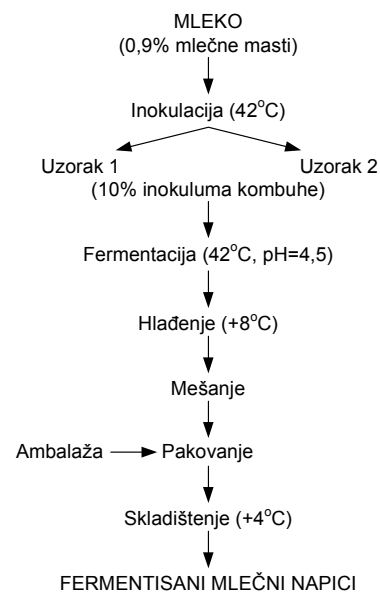
2. U laboratorijskim uslovima formirane su kesice od ambalažnog materijala PA/PE, deklarisanog sastava PA30/PE70, a napitak je pakovan u atmosferskim uslovima (ATM) i u modifikovanoj atmosferi sastava (MAP,

40% CO₂ i 60% N₂), oznaka uzoraka PA/PE-ATM i PA/PE-MAP.

Proizvodnja fermentisanog mlečnog napitka

Proizvedena su dva fermentisana mlečna napitka iz pasterizovanog, homogenizovanog mleka sa 0,9% mlečne masti uz dodatak 10% inokuluma kombuhe pH=3.

Tehnološki proces proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka prikazan je na slici 1.



Slika 1. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA
Figure 1. TECHNOLOGY OF KOMBUCHA-FERMENTED MILK BEVERAGES

Analiza hemijskog kvaliteta mleka korišćenog za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka primenom kombuhe izvršena je na Milcoscanu u mlekari AD IMLEK Beograd, ogranak Novosadska mlekara Novi Sad.

Osnovne fizičko-mehaničke i barijerne karakteristike komparativnog ambalažnog materijala PA/PE:

- debljina i masa po jedinici površine, SRPS G.S2.733;
- zatezna jačina i izduženje pri kidanju, SRPS G.S2.734, na aparatu INSTRON 4301;
- propustljivost gasova, CO₂, N₂, O₂, metodom po Lyssy, prema DIN 53380, aparatom Lyssy GPM-200;
- hermetičnost varova, metodom mikroporoznosti
- sastav gasne atmosfere, aparatom Oxybaby.

Metode analize hemijskog kvaliteta mleka korišćenog za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka primenom kombuhe izvršena je na Milco-scanu u mlekari AD IMLEK Beograd, ogranak Novosadska mlekara Novi Sad.

Kvalitet proizvedenih fermentisanih mlečnih napitaka ispitan je nakon proizvodnje.

Sadržaj suve materije, pepela, mlečne masti i ukupnih proteina, analiziran je standardnim metodama (Carić i sar., 2000).

Aktivna kiselost određena je elektrohemijski pomoću pH-metra (ISKRA, pH METER MA5724);

Sinerezis surutke (izražen u ml) određen je nakon 3h filtracije 50 g proizvedenog fermentisanog mlečnog napitka na sobnoj temperaturi (Atamer i sar., 1996), a sposobnost vezivanja vode po metodi Guzman-Gonzalez i sar., 1999.

Sadržaj laktoze, D-galaktoze, L-mlečne kiseline, D-mlečne kiseline i etanola analiziran je korišćenjem odgovarajućih enzimskih testova (Megazyme, Irska), a proizvod reakcije meren je spektrofotometrijski na spektrofotometru T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd).

REZULTATI I DISKUSIJA

Karakteristike ambalažnih materijala

Korištena ambalaža, polipropilenske PP čaše su standardnog kvaliteta, namenjene za pakovanje trajnih mlečnih proizvoda (Lazić i sar., 2005; Lazić i sar., 2003).

Svojstva komparativnog ambalažnog materijala PA/PE, prikazana su rezultatima određivanja debljine, površinske mase, zatezne jačine i izduženja pri kidanju, kao i propustljivosti gasova. Ispitivani ambalažni materijal PA/PE imao je ujednačenu debljinu od 100 μ m. Rezultati određivanja ukupne površinske mase i mase monomaterijala prikazani su u tabeli 1.

Dobijeni rezultati potvrđuju deklarirani sastav, odstupanja gramature i debljine su u granicama dozvoljenog. Srednje vrednosti određivanja mehaničkih karakteristika prikazane su u tabeli 2.

Rezultati pokazuju dobra svojstva ispitivanog materijala.

Folija PA/PE ima dobra barijerna svojstva (tabela 3) i kao takva se može koristiti za pakovanje u MAP-u (La-

Tabela 1. MASA PO JEDINICI POVRŠINE MATERIJALA (g/m^2) ZA PA/PE FOLIJU
Table 1. MASS/UNIT OF MATERIAL SURFACE (g/m^2) for PA/PE FOLIA

R.br	PA	d*	PE	d*	Ukupno
1	29,87	27	65,88	72	95,75
2	29,15	27	68,30	74	97,45
3	29,02	26	68,68	75	97,70
4	28,25	26	68,02	74	96,27
5	29,32	27	67,08	73	96,40
Srednja vrednost	29,12	26	67,59	73	96,71

d*računski određena debljina

Tabela 2. ZATEZNA JAČINA (N/15mm) I IZDUŽENJE PRI KIDANJU (%)
Table 2. TENSION STRENGTH (N/15mm) AND EXTENSION (%) IN THE MOMENT OF TWITCH

Uzorak (Sample)	Uzdužno (Longitudinal)		Poprečno (Transversal)	
	N/15mm	(%)	N/15mm	(%)
Srednja vrednost	44,0	429,0	39,8	481,2

Tabela 3. PROPUSTLJIVOST GASOVA ($ml/m^2 24h$, 1 bar)
Table 3. PERMEABILITY OF GASES ($ml/m^2 24h$, 1 bar)

UZORAK	CO ₂	O ₂	N ₂	VAZDUH
PA/PE	148,4	23,5	3,7	7,9

zić i sar., 2006; Lazić i sar., 2003; Robertson, 1993).

Promene pH vrednosti tokom fermentacije mleka

Na slici 2 prikazan je tok fermentacije mleka za oba uzorka sa dodatkom 10% inokuluma kombuhe.

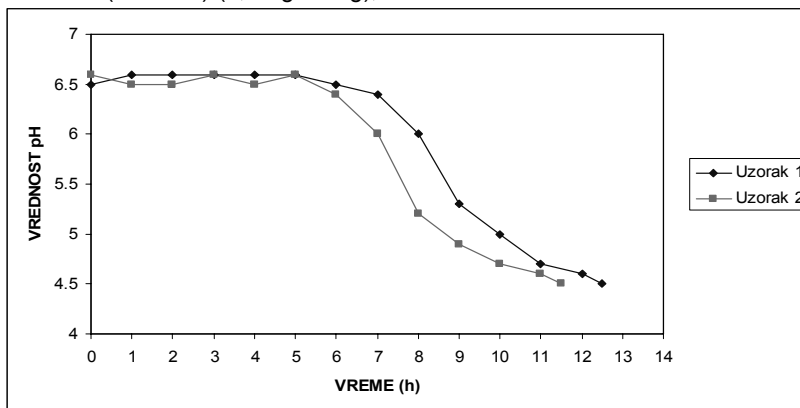
Fermentacija je zaustavljena nakon postizanja vrednosti Ph = 4,5. Vreme potrebno da se u procesu proizvodnje uzorka 1 postigne željena pH vrednost je 12,5 h, a kod uzorka 2 - 11,5 h. Obe krive zavisnosti pH vrednosti od vremena fermentacije su sigmoidalnog oblika, što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima (Malbaša i sar., 2008).

Na osnovu sadržaja proteina i mlečne masti (tabela 4), kao i sadržaja laktoze (tabela 7) (3,10 g/100 g),

izračunata je energetska vrednost kombuha fermentisanog mlečnog napitka koja je iznosila 140,38 kJ/100 g, na osnovu čega se napitak svrstava u grupu niskoenergetskih proizvoda.

Sinerezis fermentisanog mlečnog napitka od kombuhe nakon proizvodnje (tabela 4) je bio u karakterističnim eksperimentalno utvrđenim granicama (Lončar i sar., 2001, Malbaša i sar., 2008), dok sposobnost vezivanja vode (46,2%) ukazuje na dobar kvalitet i dužu trajnost proizvoda.

Rezultati pokazuju da između uzoraka PP-ATM i PA/PE-ATM nema značajnijih razlika u promeni koncentracije gasova iznad proizvoda tokom skladištenja. U uzorcima PA/PE- MAP zapažen je pad koncentracije CO₂ nakon 10 dana skladištenja, a zatim blagi porast. Ako je ambalaža dobro



Slika 2. TOK FERMENTACIJE MLEKA U UZORCIMA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA

Figure 2. FERMENTATION PROCESS OF KOMBUCHA-FERMENTED MILK BEVERAGE

Tabela 4. PROSEČAN FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV I OSOBINE KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA
Table 4. AVERAGE PHYSICO-CHEMICAL COMPOSITION AND PROPERTIES OF KOMBUCHA-FERMENTED MILK BEVERAGE

Parametar kvaliteta	Napitak
suva materija (%)	9,76
pepeo (%)	0,39
mlečna mast (%)	0,9
ukupni proteini (%)	2,87
sinerezis (ml)	33
SVV (%)	46,2

formirana i hermetički zatvorena, do promene koncentracije gasova iznad proizvoda dolazi zbog biohemijskih i mikrobioloških procesa u proizvodu.

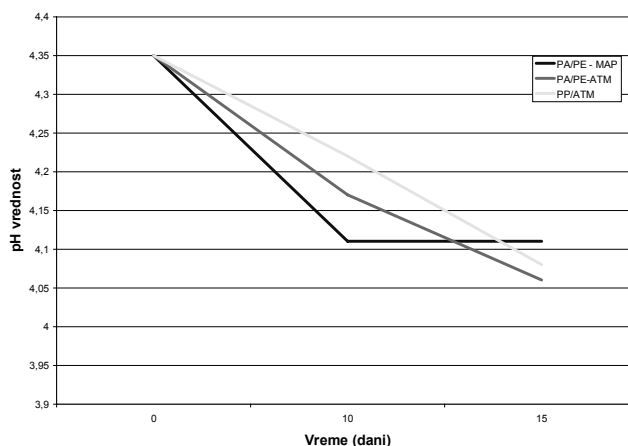
Promene pH vrednosti i kiselosti proizvedenog kombuha fermentisanog mlečnog napitka tokom skladištenja

Proizvedeni fermentisani mlečni napitak je pakovan u PP čaše i petoslojnu koekstruziju PA/PE u atmosferi vazduha (ATM) i modifikovanoj atmosferi (CO₂/N₂). Vrednosti pH i kiselosti praćene tokom su 0, 10 i 15 dana skladištenja (slika 3).

Tokom 15 dana skladištenja došlo je do pada pH vrednosti proizvoda, odnosno do porasta kiselosti. Ove promene su najmanje izražene u proizvodima pakovanim u modifikovanoj atmosferi, što je i za očekivati s obzirom na aerobni deo procesa gde se etanol prevodi u kiseline. Međutim, razlike u ovim promenama, zavisno od primenjene ambalaže i atmosfere, nisu značajne, te se može reći da ambalaža nema mnogo uticaja na kiselost kombuha fermentisanog mlečnog napitka tokom skladištenja.

Promene sadržaja komponenata u kombuha fermentisanom mlečnom napitku tokom skladištenja

U tabeli 6 prikazane su promene sadržaja komponenata određenih enzimskim testovima u kombuha fermentisanom mlečnom napitku tokom skladištenja.



Slika 3. PROMENE pH VREDNOSTI KOMBUHA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA TOKOM SKLADIŠTENJA

Figure 3. CHANGES OF pH VALUE OF KOMBUCHA FERMENTED MILK BEVERAGE DURING STORAGE

Promena koncentracije gasova iznad proizvoda tokom skladištenja

Sadržaj L-mlečne kiseline je značajno viši u odnosu na sadržaj D-mlečne kiseline (tabela 5). Viši sadržaj L-mlečne kiseline u uzorcima dobijenim fermentacijom mleka pomoću kombuhe izuzetno je bitan i veoma koristan za kvalitet proizvedenih napitaka. L-mlečna kiselina je veoma važna za prevenciju kancera.

Krv, mišići i želudac sadrže L-mlečnu kiselinu i ona je neophodna za regulaciju pH krvi u organizmu. Postoje dva oblika mlečne kiseline, "dobra" ili L-mlečna, odnosno "loša" ili D-mlečna kiselina. L-mlečna kiselina potpomaže cirkulaciju krvi, sprečava truljenje u crevima i konstipaciju, podstičući rad creva. Utiče na kiselinsko-baznu ravnotežu i podržava dejstvo vitamina C u organizmu, čime je ojačana prirodna rezistencija na infekcije. Takođe podstiče funkciju pankreasa, što stimuliše sekreciju svih digestivnih organa. Nedostatak L-mlečne kiseline u organizmu otežava respiraciju ćelija, što dovodi do stvaranja racemske smeše L- i D-mlečne kiseline, a to su uslovi koji pogoduju stvaranju kancerogenih ćelija (Frank, 1995).

Karakteristično je da tokom skladištenja u uzorcima pakovanim u PP

ambalažu dolazi do značajnog porasta sadržaja L-mlečne kiseline (tabela 6).

Sadržaj laktoze u odnosu na D-galaktazu u uzorcima tradicionalnog jogurta je oko tri do četiri puta veći nego u fermentisanom mlečnom napitku sa kombuhom (Tamime, Robinson, 2004). U uzorcima fermentisanih mlečnih proizvoda proizvedenih kombuhom, odnos laktoza/D-galaktaza je približno šest (tabela 6). Očigledno je da se fermentacijom kombuhe na mleku sa 0,9% mlečne masti sporije fermentiše laktoza u poređenju sa dejstvom probiotske kulture, pa otud i viši sadržaj. Ali ta vrednost je svakako prihvatljiva, jer nije mnogo veća u odnosu na tradicionalni jogurt (Malbaša i sar., 2008), a ovo je naročito važno za potencijalne konzumente ovog funkcionalnog napitka koji su tolerantni na laktozu.

Za mikrobiološki nastanak etanola karakteristična je anaerobna fermentacija. Procesi fermentacije kombuhe i probiotske kulture u mleku su, kako je i tipično, rađeni aerobno, pa se i nije očekivao veći sadržaj etanola. Za fermentaciju kombuhe to je još manje očekivano, jer je poznato da etanol stvaraju kvasci, a bakterije ga prevode u kiseline (Reiss, 1994). Bez obzira na pomenute činjenice, dobro je pre-

Tabela 5. PROMENA KONCENTRACIJE GASOVA
Table 5. CHANGES OF GASES CONCENTRATION

Dan	0			10			15		
	CO ₂	O ₂	N ₂	CO ₂	O ₂	N ₂	CO ₂	O ₂	N ₂
PP ATM	0	21	79	5,1	17,5	77,4	5,1	17,3	77,6
PA/PE- ATM	1	21	78	4,1	16,8	79,1	4,55	16,65	78,8
PA/PE- MAP	34,75	0,5	64,75	23,2	1,65	75,4	24,55	1,65	73,8

Tabela 6. PROMENE SADRŽAJA KOMPONENATA U KOMBUCHA FERMENTISANOM MLEČNOM NAPITKU TOKOM SKLADIŠTENJA

Table 6. CHANGES OF COMPONENT CONTENT IN KOMBUCHA FERMENTED MILK BEVERAGE DURING STORAGE

Komponenta (g /100 g)	0 dana	10 dana			15 dana		
		PP ATM	PA/PE ATM	PA/PE MAP	PP ATM	PA/PE ATM	PA/PE MAP
laktoza	3,10	2,92	2,92	3,08	2,93	3,02	3,03
D-galaktoza	0,55	0,65	0,56	0,62	0,62	0,56	0,58
D-mlečna kiselina	0,007	0,004	0,025	0,009	0,000	0,000	0,000
L-mlečna kiselina	0,807	0,874	0,747	0,704	0,967	0,610	0,803
etanol	0,026	0,032	0,040	0,005	0,051	0,016	0,009

kontrolisati sadržaj ovog metabolita u gotovom proizvodu, koji bi uz odrasle mogli da konzumiraju i deca (Malbaša i sar., 2008). Rezultati (tabela 6) su pokazali da je u svim proizvodima sadržaj etanola neznatan, odnosno detektovan je samo zahvaljujući veoma osetljivoj enzimskoj analitičkoj metodi.

ZAKLJUČAK

Proizvedeni funkcionalni kombucha fermentisani napici sadrže nutritivno visokovredne komponente, dobrih su fizičko-hemijskih osobina, blagog osvežavajućeg ukusa i karakterističnog mirisa.

Primenjena ambalaža i uslovi pakovanja omogućavaju očuvanje tehnoloških i nutritivnih svojstava proizvoda. Uticaj karakteristika ambalažnih materijala i uslova pakovanja na osobine proizvoda nije izražen.

LITERATURA

- Atamer, M., Carić, M., Milanović, S., Gavarić, D.: Kvalitet jogurta proizvedenog iz UF mleka, Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, Matica srpska Novi Sad, No 91 (1996)19-26.
- Bureau, G., Multon, J.L.: Food Packaging Technology, Vol. I and II, VCH Publishers, Inc. New York, Weinheim, Cambridge (1996).
- Buyts M. E. (2004): Active Packaging for the Dairy Industry, Proceedings International Dairy Symposium "Recent Developments in Dairy Science and Technology", Isparta, Turkey (2004) 47-48.
- Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D.: Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad p. 202 (2000).
- en.wikipedia.org/wiki/Kombucha
- Frank, G. W.: Das Teepilz- Getränk, Ennsthaler Verlag, A-4402 Steyr (1995).
- Goursaud J.: Food packaging and technology. Chapter 35: Packaging of milk products, Vol. I and II, VCH Publishers, Inc. New York, Weinheim, Cambridge.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus K.H., Ledford, R.: Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. J. of Food Protection 63 (7) (2000) 976-981.
- Guzman-Gonzalez, M., Morais, F., Ramons, M., Amigo, L.: Journal of the Science of Food and Agriculture 79, 1117-1122 (1999).
- Gvozdenović, J., Lazić, V.: Materijal sa predavanja iz predmeta Ambalaža i pakovanje, Tehnološki fakultet Novi Sad (2008).
- Konovalov, I. N., Semenova, M. N.: K fiziologiji „čajnog griba“. Bot. Žurnal (Moskva) 40 (4), (1955) 567-570.
- Kosikowski, F.V.: Cheese and Fermented Milk Foods, Edvard Brothers Inc., Ann Arbor Mich.690 (1982).
- Lazić, V., Gvozdenović, J., Ispanović, J., Prčić, I., Takač, L., Korhec, G.: Materijali i uslovi pakovanja funkcionalnog napitka od surutke, Prehrambena industrija, 1-2 (2003) 78-81.
- Lazić, V., Gvozdenović, J., Madarev, S.: Čaše od polimernih materijala za pakovanje fermentisanih mlečnih proizvoda i svežih sireva, Prehrambena industrija, 1-2 (2005) 96-99.
- Lazić, V., Gvozdenović, J., Petrović, T.: Novi trendovi pakovanja u industriji prerade mleka, Prehrambena industrija, 1-2 (2006) 78-81.
- Lončar, E., Milanović, S., Carić, M., Malbaša, R., Panić, M.: Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku, Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi, vol. 12, 1-2 (2001) 13-17.
- Malbaša, R., Minić, S., Lončar, E., Kolarov, Lj.: Uticaj inokuluma kombuhe na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda, Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi, vol. 18, 1-2, (2008) 43-46.
- Milanović, S.: Fermentisani mlečni napici za specijalne namene, Jugoslovenski mlekarski simpozijum - Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda, Zlatibor (1997) 49-55.
- Milanović, S., Carić, M.: Dijetalni trajni fermentisani mlečni napici-tehnologija i kvalitet, Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi, Vol. 11, 1-2 (2000) 34-39.
- Milanović, S., Carić, M., Panić, M., Vukanić, A.: Dijetalni kvark sa funkcionalnim aromama, Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi, 12, 1-2 (2001) 48-50.
- Petrović, S. E., Suturović, Z. J., Lončar, E. S., Malbaša, R. V.: Potentiometric stripping analysis of certain metal ions in tea fungus beverage. Nahrung 43 (5) (1999) 345-346.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture (2002): Sl. List SRJ, br. 26.
- Reiss, J.: der Teepilz und seine Stoffwechsellprodukte. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 9 (1987) 286-290.
- Reiss, J. (1994): Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Z. Lebensmittel Untera Forsch 198, 258-261.
- Tamime, A. Y., Robinson R. K. (2004): Yoghurt-Science and Technology, Second Edition, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, p. 619 (1994).
- Robertson, L. G.: Food Packaging: Principles And Practice, Massey University, Palmerston North, New Zealand, p. 664 (1993).
- Seydim, A. C., Karaaslan, M., Cetinatas G., Saglam, H. (2004): Novel Packaging Development for Dairy Products, Proceedings International Dairy Symposium "Recent Developments in Dairy Science and Technology" Isparta, Turkey (2004) 52-55.
- Tamime, A. Y., Robinson R. K. (2004): Yoghurt - Science and Technology, Second Edition, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, p. 619.

SUMMARY**QUALITY AND SHELF-LIFE OF KOMBUCHA FERMENTED DAIRY BEVERAGE PACKED IN VARIOUS PACKAGINGS**

¹Biljana J. Pejić, ²Spasenija D. Milanović, ²Vera L. Lazić, ²Jasmina S. Vitas, ²Tamara Marinkov

¹AD Imlek Dairy, ²University of Novi Sad, Faculty of Technology

The aim of this study was researching of functional low energy fermented dairy product produced of milk with 0.9% fat with the addition of 10% kombucha inoculum and the effect of various packaging on the quality of produced beverages during storage.

The beverage was packed after production in polypropylene (PP) cups, covered with alumina caps and in comparable material, sacks of co extruded barrier foil of polyamide/polyethylene (PA/PE). Packaging conditions were either atmosphere (ATM) or modified atmosphere (MAP [40% CO₂ plus 60% N₂]).

The quality of the product was tested with standard methods of physics-chemical characteristics, chemical composition, energetic value and sensory characteristics researches after production. Metabolic products of kombucha activity in milk were tested by lactose, D-galactose, L-lactic acid, D-lactic acid and ethanol researches after production and during 15 days storage.

Fermented dairy drink produced by kombucha inoculum contains all high valuable milk component. Fermentation during beverage storage packed in CO₂/N₂ compared to other two samples was slower, whole was obvious in pH value change.

Content of L-lactic acid in the product was significantly higher compared to D-lactic acid amounting 0.807 g/100g after production. The highest increase of L-lactic acid during storage was detected in products packed in PP in packaging with air atmosphere.

Key words: fermented dairy product • kombucha • packaging • quality

¹MILKA J. STIJEPIĆ
¹JOVANA R. GLUŠAČ
²DRAGICA M. MILOŠEVIĆ-ĐURĐEVIĆ

¹Visoka medicinska škola, Prijedor
²Visoka tehnološka škola
 strukovnih studija, Šabac

NAUČNI RAD

UDK: 637.146.3:638.16

PREBIOTIČKO DJELOVANJE MEDA NA FERMENTACIJU I SVOJSTVA KOZJEG I KRAVLJEG PROBIOTIČKOG JOGURTA

Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj dodatka meda na tok fermentacije kravljeg i kozjeg mlijeka inokulisanog sa liofilizovanom mješovitom bakterijskom kulturom YO FAST 88, ABY3 (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Takođe, cilj je bio da se ispita i sinereza i viskozitet, te senzorska svojstva svih ispitivanih uzoraka nakon fermentacije.

Za proizvodnju probiotičkog napitka korišteno je UHT sterilizovano kozje mlijeko sa 3,0% mliječne masti i UHT sterilizovano kravljje mlijeko sa 3,2% mliječne masti. Med je dodavan u procentima 3 i 5%. Proizvedeni su i kontrolni uzorci bez dodatka meda. Fermentacija je vođena na 37°C do postizanja pH 4,6, a svaki sat utvrđene su promjene parametara kinetike fermentacije: aktivne i titracione kiselosti i elektrohemijskog potencijala. Za mjerenje pH vrijednosti i elektrohemijskog potencijala korišten je pH-metar (EUTECH pH 510/mV Meter), dok je titraciona kiselost određivana metodom po Soxhlet-Henklu. Mjerenje viskoziteta vršeno je pomoću BROOKFIELD Digital Viscometer, Model DV-E. Za određivanje intenziteta sinereze koristila se centrifuga SIGMA 2-6 Laboratory Centrifuges, a uzorci su podvrgnuti različitim brzinama obrtaja od 1000, 2000 i 3000 o/min u trajanju od 10 minuta. Senzorska svojstva su ocijenila četiri senzorska analitičara prema sistemu bodovanja na bazi faktora važenja sa ukupno 20 bodova (ISO, 1985).

Utvrđene su razlike trajanja i toka fermentacije između kravljeg i kozjeg mlijeka, te značajno povoljan uticaj dodatka meda na skraćivanje vremena fermentacije svih ispitivanih uzoraka. Kod uzoraka kravljeg probiotičkog napitka, povećanjem udjela meda raste viskozitet i stabilnost proizvoda, a smanjuje se sinereza.

Svi uzorci kozjeg napitka pokazuju niske vrijednosti viskoziteta, dok dodatak meda ima blagi uticaj na smanjenje izdvajanja surutke.

Senzorska analiza je pokazala da su najbolje ocijenjeni uzorci kravljeg mlijeka sa 3 i 5% meda, uzevši u obzir sve parametre ocjenjivanja (ukus, miris, izgled površine, konzistencija). Dodatak meda kozjem napitku nije ublažio karakterističan okus na kozu.

Ključne riječi: probiotičke bakterije • kiselost • sinereza • viskozitet • med • kozje i kravljje mlijeko

UVOD

U novije vrijeme zahtjevi potrošača za zdravom prehranom i proizvodi ma sa osobinama funkcionalne hrane su u porastu. Zbog svojih ljekovitih svojstava mliječni proizvodi nastali kiselomliječnom fermentacijom, uz prisustvo starter kultura, zauzimaju visoko mjesto na ljestvici zdravih namirnica. U okviru ovih proizvoda, sa najvećim asortimanom su proizvodi od kravljeg mlijeka. Međutim, iako bez dovoljno istraženih mogućnosti, proizvodnja fermentisanih napitaka od kozjeg mlijeka je vrlo interesantna, prije svega zato što nakon fermentacije kozje mlijeko djelimično gubi svojstven okus (zbog prisutnosti masnih kiselina kratkog lanca) neprihvatljiv mnogim potrošačima. Pored toga, prednost kozjim proizvodima se daje kako sa aspekta nutritivne vrijednosti, tako i sa aspekta prerade i kvaliteta gotovih proizvoda. Kozji jogurt ima znatno manji viskozitet, nježniji sastav i oštrij ukus, slabije otpušta surutku, a razvoj kiseline je brži i jači u poređenju s jogurtom od kravljeg mlijeka. Sa zdravstvenog aspekta, zbog bolje pro-

bavljivosti i antialergijskih karakteristika, kozje mlijeko ima znatne dijetetske i terapijske prednosti, naročito kod pacijenata s probavnim poremećajima i čirom na želucu (Park, 2000; Haenlein, 2004).

U proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda posebno mjesto pripada fermentisanim mliječnim napicima proizvedenim pomoću probiotičkih kultura koje sadrže bakterije *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium sp.* Iako su ljekovita svojstva ovih bakterija dobro poznata (Akin i sar., 2007), ove bakterije nisu dovoljno prilagođene mlijeku kao supstratu za rast, usljed čega često fermentisano mlijeko ne posjeduje senzorski odgovarajuće, za potrošača poželjne karakteristike. Zbog prilično sporog rasta tokom fermentacije mlijeka (18 do 28 sati) i zbog nedostatka ukusa nastalo proizvoda, u praksi se probiotičke bakterije kombinuju s tipičnim jogurnim bakterijama (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), kako bi se vrijeme fermentacije skratilo, a okus proizvoda poboljšao (Tamime i Robinson, 1985).

Radi ubrzanja procesa fermentacije kiselomliječnih proizvoda dodaju se promotori rasta. Postoji vrlo malo studija o prebiotičkim svojstvima meda. Međutim, neki rezultati su pokazali da dodatak meda podstiče razmnožavanje startera jednako kao i fruktooligosaharid, galaktoolisaharid i inulin. Nađeno je da ne postoji razlika između navedenih suplemenata s obzirom na stepen produkcije mliječne kiseline (Kajiwara i sar., 2002). S druge strane, poznat je antimikrobni potencijal meda prema nekim psihofilnim patogenim bakterijama (npr. *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes*). Pored bakterijskih, ublažava i virusne

Adresa autora:

Mr Milka J. Stijepić, Visoka medicinska škola,
 Nikole Pašića 4a, 52 000 Prijedor,
 tel.: + 387 52 242 380, faks: + 387 52 242 381
 e-mail: ilijamarija@gmail.com

infekcije, pridonosi boljoj resorpciji minerala (posebno kalcijuma i magnezijuma), smanjenju količine štetnih materija koje mogu uzrokovati rak debelog crijeva, pridonosi boljoj sintezi vitamina K te snižavanju visine masnoće u krvi.

Cilj istraživanja u ovom radu je bio da se ispita uticaj različitih udjela meda na tok fermentacije kozjeg i kravljeg probiotičkog jogurta, kao i fizičko-hemijska i senzorska svojstva uzoraka 24 sata nakon fermentacije.

MATERIJAL I METODI

U istraživanjima je korišteno kozje mlijeko s učešćem mliječne masti od 3,0% sterilizovano UHT postupkom („Vindija“ Varaždin, Hrvatska) i kravlje UHT sterilizovano mlijeko tipizirano na 3,2% mliječne masti („Imlek“ Padinska Skela, Srbija).

Za inokulaciju mlijeka korištena je liofilizovana mješovita probiotička kultura YO FAST 88, ABY3, Chr. Hansen, Denmark (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) sa učešćem 0,02%.

Bagremov med („Finab“, Velika Kladuša, BiH) je u zagrijano mlijeko, prije inokulacije, dodavan u količini od 3 i 5%. Inokulisana je i slijepa proba bez dodatka meda. Fermentacija je vođena na 37°C.

Tokom procesa fermentacije, promjene pH vrijednosti svakih sat vremena su praćene preko pH-metra (pH 510/mV Meter, Eutech Instruments Oakton, England).

Poslije završene fermentacije i nakon hlađenja, mjerenje viskozitetu vršeno je pomoću viskozimetra (Digital Viscometer, Model DV-E Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, USA). Korišten je simetrični rotacijski mjerni sistem kod kojeg mjerno tijelo rotira, a posuda je fiksirana. Mjerene su promjene viskozitetu tokom definisanog vremena od 3 minute pri brzini rotacije spindla ($\varnothing 4$) od 30 obrt/min. Vrijednosti su očitavane svakih 30s, a u radu su korištene srednje vrijednosti viskozitetu izmjerene u toku 3 minute.

Za određivanje intenziteta sinereze koristila se centrifuga SIGMA 2-6 Laboratory Centrifuges (Osterode, Germany) a uzorci su podvrgnuti različitim brzinama obrtaja od 1000, 2000 i 3000 o/min u trajanju od 10 minuta.

Senzorska svojstva su ocijenila četiri senzorska analitičara prema sistemu bodovanja na bazi faktora vaganja sa ukupno 20 bodova (ISO, 1985).

REZULTATI I DISKUSIJA

Za analizu fermentacijskog procesa kako sa tehnološkog, tako i sa nutricionističkog stanovišta, veoma važnu ulogu igraju dinamičke promjene u toku procesa fermentacije. Djelovanjem mikroflore, dodate tokom procesa proizvodnje, dolazi do promjene kiselosti jogurta, što dovodi do promjene viskozitetu i strukture proizvoda, pa tako i sklonosti sinerezi. Krivulja promjene kiselosti, između ostalih, može da posluži kao parametar za optimizaciju tehnološkog procesa proizvodnje s ciljem dobijanja proizvoda određenih senzorskih svojstava.

Rezultati praćenja pH vrijednosti tokom fermentacije kozjeg i kravljeg mlijeka sa dodatkom 3% i 5% meda i kontrolnih uzoraka bez dodatka meda, prikazani su na slici 1 (a,b). Period prilagođavanja probiotičke mješovite kulture kod svih ispitivanih uzoraka trajao je oko dva sata, nakon čega je naglo krenula fermentacija.

Kod kravljeg mlijeka, očekivano, povećanjem udjela meda znatno se ubrzava fermentacija. Tako, dodatak meda od 5% uticao je da su se optimalna pH vrijednost (slika 1,a) i elektrohemijski potencijal H^+ jona (slika 2,a) postigli za 8 sati fermentacije, kod uzorka sa 3% meda za 8,5 sati, dok je kod kontrolnog uzorka postignuta kiselost izoelektrične tačke kazeina (pH=4,6) nakon 9,3 sati što se podudara sa ranijim rezultatima (Milanović i sar., 2007).

Za razliku od kravljeg, kod kozjeg mlijeka mješovita probiotička kultura je trebala nešto više vremena da se

prilagodi na povećano učešće meda, što se odražava i na višu pH vrijednost (slika 1b), odnosno niži elektrohemijski potencijal H^+ jona (slika 2,b) uzoraka s medom, u odnosu na kontrolni uzorak, ali su se brzine fermentacije izjednačile blizu četvrtog sata inkubacije. U daljem toku fermentacije, vidljivo je da povećanjem udjela meda proces fermentacije se ubrzava. Optimalni pH (pH=4,6) fermentisanog mlijeka s dodatkom 3 i 5% meda je postignut u sedmom satu fermentacije, dok je fermentacija kontrolnog uzorka bez dodatka meda trajala 7,5 sati.

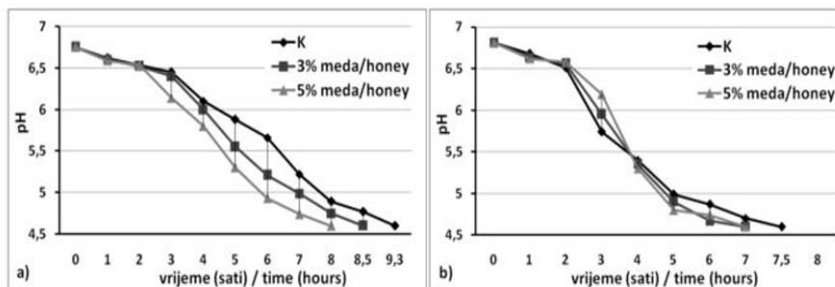
Generalno, rezultati mjerenja kiselosti jasno pokazuju brže odvijanje fermentacijskih procesa u kozjem nego u kravljem mlijeku, što je u skladu sa literaturnim podacima (Abrahamsen i Rysstad, 1991), bez obzira na dodatak meda.

Kod kozjeg mlijeka analizom varijanse, dobijeni rezultati su pokazali da dodaci meda nemaju statistički značajan uticaj ($p > 0,05$) na brzinu procesa fermentacije.

Analiza varijanse pokazuje da na nivou značajnosti $p < 0,05$ postoji statistički značajna razlika u procesu fermentacije između uzoraka sa 5% meda i kontrolnog uzorka, proizvedenih od kravljeg mlijeka.

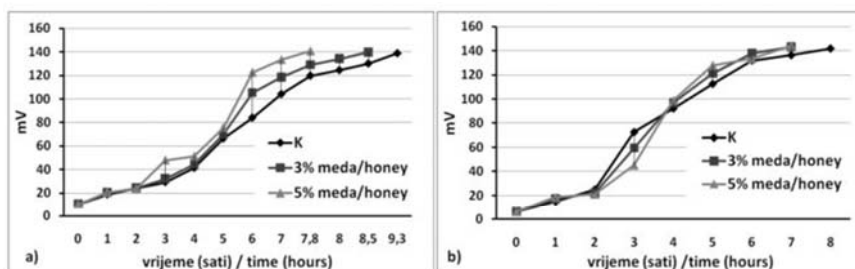
Jednako tako, rezultati su pokazali statistički visoko značajnu razliku ($p < 0,05$) između uzoraka kravljeg i kozjeg mlijeka kome je dodato 3% meda, kao i između njihovih kontrolnih uzoraka. Dodatak meda od 5% nije pokazao razliku u brzini fermentacije između pojedinih mlijeka, na nivou statističke značajnosti $p = 0,05$.

Sinereza je odvajanje tačne faze iz trodimenzionalne rešetke gela i pokazatelj je smanjene stabilnosti teksture fermentisanih mliječnih proizvoda. Problem stabilnosti grušta direktno



Slika 1 pH vrijednosti kod kravljeg (a) i kozjeg (b) jogurta sa dodatkom meda (0%, 3% i 5%) mjerene tokom fermentacije

Fig. 1 pH value of yogurt made of cow (a) and goat milk (b) with honey addition (0%, 3% and 5%) during fermentation



Slika 2 Vrijednosti elektrohemijskog potencijala (mV) mjerene kod kravljeg(a) i kozjeg(b) jogurta sa dodatkom meda (0%, 3% i 5%) tokom fermentacije

Fig. 2 Value of electrochemical potential (mV) of cow's yogurt (a) and goat's yogurt (b) with honey addition (0%, 3% i 5%) during fermentation

je vezan uz sposobnost vezivanja i zadržavanja vode unutar rešetke Caseinata (Tratnik, 1998).

Sinereza je izražena u mililitrima izdvojenog seruma u 100 g uzorka nakon centrifugiranja gela ohlađenog na 5°C. Mjerenja su izvršena prvog dana nakon fermentacije (nakon 24h), a uzorci su centrifugirani pri 1000, 2000 i 3000 o/min u trajanju od 10 min.

Iz podataka o intenzitetu sinereze, prikazanih na slici 3, može se uočiti da povećanjem brzine centrifugiranja raste sinereza svih ispitivanih uzoraka, s obzirom na to da se povećava intenzitet centrifugalne sile koja djeluje na proteinski matriks (Guinee, Mullins, Reville, & Cotter, 1995).

Tako, postoji statistički značajna razlika na nivou značajnosti $p < 0,05$ između uzoraka centrifugiranih na 3000 o/min s jedne strane, i uzoraka

centrifugiranih na 1000 i 2000 o/min s druge strane, bez obzira na dodatak meda i na vrstu mlijeka od kojih su uzorci proizvedeni.

Pri brzini od 1000 o/min procenat uzdvojene surutke je vrlo mali. Kod uzoraka od kravljeg mlijeka to je za kontrolni uzorak (K) 3,73ml, za uzorak sa 3% meda 1,4 ml, a za uzorak sa 5% meda 0,6 ml u 100g uzorka. S druge strane, kod uzoraka od kozjeg mlijeka vidljivo je nešto veće izdvajanje surutke: kod kontrolnog uzorka (K) 5,43 ml, kod uzorka sa 3% 3,32 ml i kod uzorka 5% meda 1,23 ml u 100g uzorka. Izdvojena surutka kod svih uzoraka je bila prilično bistra, što ukazuje na to da nije došlo do bitnijih promjena u strukturi gruš.

Generalno, rezultati mjerenja kiselosti jasno pokazuju brže odvijanje fermentacijskih procesa u kozjem nego u kravljem mlijeku, što je u skladu

sa literaturnim podacima (Abrahamson i Rysstad, 1991), bez obzira na dodatak meda.

Kod kozjeg mlijeka analizom varijanse, dobijeni rezultati su pokazali da dodaci meda nemaju statistički značajan uticaj ($p > 0,05$) na brzinu procesa fermentacije.

Analiza varijanse pokazuje da na nivou značajnosti $p < 0,05$ postoji statistički značajna razlika u procesu fermentacije između uzoraka sa 5% meda i kontrolnog uzorka, proizvedenih od kravljeg mlijeka.

Jednako tako, rezultati su pokazali statistički visoko značajnu razliku ($p < 0,05$) između uzoraka kravljeg i kozjeg mlijeka kome je dodato 3% meda, kao i između njihovih kontrolnih uzoraka. Dodatak meda od 5% nije pokazao razliku u brzini fermentacije između pojedinih mlijeka, na nivou statističke značajnosti $p = 0,05$.

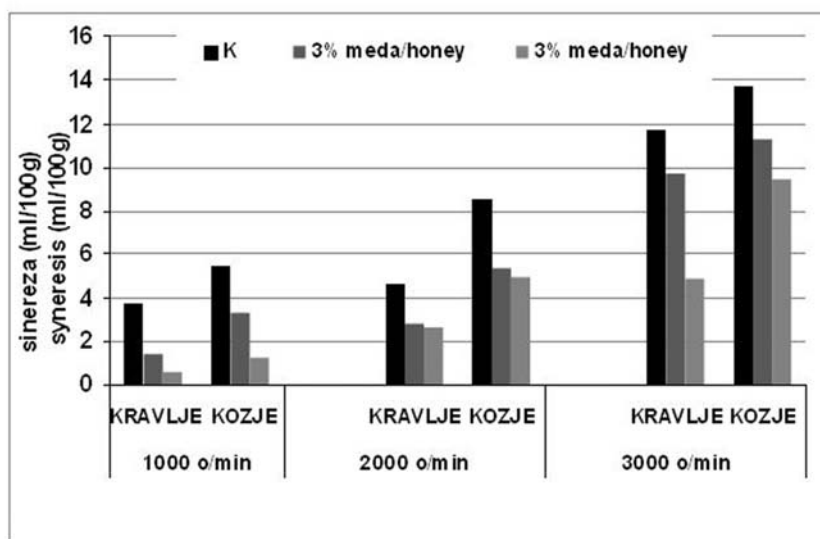
Sinereza je odvajanje tečne faze iz trodimenzionalne rešetke gela i pokazatelj je smanjene stabilnosti teksture fermentisanih mliječnih proizvoda. Problem stabilnosti gruš direktno je vezan uz sposobnost vezivanja i zadržavanja vode unutar rešetke Caseinata (Tratnik, 1998).

Sinereza je izražena u mililitrima izdvojenog seruma u 100 g uzorka nakon centrifugiranja gela ohlađenog na 5°C. Mjerenja su izvršena prvog dana nakon fermentacije (nakon 24h), a uzorci su centrifugirani pri 1000, 2000 i 3000 o/min u trajanju od 10 min.

Iz podataka o intenzitetu sinereze, prikazanih na slici 3, može se uočiti da povećanjem brzine centrifugiranja raste sinereza svih ispitivanih uzoraka, s obzirom na to da se povećava intenzitet centrifugalne sile koja djeluje na proteinski matriks (Guinee, Mullins, Reville, & Cotter, 1995).

Tako, postoji statistički značajna razlika na nivou značajnosti $p < 0,05$ između uzoraka centrifugiranih na 3000 o/min s jedne strane, i uzoraka centrifugiranih na 1000 i 2000 o/min s druge strane, bez obzira na dodatak meda i na vrstu mlijeka od kojih su uzorci proizvedeni.

Pri brzini od 1000 o/min procenat uzdvojene surutke je vrlo mali. Kod uzoraka od kravljeg mlijeka to je za kontrolni uzorak (K) 3,73ml, za uzorak sa 3% meda 1,4 ml, a za uzorak sa 5% meda 0,6 ml u 100g uzorka. S druge strane, kod uzoraka od kozjeg mlijeka vidljivo je nešto veće izdvajanje surutke: kod kontrolnog uzorka (K) 5,43 ml, kod uzorka sa 3% 3,32 ml i kod uzorka 5% meda 1,23 ml u 100g



Slika 3 Promjena inteziteta sinereze kod kravljeg i kozjeg jogurta sa dodatkom meda (0%, 3% i 5%) izmjerena 1. dana skladištenja pri brzinama centrifugiranja 1000, 2000 i 3000 o/min tokom 10 minuta

Fig. 3 Change of syneresis of cow's and goat's yogurt with honey addition (0%, 3% and 5%) at first day storage by centrifuging at 1000, 2000 and 3000 rpm

uzorka. Izdvojena surutka kod svih uzoraka je bila prilično bistra, što ukazuje na to da nije došlo do bitnijih promjena u strukturi gruša.

Nakon povećanja centrifugalne sile na 2000 o/min, rezultati su pokazali nešto intenzivnije izdvajanje surutke. Među uzorcima i od kravljeg (Kr) i od kozjeg (Ko) mlijeka, najviši intenzitet sinereze pokazali su takođe kontrolni uzorci (4,60 ml za Kr i 8,60 ml za Ko), što se slaže sa ranijim rezultatima (Stijepić i sar., 2009), nešto niže vrijednosti sa dodatkom 3% meda (2,83 ml za Kr i 5,40 za Ko) i sa dodatkom meda od 5% (2,67 ml za Kr i 4,93 ml za Ko). Izdvojena surutka je bila potpuno bistra, a formirani talog kompaktno.

Trend povećanja intenziteta sinereze praćen je povećanjem brzine centrifugiranja na 3000 o/min. Primjetno je bilo blaže zamućenje izdvojene surutke kod svih uzoraka, osim uzorka dobijenog od kravljeg mlijeka kome je dodato 5% meda, čiji je serum bio potpuno bistar. Pojava zamućenja se javlja usljed djelovanja jače centrifugalne sile koja je prouzrokovala da izdvojeni serum sa sobom povuče i čestice gela koje nisu bile čvrsto vezane za kompaktnu strukturu matriksa. Dinamika intenziteta sinereze je bila sljedeća: za uzorke od kravljeg mlijeka 11,73 ml (za K uzorak), 9,73 ml (za uzorak s 3% meda) i 4,9 ml (u uzorku s 5% meda) u 100g uzorka; za uzorke od kozjeg mlijeka: 13,7 ml (za K uzorak), 11,27 ml (za uzorak sa 3% meda) i 9,47ml (za uzorak sa 5% meda) u 100 g uzorka.

Generalno, ukupni rezultati mjerenja sinereze pokazuju da sa povećanjem udjela meda proizvod dobija na stabilnosti i manjem izdvajanju surutke. Takođe, rezultati jasno pokazuju veće izdvajanje surutke u uzorcima dobijenim od kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje, bez obzira na procenat dodatog meda i na primijenjenu brzinu centrifugiranja.

Viskoznoost svih fermentiranih mlijeka, pa tako i jogurta, kompleksan je reološki parametar kvaliteta koji predstavlja osnovu za optimizaciju tehnološkog procesa, procesnu kontrolu i potrošačku prihvatljivost proizvoda.

U našim eksperimentima, ispitivan je uticaj vremena na promjenu viskoziteta čvrstog probiotičkog jogurta proizvedenog od UHT sterilisanog kravljeg i kozjeg mlijeka uz dodatak meda, nakon 1. dana skladištenja. Ispitivanja su obuhvatila promjenu viskoziteta tokom 3 minuta mjerenja, na

Tabela 1. SREDNJE VRIJEDNOSTI VISKOZITETA KRAVLJEG JOGURTA SA DODATKOM MEDA (K, 3% I 5%) PRVOG DANA SKLADIŠTENJA
Table 1. AVERAGE VALUE OF VISCOSITY OF COW'S YOGURT WITH HONEY ADDITION (K, 3% AND 5%) FIRST DAY OF STORAGE

Vrijeme/Time (min)	K	3% meda/honey	5% meda/honey
0,5	259,75	265,00	315,00
1	214,00	213,15	269,25
1,5	185,50	187,00	241,00
2	176,50	170,50	220,50
2,5	152,50	159,25	202,25
3	142,50	148,00	188,50
Mjere varijacije/Calculated parameters			
X (n=2)	186,96	190,48	239,42
Sd	43,76	43,03	46,77
Cv	23,40612	22,59043	19,53491

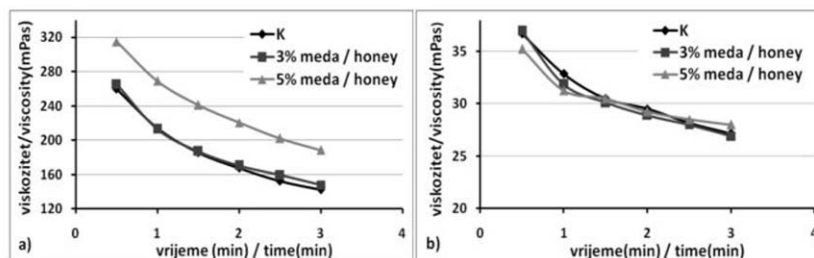
svakih 30 sekundi, pri brzini rotacije spindla od 20 obrt/min.

Iz tabele 1 i slike 4a, vidi se da svi uzorci probiotičkog jogurta (K, 0,3 i 0,5% meda) proizvedeni od kravljeg mlijeka, pokazuju značajno smanjenje viskoziteta tokom mjerenja. Prva izmjerena prosječna vrijednost viskoziteta uzorka sa 5% meda nakon 0,5 min, bila je 315,00 mPas, dok je nakon 3 minuta vrijednost viskoziteta opala na 188,50 mPas (to znači da je smanjenje viskoziteta iznosilo 126,50 mPas). Uzorci sa 3% meda i kontrolni uzorak-K imali su približno slične vrijednosti: u uzorku sa 3% meda nakon 0,5 min prosječna vrijednost viskoziteta je bila 265,00 mPas, a nakon 3 minuta 148,00 mPas (smanjenje viskoziteta je 117 mPas); u kontrolnom uzorku nakon 0,5min prosječna vrijednost viskoziteta je bila 259,75 mPas, dok nakon 3 minute u prosjeku viskoznoost je opala na 142,50 mPas (viskoznoost smanjena za 117,25 mPas).

Fermentisano kozje mlijeko, zbog svog proteinskog sastava, daje manje čvrst gruš, te ima mekšu konzistenciju u poređenju s kravljim mlijekom (Alichanidis i Polychroniadou, 1997; Merin, 2000). U našim istraživanjima svi fermentisani proizvodi, bez obzira na suplementaciju medom, imali su takođe dosta mekšu konzistenciju i manji viskozitet u odnosu na iste uzorke od kravljeg mlijeka. Može se reći da je konzistencija svih uzoraka proizvedenih od kozjeg mlijeka bila gotovo tečna, što se slaže sa ranijim rezultatima istraživanja (Stijepić i sar. 2008a, 2008b).

Podaci o promjeni srednje vrijednosti viskoziteta probiotičkog kozjeg jogurta sa dodatkom meda, nakon 1. dana skladištenja prikazani su u tabeli 2 i slici 4b.

Iz tabele 2 i slike 4b se vidi da se viskozitet u uzorku sa dodatkom 5% meda smanjio tokom vremena djelovanja sile sa 35,25 mPas nakon 0,5 minuta na 28,00 mPas nakon 3 minu-



Slika 4 Promjene viskoziteta kod kravljeg (a) i kozjeg (b) jogurta sa dodatkom meda (0%, 3% i 5%) izmjerene 1. dana skladištenja pri 20 rpm u toku 3 min

Fig. 4 Change of viscosity of cow's (a) and goat's (b) yogurt with honey addition (0%, 3% and 5%) first day of storage, at spindle rotation of 20 rpm

Analizom varijanse ustanovljeno je da dodatak meda od 5% ima statistički značajan uticaj ($p < 0.05$) na povećanje viskoziteta u odnosu na viskozitet uzoraka sa 3% meda i kontrolni uzorak.

ta. Ukupno smanjenje viskoziteta, tokom tri minuta mjerenja, iznosilo je 7,25 mPas. Uzorak proizveden od kozjeg mlijeka sa dodatkom 3% meda pokazuje prosječnu vrijednost viskoziteta nakon 0,5 minuta 36,95 mPas,

Tabela 2. SREDNJE VRIJEDNOSTI VISKOZITETA KOZJEG JOGURTA SA DODATKOM MEDA (K, 3% I 5%) PRVOG DANA SKLADIŠTENJA
Table 2. AVERAGE VALUE OF VISCOSITY OF GOAT'S YOGURT WITH HONEY ADDITION (K, 3% AND 5%) FIRST DAY OF STORAGE

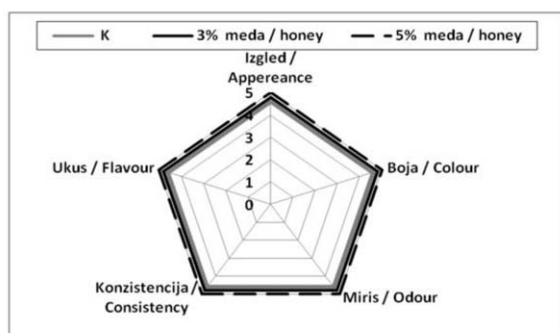
Vrijeme/Time (min)	K	3% meda/honey	5% meda/honey
0,5	36,70	36,95	35,25
1	32,85	31,85	31,25
1,5	30,50	30,10	30,50
2	29,50	28,90	29,25
2,5	28,15	28,00	28,50
3	27,15	26,90	28,00
Mjere varijacije/Calculated parameters			
X (n=2)	30,81	30,45	30,46
Sd	3,50	3,61	2,64
Cv	11,35009	11,87182	8,677408

dok je nakon tri minuta vrijednost viskoziteta opala na 26,90 mPas, što znači da je smanjenje viskoziteta iznosilo 10,05 mPas. Kod kontrolnog uzorka bez dodatka meda, vrijednost viskoziteta nakon 0,5 minuta iznosila je 36,70 mPas, a vrijednost viskoziteta nakon 3 min iznosila je 27,15 mPas. Ukupno smanjenje viskoziteta tokom vremena iznosilo je 9,55 mPas. Zanimljivo je da je u periodu od 0,5 do 1,5 minuta srednja vrijednost visko-

zitan uticaj na ukus proizvoda. Oba ova proizvoda imala su ugodno slatkast, osvježavajući ukus koji je podsjećao na voćni jogurt sa dodatkom kajsije. Presjek gruša je viskozozan, kompaktno, ujednačene strukture, bez grudica. Vrlo visoke ocjene je dobio i kontrolni uzorak proizveden od kravljeg mlijeka. Prema ukupnoj senzorskoj ocjeni, uzorci probiotičkog jogurta sa 5 i 3% meda pripadaju ekstra klasi, dok kontrolni uzorak pripada I klasi.

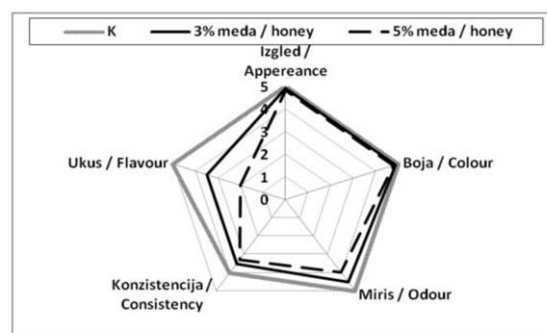
jako neprijatnog „kozjeg“ ukusa i mirisa.

Nastajanje specifičnog ukusa kozjeg mlijeka usko je povezano s prirodom različitih sastojaka mlijeka, kao i s biohemijskim i enzimskim faktorima. Tako, razlog lošije senzorske ocjene uzoraka probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka može biti, između ostalog, u njihovom aminokiselinskom sastavu. Poznato je da kozje mlijeko u odnosu na kravlje, sadrži manje treonina koji je najznačajniji prekursor nastajanja acetaldehida, najvažnijeg hlapljivog sastojka arome u jogurtu (Haenlein, 1996). S druge strane, utvrđeno je da u nastanku karakterističnog ukusa kozjeg mlijeka ključnu ulogu ima lipazna aktivnost i spontana lipoliza (Chilliard, 1982), te uticaj slobodnih masnih kiselina razgranatih lanaca (4-metiloktanska i 4-etiloktanska) (Astrup i sar., 1985). Osim toga, tri masne kiseline, nazvane po kozama (capra = koza, lat): kapronska (C6), kaprilna (C8) i kaprinska (C10), koje čine oko 20% masnih kiselina kozjeg mlijeka za razliku od samo 6% u kravljem mlijeku, utiču na jedinstveni, specifičan ukus mlijeka. Pored uticaja na ukus,



Slika 5 Senzorska procjena kravljeg jogurta bez dodatka i sa dodatkom meda (K, 3% i 5%) 1. dana skladištenja

Fig. 5 Sensory evaluation cow's yogurt with honey addition (K, 3% i 5%) first day of storage



Slika 6 Senzorska procjena kozjeg jogurta bez dodatka i sa dodatkom meda (K, 3% i 5%) 1. dana skladištenja

Fig. 6 Sensory evaluation goat's yogurt with honey addition (K, 3% i 5%) first day of storage

zitet uzorka sa 5% meda bila niža u odnosu na ostala dva, da bi se kasnije te vrijednosti izjednačile do kraja mjerenja od 3 minuta. Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) viskoziteta unutar uzoraka sa različitim udjelom meda.

Senzorsku procjenu fermentisanih napitaka (izgled, konzistenciju, boju, miris i ukus) nakon jednog dana skladištenja u frižideru na $+5^{\circ}\text{C}$, ocijenila je panel grupa od četiri člana koristeći sistem od 20 ponderisanih bodova. Rezultati senzorske analize su prikazani na slikama 5 i 6, kao srednje vrijednosti ispitivanih uzoraka.

Najbolje ocjene (slika 5) dobili su uzorci proizvedeni od kravljeg mlijeka. Dodatak meda od 5 i 3% imao je po-

Senzorska svojstva uzoraka probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka bila su sveukupno lošije ocijenjena u odnosu na uzorke od kravljeg mlijeka (slika 6). Iako je korišteno komercijalno trajno mlijeko koje je deodorisano, svi uzorci su imali karakterističan „kozji“ ukus. Bitno je istaknuti da se sa povećanjem dodatka meda, izražen ukus kozjeg mleka i intenzivirao. Konzistencija kod svih uzoraka je bila premekana, sa neznatnim neravninama po površini, što se slaže sa rezultatima (Stijepić i sar., 2008a). Prema ukupnoj senzorskoj procjeni, kontrolni uzorci od kozjeg mlijeka svrstani su u II klasu, dok su oba uzorka, s dodatkom 3 i 5% meda, svrstani u III klasu, prije svega zbog

te srednjelančane masne kiseline imaju i medicinsku vrijednost (koriste se u tretmanu sindroma malapsorpcije, intestinalnih poremećaja, koronarnih bolesti, prehrane prerano rođene dojenčadi, cističnih fibroza i žučnih kamenaca zbog jedinstvene sposobnosti da daju energiju, dok u isto vrijeme snižavaju, inhibiraju i otapaju zalihe holesterola (Jandal, 1996, Babayan, 1981). Međutim, bez obzira na medicinski značaj, prema senzorskoj ocjeni naših analitičara, svi uzorci proizvedeni od kozjeg mlijeka svrstani su u niže klase u odnosu na kravlje, s obzirom da su proizvodi, sa ovako neprijatnim ukusom, najčešće neprihvatljivi za potrošača.

ZAKLJUČAK

Rezultati mjerenja kiselosti jasno pokazuju brže odvijanje fermentacijskih procesa u kozjem nego u kravljem mlijeku. Dodatak meda je znatno ubrzao fermentaciju i kravljeg i kozjeg mlijeka. Shodno tome, kozje mlijeko je postiglo optimalne vrijednosti mjerenih parametara (pH, elektrohemijski potencijal) već nakon 7 sati fermentacije za uzorke s dodatkom 3 i 5% meda, a za 7,5 sati za kontrolni uzorak. Za uzorke od kravljeg mlijeka optimalni pH i elektrohemijski potencijal su postignuti: nakon 8 sati za uzorak s 5% meda, nakon 8,5 sati za uzorak s 3% meda i nakon 9,3 sati za kontrolni uzorak. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u fermentaciji ($p < 0,05$) između uzoraka od kravljeg i kozjeg mlijeka kome je dodato 3% meda, kao i između njihovih kontrolnih uzoraka. Unutar analiziranih uzoraka od kravljeg mlijeka dobijeni rezultati su pokazali da dodatak meda od 5% ima statistički značajan uticaj ($p > 0,05$) na brzinu procesa fermentacije u odnosu na kontrolni uzorak.

Ukupni rezultati mjerenja sinereze pokazuju da povećanjem udjela meda proizvod dobija na stabilnosti i manjem izdvajanju surutke. Takođe, rezultati jasno pokazuju veće izdvajanje surutke u uzorcima dobijenim od kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje, bez obzira na procenat dodatog meda i na primijenjenu brzinu centrifugiranja.

Svi proizvodi dobijeni fermentacijom kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje, bez obzira na suplementaciju medom, imali su: manju viskoznost, nježniji sastav, oštrij ukus i mekšu konzistenciju (gotovo tečnu).

LITERATURA

- Abrahamsen R.K., Rysstad D.: Fermentation of goats milk with yoghurt starter bacteria: a review. *Cilt. Dairy Prod.*, 26 (1991) 20-26.
- Akin, M. B., Akin, M. S., Kirmaci Z.: Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, 104 (2007) 93-99.
- Alichanidis, E. i Polychroniadou, A.: Special features of dairy products from of ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. *Sheep Dairy News*, 14 (1) (1997) 11-18.
- Astrup H. N., Steine, T. A. i Robstad A. M.: Taste, free fatty acids and fatty acids content in goat milk. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 35 (3) (1985) 315-320.
- Babayan, V. K.: Medium chain length fatty acid esters and their medical and nutritional application. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59 (1981) 49A-51A.
- Božanić, R., Tratnik, L.J. Marić, O.: Senzorska svojstva i prihvatljivost jogurta i aromatiziranog jogurta proizvedenog od kozjeg i kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo*, 50 (3) (2000) 199-208.
- Ghilliard Y.: Physiological variations in lipase activities and spontaneous lypolysis in bovine, caprine and human milk: a literature review. *Lait*, 62 (1982) 126-154.
- Guinee, T.P., Mullins, C.G., Reville, W.J. and Cotter, M.P. (1995): Physical properties of stirred-curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients. *Milchwissenschaft*, 50 (4) (1995) 196-200.
- Haenlein, G. F. W.: Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk; Production and Utilization of Ewe and Goat Milk. *International Dairy Federation, Brussels*, (2004) 159-178.
- Jandal, J.M.: Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22 (1996) 177-185.
- Kajiwara, S., Gandhi, H., Ustunol, Z.: Effect of the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J Food Prot.*, 65 (1) (2002) 214.
- Merin, U.: Influence of breed and husbandry on viscosity of Israeli goat milk yoghurt. *Small Ruminant Research*, 35 (2000) 175-179.
- Milanović, S., Carić M., Đurić, M., Ilić, M., Duraković K.: Physico-chemical properties of probiotic yoghurt produced with transglutaminase. *APTEFF*, 38 (1-190) (2007) 45-52.
- Park, O.: Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA. *Small Ruminant Research*, 37 (2000) 115-124.
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević Milošević, D.: Uticaj temperature termičke obrade svježeg kozjeg mlijeka i dodatka inulina na kvalitet probiotičkog jogurta. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2) (2008a) 47-53.
- Stijepić M., J. Glušac, D. Đurđević Milošević: Uticaj odabranih faktora na viskozitet tečnog kozjeg jogurta pri konstantnoj brzini rotacije spindla. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, VIII (2) (2008b) 150-161.
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević Milošević, D.: Uticaj sadržaja inulina i toplotnog tretmana na sinerezu probiotičkog kozjeg napitka tokom čuvanja. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik* 15, 3-4 (2009) 129-135.
- Tamime, A.Y. and Robinson, R.K.: *Yoghurt: science and technology*. Oxford: Pergamon Press Inc. (1985) pp. 40.
- Tratnik, L.J.: *Mlijeko - Tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, (1998).

SUMMARY

PREBIOTIC EFFECT OF HONEY ADDITION ON FERMENTATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF PROBIOTIC DRINK PRODUCED FROM GOAT MILK

¹Milka J. Stijepić, ¹Jovana R. Glušac, ²Dragica M. Milošević–Đurđević

¹Higher Medical School, Prijedor, Bosnia and Herzegovina,

²Higher Technological School of Professional Study, Šabac, Republic of Serbia

The aim of this research was to examine the influence of honey addition on fermentation of cow and goat milk inoculated with mixed starter culture YO FAST 88, ABY3 (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*). The aim was, also, to examine syneresis, viscosity and sensory properties of all yogurt samples made.

Probiotic drink was made of UHT goat milk with 3.0% milk fat and of UHT cow milk with 3.2% milk fat. Samples were added 3% and 5% of honey. Control samples were made without honey. Milk samples were incubated until pH 4.6 was reached and were immediately cooled to 4°C. Change of fermentation kinetics parameters: pH, potential (mV) and titratable acidity, were measured every hour. pH and potential were performed by pH-meter (EUTECH pH 510/mV Meter), titratable acidity was done by Soxhlet-Henkel method. Measurements of viscosity were done with BROOKFIELD DV-E Viscometer. For serum separation centrifuge was used SIGMA 2-6 Laboratory Centrifuges. Coagulated samples were centrifuged for 10 min at 1000, 2000 and 3000 rpm. Sensory properties were assessed by panel group (n=4) according to the method with maximum 20 points.

Differences in process and duration on the fermentation process have been found between cow and goat milk. Addition of honey had high influence on course and velocity of fermentation of all examined samples. Samples produced from cow milk, with increased percentage of honey added had increased viscosity and stability of the product, and decreased syneresis. Sample of yogurt, produced from goat milk, had low viscosity. Honey addition had influence on decreasing induced syneresis.

Based on average data from sensory panel, the best evaluated samples were produced from cow milk with 3% and 5% honey addition. Characteristic taste of goat's yogurt wasn't restrained of honey addition.

Key words: probiotic bacteria • acidity • syneresis • viscosity • honey • cow and goat milk

OGNJEN D. MAČEJ
SANJA V. SERATLIĆ
SNEŽANA T. JOVANOVIĆ
DRAGOSLAVA D. RADIN
TANJA R. VUČIĆ
ZORANA N. MILORADOVIĆ

Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet,
Institut za prehrambenu tehnologiju
i biohemiju

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.338.4:635.7

KARAKTERISTIKE SIREVA SA DODATKOM LEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA

UVOD

U proizvodnji sireva, primena lekovitog i aromatičnog bilja se ogleda kako u poboljšanju senzornih karakteristika, tako i povećanju stabilnosti i roka trajanja finalnog proizvoda. Takođe se dobija proizvod sa novim fiziološkim svojstvima, tzv. Funkcionalna namirnica. Uloga ovog bilja u produžetku roka trajanja sireva se, između ostalog, ogleda u tome što etarska ulja mnogih lekovitih i aromatičnih biljaka imaju antimikrobnu aktivnost prema velikom broju bakterija, virusa, kvasaca i plesni, i predstavljaju potencijalno bogat izvor novih biocida i preservativa. Sirevi sa lekovitim i začinskim biljem tradicionalno se proizvode u Turskoj, i to su u pitanju pretežno meki beli sirevi i beli sirevi u salamuri. Ipak, postoji veliki asortiman ovih sireva koji se proizvode širom Evrope, od mekih, preko polumekih i polutvrđih do tvrdih. Ono što je karakteristično za sve ove sireve je da se upotrebljava lekovito i aromatično bilje, karakteristično za dato geografsko područje. Lekovito i aromatično bilje, koje se koristi u proizvodnji sireva, je brojno. Tu spadaju: nana, timijan, bosiljak, peršun, žalfija, origano, mirođija, biber, cimet, kim, đumbir, ruzmarin, beli luk, feferoni, aleva paprika, list lovora, list duda, karanfilić, estragon, piskavica, celer, vlašac, kumin, kopriva, itd.

Takođe, u mnogim zemljama se već tradicionalno proizvode sirevi sa lekovitim i aromatičnim biljem, i to kako od kravljeg, tako i od ovčjeg i kozjeg ili mešanog mleka. Francuska, kao zemlja poznata po proizvodnji različitih varijeteta sireva, tradicionalno proizvodi veliki broj ovih sireva od kozjeg mleka. Ni Belgija mnogo ne zaostaje po asortimanu, a veliki broj ovih sireva proizvode i Holandija i Nemačka.

Ključne reči: sirevi sa biljem • lekovito bilje • aromatično bilje

Lekovito i aromatično bilje koristi se tradicionalno, kako u medicinske svrhe, tako i u ishrani, a njihova specifična upotreba je deo istorijskog nasleđa stanovništva na određenom geografskom području. Primena ovog bilja u prehrambenoj industriji, pa samim tim i u sirarstvu, ima višestruku ulogu. Pored poboljšanja senzornih karakteristika, kao i povećanja stabilnosti i roka trajanja finalnog proizvoda, dodatkom lekovitog i aromatičnog bilja dobija se proizvod sa novim fiziološkim svojstvima, tzv. funkcionalna namirnica. Naime, funkcionalne namirnice su one namirnice kojima se tokom prerade mogu dodati sastojci koji povoljno deluju na specifične telesne funkcije. U poslednjih deset godina, naučnici posvećuju posebnu pažnju mogućnostima upotrebe raznovrsnog biljnog materijala u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda. Pri tome se upotreba lekovitog i aromatičnog bilja sve više posmatra sa stanovišta zdravstvenih benefita.

Uloga i značaj prisustva lekovitih i aromatičnih biljaka u mlečnim proizvodima može biti izražena u vidu dobijanja proizvoda novih senzornih karakteristika. Takođe je značajno pronaći kombinacije koje će imati maksimalan zaštitni efekat tokom čuvanja gotovog proizvoda, naročito tokom perioda zrenja, kada su sirevi u pitanju.

Posebno pitanje kome se može posvetiti pažnja je zdravstvena bezbednost sireva, delovanjem bioaktivnih agenasa, komponenti aromatičnog i lekovitog bilja sa izraženom antimikrobnom aktivnošću prema velikom broju bakterija, virusa, kvasaca i plesni. Zahvaljujući ovom svojstvu, mogu predstavljati potencijalno bogat izvor

novih biocida i konzervanasa i imati veoma značajnu ulogu u sprečavanju rasta patogenih bakterija (na primer, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*) (Radin i Arsenović, 2008).

U našoj zemlji, proizvodnja ovih sireva još uvek ne postoji, ali u okviru programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja, koji finansira Ministarstvo nauke RS, Poljoprivredni fakultet u Zemunu, u saradnji sa Farmaceutskim fakultetom i JPS Zavodom za mlekarstvo u Beogradu, radi na ispitivanju mogućnosti proizvodnje tvrdih sireva od kravljeg i ovčijeg mleka, sa dodatkom samoniklog i gajenog lekovitog i aromatičnog bilja sa područja Srbije.

Sirevi sa lekovitim i aromatičnim biljem tradicionalno se proizvode u istočnoj i jugoistočnoj Turskoj uz datak 25 tipova bilja, uključujući vrste *Allium* spp., *Thymus* spp., *Silene* spp. i *Farula* spp., koje se dodaju pojedinačno ili u vidu smeše nakon koagulacije (Hayaloglu & Fox, 2008, Ağaloğlu i sar., 2005). U pitanju su beli sirevi u salamuri, od kojih je najpoznatiji varijetet »Otlu«, pored ostalih varijeteta »Carra«, »Surk« i dr. (Hayaloglu & Fox, 2008).

VARIJETETI SIREVA SA LEKOVITIM I AROMATIČNIM BILJEM

Sirevi koji se proizvode u Turskoj

Sir sa biljem »Otlu« (na turskom »Otlu peynir«, a u prevodu »sir sa biljem«) sastavni je deo svakog obroka u turskom domaćinstvu. Proizvodi se u istočnoj Turskoj, u provinciji Van (Hayaloglu i Fox, 2008), gde se takođe proizvodi i istoimeni sir sa biljem »Van« (Ayar, 2002). »Otlu« i sirevi tipa »Otlu« tradicionalno se proizvode

Adresa autora:
Prof. dr Ognjen Mačej, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet,
Nemanjina 6, 11080 Zemun
tel.: 011/ 2615 315
e-mail: mleko@agrif.bg.ac.rs

više od 200 godina u pomenutoj provinciji na istoku Turske, kako autohtonom tehnologijom, tako i u industrijskim uslovima. Industrijski proizveden sir izvozi se u zemlje EU. Za razliku od »Otlu«, »Carra« i »Surk« se proizvode isključivo autohtonom tehnologijom u južnoj provinciji Hatay, gde se pretežno i konzumiraju. Ovi sirevi se sličnom tehnologijom proizvode i u susednoj Siriji (Hayaloglu & Fox, 2008).

»Otlu« se tradicionalno proizvodi od ovčijeg sirovog mleka, mada se u nedostatku ovčijeg može koristiti i kravlje ili kozje mleko (Hayaloglu & Fox, 2008, Tarakçi & Kucukoner, 2006, Temiz i sar., 2008). U toku izrade se ne dodaju starteri, dok industrijska proizvodnja zahteva pasterezaciju i upotrebu mezofilnih starter kultura, najčešće *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Prilikom tradicionalne izrade, mleko se odmah nakon muže podsirava domaćim telećim sirilom i koagulacija traje 1-2 h na 30-35°C. Potom se gruš prebacuje u platnena cedila uz dodatak lekovitog i aromatičnog bilja (0,5-2 kg na 100 kg mleka) (Hayaloglu & Fox, 2008, Tarakçi i sar., 2004a), a zatim se vrši presovanje 3-4 h, pri čemu se intenzivno izdvaja surutka. Gruda se seče na blokove 7x7x5 cm, koji se potom potapaju u rastvor salamure (14-16% NaCl) ili se suvo sole (slika 1). Soljenje u salamuri se primenjuje u industrijskim uslovima i traje 6-10 h, nakon čega se sir prebacuje u plastične kante, u kojima zri narednih mesec dana (Hayaloglu & Fox, 2008). Ukoliko se sir soli ručno, nakon utrljavanja 5% soli, sir se ostavi da stoji 12 h, a potom se vakuumira i prenosi u prostoriju za zrenje, gde zri do 1,5 mesec na 4±1°C (Tarakçi & Kucukoner, 2006).

Suvo soljenje je karakteristično za tradicionalan način izrade, pri čemu se sir slaže u plastične ili zemljane posude, koje se potom okrenu naopačke (radi pospešivanja oticanja surutke) i stave 50 cm duboko u zemlju na zrenje u trajanju od 2-3 meseca. (Hayaloglu & Fox, 2008, Ekici i sar., 2006). Ovaj vid zrenja je, pored dodatog bilja, druga specifičnost koja karakteriše ovaj sir. Iako se u industrijskim uslovima ovaj postupak ne pri-

menjuje, potrošači preferiraju sir proizveden tradicionalnom tehnologijom. Značajne senzorne karakteristike ovi sirevi postižu tek nakon 3 meseca zrenja pod zemljom.

Ovi sirevi se mogu proizvoditi i kao niskomasni, gde su Tarakçi i Kucukoner (2006) ustanovili da se sir, najprihvatljiviji za potrošače, dobija od obranog mleka koje sadrži 1,5% MM. U cilju poboljšanja proteolize, pa samim tim i senzornih svojstava niskomasnih sireva, prilikom izrade se dodaju sledeći starteri: jogurtna kultura (*St. thermophilus* i *Lb. bulgaricus*), mezofilna sirarska kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), kao i termofilni *Lb. helveticus* (Tarakçi & Kucukoner, 2006).

Biljke, koje se pored *Allium* spp., najčešće upotrebljavaju su *Chaerophyllum macropodum*, *Antricus nemorosa*, *Silene vulgaris*, *Ferula* spp., *Prangos* spp., *Tymus* spp., *Mentha* spp., itd. (Tarakçi & Kucukoner, 2006, Temiz i sar., 2008). Biljke se mogu dodavati pojedinačno ili u vidu mešavine dve ili tri različite vrste. Dodato

loglu & Fox, 2008) ustanovio da ove biljke ne utiču na aktivnost dodatih mezofilnih startera. Bakirci (1999) je ustanovio da ove biljke ne utiču ni na razvoj termofilnih startera *St. thermophilus* i *Lb. bulgaricus*, koje se takođe mogu, kao dodatne kulture, koristiti u izradi »Otlu« sira.

Hemijski sastav ovih sireva može da varira. Parametri se kreću u sledećim intervalima: suva materija 44,95-68,72%, mlečna mast 14-34%, proteini 16,6-27,4%, so 3,3-6,4%, pH 4,84-5,96, a titraciona kiselost 0,27-0,78% mlečne kiseline. (Hayaloglu & Fox, 2008, Tarakçi i sar., 2004) Naučnici su ustanovili da je prisustvo dodatih biljaka rezultovalo sniženjem pH sira, jer se povećanjem koncentracije biljaka značajno redukovala pH vrednost sira (Tarakçi, 2004, Tarakçi i sar., 2006). Biljke takođe povećavaju kiselost sira, što stimuliše početni rast BMK prisutnih u sirovom mleku (Coşkun & Tunçtürk, 2000). Povećana koncentracija gvožđa u »Otlu« siru je posledica dodatog bilja (Mendil, 2006), a takođe i visok nivo vitamina C, koji je detektovan u ovim sirevima



(a)



(b)

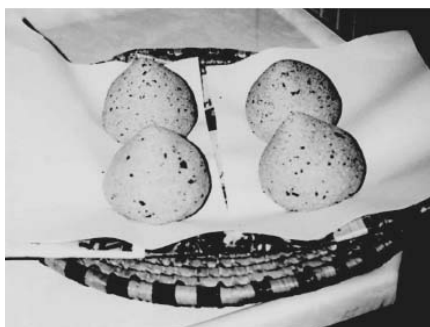
Slika 1. TURSKI SIR SA BILJEM »OTLU«: (a) U SALAMURI; (b) KRIŠKA (Alichanidis, E., 2008)

Figure 1. TURKISH CHEESE WITH HERBS »OTLU«: (a) IN BRINE; (b) PIECE

bilje siru daje karakterističan izgled i aromu, a takođe i produžava rok trajanja. Naime, ustanovljeno je da ekstrakti etanola i metanola pojedinih biljaka (uključujući *Allium vineale*, *Chaerophyllum macropodum* i *Prangos ferulacea*) poseduju antibakterijsku aktivnost protiv *L. monocytogenes* (Sagun i sar., 2006). Mnogi autori su ispitivali antimikrobnu aktivnost pojedinih biljaka, ali je Coskun (Haya-

~3mg na 100 g sira) (Coşkun & Öztürk, 2000).

Za proizvodnju »Otlu« sira koristi se 25 različitih biljaka. Najzastupljenija je *Allium* spp., verovatno zbog velike zastupljenosti ove biljke na planinskim područjima regije Van, kao i zbog toga što potrošači preferiraju ukus sira sa ovom biljkom.



Slika 2. TURSKI SIR SA BILJEM »SÜRK« (Guller-Akin M.B., 2000)
Figure 2. TURKISH CHEESE WITH HERBS »SÜRK« (Guller-Akin M.B., 2000)



Slika 3. ŠVAJCARSKI SIREVI SA BILJEM: (a) TVRDI »BELLEVUE«;
(b) POLUTVRDI »PANORAMA« (<http://www.emmi-swissalp.ch/english/home-swissalp/>)
Figure 3. SWISS CHESES WITH HERBS: (a) HARD »BELLEVUE«;
(b) SEMIHARD »PANORAMA« (<http://www.emmi-swissalp.ch/english/home-swissalp/>)

Pored klasičnog »Otlu« sira, proizvode se i varijeteti »Otlu Cacik« i »Otlu Lor«. »Otlu Cacik« se proizvodi od turskog tradicionalnog jogurta »Ayran« (niskomasni jogurt niskog viskoziteta, čija se izrada bazira na mešanju iste količine jogurta i vode). Jogurt se zagreva do temperature ključanja na kojoj se drži 5-10 minuta, do pojave belog koaguluma na površini. Potom se koagulum sakuplja u platnena cedila i vrši se odlivanje seruma do postizanja adekvatnog sadržaja suve materije. U takav sir se dodaje dobro pripremljena mešavina bilja u količini od 1-2%. »Cacik« ne podleže procesu zrenja, već se konzumira svež. Hemijski sastav sira je sledeći: suva materija 16,5-20,8%, mlečna mast 1,5-4,3%, proteini 8,1-13,9%, so 0,3-3,2%, dok se pH kreće do pH 4,3 (Hayaloglu & Fox, 2008, Kucukoner i sar., 2006).

»Otlu Lor« se dobija od surutke koja se izdvaja prilikom izrade »Otlu Cacika«. Gruš dobijen kuvanjem surutke se meša sa 2-8% soli i 2-10% bilja i ostavlja da zri. Prosečan hemijski sastav ovog sira je: suva materija 33,7%, mast 7,3%, proteini 17,3%, so

5,1% i kiselost 1,5% mlečne kiseline (Hayaloglu & Fox, 2008).

Varijetet »Sürk«, se slično »Caciku«, proizvodi zagrevanjem niskomasnog jogurta Ayran na temperaturu ključanja oko 30 min. Koagulum se potom presuje 5-6 sati, a potom se dodaje mešavina bilja i začina (pepermint, timijan, nana, kim, cimet, crni biber i đumbir). Smeša se pravi tako što se svaki sastojak dodaje u količini od 0,1-0,3% i meša sa 2% feferona, a ponekad se dodaje i 1% belog luka. Nakon dodavanja 5% soli, od smeše se formiraju konični oblici (slični obliku jagode) dijametra 5-7 cm i mase 150-200g (slika 2), koji se suše na vazduhu.

Sir se konzumira svež ili se umotava u pergament papir i stavlja u čup u kome zri 30 dana na sobnoj temperaturi, čime se pospešuje razvoj plesni na površini. Postoji varijanta da se sir u čupu prelije maslinovim uljem, što sprečava prodor plesni i na taj način produžava rok trajanja sira (Hayaloglu & Fox, 2008, Masatcioglu & Avsar, 2005).

Sir se tradicionalno proizvodi od kravljeg mleka u južnoj regiji Hatay u

malim zanatskim radionicama. U istoj regiji se od kozjeg mleka izrađuje varijetet »Carra« - polutvrđi do tvrđi sir sa dodatkom začina. Sir se proizvodi tako što se kozje mleko zagreva na 30-32°C, dodaje sirilo i koagulacija traje 60 min. Gel se reže na male komade, a potom se gruš prebacuje u platnena cedila i presuje 30 min pod pritiskom. Sirna gruda se potom reže na kriške 4-5cm i soli morskom solju i tako osoljeni komadi se ostave da stoje 2-3 dana. Potom se dodaje mešavina sušenog crnog kima i timijana u količini od po 5%. Kriške se slažu u zemljane ili grnčarske posude, prekriju tkaninom, a potom se na tkaninu stavlja drvo na koje je prethodno neta smeša pepela, soli i maslinovog ulja, koja se kad se osuši, prekriva još jednom tkaninom. Tako zatvoreni čupovi se zakopavaju 1,5m pod zemlju, gde sir zri 4-5 meseci. Ovaj tehnološki proces još uvek nije standardizovan i može da varira od domaćinstva do domaćinstva. Stoga hemijski sastav ovih sireva drastično varira, a prosečan sadržaj pojedinih sireva koji su Konar i sar. (1998) objavili analizom 30 uzoraka, je iznosio: suva materija 53,4%, mlečna mast 24,9%, proteini 18,9%, so 8,8%, a pH 5,6 (Hayaloglu & Fox, 2008).

Sirevi koji se proizvode u Švajcarskoj

Za razliku od Turske, gde se tradicionalno proizvode meki do polutvrđi beli sirevi sa biljem unutar sirmog testa, u Švajcarskoj se proizvode polutvrđi i tvrđi sirevi i to pretežno varijeteti sa biljem na površini. Primenom tradicionalne tehnologije, u malim domaćinstvima na Alpima proizvode se sirevi »SwissAlp« od kvalitetnog planinskog mleka i najboljih alpskih trava. Industija mleka »Emmi« proizvodi dva varijeteta: polutvrđi »SwissAlp Panorama« i tvrđi »SwissAlp Bellevue«. Sirevi se proizvode od pasterizovanog kravljeg mleka, koje se podsirava mikrobiološkim sirilom, a nakon obrade gruša i kalupljenja, na površinu se nanosi mešavina pažljivo selekcionisanog aromatičnog i lekovitog bilja. Zrenje polutvrđog sira »Panorama« traje do 4 meseca, a tvrđog »Bellevue« od 5 do 7 meseci. Sirevi sadrže 55% masti u suvoj materiji, a pakuju se u vidu celih kolutova, zatim četvrtine kolutova i porcijama od 150 g ili 125 g (slika 3).

Biljke se posebno uzgajaju na malim kultivisanim područjima na velikoj

nadmorskoj visini, gde je zemljište bogato mineralnim materijama, a sunce veoma jako. Takve biljke sporo rastu, čime se pospešuje formiranje jače arome. Žetva ovog bilja se obavlja ručno.

Vrste, koje se prilikom proizvodnje ova dva varijeteta dodaju, mešavina su sledećeg lekovitog i aromatičnog bilja: žalfija (*Salvia officinalis*), timijan (*Thymus vulgaris*), bosiljak (*Ocimum basilicum*), origano (*Origanum vulgare*) i peršun (*Petroselinum crispum*). Iako se biljke nanose na površinu kore sira, aroma tokom zrenja dospeva i u centralne delove sirnog testa. Varijetet »Panorama« ima prijatnu biljnu aromu, dok je aroma tvrdog sira »Belle-vue« nešto jačeg intenziteta.

Sirevi koji se proizvode u zemljama EU

U mnogim zemljama Evrope se takođe proizvode različite vrste sireva sa aromatičnim i lekovitim biljem. U Francuskoj, koja proizvodi više od 300 vrsta različitih sireva, postoji i veliki broj varijeteta sireva sa lekovitim i aromatičnim biljem, među koje spadaju:

«Arôme au gène de marc» - to je francuski autohtoni sir koji se proizvodi u regionu oko Liona i karakteriše ga lišće vinove loze, koje se obavlja oko površine sirnog kotura. Sir se proizvodi od kravljeg i kozjeg mleka.

«Poivre d'âne / Pèvre d'ai» proizvodi se od kravljeg, kozjeg ili mešanog sirovog mleka i na površinu se stavlja lokalna biljka *Saruteia hortensis*, slična timijanu i menti, koja ovom siru daje pikantan ukus.

«Petit Quercy» ili u prevodu «mali kersi» proizvodi se u istoimenoj provinciji na jugu Francuske i to od sirovog kozjeg mleka. Površina sira se ukrašava listom duda, a period zrenja ovog sira je kratak, najduže dve nedelje.

«Fleur du Maquis» ili u prevodu «cvet makis», kao i «Brin d'amour», što u prevodu znači «malo ljubavi» su sirevi koji se proizvode na Korzici i oba varijeteta karakteriše veliki broj sušenog bilja na površini kore. Kombinacija bilja koja se koristi (feferoni, bobice kleke, ruzmarin), daje siru vrlo paleći ukus na jeziku prilikom konzumiranja. To su autohtoni sirevi, koji se proizvode od ovčijeg sirovog mleka i period zrenja im je minimalno mesec dana (Colloto i Dorelli, 2006, Harbutt, 1999, Masui i Yamada, 2005).

«Gardian» je sveži sitan sir, koji se proizvodi u provinciji Bouches du

Rhône, u predelu Azurne obale, od ovčijeg (period decembar-leto) ili kravljeg mleka (tokom cele godine). Na površinu sira se posipa biber i *herbes de Provence* (bilje sa pometnutog podneblja, kao što su npr. bobice smreke) i na kraju ukrašava lorovim listom.

«Boulette d'Avesnes» proizvodi se u severnom regionu Avesnes, blizu belgijske granice, kako u tradicionalnim, tako i industrijskim uslovima. Za proizvodnju se koristi kravlje mleko (sirovo ili pasterizovano, u zavisnosti od toga da li se proizvodi u industriji ili autohtono) ili mlaćenica. U sir se ubacuje mešavina peršuna, bibera, estragona i karanfilića, smesa se ručno oblikuje u kupole, na koje se potom nanosi aleva paprika ili anato boja. Zrenje traje 2-3 meseca, nakon čega se u tradicionalnoj izradi površina sira ispira pivom.

«Boulette de Cambrai» proizvodi se sličnom tehnologijom kao prethodni, ali se za razliku od prethodnog ne nanosi aleva paprika na površinu i sir se konzumira svež.

«Dauphin» se takođe proizvodi u Severnoj Francuskoj, od sirovog ili pasterizovanog kravljeg mleka (tradicionalno i industrijski), mada se tradicionalno može proizvoditi i od kozjeg sirovog mleka (Harbutt, 1999). U toku izrade u gruš se dodaje mešavina estragona, peršuna, bibera i karanfilića. Sir se oblikuje i nosi na zrenje, koje traje od 2-4 meseca (Masui & Yamada, 2005).

«Boursin» je mek, kremast sir, koji se proizvodi u Normandiji od kravljeg mleka obogaćenog pavlakom, pa je sadržaj masti vrlo visok, oko 70% MuSM. U industrijskim uslovima se proizvode različite kombinacije ovog sira, pa se na tržištu može naći «Boursin» sa belim lukom i lokalnim biljem, kao i «Boursin» sa crnim biberom.

«Figue» je tradicionalni sir koji se proizvodi u zanatskim radionicama u regionu Aquitaine od sirovog kozjeg mleka. To je sveži sir koji se oblikuje u male kolutove oblika smokve. Oni se ručno sole, a potom posipaju začinskim biljem i paprom (Harbutt, 1999).

U Belgiji se proizvodi veliki broj različitih varijeteta sireva sa začinskim biljem sa flamanskog geografskog područja. Najpoznatiji varijetet je »Herbie«, koji predstavlja asortiman sireva koji se proizvode u provinciji Flandrija Orijental. U proizvodnji ovih sireva koristi se različito aromatično i lekovito bilje (kopriva, celer ili vlašac,

biber ili beli luk, kumin ili piskavica) i, u zavisnosti od upotrebljene kombinacije, dobija se sir odgovarajuće arome. Sadržaj MuSM se kreće iznad 48%, a sirevi se proizvode od sirovog kravljeg mleka u kolutovima težine oko 4 kg.

Pored Herbie, varijeteti koji se u Belgiji proizvode su sledeći:

»Maaseyker provençale« je polutvrđi sir, koji se proizvodi od pasterizovanog kravljeg mleka, a na površini je ukrašen začinskim biljem sa prostora provincije Anvers u severnoj Belgiji. Sadržaj masti u suvoj materiji je iznad 50%, što siru daje kremastu strukturu, a začinsko bilje doprinosi pikantnoj aromi. Sir se proizvodi u obliku koluta težine oko 3 kg.

»Moerenaar Fromage aux herbes«, u prevodu sir Moerenar sa biljem, koji se izrađuje u regionu Moeren u blizini francuske granice. To je polutvrđi sir, za čiju se izradu koristi sirovo kravlje mleko, a bilje se dodaje na površini. Sir ima više od 50% MuSM, a poseduje karakterističnu pikantnu aromu belog luka.

»Postel Provençal« je takođe polutvrđi sir za čiju se izradu koristi sveže bilje sa područja Antwerpen Kempen. Proizvodi se od pasterizovanog mleka i sadrži minimalno 50% MuSM.

»Rochefort aux algues« je polutvrđi sir sa algama, koje su bogat izvor natrijuma, kalcijuma i gvožđa, sadrže veliki broj vramina i poseduju antikoagulativnu i antikancerogenu aktivnost. Sir se proizvodi od pasterizovanog mleka u malim kolutovima do 1 kg (dimenzije 9x17x9 cm) i sadrži minimum 48% MuSM. 100g sira sadrži, između ostalog, 500mg fosfora, što je 60% od preporučenog dnevnog unosa (RDA), kao i 800mg kalcijuma, što je 100% RDA.

»Rochefort Bio Basilic« se proizvodi od mleka i bosiljka iz organske poljoprivrede i bogat je vitaminima A i C, kalcijumom i gvožđem. Dodato bilje stimuliše nervni sistem, a eterična ulja koja se mogu izdvojiti, koriste se u aromaterapiji protiv depresije i za opuštanje.

Pored navedenih, u Belgiji se proizvode i sirevi od ovčjeg mleka sa dodatkom bilja, kao što su »Bailli auh orties« - polutvrđi sir sa ukusom paprike i koprive, zatim »Brillat Basilic« - kremasti sir sa bosiljkom i »Pomodori« - kremasti sir sa bosiljkom i paradajzom. Od kozjeg mleka se proizvodi »Lolivet« - sveži sir, čija je unutrašnjost ispunjena crnim maslinama.

U Holandiji se proizvode razni varijeteti sireva u tipu »Gaude« ili »Edamera«, kako od kravljeg, tako i od ovčijeg i kozjeg mleka i to u malim zanatskim radionicama. Ovi sirevi predstavljaju specijalitet proizvodnog programa asocijacije Henri Willig, čije se farme i male mlekarske radionice nalaze širom Holandije.

Varijeteći koji se proizvode od kravljeg mleka su sirevi sa korijanderom i đumbirom (slika 4), zatim pikantni sir sa belim lukom, vlašcem i peršunom, sir sa kimom, sa dodatkom aleve paprike, itd. Jedan od novijih proizvoda je sir sa biljkom piskavica, iz porodice *Fabaceae* (*Trigonella foenum-graecum*) (eng. Fenugreek). Piskavica je seme koje se još 1600 godina p.n.e. uzgajivalo zbog svojih lekovitih svojstava. Biljni deo se takođe koristi, pa je čaj bio poznat kao piće za podmlađivanje. Ukus sira sa semenom piskavice je vrlo sličan siru sa orasima.



Slika 4. HOLANDSKI SIREVI SA BILJEM: SIR SA ĐUMBIROM I KORIJANDEROM (foto Seratlić S., 2007)

Figure 4. NETHERLAND CHEESES WITH HERBS: CHEESE WITH GINGER AND CORIANDER (Photo by S. Seratlić, 2007)

Sirevi se proizvode u vidu malih kolutova mase 440g, a sadržaj masti u suvoj materiji iznosi 48%.

U Holandiji se takođe proizvodi »Leyden« ili »Leidsekaas / Komijenskaas«. To je tvrdi sir, za čiju se izradu koristi kravlje mleko, a proizvodi se u malim zanatskim radionicama u okviru farmi univerzitetskog gradića Leidena. Tekstura sira je slična teksturi »Gaude«, ali pošto se za izradu koristi delimično obrano mleko, sir ima nešto čvršću konzistenciju. Gruš se boji anato bojom i meša sa semenom kima pre presovanja i soljenja u salamuri. Kim daje siru vrlo aromatičnu aromu, koja se dobro uklapa sa osta-

lim komponentama arome karakterističnim za ovaj tip sira (Harbutt, 1999).

U Danskoj se tradicionalno proizvodi »Danbo« od kravljeg mleka. To je polumeki sir pravougaonog oblika, čija je površina ponekad premazana crvenim ili žutim voskom, a unutrašnjost je ispunjena semenom kima, koji mu daje specifičnu aromu. Proces zrenja traje od 5-6 nedelja. Sir može biti bez začina, pri čemu u unutrašnjosti može sadržati nekoliko rupica veličine lešnika. Slični sirevi, koji se u Danskoj proizvode, su Fynbo, Elbo, Svenbo i Molbo (Harbutt, 1999).

U Nemačkoj se takođe proizvode sirevi sa aromatičnim i začinskim biljem. Najznačajnija tri predstavnika su (Colloto i Dorelli, 2006).

»Biarom«, polutvrđi sir, koji se izrađuje od pasterizovanog kravljeg mleka, u provinciji Gornje Bavorske. Sir je karakterističan po svom jedinstvenom, oštroj, ali slatkome ukusu. Na aromu sira, takođe može uticati bilje koje raste na pomenutom podneblju, kao i zeleni biber, seme kima ili feferoni, koji se mogu dodati posebno ili u kombinaciji.

»Bonifaz« je meki, kremast sir, koji se takođe proizvodi u Gornjoj Bavorskoj. Za proizvodnju se koristi pasterizovano kravlje mleko čiji se sadržaj masti povećava dodavanjem pavlake, što utiče na kremastu strukturu sira, čiji se sadržaj MuSM kreće i do 70%. Proizvode se različite kombinacije sira, sa dodatkom aromatičnog bilja, bibera, crvene paprike, belog luka i šampinjona.

»Altenburger Ziegenkäse« je meki sir koji se proizvodi od mešanog kravljeg i kozjeg (min 15%) pasterizovanog mleka. Sir je sličan »Kamemberu«, na površini ima bele plesni, a unutrašnjost je svetlo žute boje, meke konzistencije i ispunjena je semenom kima, koji se dodaje prilikom kalupljenja. Proces zrenja ovog sira traje 12 dana.

U Engleskoj se proizvode »Perroche« i »Rosary Herb Log«. Sirevi se izrađuju od sirovog kozjeg mleka, od kojih prvi u regionu Hereford i Worcester, a drugi u regionu Wiltshire. To su sveži sirevi, u toku čije izrade se dodaje različito bilje, poput mirođije, estragona, ruzmarina i timijana i period zrenja traje minimum 2 nedelje. »Perroche« ima oblik zarubljene kupe, dok »Rosary Herb Log« ima oblik valjka, a površina ovih sireva može biti dekorisana mirođijom ili ruzmarinom ili mešavinom ovih biljaka sa gore pomenutim (Harbutt, 1999).

Sir »Vulscombe«, koji se takođe proizvodi u Engleskoj, i koji je dupli nosilac bronzane medalje na British Cheese Awards, je sveži kozji sir, koji se u prodaji može naći bez bilja, kao i u kombinaciji sa svežim biljem i belim lukom, posut crnim biberom ili ukrašen lovorovim listom. Sir se tradicionalno proizvodi u regionu Devon, a karakteristično je da se koagulacija odvija pod dejstvom prisutne autohtone mikroflore, odnosno ne dodaje se sirilo u toku izrade sira. Proces zrenja traje 1-3 nedelje, a dobijeni kolutovi su mali, do 170g, vlažne i kremaste teksture (Harbutt, 1999).

Biohemijske promene u sirevima sa biljem

Grupa autora je proučavala proteolitičke promene u turskom »Otlu« siru i ustanovila da biljke, kao što su *Allium* spp. (Ekici i sar., 2006, Coşkun i Tunçtürk, 2000), *Prangos* spp. (Tarakçı, 2004) i *Chaerophyllum* spp. (Tarakçı i sar., 2006) favorizuju proteolizu tokom zrenja. Ipak, povećana koncentracija bilja negativno utiče na senzorne karakteristike finalnog proizvoda, pa su Tarakçı (2004) i Tarakçı i sar. (2006) ustanovili da koncentracija biljaka od 1% daje najbolje senzorne karakteristike sira (Tarakçı, 2004 Tarakçı i sar., 2006).

Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija bio je veći u sirevima proizvedenim od sirovog mleka (Coşkun, 1998, Tunçtürk i sar., 2003). Takođe, Tunçtürk i Coskun (2002) detektovali su veći stepen proteolitičkih promena u sirevima kod kojih je primenjen postupak suvog soljenja, što se može objasniti migracijom pojedinih azotnih jedinjenja iz sira u salamuru. Naime, Tunçtürk i sar. (2003) su u salamuri detektovali povećan nivo u vodi rastvorljivih azotnih materija, što je bilo i očekivano, s obzirom na činjenicu da se tokom zrenja oslobađa izvesna količina peptida i aminokiselina, od kojih pojedini difunduju u salamuru. Stoga se nameće potreba da se, paralelno sa analizama sireva, izvrše i analize salamure, kako bi proces zrenja mogao što adekvatnije da se prati. Ipak, proteolitičke promene u ovim sirevima nisu u toliko velikom stepenu zastupljene, kao npr. kod sireva sa plavozelenim plesnima, kod kojih su Seratlić i sar. (2006, 2007, 2008a) detektovali visok stepen rastvorljivih azotnih materija, kako u 12% trihlorsirčetnoj, tako i u 5% fosfovolfamskoj kiselini,

koje su indikator »duboke« proteolize u sirevima.

Elektroforetskim ispitivanjima je ustanovljen visok stepen degradacije α_{s1} -kazeina u zreom »Otlu« siru, dok je β -kazein ostao praktično netaknut (Tarakçi i sar., 2004a). Ekici i sar. (2006) su u sirevima proizvedenim od sirovog mleka detektovali veći stepen u vodi rastvorljivih azotnih materija. Naime, nestarterska mikroflora, koja je u velikom broju prisutna u sirovom mleku, sadrži termorezistentne sojeve koji sintetišu veliki broj ekstracelularnih enzima. Time se povećava koncentracija u vodi rastvorljivih azotnih materija, kao i broj produkata razgradnje, koji doprinose dominantnim karakteristikama ukusa i mirisa. Osnovni pokazatelj, koji karakteriše autohtonu tehnologiju sireva, kao što je Otlu i drugih sireva u salamuri, je upotreba sirovog mleka. Tako se i beli sirevi u salamuri, kao što su Svrlijski, Zlatarski, Sjenički i dr. proizvode od svežeg, termički netretiranog mleka, koje je izuzetnog kvaliteta, pre svega zbog trave i pašnjaka na kojim se životinje hrane, a koji se nalaze na velikoj nadmorskoj visini, kao i klimatskih uslova, što ima veliki uticaj i na kvalitet finalnog proizvoda, na koji takođe utiče i sam tradicionalan način proizvodnje (Jovanović i sar., 2005, Mačej i sar., 2004, 2005, 2006, 2007, Vučić i sar., 2008).

Coşkun i Tunçtürk (2000) su ustanovili da dodato bilje povećava ne samo stepen proteolize, nego i lipolize u »Otlu« i sirevima tipa »Otlu«. Upotreba sirovog mleka pospešuje lipolizu u sirevima ove grupe i to najverovatnije zbog prisutstva native lipaze mleka (Coşkun, 1998). Tarakçi (2004) je detektovao veći nivo slobodnih masnih kiselina u uzorcima zrelog »Otlu« sira. Tako je nivo slobodnih masnih kiselina u zrelih sirevima bio 4,3 puta veći u odnosu na početak zrenja. Takođe, isti autor je ustanovio da su sirevi sa većim sadržajem bilja imali veće koncentracije slobodnih masnih kiselina (Tarakçi, 2004). Objašnjenje se može tražiti u mogućoj kontaminaciji bilja plesnima, koje takođe učestvuju u procesima lipolize (Coşkun i Tunçtürk, 2000, Tarakçi, 2004). Naime, plesni su izraziti lipoliti, koji proizvode ekstracelularne lipaze, koji ne samo da vrše hidrolizu masti uz oslobađanje masnih kiselina, nego i konverziju slobodnih masnih kiselina u β -keto kiseline, a potom i metil-ketone. Ova jedinjenja su glavni nosioci arome sireva sa plavo-zelenim plesni-

ma (Seratlić i sar., 2008b). Na taj način, plesni koje mogu biti prisutne u sirevima sa biljem, učestvuju u procesima lipolize, čime u velikoj meri utiču i na formiranje arome ovih sireva. Diraman (2004) je ustanovio prisustvo masnih kiselina sa kratkim lancima (C_4 - C_8), kao i kapronske kiseline (C_{10}) u značajnom stepenu (cit Hayaloglu i Fox, 2008).

Durlu-Özakaya (2002) vršio je ispitivanje sadržaja biogenih amina u nekim turskim sirevima i ustanovio da je tiramin najzastupljeniji u uzorcima sira »Otlu«, ali da su ove koncentracije bile znatno ispod nivoa toksičnosti. Putrescin, kadaverin i histamin su takođe detektovani u ovom siru, ali u znatno manjoj koncentraciji u odnosu na druge ispitivane turske sireve (zreli meki sir »Civil«, zrelu tvrdi sirevi »Urfa«, »Mihaliç« i »Kacar«, kao i mladi tvrdi sir »Örgü«) (Durlu-Özakaya, 2002). Naime, koncentracija biogenih amina je veća kod zrelih tvrdih sireva, proporcionalno povećanom sadržaju slobodnih aminokiselina, čijom dekarboksilacijom ovi amini nastaju.

Ekici i sar. (2006) su ispitivali uticaj biljaka na akumulaciju histamina u »Otlu« siru i ustanovili da dodato bilje može doprineti formiranju histamina u ovim sirevima, mada detektovane koncentracije nisu bile štetne po zdravlje. Biološki aktivni amini nastaju kao proizvod metaboličkih procesa mikroorganizama, izdvajanjem α -karboksilne grupe iz pojedinih slobodnih aminokiselina. Histamin nastaje dejstvom onih mikroorganizama koji poseduju enzim histidin-dekarboksilazu (Arnold i Brown, 1978). Tako su Durlu-Özakaya i sar. (1999) ustanovili da je sadržaj histamina u korelaciji sa brojem laktobacila u siru. Sadržaj histamina, koji je detektovan u »Otlu« siru, kretao se od 0,0 do 52,5 mg/kg. Sagun i sar. (2005) su takođe ispitivali sadržaj ovog amina i detektovali prosečnu koncentraciju od 21,9 mg/kg histamina u prvim danima zrenja, da bi ona postepeno rasla i nakon 90 dana zrenja dostigla nivo od 46,2 mg/kg. Ove koncentracije nisu štetne po zdravlje, s obzirom na to da su Casella i sar. (2001) objavili podatak da koncentracija histamina od 1g/kg rezultuje trovanje organizma. Kancerogeno dejstvo biogenih amina se ogleda u tome što u reakciji sa nitritima nastaju potencijalno kancerogena jedinjenja nitrozamini (Shalaby, 1996). Međutim, koncentracija bilja, koje se u proizvodnji ovih sireva dodaje (do 2 kg na 100 l mleka), suvi-

še je niska da bi uticala na povećanje nivoa histamina u ovim sirevima. Ipak, treba imati u vidu da potencijalno učešće u formiranju biogenih amina mogu imati mikroorganizmi, koji se najčešće javljaju u sirevima u salamuri. Takođe treba istaći da sirevi proizvedeni od sirovog mleka poseduju veći broj ovakvih mikroorganizama. Sprovedena istraživanja od strane Ekici i sar. (2006) ukazuju na to da je nivo formiranog histamina bio niži u sirevima proizvedenim od pasterezovanog mleka. Ovi sirevi uglavnom nisu sadržali bakterije roda *Enterobacteriaceae*, koje poseduju dekarboksilaznu aktivnost na histidin. Ipak, ukoliko je detektovano, prisustvo ove bakterije potiče od dodatih biljaka. Naime, brojni autori su ustanovili da se u biljkama, koje se dodaju prilikom izrade ove grupe sireva, mogu naći mikroorganizmi koji poseduju aktivne dekarboksilaze, a među kojima su: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii*, pseudomonade i mikrokoke.

S obzirom na to da dodato bilje može da dovede do naknadne kontaminacije sireva mikroorganizmima koji proizvode histamin, to ukazuje na potrebu da se izvrše ne samo analize sireva, nego i dodatih biljaka na prisustvo onih sojeva mikroorganizama koje poseduju histidin-dekarboksilazu.

LITERATURA

- Ağaloğlu, S., Dostbil, N., Alemdar, S.: The Antibacterial Efficiency of Some Herbs Used in Herby Cheese. *Vet. Fak. Derg.*, 16 (2) (2005) 39-41.
- Arnold, S.H., Brown, W.D.: Histamine toxicity from fish products. *Adv. Food Res.*, 34 (1978) 113-154.
- Ayar, A.: Effect of some herb essential oils on lipolysis in white cheese. *J. Food Lipids*, 9 (2002) 225-237.
- Bakirci, I.: The effects of some herbs on the activities of thermophilic dairy cultures. *Nahrung*, 43 (5) (1999) 333-335.
- Casella, I.G., Gatta, M., Desimoni, E.: Determination of histamine by high-pH anion-exchange chromatography with electro-chemical detection. *Food Chem.*, 73 (2001) 367-372.
- Colloto, C., Dorelli, L.: Formaggi. N.G.V., Colonia (2006).
- Coşkun, H.: Microbiological and biochemical changes in herby cheese during ripening. *Nahrung/Food*, 42 (5) (1998) 309-313.
- Coşkun, H., Tunçtürk, Y.: The effect of *Allium* sp. on the extension of lipolysis and proteolysis in Van herby cheese during maturation. *Nahrung/Food*, 44 (1) (2000) 52-55.
- Coşkun, H., Öztürk, B.: Vitamin C contents of some herbs used in Van herby cheese (Van Otlu Peyniri). *Nahrung / Food*, 44 (5) (2000) 379-380.
- Durlu-Özakaya, F.: Biogenic amine content on some Turkish cheeses. *J. Food Process. Preserv.*, 26 (2002) 259-265.

- Dorlu-Özakaya, F., Alichanidis, I., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tunail, N.: Determination of biogenic amine content of Beyaz cheese and biogenic amine production ability of some lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 54 (1999) 680-681.
- Ekici, K., Coskun, H., Tarakçi, Z., Ondul, E., Sekeroglu, R.: Contribution of herbs to the accumulation of histamine in "Otlu" cheese. *J Food Biochem*, 30 (2006) 362-371.
- Harbutt, J.: *The world encyclopedia of cheese*. Harnes House, London (1999).
- Hayaloglu, A., Fox P.F.: Cheeses of Turkey: 3. Varieties containing herbs or spices. *J. Dairy Sci. Tehnol.*, (2008).
- Jovanović, S., Mačej, O., Vučić, T., Seratlić, S.: Karakteristike autohtone proizvodnje Zlatarskog sira, Simpozijum "Mleko i proizvodi od mleka", Tara, 2005, Zbornik radova, 84-86.
- Kucukoner, E., Tarakçi, Z., Sagdic, O.: Physicochemical and microbiological characteristics and mineral content of herby Cacik, a traditional Turkish dairy product. *J. Sci. Food Agric.*, 86 (2006) 333-338.
- Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M.: Uticaj vrste mleka na kvalitet Sjeniškog sira i sireva u tipu Sjeniškog sira izrađenih autohtonom tehnologijom. *Biotehnologija u stočarstvu*, 20 (1-2) (2004) 109-117.
- Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M., Seratlić, S., Vučić, T.: Chemical and sensory characteristics of Svrlijg white cheese. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21 (5-6) (2005) 369-373.
- Mačej O., Snežana Jovanović, Gordana Niketić, Tanja Vučić, Sanja Seratlić: Senzorne karakteristike Zlatarskog sira. XVII Inovacije u stočarstvu, Biotehnologija u stočarstvu, 22 (2006) 317-327.
- Mačej O., Snežana Jovanović, Sanja Seratlić, Tanja Vučić: Tehnološki postupak proizvodnje autohtonog Zlatarskog sira, IV simpozijuma "Mleko i proizvodi od mleka", Kladovo, 2007, Zbornik radova, 83-87.
- Masatcioglu, T.M., Avsar, Y.K.: Effects of flavorings, storage condition, and storage time on survival of *Staphylococcus aureus* in Surk cheese. *J. Food Prot.*, 68 (2005) 1487-1491.
- Masui, K., Yamada, T.: *French Cheeses*. Dorling Kindersley Limited, London (2005).
- Mendil, D.: Mineral and trace metal levels in some cheese collected from Turkey. *Food Chem.*, 96 (2006) 532-537.
- Radin, D., Arsenović, B.: Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i potencijalna primena u proizvodnji sireva. (2008).
- Sagun, E., Ekici, K., Durmaz, H.: The formation of histamine in herby cheese during ripening. *J. Food Qual.*, 28 (2005) 171-178.
- Shalaby, A.R.: Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29 (1996) 675-690.
- Seratlić, S., Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M.: The influence of two different types of *Penicillium roqueforti* moulds on the protein changes in Gorgonzola type blue-veined cheeses, during ripening, 2nd International Congress on Bioprocesses in Food Industries, University of Patras, Rio - Patras, Greece, 2006, Proceedings, 123-124.
- Seratlić, S., Mačej, O., Jovanović, S., Marinković, S.: Chemical and sensory characteristics of Gorgonzola-type cheeses produced in Serbia, 14th International Congress Euro Food Chem XIV: Food quality, an issue of molecule based science, Paris, France, 2007, Proceedings, (1) 230-233.
- Seratlić, S., Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M., Jovanović, Z.: Changes of Nitrogen Matters during the Ripening of Gorgonzola Type Cheese produced in Serbia, 5th IDF Symposium on cheese ripening, Bern, Switzerland, 2008a, Book of Abstracts, 116-117.
- Seratlić, S., Mačej, O., Jovanović, S., Jovanović, Z.: Mikroflora sireva sa plavozelenim plesnima. *Biotehnologija u stočarstvu*, 24 (2008b) 237-258.
- Tarakçi, Z.: The influence of helis (*Prangos* sp.) on characteristics of vacuum-packed Van herby cheese during ripening. *Milchwissenschaft*, 59 (2004) 619-623.
- Tarakçi, Z., Coşkun, H., Tunçturk, Y.: Some properties of fresh and ripened herby cheese. *Food Technol. Biotechnol.*, 42 (1) (2004) 47-50.
- Tarakçi, Z., Kucukoner, E.: Note: Effect of Different Cultures on Psycho-chemical and Sensory Properties of low-fat Herby Cheese. *Food Sci. Tech. Int.*, 12 (5) (2006) 423-428.
- Tarakçi, Z., Sagun, E., Durmaz, H.: The effect of mendi (*Chaerophyllum*) - on ripening of vacuum-packed herby cheese. *Int. J. Dairy Tech.*, 59 (1) (2006) 35-39.
- Temiz, H., Tarakçi, Z., Aykut, U., Turhan, S.: The fatty acid levels and physicochemical properties of herby brined cheese, a traditional Turkish cheese. *Int. J. Dairy Tech.*, 62 (2008) 56-62.
- Tunçturk, Y., Coskun, H.: the effect of production and ripening methods on some properties of the herby cheese, Otlı peynir. *Milchwissenschaft*, 57 (2002) 638-640.
- Tunçturk, Y., Coskun, H., Ghosh, B.C.: Nitrogen fractions in brine during ripening of herby cheese (Otlı peynir). *Indian J. Dairy Sci.*, 56 (2003) 208-212.
- Vučić, T., Mačej, O., Jovanović, S., Seratlić, S., Niketić, G.: Zlatarski sir - autohtona tehnologija i senzorne karakteristike. *Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi*, 19 (1-2) (2008) 97-101.
- <http://www.emmi-swissalp.ch/english/home-swissalp/>
- <http://www.jacquycange.be/>
- <http://www.lesfromagesdechezvous.be/>

SUMMARY

CHEESES WITH MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, PRODUCED IN EUROPE

Ognjen D. Mačej, Sanja V. Seratlić, Snežana T. Jovanović, Dragoslava Radin, Tanja R. Vučić

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Institute for Food Technology and Biochemistry

In the production of cheeses, the application of medicinal and aromatic herbs is reflected both in improving sensory characteristics, and increasing stability and shelf life of final products. Also, the final product gets new physiological properties, of the so-called functional food. The antimicrobial properties of aromatic and medical plants essential oils are well established against wide spectra of microbes including bacteria, viruses, yeasts and fungi. Cheeses with medicinal and aromatic herbs are traditionally produced in Turkey (mostly soft fresh cheese and white cheese in brine). However, there is a large assortment of this kind of cheeses that is produced throughout Europe, from the soft and semi-soft to semi-hard and hard cheeses. The main characteristic of all these cheeses is the use of medicinal and aromatic plants from the unique geographic area for each European country. There are numerous medical and aromatic plants used in cheese production. These include: mint, thyme, basil, parsley, sage, oregano, dill, pepper, cinnamon, cumin, ginger, rosemary, garlic, pepperoni, pepper, bay, mulberry, cloves, tarragon, fenugreek, celery, shallot, nettle, etc. Also, in many countries these cheeses are traditionally produced from cow, sheep and goat or mixed milk. In France, a country known for the production of many different cheese varieties, a large number of cheeses from goat milk is traditionally produced. Belgium is not far behind, where the large number of cheese varieties is produced as well as in the Netherlands and Germany.

Key words: cheeses with herbs • medicinal plants • aromatic herbs

JASMINA S. STOJILJKOVIĆ

Visoka škola primenjenih
strukovnih studija u Vranju

NAUČNI RAD

UDK: 637.02/.03:637.047:637.352

Tehnološke operacije pri proizvodnji belog mekog sira slede jedna za drugom i imaju zadatak da pretvore mleko u sasvim nov proizvod – sir. U poređenju sa mlekom, sir je sa značajno koncentrisanijim osnovnim hranljivim sastojcima, a u poređenju sa drugim belančevinskim prehrambenim proizvodima, sir ima i značajno veću hranljivu vrednost. U toku proizvodnje, u mleku pripremljenom za koagulaciju, broj bakterija mlečne kiseline pokazivao je izvesno smanjenje u odnosu na njihov broj u prijemnom mleku. To je ukazivalo da se sa pasterizacijom mleka smanjuje broj mikroorganizama. Tokom dalje proizvodnje, broj bakterija mlečne kiseline svoj maksimum je dostigao u fazi kalupljenja i soljenja, samopresovanja i presovanja. Kod zrenja sira u salamuri, broj bakterija mlečne kiseline počinje da se smanjuje. Najveći pad broja mikroorganizama se poklapa sa najvećim smanjenjem pH. Na kraju salamurenja broj bakterija mlečne kiseline se kreće u granicama od $2,4 \times 10^5$ – $5,8 \times 10^5$ /g sira. Ove bakterije su najznačajnije za formiranje konačnog ukusa, mirisa i arome sira.

Gljučne riječi: mleko • tehnološke operacije • bakterije mlečne kiseline • beli meki sir

UTICAJ TEHNOLOŠKIH OPERACIJA NA DINAMIKU BROJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U BELOM MEKOM SIRU

UVOD

Tehnološke operacije u proizvodnji belog mekog sira su dizajnirane tako da kontrolišu i usmeravaju uslove za razvoj poželjnih mikroorganizama koji transformišu mleko u kvalitetan krajnji proizvod. Sa koagulacijom mleka dobija se supstrat sastavljen od kazeina, masti i nekih rastvorljivih komponenti mleka. Ovaj supstrat sadrži mikroorganizme čiji enzimski sistemi, zajedno sa enzimima sirila u grušu, izazivaju transformaciju hemijskih komponenti. Biohemijske transformacije koje se odvijaju u toku zrenja sira unose nova svojstva u siru masu. Ako je sir u početku bio tvrd, kompaktno, bez svojstvenog mirisa i ukusa, zrenjem postaje proizvod sa prijatnom aromom i lako svarljiv.

Fox and Wallace (1997) navode da je primarna uloga bakterija mlečne kiseline iz starter kultura stvaranje mlečne kiseline u toku procesa fermentacije. Stvaranje mlečne kiseline ima nekoliko funkcija: pomaže aktivnosti sirila i smanjuje sadržinu vlage u sirnoj masi čime doprinosi izlučivanju surutke iz gruša posle podsirivanja mleka (Fox et al., 2000). Sa druge strane mlečnokiselinske bakterije doprinose zrenju sireva, jer su njihovi enzimi neophodni pri dobijanju sastojaka važnih za ukus. Ove bakterije mlečne kiseline mogu da se dodaju mleku na početku proizvodnje ili da budu prisutne kao prirodni kontaminanti mleka kao što je slučaj sa velikim brojem tradicionalnih sireva napravljenih od sirovog mleka. Bakterije mlečne kiseline tokom proizvodnje sireva mogu da dostignu brojnost od 10^8 /g - 10^9 /g sira (Beresford et al., 2001; Centeno et al., 1996). U pogledu optimalne temperature one mogu

da budu mezofilne i termofilne što zavisi od tehnologije proizvodnje sira.

U grupu tradicionalnih kultura koje se najčešće sreću u sirevima izrađenim od sirovog mleka, spadaju: *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii ssp. lactis*, *L. helveticum*, *L. plantarum*, *L. casei* (Cogan & Hill, 1993).

Prema Micevu i Bubalovu (1988), od presudnog značaja za proizvodnju sira je praćenje dinamike mlečnokiselinskih bakterija. Povećanjem kiselosti, u toku zrenja sira u salamuri dolazi do smanjenja broja bakterija mlečne kiseline.

MATERIJAL I METODI

Ispitivanja koja su predmet ovog rada su izvedena u Mlekari Han DOO Vladičin Han, u mikrobiološkoj laboratoriji. Beli meki salamureni sir je proizvod koji zauzima ključno mesto u proizvodnom programu Mlekare Han. Kao sirovina za izradu belog mekog sira koristi se kravlje mleko sa terena celog Pčinjskog regiona (Vladičin Han, Vranje, Surdulica, Bujanovac, Trgovište) u Republici Srbiji.

Ispitivanja u mlekari vršena su na tri posebna proizvodna procesa u proizvodnji belog mekog sira, a sprovedena u tri različita letnja meseca (julu, avgustu i septembru), sa mlekom letnje laktacije.

Za vreme proizvodnog procesa pri izradi belog mekog sira, probe za mikrobiološka ispitivanja bakterija mlečne kiseline uzete su iz sledećih faza:

1. Faza: priprema mleka za koagulaciju, koagulacija mleka, obrada gruša, samopresovanje i presovanje gruša. Probe su uzete prvog dana od:

Adresa autora:

Mr Jasmina Stojiljković, Visoka škola primenjenih
strukovnih studija u Vranju, Filipa Filipovića 20,
17500 Vranje
tel.: 017/416-814; 063/698-544
e-mail: jasminda_vranje@yahoo.com

- sirovog zbirnog mleka, mleka pred koagulaciju, surutke, gruš pred obradu i od gruš posle samopresovanja i presovanja.

2. Faza: kalupljenja i suvog soljenja, probe su uzete drugog dana od: - sira posle kalupljenja i soljenja.

3. Faza: zrenja sira u salamuri, probe su bile uzete prvog, desetog, dvadesetog, tridesetog i četrdesetog dana od salamurenja iz:

- sira.

Probe su uzete sterilno na sledeći način:

1. Probe mleka i surutke su uzete sterilnom pipetom od 10 ml.

2. Probe od gruš pre obrade, gruš posle samopresovanja i sira uzete su čeličnim nožem sa oštrim vrhom, steriliziranim flambiranjem.

Po uzimanju probe stavljanje su u sterilne staklene sudove.

Za ispitivanje bakterija mlečne kiseline korišćene su sledeće podloge: standardni laktoza agar (hranljiv agar sa 10% laktozom) i MRS (Man, Sharp and Rogosa) agar.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uzimajući u obzir ulogu bakterija mlečne kiseline u izradi sira, literaturni podaci pokazuju da je ova grupa bakterija najzastupljenija pri proizvodnji i zrenju sira (Caridi et al., 2003; Psoni et al., 2003; Hatzikamari et al., 1999; Fernandez del Pozo et al., 1988; Macedo et al., 1995). Kretanje broja bakterija mlečne kiseline tokom proizvodnje belog mekog sira dat je u tabeli 1.

Broj bakterija mlečne kiseline u sirovom mleku koje se koristilo za izradu belog mekog sira u „Mlekari Han“, bio je najveći u julu, zatim u avgustu, a najmanji u septembru. Da sirovo mleko sadrži veći broj bakterija mlečne kiseline, dokazuju i drugi autori koji su ispitivali druge vrste mleka kao što je kozije i ovčije (Xanthopoulos et al., 2000; Alonso – Calleja et al., 2002).

Termički tretirano kravlje mleko u momentu koagulacije za izradu belog mekog sira sadrži manji broj bakterija mlečne kiseline od sirovog termički netretiranog mleka. Najveći broj se zadržao u mleku za prvo ponavljanje u julu, zatim za drugo u avgustu i najzad za treće ponavljanje u septembru. Smanjenje broja bakterija mlečne kiseline u mleku posle termičkog tretmana nastupilo je usled dejstva visoke temperature. Temperatura pasterezacije smanjuje broj bakterija mlečne kiseline. Pasterizaciju preživljavaju i

loptaste i štapičaste bakterije mlečne kiseline, na šta ukazuju istraživanja raznih autora. Foster et al., (1961), navodi da posle pasterezacije mleka može da preživi *Streptococcus lactis*, zato što se ovaj mikroorganizam često sreće i ima ga posle pasterezacije mleka.

Tabela 1. BROJ BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U BELOM MEKOM SIRU OD POČETKA IZRADE DO KRAJA ZRENJA (u mL ili g probe)
Table 1. THE NUMBER OF LACTIC ACID BACTERIA IN WHITE SOFT CHEESE DURING THE CHEESE MAKING (in mL or g test)

PROBA	JUL	AVGUST	SEPTEMBAR
Sirovo mleko	$8,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
Mleko pre koagulacije	$7,8 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
Surutka	$2,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
Gruš pre obrade	$4,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
Gruš posle samopresovanja	$3,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
Sir posle kalupljenja i soljenja	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
Prvi dan salamurenja	$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$
10-ti dan salamurenja	$1,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
20-ti dan salamurenja	$8,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
30-ti dan salamurenja	$5,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$
45-ti dan salamurenja	$5,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$

Posle formiranja gruš, broj bakterija mlečne kiseline je i dalje visok zahvaljujući razmnožavanju mikroorganizama u njemu, i njihovom fizičkom zarobljavanju u gruš, posle odstranjivanja surutke od delića gruš (Stević, 1962; Tatini et al., 1971; Alonso – Calleja et al., 2002).

U poređenju sa surutkom, 91,48 - 93,69% bakterija mlečne kiseline ostaje u gruš. Ukoliko se napravi poređenje broja bakterija mlečne kiseline u surutki i gruš, zapaža se da se kod prvog ponavljanja u surutki nalazi 6,31%, a u gruš 93,69%, kod drugog, u surutki se nalazi 8,52%, a u gruš 91,48%, dok kod trećeg ponavljanja u surutki ima 7,56%, a u gruš 92,44%, odnosno veći procenat mikroorganizama se zadržava u gruš.

U fazi samopresovanja gruš u odnosu na gruš pre obrade, broj prisutnih bakterija mlečne kiseline je i dalje visok i gotovo je na istom nivou. U ovoj fazi izrade sira u odnosu na prethodnu, broj bakterija mlečne kiseline se povećao 1,17 puta kod prvog ponavljanja i 1,09 puta za drugo i treće ponavljanje. Manipulisanje grušom tokom njegovog sečenja i modeliranja isto tako može da utiče na povećanje broja mikroorganizama. Smanjenje vrednosti pH pri formiranju sirnog testa u odnosu na mleko, rezultat je povećanja broja bakterija mlečne kiseline, odnosno njihove metaboličke aktivnosti, pri čemu se kao krajnji rezultat razlaganja laktoze javlja mlečna kiselina (Alonso – Calleja et al., 2002).

U fazi kalupljenja i suvog soljenja, broj bakterija mlečne kiseline u odnosu na prethodnu fazu počinje da se smanjuje kod prva dva ponavljanja i to 1,85 i 1,7 puta, a kod trećeg ponavljanja povećava se 1,33 puta. Uzrok povećanja broja bakterija mlečne kiseline u fazi kalupljenja i suvog soljenja

u odnosu na prethodnu fazu samopresovanja može da bude dodatno zagađenje iskalupljenog sira. To se dešava pri manuelnoj manipulaciji zaposlenih nečistim rukama.

Smanjenje broja bakterija mlečne kiseline zapaža se i tokom zrenja sira u salamuri.

Prvog dana salamurenja belog mekog sira, broj bakterija mlečne kiseline u odnosu na početni broj u sirovom mleku smanjuje se do 2,75% kod prvog ponavljanja, 40,74% kod drugog ponavljanja i ostaje na istom nivou za treće ponavljanje.

U odnosu na kalupljenje i suvo soljenje, posle 24-časovnog salamurenja sira, u njemu ostaje 11,43% bakterija mlečne kiseline kod prvog ponavljanja, 55% kod drugog i 40,63% kod trećeg ponavljanja.

Desetog dana salamurenja – procenti zastupljenosti bakterija mlečne kiseline u sirnoj masi u odnosu na početni broj mikroorganizama, značajno se menjaju. U siru ostaje 1,26% bakterija kod prvog ponavljanja, 6,66% kod drugog i 16,15% kod trećeg ponavljanja.

U odnosu na fazu kalupljenja i suvog soljenja u siru desetog dana salamurenja, ostaje 5,24% bakterija mlečne kiseline kod prvog ponavljanja, 9% kod drugog ponavljanja i 6,56% bakterija mlečne kiseline kod trećeg ponavljanja.

Dvadesetog dana salamurenja, procenti zastupljenosti bakterija mlečne kiseline u odnosu na početni broj

sve više se smanjuju. Oni iznose: 1,02% za prvo ponavljanje, 1,07% za drugo i 10% za treće ponavljanje.

U odnosu na fazu kalupljenja i suvog soljenja, u siru je dvadesetog dana salamurenja ostalo 4,23% bakterija mlečne kiseline za prvo ponavljanje, 1,45% za drugo i 4,06% za treće ponavljanje. Tokom salamurenja broj bakterija mlečne kiseline i dalje se smanjuje. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Alonsa-Calleje (2002).

Tridesetog dana salamurenja za prva dva ponavljanja procenat zastupljenosti bakterija mlečne kiseline u ovoj fazi salamurenja dostiže najnižu vrednost i iznosi 0,62% i 0,77%, a za treće ponavljanje procenat zastupljenosti bakterija mlečne kiseline u odnosu na početni broj iznosi 6%.

U odnosu na fazu kalupljenja i suvog soljenja, u siru tridesetog dana salamurenja je ostalo 2,57% za prvo ponavljanje, 1,05% kod drugog i 2,44% kod trećeg ponavljanja. To se objašnjava time što se pH vrednost smanjuje u ovoj fazi salamurenja sira.

Najniži procenat zastupljenosti bakterija mlečne kiseline u odnosu na početni broj za treće ponavljanje javlja se četrdeset petog dana salamurenja sira i iznosi 2,62%. Kod prvog i drugog ponavljanja ti procenti iznose 0,66% i 0,88%.

U siru u odnosu na fazu kalupljenja i suvog soljenja ostaje 2,76% bakterija mlečne kiseline kod prvog ponavljanja, 1,2% bakterija mlečne kiseline kod drugog i 1,06% bakterija mlečne kiseline kod trećeg ponavljanja.

Ovi rezultati se poklapaju sa podacima Kirova i Čomakova (1965) i Rašića (1961), prema kojima broj bakterija mlečne kiseline kod belog salamurenog sira se smanjuje odmah posle njegovog potapanja u salamuru i to od 8,81% do 0,05 % u odnosu na početni broj, a odstupaju od podataka Addis et al., (2001). Oni su pratili dinamiku tehnološki važne mikroflore tokom zrenja kamambra (*Camembert*) i utvrdili da je broj bakterija mlečne kiseline zavisno od proizvođača iznosio od 10^7 do $10^9/g$ sira.

Kao rezultat osetljivosti laktokoka na više koncentracije soli (Núñez et al., 1985), kao i inhibitornog uticaja nižih vrednosti pH, njihova zastupljenost u siru se postepeno smanjuje tokom zrenja, a na njihovo mesto se javljaju laktobacili koji su nasuprot njima tolerantni na nisku pH (Núñez, 1978), visoke koncentracije soli (He-

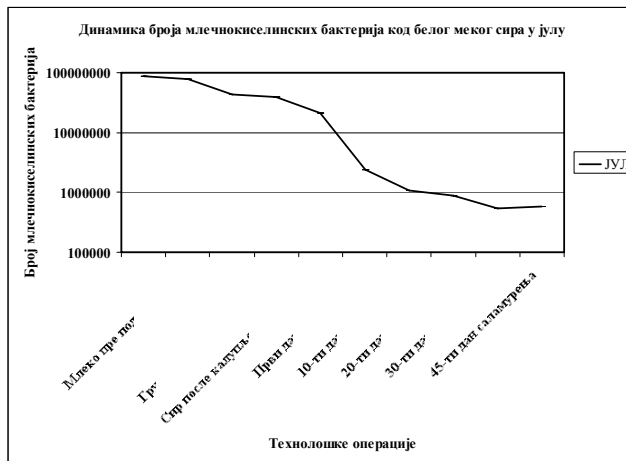
gazi, 1984) i dominiraju u završnim fazama zrenja sira.

Dinamika bakterija mlečne kiseline kod belog mekog sira u julu, avgustu i septembru je grafički prikazana na slikama 1, 2 i 3.

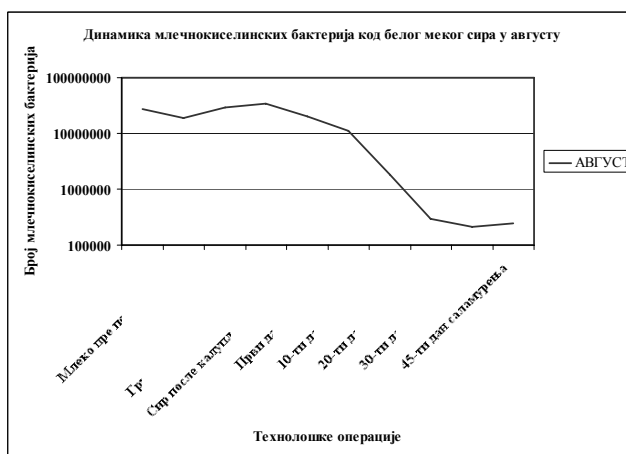
ZAKLJUČAK

Na osnovu svega do sada iznetog, mogu se dati sledeći zaključci:

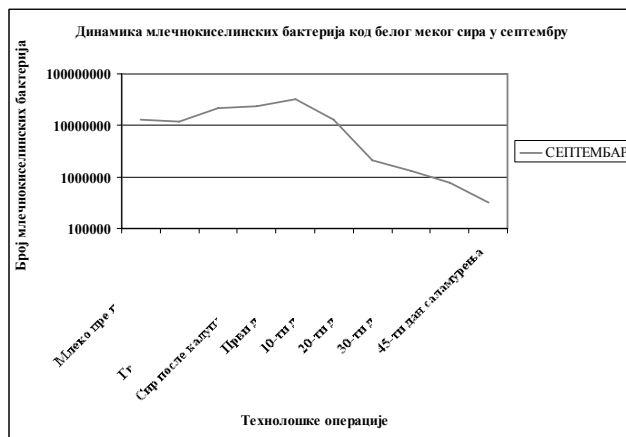
1. U sirovom mleku zabeležen je visok broj bakterija mlečne kiseline,



Slika 1. DINAMIKA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KOD BELOG MEKOG SIRA U JULU
Figure 1. DYNAMIC OF LACTIC ACID BACTERIA IN WHITE SOFT CHEESE ON JULY



Slika 2. DINAMIKA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KOD BELOG MEKOG SIRA U AVGUSTU
Figure 2. DYNAMIC OF LACTIC ACID BACTERIA IN WHITE SOFT CHEESE ON AVUGUST



Slika 3. DINAMIKA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KOD BELOG MEKOG SIRA U SEPTEMBRU
Figure 3. DYNAMIC OF LACTIC ACID BACTERIA IN WHITE SOFT CHEESE ON SEPTEMBAR

što ukazuje na nedovoljnu higijenu u proizvodnji sirovog mleka. Povećanjem higijenske ispravnosti sirovog mleka, bilo bi moguće približavanje do kriterijuma i standarda koji važe za zemlje Evropske unije. Osnovni preduslovi za poboljšanje higijene sirovog mleka su higijena pri muži, propisno hlađenje mleka posle muže i adekvatan transport sirovog mleka do mlakare u kojoj se prerađuje.

2. S obzirom na to da tehnologija proizvodnje belog mekog sira predviđa termički tretman sirovog mleka, normalno je smanjenje broja bakterija mlečne kiseline.

3. Pri podsirivanju mleka primećuje se značajnije povećanje broja bakterija mlečne kiseline u grušu, nego u surutki.

4. Presovanjem sirne mase uglavnom se istiskuje zaostala surutka, a u presovanom grušu i dalje se zadržava veći deo mikroflora.

5. Solenje sira je limitirajući faktor za razvoj mikroorganizama. S druge strane, tokom soljenja kao posledica nekog dopunskog zagađenja soli, broj bakterija može da se poveća. To se i dešavalo u ovom ispitivanju u fazi soljenja sira suvom solju i u fazi zrenja sira u salamuri.

6. Pri zrenju sira u salamuri broj bakterija mlečne kiseline drastično se smanjuje. Najveće smanjenje broja mikroorganizama poklapa se sa najvećim smanjenjem pH.

7. Bakterije mlečne kiseline su najznačajnije za ceo tok proizvodnje sira i od njihovog pozitivnog dejstva zavise karakteristike finalnog proizvoda, t.j. specifični ukus, miris, aroma i konzistencija.

8. Nužna je standardizacija procesa proizvodnje belog mekog sira za vreme svih tehnoloških operacija sa ciljem da domaće mleko i njegove prerađevine zauzmu mesto na trpezama ne samo naših, nego i svetskih metropola.

9. Tehnološke operacije pri proizvodnji belog mekog sira sa jedne strane utiču na fizičko-hemijske promene komponenti mleka, a sa druge utiču na razvoj i biohemijsko dejstvo bakterija mlečne kiseline. Međutim, i bakterije mlečne kiseline sa svojom biohemijskom aktivnošću utiču na fizičko-hemijske promene mleka, pa tako posredno deluju na same tehnološke operacije. Može da se zaključuje da postoji tesna povezanost između tehnoloških operacija i biohemijske aktivnosti bakterija mlečne kiseline u procesu transformacije mleka u sir. Ta povezanost je toliko velika da je osnovni cilj tehnoloških operacija da regulišu biohemijsku aktivnost ovih mikroorganizama u procesu proizvodnje belog mekog sira.

LITERATURA

- Addis, E., Fleet G. H., Cox, J. M., Kolak, D. and Leung, T.: The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69 (1-2) (2001) 25-36.
- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A. and Garsia López M. L.: Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 35 (2002) 222-232.
- Beresford, Tom P., Fitzsimons, A. Nora, Brennan, L. Noelle and Cogan, M. Tim.: Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11 (4-7) (2001) 259-274.
- Caridi, A., Micari Caparra, P., Cufari, A., Sarullo, V.: Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewe's cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13 (2003) 191-200.
- Centeno, J. A., Menendez, S., Rodríguez – Otero, J. L.: Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's – milk cheese (northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33 (2-3) (1996) 307 – 13.
- Cogan, M. T. and Hill, C.: Cheese starter cultures, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, eds. F. Fox, Chapman & Hall., London (1993) pp. 193 – 255.
- Fernandez del Pozo, B., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez – Marin, M. A. and Nuñez, M.: Changes in the microflora of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55 (1988) 449 – 455.
- Foster, M. E., Nelson, E. F., Speck, L. M., Doetsch, N. R. and Olson, C. J.: *Dairy microbiology*, Second printing, Prentice-Hall, Inc. Englewood cliffs, New Jersey, USA (1961).
- Fox, P. F. & Wallace, J. M.: Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Food Microbiology*, 45 (1997) 17 – 85.
- Fox, F. P., Guinee, P. T., Cogan, M. T., McSweeney, L. H. P.: *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland (2000).
- Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N.: Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87 (4) (1999) 595-601.
- Hegazi, F. Z.: The microbial flora of salted raw milk. *Systematic and Applied Microbiology*, 5 (1984) 527 – 533.
- Киров, Н., Чомаков, Х.: Микрофлора болгарской Брынзы. *Молочная промышленность*. Москва (1965).
- Macedo, A. C., Malcata, F. X. and Hogg, T. A.: Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *Journal of Applied Bacteriology*, 79 (1995) 1-11.
- Мицев, Н., Бубалов, М.: Земјоделска микробиологија - специјален дел. Основен учебник. Универзитет „Кирил и Методиј“, Скопје (1988).
- Núñez, M.: Microflora of Cabrales cheese: Changes during maturation. *Journal of Dairy Research* 45, (1978) 501 – 508.
- Núñez, M., Gaya, P. and Medina, M.: Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of Enterobacteriaceae in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science*, 68 (1985) 794-800.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.: Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20 (2003) 575 - 582.
- Rašić, J.: Mikroflora belog sira, dinamika razvića i njena biohemijska aktivnost u procesu zrenja sira. *Disertacija*, Beograd (1961).
- Stević, B.: Tehnološka mikrobiologija stočnih proizvoda i ishrane stoke. *Naučna knjiga*, Beograd, (1962).
- Stojiljković, J.: Dinamika broja tehnološki značajnih mikroorganizama kod belog mekog sira, *Magistarska teza*, Univerzitet „Sv. Kiril i Metodij“ Skopje – Fakultet poljoprivrednih nauka i hrane (2007).
- Tatini, S. R., Jezeski, J. J., Moris, H. A., Olson, J. C. and Gasman, E. P.: Production of enterotoxin A in Cheddar and Colby cheese. *Journal of Dairy Science*, 54 (1971) 815-825.
- Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tsakalidou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E.: Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2000) 1056-1064.

SUMMARY**INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL OPERATIONS ON THE NUMBER OF LACTIC ACID BACTERIA IN WHITE SOFT CHEESE MAKING FROM MILK OF SUMMER LACTATION**

Jasmina S. Stojiljković

College of Applied Studies, Vranje

The technological operations during cheese making, have a task to converse milk into a completely new product-cheese. In comparison with milk, cheese has more concentrated basic nutritive ingredients, but compared to other food protein products, cheese has better nutritive value. During cheese making, the number of lactic acid bacteria in the milk prepared to be used in the process was decreasing in comparison to their number in raw milk, which proves that the total number of microorganisms is significantly reduces after pasteurization. During further production, the number of lactic acid bacteria reaches its maximum in phases of pressing or self-pressing, forming and salting. The number of lactic acid bacteria decreases during cheese ripening in brine. The greatest decrease of microorganisms number correspond with highest decrease of the pH value. At the end of salting, the number of lactic acid bacteria varies in the range from $2,4 \times 10^5$ - $5,8 \times 10^5$ /g. These bacteria have the most important effect on taste and aroma of the final product.

Key words: milk • technological operations • lactic acid bacteria • white brined cheese

UPUTSTVO AUTORIMA

Časopis **PREHRAMBENA INDUSTRIJA – MLEKO I MLEČNI PRIZVODI** objavljuje pregledne naučne i stručne radove, prikaze iz industrijske prakse, prikaze savremene tehnološke opreme, zatim knjiga i drugih stručnih izdanja, privredne vesti i tehnološke novosti.

Rad treba da je izložen jasno i da sadrži sledeće delove: Izvod (do 200 reči), Ključne reči, Uvod, Materijal i metodi, Rezultati i diskusija, Zaključak i Izvod na engleskom jeziku (Summary), do 250 reči.

Na prvoj strani dati predlog autora za kategoriju rada (naučni ili stručni) i naslov (koji ne treba da sadrži simbole, formule i skraćenice). Ispod naslova rada staviti ime, srednje slovo i prezime svakog autora, bez titula, zvanja i funkcija. Ispod imena autora navesti u najkraćem obliku nazive i mesto institucija u kojima rade autori. Pri kraju prve strane navesti punu adresu jednog autora, zvanje, e-mail i telefon.

Preporučuje se da celokupan rukopis, uključujući priloge, ne bude veći od 15 strana.

Pridrživati se Međunarodnog sistema jedinica (SI), Zakona o mernim jedinicama i merilima, i uobičajene hemijske nomenklature.

Spisak literature daje se po abecednom redu i prilaže na odvojenom listu. Skraćene nazive časopisa treba navoditi prema Međunarodnom kodeksu za skraćivanje naslova periodičnih publikacija.

Reference se navode na sledeći način:

ČASOPISI: Burity, F.C.A., da Rocha, J.S. and Saad, S.M.I.: Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. International Dairy Journal, 15 (2005) 1279-1288.

KNJIGE: Tamime, A.Y. and Robinson, R.K.: Yoghurt Science and Technology, Woodhead publishing limited, Cambridge, England, p. 619 (2004).

POGLAVLJE U KNJIZI: Kindstedt, P., Carić, M., Milanović, S.: Pasta Filata Cheeses. Chapter 11, in: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd ed.: Major Cheese Groups-vol. 2, eds. P.F. Fox et al., Elsevier Science Ltd., London (2004) pp. 251-277.

ZBORNIK RADOVA: Fox, P.F., Kelly, A.L.: Milk proteins: Technological aspects, International Dairy Symposium "Recent Developments In Dairy Science and Technology", Isparta-Turkey, 24-28 May 2004, Proceedings, p.17.

TEZA (Ph.D., M.Sc.): prezime, inicijali imena.: naslov doktorske disertacije ili magistarske teze, naziv univerziteta, godina.

Pri pisanju literature u **tekstu** navesti prezime autora, bez inicijala i godinu publikacije. Primeri:

1. Steventon, Donald and Gladden (1994) izučavali su efekte... ili
2. Slične rezultate publikovali su i drugi autori (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990).
3. Ako se navodi više rezultata istog autora u isto vreme, poredati datume po redu. Koristiti slova posle godine da bi se naznačilo više publikacija od istog autora iste godine:

"Više studija (Johnson, 1988, 1990a, 1990b, Johnson et al.1995a, 1995b) pokazalo je isti rezultat."

Na posebnom listu, na kraju rukopisa, dati izvod na engleskom jeziku (SUMMARY) do 250 reči koji treba da sadrži: naslov rada, ime i prezime svakog autora, naziv institucije u kojoj autori rade (na engleskom), važnije pojmove (Key words) na engleskom jeziku.

Sve nazive **tabela** i **slika** i upise u njima u tekstu napisati i **na engleskom jeziku**.

Tehnički detalji u vezi sa pisanjem radova za časopis PREHRAMBENA INDUSTRIJA:

Radove pisati u Wordu. Format strane je **A4** sa marginama od **25 mm**. Koristiti font **Times New Roman** veličine **12 pt**, a Izvod na srpskom i engleskom veličine **10 pt**. Naslove pisati velikim slovima veličine **12 pt (bold)**, a podnaslove malim slovima veličine **12 pt (bold)**. Reči ne rastavljati. Ilustracije i tabele postaviti na svoja mesta u tekstu. Ilustracije treba da su u crno-belom tehnici i treba ih dati još i u posebnom **grafičkom fajlu (ne u Wordu)**. Ako je vektorska grafika u pitanju, u obzir dolaze formati ***.cdr** i ***.wmf**, a za bitmapiranu grafiku preporučuju se formati ***.bpm** ili ***.tif** u rezoluciji od najmanje **300 dpi**. Kolor ili crno-bele fotografije, ukoliko ih ima u radu, treba dostaviti u ***.jpg** formatu. Takođe, sve grafikone koji su urađeni pomoću Microsoft Office Excel programa dostaviti u originalnom excel formatu. Ako se u ilustracijama koriste neki nestandardni fontovi treba ih **pretvoriti u krive**.

Radove slati na CD–u i jednu 'hard' kopiju na adresu: Prof. dr Spasenija Milanović, glavni urednik (Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi), Tehnološki fakultet, 21000 Novi Sad, Bul. cara Lazara 1 i na e–mail adresu: mlekotf@uns.ac.rs.

Svi radovi podležu recenziji. Konačnu odluku o kategorizaciji i štampanju rada donosi Uredništvo časopisa.