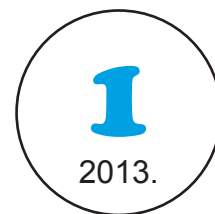


Prehrambena industrija

ČASOPIS ZA PROIZVODNJU, TEHNOLOGIJU, BIOINŽENJERSTVO I MARKETING

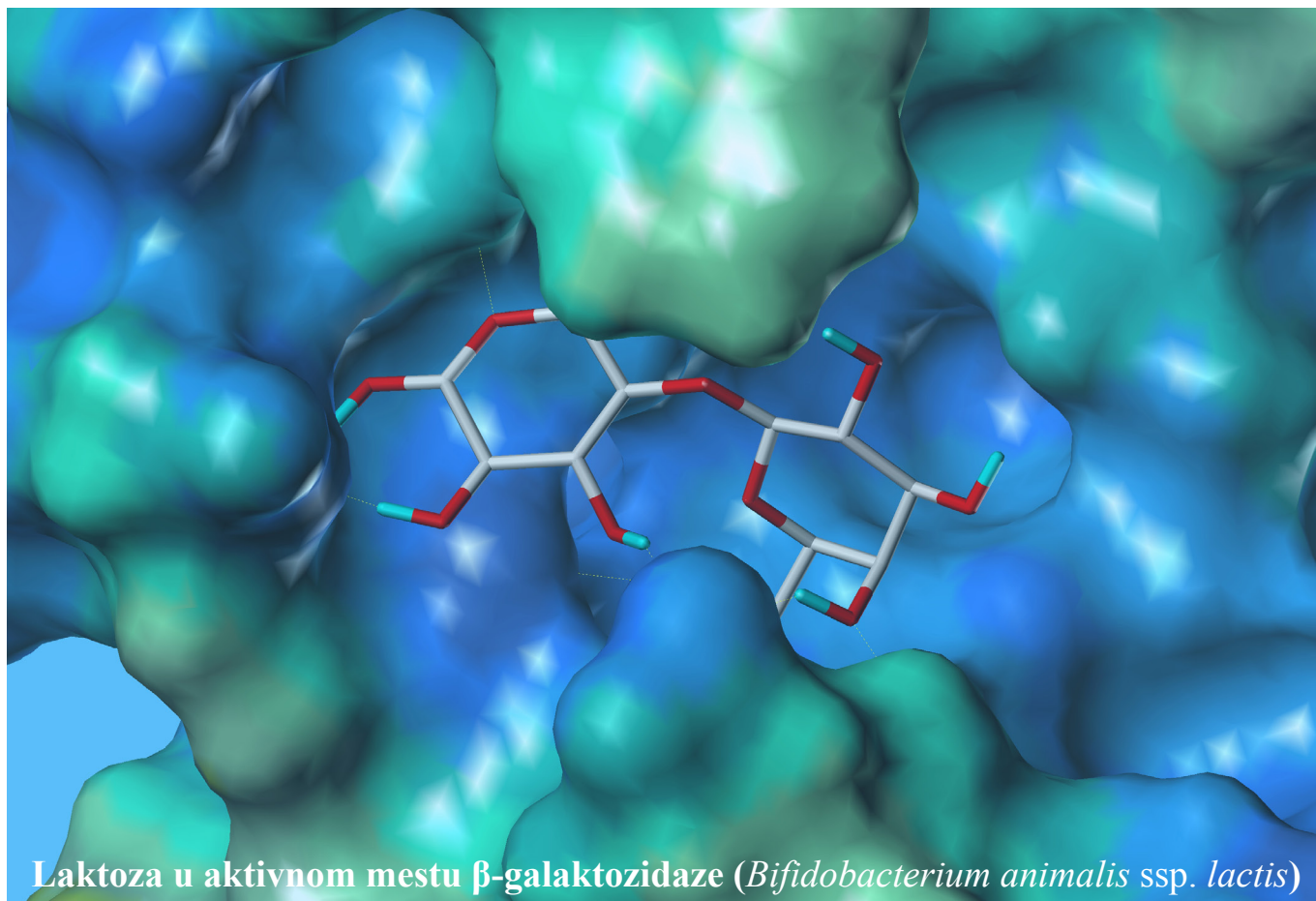
Food industry



VOL. 24

SAVEZ HEMIJSKIH INŽENJERA SRBIJE
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

Mleko i mlečni proizvodi Milk and dairy products



Prehrambena industrija

MLEKO I MLEČNI PROIZVODI

ČASOPIS SAVEZA HEMIJSKIH INŽENJERA SRBIJE
I TEHNOLOŠKOG FAKULTETA U NOVOM SADU

VOL. 24

BEOGRAD, 2013.

BROJ 1

Izdavači:

SAVEZ HEMIJSKIH INŽENJERA SRBIJE (SHI)
UNIVERZITET U NOVOM SADU, TEHNOLOŠKI
FAKULTET NOVI SAD (TF NS)

Za izdavača:

Dr Tatijana Duduković, sekretar SHI
Prof. dr Zoltan Zavargo, dekan TF NS

Glavni urednik:

Prof. dr Spasenija Milanović, Univerzitet u Novom
Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija

Uredništvo:

Dr Marijana Carić, prof. emeritus, Univerzitet u
Novom Sadu, Srbija
Prof. dr Dragojlo Obradović, Univerzitet u
Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Srbija
Doc. dr Mirela Ilić, Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija
Prof. dr Ljerka Gregurek, Probiotik d.o.o., Zagreb,
Hrvatska
Prof. dr Zdenko Puhanić, ETH Zurich, Switzerland
Dr Adnan Tamime, Dairy Science and Technology
Consultant Ayr, UK
Prof. dr Gyula Vatai, Corvinus University of
Budapest, Faculty of Food Science, Hungary

Izdavački savet:

Mr Živanko Radovančević, Mlekoprodukt AD,
Zrenjanin, Srbija
Prof. dr Spasenija Milanović, Univerzitet u Novom
Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija
Dr Marijana Carić, prof. emeritus, Univerzitet u
Novom Sadu
Doc. dr Mirela Ilić, Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija
Dipl.inž. Dragan Šašić, AD Mlekara, Subotica,
Srbija
Dipl.inž. Nataša Tucović, AD Imlek, Srbija
Dipl.inž. Zoran Đerić, Farmakom MB, AD Mlekara
Šabac, Srbija
Dipl.inž. Mara Pokrajac, Somboled d.o.o., Sombor,
Srbija
Mr Jelisaveta Raić, MTC-SO d.o.o., Sombor, Srbija

Publikovanje časopisa finansijski je pomoglo:

Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja
Republike Srbije

Uredništvo:

Tehnološki fakultet
21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Tel.: +381 21 485 3712
Fax: +381 21 450 413

Pretplata:

Za čitaoce u SRB 300 RSD
Za inostranstvo 30 Eura
Žiro račun: 840-1647666-56

Lektor:

Mr Jelena Jerković

Priprema i štampa:

Futura d.o.o., Petrovaradin
Telefon: 021/6431 602
Faks: 021/6431 815

Tiraž: 250 primeraka

SADRŽAJ

R. Doder, V. Vukić, D. Hrnjez, S. Milanović, M. Ilić Zdravstveni aspekti primene probiotika	3
D. Ilić Udovičić, S. Milanović, M. Ilić, A. Mandić, D. Hrnjez, V. Vukić Kinetika hidrolize laktoze u permeatu mleka	9
A. Nedeljković, J. Miočinović, M. Radovanović, P. Puđa Mogućnosti primene Raman spektroskopije u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka	13
J. Vitas, R. Malbaša, E. Lončar, S. Milanović, S. Kravić, I. Suturović Antioksidativna aktivnost i sadržaj mononezasićenih masnih kiselina u fermentisanim mlečnim proizvodima dobijenim pomoću kombuhe	19
S. Milanović, M. Ilić, M. Ranogajec, D. Hrnjez, V. Vukić, K. Kanurić Uticaj starter kulture na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda tokom skladištenja	23
M. Stijepić, S. Milanović, J. Glušac, D. Đurđević-Milošević Primjena različitih dodataka u proizvodnji fermentisanih mliječnih napitaka	29
V. Madjoska, S. Srbinovska, S. Sterjovski Uticaj proteina surutke na senzorne osobine jogurta	37
S. Sterjovski, S. Srbinovska, V. Madjoska Senzorna analiza jogurta sa tržišta Makedonije	43
K. Tonković, Lj. Gregurek, Ž. Kršev Šurić Primjena procesa ultrafiltracije u proizvodnji polutvrđog sira tipa Trapist – primjer iz prakse	47
H. Keran, A. Odabašić, S. Čatić, I. Šestan, A. Bratovčić, E. Obralić, E. Omeragić Određivanje esencijalnih elemenata u mlijeku primjenom voltametrijske tehnike	51
S. Markov, N. Klisara, D. Cvetković, A. Velićanski Rasprostranjenost <i>Listeria monocytogenes</i> u svježim sirevima na tržištu Novog Sada	55

Food industry

MILK AND DAIRY PRODUCTS

JOURNAL OF ASSOCIATION OF CHEMICAL ENGINEERS OF SERBIA
AND FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD

VOL. 24

BEOGRAD, 2013.

No 1

Publishers:

ASSOCIATION OF CHEMICAL ENGINEERS OF
SERBIA (AChE)
FACULTY OF TECHNOLOGY UNIVERSITY OF
NOVI SAD (FoTNS)

For Publisher:

Dr Tatjana Duduković, Secretary of AChE
Prof. Dr. Zoltan Zavargo, Dean of FoTNS

Editor in Chief:

Prof. Dr. Spasenija Milanović, University of Novi
Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia

Editorial Board:

Dr. Marijana Carić, Prof. Emeritus, University of
Novi Sad, Serbia
Prof. Dr. Dragojlo Obradović, University of
Belgrade, Faculty of Agriculture, Serbia
Assist. Prof. Dr. Mirela Ilić, University of Novi
Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia
Prof. Dr. Ljerka Gregurek, Probiotik d.o.o., Zagreb,
Croatia
Prof. Dr. Zdenko Puhani, ETH Zurich, Switzerland
Dr. Adnan Tamime, Dairy Science and Technology
Consultant Ayr, UK
Prof. Dr. Gyula Vatai, Corvinus University of
Budapest, Faculty of Food Science, Hungary

Advisory Board:

M.Sc. Živanko Radovančević, Mlekoprodukt AD,
Zrenjanin, Serbia
Prof. Dr. Spasenija Milanović, University of Novi
Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia
Dr. Marijana Carić, Prof. Emeritus, University of
Novi Sad, Serbia
Assist. Prof. Dr. Mirela Ilić, University of Novi
Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia
B.Sc. Dragan Šašić, AD Mlekara, Subotica, Serbia
B.Sc. Nataša Tucović, AD Imlek, Serbia
B.Sc. Zoran Đerić, Farmakom MB, AD Mlekara
Šabac, Serbia
B.Sc. Mara Pokrajac, Somboled d.o.o., Sombor,
Serbia
M.Sc. Jelisaвета Raič, MTC - SO d.o.o., Sombor,
Serbia

The journal is financially supported by:

Ministry of Education, Science and Technological
Development, Republic of Serbia

Editorial:

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

Subscription:

300 RSD per issue or 30 Euro
Bank account: 840-1647666-56

Text proof reader:

M.Sc. Jelena Jerković

Prepress & printed by

Futura d.o.o., Petrovaradin
Phone: +381 21 6431 602
Fax: +381 21 6431 815

Copies: 250

CONTENTS

R. Doder, V. Vukić, D. Hrnjez, S. Milanović, M. Ilić Health benefits of probiotics application	3
D. Ilić Udovičić, S. Milanović, M. Ilić, A. Mandić, D. Hrnjez, V. Vukić The kinetics of lactose hydrolysis in milk permeate	9
A. Nedeljković, J. Miočinović, M. Radovanović, P. Pudja Application possibilities of Raman spectroscopy in the investigation of milk and dairy products	13
J. Vitas, R. Malbaša, E. Lončar, S. Milanović, S. Kravić, I. Suturović Antioxidant activity and monounsaturated fatty acids content of kombucha fermented milk products	19
S. Milanović, M. Ilić, M. Ranogajec, D. Hrnjez, V. Vukić, K. Kanurić The influence of a selected starter culture on the quality of fermented dairy beverages during storage	23
M. Stijepić, S. Milanović, J. Glušac, D. Đurđević-Milošević The application of different ingredients in the production of fermented dairy beverages	29
V. Madjoska, S. Srbinovska, S. Sterjovski The influence of whey proteins on the sensory properties of yoghurt	37
S. Sterjovski, S. Srbinovska, V. Madjoska Sensory analysis of yoghurt represented on the Macedonian market	43
K. Tonković, Lj. Gregurek, Ž. Kršev Šurić The application of ultrafiltration process in the production of semi-hard Trappist cheese type – case study	47
H. Keran, A. Odabašić, S. Čatić, I. Šestan, A. Bratovčić, E. Obralić, E. Omeragić Essential elements content determination in milk by applying the voltammetry method	51
S. Markov, N. Klisara, D. Cvetković, A. Velićanski Distribution of <i>Listeria monocytogenes</i> in fresh cheeses at the market of Novi Sad	55

¹ RADOSLAVA Z. DODER
² VLADIMIR R. VUKIĆ
² DAJANA V. HRNJEZ
² SPASENIJA D. MILANOVIĆ
² MIRELA D. ILIČIĆ

¹ University of Novi Sad, Faculty of Medicine; Clinic for Infectious Disease, Clinical Centre of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

² University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia

REVIEW PAPER

UDK: 637.146:579.86:615.24

Among variety of functional products such as functional foods, dietary supplements and nutraceuticals, probiotics and prebiotics have carved their own special place because of their health promoting properties. They have been intensively researched over the past twenty years. Probiotics are widely used in fermented dairy products industry, providing suitable technological properties of the final products. The aim of this research was to present the advantages of probiotics application in fermented dairy technology and their impact on human health. Certain probiotics appear to reduce the duration of acute infectious diarrhea, particularly for diarrhea caused by rotavirus. Probiotics application should be investigated more widely depending on health and special categories of patients.

Key words: fermented dairy products • probiotics • clinical indications • treatment and prevention

HEALTH BENEFITS OF PROBIOTICS APPLICATION

INTRODUCTION

Nowadays, new food products, known as functional food, have the potential to improve human health and also reduce the risk of disease. Functional food is positioned above the traditional food. A product is considered functional food if in addition to the nutritional value it contains components that have a positive effect on health, physical and mental condition of the human body. The most famous examples of functional foods are fermented milk products, especially those containing probiotic bacteria and prebiotics. Fermented dairy products contain a number of micronutritive components that, either individually or in combination with other such components, may influence the maintenance or even improvement of human health (Esriche et al. 1999, Irygoyen et al. 2007, Hannon et al. 2007). The aim of this research was to present the advantages of probiotics application in fermented dairy technology and their impact on human health.

PROBIOTIC – CHARACTERISTICS AND ROLE IN FERMENTED DAIRY TECHNOLOGY

The two most important genera in the probiotic field are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, but some others contain species of interest, e.g., *Pedococcus*, *Enterococcus*, and *Lactococcus*. *Lactobacilli* are Gram-positive bacteria, unable to sporulate, occurring as rods or cocco-bacilli. The most abundant probiotic species is *Lactobacillus acidophilus*. *Bifidobacteria* are Gram-positive rods, which can sometimes be branched, a characteristic

which gives the name to the genus. *Bifidobacteria* do not form spores, are nonmotile, and anaerobic. *Bifidobacterial* strains exhibiting probiotic properties belong to the species *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, and *Bifidobacterium longum*, which are not related from a phylogenetic standpoint.

For selection, preferably the microbes should have GRAS (Generally Regarded As Safe) status, have a long history of safe use in foods, be non-pathogenic, and acid and bile tolerant (Morgensen et al., 2002). Probiotics are described as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2001). More or less similar definitions are also available (Sanders, 1999, Guarner, 2005, Huis Int' Veld, 1994) however, the above definition points to the most important properties of a probiotic product. The first property is that a probiotic product should contain live microorganisms, and second, the live microorganisms should be provided in a proper amount to exert their health benefits. But, there is no general consensus as to whether probiotics should be viable in all cases to exert a health benefit, with some studies demonstrating that non-viable probiotic bacteria can have a beneficial effect on the host (Ouwehand and Salminen, 1998, Salminen et al. 1999).

Following ingestion, probiotics pass through the stomach before they reach the small intestine (figure 1). The acidity of the stomach is known to fluctuate, from pH 1.5 to 6.0 after food intake (Waterman and Small, 1998). In vitro methods have been developed

Author address:

Prof. Dr. Radoslava Doder, University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Clinic for Infectious Disease, Clinical Centre of Vojvodina, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
 E-mail: radoslavadoder@yahoo.com

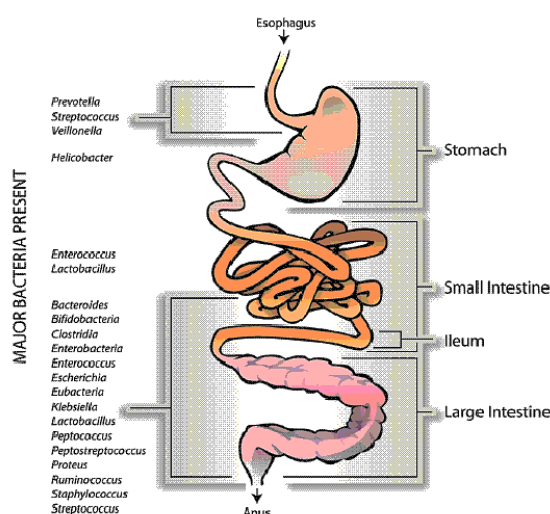


Figure 1. DISTRIBUTION OF NONPATHOGENIC MICROORGANISMS IN HEALTHY HUMANS (www.foodhaccp.com)

Slika 1. DISTRIBUCIJA NEPATOGENIH MIKROORGANIZAMA KOD ZDRAVIH LJUDI (www.foodhaccp.com)

to select for strains that can withstand the extreme conditions in the stomach. In addition to overcoming the stresses encountered in the stomach and small intestine, adherence to epithelial cells is considered a desirable probiotic trait (Guarner and Schaafsma, 1998). The preparation of the milk for yoghurt production varies by two main parameters: solids level as well as the heating/homogenization process. Typically, the milk blend used for yoghurt manufacture will have between 10 and 15% nonfat milk solids, be heated between 80 and 95°C for 1-30 min, and homogenized at 50-70°C at pressures of 100-200 kg/cm² (Tamime and Robinson, 1985). Parameters that affect the growth of lactic cultures are presented in table 1. In many cases, growth of lactic starter cultures is better in heated milks (Mortazavian *et al.*, 2006) because antibacterial components are destroyed, oxygen is removed and a lower redox level is reached, limited proteolysis occurs and formic acid is produced. There is lack of literature data on the effect of milk heating on the growth of probiotic bacteria, but it can be hypothesized that trends would be similar to those observed for starter cultures. When the growth of yoghurt cultures was examined on milks heated at 85°C for 15 min or at 95°C for 5 min, the streptococci preferred the lesser-heated milk, while lactobacilli developed much better in milk previously heated to 95°C for 5 min (Kurultay *et al.*, 2006). Lowering of milk water activity (a_w) with sugar favours

the cocci (Larsen and Anon, 1989, Shah and Ravula, 2000). Unfortunately the effect of milk solids on the ratios of probiotic bacteria in yoghurt cultures are not researched well. When sugar is added to the blend, *L. acidophilus* and bifidobacteria had 1 log reductions in populations in the yoghurts with 12% sucrose, as compared to yoghurts supplemented with 8% (Shah and Ravula, 2000).

During the manufacture of yoghurt, the heat-treated milk is cooled to the incubation temperature of the starter culture. In general, the milk is fermented at 40-45°C, that is, the optimum

growth condition for the mixed culture - the short incubation method. However, the longer incubation method, (i.e. overnight) can be used and the incubation conditions are 30°C for around 16±18 h, or until the desired acidity is reached (Hrabova and Hylmar, 1987, Merlo, 2000, Rodgers, 2001). At a lower incubation temperature, the casein particles increase in size because of a reduction in hydrophobic interactions which, in turn, leads to an increased contact area between the casein particles (Lee and Lucey, 2003). A lower incubation temperature is more favourable, e.g. 38°C in the case of using probiotic cultures.

Metabolic activity of starter cultures causes numerous changes during the milk fermentation. Lactose content decreases in average up to 20-30%, by transforming to lactic acid. The lactic acid content in mild acid yoghurt is around 0.85-0.95% and 0.95-1.2% in more acidic yoghurt. Enzymes of lactic acid bacteria hydrolyze milk protein and induce better digestibility of casein

In general, dairy starter cultures metabolise carbohydrate (i.e. lactose as the main sugar present in milk) either through the homo- or heterofermentative metabolic pathways. Probiotic bacteria like *Lactobacillus acidophilus* transform lactose homofermentatively, while *Bifidobacterium* spp. ferments the same sugar heterofermentatively.

Table 1. PARAMETERS WHICH AFFECT THE GROWTH OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT PRODUCTION (Tamime and Robinson, 2009)

Tabela 1. PARAMETRI KOJI UTIČU NA RAST PROBIOTSKIH BAKTERIJA TOKOM PROIZVODNJE JOGURTA (Tamime i Robinson, 2009)

MILK BLAND	FERMENTATION	STORAGE
- Animal source - Pre-processing storage time of raw milk - Non-fat solids - Fat content - Growth supplements - Sugar level - Flavours and fruits - Preservatives - Heating parameters - Redox level	- Compatible starter - Form of starter or probiotic (liquid, DVI) - If dried DVI, rehydration parameters (solids, temperature, time) - Inoculation level of starter or probiotic (CFU/ml) - Moment of inoculation of probiotic - Fermentation temperature - Fermentation time	- pH (plain yoghurt and after fruit addition) - Moment of inoculation of probiotic <i>L. bulgaricus</i> content and activity - Redox level. Additional of antioxidants - Packaging, particularly with respect to oxygen permeability - Encapsulation

CLINICAL INDICATIONS OF PROBIOTICS

Suggested mechanisms for the effects of probiotics on the gastrointestinal microbiota in relation to the prevention and treatment of diarrhea include direct effects, such as reduction of intestinal pH, production of organic acids and gut protective metabolites, and binding and metabolism of toxic metabolites. There is growing evidence that the host's systemic and mucosal immune system can be modulated by bacteria in the gut. Mechanisms may include modulation of the microbiota itself, improved barrier function with consequent reduction in immune exposure to microbiota and direct effects of bacteria on different epithelial and immune cell types (figure 2).

Hibberd P. (2009), reported 38 studies of probiotic influences on infectious diarrhea were analyzed. In 17 studies (45%), the probiotic tested was *Lactobacillus* GG (also known as LGG, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus case* GG), but the dose and duration of even this one probiotic varied across the studies. Twelve of the 17 *Lactobacillus* GG studies showed benefit of the probiotic on diarrhea (mostly duration of diarrhea), while five did not. The *Saccharomyces* studies also had variations in definitions of diarrhea at study entry and exit, as well as dose and duration of administration of the probiotic. All but one of the *Saccharomyces* studies reported benefit of the probiotic (Canani et al., 2007).

Although rotavirus diarrhea was the most commonly studied pathogen in the 38 studies, probiotics did not always reduce the duration of rotaviral diarrhea. There are three small studies of treatment of infectious diarrhea in adults, combination product was not effective. These studies have the same methodological issues as those raised for the pediatric studies above.

In fourteen studies the authors stated that there were no adverse events in the probiotic or comparison groups and in three studies of various probiotic and prebiotic combinations, adverse events were similar in the various study groups.

The review reported by Allen et al., (2004) concluded that probiotics appear to be a useful adjunct to rehydration therapy for both adults and children, but that more research is needed to address particular regimens for specific patient populations.

Antibiotics can cause diarrhea in 5-25% of individuals who take them but its occurrence is unpredictable. Diarrhea due to antibiotics is called antibiotic-associated diarrhea (AAD). The most severe form of AAD is caused by overgrowth of *Clostridium difficile* which can cause severe diarrhea, colitis, pseudomembranous colitis, or even fatal toxic mega colon. Rates of diarrhea vary with the specific antibiotic as well as with the individual susceptibility.

Risk factors for antibiotic-associated diarrhea (AAD) include broad spectrum antibiotics, especially ampicillin or amoxicillin, cephalosporins, and clindamycin, although other antibiotics may be involved (McFarland, 1995). AAD results in longer hospital stays (8 days on an average), higher cost of care (2,000-4,000 USD), a fivefold increase in other nosocomial infections and a threefold increase in mortality (0.7-38%)(McFarland, 1998).

The pathophysiology is not completely understood, but changes in faecal flora may result in altered carbohydrate metabolism of undigested carbohydrates with an osmotic diarrhea. The faecal flora normally ferment unabsorbed carbohydrates and produce short chain fatty acids. A change in the faecal flora could alter this faecal fermentation, resulting in changes in pH as well as changes in carbohydrate by-products which could cause an osmotic diarrhea (Clausen et al., 1991). Other possible mechanisms are reduced anaerobic flora or overgrowth of potential pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* or *Candida* (Surawicz, 2005).

Antibiotics have a major effect on the gastrointestinal bacterial flora. The normal flora consists of over 500 distinct species of bacteria, most of which are anaerobic. Various antibiotics alter the flora in different ways; some suppress the anaerobic flora, other alters the aerobic flora (Surawicz, 2005). Thus, it makes sense that probiotics could have a role in either preventing this disruption or normalizing any effects. *L. rhamnosus* GG and the yeast *Saccharomyces boulardii* (*Saccharomyces cerevisiae*) are proven to be effective in prevention of AAD.

L. rhamnosus GG is a strain identified by Gorbach and Golden (1987). It is stable in acid and bile and also produces a bacteriocin. Bacteriocins are peptides or polypeptides that are produced by some lactic acid bacteria and have antibacterial activity against

some microorganisms. The prevention of AAD by *L. rhamnosus* GG has been shown to be effective in many trials (including several in children) as compared to placebo. However, a later randomized controlled trial did not show efficacy. Three studies of *L. rhamnosus* GG in children showed decreased rates of AAD – a total of 388 children were studied (Arvola et al., 1999; Szajewska et al., 2001).

Several studies have been conducted in adults with *L. rhamnosus* GG; in controls, diarrhea rates were 15-33% as compared to 5-7% for treated patients ($p < 0.05$). In a study of adults receiving erythromycin, those given *L. rhamnosus* GG had less AAD (Siitonen et al., 1990). However, in a large study of 267 hospitalized adults, diarrhea rates were similar, 30% with controls and 29% with *L. rhamnosus* GG (Thomas et al., 2001).

Fermented milk containing *L. acidophilus* and *L. casei* was tested in hospitalized patients in Montreal. AAD occurred in 44 (15.9%) in the probiotic group as compared to 16 out of 45 (35.6%) in the control group. Hospitalization was two days shorter in the probiotic group (Beausoleil et al., 2007). A probiotic combination of *L. casei*, *L. bulgaricus*, and *S. thermophilus* was tested in a randomized controlled trial versus placebo in a study of 136 patients in a hospital receiving antibiotics. Seven out of fifty seven (12%) of the probiotic group developed diarrhea as compared to 19 out of 56 (34%) on placebo (Hickson et al., 2007).

In a study of ten volunteers given clindamycin, an antibiotic that can cause diarrhea, co-administration of fermented milk with *B. longum* and *L. acidophilus* resulted in less gastrointestinal discomfort (Orrhage et al., 1994). In a randomized controlled trial, Correa et al. studied 157 children aged six to thirty six months receiving antibiotics. Among these children, the ones who were given a daily dose of a probiotic containing *B. lactis* BB-12 and *S. thermophilus*, 13 out of 80 (16%) developed diarrhea as compared to 24 out of 77 (31%) of controls $p = 0.044$ (Correa et al., 2005).

Several meta-analyses of probiotics in the prevention of AAD have been done, with the conclusion that probiotics prevent AAD, especially lactobacilli, (Cremonini et al., 2002; D'Souza et al., 2002).

Research at Clinic for infectious disease, Clinical Centre of Vojvodina,

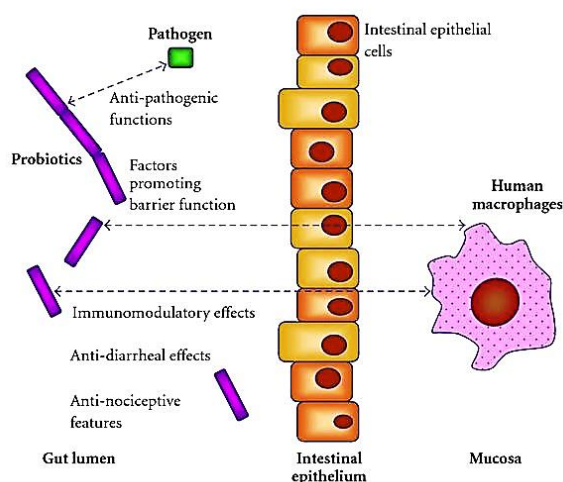


Figure 2. PROBIOTICS FUNCTIONS IN HUMAN GUT (www.metamicrobe.com)

Slika 2. FUNKCIJE PROBIOTIKA U HUMANOM DIGESTIVNOM TRAKTU (www.metamicrobe.com)

revealed that administration of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11 and *Bifidobacterium longum* Rosell-175 alongside the standard antimicrobial therapy in the patients with *Clostridium difficile* enterocolitis demonstrated positive effects on the severity or clinical picture and normalization of laboratory parameters. Recurrent infection after successful therapy was observed in only a small number of patients as compared with the literature data (Doder et al., 2013).

In children, Kotowska et al. showed that *S. boulardii* as an adjunct to the antibiotics being given to children with upper respiratory infections had significantly less diarrhea than those given antibiotics and placebo (Kotowska et al., 2005). In adults, five placebo controlled and randomized trials showed significant reduction in AAD with *S. boulardii* (McFarland et al., 1995; Surawicz et al., 1989). In a study of 388 French outpatients receiving tetracycline or a β -lactam antibiotic, diarrhea occurred in 33 out of 99 (17%) with placebo as compared to 9 out of 99 (4%) with *S. boulardii* ($p < 0.01$). In a US study of hospitalized patients, diarrhea rates were 22% with placebo as compared to 9.5% with *S. boulardii* (Surawicz et al., 1989). In a study of patients receiving β -lactam antibiotics, 15% of controls had diarrhea as compared to 7% in *S. boulardii* (McFarland et al., 1995).

There are many possible mechanisms of probiotics influence on di-

gestive tract. One is changes in the normal colonic flora. *In vitro* studies of *L. acidophilus* and *L. casei* fermented milk showed inhibition of some pathogens including *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Listeria innocua*, and suggest that these antimicrobial mechanisms may prevent AAD (Millette et al., 2007). Other probiotics produce antimicrobial substances such as bacteriocins. *Lactococcus lactis* produces a bacteriocin, a compound called nisin that is active against *Clostridium difficile*. This compound, lacticin 3,147 is a two-component lantibiotic from Irish kefir grain (Rea et al., 2007).

The main areas of concern relate to the potential for bacteria and fungi to translocate, crossing the gastrointestinal barrier and resulting in invasive infection, and the possibility for antibiotic resistance to be transferred from some probiotics to potentially pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract (Salyers et al., 2004).

Based on comparison of the large number of people who have consumed probiotics to the small number of people in whom serious adverse events have been reported, probiotics appear to be safe. However, since probiotics can cause invasive infection, probiotics should be used with caution in individuals who have an abnormal gastrointestinal mucosal barrier and should be avoided in children with short gut syndrome. Furthermore, probiotics are not recommended in severely immunocompromised patients and critically ill patients in intensive

care units. Similarly, patients with comorbid conditions that place them at increased risk of invasive infection should avoid probiotics, although it is not clear whether this recommendation should extend to severely malnourished patients.

CONCLUSION

Probiotics are widely used in fermented dairy products industry, providing suitable technological properties of the final products. Probiotics are promising for the prevention of diarrhea, particularly for non-breastfed infants in daycare. Certain probiotics appear to reduce the duration of acute infectious diarrhea, particularly for diarrhea caused by rotavirus. Probiotics appear to be safe for the prevention and treatment of infectious diarrhea. Probiotics should be avoided in children with short gut syndrome, in patients with central venous catheters, severely immunocompromised patients and critically ill patients in intensive care units. Caution should be used in patients with comorbid conditions that increase the risk of invasive infection as a result of probiotic use. In order for probiotics to be widely used, additional information is needed including identification of high risk patients who would benefit, identification of which probiotics, doses, activity, and duration of therapy should be used and safety studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation is a part of the Project No. 46009 financially supported by Ministry of Education, Science and Technology Development of Serbia (Project No. 46009).

LITERATURE

- Allen S.J., Okoko B., Martinez E., Gregorio G., Dans L.F. (2004): Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane Database System Review 2, CD003048.
- Arvola T, Laiho K, Torkkeli S. (1999): Prophylactic *L. rhamnosus* GG reduces antibiotic associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. Pediatrics 104, 1121-1122.
- Canani R.B., (2007): Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. British Medical Journal, 7615, 335-340.
- Correa N.B., Peret Filho L.A., Penna F.L., Lima F.M., Nicoli J.R. (2005): A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention antibiotic-associated diarrhoea in infants. Journal of Clinical Gastroenterology 39,385-389.

- D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J., Bulpitt C.J. (2002): Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *British Medical Journal* 324, 1341-1345.
- Doder R., Kovačević N., Mučan D., Potkonjak A., Tomašev B. and Ružić M. (2013): Outcomes of *Clostridium difficile* enterocolitis after administration of antibiotics along with probiotic supplement *Medicinski Pregled*; LXVI (5-6): 209-213.
- Esriche, I., Serra, J.A., Guardiola, V. and Mulet, A. (1999): Composition of Medium Volatility (Simultaneous Distillation Extraction-SDE) Aromatic Fraction of Pressed, Uncooked Paste Cheese (Mahon Cheese), *Journal of Food Composition and Analyses*, 12, 63-69.
- Fatih Yıldız (2010): Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products, CRC Press, London, England.
- Gorbach S.L., Chang T., Goldin B. (1987): Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *L. rhamnosus* GG. *Lancet* 2, 15-19.
- Guarner F., Schaafsma G.J. (1998): Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 39, 237-238.
- Guarner, F., Perdigo, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., and Morelli, L., (2005): Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93, 783-786.
- Hannon, J.A., Kilcawley, K.N., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M. and Beresford, T.P. (2007): Flavour Precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lyses of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 17, 316-327.
- Hickson M., D'Souza A.L., Muthu N., Rogers T.R., and Want S., Bulpitt C.J. (2007): Use of probiotic preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, 335, 80.
- Hrabova, H. Hylmar, B. (1987): *Dairy Science Abstracts*, 49, 22.
- Huis in't Veld, J.H.J., Havenaar, R., Marteau, P., (1994): Establishing a scientific basis for probiotic R&D, *Trends in Biotechnology*, 12, 6-8.
- Irygoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M. & Torre, P. (2007): Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compound in a Roncal-type ewes-milk cheese, *Food Chemistry*, 100, 71-80.
- Kurultay O., Oksul O., Kaptan B. (2006): Effects of different heat treatments of milk on some growth characteristics of mixed and single cell cultures of yoghurt bacteria. *Milchwissenschaft* 61, 52-55.
- Larsen R.F., Anon M.C. (1989): Effect of water activity w of milk on acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 54, 917-921.
- McFarland L.V. (1995): Epidemiology of infectious and iatrogenic nosocomial diarrhea in a cohort of general medicine patients. *American Journal of Infection and Control* 23, 295-305.
- McFarland L.V. (1998): Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic associated diarrhea. *Digestive Diseases and Science* 10, 292-307.
- Morgensen G., Salminen S., O'Brien J., Ouwehand A.C., Holzapfel W.H., Shortt C. (2002): Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. International Dairy Federation* 377, 10-18.
- Mortazavian A.M., Ehsani M.R., Mousavi S.M., Sohrabvandi S., Reinheimer J.A. (2006): Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology* 61, 248-252.
- Orrhage K., Brignar B., Nord C.E. (1994): Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microbial ecology in Health and Disease* 7, 17-25.
- Ouwehand A.C., Salminen S.J. (1998): The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal* 8, 749-758.
- Rea M.C., Clayton E., O'Connor P.M., Shanahan F., Kiely B., Ross R.P., Hill C. (2007): Anti-microbial activity of lactacin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medicin Microbiology* 56, 940-946.
- Rodgers, S. (2001): Trends in Food Science & Technology, 12, 276.
- Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K. (1999): Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10, 107-110.
- Salysers A.A., Gupta A., Wang Y. (2004): Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12 (9), 412-416.
- Sanders, M.E., (1999): Probiotics, *Food Technology*, 53, 67-75.
- Shah N.P., Ravula R.R.: (2000): Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* 55, 127-131.
- Surawicz C.M. (2005): Antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis: are they less common with poorly absorbed antimicrobials? *Chemotherapy* 51, 81-89.
- Szajewska H., Kotowska M., Mrukowicz J.Z., (2001): Efficacy of *L. rhamnosus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *Journal of Pediatrics* 138, 361-365.
- Tamime A.Y., Robinson R.K. (1985): *Yoghurt science and technology*. Pergamon Press, Oxford, p. 431
- Thomas M.R., Litin S.C., Osmon D.R., (2001): Lack of effect of *L. rhamnosus* GG on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. *Mayo Clinic Proceedings* 76, 883-889.
- Tamime AY, Robinson RK (2007). *Yoghurt, Science and Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Waterman S.R., Small P.L. (1998): Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Application Environmental Microbiology* 64, 3882-3886.
- www.foodhaccp.com
www.metamicrobe.com

IZVOD

ZDRAVSTVENI ASPEKT PRIMENE PROBIOTIKA

Radoslava Z. Doder¹, Vladimir R. Vukić², Dajana V. Hrnjez², Spasenija D. Milanović², Mirela D. Ilić²

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet Novi Sad, Klinika za infektivne bolesti, Klinički centar Vojvodine

² Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

Među brojnim funkcionalnim produktima kao što su funkcionalna hrana, dodaci hrani, probiotici i prebiotici zauzimaju posebno mesto zahvaljujući uticaju na poboljšanje zdravlja. Poslednjih dvadeset godina probiotici su predmet intenzivnih istraživanja. Probiotici imaju široku primenu u industriji fermentisanih mlečnih proizvoda jer daju poželjne tehnološke osobine krajnjeg proizvoda. Cilj ovog rada bio je da se predstave prednosti primene probiotika u tehnologiji fermentisanih mlečnih proizvoda i njihov uticaj na ljudsko zdravlje. Pokazalo se da pojedini probiotici skraćuju vreme akutne dijareje, posebno one izazvane rotavirusima. Mogućnosti primene probiotika trebalo bi nastaviti istraživati još intenzivnije uzimajući u obzir uticaj na zdravlje ljudi i posebne kategorije pacijenata.

Ključne reči: fermentisani mlečni proizvodi • probiotici • klinička ispitivanja • lečenje i prevencija

¹ DRAGANA D. ILIĆ UDOVIČIĆ
² SPASENIJA D. MILANOVIĆ*
² MIRELA D. ILIĆIĆ
³ ANAMARIJA I. MANDIĆ
² DAJANA V. HRNJEZ
² VLADIMIR R. VUKIĆ

¹ Higher Technological School of Professional Studies, Šabac, Serbia

² University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

³ University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia

ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK: 637.345 : 66.094.941

The aim of this research is to carry out the hydrolysis of lactose by applying the enzyme β -galactosidase in permeate obtained by milk ultrafiltration. The effect of β -galactosidase (isolated from *Kluyveromyces lactis*) at various concentrations (0.1, 0.3 and 0.5 g100g⁻¹) and reaction temperature (40°C) on the degree of lactose hydrolysis in permeate during 60 minutes was studied. Also, the paper presents the kinetics of lactose hydrolysis as a function of temperature and enzyme concentration.

The hydrolysis degree of lactose by the addition of 0.1 g100g⁻¹ enzyme in permeate at 40°C after 50 minutes was 97%. While the concentration of the enzyme was 0.3 g100g⁻¹ and 0.5 g100g⁻¹ at the same temperature the lactose was degraded 90% or 97% respectively, after 10 minutes.

Key words: lactose • permeate • hydrolysis • β -galactosidase

THE KINETICS OF LACTOSE HYDROLYSIS IN MILK PERMEATE

INTRODUCTION

Lactose is a reducing disaccharide, composed of glucose and galactose linked by a β 1-4 glycosidic bond (Fox, 2011). It is one of the sources of energy needed by human body and plays an important role in the absorption of minerals in the body. But, its use is limited because it can cause laxative effect in high concentration is poorly soluble and not very sweet (Ferreira et al., 2003; Jelen, 2009).

Most of the world populations lose part of their β -D-galactosidase activity in the small intestine after the childhood. Many traditional dairy products like ripened cheeses are naturally lactose-free. New technologies to produce lactose-free fresh dairy products have been developed during the last decades to satisfy the needs of the people suffering from lactose intolerance (Harju et al., 2012).

Enzyme β -D-galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase) is widely distributed in nature and can be isolated from different sources such as plants. Lactose-hydrolysed milk and dairy products have been under development since the 1970s, when the first β -galactosidases (lactase) became commercially available. Nowadays lactase is one of the most important enzymes used in food processing (Panesar et al., 2006; Harju et al., 2012).

Hydrolysis of lactose increases the sweetness of the product which in many cases provides an opportunity to lower the level of added sugar. Hydrolysis of 70% of lactose in milk increases sweetness by an amount corresponding to an addition of about 2% sucrose (Zadow, 1984; Harju et al., 2012; Mahoney, 1985; Jelen, 2009).

Lactose is the main component of permeate, obtained by ultrafiltration of milk in the production of cheese varieties. The lactose accounted for 80% of the dry matter of permeate (Hattem et al., 2011), may represent an environmental problem.

The hydrolysis of lactose in glucose and galactose is important process due to the potentially beneficial effects on assimilating the foods containing lactose, as well as the technological and environmental advantages of industrial applications (Jurado et al., 2002). In this way the possibility for commercial use of permeate increases (Mariotti et al., 2008).

The aim of this research is to carry out the hydrolysis of lactose applying the enzyme β -galactosidase in permeate obtained by milk ultrafiltration.

The effect of β -galactosidase, isolated from *Kluyveromyces lactis* at various concentrations (0.1, 0.3 and 0.5 g100g⁻¹) and reaction temperatures (40°C) on the degree of lactose hydrolysis in permeate during 60 minutes was studied. This paper presents the kinetics of lactose hydrolysis as a function of temperature and enzyme concentration, as well.

MATERIALS AND METHODS

Permeate

Permeate was obtained, during the manufacture of feta cheese by ultrafiltration of milk with 3.7% fat (manufacturer "DAIRY Šabac", Serbia). Device for UF process (producer DDS Denmark, with polysulfone membrane, hollow fibre module) with capacity of 5000 L of milk/h and single-shift capa-

Author address:
 Dragana Ilić Udovičić, Higher Technological School of Professional Studies, Hajduk Veljkova 10, 15000 Šabac, Serbia
 e-mail: draganailic82@yahoo.com

city of milk treatment of 20000 L milk resulting in 4500-4800 L of concentrate and around 15000-16000 L of permeate).

Enzyme

Enzyme Maxilact® LG5000 (DSM Food Specialties, The Netherlands) – derived from the yeast *Kluyveromyces fragilis* was used for lactose hydrolysis.

Enzymatic hydrolysis

Enzyme preparation was added to permeate at the temperature of 40°C in concentration of 0.1%, 0.3% and 0.5%. Degree of lactose hydrolysis was calculated during 60 minutes (in period of 10 minutes). The figure 1 shows technological process of lactose hydrolysis in milk permeate.

Physicochemical analyses

The application of standard analytical methods (Carić et al., 2000) in samples of milk, permeate and hydrolyzed permeate resulted in the determination of:

- pH value, using a pH-meter (Consort C830, Belgium);
- milk fat, by the Gerber method;
- dry matter, by oven drying;
- total proteins, using the Kjeldahl method;
- ash, by the incineration;

Sugar content was analyzed by Liquid Chromatograph Agilent Technologies 1200 Series. with ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) and Zorbax Carbohydrate Column (4.6 x 250mm, 5 µm) (Agilent Technologies). Samples (5g of each sample) were diluted in 25 mL volume flasks with 10 mL distilled water. The solutions were incubated in a water bath at 50°C for 15 min. After cooling 0.5 mL

Table 1. CHEMICAL COMPOSITION AND ENERGY VALUE OF MILK PERMEATE AND HYDROLIZED PERMEATE

Tabela 1. HEMIJSKI SASTAV I ENERGETSKA VREDNOST PERMEATA MLEKA I HIDROLIZOVANOG PERMEATA

CONTENTS	Milk	Permeate	Hydrolised permeate
pH	6.75	6.46	6.28
Dry matter (g/100g)	12.67 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.41 ± 0.01
Milk fat (g/100g)	3.7 ± 0.01	< 0.1 ± 0.01	0.00 ± 0.01
Total proteins (g/100g)	3.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Lactose (g/100g)	5.47	5.72	0.00
Ash (g/100g)	0.76 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.51 ± 0.01
Energy value (kJ/100g)	288.88	87.27	84.32

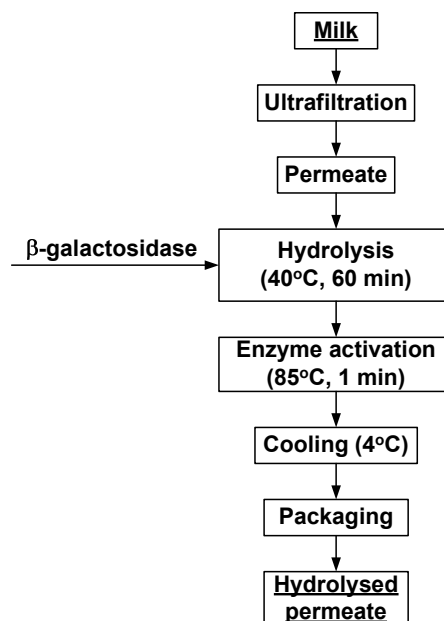


Figure 1. TECHNOLOGICAL PROCESS OF LACTOSE HYDROLYSIS IN MILK PERMEATE

Slika 1. TEHNOLOŠKI PROCES HIDROLIZE LAKTOZE U PERMEATU MLEKA

of Karez I, 0.5 mL of Karez II and 1 mL of 100 mM NaOH were added. The flask was amended with distilled water, mixed and samples were filtered through filter paper No.381. The filtrates (10µL) were injected using autosampler. The flow rate was 1.000 mL/min, at ambient temperature and run time was 15 min. The mobile phase with isocratic flow, was acetonitrile/water (70/30. v/v). ELSD parameters were: temperature 40±1°C, nitrogen pressure: 4.5±0.1 bar.

Statistical analysis

All experiments and standard deviation were carried out in triplicate and all data were expressed as mean values. Statistical and graphical analy-

ses of results were carried out with the computer software program "Origin 6.1"

Experimental data were fitted to an empirically-derived model using Origin. The best model to present the curve consisting of retaining stages and very steep decline before is exp. Dec.2 function:

$$S(t) = S_0 + A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2}$$

where S denotes lactose concentration (g /100g), which changes in time t. Parameters A1 and A2 correspond to the positions of two asymptotes to the S(t) curve to is the t-coordinate of the point at which the slope has the highest value, while Δt is the width of the step of an exponential decrease parameters (A1, A2, t and Δt) were determined by applying the Levenberg-Marquardt method (ORIGIN 6.1) over the experimental data. S(t) functions were determined for all investigated reactions at the chosen 40°C temperatures and in the presence of 0.1% enzyme concentrations.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition of milk, permeate and hydrolyzed permeate is shown in table 1. pH value of permeate corresponds to the values given in the literature (pH optimum 6.5-7) for enzyme neutral β-galactosydase (Mahoney, 1985; Demirhan et al., 2010).

Kinetics of lactose hydrolysis

Reduction of lactose during hydrolysis in permeate at a temperature of 40°C and enzyme concentration 0.1% (v/v) during 60 minutes are shown in figure 2. Complete hydrolysis of lactose at this concentration and temperature was achieved after 50 minutes of enzyme addition. The analysis of the rate curves (figure 2) shows that it passes through a maximum at the beginning indicating that the rate of hydrolysis increases to a maximum after approximately 15-20 min.

The achieved coefficients of determination are very high ($R^2 > 0.99$), indicating a good fit of the data to the selected model within the whole interval of variable values.

The changes of concentration glucose and galactose during 60 minutes hydrolysis are presented in figure 3. During lactose hydrolysis, the maximum content of glucose achieved by the addition of 0.5% enzyme after 60 minutes (2.8g/100g). The minimal level of glucose content was obtained after 60 minutes using 0.1g/100g enzyme (2.4g/100g). The galactose content constantly increased in all cases during 60 minutes of hydrolysis. The obtained values are in high correlation with glucose content ($r=0.9636$)

CONCLUSION

The obtained results showed the effect of different concentrations (0.1, 0.3 and 0.5 g/100g⁻¹) of β -galactosidase on the degree of lactose hydrolysis in permeate during 60 minutes. The

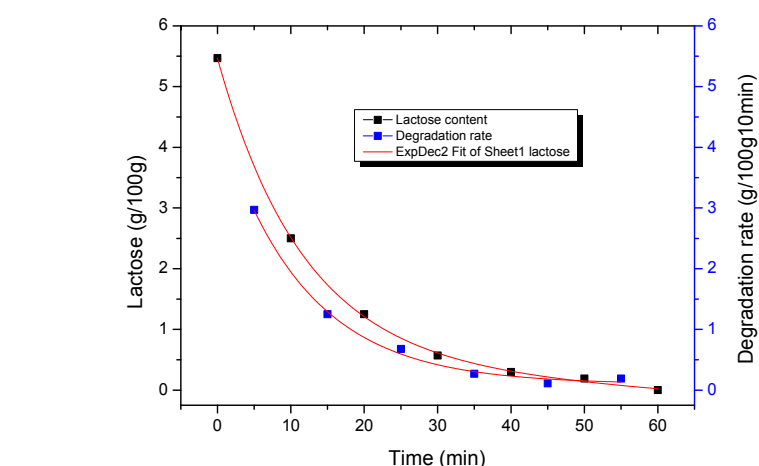


Figure 2. KINETICS OF LACTOSE HYDROLYSES IN PERMEATE BY THE ADDITION OF 0.1% ENZYME DURING 60 MINUTES

Slika 2. KINETIKA HIDROLIZE LAKTOZE U PERMEATU DODAVANJEM 0,1% ENZIMA U TOKU 60 MINUTA

increase of concentration of β -galactosidase showed faster transformation of lactose into glucose and galactose and higher degree of lactose hydrolysis in permeate. The most efficient rate of hydrolysis was obtained by 0.5% enzyme at 40°C, when the hydrolysis was completed after 60 min, with maximum yield of glucose and galactose (2.83 and 3.39 g/100g respectively). The chosen empirical model of hydrolysis kinetics enables a better insight into lactose transformation. These results could be applied to modelling and optimization of the technological process of delactosed milk permeates beverages manufacturing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank the Ministry of Education and Science of Republic of Serbia for the financial support of research presented in this article, EUREKA Project E! 5406. We express our gratitude to "DAIRY Šabac", Serbia for supplying free samples of milk and permeate, as well as NOVI TRADING NS, Novi Sad, Serbia for gratis samples of Enzyme Maxilact® LG5000 (DSM Food Specialties, The Netherlands).

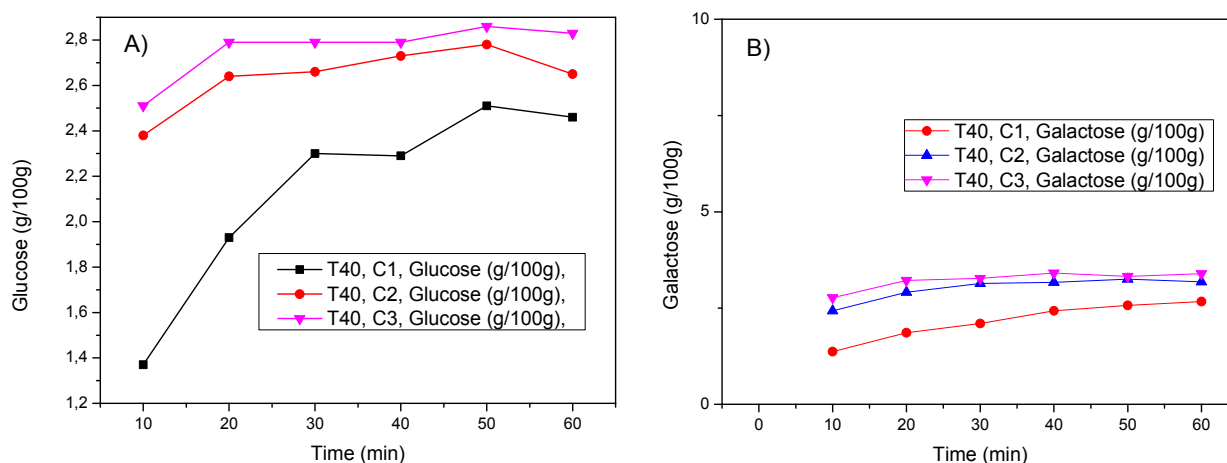


Figure 3. THE EFFECT OF ENZYME CONCENTRATION ON A) GLUCOSE CONTENT AND B) GALACTOSE CONTENT, IN HYDROLYSED PERMEATE

Slika 3. UTICAJ KONCENTRACIJE ENZIMA NA A) SADRŽAJ GLUKOZE I B) SADRŽAJ GALAKTOZE, U HIDROLIZOVANOM PERMEATU

REFERENCES

- Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D. (2000): *Standard methods of milk and dairy products analyses*. Novi Sad, Yugoslavia: Prometej & Faculty of Technology, 204
- Demirhan, E., Apar, D.K., Özbek, B. (2010): A modelling study on hydrolysis of whey lactose and stability of β -galactosidase. *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol. 27, 2, 536-545.
- Ferreira L. S., Souza, M. B., Trierweiler, J. O., Hitzmann, B., Folly, R. O. M. (2003): Analysis of experimental biosensor/FIA lactose measurements. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, 7-13.
- Fox, P. F. (2011): Lactose: Chemistry, Properties. In: J. W. Fuquay, P.F. Fox, & P. L. H. Mc Sweeney (2nd ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, San Diego: Academic Press, pp. 173-181.
- Harju, M., Kallionen, H., Tossavainen, O. (2012): Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects, *International Dairy Journal* 22, 104-109.
- Hattem H. E., Abouel-Einin, E. H., Mehanna, N.M. (2011): Utilization of milk permeate in the manufacture of sports drinks. *Journal of Brewing and Distilling*, 2, 23-27.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G., Vicaria, J. M. (2002): A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 300-309.
- Jelen, P. (2009): Dried Whey, Whey Proteins, Lactose and Lactose Derivative Products, in: A. Y. Tamime (Eds), *Dairy Powders and Concentrated Products* (pp. 255-266). Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/978144-4322729.ch7
- Mahoney, R. R. (1985): Modification of lactose and lactose-containing dairy products with β -galactosidase. In: P.F. Fox (Eds), *Developments in Dairy Chemistry-3*, Springer Netherlands, pp. 69-109.
- Mariotti, M. P., Yamanaka, H., Araujo, A. R., Trevisan, H. C. (2008): Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1233-1240.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F.Kumar, H. (2006): Microbial Production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530-543.
- Zadow, J.G. (1984): Lactose hydrolysed dairy products. *Food Technology in Australia*, 38, 460-462, 471.

IZVOD

KINETIKA HIDROLIZE LAKTOZE U PERMEATU MLEKA

Dragana D. Ilić-Udovičić¹, Spasenija D. Milanović², Mirela D. Iličić², Anamarija I. Mandić³, Dajana V. Hrnjez², Vladimir R. Vukić²

¹ Visoka tehnološka škola strukovnih studija Šabac, Hajduk Veljkova 10, 15000 Šabac

² Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

³ Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad

Cilj ovog istraživanja je bio da se izvrši hidroliza laktoze primenom enzima β -galaktozidaze u permeatu koji je dobijen ultrafiltracijom mleka. U radu je ispitan uticaj koncentracije enzima β -galaktozidaze (izolovan iz *Kluyveromyces fragilis*) (0,1, 0,3 i 0,5 g/100g-1) pri temperaturi od 40°C na stepen hidrolize laktoze tokom 60 minuta. Takođe dat je prikaz kinetike razgradnje laktoze kao funkcija koncentracije enzima i temperature. Korišćenjem enzima u koncentraciji od 0,1g/100g na temperaturi od 40°C razgradi se 97% laktoze na glukozu i galaktozu nakon 50 minuta. Dok pri koncentraciji enzima 0,3g/100g i 0,5g/100g na istoj temperaturi nakon 10 minuta razgradi se 90% odnosno 97 % laktoze.

Ključne reči: laktoza • permeat • hidroliza
• β -galaktozidaza

ALEKSANDAR D. NEDELJKOVIĆ
JELENA B. MIOČINOVIĆ
MIRA M. RADOVANOVIĆ
PREDRAG D. PUĐA

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni
fakultet, Institut za prehrambenu tehnolo-
giju i biohemiju, Beograd, Srbija

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.13/.14 : 543.4

MOGUĆNOSTI PRIMENE RAMAN SPEKTROSKOPIJE U ISPITIVANJU MLEKA I PROIZVODA OD MLEKA

UVOD

Raman spektroskopija je vibraciona spektroskopska tehnika koja se zasniva na neelastičnom rasejanju svetlosti. Ova ne-destruktivna, bezkontaktna tehnika daje brojne kvalitativne i kvantitativne informacije o različitim uzorcima i našla je primenu u mnogim oblastima istraživanja. U kombinaciji sa optičkim mikroskopom idealna je za ispitivanje heterogenih sistema. Od početka primene, ograničenja ove tehnike tiču se problema sa fluorescencijom, koji su se razvojem instrumentalnih rešenja danas značajno smanjili. Zahvaljujući prednostima koje pruža (vrlo slab signal vode, rad sa koncentrovanim rastvorima, širok opseg tipova uzoraka i dr.), Raman spektroskopija ima vrlo veliki potencijal za primenu u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka.

Ključne reči: Raman spektroskopija • talasna dužina • mlečna mast • proteini

Interakcija elektromagnetnog zračenja i molekula je u osnovi brojnih spektroskopskih tehnika koje se baziraju na procesima apsorpcije, emisije i rasejanja zračenja. Raman spektroskopija je vibraciona spektroskopska tehnika koja se zasniva na fenomenu neelastičnog rasejanja zračenja usled međusobnog delovanja sa uzorkom. Prilikom interakcije upadnog zračenja i molekula dolazi do razmene energije a njena količina odgovara unutrašnjim vibracionim prelazima koji su specifični za pojedine hemijske veze.

Tehnike ispitivanja zasnovane na Ramanovom rasejanju daju podatke o vibracionom otisku molekula te se stoga ova tehnika može koristiti za hemijske karakterizacije, ispitivanje molekulskih struktura, međumolekulskih interakcija, opisivanje okruženja oko pojedinih atoma u molekulu i dr. Zahvaljujući fenomenima koji su osnova ove tehnike, primenjiva je za ispitivanje velikog broja supstanci i materijala. S tim u vezi, od nedavno, ova tehnika je našla primenu i u analizi hrane, s obzirom na to da omogućava dobijanje relevantnih informacija o sastavu različitih vrsta uzoraka uključujući tečnosti, gasove i čvrste materijale. Informacije dobijene ovom tehnikom se baziraju na vrlo specifičnim spektrima karakterističnim za uzorak koji se ispituje. Rezultati dobijeni tehnikama Raman spektroskopije se najčešće usled složenosti dalje obrađuju primenom statističkih metoda kao što je analiza glavnih komponenti (*eng. principal component analysis, PCA*) i regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata (*engl. partial least squares regression, PLS*).

Najveća prednost korišćenja ove tehnike u analizi hrane je vrlo slabo rasejanje vode koje ne ometa signale ostalih ispitivanih komponenta, zatim nesmetano ispitivanje koncentrovanih

uzoraka, minimalna priprema uzorka (ili nije potrebna) kao i mogućnost prenosa signala na veće udaljenosti.

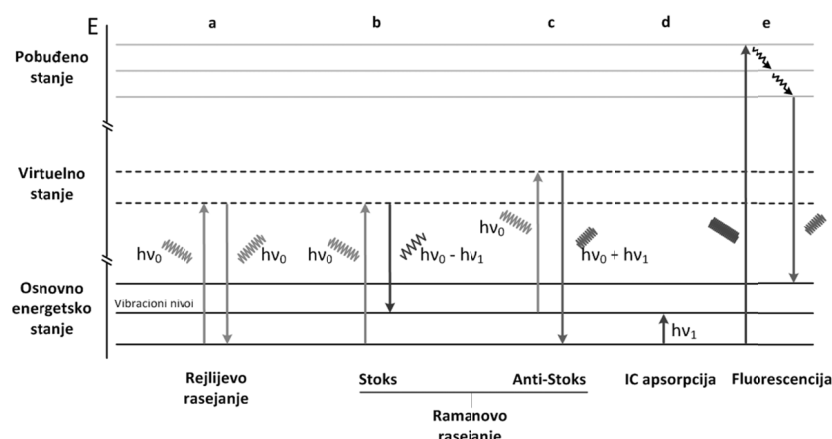
U ovom radu izložene su osnovne informacije o Raman mikrospektroskopiji i principima same tehnike, kao i mogućim problemima i poboljšanjima prilikom njene primene u analizi hrane (npr. odabir lasera, problem fluorescencije itd.). U drugom delu rada su prikazani rezultati dosadašnjih istraživanja zasnovanih na primeni Raman spektroskopije u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka.

OSNOVI PRINCIPI TEHNIKE RAMAN SPEKTROSKOPIJE

Pri procesu transmisije (prolaza) elektromagnetnog zračenja kroz materiju, jedan vrlo mali deo zraka se rasejava u svim pravcima (Skoog, 2007). U kvantnoj mehanici rasejanje se opisuje kao pobuđivanje molekula do **virtuelnog stanja**, koje je niže energije od elektronskog prelaza, uz skoro istovremeni (za manje od 10^{-14} sekundi) povratak na niži elektronski nivo i reemitovanje fotona (Skoog, 2007; Smith and Dent, 2005). U toku ovog procesa, najveći deo fotona se rasejava elastično tzv. **Rejljevo rasejanje** (slika 1a), pri čemu oni imaju istu energiju (frekvenciju i talasnu dužinu) kao i upadni fotoni, odnosno ne dolazi do razmene energije. Međutim, mali deo zračenja (jedan od 10^6 - 10^8 fotona; Smith and Dent, 2005) se rasejava sa frekvencijama različitim, najčešće nižim, od frekvencija upadnih fotona pri čemu se odvija razmena energije. Proces u toku kojeg dolazi do ovog tzv. neelastičnog rasejanja naziva se **Ramanovo rasejanje** odn. **Ramanov efekat**.

U zavisnosti od početnog stanja molekula ova promena može biti ka višem (**Stoksovo** rasejanje, slika 1b) ili nižem vibracionom nivou (**Anti-Stoksovo** rasejanje, slika 1c). Na sob-

Adresa autora:
Aleksandar Nedeljković, Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun
- Beograd
tel: +381 11 2615-315 / lok 117
e-mail: a.nedeljkovic@agrif.bg.ac.rs



Slika 1. ODNOS INFRACRVE NEAPSORPCIJE, REJLIJEVOG I RAMANOVOG RASEJANJA I FLUORESCENCIJE

Figure 1. THE RELATIONSHIPS BETWEEN INFRARED ABSORPTION, RAYLEIGH AND RAMAN SCATTERING AND FLUORESCENCE

noj temperaturi najveći broj molekula se nalazi u osnovnom stanju (1b), dok je broj molekula u pobuđenim vibracionim stanjima mali (1c). Stoga je intenzitet Stoksovog rasejanja znatno veći od anti-Stoksovog, pa se zato, iako nose istu frekvencijsku informaciju, i više posmatra u Ramanovoj spektroskopiji.

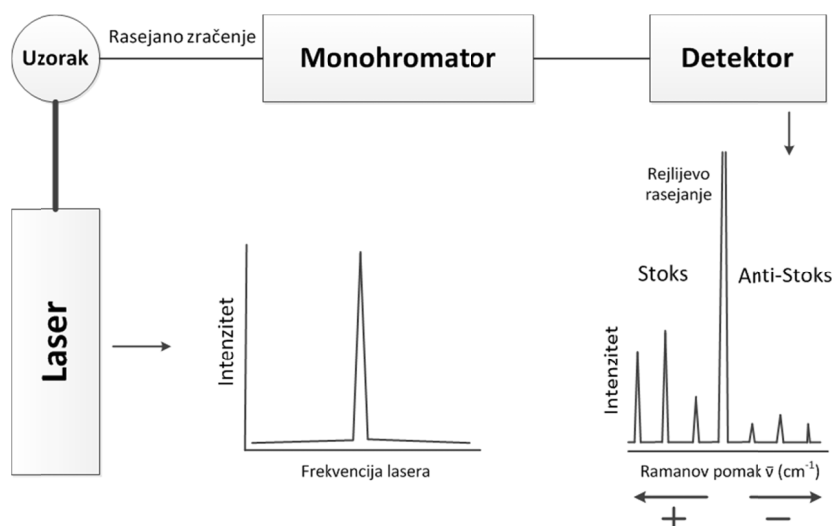
Ramanov spektar (slika 2) se prikazuje kao intenzitet rasejanja (broj detektovanih rasejanih fotona) u odnosu na **promenu** njihove talasne dužine u talasnim brojevima. Ova promena se naziva **Ramanov pomak**. Na osnovu toga moguće je korišćenje različitih izvora zračenja uz konstantno dobijanje iste razlike. Tako će na primer pomak od 1600 cm^{-1} biti prisutan uvek bez obzira na talasnu dužinu izvora zračenja. Numerički, Ramanov pomak u talasnim brojevima (cm^{-1}) se izračunava pomoću jednačine:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda_u} - \frac{1}{\lambda_r}$$

gde su λ_u i λ_r talasne dužine (u cm) upadnog i rasejanog fotona.

Raman spektroskopija se kao i infracrvena (IC) spektroskopija zasniva na finim vibracionim promenama, koje odgovaraju različitim istežućim i savijajućim vibracijama pojedinih hemijskih veza u molekulu. Međutim, i pored ove sličnosti, Raman i IC spektri istog uzorka nisu identični, i zato su ove dve tehnike komplementarne. Da bi došlo do IC apsorpcije, neophodno je da se u toku vibracije menja trajni dipolni momenat, dok Raman rasejanje zavisi od promene polarizabilnosti funkcionalnih grupa u toku vibracije (Skoog 2007; Smith and Dent, 2005; McCreery, 2005). Zato, polarne grupe kao što su C=O, N-H i O-H imaju izražene IC, dok nepolarne grupe kao C=C, C-C and S-S imaju izražene Raman signale. Voda je polarni molekul i jako apsorbuje IC zračenje. Nasuprot tome, daje vrlo slab Raman signal i predstavlja neznan problem u Raman spektroskopiji. Kao rezultat toga, ova tehnika se smatra veoma pogodnom za *in vivo* i *in situ* istraživanja bioloških sistema, uključujući i hranu (Li-Chan, 2010).

Raman spektroskopija je i kvalitativna i kvantitativna tehnika (Skoog, 2007; Smith and Dent, 2005; McCreery, 2005). Pre svega, opšti spektralni profil (pozicije traka i njihovi intenziteti) daju jedinstveni hemijski otisak prsta koji se može koristiti za identifikaciju

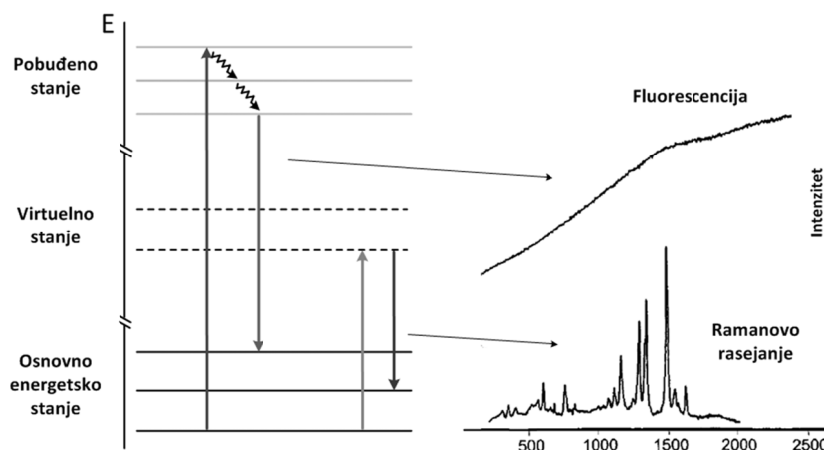


Slika 2. DIJAGRAM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE I UPROŠĆENI RAMANOV SPEKTAR. Zračenje lasera se usmerava na uzorak. Ramanovo rasejanje se uobičajeno meri pod uglom od 90° ili 180° kako bi se izbeglo transmitovano zračenje izvora. centralna linija na spektru predstavlja intenzitet elastično rasejane svetlosti (Rejljevo rasejanje) i predstavlja 0 cm^{-1} . Levo od ove linije (pozitivan pomak) se nalazi stoks deo spektra, dok je desno (negativan pomak) anti-stoks pomak. ova dva dela spektra su simetrična, ali je intenzitet signala kod anti-stoks pomaka manji.

Figure 2. RAMAN SPECTROSCOPY DIAGRAM WITH SIMPLIFIED RAMAN SPECTRUM. Laser radiation is pointed on sample. To avoid transmitted radiation, it is better to measure scattering in 90° or 180° configuration. middle band, at 0 cm^{-1} corresponds to elastic scattering (rayleigh scattering). bands to the left are stokes (positive shift) and to the right - anti-stokes (negative shift). These two spectrum parts are symmetrical, but anti-stokes peak intensities are lower.

molekula. Često je dobijeni spektar vrlo kompleksan, ali postoje obimne biblioteke spektara na osnovu kojih se može lako ostvariti hemijska identifikacija. Pored određivanja prisustva pojedinih molekula ovom tehnikom mogu se dobiti i suptilnije informacije o kristalnoj strukturi, polimorfnim oblicima, interakcijama na granicama faza, strukturi proteina i vodoničnom vezivanju. S druge strane, intenzitet traka je direktno proporcionalan koncentraciji (Skoog, 2007). Zbog toga je moguće sprovesti jednostavnu kalibracionu proceduru u cilju determinacije odnosa intenziteta trake i koncentracije što dalje omogućuje rutinsko određivanje nepoznate koncentracije. Vrlo je pogodna za analizu uzoraka koji sadrže vodu (rastvori i biološke materijale: tkiva, ćelije, hranu). Kao što je pomenuto, molekul vode ima minimalno Raman rasejanje i daje vrlo jednostavan spektar, sa nekoliko manjih pikova koji se minimalno preklapaju sa pikovima ostalih prisutnih supstanci.

S obzirom na to da je Raman rasejanje fenomen vrlo niskog intenziteta, u cilju dobijanja merljivih signala, sa dovoljno dobrim odnosom signal/šum, neophodno je osloniti se na izvore vrlo intenzivnog zračenja. Zbog toga se, kao izvor zračenja u Ramanovoj spektroskopiji koriste laseri. Vrlo je bitno odabrati laser dovoljne energije ("dovoljno plav") koji može da dovede ispitivani molekul do virtuelnog stanja, ali ne toliko velike energije da izazove fluorescenciju. Fluorescencija je pojava pri kojoj materija reemituje zračenje veće talasne dužine od onog kojem je izložena i obuhvata elektronski prelaz (slika 1e). Pojava fluorescencije predstavlja jedan od najvećih problem u Ramanovoj spektroskopiji jer čak i najslabija može u potpunosti da zakloni Ramanov signal i onemogućiti dobijanje adekvatnih rezultata merenja (slika 3) (McCreery, 2005). Ovo je jedan od osnovnih razloga zbog kojih je Raman spektroskopija do 90-tih godina prošlog veka bila vrlo malo korišćena tehnika. Međutim, primena instrumentalnih rešenja kao što su korišćenje lasera veće talasne dužine (iz bliske IC oblasti - Nd-YAG laser (engl. *Neodymium-doped yttrium aluminum garnet*-Neodimijum-dopirani itrijum-aluminijum-grnat) uz kombinovanje sa FT (Furijeova transformacija) uređajima i CCD detektorima (engl. *charge coupled device*) omogućilo je da se problem fluorescencije u većini analiza uspešno



Slika 3. ENERGETSKI DIJAGRAM I SPEKTAR FLUORESCENCIJE U POREĐENJU SA RAMANOVIM RASEJANJEM (FLUORESCENCIJA U POTPUNOSTI ZAKLANJA RAMANOV SPEKTAR)

Figure 3. COMPARISON OF ENERGY DIAGRAMS AND SPECTRA OF FLORESCENCE AND RAMAN SCATTERING (FLUORESCENCE COMPLETELY COVERS RAMAN SPECTRUM)

prevaziđe, a da se istovremeno detektuje zadovoljavajući intenzitet Ramanovog rasejanja (Li-Chan, 1996; Keller, 1993).

MOGUĆNOST PRIMENE RAMAN SPEKTROSKOPIJE U PROUČAVANJU MLEKA I PROIZVODA OD MLEKA

Brzo određivanje sadržaja masti u mleku

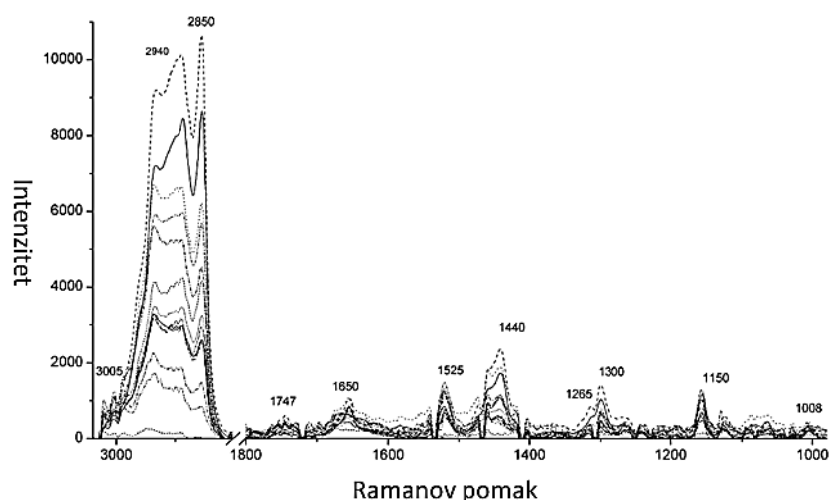
El-Abassy et al. (2011) su demonstrirali mogućnost primene Raman spektroskopije kao brze metode za direktno određivanje sadržaja masti u mleku. U njihovom radu je korišćeno 13 uzoraka homogenizovanog mleka sa različitim sadržajem masti (0,3-4,0%). Priprema uzorka je veoma jednostavna i obuhvatila je samo transfer uzorka u posudu za snimanje. Kao izvor zračenja upotrebljen je argon-jonski laser ($\lambda = 514,5$ nm, 20 mW) koji je fokusiran na uzorak mikroskopom (50x). Raman signal je prikupljan pod uglom od 180° . Spektralni opseg je bio podeljen na dva dela $800-1800$ cm^{-1} i $2500-3100$ cm^{-1} . Vreme snimanja za svaki spektralni deo je bio samo 30 s, i u toku ovog vremena snimljeno je po pet spektara (5x6 s) u cilju dobijanja zadovoljavajućeg odnosa signala i šuma i prosečnih rezultata. Dobijeni spektralni podaci su obrađeni hemometrijskim metodama odnosno (PLS, partial least square regression - regresija metodom delimič-

nih-najmanjih kvadrata) u cilju dobijanja modela za određivanje sadržaja masti u mleku.

Autori su ustanovili da spektar sa najvećim intenzitetom pikova odgovarao je uzorku sa najvećim sadržajem masti (4,0 %) i obrnuto, uzorak sa 0,3 % masti imao je spektar sa najmanjim intenzitetom pikova (slika 4). S obzirom na to da je u svim uzorcima sadržaj proteina i ugljenih hidrata bio konstantan, varijacije u intenzitetima Raman traka su mogle biti pripisane isključivo varijacijama sadržaja masti u uzorcima. Najupadljiviji pikovi su se nalazili na 1650 cm^{-1} (C=C cis istežanje RHC=CHR), 1440 cm^{-1} (C-H ukrštanje- CH_2), 1265 cm^{-1} (C-H cis savijanje R-HC=CH-R), 1300 cm^{-1} (C-H uvrtnje- CH_2), i 1747 cm^{-1} (C-O istežanje RC-OOR)(Yang and Irudayaraj, 2001; Yang et al., 2005; Baeten et al., 1998).

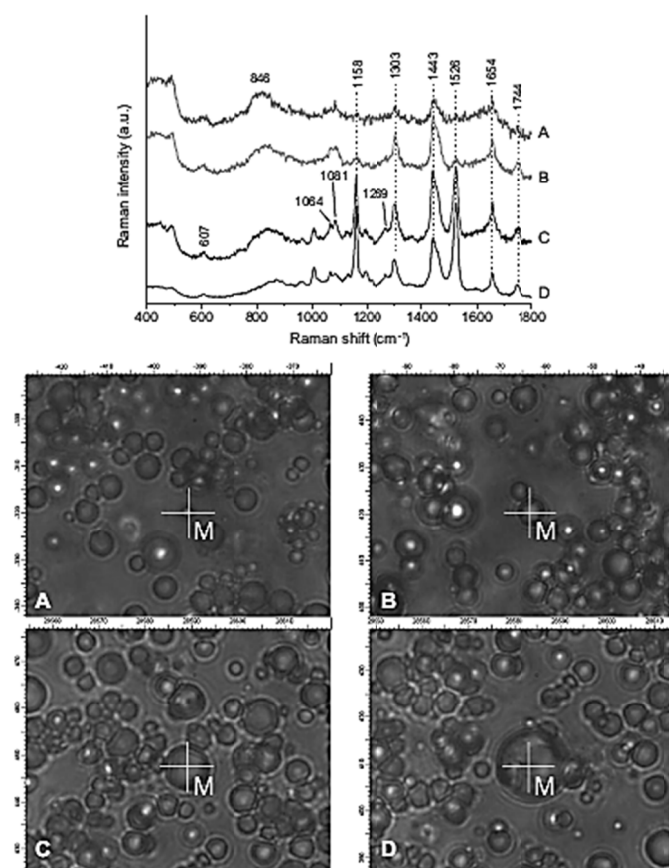
U drugom delu spektra su se javili pikovi oko 2850 and 2940 cm^{-1} karakteristični za simetrične i asimetrične C-H vibracije kod CH_2 i CH_3 grupa su, dok se pik na 3005 cm^{-1} pripisuje simetričnom ukrštanju C-H (Yang and Irudayaraj, 2001; Baeten et al., 1996).

Navedeni rezultati su pokazali da se sadržaj masti u mleku može uspešno odrediti na osnovu podataka dobijenih Raman spektroskopijom koji se potom obrađuju odgovarajućom statističkom metodom (PLS). Prednost ove metode je odsustvo složene pripreme uzorka kao i kratko vreme trajanja analize. Usled toga, smatra se da teh



Slika 4. RAMAN SPEKTRI UZORAKA MLEKA SA RAZLIČITIM SADRŽAJEM MASTI (EL-ABASSY ET AL., 2011)

Figure 4. RAMAN SPECTRA OF MILK SAMPLES WITH DIFFERENT FAT CONTENT



Slika 5. RAMAN SPEKTRI I ODGOVARAJUĆI MIKROGRAFI MASNIH GLOBULA RAZLIČITE VELIČINE (MLEKO DŽERZEJSKE RASE): A–1 μ M; B–5 μ M; C–9 μ M; D–15 μ M

Figure 5. RAMAN SPECTRA AND ASSOCIATED MICROGRAPHS OF DIFFERENT SIZES MILK FAT GLOBULES (JERSEY MILK): A–1 μ M; B–5 μ M; C–9 μ M; D–15 μ M

nika Raman spektroskopije ima velikog potencijala posebno za in-line analizu sadržaja mlečne masti tokom procesa proizvodnje.

Nedestruktivno određivanje prisustva melamina u mleku u prahu

Melamin je jedinjenje koje se koristi u proizvodnji plastike, ali se relativno često koristi u cilju falsifikovanja sadržaja azota u namirnicama odavajući lažni utisak većeg sadržaja proteina. Za određivanje melamina uobičajeno je korišćene tehnika kao što su ELISA (Garber, 2008) i hromatografija (HPLC) (Ehling, 2007; Inoue, 1985; Muniz-Valencia, 2008) koje zahtevaju relativno dug proces pripreme uzorka.

Okazaki et al., (2009) su ispitivali mogućnost primene Raman spektroskopije u cilju određivanja prisustva melamina u mleku u prahu. U svom istraživanju su dodavali različite količine melamina (10%, 3%, 1%, 0,3%, i 0,1%) u komercijalne uzorke mleka u prahu i takve uzorke ispitivali Raman spektroskopijom. Sama priprema uzorka je obuhvatila formiranje peleta (8 mm) koji su potom izlagani zračenju lasera ($\lambda = 785$ nm, 80 mW) tokom 50 s (5 s x 10 spektara).

Prisustvo melamina u mleku u prahu je vrlo lako identifikovano jednostavnim poređenjem spektara uzoraka i čistog melamina. Za kontrolu prisustva melamina ustanovljeno je da je najpodesniji deo spektra oko 676 cm^{-1} , a ustanovljena granica detekcije je iznosila oko 1 % (w/w). Na osnovu rezultata istraživanja smatra se da je Raman spektroskopija vrlo korisna i jednostavna metoda za detektovanje melamina u mleku u prahu bez ikakvog prethodnog hemijskog tretmana uzorka. Jedna od osnovnih prednosti metoda se ogleda u odsustvu složene pripreme kao npr. ekstrakcije melamina iz uzorka, pri čemu je smanjen rizik od moguće greške koja bi nastala tokom ekstrakcije ili usled interakcije sa dodatim reagensima.

Određivanje sastava masnih globula

Gallier et al., (2011) su primenili konfokalnu Raman mikrospektroskopiju za analizu sastava globula mlečne masti različite veličine (1-15 μ m dijametar) i porekla (Džerzi i Frizijska rasa). Neposredno nakon muže, sirovo mleko dve rase je sakupljeno a potom centrifugiranjem odvojena mlečna mast u vidu pavlake (20%). Dobijena

pavlačka je razblažena 10x fosfatnim puferom zbog lakšeg pronalaženja pojedinačnih masnih globula, a za imobilizaciju uzorka vršeno je dodavanje rastvora agaroze (čiji spektar nije davao nijedan karakterističan pik). Dobijanje spektralnih podataka je vršeno pomoću konfokalnog Raman mikrospektroskopa, opremljenog sa diodnim laserom ($\lambda=532$ nm, 5 mW). Upotreba mikroskopa je omogućila dubinsko profilisanje i dobru rezoluciju čime su uspešno prikupljeni spektri iz centara globula mlečne masti različite veličine (Slika 5).

Rezultati istraživanja su pokazali da sastav globula mlečne masti veoma varira u zavisnosti od veličine globula, tako da se sa povećanjem prečnika globula povećava sadržaj karotenoida dok nivo nezasićenosti se smanjuje. Sadržaja karotenoida takođe varira u zavisnosti od porekla mleka odnosno rase muznih životinja. Pored toga, autori su ustanovili da je sadržaj triglicerida u malim globulama masti ($1\mu\text{m}$) bio ispod nivoa detekcije, dok je s druge strane ustanovljen značajno prisustvo fosfolipida i holesterola (trake pri 607 i oko 846 cm^{-1}) (Bresson et al., 2005), koji predstavljaju značajne komponente membrane masnih globula. Na osnovu ovih rezultata, autori su zaključili da specifični sastav malih masnih globula utiče na specifičnost njihovih nutritivnih i tehnoloških svojstava u poređenju sa velikim masnim globulama.

Na osnovu iznetog, možemo zaključiti da se Raman spektroskopija može uspešno koristiti za dobijanje informacija o sastavu i strukturi membrane masnih globula.

Ispitivanje nastajanja gelova β -laktoglobulina

Ikeda and Li-Chan (2004) su, primenom Raman spektroskopije, ispitivali molekularne strukturne promene proteina koje se dešavaju tokom formiranja dve vrste gelova β -laktoglobulina (β -lg) delovanjem toplote (fini i partikularni). Naime, autori su 15% rastvora β -lg (w/v), različitih pH vrednosti, termički tretirali režimom $80^\circ\text{C}/60\text{ min.}$, a potom dobijene gelove analizirali Raman spektroskopom ($\lambda=785\text{ nm}$, 50 mW).

Analizom dobijenih spektara ustanovljeno je da je termički indukovano nastajanje gela praćeno poremećajima u sekundarnoj strukturi proteina i povećanjem jačine vodoničnog vezi-

vanja tirozina. Prilikom formiranja finijeg gela intenzitet trake od oko 760 cm^{-1} se povećao (traka povezana sa vibracijom veza u triptofanu) (Howell and Li-Chan, 1996; Ogawa et al., 1999), dok je pri nastajanju partikularnog gela proces tekao suprotno. Intenzivna traka na 1345 cm^{-1} , pripisana CH savijajućim vibracijama (Nonaka et al., 1993), sugerisala je na značajan doprinos hidrofobnih interakcija pri nastajanju partikularnog gela. Kod ovog tipa gela sekundarna struktura je bila bolje očuvana, obzirom na to da je kod finog gela uočeno veće narušavanje α -heliksa, dok je najveći deo β -nabrane strukture u oba slučaja ostao netaknut.

Primenom Raman spektroskopije bilo je moguće ustanoviti razlike između dva tipa termički indukovanih gelova β -lg. Ustanovljene su promene sekundarne strukture kao i tipovi veza koje prevladavaju u njima.

ZAKLJUČAK

Raman spektroskopija je tehnika koja se zasniva na rasejanju zračenja pri kome se foton koji reaguje sa uzorkom rasejava uz promenu talasne dužine. Ova promena je osnova kako kvalitativne tako i kvantitativne primene ove vrlo moćne tehnike.

Poslednjih godina, interesovanje za korišćenje ove tehnike u mnogim disciplinama, uključujući i nauku o hrani, značajno se povećava pre svega usled jednostavnosti pripreme ispitivanog uzorka kao i širine dobijenih informacija o sastavu, strukturi molekula, rasporedu komponentata i dr. Primenom Raman mikro/spektroskopije mogu se dobiti kvalitativne i kvantitativne informacije o velikom broju komponentata hrane uključujući makro (proteine, lipide, ugljene hidrate i vodu) i minorne komponente (pigmente, sintetičke boje).

Mogućnosti primene Raman spektroskopije u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka su brojne i obuhvataju kvalitativne i kvantitativne analize makro (proteina, lipida, ugljenih hidrata i dr.) i minornih komponenti. Takođe, poslednjih godina vrše se brojna ispitivanja na mogućnosti primene ove tehnike u analizi mikrobiološkog kvaliteta prehrambenih proizvoda.

Ipak, upotreba ove tehnike u analizi hrane, uključujući proizvode od mleka, je još uvek nedovoljno istražena oblast, posebno na našem području, a može imati značaja kako u rutin-

skim analizama kontrole kvaliteta proizvoda tako i u naučno istraživačkim studijama.

ZAHVALNICA

Rad je nastao kao deo istraživanja u okviru FP7 projekta AREA 316004 koje finansira EU, autori se takođe zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za finansiranje istraživanja u okviru nacionalnog projekta III-46009.

LITERATURA

- Baeten, V., Hourant, P., Morales, M.T., Aparicio, R. (1998): Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2638-2646.
- Baeten, V., Meurens, M., Morales, M.T., Aparicio, R. (1996): Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2225-2230.
- Bresson, S., El Marssi, M., Khelifa, B. (2005): Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides, *Chemistry and Physics of Lipids*, 134, 119-129.
- El-Abassy, R.M., Eravuchira, P.J., Donfack, P., von der Kammer, B., Materny, A. (2011): Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 56, 3-8.
- Ehling S., Tefera S., Ho I.P. (2007): High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammeline, and cyanuric acid, *Food Additives and Contaminants* 24, 1319-1325.
- Howell, N., Li-Chan, E. (1996): Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy, *International Journal of Food Science & Technology*, 31, 439-451.
- Gallier, S., Gordon, K.C., Jiménez-Flores, R., Everett, D.W. (2011): Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy, *International Dairy Journal*, 21, 402-412.
- Garber, E.A. (2008): Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology, *Journal of Food Protection*, 71, 590-594.
- Ikeda, S., Li-Chan, E.C.Y. (2004): Raman spectroscopy of heat-induced fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels, *Food Hydrocolloids*, 18, 489-498.
- Inoue, T., Ishiwata, H., Yoshihira, K., Tanimura, A. (1985): High-performance liquid chromatographic determination of melamine extracted from cups made of melamine resin, *Journal of Chromatography* 346, 450-452.
- Li-Chan, E.C.Y. (1996): The Applications of Raman spectroscopy in food science, *Trends in Food Science & Technology*, 7, 361-370.
- Li-Chan, E., Chalmers, J.M., Griffiths, P. (2010): Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science, Volume 1, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England.
- Keller, S., Lichte, T., Dippel, B., Schrader, B. (1993): Quality control of food with near-infrared-excited Raman spectroscopy, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346, 863-867.
- McCreery, R.L. (2005): Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, J. Wiley, Canada.

- Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S.G., Rosales-Martinez, D., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Cubedo-Fernandez-Trapiella, A., Izquierdo-Hornillos, R.C. (2008): Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 523-531.
- Nonaka, M., Li-Chan, E., Nakai, S. (1993): Raman spectroscopic study of thermally induced gelation of whey proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1176-1181.
- Ogawa, M., Nakamura, S., Horimoto, Y., An, H., Tsuchiya, T., Nakai, S. (1999): Raman spectroscopic study of changes in fish actomyosin during setting, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3309-3318.
- Okazaki, S., Hiramatsu, M., Gonmori, K., Suzuki, O., Tu, A. (2009): Rapid nondestructive screening for melamine in dried milk by Raman spectroscopy, *Forensic Toxicology*, 27, 94-97.
- Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, J.F. (2007): *Principles of instrumental analysis*, Thomson Brooks/Cole Belmont, CA.
- Smith, E., Dent, G. (2005): *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England.
- Yang, H., Irudayaraj, J. (2001): Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier Transform-Raman Methods for Determining Olive Pomace Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 889-895.
- Yang, H., Irudayaraj, J., Paradkar, M.M. (2005): Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy, *Food Chemistry*, 93, 25-32.

SUMMARY

APPLICATION POSSIBILITIES OF RAMAN SPECTROSCOPY IN THE INVESTIGATION OF MILK AND DAIRY PRODUCTS

Aleksandar D. Nedeljković, Jelena B. Miočinović, Mira M. Radovanović,
Predrag D. Pudja

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

Raman spectroscopy is a vibrational spectroscopic technique based on inelastic light scattering. This non-destructive, non-contact technique provides a number of qualitative and quantitative information about the different samples and has been applied in many fields of research. In combination with an optical microscope this method is ideal for testing of heterogeneous systems. The limitations of this technique include problems with fluorescence, but nowadays they are significantly reduced with developed instrumental solutions. Thanks to the numerous advantages (very weak signal lead, working with concentrated solutions, a wide range of sample types, etc.), Raman spectroscopy has great potential for application in the examination of milk and milk products.

Key words: Raman spectroscopy • wavelenght • milk fat • protein

JASMINA S. VITAS
RADOMIR V. MALBAŠA
EVA S. LONČAR
SPAŠENIJA D. MILANOVIĆ
SNEŽANA Ž. KRAVIĆ
IRENA Z. SUTUROVIĆ

Univerzitet u Novom Sadu,
Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

ORIGINALNI NAUČNI RAD

UDK:637.146+663.88]:665.127:66.094.3.097.8

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST I SADRŽAJ MONONEZASIĆENIH MASNIH KISELINA U FERMENTISANIM MLEČNIM PROIZVODIMA DOBIJENIM POMOĆU KOMBUHE

UVOD

Utvrđeno je da je pogodan uticaj koji mnoge namirnice imaju na zdravlje ljudi posledica njihove antioksidativne aktivnosti. Antioksidanti su postali suštinski deo tehnologije konzervisanja hrane i savremene brige o zdravlju. Princip antioksidativne aktivnosti je zasnovan na sposobnosti elektrona da neutrališu slobodne radikale (Gülçin, 2012). Antioksidanti uneti hranom deluju zajedno u smanjenju nivoa reaktivnih kiseonikovih vrsta i to efikasnije od pojedinačno unetih antioksidanata, zato što mogu da funkcionišu sinergistički. Pored toga, smeša koja sadrži hidrosolubilne i liposolubilne antioksidante ima sposobnost da onemogućava dejstvo slobodnih radikala i u vodenim i u lipidnim fazama (Podsędek, 2007). Nova istraživanja su usmerena na ulogu koju antioksidanti prirodnog porekla imaju u hrani i na ljudsko zdravlje.

Kombuha je simbioza nekoliko sojeva kvasaca i bakterija sirćetne kiseline. U aerobnim uslovima, simbioza kombuhe je sposobna da prevede veoma jednostavan supstrat (saharoza i crni ili zeleni čaj) u blago gaziran, nakiseo i osvežavajući napitak. Proces traje 7-10 dana, na sobnoj temperaturi. Sastav dobijenog napitka čine šećeri, sirćetna, glukonska, glukuronska, L-mlečna, jabučna, vinska, malonska, limunska i oksalna kiselina, kao i etanol, 14 aminokiselina, hidrosolubilni vitamini, jedinjenja sa antibiotskom aktivnošću i pojedini hidrolitički enzimi (Malbaša et al., 2011a). Nove studije su pokazale da napitak od kombuhe poseduje antioksidativne, antimikrobne, antistresne osobine, štiti jetru i bubrege, snižava nivo holesterola i obezbeđuje olakšanje/izlečenje gastrične ulceracije, pa čak i kancera. Takođe, poseduje i potencijal funkcional-

ne hrane u cilju prevencije dijabetesa i njegovih sekundarnih komplikacija (Bhattacharya et al., 2013). Sem na tradicionalnom supstratu, kombuha ispoljava svoju metaboličku aktivnost i na alternativnim supstratima, kao što su biljni čajevi, melasa, topinambur, voćni sokovi, glukoza, fruktoza, mleko i tako dalje (Malbaša, 2009).

Kopriva je biljka koja pripada redu Urticales, porodici Urticaceae, rodu *Urtica* i vrsti *Urtica dioica* L. (Blečić, 1970). Kopriva je bogata mineralima (naročito gvožđem), vitaminom C i provitaminom A, koji su antioksidativni vitamini. Listovi koprive su dobar izvor esencijalnih aminokiselina, ugljenih hidrata, masnih kiselina i izolektina. Različiti tipovi ekstrakata koprive poseduju niz pozitivnih efekata po ljudsko zdravlje (Hojnik et al., 2007). Ranija istraživanja su pokazala da je moguće proizvesti napitak od kombuhe, kada se kao supstrat za fermentaciju koristi čaj od koprive (Lončar et al., 2011; Vitas et al., 2011; Malbaša et al., 2012), a dobijeni napitak da se primeni kao nekonvencionalna starter kultura u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda (Vitas et al., 2013). Fermentisana hrana i napici poseduju brojne nutritivne i terapijske osobine. Proizvodi koji spadaju u fermentisano mleko poseduju mnoge zdravstvene pogodnosti po ljudski organizam, kao što su antitumorska aktivnost, prevencija gastrointestinalnih infekcija, smanjenje nivoa serumskog holesterola i antitumorigena aktivnost. Ovi proizvodi su preporučeni za konzumiranje od strane ljudi netolerantnih na laktozu i obolelih od arterioskleroze (Shiby i Mishra, 2013). Istraživanja su pokazala da mononezasićene masne kiseline (MMK), koje se unose preko namirnica, nisu neutralne već snižavaju ukupni i LDL holesterol, slično polinezasićenim masnim kiselinama

Ključne reči: mononezasićene masne kiseline (MMK) • antioksidativna aktivnost • kombuha • kopriva • fermentisani mlečni proizvodi

Adresa autora:
dr Jasmina Vitas, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
tel: 021/485-3645; fax: 021/450-413
e-mail: jasminavitas2013@gmail.com

(PMK). Zamenja zasićenih masnih kiselina MMK neće sniziti nivo HDL holesterola. MMK mogu sniziti rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti zahvaljujući svojim antioksidativnim, antitrombičkim i antihipertenzivnim osobinama (Feldman, 1999).

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja temperature fermentacije i sadržaja mlečne masti mleka na sadržaj MMK i antioksidativnu aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću startera kombuhe kultivisanog na čaju od koprive (zaslađen dodatkom 7% saharoze). Mleko sa 1,6 i 2,8% mlečne masti je inkubirano dodatkom 10% (v/v) navedenog startera, na temperaturama od 37, 40 i 43°C.

MATERIJAL I METODI

Starter kombuhe

Starter kombuhe za fermentaciju mleka je dobijen kultivacijom kombuhe na čaju od koprive, koji je pripremljen na sledeći način: u 1 L ključale česmenske vode dodato je 70 g saharoze i 2,25 g lista koprive. Pripremljeni čaj je ohlađen na sobnu temperaturu, proceđen, a zatim je dodato 100 mL startera iz prethodne fermentacije, odnosno 10% (v/v) fermentativne tečnosti kombuhe. Čaša je prekrivena tkaninom propusnom za vazduh. Inkubacija kombuhe je izvedena na sobnoj temperaturi, tokom 7 dana.

Proizvodnja fermentisanih mlečnih proizvoda

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda u laboratorijskim uslovima korišćeno je pasterizovano, homogenizovano mleko sa 1,6 i 2,8% mlečne masti, proizvođača „AD IM-LEK“ Beograd, ogranak „Novosadska mlekara“, Novi Sad.

U odgovarajuće mleko je dodato 10% (v/v) startera kombuhe. Fermentacija mleka je izvedena na 37, 40 i 43°C do postizanja vrednosti pH od 4,5. Gel je zatim ohlađen na temperaturu od 8°C i homogenizovan mešalicom. Dobijeni uzorci su označeni sa K1,6-37, K1,6-40, K1,6-43, K2,8-40, K2,8-37 i K2,8-43 zavisno od sadržaja mlečne masti polaznog mleka i temperature na kojoj je izvedena fermentacija.

Metode analize

Sadržaj MMK je određen primenom GC-MS metode (Malbaša *et al.*,

2011b), dok je antioksidativna aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe ispitana merenjem uticaja na DPPH (Živković *et al.*, 2009) i hidroksi radikale (Deeseenthum i Pejovic, 2010).

Dobijeni proizvodi su analizirani nakon proizvodnje.

REZULTATI I DISKUSIJA

Sadržaj MMK

MMK su uobičajeni sastojci mlečne masti. Rezultati analize sadržaja MMK proizvedenih uzoraka su prikazani na slici 1.

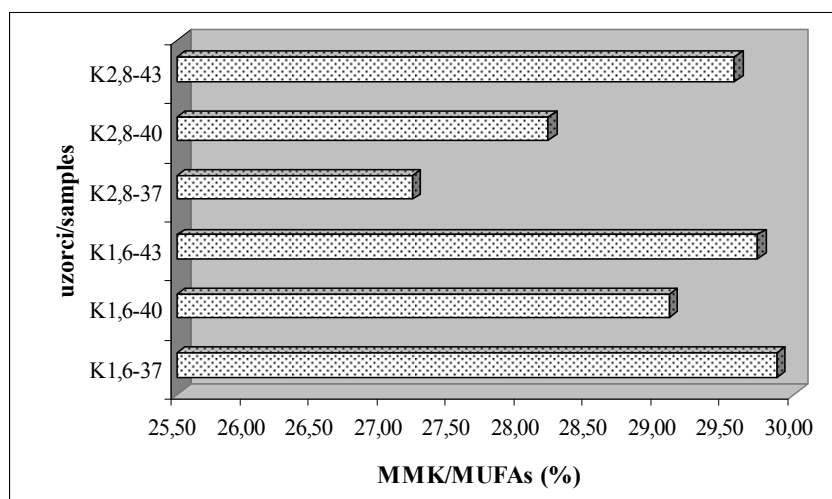
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 1, može se zaključiti da se sadržaj MMK uzoraka proizvedenih iz mleka sa 1,6% mlečne masti ne razlikuje značajno i kreće se u opsegu od 29,09% (K1,6-40) do 29,88% (K1,6-37). U slučaju proizvoda dobijenih iz mleka sa 2,8% mlečne masti sadržaj MMK je rastao sa porastom temperature fermentacije i kretao se u opsegu od 27,22% (K2,8-37) do 29,57% (K2,8-43). Prosečne vrednosti sadržaja MMK ukazuju da je njihov sadržaj veći u uzorcima iz mleka sa 1,6% mlečne masti (29,57%), u odnosu na proizvode iz mleka sa 2,8% mlečne masti (28,33%) (slika 1). Ukupne nezasićene masne kiseline (UNMK) fermentisanih mlečnih proizvoda čine MMK i PMK. Prema podacima (Berić, 2011; Munčan, 2011) sadržaj UNMK je približan. Uzimajući u obzir više

vrednosti MMK uzoraka iz mleka sa 1,6% mlečne masti u odnosu na proizvode iz mleka sa 2,8% mlečne masti može se zaključiti da je kod proizvoda iz mleka sa 2,8% mlečne masti veći sadržaj PMK.

Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale

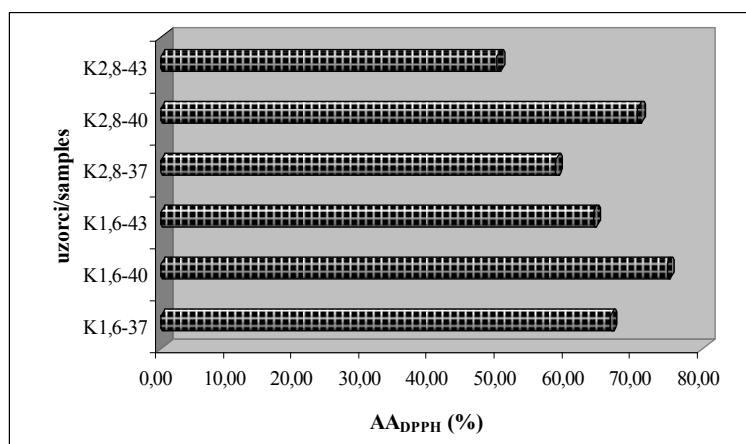
Utvrdjivanje antioksidativne aktivnosti merenjem procenta inhibicije DPPH radikala (AA_{DPPH}) spada u jednostavne i jeftine metode. DPPH radikali su stabilni i reaguju kako sa donorima elektrona, tako i sa donorima vodonika (Apak *et al.*, 2013). Rezultati analize antioksidativne aktivnosti fermentisanih mlečnih proizvoda dobijeni spektrofotometrijski merenjem uticaja na DPPH radikale prikazani su na slici 2.

Rezultati prikazani na slici 2 ukazuju da je AA_{DPPH} , kada se posmatra uticaj temperature fermentacije u okviru proizvoda dobijenih iz mleka sa različitim sadržajem mlečne masti, bila najveća za proizvode dobijene na 40°C i iznosila je 74,72% (K1,6-40) i 70,43% (K2,8-40). Najniža vrednost je utvrđena za uzorke proizvedene na 43°C (49,66% za uzorak K2,8-43 i 63,88% za uzorak K1,6-43). Prosečne vrednosti AA_{DPPH} , uzimajući u obzir uticaj sadržaja mlečne masti, ukazale su da proizvodi dobijeni iz mleka sa 1,6% mlečne masti poseduju višu AA_{DPPH} (68,32%) u odnosu na proizvode dobijene iz mleka sa 2,8% mleč-



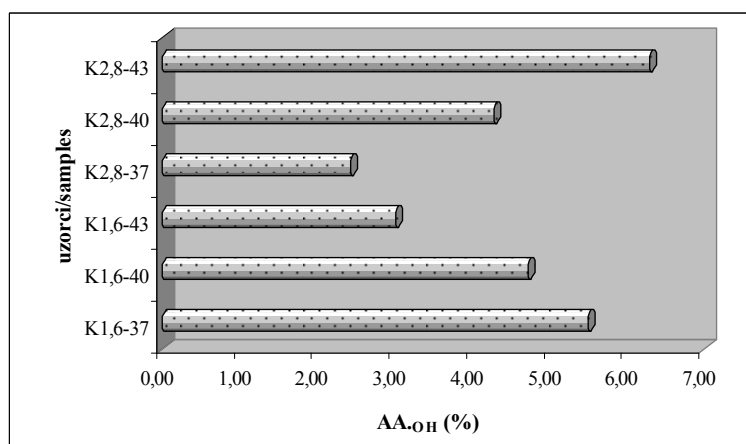
Slika 1. SADRŽAJ MMK FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA DOBIJENIH POMOĆU KOMBUHE KULTIVISANE NA ČAJU OD KOPRIVE

Figure 1. MUFA'S CONTENT IN FERMENTED MILK PRODUCTS OBTAINED BY THE ADDITION OF KOMBUCHA CULTIVATED ON STINGING NETTLE TEA



Slika 2: ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA DOBIJENIH POMOĆU KOMBUHE KULTIVISANE NA ČAJU OD KOPRIVE NA DPPH RADIKALE

Figure 2: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FERMENTED MILK PRODUCTS OBTAINED BY THE ADDITION OF KOMBUCHA CULTIVATED ON STINGING NETTLE TEA TO DPPH RADICALS



Slika 3: ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA DOBIJENIH POMOĆU KOMBUHE KULTIVISANE NA ČAJU OD KOPRIVE NA $\cdot$ OH RADIKALE

Figure 3: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FERMENTED MILK PRODUCTS OBTAINED BY THE ADDITION OF KOMBUCHA CULTIVATED ON STINGING NETTLE TEA TO HYDROXYL RADICALS

ne masti (59,44%) (slika 2). Uzimajući u obzir prosečne vrednosti sadržaja MMK i prosečne vrednosti AA_{DPPH} može se zaključiti da je viši sadržaj MMK u korelaciji sa višim vrednostima AA_{DPPH} proizvoda iz mleka sa 1,6% mlečne masti.

Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikale

Hidroksi radikali su visoko reaktivni i pripadaju radikalima sa slobodnim kiseonikom. Takođe, hidroksi radikali se mogu stvoriti u ljudskom organizmu

(Mimić-Oka *et al.*, 1999). Rezultati analize antioksidativne aktivnosti fermentisanih mlečnih proizvoda dobijeni spektrofotometrijski merenjem uticaja na hidroksi radikale (AA_{OH}) prikazani su na slici 3.

Vrednosti AA_{OH} proizvoda dobijenih iz mleka sa 1,6% mlečne masti su opadale sa porastom temperature fermentacije mleka, dok je u slučaju uzoraka proizvedenih iz mleka sa 2,8% mlečne masti navedeni trend bio suprotan (slika 3). Kada se posmatra uticaj sadržaja mlečne masti, prosečne vrednosti AA_{OH} ukazuju da ne postoji značajna razlika pošto za proizvode

dobijene iz mleka sa 1,6% mlečne masti ona iznosi 4,41%, a za uzorke proizvedene iz mleka sa 2,8% mlečne masti vrednost je 4,33% (slika 3). Rezultati dobijeni za sadržaj MMK (slika 1) uzoraka iz mleka sa 2,8% mlečne masti pokazali su da je njihov trend isti, kao i trend kretanja vrednosti AA_{OH} ovih uzoraka, što govori o korelaciji ove dve karakteristike.

ZAKLJUČAK

Antioksidativna aktivnost fermentisanih mlečnih proizvoda dobijenih pomoću kombuhe je utvrđena spektrofotometrijskim merenjem procenta inhibicije DPPH i hidroksi radikala. Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina je određen primenom metode gasna hromatografija-masena spektrometrija.

Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina je najveći za uzorak dobijen iz mleka sa 1,6% mlečne masti na temperaturi 37°C (29,88%). Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale je najveća kod proizvoda dobijenog na 40°C iz mleka sa 1,6% mlečne masti. Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikale je najveća za uzorak proizveden iz mleka sa 2,8% mlečne masti na temperaturi 43°C.

Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina uzoraka iz mleka sa 2,8% mlečne masti je rastao sa porastom temperature fermentacije, dok je kod uzoraka iz mleka sa 1,6% mlečne masti bio najveći na 37°C.

Antioksidativna aktivnost na DPPH radikale je najveća za proizvode dobijene na 40°C, a najmanja u uzorcima proizvedenim na 43°C.

Antioksidativna aktivnost na hidroksi radikale je kod uzoraka iz mleka sa 1,6% mlečne masti opadala sa porastom temperature fermentacije, dok je kod proizvoda iz mleka sa 2,8% mlečne masti trend bio suprotan.

Prosečne vrednosti antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale ukazuju na višu vrednost ove aktivnosti proizvoda dobijenih iz mleka sa 1,6% mlečne masti, dok prosečne vrednosti antioksidativne aktivnosti na hidroksi radikale ne ukazuju na značajne razlike, u okviru ove dve grupe proizvoda.

ZAHVALNICA

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za finansiranje istraživanja predstavljenih u ovom radu, projekat III-46009.

LITERATURA

- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013): Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85, 957-998.
- Berić, Đ.: Uticaj inokuluma na sadržaj masnih kiselina u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe sa lekovitim biljem, Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, 2011.
- Bhattacharya, S., Gachhui, R., Sil, P.C. (2013): Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 328-340.
- Blečić, V. (1970): Rod *Urtica*. In: Flora SR Srbije, II tom, 62-65.
- Gülçin, İ. (2012): Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Deeseenthum, S., Pejovic, J. (2010). Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. *Biotechnology*, 9(3), 332-337.
- Feldman E.B. (1999): Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 953-954.
- Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž. (2007): Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Separation and Purification Technology*, 57, 37-46.
- Lončar, E., Malbaša, R., Vitas, J., Đurić, M., Kolarov, Lj. (2011): Characteristics of kombucha fermented milk products with stinging nettle. *Abstract Book of the 4th International Congress on Food and Nutrition together with 3rd SAFE Consortium International Congress on Food Safety*, 12-14 October 2011, Istanbul Congress Center, Istanbul, Turkey, 107.
- Malbaša, R. (2009): Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe (monografija), Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Čanadanović-Brunet, J.M. (2011a): Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry*, 127, 1727-1731.
- Malbaša, R., Vitas, J., Lončar, E., Kravić, S. (2011b): Influence of fermentation temperature on the content of fatty acids in low energy milk-based kombucha products. *Acta Periodica Technologica*, 42, 81-90.
- Malbaša, R.V., Vitas, J.S., Lončar, E.S., Milanović, S.D. (2012): Physical and textural characteristics of fermented milk products obtained by kombucha inoculums with herbal teas. *Acta Periodica Technologica*, 43, 51-59.
- Mimić-Oka, J., Simić, D., Simić, T. (1999): Free radicals in cardiovascular diseases. *The scientific journal FACTA UNIVERSITATIS (Series: Medicine and biology)*, 6, 11-22.
- Munčan, D.: Uticaj temperature fermentacije na sadržaj masnih kiselina u fermentisanim mlečnim napicima od kombuhe sa lekovitim biljem, Master rad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, 2011.
- Podsędek, A. (2007): Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Shiby, V.K., Mishra, H.N. (2013): Fermented milks and milk products as functional foods-a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53, 482-496.
- Vitas, J., Malbaša, R., Vukić, V., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2011): Quality of different milk-based products obtained by means of kombucha. *Proceedings of Papers of 2nd CEF-SER (Center of Excellence in Food Safety and Emerginf Risks) WORKSHOP Persistent organic pollutants in food and the environment. 26th Symposium on Recent Developments in Dairy Technology. BIOXEN seminar Novel approaches for environmental protection*, Novi Sad, Serbia, 8-10 September, 2011, 76-81.
- Vitas J.S., Malbaša R.V., Grahovac J.A., Lončar E.S. (2013): The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quaterly*, 19, 129-139.
- Živković, J., Sunarić, S., Trutić, N., Pavlović, R., Kocić, G., Nikolić, G., Jovanović, T. (2009): DPPH radical-scavenging activity of pasteurized cow milk. *Food industry-Milk and dairy products*, 20(1-2), 45-47.

SUMMARY

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND MONOUNSATURATED FATTY ACIDS CONTENT OF KOMBUCHA FERMENTED MILK PRODUCTS

Jasmina S. Vitas, Radomir V. Malbaša, Eva S. Lončar, Spasenija D. Milanović, Snežana Ž. Kravić, Irena Z. Suturović

University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad, Serbia

The aim of this paper was the investigation of fermentation temperature and milk fat content to the monounsaturated fatty acids (MUFAs) content and antioxidant activity of fermented milk products obtained by the addition of kombucha cultivated on stinging nettle tea.

Monounsaturated fatty acids content of the obtained products was determined with GC-MS and the antioxidant activity was followed by measuring the influence to the DPPH and hydroxyl radicals.

Milk fermentation temperature did not have significant influence on the monounsaturated fatty acids content of the samples produced from milk with 1.6% milk fat content. The content of these fatty acids increased with the increase of fermentation temperature in products obtained from milk with 2.8% milk fat content.

Antioxidant activity to DPPH radicals was the highest for products obtained at 40°C, for both types of milk.

Antioxidant activity to hydroxyl radicals decreased with the increase of fermentation temperature for products obtained from milk with 1.6% milk fat content. This trend was opposite for samples produced from milk with 2.8% milk fat content.

The products obtained at 43°C from milk with 2.8% milk fat content showed the highest value of antioxidant activity to hydroxyl radicals, which indicated its better quality from the aspect of antioxidant activity.

Key words: monounsaturated fatty acids (MUFAs) • antioxidant activity • kombucha • stinging nettle • fermented milk products

SPASENIJA D. MILANOVIĆ
MIRELA D. ILIČIĆ
MARJAN I. RANOGAJEC
DAJANA V. HRNJEZ
VLADIMIR R. VUKIĆ
KATARINA G. KANURIĆ

University of Novi Sad, Faculty of
Technology, Novi Sad, Serbia

ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK: 637.146:631.563.1:663

THE INFLUENCE OF A SELECTED STARTER CULTURE ON THE QUALITY OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES DURING STORAGE

The effect of three different starters (traditional, probiotics and kombucha inoculum) on quality of fermented dairy products were investigated. All samples were produced from milk with 2.8% w/w of fat.

Chemical composition and physicochemical characteristics of samples were analysed after production. pH value, total acidity, textural properties and viscosity of fermented milk products were measured during 14 days of storage.

Key words: fermented dairy beverages• starter culture •quality• storage

INTRODUCTION

Fermented dairy beverages are a very diverse group of highly nutritional value products. They play an important role both in the human diet and in the modern life style. These beverages are obtained by milk fermentation with the use of traditional and non-conventional starter cultures. Besides the traditional thermophilic starters (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*), great progress in modern technology of fermented dairy beverages has been made by the development of new types of probiotic bacteria, most commonly by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains.

The application of kombucha (non-conventional starter) in the technology of fermented dairy products has gained considerable popularity among novel researchers. Kombucha or a tea fungus, as some authors prefer to call it, is a symbiotic association of yeast and acetic acid bacteria. It is traditionally cultivated on a sweetened black tea, but also it may be cultivated on other substrates such as: dark beer, Coca-Cola, vine (red or white), topinambur extract, echinacea, mint tea, Rtanj tea, whey, lactose, and others. Because of the kombucha's metabolic activity, a refreshing product with a sour taste can be obtained, and according to recent scientific research, it has many health benefits.

The aim of this study was to investigate the influence of different types of the starter cultures, such as traditional, probiotic, and kombucha inoculums, on a quality of the fermented dairy beverage produced from milk with 2.8% of milk fat. An analysis of chemical composition and physicochemical characteristics was done after the production of various types of the beverages. Acidity, pH value, tex-

tural characteristics and viscosity were analyzed during 14 days of storage.

MATERIALS AND METHODS

Milk

Pasteurized and homogenized milk with 2.8% of milk fat was used for the production of fermented dairy beverages. Milk was taken from "Mlekara Subotica", Subotica, and the quality of milk was in accordance with "The regulations on the quality of raw milk" (Sl. glasnik RS 21/2009) and "The regulations on the quality of dairy products and starter cultures" (Sl. glasnik RS, 33/2010 and 69/2010).

Starter cultures

Three different types of starter cultures were used for the production of the fermented dairy beverages.

A classic yoghurt was produced with YF-L812 starter culture, which contains *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Chr. Hansen, Denmark). Probiotic yoghurt was produced with ABT-10 starter culture. This starter culture contains *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *lactis* bb 12, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen, Denmark).

In addition, a non-conventional kombucha inoculums starter was used for the production of the last type of the fermented dairy beverages, and the kombucha was obtained according to previous research (Milanović et al., 2002). The kombucha was obtained on black tea ("Vitamin", Serbia) (1.5 g/L) with sucrose concentration of 70 g/L. The tea solution, cooled to room temperature, was inoculated with 10% v/v fermentation from previous kombucha fermentation.

Author address:
Prof. Dr. Spasenija Milanović, University of Novi
Sad, Faculty of Technology, Bulevar cara Lazara
1, 21000 Novi Sad, Serbia
Phone: +381 21 485 3712
e-mail: senadm@uns.ac.rs

Production of fermented dairy beverages

In 1000 ml of milk (with 2.8% fat), heated to 42°C, three types of differently prepared inoculum were added: a) yoghurt starter culture (0.05 g / 900 ml), b) probiotic starter culture (0.05 g / 900ml), and c) 10% (v/v) kombucha inoculum taken immediately after cultivation. Fermentation lasted until pH reached 4.5 level. After that gel was cooled to the temperature of 8°C, and homogenized by an electric mixer. Products were stored for 14 days in a fridge at a temperature of 4°C.

Analysis of milk and fermented dairy products

Physicochemical analysis of these three types of fermented dairy beverages was performed right after the production, and in addition after 7 and 14 days of the production process. For this purpose standard methods of analysis were used: pH value was measured with a pH meter (EcoScan pH 6, Eutech Instruments, Nijkerk, Holand), and the total acidity was calculated according to Lončar et al. (2013).

Chemical composition of beverages was analyzed after the production (Carić et al., 2000):

- dry matter with direct method on the temperature of 102±1 °C,
- milk fat by the Gerber method,
- total proteins by Kjeldahl method
- lactose was calculated with the volumetric method
- lactic acid was determined by spectrophotometric method (UV/VIS Spectrophotometer PYE UNICAM, England).

The energy value of fermented dairy beverages was calculated as follows:

$$EV = (\% \text{ proteins} \times 4.4 + \% \text{ milk fat} \times 9.3 + \% \text{ total sugar} \times 4.1) \times 4.186 \text{ [kJ/100g]}$$

Textural characteristics of fermented dairy beverages were examined after the production, before and after the homogenization process, and during the storage period at temperature of +4°C. Texture analyzer TA.XPplus (Micro Stable System, England) was used for these analyses. The force of compression was measured using a disc A / BE with a diameter of 35 mm, and weight extension bar which load is 5kg. It was used the option "Return

to Start". A speed disk displacement before and during the test was 1.0 mm/s. The disk has exceeded the distance of 30 mm.

The viscosity of the samples was measured at the temperature of +5°C with the Haake Rheo Stress 600 (Karlsruhe, Germany), with different rotational speed (0-40 and 0-25 1/s). The changes in viscosity of the samples were measured before the homogenization, and during 7 and 14 days of storage.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characteristics of the fermented dairy beverages after the production are shown in table 1.

According to the results presented in table 1, fermentation time was the

Chemical composition of fermented dairy beverages is shown in table 2.

The highest value of dry matter (table 2) has the probiotic yoghurt (12.01%), and the lowest has the kombucha FDB (11.66%). As in a previous case, the probiotic yoghurt has the maximum value of total proteins (3.07%), and the lowest value has the kombucha FDB (2.77%). The average value of lactose is in accordance with literature data (Carić et al. 1997). Lower content of total solids and macro-components of kombucha fermented dairy beverage compared to other beverages is caused by addition of 10% kombucha starter which diluted the milk intended for fermentation.

The value of dry matter in the samples was between 0.36% (kombu-

Table 1. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE FERMENTED DAIRY BEVERAGE AFTER PRODUCTION

Tabela 1. FIZIČKO-HEMIJSKE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA NAKON PROIZVODNJE

Sample	Fermentation time (h)	pH value	Titrateable acidity (°SH)	Total acidity (g lactic acid/L)
Traditional yoghurt	3.91	4.57	31.0	7.24
Probiotic yoghurt	3.91	4.52	31.9	7.38
Kombucha FDB	7.75	4.54	31.5	7.11

longest for the kombucha FDB (7.75 h), but for the traditional and probiotic yoghurt it lasted for a shorter period of time (just 3.91 h). These results are in accordance with previous researches (Milanović et al., 2002; Ilić, 2010). The pH value after fermentation is similar for all samples, and titrateable acidity was the highest for the probiotic yoghurt (31.9°SH), and the lowest for the traditional yoghurt (31°SH). The probiotic yoghurt had the highest total acidity (7.38 g lactic acid/L) and lowest was for the kombucha FDB with 7.11 g lactic acid/L.

cha) and 0.39% (probiotic yoghurt), and the energy value for the kombucha FDB is 225 KJ/100g.

Physicochemical changes during the storage

During storage of these dairy beverages changes were detected by the pH value and total acidity (figure 1). During 14 days of storage period, pH value has decrease for all products, but still the greatest value had the traditional yoghurt (4.30), and the lowest the probiotic yoghurt (4.07).

Table 2. COMPOSITION OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES

Tabela 2. HEMIJSKI SASTAV FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA

Sample	Dry matter (%)	Total proteins (%)	Lactose (%)	Lactic acid (%)	Energy value (kJ/100g)
Traditional yoghurt	11.91	2.98	-	-	-
Probiotic yoghurt	12.01	3.07	3.92	0.39	233
Kombucha FDB	11.66	2.77	3.77	0.36	225

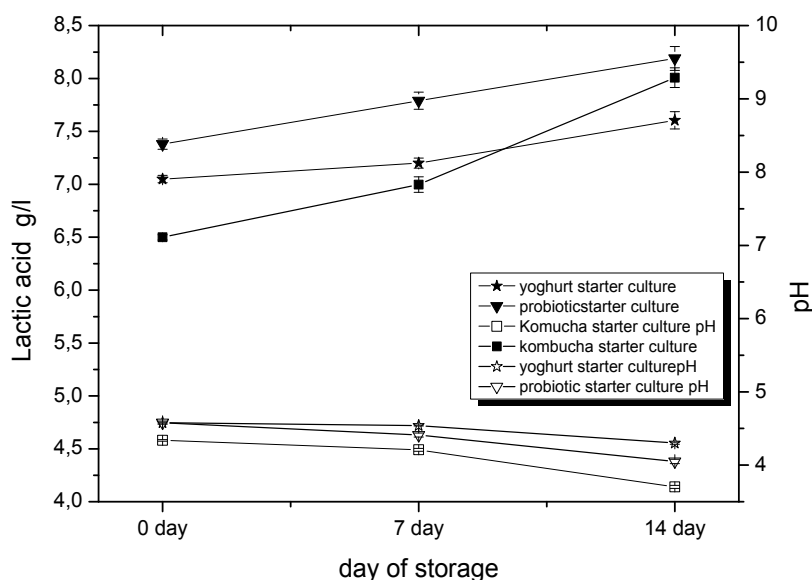


Figure 1. CHANGES OF pH VALUE AND TOTAL ACIDITY DURING STORAGE

Slika 1. PROMENA pH VREDNOSTI I KISELOSTI TOKOM SKLADIŠTENJA FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

The changes of total acidity during the storage period are similar to the changes of the pH value. After the production, total acidity in the samples was around 7.2 g/L, but there are significant changes during the storage period. After 14 days, the highest acidity has kombucha FDB (9.29 g/L), and the lowest one has the traditional yoghurt (7.61 g/L). Based on these results, the changes in total acidity are the lowest for the traditional yoghurt, and this shows that ability for post acidification is the lowest for the traditional yoghurt starter culture.

Textural characteristics of the fermented dairy beverages

Textural characteristics of fermented dairy beverages after the production are shown in table 3.

Table 3. TEXTURAL CHARACTERISTICS OF THE FERMENTED DAIRY BEVERAGES AFTER PRODUCTION

Tabela 3. TEKSTURALNE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA NAKON PROIZVODNJE

Sample	Firmness (g)	Consistency (gs)	Cohesiveness (g)	Index of viscosity (gs)
Traditional yoghurt	129.142	3396.174	-128.770	-307.315
Probiotic yoghurt	130.743	3209.654	-122.774	-94.196
Kombucha FDB	71.266	1598.961	-51.384	-125.234

According to these results, the firmness for the traditional and probiotic yoghurt is very similar, and it is significantly lower for the kombucha fermented dairy beverage. These results are in accordance with previous research (Ilić et al. 2013). The traditional yoghurt has the greatest consistency (3396.174 gs), and the lowest one has the kombucha FDB (1598.961gs). In addition, the traditional yoghurt has the greatest value of cohesiveness (-128.770g), and the lowest has the kombucha FDB (51.384g). On the other hand, the lowest index of viscosity has the probiotic yoghurt. There is some difference in firmness and consistency in the samples when compared with the previous results from Ilić et al. (2010). This can be explained in the difference of the amount of milk fat used in the fermentation procedure, because in Ilić et al. (2010) paper milk with 0.9% fat was used.

Textural characteristics of fermented dairy beverages were monitored during storage period, and can be seen in figure 2.

After the production and homogenization process, the highest value of the firmness (figure 2a) has the kombucha FDB (15.11 g), and the lowest probiotic yoghurt (113.01 g). During the period of storage the firmness has changed significantly, and after the seven days period, the value of the firmness has dropped. Still the highest value has the kombucha FDB, and the lowest has the probiotic yoghurt. On the other hand, after the 14 days period, the value in all samples has risen due to structural changes. The highest firmness has the probiotic yoghurt, and the lowest kombucha FDB.

The consistency of the traditional and probiotic yoghurt has similar values after the homogenization process (Figure 2b), and the value for the kombucha FDB is for 6.5% higher in comparison with the first two samples. After seven days of storage, the consistency for all samples has declined, but after 14 days of storage the consistency in all samples has risen. In the probiotic and traditional yoghurt the value has increased for 15.5%, and in the kombucha FDB for 7.4%. The highest consistency has the probiotic yoghurt (410.457 gs), and the lowest kombucha FDB (370.049 gs).

According to figure 2c, the value of cohesiveness is the highest in the traditional yoghurt, and the lowest in kombucha FDB. After seven days, the cohesiveness is significantly lower in the probiotic yoghurt. The highest value has the traditional yoghurt, and the lowest has the probiotic yoghurt. In the next seven days, the value of cohesiveness has increased in all samples.

The highest index of viscosity has the probiotic yoghurt, and the lowest has kombucha FDB (figure 2d). After seven days of storage, the highest index of viscosity has the traditional yoghurt. For the same period of storage, the probiotic yoghurt and kombucha FDB have similar values. After 14 days of storage, the index of viscosity is lower in the traditional yoghurt, the probiotic yoghurt has slightly higher value, and the changes in the kombucha FDB sample is insignificant.

The estimated changes of textural characteristics of fermented dairy beverages produced from milk with 2.8% fat have the similar trend as published data for products obtained by milk fer-

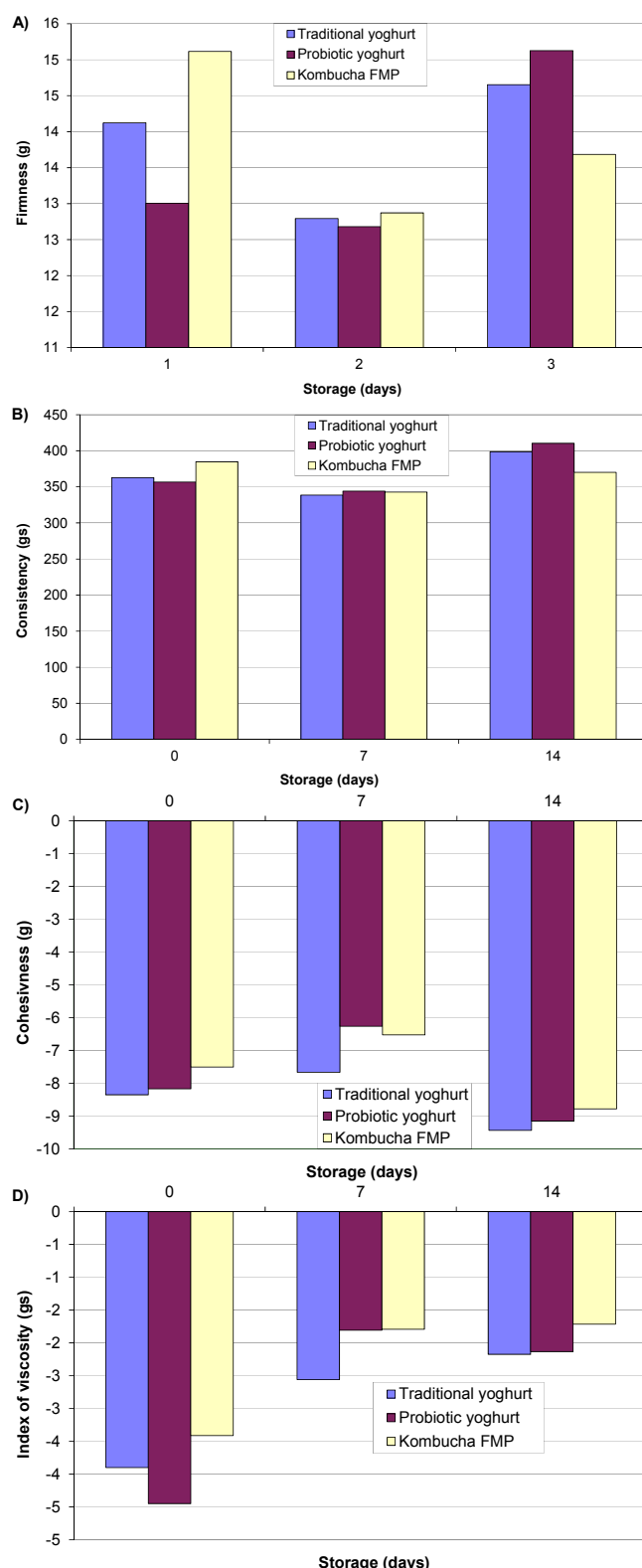


Figure 2. TEXTURAL CHARACTERISTICS OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES DURING THE STORAGE PERIOD: A) FIRMNESS, B) CONSISTENCY, C) COHESIVENESS, AND D) INDEX OF VISCOSITY

Slika 2. TEKSTURALNE KARAKTERISTIKE FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA TOKOM SKLADIŠTENJA: A) ČVRSTOĆA, B) KONZISTENCIJA, C) KOHEZIVNOST I D) INDEKS VISKOZNOSTI

mentation with 0.9 and 2% fat. (Iličić, 2010; Iličić et al, 2013; Romanian).

Viscosity of the fermented dairy beverages

The viscosity of the fermented dairy beverages was measured after the production process, but before the homogenization, and then during 7 and 14 days of storage period. According to the figure 3, the type of the starter culture has a significant influence on the viscosity values of the samples. The value of viscosity is dropping with the increase of the shear speed, and this is in accordance with the previous research data (Rohm, 1993; Jacob, 2011; Iličić et al. 2013).

After the production process, and before homogenization procedure (figure 3a), the viscosity of the traditional and kombucha FDB are almost the same, and the viscosity value for the probiotic yoghurt is slightly higher.

On the seventh day of storage period, the viscosity of the samples is very different (figure 3b). The highest value has the traditional yoghurt, and the lowest value probiotic yoghurt. During this seven day period the viscosity of the samples is declining with the increase of the shear speed.

After 14 days of the storage, the viscosity of all samples is almost at the same level (figure 3c), and the trend is the same as seven days before. It declines with the increase of the shear speed.

CONCLUSION

The obtained results showed that physicochemical characteristics, textural properties and the viscosity of fermented dairy beverages produced with three different starter culture changed during 14 days of storage.

pH value in all samples decreased during storage, with different dynamics depending on the type of starter culture.

Viscosity of probiotic yoghurt was higher compared to traditional yoghurt and kombucha fermented milk beverage. During storage, viscosity in all samples decreased. The differences in viscosity between samples were not significant after 14 days of storage.

ACKNOWLEDGEMENT

This investigation is financially supported by Ministry of Education,

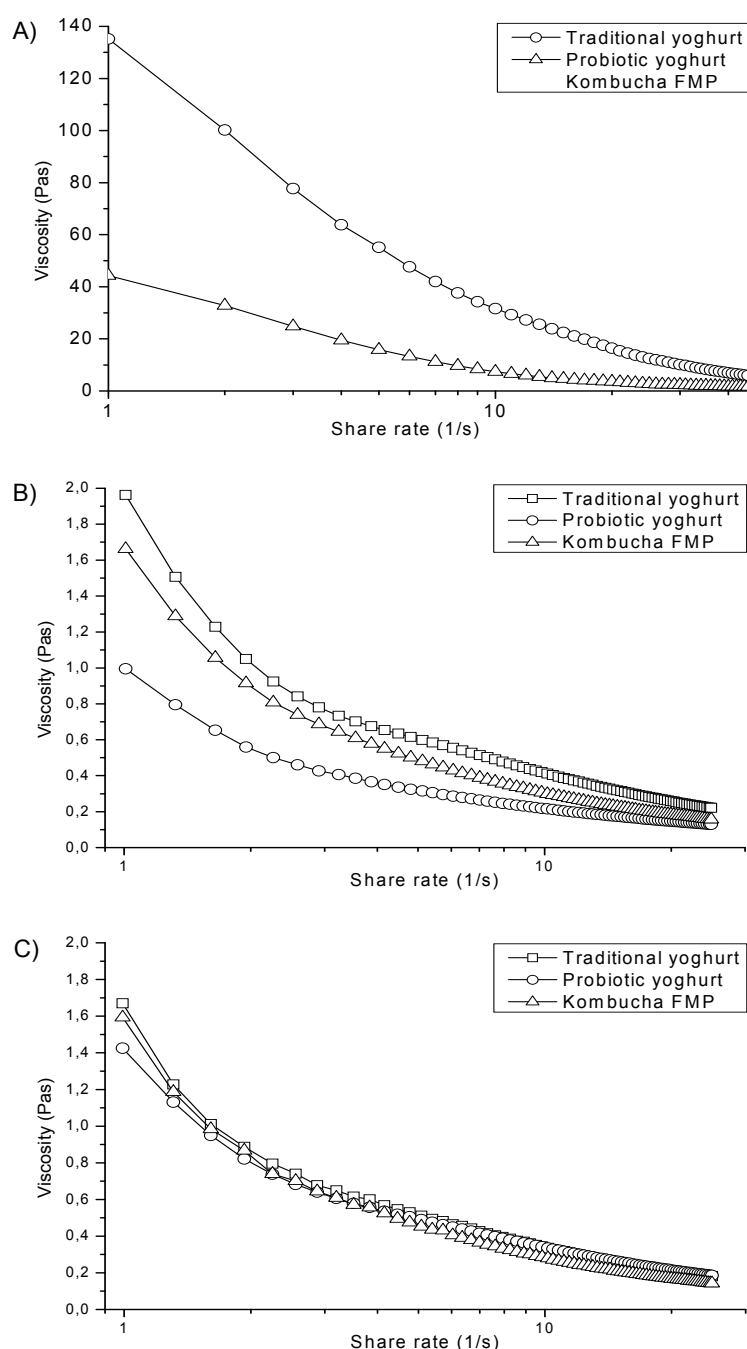


Figure 3. VISCOSITY OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES DURING THE STORAGE PERIOD: A) AFTER GELATION, B) 7 DAYS AND C) 14 DAYS.

Slika 3. VISKOZITET FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA TOKOM SKLADIŠTENJA: A) NAKON PROIZVODNJE, B) 7 DANA I C) 14 DANA.

Science and Technological Development, Republic of Serbia, Project No. 46009.

REFERENCES

- Carić, M., Milanović, S. (1997): Topljeni sir, Nauka, Beograd.
- Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D. (2000): Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda, Prometej, Novi Sad, p. 202.
- Iličić M. (2010): Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Vukić, V., Kanurić, K., Ranogajec, M., Hrnjez, D. (2013): The effect of transglutaminase on rheology and texture of fermented milk product. *Journal of Texture Studies*, 44, 160-168.
- Jacob, M., Nöbel, S., Jaros, D., & Rohm, H. (2011). Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids*, 25, 928-934.
- Lončar E., Kanurić K., Malbaša R., Đurić M., Milanović S. (2013): Kinetics of saccharose fermentation by kombucha, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, doi:10.2298/CICEQ121113016L.
- Milanović, S., Carić, M., Lončar, E., Panić, M., Malbaša, R., Dobrić, D. (2002): Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka, *Prehrambena industrija- Mleko i mlečni proizvodi*, Vol. 13, 1-2, 8-13.
- Rohm, H. (1993): Influence of dry matter fortification on flow properties of yoghurt 2. Time dependant behavior. *Milchwissenschaft*, 48, 614-617.
- Malbaša, R., Lončar, E., Milanović, S., Kolarov, Lj. (2009): Use of milk-based kombucha inoculum for milk fermentation, *Acta Periodica Technologica*, 40, 47-53.
- Milanović, S., Iličić, M., Lončar, E., Ranogajec, M., Hrnjez, D., Kanurić, K., Vukić, V. (2011): Nutritive and functional characteristics of kombucha fermented milk beverage, 5th PSU-UNS International conference on engineering and technology p131-135.
- Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M., Kolarov, Lj., Milk-based beverages obtained by Kombucha application *Food Chem.* 112 (2009b) 178-84
- Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V., Hrnjez, D., Iličić, M., Ranogajec, M., Milanović, M. Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. *African Journal of Biotechnology*, 11 (9) (2012) 2320-2327.
- Iličić, M., Kanurić, K., Milanović, S., Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R. Lactose fermentation by Kombucha - a process to obtain new milk-based beverages. *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (1), (2012) 7013-7021.

IZVOD

UTICAJ STARTER KULTURE NA KVALITET FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA TOKOM SKLADIŠTENJA

Spasenija D. Milanović, Mirela D. Ilić, Marjan I. Ranogajec, Dajana V. Hrnjez,
Vladimir R. Vukić, Katarina G. Kanurić

Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija

U radu je dat komparativni prikaz uticaja različitih starter kultura (tradicionalna, probiot-ska i inokulum kombuhe) na kvalitet fermentisanog mlečnog proizvoda dobijenog iz mleka sa 2,8% mlečne masti. Nakon proizvodnje analiziran je hemijski sastav i fizičko hemijske osobine fermentisanih napitaka. Tokom 14 dana skladištenja praćena je promena pH vred-nosti, ukupna kiselost, teksturalne karakteristike i viskozitet proizvedenih varijanti fermenti-sanih mlečnih napitaka.

Ključne reči: fermentisani mlečni napici •
starter kulture • kvalitet • skladištenje

¹ MILKA J. STIJEPIĆ
² SPASENIJA D. MILANOVIĆ
¹ JOVANA R. GLUŠAČ
³ DRAGICA M. ĐURĐEVIĆ-
 MILOŠEVIĆ

¹ Visoka medicinska škola Prijedor
 Prijedor, Bosna i Hercegovina
² Univerzitet u Novom Sadu Tehnološki
 fakultet Novi Sad, Srbija
³ Anahem Laboratorija, Beograd, Srbija

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.146:66.022.392

PRIMJENA RAZLIČITIH DODATAKA U PROIZVODNJI FERMENTISANIH MLIJEČNIH NAPITAKA

UVOD

Zahvaljujući širokom asortimanu i velikoj raznovrsnosti mlečnih proizvoda, potrošnja fermentisanih mliječnih proizvoda danas je u svijetu sve veća. Razlog tome je povećanje njihove nutritivne i zdravstvene vrijednosti, uz zadržavanje poželjnih fizičko-hemijskih i senzorskih svojstava tokom skladištenja (Lucey, 2004; Tamime i Robinson, 2007). Poboljšanje kvaliteta fermentisanog mliječnog proizvoda može se postići, pored optimizacije tehnološkog procesa i izbora startera, korištenjem i različitih dodataka poznatog hemijskog sastava. Bez obzira na nutritivnu vrijednost, dodaci se ne konzumiraju kao hrana niti su tipičan sastojak hrane, već se njihovom primjenom žele poboljšati tehnološka i senzorska svojstva gotovog proizvoda. Od dodataka u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda koriste se: mlijeko u prahu, obrano mlijeko u prahu, surutka u prahu, proizvodi na bazi kazeina, proizvodi na bazi surutke, inulin, prirodni šećeri, umjetna sladila, boje, stabilizatori, vitamini i dr.

U radu je dat pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za osobine i značaj koncentrata proteina surutke (KPS), inulina (IN) i meda (M) u ishrani, primjenu u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda, kao i uticaj navedenih dodataka na mikrobiološka, fizičko-hemijska, reološka i senzorska svojstva, te mikrostrukturu fermentisanih mliječnih proizvoda.

DODACI U PROIZVODNJI FERMENTISANIH MLEČNIH PROIZVODA

Proteini surutke

Najvažniji proteini surutke su β -laktoglobulini i α -laktalbumini koji su genski proizvodi mliječne žlijezde.

Prema Morr-u, (1985) β -laktoglobulini predstavljaju oko 50% ukupnih proteina surutke i 12% ukupnih proteina mlijeka. α -Laktalbumini čine oko 20% ukupnih proteina surutke, ili 2-5% ukupnih azotnih materija mlijeka. Dalje slijede termostabilni proteoze-peptoni, koji djelimično potiču i od hidrolize β -kazeina, te albumin krvnog seruma i imunoglobulini (Pihlanto, 2011). Pored ovih proteina, prisutni su i drugi bioaktivni peptidi u malim količinama, kao što su kazomorfini, fosfopeptidi, laktoferin, laktolin, glikoprotein, krvni transferin i dr. (Pihlanto, 2011; McGregor i Poppitt, 2013).

Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti proteini surutke su svrstani u grupu funkcionalne hrane (Uysal-Pala i sar., 2006). Ovi proteini imaju dobro izbalansiran odnos esencijalnih aminokiselina što im daje veliku prednost u biološkom kvalitetu u odnosu na druge proteine animalnog i biljnog porijekla. Posjedovanje izvrsnih funkcionalnih svojstava (sposobnost želiranja i emulgovanja i obrazovanje i stabilizacija pjene), proteinima surutke omogućuje uklapanje u brojne mliječne proizvode, uključujući i fermentisane. Osim toga, proteini surutke stimuliraju rast nekih bakterija mliječne kiseline što je posebno važno u primjeni probiotičkih kultura koje se teže adaptiraju i sporije rastu u mlijeku. S druge strane, ispitivanja u oblasti funkcionalne hrane daju ohrabrujuće rezultate i u pogledu korištenja proteina surutke kao dodatka u poboljšanju imunološkog statusa organizma. Imunoglobulini i nespecifični imunoaktivni sastojci proteina surutke štite organizam od bakterija, virusa i uzročnika zaraznih bolesti, te se koriste pri liječenju i najtežih oboljenja. Nadalje, proteini surutke odavno se smatraju nezamjenljivim suplementima u ishrani vrhunskih

Fermentisani mliječni proizvodi danas čine najpopularniju grupu funkcionalne hrane. Njihova nutritivna, fizičko-hemijska i funkcionalna svojstva, te zdravstvena vrijednost, mogu se povećati uz primjenu različitih dodataka. Među dodacima, svakako, značajno mjesto zauzimaju koncentri proteina surutke (KPS) i inulin (IN), a zbog izraženih ljekovitih i prebiotičkih svojstava i među se posvećuje sve veća pažnja. Pregled dosadašnjih istraživanja vezanih za osobine i značaj KPS, inulina i meda u ishrani, sa posebnim akcentom na njihov potencijal i primjenu u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda prikazan je u radu. Takođe, analiziran je uticaj navedenih dodataka na mikrobiološka, fizičko-hemijska, reološka i senzorska svojstva, kao i mikrostrukturu fermentisanih mlečnih proizvoda.

Ključne reči: fermentisani mliječni proizvodi • KPS • inulin • med • mikrobiološka • fizičko-hemijska, reološka i senzorska svojstva • mikrostruktura

Adresa autora:
 Dr Milka J. Stijepić, Visoka medicinska škola,
 Nikole Pašića 4a, 79101 Prijedor, Republika
 Srpska, BiH
 Telefon: +387 52 242 380; Fax: +387 52 242 381
 E-mail: stjepicmilka@gmail.com

sportista pri oporavku, izgradnji i razvoju mišićnog tkiva, jer se njihove aminokiseline razgranatog lanca (BCAA) direktno metaboliziraju i prenose u mišićno tkivo. Korisnost proteina sirutke pokazala se i kod djece, adolescenata, trudnica, kao i kod ljudi u zreloj dobi (Mc Gregor i Pop-pitt, 2013).

S obzirom da su proteini sirutke tipični globularni proteini, posebno bitan faktor koji određuje osobine, a time i moguću primjenu proteina sirutke u prehrambenim proizvodima je stepen djelovanja visokih temperatura (Jovanović i sar., 2004). Tako je i u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda, za stvaranje njihovog koaguluma termički tretman mlijeka je jedan od najvažnijih procesnih parametara. Istraživanja su pokazala da se primjenom strožijih termičkih tretmana, između kazeina i proteina sirutke obrazuju hemijski kompleksi-koagregata proteina mlijeka. Naime, na temperaturama iznad 70°C u mlijeku se odvijaju kompleksne fizičko-hemijske, biohemijske i mikrobiološke promjene, koje preko denaturacije i agregacije proteina sirutke, interakcije proteina sirutke sa kazeinskom micelom, reakcije između laktoze i proteina (Mail-lard-ova reakcija), promjene u strukturi kazeinske micelle, prelaskom kalcijuma i fosfata iz rastvorljivog u koloidno stanje, sniženjem pH vrijednosti, utiču na konzistenciju i kvalitet proizvoda (Tamime i Marshall, 1997; Sourd-et i sar., 2003). Sva pitanja koja proizilaze iz ove problematike su veoma složena, a odnose se prije svega na izbor optimalnog termičkog tretmana, pri kojem se koagregati obrazuju u najvećem stepenu.

Zahvaljujući primjeni novih procesnih tehnika (npr. membranske tehnike frakcionisanja), danas je u primjeni široka paleta proizvoda na bazi proteina sirutke, pri čemu su najzastupljeniji proteinski koncentraci (KPS) i izolati (IPS). IPS imaju veću koncentraciju proteina u suvoj materiji (više od 90%) i manje ostalih sastojaka (laktoze, masti, mineralnih materija) od KPS čiji sadržaj proteina u suvoj materiji se kreće 50-70%.

Koncentraci proteina sirutke

Koncentraci proteina sirutke (KPS) imaju širok raspon variranja sadržaja proteina koji se kreće od 35-80%, dok moderni koncentraci sadrže i nešto više proteina uz redukovanu količinu laktoze i masti. Iako koncentraci sadrže manje proteina u odnosu na izola-

te, koncentraci visokog kvaliteta sadrže raznovrsne interesantne komponente koje rijetko možemo pronaći u izolatima. Dobar koncentrat sadrži daleko veći udio faktora rasta (IGF-1, TGF-alfa i TGF-beta), različite bioaktivne masti (konjugovane linolne kiseline, npr.), a često i viši nivo imunoglobulina i laktoferina. KPS su relativno jeftin i lako dostupan izvor proteina sirutke, a za njegovu proizvodnju koriste se različite tehnike, kao što su ultrafiltracija i dijalizacija (Herceg i Režek, 2006; Walstra i sar., 2006), reverzna osmoza, elektrodijaliza, dijaliza, mikrofiltracija, tehnike koje se zasnivaju na taloženju, ili kompleksiranju sa različitim reagensima i tehnike fizičke i hromatografske separacije (Tratnik, 1998; Mayyada i sar., 2011). Sastav, kvalitet i funkcionalne karakteristike variraju i to u zavisnosti od kvaliteta i porijekla sirutke, postupaka pripreme, kao i od uslova i čuvanja.

Koncentraci proteina sirutke djeluju kao hidrokoloidi i zato u proizvodnji tečnog jogurta nije potreban dodatak stabilizatora. Za poboljšanje viskoznosti i smanjenje sinereze, koncentraci proteina sirutke u proizvodnji tečnog jogurta dodaju se u količini 1-2%. Ova količina ima povoljan uticaj i na ukus tečnog jogurta, dok količina veća od 2% uzrokuje brašnast ukus (Božanić i sar., 2001). Nasuprot tome, za poboljšanje viskoznosti i smanjenje sinereze taj dodatak u proizvodnji čvrstog jogurta nije se pokazao prikladnim. Za poboljšanje viskoznosti koncentraci proteina sirutke izuzetno se koriste u količini od 3% u proizvodnji jogurta od kozjeg mlijeka, čija konzistencija je izrazito tečna (Herrero i Requena, 2006).

Inulin

Inulin (IN) je neprobavljivi ugljeni hidrat, sastavljen iz prirodnih fruktooligosaharida, posjeduje karakteristike dijetalnog vlakna, te je važan prebiotik u ljudskoj ishrani (Akin i sar., 2007). Kao proizvod hidrolize oligofruktoze, inulin se ne apsorbuje u gornjem dijelu intestinalnog trakta i nepromijenjen prolazi kroz usta, želudac i tanko crijevo. Tek u debelom crijevu djelovanjem selekcionijske bakterije inulin podliježe potpunog fermentacije. Kao produkt anaerobne fermentacije nastaje bakterijska biomasa, kratkolančane masne kiseline (sirćetna, propionska i maslačna), gasovi (CO₂, CH₄, H₂) i mliječna kiselina. Inulin posjeduje manju energetska vrijednost od ostalih ugljenih hidrata jer ga probavni enzimi

ne mogu sasvim probaviti. Oslobođena energija iznosi svega 1,5 kcal/g. Konzumiranje veće količine inulina, kod osjetljivih osoba, dovodi do smanjene produkcije gasa i smanjene nadutosti probavnog trakta. Inulin minimalno utiče na krvni šećer, tako da ga mogu konzumirati i dijabetičari, a neke studije pokazuju da čak pomaže u snižavanju nivoa šećera u krvi. Pored toga, inulin poboljšava mineralni sadržaj kostiju (prije svega kalcijuma, magnezijuma i željeza) i gustoću koštane mase.

Inulin se, međutim, prije svega posmatra sa stanovišta pozitivnog učinka na crijevu mikrofloru. Dokazano je da debelo crijevo ima ključnu ulogu u varenju hrane i da mikroflora ove regije obavlja vitalne fermentacione procese, odnosno učestvuje u transformaciji mnogih ugljenih hidrata, razgradnji proteina i aminokiselina. Kombinovanom primjenom probiotičkih bakterija i prebiotičkih supstrata (inulina), tzv. simbiotički koncept, podstiče preživljavanje i aktivnost autohtono prisutnih i alohtono unesenih probiotičkih bakterija u intestinalnom sistemu (Martínez-Villaluenga i sar. 2006; Donkor i sar., 2007). Osim toga, prebiotici poboljšavaju preživljavanje probiotika dok prolaze kroz gornji dio probavnog sistema i omogućuju njihovo naseljavanje u mikroflori debelog crijeva. Dodatno svojstvo im je što pospješuju peristaltiku crijeva i skraćuju vrijeme prolaska hrane kroz probavni kanal. Naučna istraživanja su pokazala da kombinacija bifidobakterija i inulina značajno sprečava nastajanje predkancerogenih lezija debelog crijeva, koje su indikacija za razvoj raka debelog crijeva. Dokazano je da ova kombinacija jača imunološki sistem, što pomaže u prevenciji infekcija, raka, ali i kod infekcija HIV-virusom (AIDS-a). Bifidobakterije i laktobacili imaju sposobnost snižavanja pH vrijednosti proizvodnjom kratkih lanaca masnih kiselina, čime onemogućavaju rast ostalih nepoželjnih bakterija kao što su vrste *E. coli* i *Salmonella* spp. Novonastali kratki lanci imaju važnu, pozitivnu ulogu za optimalan rad epitelnih ćelija kolona i apsorpciju katijona Ca²⁺, Mg²⁺ i Fe³⁺ (Coudray i sar., 2003).

Zbog svojih prehrambenih svojstava (prebiotičko djelovanje, zamjena za šećer i masti, niska energetska vrijednost) i tehnoloških vrijednosti (djeluje kao sredstvo za popravljivanje teksture, poboljšava ukus namirnica sa manje masti i šećera, dobro se otapa, služi

kao vezivno sredstvo), značajna je njegova primjena i u proizvodnji mliječnih proizvoda: jogurta, fermentisanog mlijeka, svježeg sira, mliječnih napitaka i deserata (Tamime, 2006; Elleuch i sar. 2011). Kako bifidobakterije pokazuju slab rast u mlijeku, dodatkom inulina postiže se potencijalni aktivitet stimulacije rasta (Pimentel i sar., 2012). Upotrebljava se i kao zamjena za mliječnu mast (Gueven i sar., 2005) i kao takav utiče na teksturalne promjene jogurta, dovodi do povećanja čvrstoće proizvoda tokom skladištenja (Tamime, 2006; Arango i sar., 2013), a proizvodu, s obzirom da utiče na stabilizaciju strukture vodene faze, daje punoću ukusa (Oliveira i sar., 2009; Hoppert i sar., 2013). Za poboljšanje ukusa jogurta sa sadržajem masti od 0,1 % dovoljno je dodati inulin u količini najviše do 1 %, s obzirom da njegov veći dodatak negativno utiče na senzorske osobine jogurta, te uzrokuje povećanu sinerezu (Gueven i sar., 2005).

Med

Med (M) je gusta higroskopna tečnost. Boja, ukus i miris najvažnija su senzorska svojstva meda i ovise o biljnom porijeklu, te uslovima prerade i čuvanja. Velika količina šećera u medu ne dozvoljava razmnožavanje mikroorganizama. Jedino se osmofilni kvasci mogu razmnožavati u medu. Oni izazivaju njegovu fermentaciju koja uglavnom ovisi o količini vode i koncentraciji kvasca.

Zahvaljujući sadržaju fruktooligosaharida, med se ubraja u prebiotičke materije. To su neprobavljiva vlakna rastvorljiva u vodi, a biljnog su porijekla. U proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda (probiotičkih), radi ubrzanja procesa fermentacije, mlijeku se može dodati med, kao promotor rasta. Postoji vrlo malo studija o prebiotičkim svojstvima meda, međutim neki rezultati su pokazali da dodatak meda znatno ubrzava proces fermentacije mlijeka (Stijepić i sar., 2009c). Isto tako, neki rezultati ukazuju da med podstiče razmnožavanje startera jednako kao i fruktooligosaharid, galaktooligosaharid i inulin (Papa i Ustunol, 2011). Ustanovljeno je da ne postoji razlika između navedenih soplemenata u odnosu na stepen produkcije mliječne kiseline (Kajiwara i sar., 2002). S druge strane, poznat je antimikrobni i inhibicioni učinak meda prema nekim psihrofilnim patogenim bak-

terijama, ali i stimulatorski učinak na bakterije probavnog trakta (Bogdanov i sar., 2008). Takođe, dobro je poznato da crijevna mikroflora i njeni metaboliti imaju važnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja. Korisna mikroflora značajno smanjuje štetne bakterije i njihove toksične proizvode u crijevima, ima antagonistički učinak na enteropatogene bakterije (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. i *Bacillus* spp.), te na psihrofilne patogene bakterije (npr. *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes*). Med značajno povećava broj bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium* sp.) koje imaju probiotički učinak - rastu u crijevima i proizvode metabolite koji inhibiraju rast patogena i daju otpornost domaćinu. Med takođe pridonosi ublažavanju virusnih infekcija, smanjenju štetnih materija koji mogu uzrokovati rak debelog crijeva, boljoj resorpciji minerala (posebno kalcijuma i magnezijuma), boljoj sintezi vitamina K, te snižavanju nivoa masnoće u krvi. Prirodni pčelinji med, zavisno od vrste, prosječno sadrži: 15-20 % vode, 75-80 % šećera (groždanog – glukoze, voćnog – fruktoze, a u manjoj mjeri sadrži i saharozu), zatim mineralne materije, proteine, vitamine, fermente, organske i neorganske kiseline, alkaloida, mirisne i boje materije).

Primjena KPS-a, inulina i meda u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda

Proizvodnja različitih fermentisanih mliječnih proizvoda uz mogućnost primjene KPS-a, inulina i meda bila je predmet brojnih laboratorijskih istraživanja Stijepić i sar. (2008; 2009 a, b, c, d, e; 2010 a, b; 2011 a, b, c; 2012 a, b; 2013). Ispitivanja su bila usmjerena na optimalno obogaćenje proizvoda medom u kombinaciji sa KPS-om, odnosno inulinom, u svrhu poboljšanja fizičko-hemijskih i reoloških osobina, nutritivne vrijednosti, kao i postizanja poželjnih senzorskih svojstava prihvatljivih potrošaču. Takođe, istraživanja su obuhvatila uticaj navedenih ingredijenata na stabilnost i održivost proizvedenih fermentisanih mliječnih proizvoda tokom skladištenja.

Na osnovu rezultata istraživanja (Stijepić i sar., 2008; 2009 a, b, c, d, e; 2010 a, b; Stijepić i sar., 2011 a; Stijepić i sar., 2012 a; Stijepić i sar., 2013) ustanovljeno je da su dodaci

KPS i inulina u koncentraciji 1% optimalni za proizvodnju tradicionalnog i probiotičkog jogurta.

Dodatak KPS-a i inulina u proizvodnji fermentisanih mliječnih proizvoda opravdan je iz više razloga. Pri ovome se pošlo od činjenice da se u proizvodnji jogurta sa smanjenim učešćem masti može da koristi inulin kao zamjena za mliječnu mast i da se procijeni opravdanost suplementiranja inulinom radi poboljšanja ukusa jogurta i smanjenja izdvajanja surutke. Svojstva inulina baziraju se na njegovoj sposobnosti stabilizovanja strukture vodene faze jogurta što daje čvrstoću i bolje senzorne karakteristike (puni okus sličan mastima), a takođe stimuliše rast probiotičkih bakterija koje imaju ljekovita svojstva i temelj su funkcionalne hrane. S druge strane, pri strožijim režimima termičke obrade mlijeka (85°C/20 min i 95°C/10 min), dolazi do formiranja kompleksa između kazeina i proteina surutke. Razmatranjem ove problematike u model sistemima, ustanovljeno je da 1 gram kazeina vezuje 2,2 grama β -laktoglobulina, što praktično znači da je kazein iz mlijeka sposoban da veže mnogo veću količinu proteina surutke od one koja se nalazi u mlijeku. To je naročito bitno ako se uzme u obzir da su proteini surutke dodati u obliku koncentrata proteina surutke, zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti svrstani u grupu funkcionalne hrane. Nadalje, proizvodnja fermentisanih mliječnih proizvoda sa dodatkom meda, iako bez dovoljno istraženih mogućnosti, veoma je interesantna, jer se med pokazao kao dobar promotor rasta starter kultura, naročito bifidobakterija humanog porijekla.

UTICAJ KONCENTRATA PROTEINA SURUTKE I MEDA NA SVOJSTVA TRADICIONALNOG I PROBIOTIČKOG JOGURTA

pH i titraciona kiselost

Kiselost je jedna od najznačajnijih karakteristika kvaliteta jogurta, s obzirom na njen širok raspon variranja tokom skladištenja i temperaturnog režima kome je proizvedeni jogurt podvrgnut u lancu distribucije i prodaje, a čije povećanje može imati izrazito negativan uticaj na kvalitet proizvoda.

Rezultati praćenja pH vrijednosti tokom fermentacije pokazali su da dodatak 1% KPS prije termičkog tretmana mlijeka skraćuje vrijeme fermenta-

cije u prosjeku za 1 sat u odnosu na kontrolne uzorke čija je fermentacija trajala između 6 i 7 sati (Stijepić 2011; Stijepić i sar., 2011b, Stijepić i sar. 2012 b). To je u skladu sa rezultatima Milanović i sar. (2009), koji su utvrdili da tokom acidifikacije dodatak proteina surutke doprinose bržoj koagulaciji mlijeka. Osim toga, dodatak meda dodatno je djelovao na skraćivanje fermentacije. Uzorci sa dodatkom 2% meda fermentišu za 5 sati, a sa dodatkom 4% i 6% meda u prosjeku za 4 sata. Prethodni termički tretman mlijeka (85°C/20 min ili 95°C/10 min) ne utiče značajno na tok, niti na završetak fermentacije (Stijepić, 2011; Stijepić i sar., 2011b, Stijepić i sar., 2012b).

Tokom 21 dana skladištenja uočene su izvjesne promjene pH vrijednosti i titracione kiselosti kod svih uzoraka jogurta, što je posljedica naknadne aktivnosti bakterijske kulture. Niže vrijednosti pH (i više vrijednosti titracione kiselosti) zabilježene su u uzorcima koji sadrže kombinaciju meda i KPS, u odnosu na uzorke sa KPS i kontrolne uzorke. Uočen je blaži pad pH i veća stabilnost uzoraka sa prethodnim TTM na 85°C/20 min u odnosu na uzorke proizvedene od TTM na 95°C/10 min (Stijepić 2011; Stijepić i sar., 2011 b).

Rezultati praćenja promjene pH vrijednosti tokom fermentacije, nezavisno od termičkog tretmana mlijeka, su pokazali da je za adaptaciju probiotičke kulture sa dodatkom inulina i meda (u svim kombinacijama) bilo potrebno oko 2 sata vremena, što se odrazilo na vrlo blagi pad pH vrijednosti (Stijepić i sar., 2011 a, b, c). Nakon tog perioda, u ovim uzorcima došlo je do naglog pada vrijednosti pH, što se može pripisati snažnom djelovanju inulina i meda na odabranu probiotičku kulturu. Kontrolnim uzorcima bilo je potrebno između tri i četiri sata vremena prilagođavanja novoj sredini, nakon čega je i kod ovih uzoraka došlo do bržeg procesa fermentacije. Fermentacija je najduže trajala kod kontrolnih uzoraka (7 sati), a najkraće kod uzoraka sa dodatkom 1%IN i 6% meda (u prosjeku za 5,5 sati), bez obzira na termički tretman mlijeka. Dodatak meda, uz inulin, generalno utiče na ubrzanje fermentacije mlijeka. Dobljeni rezultati o promjeni pH vrijednosti tokom fermentacije mlijeka sa dodatkom inulina su u saglasnosti sa podacima drugih autora. Tako npr. *Tratnik (1998)* konstatuje da se sa povećanjem koncentracije inulina i njegovog djelovanja na bifidobakterije, fermentacija brže završava. Osnovna

pretpostavka u ovim ispitivanjima je bila da dodatak meda može uticati na tok i brzinu fermentacije mlijeka, što su dobijeni rezultati i potvrdili (Stijepić, 2011).

Mikrobiološke karakteristike

Prema Stijepić (2011) i Stijepić i sar. (2011 b; 2012c) primjena KPS, a naročito kombinacija KPS-a i meda, stimuliše rast bakterija mliječne kiseline. Početni broj bakterija uzoraka proizvedenih pri TTM 85°C/20 min nakon proizvodnje najveći je kod uzoraka jogurta sa dodatkom 6 % meda i 1%KPS. Za kontrolni uzorak broj bakterija iznosi 11 logCFU/mL, za uzorak sa dodatkom 1%KPS 11,48 log CFU/mL, za uzorak sa dodatkom 1%KPS+2%M 11,85 logCFU/mL, 12 log CFU/mL za uzorke sa dodatkom 1%KPS+4%M i 12,18 logCFU/mL za uzorak sa dodatkom 1%KPS + 6%M. Tokom skladištenja broj mikroorganizama je stabilan i opada u prosjeku za 2,6 logaritamskih jedinica. Najveći pad je prisutan kod uzorka sa dodatkom 1%KPS+6%M od 2,88, a najmanji kod jogurta sa dodatkom 1%KPS+2%M od 2,25 logaritamskih jedinica.

Broj bakterija kod uzoraka jogurta proizvedenih pri oštrijem termičkom tretmanu (TTM 95°C/10 min) bitnije se ne razlikuje u odnosu na uzorke proizvedene pri TTM 85°C/20 min. Najmanji broj bakterija imao je kontrolni uzorak (10,85 log CFU/mL) prvog dana skladištenja, a najveći uzorak sa najvećom koncentracijom meda u kombinaciji sa KPS (12,18 log CFU/mL). Tokom skladištenja izražen je nešto veći pad broja bakterija (u prosjeku za 2,8 logaritamskih jedinica ili za 23,8 %) u odnosu na uzorke sa TTM 85°C/20 min (22,2%). Najmanji broj bakterija 21. dana skladištenja imao je kontrolni uzorak (8,0 log CFU/mL), dok najveći broj imao uzorak sa dodatkom 1%KPS + 6%M (9,48 logCFU/mL).

Početni broj mikroorganizama kod uzoraka proizvedenih pri TTM 85°C/20min kreće se nakon proizvodnje u rasponu od 11 (kontrolni uzorak) do 11,6 log CFU/mL kod uzorka sa 1%IN+6%M. Broj mikroorganizama tokom skladištenja opada u prosjeku za dvije logaritamske jedinice, pa tako 21. dana kontrolni uzorak ima najveći pad (za 2,3 log) i najmanji broj bakterija od 8,7 log CFU/mL, dok svi ostali uzorci imaju 9,3 log CFU/mL. Promjena broja mikroorganizama tokom skladištenja, kod uzoraka jogurta sa

TTM 95°C/10 min su pokazali da kontrolni uzorak ima isti broj mikroorganizama (11 log CFU/mL) kao i kontrolni uzorak sa TTM 85°C/ 20 min, dok ostali uzorci imaju više vrijednosti u odnosu na uzorke jogurta sa prethodnim TTM 85°C/20min. Takođe, i ovdje se uočava povećanje broja probiotičkih bakterija sa povećanjem koncentracije dodatog meda u kombinaciji sa inulinom. Na kraju skladištenja (21. dana) dolazi do opadanja broja bakterija, tako da je najveći broj nađen kod jogurta sa dodatkom 1%IN+2%M (9,6 log CFU/mL), dok je najmanji broj nađen kod uzoraka sa dodatkom 1%IN i 1%IN+4%M (9,3 log CFU/mL).

Rezultati istraživanja su pokazali pozitivan uticaj inulina, kao i kombinacije inulina i meda na rast probiotičkih bakterija (Stijepić, 2011; Stijepić i sar, 2011b), što potvrđuje prebiotička svojstva inulina i meda.

Broj živih ćelija mješovite probiotičke kulture u svim je proizvedenim uzorcima probiotičkog jogurta tokom 21 dana čuvanja bio veći od 6 log CFU/mL (terapijski minimum), što je u skladu s *Codex Alimentarius Standardom za fermentisane proizvode (Codex Alimentarius Commission, 2003)* i preporukama o broju živih ćelija probiotičke kulture po gramu proizvoda (Shah, 2007).

Viskozitet

Stijepić i sar.(2011 b;2012 b; 2012 c) ispitivali su uticaj dodatka 1%KPS i različitih udjela meda (2, 4 i 6%M) na viskozitet jogurta tokom skladištenja.

Viskozitet kod svih uzoraka jogurta izmeren je viskozimetrom BROOKFIELD Digital Viscometer, DV-E, dok je promjena viskoziteta jogurta tokom vremena određena pri brzini rotacije spindla od 20 obrt/min. Viskoizitet uzoraka povećava se tokom perioda skladištenja, ali ne statistički značajno ($p > 0,05$). Dodatak 1% KPS u mlijeko bitno je mijenjao njegovu proteinsku strukturu i ovi uzorci izdvajaju se kao najstabilniji i sa najvišim vrijednostima viskoziteta, jer se dodatkom KPS povećava broj slobodnih aktivnih grupa (vanjski dio molekule proteina surutke, uglavnom hidrofilni ostaci aminokiselina) čime je omogućeno i vezanje veće količine vode. Dodatak meda u koncentraciji 2% u kombinaciji sa 1%KPS, daje vrijednosti viskoziteta bliske vrijednostima uzoraka koji sadrže 1%KPS, dok veće koncentracije meda (4 i 6 %) u kombinaciji sa 1%KPS proizvode gel nižeg viskozi-

teta. Izrazito najniži viskoziteti su ustanovljeni kod kontrolnih uzoraka.

Rezultati istraživanja *Stijepić i sar.* (2011a,b,c) su pokazali da uzorci sa dodatkom inulina i meda, i prethodno TTM na 85°C/20 min, imaju veće vrijednosti viskoziteta u odnosu na kontrolni uzorak (K). Najvišu srednju vrijednost viskoziteta za 1. dan skladištenja ima uzorak sa 1%IN (334,08 mPas), dok su vrijednosti slične za uzorke sa dodatkom 1%IN i 2%M (328,38 mPas) i 1%IN i 4%M (329,5 mPas). Uzorak sa dodatkom 1%IN i 6%M ima nešto nižu vrijednost viskoziteta (318,63 mPas), dok kontrolni (K) uzorak ima najnižu vrijednost (299,46 mPas), ali bez statistički značajne razlike na nivou značajnosti $p > 0,05$. Slične vrijednosti viskoziteta su i u uzorcima proizvedenih uz prethodni TTM 95°C/10 min. Nakon 21 dana skladištenja, ispitivanjem je utvrđeno da period skladištenja značajno utiče na viskozitet gotovog proizvoda, odnosno na stabilnost, kompaktnost i čvrstoću gela. Dolazi do većeg razaranja i kidanja proteinskog matriksa tako da djelovanje iste sile u istom vremenskom intervalu, rezultuje znatno manjim vrijednostima viskoziteta ($p < 0,05$), bez obzira na dodatak i primijenjeni termički tretman. Najviše srednje vrijednosti viskoziteta su u uzorku sa 1%IN (210,92 mPas), dok dodatak meda u svim koncentracijama (2,4 i 6%) ima za posljedicu smanjenje viskoziteta (201,0 mPas; 205,0 mPas i 200,1 mPas). Najniže vrijednosti viskoziteta su zabilježene kod kontrolnog uzorka (210,92 mPas). Na kraju skladištenja, između uzoraka, ne postoji statistički značajna razlika u viskozitetu ($p > 0,05$).

Ni kod jednog uzorka nije zabilježeno izdvajanje surutke tokom ispitivanog perioda, niti odstupanje od tiksotropnog ponašanja.

Sinereza

Prema *Stijepić (2011)*, pri brzini centrifugiranja 1000 o/min, sinereza jogurta, za uzorke koji u svom sastavu sadrže KPS i kombinaciju meda i KPS je zanemarljivo mala, i ne prelazi 0,34 % tokom perioda skladištenja. Za kontrolne uzorke sinereza nakon 21. dana skladištenja iznosi 3,1 % (oštriji termički tretman mlijeka) i 1,89 % (blaži TTM). S obzirom na to da centrifugalna sila nije bila dovoljno jaka da izazove promjene, rezultati dobijeni pri ovoj brzini ne daju jasnu osnovu za ocjenjivanje strukture gela.

Sa povećanjem centrifugalne sile sinereza se povećava, dolazi do intenzivnijeg narušavanja strukture gela i lakšeg otpuštanja surutke.

Pri brzini od 2000 o/min vrijednosti sinereze uzoraka koje u svom sastavu sadrže KPS i kombinaciju KPS i meda kreće se u rasponu od 0,65% za uzorak sa 1%KPS+6%M do 3,32 % za uzorak sa 1%KPS. Tokom perioda skladištenja nije došlo do bitnijeg izdvajanja surutke ni kod jednog uzorka sa primijenjenim dodacima. Pri brzinama od 2000 i 3000 o/min sinereza kontrolnih uzoraka je u prosjeku veća ($p < 0,05$) za oko 10 puta u odnosu na ostale uzorke.

Brzina centrifugiranja od 3000 o/min daje najbolje rezultate za procjenu karaktera formiranog gela. Vrijednosti sinereze kod uzoraka sa TTM na 85°C/20 min kretale su se od 1. do 21. dana skladištenja: 26,67 – 31,44 % (K), 3,70 – 3,90 % (1%KPS), 3,44 – 3,09 % (1%KPS+2%M), 2,64 – 2,81 % (1%KPS+4%M) i 2,07 – 2,95 % (1%KPS+6%M). Slične vrijednosti izdvojene surutke imali su i uzorci čije je mlijeko podvrgnuto oštrijem termičkom tretmanu. Generalno, ukupni rezultati mjerenja sinereze pokazuju da sa povećanjem koncentracije meda, uz prisustvo KPS, proizvod dobija na stabilnosti i manjem izdvajanju surutke, što je u linearnoj zavisnosti sa čvrstoćom gela i obrnuto, postoji proporcionalna zavisnost između koncentracije dodatog meda i sinereze.

Kada se jogurt podvrgne djelovanju spoljašnje sile, dolazi do djelimičnog rušenja strukture gela što rezultuje kidanjem veze unutar proteinskog matriksa. U zavisnosti od intenziteta i dužine trajanja spoljašnje sile, stvaraju se manji kazeinski agregati i dolazi do pojave sinereze.

Na osnovu rezultata (*Stijepić i sar.*, 2011 a, b, c) za sinerezu uočava se da pri brzini centrifugiranja od 1000 o/min kod svih uzoraka tokom skladištenja procenat izdvojene surutke je vrlo mali, bez obzira na dodatak i termički tretman mlijeka. Međutim, centrifugiranjem pri brzinama od 2000 i 3000 o/min pružaju se bolji uslovi za procjenu karaktera gela. Pri ovim brzinama dolazi do formiranja kompaktnijeg gela i većeg istiskivanja surutke. Termički tretman mlijeka 95°C/10 min je uslovio veću stabilnost gela i manje otpuštanje surutke, u odnosu na režim 85°C/20 min. Kontrolni uzorci na oba termička tretmana pokazuju znatno veće otpuštanje surutke ($p < 0,05$), nego ogledni uzorci pri istoj centrifu-

galnoj sili. Opšti je zaključak da je dodatak meda u kombinaciji sa inulinom, dodatno uticao na stabilizaciju strukture vodene faze probiotičkog jogurta, gdje se sa povećanjem sadržaja meda, sinereza smanjivala. Tokom skladištenja dolazi do neznatnog porasta sinereze kod svih uzoraka.

Teksturalne karakteristike

Čvrstoća jogurta direktno zavisi od sadržaja suve materije, proteina i oblika (nativnih ili denaturisanih) proteina. Veća količina proteina će usloviti više međusobnih interakcija u proteinskoj mreži i rezultovati gušćim gelom (*Tamime 2006*).

Stijepić i sar. (2012 a, b, c) ustanovili su različit uticaj odabranih faktora (dodatak KPS i kombinacije KPS i meda, termički tretman mlijeka i vrijeme skladištenja) na teksturalne karakteristike (čvrstoća, kohezivnost, konzistencija i indeks viskoziteta – ispitane primjenom uređaja Texture Analyser TA.XPplus.) dobijenih fermentisanih proizvoda. U odnosu na kontrolni uzorak, vidljiv je izrazito pozitivan uticaj dodatka KPS i kombinovanog dodatka KPS i meda ($p < 0,05$), koji su uticali na čvrstoću, ali i na ostale parametre teksture (konzistenciju, kohezivnost i indeks viskoziteta). Primjena KPS prije termičkog tretmana mlijeka vodi boljem uklapanju proteina surutke u proteinski trodimenzionalni matriks (*Kulozik i Guilmineau, 2003; Aziznia i sar., 2008*), a povećavanjem broja veza kazein-proteini surutke raste čvrstoća i konzistencija jogurta (*Puvanenthiran i sar., 2002; Augustin i sar., 2003; Milanović i sar., 2009; Yamul i Lupano, 2009; Akalin i sar., 2012; Ünal i Akalin, 2013*). Dobijeni rezultati *Stijepić (2011)* i *Stijepić i sar.* (2012 c) u skladu sa rezultatima navedenih autora. Tekstura jogurta koji su proizvedeni uz dodatak kombinacije KPS i meda, nije bila značajno niža u odnosu na uzorak sa dodatkom 1% KPS ($p > 0,05$). Termički tretman mlijeka i period skladištenja manje utiču na teksturalne karakteristike tradicionalnog jogurta, s tim da je tokom skladištenja kod svih uzoraka došlo do porasta svih teksturalnih parametara.

Tekstura gela fermentisanih mliječnih proizvoda jedan je od osnovnih faktora njihovog ukupnog kvaliteta. Samu strukturu ovakvih proizvoda, *Walstra (1998)* definiše količinom i rasporedom pora u gelu.

Rezultati ispitivanja *Stijepić i sar.* (2011 a, b, c) pokazuju različit uticaj

odabranih faktora (dodatka inulina i kombinacije inulina i meda, termičkog tretmana mlijeka i vremena skladištenja) na teksturalne karakteristike ispitivanih uzoraka. Pokazao se pozitivan uticaj inulina (djelovao je na poboljšanje svih parametara teksture) i manje pozitivan uticaj kombinacije inulina i meda (niže vrijednosti svih parametara teksture). Termički tretman mlijeka i period skladištenja su manje uticali na teksturalne karakteristike probiotičkog jogurta. Generalno posmatrajući, dodatak inulina znatno je uticao na čvrstoću jogurta, ali i na sve druge parametre teksture (konzistenciju, kohezivnost i indeks viskoziteta). Ova razlika u čvrstoći se može objasniti činjenicom da je dodatak inulina uticao na to da tokom koagulacije, pored povezivanja nastalih proteinskih agregata, dolazi i do vezivanja novonastale inulinske mreže za kazeinske micelle i uklapanja u proteinske agregate. Ovakva novonastala modifikovana proteinska mreža omogućava veće zadržavanje vode, doprinosi većoj čvrstoći i fleksibilnosti trodimenzionalne proteinske mreže tokom skladištenja, što je u skladu sa ranijim istraživanjima (*Phaseephol i sar. 2008*). Dodatak meda, u kombinaciji sa inulinom, znatno je uticao na smanjenje čvrstoće jogurta. Tako, prema rezultatima ovih istraživanja, sa povećanjem udjela meda, čvrstoća se smanjuje u odnosu na uzorak sa dodatkom 1%IN, ali i u odnosu na kontrolni (K) uzorak, bez obzira na termički tretman mlijeka od kojih su jogurti proizvedeni, što je u skladu sa ranijim istraživanjima (*Stijepić i sar. 2010b*). Manja čvrstoća jogurta može biti posljedica nježnije strukture gela usljed smanjenog broja veza kazein-kazein (*Phaseephol i sar., 2008*) i potrebno je manje energije da se proteinska struktura deformiše.

Senzorske karakteristike i utvrđivanje prihvatljivosti

Senzorska analiza uzoraka jogurta proizvedenih od mlijeka termički tretiranih na oba termička tretmana (85°C/20 min ili 95°C/10 min), pokazuje da svi uzorci imaju karakterističan ugodan miris i ukus svojstven za pojedine uzorke, bez grudvica i fine konzistencije, izgled površine je gladak, homogen, sjajan i bez izražene sinereze. Uzorci sa kombinacijom KPS i meda imaju posebno ugodan slatkast ukus, dok se kod uzorka sa 1% KPS osjeća punoća u ustima. Svi

uzorci su ocijenjeni maksimalnim ocjenama za sve ispitivane parametre, sa ukupnim brojem bodova 20. Nakon 21 dana čuvanja najlošije su ocijenjeni uzorci sa dodatkom 1%KPS i 6% meda (18,8) i kontrolni uzorak (19,05) zbog nešto lošijih ocjena za parametre ukusa i konzistencije. Slijedi uzorak sa 1% KPS i 4% meda (19,4), dok su maksimalne ocjene (20,0) za sva svojstva dobili uzorci sa 1%KPS i sa kombinacijom 1% KPS i 2% meda.

Generalno, dodaci KPS i meda poboljšavaju senzorska svojstva uzoraka jogurta.

Pored senzorske ocjene (i čitavog niza drugih faktora), kvalitet gotovog proizvoda obilježava i saznanje o njihovoj prihvatljivosti od strane potrošača. Tako se testiranjem 44 potrošača hedonističkom skalom došlo do zaključka da su 1. dana skladištenja svi uzorci bili opisani kao „izrazito visoko poželjan“ i „visoko poželjan“ (prihvatljivost 100%). Nakon 21 dana skladištenja, dokazana poželjnost jogurta sa 1%KPS i sa kombinacijama KPS i medom 2 % bila je 100%, dok je poželjnost uzoraka jogurta s dodatkom KPS i 4 i 6% meda bila 97,73%, te kontrolnog uzorka 95,46% (*Stijepić i sar., 2012c*).

Stijepić (2011) navodi da je senzorski kvalitet svih uzoraka probiotičkog jogurta proizvedenih od mlijeka tretiranih na oba termička tretmana (TTM 85°C/20 min ili 95°C/10 min), 1. dana skladištenja ocijenjen najvišim ocjenama za sve ispitivane parametre i sa maksimalnim brojem ponderisanih bodova (20,0). Konzistencija gela kod svih uzoraka probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina ocijenjena je kao kremasta i pjenasta, posebno kod uzoraka sa dodatkom kombinacije inulina (1%) i meda (2, 4 i 6 %), gdje je okarakterisana kao homogena i bez grudvica. Neznatno čvršći gel, ali i dalje sa kremastom konzistencijom, uočen je kod uzoraka sa dodatkom 1%IN, bez obzira na termički tretman mlijeka. Konzistencija gela kod kontrolnog uzorka jogurta ocijenjena je kao homogena ali ne i kremasta, što je bila karakteristika kod ostalih uzoraka. Svi uzorci su imali karakterističnu bijelu boju (med nije uticao na promjenu boje), glatku, ravnu i sjajnu površinu, bez izdvojene surutke. Uzorci sa kombinovanim dodatkom inulina i meda imali su posebno sjajnu „porculansku“ površinu. Nakon 21 dana skladištenja najbolje ocijenjeni uzorak je sa dodatkom 1%IN i 2% meda sa maksimalnim ocjenama za sve para-

metre, dok su ostali uzorci dobili nešto niže ocjene za svojstvo ukusa i konzistencije, a ocjene vezane za izgled, boju i miris su ostale maksimalne.

Sveukupno se može reći da je med u kombinaciji sa inulinom poboljšao senzorske osobine proizvoda kao i njihovu stabilnost tokom skladištenja. S druge strane, dodatak inulina nije naročito uticao na ocjenu ukupnog senzorskog kvaliteta uzoraka. Međutim, ukoliko se posebno posmatraju ocjene za parametre teksture, i ukoliko se uzme u obzir smanjeno učešće mliječne masti, primjetan je pozitivan uticaj dodatka inulina na čvrstoću i konzistenciju proizvoda. Termički tretman mlijeka nije uticao na senzorske ocjene proizvoda.

Statističkom obradom podataka ustanovljeno je da su svi uzorci pokazali jako veliku poželjnost od strane 57 testiranih potrošača.

Mikrostruktura

Mikrostruktura kontrolnog jogurta ima nepravilno raspoređene formirane proteinske lance, različitih veličina i debljina. Uočen je veliki broj jasno izdiferenciranih lanaca bakterijske kulture *Streptococcus thermophilus*.

Dodatkom KPS povećao se udio proteina koji pogoduju heterogenoj distribuciji kazeinskih agregata i zadebljanju polipeptidnih lanaca, odnosno stvaranju novih veza među njima, što rezultuje povećanjem gustine i veće umrežanosti proteinske mreže. Dodatak meda i njegova inkorporacija u trodimenzionalni proteinski matriks, prethodno obogaćen KPS, rezultuje dodatnim povećanjem gustine razgranate proteinske mreže i smanjenom otpuštanju surutke, te poboljšanju teksturalnih karakteristika (*Stijepić, 2011; Stijepić i sar., 2012c*).

Mikrostruktura probiotičkog jogurta sa 1%IN je pokazala jasno izdiferencirane proteinske lance različitih veličina i debljina formiranih lanaca (od 0,4 do 0,6 µm). Unutar trodimenzionalne strukture gela nepravilno su raspoređene šupljine sa različitim veličinama od 0,2 do 5 µm. Rastresita struktura proteinskog matriksa je povezana sa nešto višim vrijednostima sinereze koja je neznatno niža u odnosu na kontrolni uzorak, dok su viskozitet i teksturalne karakteristike bolje nego kod kontrolnog uzorka. Mikrostruktura probiotičkog jogurta proizvedenog od mlijeka sa dodatkom 1%IN+2%M imala je finiju i umrežaniju strukturu, sa jasno izdiferenciranim proteinskim lancima i

uočljivim prisustvom mikroorganizama prečnika oko 0,8 µm. Navedeni uzorak je imao manju sinerezu, ali je uočeno da dodatak meda utiče i na smanjenje viskoziteta i čvrstoće, u odnosu na uzorak koji u svom sastavu sadrži samo inulin. Probiotički jogurt proizveden iz mlijeka sa dodatkom 1%IN+4%M imao je gusto upakovanu strukturu, sa pravilnim rasporedom šupljina. Generalno, sa povećanjem sadržaja meda postiže se bolja kompaktnost proteinskih lanaca, i na taj način se smanjuje sinereza i poboljšavaju senzorske karakteristike proizvoda (Stijepić i sar. 2011c).

ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir sve analizirane parametre, koncentracija meda 2 i 4% u kombinaciji sa inulinom (IN) i koncentracija 2% meda u kombinaciji sa koncentratom proteina surutke (KPS) može se smatrati optimalnom. Međutim i sve druge kombinacije meda sa inulinom i KPS imaju vrlo dobre, već opisane karakteristike, što je potvrđeno prihvatljivošću od strane testiranih potrošača.

Tradicionalni i probiotički jogurti proizvedeni uz primjenu različitih koncentracija meda (2, 4 i 6%) u kombinaciji sa inulinom i KPS proizvodi su visoke hranljive vrijednosti i mogu se smatrati funkcionalnim proizvodima, te mogu biti namijenjeni različitim grupama potrošača: djeci, adolescentima, sportistima, starijoj populaciji i dr.

LITERATURA

- Akalin, A.S., G. Unal, N. Dinkci, A.A. Hayaloglu (2012): Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science* Vol. 95, Issue 7, Pages 3617-3628.
- Akin, M.B., Akin, M.S., Kirmaci, Z. (2007): Effects of inulin and sugar levels on the viability of yoghurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream, *Food Chemistry* 104, 93-99.
- Arango, O., A.J. Trujillo, M. Castillo (2013): Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. *Journal of Dairy Science* Vol. 96, Issue 4, Pages 1984-1996.
- Augustin, M.A., Cheng, L.J., Glagovskaia, O., Clarke, P.T., Lawrence, A. (2003): Use of blends of skim milk and sweet whey protein concentrates in reconstituted yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 30-35.
- Aziznia, S., A. Khosrowshahi, A. Madadlou and J. Rahimi, (2008): Whey protein concentrate and gum tragacanth as fat replacers in non-fat yogurt: Chemical, physical and microstructural properties. *J. Dairy Sci.*, 91: 2545-2552.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008): Honey for Nutrition and Health. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.
- Božanić, R., Rogelj, I., Tratnik, L.J. (2001): Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. *Milchwissenschaft*, 56(11), 618-622.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2003): CODEX standard for fermented milks. *Codex Stan* 243-2003.
- Coudray, C., Tressol, J.C., Gueux, E., Rayssiguier, Y. (2003): Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats, *Eur. J. Nutr.*, 42, 91-98.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2007): Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 17, 657-665.
- Elleuch, M., D. Bedigian, O. Roiseux, S. Besbes, C. Blecker, H. Attia (2011): Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review *Food Chemistry*, 124 (2), 411-421.
- Gueven, M., Yasar, K., Karaca, O.B., Hayaloglu, A.A. (2005): The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yoghurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (3), 180-184.
- Herceg, Z., Režek, A. (2006): Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke, *Mljekarstvo*, 56 (4), 379-396.
- Herrero, A.M., Requena, R. (2006): The effect of supplementing goats milk whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 87-92.
- Hoppert, K., S. Zahn, L. Jäneck, R. Mai, S. Hoffmann, H. Rohm (2013): Consumer acceptance of regular and reduced-sugar yoghurt enriched with different types of dietary fiber. *International Dairy Journal*, Volume 28, Issue 1, Pages 1-7.
- Jovanović, S., Mačej, O., Barać, M. (2004): Influence of curd particles drying temperature on the composition of curd made of milk in which coaggregates were formed. *J. Agric. Sci.*, 49(1) 65-73.
- Kajiwar, S., Gandhi, H., Ustunol, Z. (2002): 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), 214.
- Kulozik, U., Guilmineau, F. (2003): Food process engineering and dairy technology at the Technical University of Munich. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 191-198.
- Lucey, J.A. (2004): Cultured dairy products: An overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2-3), 77-84.
- Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez, R., Vidal-Valverde, C. (2006): Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotics survival in fermented milk during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 16, 768-774.
- Mayyada, M., H., El-Sayed, Howard, A., Chase (2011): Trends in whey protein fractionation. *Biotechnology Letters*, 33 (8), 1501-1511.
- McGregor, R.A., Poppitt S.D. (2013): Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism*. Open access: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/10/1/46>
- Milanović, S., Ilić, M., Djurić, M., Carić, M. (2009): Effect of transglutaminase and whey protein concentrate on textural characteristics of low fat probiotic yoghurt. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 64 (4), 388-392.
- Morr, C.V. (1985): Functionality of Heated Milk Proteins in Dairy and Related Foods, *J.Dairy Sci.* 68 (10), 2773-2781.
- Oliveira, R.P.S., Oliveira, P., Converti, A., Oliveira, M.N. (2009): Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*, *J. Food Engineering* 91, 133-139.
- Paseephol, T., Small, D.M., Sherkat, F. (2008): Rheology and texture of set yogurts as affected by inulin addition, *Journal of Texture Studies* 39 (6) 617-634.
- Pihlanto, A. (2011): Whey proteins and peptides. *Nutrafoods*, 10, (2-3), 29-42.
- Pimentel, T., Garcia, S., Prudencio, S. (2012): Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 65, (1), 104-110.
- Popa, D., Ustunol, Z. (2011): Influence of sucrose, high fructose corn syrup and honey from different floral sources on growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria, *International Journal of Dairy Technology*, 64 (2), 247-253.
- Puvanenthiran, A., Goddard, S.J. and Augustin, M.A. (2002): Gelation of Mixed Gels Containing κ-Carrageenan and Skim Milk Components. *Journal of Food Science*, 67,573-577.
- Rašić, J., Kurmann, J.A. (1978): *Yoghurt*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen.
- Shah, N. P. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.
- Sourdet, S., Relkin, P., Cesar, B. (2003): Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 31, 55-64.
- Stijepić M., D. Đurđević Milošević, J. Glušac (2012a): Reološke i senzorske karakteristike probiotičkog jogurta proizvedenog od kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka obogaćenog inulinom. *Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 23, (1): 13-18.
- Stijepić M., D. Đurđević Milošević, J. Glušac. (2012b): Production of low fat yoghurt enriched with different functional ingredients, *QUALITY OF LIFE* 3 (1-2):5-12.
- Stijepić M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2008): Uticaj temperature termičke obrade svežeg kozjeg mlijeka i dodatka inulina na kvalitet probiotičkog napitka. *Prehrambena industrija- Mleko i mlečni proizvodi* 19 (1-2), 47-53.
- Stijepić M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2009a): Uticaj dodatka koncentrata proteina surutke na reološke i senzorske osobine čvrstog jogurta, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 9 (2), 131-137.
- Stijepić M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2009c): Prebiotičko djelovanje meda na fermentaciju i svojstva kozjeg i kravljeg probiotičkog jogurta, *Prehrambena industrija*, 20 (1-2), 116-122.
- Stijepić M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D., Ilić, D. (2009b): Promjene sinereze jogurta obogaćenog koncentratom serum proteina u zavisnosti od termičkog tretmana mlijeka. *Zbornik radova Tehološkog fakulteta u Leskovcu* 19, 104-111.
- Stijepić M., J. Glušac. D. Đurđević Milošević, D. Pešić-Mikulec. (2013): Physicochemical characteristics of soy probiotic yoghurt with inulin addition during the refrigerated storage. *Romanian Biotechnological Letters* 18, (2): 8077-8085.
- Stijepić M.J., J. R. Glušac, i D. M. Đurđević-Milošević. (2011a): Fizičko-hemijska i senzorska svojstva probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina. *Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi* 22, (1): 29-34.

- Stijepić, M. (2011): Optimizacija dodatka inulina i koncentrata proteina surutke u proizvodnji tradicionalnog i probiotičkog jogurta, Disertacija, Tehnološki fakultet Zvornik Univerziteta Istočno Sarajevo.
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2009d): Uticaj termičkog tretmana mleka i inulina na viskozitet čvrstog kozjeg jogurta. VIII Simpozijum sa međunarodnim učešćem „Savremene tehnologije i privredni razvoj“, 23-24.10.2009, Leskovac, Zbornik radova, 19-27.
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2009e): Uticaj sadržaja inulina i toplotnog tretmana na sinerezu probiotičkog kozjeg napitka tokom čuvanja, Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik 15(3-4):129-135
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D. (2010a): Reološke osobine probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik 16 (3-4), 211-216.
- Stijepić, M., Milanović, S., Djurdjević-Milošević, D., Djurić, M., Glušac, J., Kanurić, K., Vukić, V. (2012c): Effects of honey and whey protein concentrate addition on textural and sensory properties of probiotic yoghurt. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 67 (3), 277-280.
- Stijepić, M., Milanović, S., Glušac, J., Kalaba, V., Kanurić, K., Vukić, V., Djurdjević-Milošević, D., Ranogajec, M. (2011b): Sensory and microbiological properties of yoghurt enriched with honey and whey protein concentrate. 2nd CEFSE (Center of Excellence for Food Safety and Emerging Risks) Workshop "Persistent organic pollutants in food and environment", 26th Symposium on Recent Developments in Dairy Technology, and BIOXEN seminar "Novel approaches for environmental protection", Faculty of Technology, University of Novi Sad, Serbia, 8-10. September, Proceedings, 136-141.
- Stijepić, M., Milanović, S., Glušac, J., Vukić, V., Kanurić, K., Đurđević-Milošević, D. (2010b): Promjene teksturalnih i senzorskih osobina probiotičkog jogurta proizvedenog uz primjenu različitih dodataka. *Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi* 21 (1-2), 103-108.
- Stijepić, M., S. Milanović, J. Glušac, V. Vukić, K. Kanurić, D. Đurđević-Milošević, M. Ranogajec, (2011c): Utjecaj odabranih čimbenika na reološka i teksturalna svojstva probiotičkog jogurta. *Mljekarstvo* 61 (1), 92-101
- Tamime, A.Y., Marshall, V.M.E. (1997): Microbiology and technology of fermented milks, u *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, Chapman & Hall, London, pp. 57-133.
- Tamime, A.Y., (2006): Manufacture of Yogurt, u *Fermented Milks*, Blackwell Publishing company, UK, 60-62
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2007): *Yoghurt Science and Technology*, 3. izdanje, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Tratnik, Lj. (1998): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Ünal, G., Akalin, S. (2013): Influence of fortification with sodium-calcium caseinate and whey protein concentrate on microbiological, textural and sensory properties of set-type yoghurt, *International Journal of Dairy Technology*, 66, (2), 264-272
- Uysal-Pala, C., Karagual-Yuceer, Y., Pala, A., Savas, T. (2006): Sensory properties of drinkable yoghurt made from milk of different goat breeds, *Journal of Sensory Studies* 21, 520-533.
- Yamul, D.K., Lupano, C.E. (2009): Viscoelastic properties of whey protein concentrate gels with honey and wheat flour at different pH. *Journal of Texture Studies*, 40(3), 319-333

SUMMARY

THE APPLICATION OF DIFFERENT INGREDIENTS IN THE PRODUCTION OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES

Milka J. Stijepić¹, Spasenija D. Milanović², Jovana R. Glušac¹, Dragica M. Đurđević-Milošević³

¹ School of Applied Medical Sciences, Nikole Pašića 4a, 79101 Prijedor, Bosnia and Herzegovina,

² Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Novi Sad, Serbia,

³ Anahem Laboratory, Mocartova 10, 11160 Belgrade, Serbia

In recent years, more attention has been focused on the fermented dairy products among different types of functional foods. Nutritive, physicochemical, functional properties and provided health benefits of fermented dairy products can be improved by adding different ingredients. One of the most often used and the most important ingredients are whey protein concentrate (WHC) and inulin. Recently, a considerable amount of attention is also being focussed on honey application in manufacturing fermented dairy products, mainly due to health benefits and prebiotics properties. The article reviews the state of the art concerning the relation between WHC, inulin and honey application in manufacturing of fermented dairy products. Furthermore, this paper will also review the previously published research related to the effect of adding these ingredients, especially on microbiological, physicochemical, reological and sensory properties, and microstructure of produced milk fermented product.

Key words: fermented dairy products • WHC • inulin • honey • microbiological, physicochemical, reological and sensory properties • microstructure

¹ VANJA G. MADJOSKA
² SONJA D. SRBINOVSKA
² STERJA M. STERJOVSKI

¹ Municipality of Makedonski Brod, Ilindenska street, No. 13, 6530-Makedonski Brod, Republic of Macedonia

² Faculty of Agricultural Sciences and Food, Skopje, Republic of Macedonia

ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK: 637.146.3:547.96:543.92

THE INFLUENCE OF WHEY PROTEINS ON THE SENSORY PROPERTIES OF YOGHURT

In order to determine the influence of whey proteins on the quality of yoghurt, two different starter cultures were applied: YF-L 811 (V1) and YC-381 (V2), as well as two inoculation temperatures: 35-37°C (V1.1 and V2.1) and 41-43°C (V1.3 and V2.3), with and without the addition of whey proteins powder (V1.2, V1.4 and V2.2 and V2.4). Cow milk from the same milk farm was used as a raw material, which was pasteurized at 85°C for 30 minutes. The storage lasted for 15 days at a temperature of 4°C, there was a noticed influence of the whey proteins, the temperature of fermentation and the culture used for inoculation over the individual sensory properties of the yoghurt (smell, taste, color, and consistency). The highest number of points for the characteristic of taste was given to B1.1 (4.77), and the lowest. 0.68 to B.1.2 and B2.4.

Key words: yoghurt • whey proteins • fermentation temperature • starter culture • sensory properties

INTRODUCTION

During the production of yoghurt, the addition of whey proteins is limited because if it is added in larger quantities it may cause some defects in texture, taste and appearance. But since whey proteins are relatively inexpensive functional accessory for increasing dry matter in dairy products, their use is well studied.

According to Hugunin (1999), there are many benefits derived from the addition of whey proteins in yoghurts. Whey proteins offer many functional advantages and can help in replacing less desirable ingredients in yoghurt. These benefits include: improved flavor, improved texture, enriched nutritional value, reduced syneresis, extended shelf life, probiotic effect, nutritional benefit and cost-effectiveness.

Whey proteins are particularly suitable for the use in the production of yoghurt, because of its functional properties, the ability to bind water, creating a gel and ability for emulsification. Whey proteins act as a hydrocolloids and therefore in the production of yoghurt, no additional stabilizers are needed (Tratnik, 1998; Božanić et al., 2000).

In the literature, there are variable results for the influence of whey proteins on the sensory properties of yoghurt. Many studies have shown that sensory properties of yoghurt containing middle levels of whey proteins are more acceptable for consumption in comparison with control samples (Antunes et al. 2005, Christopher et al., 2006; Raziuddin et al., 2004; Reddy et al., 2005).

According to Raziuddin et al. (2004) sensory properties of yoghurt are unfavorable when adding more than 1.5 % whey proteins, and according to Christopher et al., (2006), when used higher amounts than 0.5%.

Christopher et al., (2006), when used higher amounts than 0.5%.

The addition of whey proteins in quantities of 1 to 2 % have a favorable effect on the taste of yoghurt while the amount exceeding 2 % causes flavor taste (Božanić et al., 2000a; Božanić et al., 2000b).

Cheng et al. (2003) found that the replacement of 10 to 20 % of milk powder with whey protein enhances the taste of the product.

Gonzalez-Martinez et al. (2002) concluded that yoghurt produced by adding whey protein shows less defects in texture during the storage. Shah et al. (1993) studied whey protein substitute skim milk powder produced in yoghurt reconstructed milk. They came to the conclusion that it is possible to produce high quality yoghurt by adding 25 % whey protein that actually substituted the skimmed milk powder. Gonzalez-Martinez et al. (2002) concluded that the yellow color obtained in yoghurt is gained when whey protein and its intensity is proportional to the amount of whey proteins. Also, they found that the use of whey proteins to replace skimmed milk powder in order to increase the protein content in the milk cause certain defects of the finished product (yellow and increased syneresis). Whey proteins, were added to increase the total dry matter in yoghurt and provide better consistency, texture and homogeneity of the product.

Some authors assume that the addition of whey protein interaction protein-protein is partially inhibited by exopolysaccharides, reducing the strength of the resulting gel yoghurt (Rohm et al., 1993, Hess et al., 1997 and Hassan et al., 1996).

Rohm et al. (1993) concluded that there is a good balance between strength and the rheological properties

Author address:
 MSc Vanja Madjoska, Ilindenska street, No. 13,
 6530 - Makedonski Brod, Republic of Macedonia,
 E-mail: vanja_madjoska@yahoo.com

of yoghurt in which whey proteins are added.

The rheological properties of yoghurt are often improved after using the whey proteins leading to increase the strength of yoghurt (Antunes et al. 2005).

The strength of yoghurt increases when the concentration of whey proteins is increased from 0.5 to 1.5%. Increasing the concentration of whey proteins in the yoghurt, results in higher strength of yoghurt. The yoghurt fortified with casein or skimmed milk proteins, often have a firmer gel and the yoghurt fortified with whey proteins tend to be smoother and have a better look (Modler and Kalab, 1983).

Puvanenthiran et al. (2002) studied the positive effect of whey proteins on the strength of yoghurt.

To improve the viscosity of goat yoghurt whey proteins are used in quantities of 3%, because in principle its consistency is extremely liquid (Martin-Diana et al., 2003; Herrero and Reguena, 2006).

When whey proteins are added to replace skimmed milk powder, leading to lower the strength of the gel and reduction of viscosity of yoghurt, because of the low protein content in whey powder, compared with those in milk powder (Bhullar et al., 2002; Dave and Shah, 1998).

Studies of Guinee et al., (1997) and Guzman-Gonzales et al., (1999 and 2000), show similar or weaker viscosity of yoghurt where skimmed milk powder is replaced with whey proteins.

Higher value of viscosity, in yoghurt, in which whey proteins were added is gained at higher temperature treatment of milk, because high temperature leads to larger denaturation of whey proteins (Guzman-Gonzales et al., 1999 and 2000).

Raziuddin et al. (2004) found that adding of 1 % and 1.5 % whey protein improves viscosity of yoghurt.

Cheng et al. (2003) found that the yoghurt containing 90:10 and 80:20 combinations of milk powder accor-

ding to whey proteins have higher viscosity and better structure than yoghurt that contains only milk powder.

According Božanić et al. (2000) to reduce the viscosity of yoghurt, whey proteins are added from 1 to 2%, while according to Gurman-Gonzales et al. (1999) the addition of whey proteins in the production of set yoghurt is not proved beneficial for improving the viscosity and reductions of syneresis.

The addition of whey protein powder causes an increase in viscosity and reduces the syneresis (Tamime and Robinson, 1999).

Antunes et al. (2005) studied the effect of replacing skimmed milk powder with concentrated whey proteins on physicochemical and sensory properties of yoghurt. The results obtained are inconsistent. In some cases they obtained positive effect on whey protein concentration on strength and viscosity of yoghurt, and in another case the opposite effect. The influence of whey protein concentration to the holding capacity of water is also not constant. These apparent contradictions are results of multiple reasons. In these studies one of the reasons for the inconsistent results was the use of different methods used in order to determine the physicochemical and sensory properties of yoghurt.

The syneresis in yoghurt tends to decrease when increasing the level of whey proteins in yoghurt (Modler and Kalab, 1983).

The yoghurt where the whey proteins are added in relation to yoghurt, produced with the addition of milk powder has better texture (homogeneous) and syneresis is less expressive. In the production of yoghurt, acidic whey proteins are used, because sweets contain more lactose content (Gonzalez-Martinez et al., 2002).

Higher capacity of water retention (Cheng et al., 2003; Sodini et al., 2005) and reduced syneresis (Antunes et al., 2005; Raziuddin et al., 2004) were determined when whey proteins were used in yoghurt.

Remeuf et al. (2003) and Cheng et al. (2003) concluded that the addition of whey protein powder increase the water holding capacity.

The most important benefit that is derived from whey proteins is the effect of separation or sinerezis, during storage of yoghurt (shelf life). When it is properly heat treated, the yoghurt fortified with whey proteins, has a higher viscosity and better water retaining properties.

Guzman-Gonzales et al. (2000) and Cheng et al. (2003) show that the yoghurt has better water holding properties, when containing whey proteins than when skimmed enriched with milk powder.

Guinee et al. (1997), Modler and Kalab. (1983) and Remeuf et al. (2003) observed the opposite effect for the ability of water holding capacity in yoghurt, after the addition of whey proteins.

MATERIAL AND METHODS

Raw cow's milk from the one dairy farm was used as the basic raw material for research. Production of yoghurt variants were performed in milk laboratory at FASF, Skopje. Two basic variants were produced applying two different temperature by using two starter cultures with and without whey proteins addition. In the survey, eight samples were analysed: V1-inoculated with YF L-811 and sub-variants: V1.1 (35-37°C); V1.2 (35-37°C + whey proteins); V1.3 (41-43°C) and V1.4 (41-43°C + whey protein). V2-inoculated with YC-381 and: sub-variants: V2.1 (35-37°C); V2.2 (35-37°C + whey protein); V2.3 (41-43°C) and V2.4 (41-43°C + whey proteins).

RESULTS AND DISCUSSION

Sensory analysis of taste

The results of the sensory analysis of taste for variants of yoghurt are presented in table 1 and figure 1, where the highest rated characteristic flavor got V1.1 maximum 4.77, and the lowest V1.2 with 0.68 points. According to sensory analysis, it could be concluded that variants without whey protein powder shows better results. Results are not in accordance with the results obtained (Božanić et al., 2000; Božanić et al., 2000; Suter and Puhani, 1977) because, according to them, whey proteins didn't affect the taste of yoghurt.

Table 1. SENSORY ANALYSIS OF TASTE

Tabela 1. SENZORNA ANALIZA UKUSA

TASTE (0-5)	V1.1	V1.2	V 1.3	V 1.4	V 2.1	V 2.2	V 2.3	V 2.4
Inherent	4,77	0,68	3,04	2,62	4,24	2,51	2,64	0,68
Salt	0,64	0,82	0,33	0,62	0,4	2,8	0,26	0,71
Acidic	0,6	0,64	0,68	1,24	0,95	0,93	1,35	0,46
Bitter	0,11	1,46	0,11	0,33	0,24	0,4	0,35	0,75
Slight	1,24	1,91	2,17	0,82	0,66	1,11	0,53	2,97

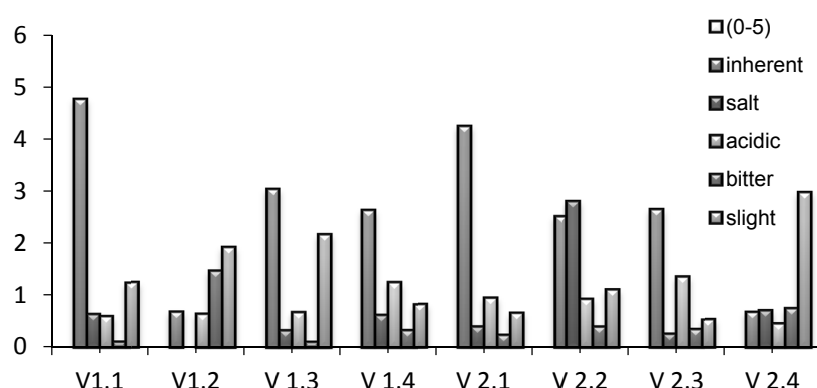


Figure 1. SENSORY ANALYSIS OF TASTE

Slika 1. SENZORNA ANALIZA UKUSA

Salty taste, which is considered unacceptable feature is most evident in V2.2 with a total of 2.8 points, and the least noticeable in V2.3 with 0.26 points. Common to these two variants are inoculation with the same starter culture and the same temperature of fermentation, but the obtained points showed that variants with added whey proteins have salted taste than others. Acid taste is most evident in V2.3 with 1.37 points, at least expressed in V1.1 with 0.6 total score. In order to reduce the points it can be concluded that the variants inoculated with YC- 381 (V2)

have more acidic taste than V1, which means that the starter culture used for inoculation, affect, but the addition of whey proteins and fermentation temperature do not affect this property of yoghurt, which is consistent with the studies of Chr - Hansen(2006).

The variants in which a whey protein supplement powder feels bitter taste than others, but the bitterness is slightly marked. The bitter taste is most evident in V1.2 with 1.46 total points, and least noticeable in V1.1 and V1.3 with a total of 0.11 points. From the given points of degustator,

we can conclude that the addition of whey powder and starter culture influence, with minimal intensity, while the temperature of fermentation does not affect the appearance of the characteristic bitter in yoghurt.

Variants inoculated with YF L- 811 (V1) have a milder flavor than those inoculated with YC- 381 (V2), as confirmed by research conducted by Chr-Hansen(2006). According to the obtained results, the most affecting were starter cultures used for inoculation, while whey protein and temperature do not affect fermentation. Most points for this feature is recorded for a total of 2.97 for V2.4 and V2.3 with at least 0.53. The results are consistent with Suter and Puhani, (1977), who found that the change in taste, connected with addition of the whey is not the result of the addition of whey proteins, but it is caused by influenced of light and oxygen during production.

Sensory analysis of odor

Based on the results of sensory analysis of odor (table 2, figure 2), it can be concluded that whey proteins, culture and temperature affect equally to milky-sour smell of yoghurt. The maximum number of points is observed in V2.2 with 2.13 total points, with a minimum total points of 1.82 for V1.4.

Reviews of the taster show that the variant without addition of whey proteins and inoculated with YF L- 811-(V1), have more prominent characteristic pleasant smell. Most evident characteristic pleasant smell is noticeable in V2.1 with 3.62 total points, and the least number of points, for this property, V1.2 and V2.2 had a total of 1.86 points. The temperature of fermentation didn't affect the property of this yoghurt.

In variant with the addition of whey proteins, foreign minimum odors are noticed in yoghurt, while other variants are scored with 0 points. The maximum number of points for the presence of foreign odors in yoghurt, was 1.2 and noticed in V1.2 sample. Starter cultures for inoculation did not affect this property in yoghurt.

Sensory analysis of color

It can be noted that the variant with no added whey protein, white color is uniform. The maximum number

Table 2 SENSORY ANALYSIS OF ODOR

Tabela 2. SENZORNA ANALIZA MIRISA

FRAGRANCE (0-5)	V1.1	V1.2	V1.3	V1.4	V2.1	V2.2	V2.3	V2.4
Lactic acid	1,77	1,2	1,44	1,82	1,6	2,13	1,04	0,84
Pleasant inherent	3,35	1,86	3,13	2,73	3,62	1,86	1,97	2,55
Expressed foreign odors	0	1,2	0	0,44	0	0	0,33	0,06

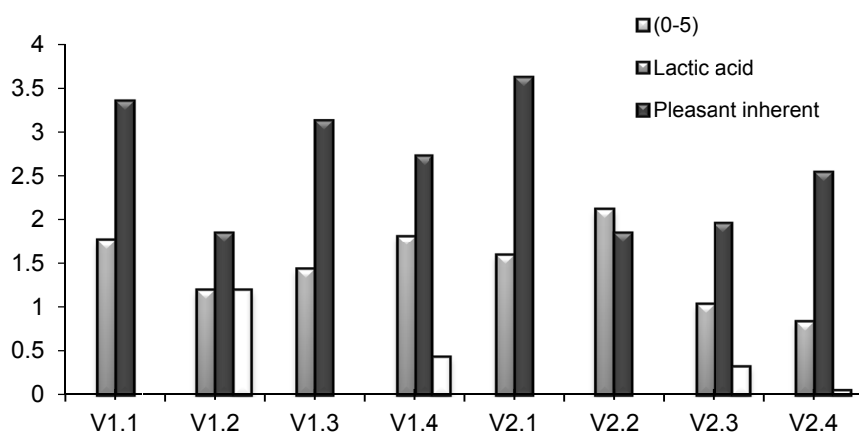


Figure 2. SENSORY ANALYSIS OF ODOR

Slika 2. SENZORNA ANALIZA MIRISA

Table 3. SENSORY ANALYSIS OF COLOR

Tabela 3. SENZORNA ANALIZA BOJE

COLOR (0-5)	V1.1	V1.2	V1.3	V1.4	V2.1	V2.2	V2.3	V2.4
Uniform white	4,33	0,53	4,15	3,46	3,48	2,55	2,86	1,8
Yellow	0,44	3,57	0,48	2,13	1,28	1,77	1,37	2,35
Completely uneven	0	0	0	0	0	0	0	0

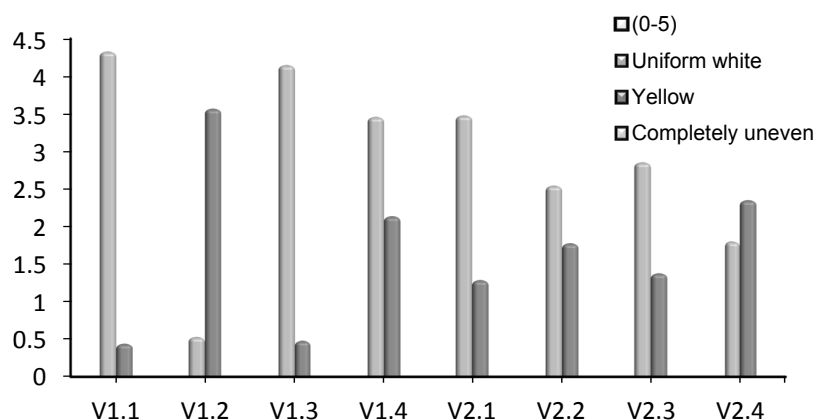


Figure 3. SENSORY ANALYSIS OF COLOR

Slika 3. SENZORNA ANALIZA BOJE

Table 4. SENSORY ANALYSIS OF CONSISTENCY

Tabela 4. SENZORNA ANALIZA KONZISTENCIJE

Consistency (0-5)	V1.1	V1.2	V1.3	V1.4	V2.1	V2.2	V2.3	V2.4
Thick	3,86	2,35	3,28	3,97	3,51	3,15	2,93	2,84
Weighs	0,15	0,26	0,2	0,37	0,55	0,24	0,31	1,66
Watery	0,44	1,71	1,13	0,46	0,73	0,42	0,37	0,5

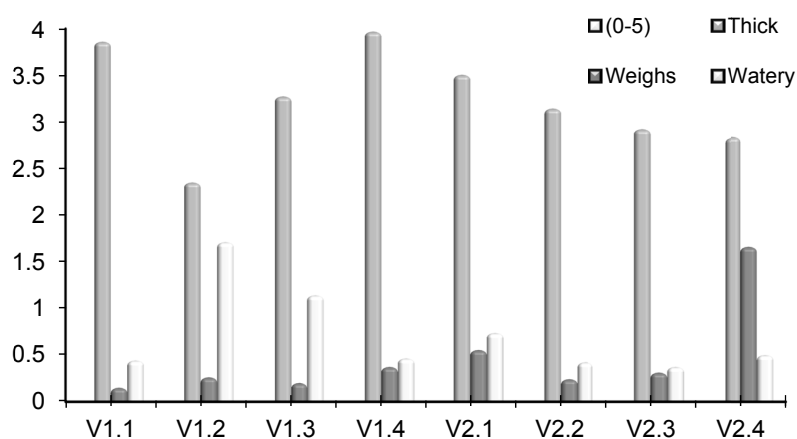


Figure 4. SENSORY ANALYSIS OF CONSISTENCY

Slika 4. SENZORNA ANALIZA KONZISTENCIJE

of points was observed in a total of 4.33 in sample V1.1 in addition to uniform white and sample 1.2 with the minimum total of 0.53 points. The difference between the two versions was the addition of whey proteins, and the similarity is the temperature of fermentation and starter culture used for inoculation. The temperature of fermentation and starter culture used for inoculation did not affect this property in yoghurt, which is in accordance with studies of Gonzalez-Martinez et al. (2002).

Yellowish color was the most extensive in sample V1.2 with total 3.57 points, at least in sample V1.1 with a total of 0.44 points. It is evident that this feature is more extensive in variants with the addition of whey proteins. This result corresponds to the result obtained in terms of the uniform color. Temperature and used starter culture did not affect the appearance of yellowish color in yoghurt, as confirmed by the analysis conducted by Gonzalez - Martinez et al. (2002).

As variants do not appear uneven in color which means a yellowish tinge, which is obtained as a result of the addition of whey protein powder, is uniformly distributed in the mass of yoghurt.

Sensory analysis of consistency

The results of sensory analysis for consistency are given in table 4 and figure 4, where it can be noticed that sample V1, inoculated with YF L-811, has most extensive thick consistency. The maximum number of points for this feature has been observed in V1.4 with a total of 3.97 points, and the minimum V1.2 with a total of 2.35 points. It can be concluded that the addition of whey proteins did not influence the viscosity of yoghurt, and also the temperature of fermentation was not affected, which corresponds to the results of several authors (Gurman-Gonzales et al., 1999; Bhullar et al., 2002; Dave and Shah, 1998; Guinee et al., 1997 and Guzman-Gonzales et al., 1999) which proved that the whey protein powder does not affect the viscosity of yoghurt. On the other hand, our results are not consistent with the results of a survey of several authors (Martin-Diana et al., 2003; Herrero and Reguena, 2006; Bhullar et al., 2002; Dave and Shah, 1998; Guinee et al., 1997 and Guzman-Gonzales et al., 1999; Raziuddin et al.,

2004; Božanić et al., 2000; Tamime and Robinson, 1999; Chr-Hansen, 2006; Gonzalez-Martinez et al., 2002), which proved the yoghurt inoculated with YF L-811 has a more extensive consistency of thick than yoghurt inoculated with YC-381.

Weights consistency was observed in all variants of yoghurt. The maximum number of points for this feature is recorded for sample V2.4 with total of 1.66 points, while the minimum is obtained in sample V1.1 with 0.2 points. This property is equally present among variants with and without the addition of whey proteins, while in variants with higher temperature for fermentation and variants inoculated with YC-381 (V2) this property is something stronger. This means that whey proteins do not affect this property of yoghurt, on the other hand the temperature of fermentation and used starter culture minimally affect this property in yoghurt. Chr-Hansen (2006) also noted the consistency weighs, in variants inoculated with YC-381.

Watery consistency of yoghurt did not influence the whey protein addition powder as in variants with and without the addition of whey protein powder. This property is equally represented. Subvariant V1.2 obtained the maximum number of points for this property with a total of 1.71 and V2.3 is the minimum number of points with a total of 0.37. The fermentation temperature does not affect the properties of yoghurt, and also does not affect starter culture used for inoculation. The result matches with the data obtained (Guinee et al., (1997); Modler et al. (1983); Remeuf et al., (2003); Modler and Kalab, (1983), and does not match with the results of: Augustian et al., (2003); Remeuf et al., (2003); Cheng et al., (2003), Guzman-Gonzales et al., (2000) and Cheng et al. (2003); Sodini et al. (2005); Antunes et al., (2005) and Raziuddin et al., (2004); Modler et al., (1983).

CONCLUSION

Based on the obtained results from the research the following conclusions can be adopted:

Sensory analysis on the following parameters was performed: taste (typical, salty, sour, bitter, sweet) smell (lactic acid, pleasant characteristic, expressed strange odors), color (white uniform, yellowish, completely uneven) and consistency (thick, weighs, watery). By analyzing the total number

of points it could be concluded that the highest score was given for sample V1.1 (4.77 points) for typical taste and the lowest for fully uneven color and 0 points in all sub-variants.

The addition of whey proteins influenced: typical, salty and bitter taste, lactic acid, and other pleasant odors in yoghurt, as well as the yellowish color and thick consistency.

The temperature of fermentation influenced the sour - milk smell, consistency weighs while culture used for inoculation influenced sour, bitter and sweet taste, lactic acid and pleasant typical smell, the thick consistency and the weighs consistency.

LITERATURE

- Antunes, A.E.C., Cazetto, T.F., Bolini, H.M.A. (2005). Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yoghurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (3), 169-173
- Bhullar, Y.S., Uddin, M.A., Shah, N.P. (2002). Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. *Milchwissenschaft*, 57:328-332
- Božanić, R., Tratnik, L.J., Marić, O. (2000). Utjecaj dodatka koncentrata proteina sirutke na viskoznost i mikrobiološku kakvoću jogurta tijekom čuvanja. *Mljekarstvo*, 50 (1), 15-24
- Cheng L.J., Augustin M.A., Glagovskaia, O., Clarke, P.T., Lawrence A. (2003). Use of blends of skim milk and sweet whey protein concentrates in reconstituted yoghurt. *The Australian J. Dairy Technology*, 58, 1, 30-35
- Christopher Vasey et al., (2006). The Acid-Alkaline Diet for Optimum Health: Restore Your Health by Creating pH Balance in Your Diet, Tempe, AZ USA
- Chr-Hansen. (2006). Yo-Flex EN Technical Brochure revised September 2006.doc/13:36 Yo-Flex® revised edition, September 2006
- Dave, R. I., and Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *J. Dairy Sci* 81:2804-2816
- Gonzalez - Martinez, C., Becerra, M., Chaffer, M., Albors, A., Carot, J.M., Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 334-340
- Guinee, TP, Gorry, C.B., O'Callaghan, D.J., O'Kennedy, B.T., O'Brien, N & Fenelon, M.A., (1997). The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology* 50 99-106
- Guzman-Gonzales, M., Morais, F., Ramos, M., Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117-1122.
- Guzman-Gonzales, M., Morais, F., Amigo, L. (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 433-438.
- Hassan, A.N., Frank, J.F., Schmidt, K.A., Shalabi, S.I., (1996). Rheological properties of yoghurt made with encapsulated nonpropy lactic cultures. *J. Dairy Sci*. 79: 2091-2097
- Herrero, A.M., Requena, R. (2006). The effect of supplementing goats milk whey protein concentrate on textural properties of set-type yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 87-92
- Hess, S.J., Roberts, R.F., Ziegler, G.R., (1997). Rheological properties of nonfat yoghurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *J. Dairy Sci*. 80: 252-263
- Huginin, A. (1999). Whey products in yoghurt and fermented dairy products, Application monograph. Yoghurt. U.S. Dairy Export Council
- Martin-Diana, A.B., Janer, C., Pelaez, C., Requena, T. (2003). Development of fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13 (10), 827-833
- Modler, H.W., and Kalab, M. (1983). Microstructure of yoghurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci*. 66:430-437
- Puvanenthiran, A. Williams, R.P.W., Augustin, M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.* 12:383-391
- Raziuddin, M., Zanjad, P.N., Ambadkar, R.K., Rathod, K.S. (2004). Influence of whey protein concentrate on chemical characteristics of low fat yoghurt. *Ind. J. Dairy Biosci* 15:32-35
- Reddy, V.P., Reddy, I.S., (2005). Influence of whey protein concentrate on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic yoghurt. *Ind. J. Dairy Sci* 58:333-336.
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I. and Tissier, J.P. (2003). Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yoghurt. *International Dairy Journal* 13(9): 773-782.
- Rohm, H. (1993). Influence of dry matter fortification of flow properties of yoghurt. 2. Time dependent behaviour. *Milchwissenschaft*. 48: 614-617.
- Shah et al., (1993). Use of dry whey and lactose hydrolysis in yoghurt bases. *Milchwissenschaft*, 48:494-498.
- Sodini, I., Lucas, A., Tissier, J.P., Corrieu, G. (2005). Physical Properties and Microstructure of Yoghurts Supplemented with Milk Protein Hydrolysates. *International Dairy Journal*, 15, 29-35.
- Sorhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K (1999). (a) Background to Manufacturing Practice in Yoghurt Science and Technology, 2. ed. Woodhead Publishing, Cambridge, 11-129.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (1999). (b) Quality Appraisal of Retail Products in Yoghurt Science and Technology, 2. ed. Woodhead Publishing, Cambridge, 552-587.
- Tratnik, L.J. (1998). Fermentirani mliječni napici u knjizi Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 129-187.
- Tratnik, L.J. (1998). Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 345-380.
- Tratnik, L.J., Božanić, R., Hruškar, M., Alim, A. (2003). Influence of culture activity on aroma components in yoghurts produced from goat's and cow's milk 32(2):151-160.

IZVOD

UTICAJ PROTEINA SURUTKE NA SENZORNE OSOBINE JOGURTA

Vanja G. Madjoska¹, Sonja D. Srbinovska², Sterja M. Sterjovski²

¹ Opštinska uprava, Makedonski Brod, Makedonija

² Fakultet za poljoprivredne nauke i hranu, Skoplje, Makedonija

U radu je ispitan uticaj proteina surutke, različitih starter kultura: IF - L 811 (V1) i IC- 381 (V2) i dve temperature inokulacije: (35-37°C, 41-43°C) na osobine jogurta sa i bez dodatka proteina surutke u prahu. Kravlje mleko je pasterizovano na 85°C tokom 30 minuta. Skladištenje je trajalo 15 dana na temperaturi 4°C. Utvrđen je uticaj proteina surutke, temperature fermentacije i kultura korišćenih za inokulaciju na pojedina senzorna svojstva jogurta (miris, ukus, boja i konzistencija). Najveći broj poena za ukus je dat uzorku proizvedenom sa kulturom YF-L811 na temperaturi 35-37°C (4,77), a najmanji 0,68 poena za uzorke proizvede sa kulturom YF-L811 na temperaturi 35-37°C sa dodatkom proteina surutke i uzorku proizvedenom sa kulturom YF-L811 na temperaturi 41-43°C sa dodatkom proteina surutke.

Ključne reči: jogurt • proteini surutke • temperatura fermentacije • starter kulture • senzorna svojstva

¹ STERJA M. STERJOVSKI
¹ SONJA D. SRBINOVSKA
² VANJA G. MADJOSKA

¹ Faculty of Agricultural Sciences and Food, Skopje, Republic of Macedonia
² Municipality of Makedonski Brod, Ilinden-ska street, No. 13, 6530-Makedonski Brod, Republic of Macedonia

ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK: 637.146.3:543.92:004.4(497.7)

This paper presents the results of the research on the impact of storage temperature on three samples of yoghurt purchased from retail centers.

The finished packaged products were stored at 4 and 8°C during 20 days, and the analyses were conducted on the 1st and 20th day.

The sensory analysis performed on the 1st day showed good results in all three variants, while on the 20th day it could not be conducted because all three varieties stored at 4 and 8°C showed unacceptable changes in terms of consistency and taste.

Key words: yoghurt • storage temperature • sensory analysis

SENSORY ANALYSIS OF YOGHURT REPRESENTED ON THE MACEDONIAN MARKET

INTRODUCTION

The fermented dairy products are traditional products that are present in milk processing facilities, markets and our table (Tamime and Robinson, 2004; Robinson and Itsaranuwat, 2006; Naudth, 2006; Surono, Hosono, 2011). One of the most consumed sour-milk products in our country is the yoghurt. Under yoghurt we think of a product that is obtained by fermentation of pasteurized milk with appropriate lactic acid cultures. The technology is tailored according to traditional sour milk fermented dairy product as originating from this region and is sold like liquid yoghurt and sour milk.

The quality and the safety of the yoghurt can be defined by a number of criteria which include: microbial, chemical, physical and nutritional characteristics. As a result, the quality and the safety can be determined by a number of tests of varying degrees of objectivity, aiming to establish that the product is:

- safe for human consumption (especially in terms of microbiological and chemical pollution);
- in accordance with all legal requirements;
- able to achieve the assigned expiration date without spoiling and
- with high sensory standards.

The storage of the yoghurt at temperatures lower than 10°C and maintaining this temperature until the sale of consumer products, enables the slowdown of microbiological and biochemical reactions that occur in yoghurt.

The temperatures of 10-20°C are optimal for a number of fungi, yeasts and bacteria. In the presence of pathogenic microorganisms in the yog-

hurt the duration of the reduction or increase of the temperature in the product will have direct impact on the speed of their propagation and reaching the infective dose. All these negative changes that may occur in the yoghurt are the result of violation of the prescribed rules and measures for preservation and storage of the yoghurt.

The consumption of yoghurt in Macedonia (table 1) and the world (table 2) takes a wide swing and it is constantly growing. From Table 2 it can be concluded that all of the continents, the European continent is the largest consumer of yoghurt in the world. According to Kurmann 1994, factors that may affect the consumption of yoghurt are:

- availability of milk,
- diet,
- income level,
- advertising,
- number of fermented types of milk available on the market,
- distribution system and
- religion.

The yoghurt has thick liquid consistency, equalized white or yellowish white color and pleasant characteristic aroma and taste of well-defined lactic acid.

Table 1. CONSUMPTION OF YOGHURT PER CAPITA (LITERS) IN MACEDONIA*

Tabela 1. POTROŠNJA JOGURTA PO STANOVNIKU (L) U MAKEDONIJI

Year	Liters
2005-2007	18.5
2007-2009	26.1

* Source: State Statistical Office of the Republic of Macedonia

Author address:
 MSc Sterja Sterjovski, 160th street No.10, 7000 Bitola, Republic of Macedonia,
 E-mail: s_sterjovski@yahoo.com

Table 2. CONSUMPTION OF YOGHURT PER CAPITA (LITERS) IN THE WORLD*

Tabela 2. POTROŠNJA JOGURTA PO STANOVNIKU (L) U SVETU

Country	Kg. per capita
The Netherlands	45.0
Finland	38.8
Sweden	30.3
Denmark	27.3
France	26.9
USA	7.4
Australia	6.4
Canada	3.6
South Africa	3.1
China	0.2

* Source: IDF, 1999 with permission

Deviations from the sensory properties (smell, taste, color and consistency) are called flaws of the yoghurt. The flaws of the yoghurt can be caused by the quality of the raw material, the error in the technological process and during storage. According to Petrić (1984) and Tratnik and Božanić (2012) flaws of the yoghurt are divided into several groups:

1. Flaws of the appearance of the yoghurt:
 - discoloration,
 - separated whey,
 - inhomogeneous mass
 - occurrence of flakes,
 - overflowing cups,
 - condensed water to the cover.
2. Flaws in the taste and smell of the yoghurt:
 - pre acidic,
 - bland, tasteless,
 - aroma of animal feed,
 - flourish odor,
 - uncharacteristic odor,
 - dusty,
 - fruit and
 - atypical acidity.
3. Flaws in the consistency of the yoghurt:
 - diluted consistency,
 - inhomogeneous mass,
 - separated whey and
 - sticky, clot and gummy table.

From the above presented flaws in the yoghurt more significant are:

- Too much liquid consistency occurs because of the smaller amount of dry matter, low temperature incubation and weak activity of lactic acid bacteria.

Reduced activity of lactic acid bacteria may be due to the presence of inhibitory substances, bacteriophages, and the unfavorable relationship between the stick bacteria and cocci.

- Separation of water occurs due to insufficient cooling before and after filling the containers, mixing the yoghurt before having enough time to cool down, shaking the yoghurt, inappropriate heat treatment and high temperature fermentation.
- Sourer taste occurs when the fermentation time is prolonged, when the fermentation temperature is high or the finished product is slowly cooled. This fault can occur in the yoghurt stored higher than 8°C.
- Insufficient sour taste is due to the low temperature fermentation or if used any active starter cultures for the presence of inhibitory substances in milk or bacteriophages.
- Bitter taste is due to thermo-resistant proteolytic microorganisms that are not destroyed by the heat treatment. The emergence of bitterness leads to poor development of acidity and allows propagation of undesirable microorganisms.
- Hot taste occurs in yoghurt, when there is greater amount of fat on the surface.

In the yoghurt can be developed yeasts that produce alcohol and CO₂, and it changes the flavor where it becomes bitter and alcoholic, but also changes the consistency, i.e. the liquid yoghurt becomes foamy. The appearance of this defect can be seen in the packaging flatulence.

The main objective of the research is to determine the changes of sensory characteristics that occur during the storage of the yoghurt from three leading Macedonian milk-producing facilities. The acceptability of the product for the consumption during its shelf life and requirements of the existing rules of quality dairy products were analysed.

The goal is to determine what kind of sensory properties changes will occur in the yoghurt stored at two different temperatures (4 and 8°C). Considering the fact that the yoghurt in distribution networks are kept at the proper temperature, and the temperature often exceeds the one which is

provided in the declaration. The influence of storage temperature on the durability of the product, or sensory properties during the storage of 20 days, as well as the differences in the intensity of these changes will be determined in the survey.

The paper is aiming at the results of a practical way so that it would present the factors that affect the quality of the yoghurt of all concerned parties in the chain of manufacturers, distributors, supermarkets and consumers.

Based on the obtained results, the appropriate recommendations for milk production capacities in terms of quality and product safety will be added.

MATERIAL AND METHODS

Studies were conducted on samples of yoghurt produced from three milk processing facilities that work with cutting edge technology and have implemented systems for food safety.

Samples yoghurt in packages of 1 liter were bought from markets immediately after placing in the production and retail distribution network.

Namely, yoghurts produced from three different manufacturers (B1, B2 and B3) which were stored during 20 days at a temperature of 4°C (B1-4, B2-4 and B3-4) and at a temperature of 8°C (B1-8, B2-8 and B3-8) were included in the study.

The samples were examined and analyzed in the laboratory for milk at the Faculty of Agricultural Sciences and Food, Skopje.

Thus, with the survey were covered 6 variants including:

- B1-4 yoghurt stored at 4°C.
- B2-4 yoghurt stored at 4°C.
- B3-4 yoghurt stored at 4°C.
- B1-8 yoghurt stored to 8°C
- B2-8 yoghurt stored to 8°C
- B3-8 yoghurt stored at 4°C.

The sensory analysis was conducted on the first and the twentieth day by quantitative descriptive analysis, where on the scale of 1-10, the taste, smell, color and consistency of the product were evaluated.

The study involved 17 tasters of which 6 women or 37.5% and 11 men or 62.5%. The tasters were 5 smokers or 31.25% and 12 non-smokers or 68.75%.

Tasters were from all age categories and both sexes.

During the performance of the sensory examination the creation and maintenance of optimal conditions were strictly taken into consideration.

Table 3. TOTAL POINTS AWARDED FOR SENSORY ANALYSIS ON VARIANTS STORED AT 4°C FOR 1 DAY

Tabela 3. SENZORNA OCENA VARIJANTI JOGURTA SKLADIŠTENIH 1 DAN NA 4°C

	General appearance	Consistency	Color	Smell	Taste	Total points
Variant 1	1.79	4.19	1	1.83	7.69	15.9
Variant 2	1.84	3.69	1	1.34	6.26	13.9
Variant 3	1.47	4.26	1	1.59	6.02	14.6

The yoghurt samples were an original manufacturer packaging in bottles of 1.000 ml and tetrapack packing of 1.000 ml.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the sensory analysis are given in the table 3. Based on the obtained results it can be concluded that for general appearance the largest number of points were awarded to B2 and the minimum was awarded to B3 variant. In terms of consistency the most points were awarded to B3 and the minimum to B2 variant. In terms of color the number of points awarded was identical. Among the taste the most awarded points were awarded to B1 and the minimum to the B3 variant. With this we can conclude that the highest total number of points was awarded the first B1 and 15.9, followed by 14.6 to B3, while B2 received the minimum 13.9 points.

The intended tasting on the 20th day could not be carried out because the variants show significant changes in terms of smell and consistency.

This in B1 at 4°C was quite evident milky acidic taste and smell, and had medium thick consistency with poor grain structure.

In B1 at 8°C prevailed uncharacteristic lactic acid smell (absence of lactic acid fermentation) with medium dense homogeneous mass.

In B2 at 4°C the smell was average and there was separation of the whey, slightly thicker consistency with homogenous mass.

In B2 at 8°C at the consistency, there is prevalence of inhomogeneous mass with separated whey and little bit heavy, however the smell was unusual, where there was an absence of milky-sour taste and presence of propionic fermentation.

In B3 at 4°C the consistency was really highly thick liquid consistency with homogenous mass, while the

smell was not typical, poorly sharp with yeast presence.

In B3 at 8°C in terms of consistency, there was emergence of sinezis, inhomogeneous mass with clearly separated whey, and density (like Greek yoghurt). At the odor there was swollen packaging, release CO₂ when opened, presence of yeasts (extremely acidic taste), presence of proteolytic fermentation (production of peptides and peptons).

Petrović and Mančić (2006) while examining the sensory characteristics after 21 days of storage of yoghurt showed significant change in the taste of yoghurt, but it was still usable. Unlike our results when examining the sensory characteristics of the yoghurt in Hruškar et al. (2005) it was estimated that at the beginning of the storage the sensory evaluation of ordinary yoghurt totaled 19.4 points and on the 20th day concluded that the samples of yoghurt have lost their sensory quality but they were suitable for consumption.

According to the above, we can conclude that the only products that can survive on the market should have consistent quality and should meet the consumer demands. The product quality is a requirement for the existence and condition of revenue and so it may be a long term and every plant for milk processing must continually ensure product safety, guarantee of good quality and appropriate service. Thus, quality policy and food security becomes a key element and should be the strategic determination of every food producer.

CONCLUSION

Based on everything stated before we can give the following conclusions:

1. The sensory analysis of the yoghurt variants the largest number of points were awarded to B1 (15.9), B3 (14.6), while B2 has had lowest number of assigned

points (13.9). On the 20th day it could not be performed sensory analysis due to the major changes in terms of smell and consistency.

2. It is recommended storage of the yoghurt at 4°C, and in exceptional cases up to 8°C.

LITERATURE

- Baltic, M. (1984): Kontrola namirnica, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, 1994.
- Hruškar M., Krpan M., Bucak I., Vahčić N. (2005): Promjene koncentracije sastojaka arome u običnom i probiotičkom jogurtu tijekom skladištenja, *Mljekarstvo* 55 (1) 31-39, 2005.
- Kurmann, J. A. (1984): The production of fermented milk in the world. *FIL-IDF Bull. Doc.* 179, 8-16.
- Petričić, A., (1984): "Konzumno i fermentirano mlijeko", Udruženje mljekarskih radnika Hrvatske, Zagreb.
- Petrović, S., Mančić A. (2006) – Dinamika titracije kiselosti i pH mleka fermentacije i za vreme skladištenja jogurta u zavisnosti od načina koagulacije, *Simpozijum "Mleko i proizvodi od mleka"*, Tara 2006.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Tamime, Y.A., Robinson, K.R. (2004): *Yoghurt Science and technology*, Woodhead publishing, Cambridge, England.
- Robinson, R. K., Itsaranuwat, P. (2006): *Properties of yoghurt and their appraisal in Fermented milks* ed. A. Y. Tamime, Blackwell, 76-94.
- Surono I.S., Hosono, A. (2011): *Types and standards of identity in Encyclopedia of Dairy Science*, Elsevier Academic Press, London, UK.

IZVOD

SENZORNA ANALIZA JOGURTA SA TRŽIŠTA MAKEDONIJE

Sterja M. Sterjovski¹, Sonja D. Srbinovska¹, Vanja G. Madjoska²

¹ Fakultet za poljoprivredne nauke i hranu, Skoplje, Makedonija

² Opštinska uprava, Makedonski Brod, Makedonija

U radu su prikazani rezultati istraživanja uticaja temperature skladištenja na tri komercijalna uzorka jogurta kupljena u maloprodajnim objektima. Uzorci jogurta skladišteni su na 4 i 8°C u toku 20 dana, dok su analize sprovedene 1. i 20. dana. Senzorna analiza vršena je jedan dan nakon proizvodnje i pokazala je dobre rezultate u sve tri varijante. Nakon 20. dana sve tri vrste jogurta čuvane na 4 i 8°C pokazale su neprihvatljive promene u pogledu ukusa i ostalih senzornih karakteristika, te stoga senzorna analiza nije rađena.

Ključne reči: jogurt • temperatura skladištenja • senzorna analiza

KATARINA TONKOVIĆ
LJERKA GREGUREK
ŽELJKA KRŠEV ŠURIĆ

Probiotik d.o.o., Zagreb, Hrvatska

ORIGINALNI NAUČNI RAD

UDK: 637.354:542.816

PRIMJENA PROCESA ULTRAFILTRACIJE U PROIZVODNJI POLUTVRDOG SIRA TIPA TRAPIST – PRIMJER IZ PRAKSE

Proces ultrafiltracije ima primjenu u proizvodnji većine vrsta sireva i fermentiranih mliječnih proizvoda posljednjih 40 godina, s ciljem povećanja hranjive vrijednosti i prinosa sira. Sve više, proces ultrafiltracije se primjenjuje i u proizvodnji novih vrsta sireva, mlijeka s povećanim sadržajem proteina ili smanjenim sadržajem (ili bez) laktoze, mliječnih namaza, itd. Cilj rada bilo je proučavanje uvođenja procesa ultrafiltracije kod proizvodnje polutvrdo sira tipa Trapist, s naglaskom na rješavanje problema koji se pojavljuju u proizvodnji te prednosti koje se postižu uvođenjem ultrafiltracije u proizvodnju sira.

Ključne reči: ultrafiltracija • polutvrđi sir • primjena • prednosti • procesni problemi

UVOD

Ultrafiltracija je tlačni postupak filtracije u kojem se preko polupropusne membrane separiraju/frakcioniraju velike molekule poput proteina (koje zaostaju na membrani), od manjih molekula (poput laktoze, mineralnih tvari i vode), koje prolaze kroz polupropusnu membranu. U postupku ultrafiltracije primjenjuju se pritisci od 1-10 bara, s membranama veličine pore 0,001-0,01 µm na kojima se zadržavaju makromolekule molekulske težine 1.000-200.000 Da (Jeličić, 2012). Frakcioniranje mlijeka membranskim postupkom ultrafiltracije koristi se u proizvodnji gotovo svih vrsta mliječnih proizvoda, a posebno sireva, većinom zbog: mogućnosti maksimalnog iskorištenja sirovine, veće biološke vrijednosti proizvedenog sira (veća količina proteina, posebno biološki najvrednijih proteina sirutke), manjeg gubitka kazeina sirutkom, smanjenja utroška energije i ušteda u proizvodnji (manji dodatak sirila i starter kulture, boje i soli). Najvažnije, uvođenjem procesa ultrafiltracije u proizvodnju moguće je standardizirati sadržaj proteina i masti u mlijeku za proizvodnju sireva, a time direktno utjecati na prinos sira, što je od najveće ekonomske važnosti za sirare.

MATERIJAL I METODI

Za ultrafiltraciju mlijeka korišten je modul za ultrafiltraciju industrijskog tipa s polisulfonskim membranama, a faktor ugušćenja ultrafiltriranog mlijeka bio je 1,72. Temperatura pasterizacije retentata iznosila je 78,9°C, a izlazna temperatura 27,1°C.

Za probnu proizvodnju polutvrdo sira u tipu Trapist korištena je mješavina retentata i pasteriziranog mlijeka u količini od 5.000 litara u kojoj je odnos retentat: mlijeko bio 1:1,2 (1,3). Temperatura mlijeka bila je 24°C. Za

proizvodnju sira Trapist slijeđen je standardni postupak proizvodnje sira u mljekari, bez preinake postupka: u mješavinu retentata i mlijeka temperature 32-33°C (uz dogrijavanje mješavine ukoliko je potrebno nakon punjenja u sirozagotavljač) dodaje se odabrana starter kultura (prema proizvođačkoj specifikaciji) i kalcij klorid (za poboljšanje grušanja mlijeka), a 30 minuta poslije enzim za ubrzanje zrenja i sirilo. Nakon postignute dovoljne čvrstoće gruša započinje se s miješanjem gruša i njegovim dogrijavanjem i sušenjem do temperature 43°C u ukupnom trajanju 45 minuta, tj. do dobivanja suhog zrna veličine pšenice (bliže tehnologiji tvrdog sira). Nakon toga slijede prešanje i soljenje sira u salamuri prema standardnim procedurama mljekare. Zrenje sira odvija se pri 12°C i relativnoj vlazi od 75-80% i traje 40 dana. U proizvodnji sira tipa Trapist od UF mlijeka korišteno je: kombinacija komercijalnih dubokosmrznutih starter kultura (*Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. i *Streptococcus thermophilus*), sirilo (jačine 1800 IMCU/mL) i enzim za ubrzanje zrenja (specifične karboksipeptidaze/proteaze), sve prema proizvođačkim specifikacijama proizvođača DSM Food Specialties (Nizozemska).

REZULTATI I DISKUSIJA

Kemijski sastav, točka leđišta (% dodane vode) i kiselost retentata, mlijeka i mješavine retentat + mlijeko dane su u tablici 1.

Standardizacijom sastavnih komponenti mlijeka želi se postići njihovo maksimalno ekonomsko iskorištenje tijekom cijele godine. Željeni/ciljani sastav mliječne masti u mješavini retentata i mlijeka za proizvodnju polutvrdo sira tipa Trapist trebao je biti minimalno 3,1%, a proteina 4,0-4,5%. Kako se vidi iz dobivenih podataka,

Adresa autora:
Katarina Tonković, univ. spec. techn. aliment.
dipl. ing.
PROBIOTIK d.o.o., Ulica grada Gospića 3
10000 Zagreb, Croatia
e-mail: katarina.tonkovic@probiotik.hr

Tablica 1. KEMIJSKI SASTAV I KARAKTERISTIKE MLIJEKA, RETENTATA I MJEŠAVINE MLIJEKA I RETENTATA

Table 2. CHEMICAL COMPOSITION AND CHARACTERISTICS OF MILK, RETENTATE AND THEIR MIXTURE

	mlječna mast	proteini	laktoza	ukupna suha tvar	bezmasna suha tvar	ledište	pH/ °SH
Mlijeko	2,79	2,95	4,12	10,57	8,574	-0,468 (9,47% vode)	6,65/6,20
Retentat	3,32	5,41	4,12	13,56	10,24	-0,504 (2,51% vode)	6,60/6,00
mljeko + retentat	2,97	3,91	3,95	11,53	8,57	0,451 (12,76% vode)	6,52/7,20

postoci mlječne masti i proteina bili su niži od ciljanih vrijednosti. Analiza mješavine retentata i mlijeka ukazuje i na značajnu količinu vode za koju je utvrđeno da ulazi u siroizgotovljač prilikom njegova punjenja s pasteriziranim mlijekom, a potom i u procesu dodavanja ultrafiltrata, što se odražava na sastav sirovine za proizvodnju sira u vrlo negativnom smislu. Također, poznato je da postupak ultrafiltracije mlijeka mijenja odnose proteina i suhe tvari, koji je u pokusnoj proizvodnji UF sira iznosio 0,50, a navodi se npr. da je za proizvodnju St. Paulina (najcjenjenija vrsta polutvrdog sira iz Francuske, koja se smatra pretečom Trapist) potreban odnos 0,80 (Ostojić, M., 1989).

Kemijski sastav proizvedenog sira od UF mlijeka prikazan je u tablici 2.

Kako se iz rezultata vidi, sadržaj suhe tvari i mlječne masti u suhoj tvari niži je od vrijednosti koje ima sir proizveden iz mlijeka koje nije ultrafiltrirano. Također, literaturne reference navode slijedeći sastav za Trapist (Popović-Vranješ A. i sur., 2009): 48,9 % mlječne masti u suhoj tvari, 62,4 % suhe tvari i 37,6 % vode. Razlog niskom sadržaju mlječne masti i suhe tvari u siru od UF mlijeka je u tome što sastav mješavine retentata i mlijeka koja je korištena u proizvodnji sira tipa Trapist nije u potpunosti odgovarala sastavu mješavine koji se želio postići za proizvodnju sira od UF mlijeka. Jedan od razloga visokog sadržaja vode u UF mlijeku (na početku i na kraju punjenja siroizgotovljača) je u tome što ono putuje od linije za ultrafiltraciju do siroizgotovljača kroz dugačke linije cijevi, pa na početku UF mlijeko istis-

kuje vodu koja se nalazi u cijevima u siroizgotovljaču, a isto tako dio vode koji istiskuje mlijeko iz cijevi ulazi u sastav UF mlijeka za preradu (duže linije cijevi - veća količina vode). Dodatak vode u retentatu i mlijeku nije prihvatljiv, jer mijenja kemijska svojstva sira (sadržaj masti, proteina, laktoze i suhe tvari), pa se ovaj nedostatak u proizvodnji polutvrdog sira iz UF mlijeka treba što prije ukloniti. Osim toga, dodatak vode utječe i na fermentativnu i proteolitičku aktivnost starter kulture što može negativno utjecati na važne procese tijekom zrenja sira. Problem ulaska vode u UF mlijeko za preradu trebao bi se pokušati riješiti uvođenjem npr. automatiziranog procesa kontrole mlijeka u protoku i ulasku u siroizgotovljače denzitometrijom ili ugraditi transparentne cijevi (dužine cca 1 metar) na samom ulasku u siroizgotovljač, pomoću kojih bi se mogao vizualno pratiti izgled mlijeka (npr. obojiti vodu u cijevima nekom prehrambenom bojom, pratiti intenzitet boje i na temelju vizualne procjene odijeliti ulaz mješavine vode i mlijeka od ulaza čistog mlijeka).

Važno je napomenuti da su prilikom proizvodnje Trapist od UF mlijeka napravljene i određene uštede prvenstveno u količini dodataka, čija je količina smanjena za u odnosu na standardnu proizvodnju. Količina dodanog kalcij-klorida smanjena je za cca 45%, a sirila za 35% (sirilo se dodaje prema preporuci proizvođača za proizvodnju polutvrdog sira). To se objašnjava činjenicom da je grušenje UF mlijeka brže jer proces agregiranja kazeinskih micela započinje pri manjem stupnju hidrolize κ -kazeina nego

kod uobičajenog mlijeka, a, također, čvrstoća gela UF mlijeka je veća od čvrstoće gela običnog mlijeka zbog većeg sadržaja suhe tvari (Tratnik i Božanić, 2012). Također, proces ultrafiltracije omogućuje manji kapacitet proizvodnih uređaja za istu količinu sira. Dodatnu uštedu energije moguće je postići ukoliko se regulira da izlazna temperatura retentata bude dovoljno visoka, jer će ono miješanjem s mlijekom adekvatne temperature imati za proces prerade prihvatljivu temperaturu te neće biti potrebno njegovo dodatno dogrijavanje.

Senzorska procjena od strane pet senzorskih ocjenjivača dala je vrlo dobre ocjene za proizvedeni sir Trapist od UF mlijeka. Sir je imao pravilne male rupice, a boja, tekstura, mirisa i okus bili su više izraženi i karakteristični za sir tipa Trapist. Na okus sira utjecao je dodatak specifičnih proteaza (karboksipeptidaza), jer se time povećala njihova koncentracija u siru čime se direktno utjecalo na brzinu zrenja sira i njegov krajnji okus. Bilo koji proces koji rezultira ubrzanjem zrenja sira zanimljiv je također s ekonomskog stajališta: ista količina sira može se proizvesti u kraćem vremenskom intervalu (Fox i McSweeney, Food Rev. Int (1996) 12, 457-509).

ZAKLJUČAK

Na osnovi dobivenih rezultata i opservacija sakupljenih tijekom probne proizvodnje polutvrdog sira tipa Trapist od UF mlijeka, možemo zaključiti slijedeće:

Od UF mlijeka moguće je proizvesti vrlo kvalitetni standardizirani proiz-

Tablica 2. KEMIJSKI SASTAV I KARAKTERISTIKE SIRA PROIZVEDENOG IZ MJEŠAVINE RETENTATA I MLIJEKA I STANDARDNOG SIRA PROIZVEDENOG IZ MLIJEKA KOJE NIJE ULTRAFILTRIRANO

Table 2. CHEMICAL COMPOSITION AND CHARACTERISTICS OF CHEESE PRODUCED FROM MIXTURE OF MILK AND RETENTATE AND CHEESE PRODUCED FROM MILK

	mlječna mast	voda	suha tvar	m. mast u suhoj tvari	° SH	pH
retentat+mlijeko	24,47	43,97	56,03	43,67	20	5,34
mlijeko	30,82	37,38	62,62	49,21	30	5,30

vod – sir Trapist. Potrebno je prilagoditi omjere miješanja retentata i mlijeka, a kako bi se u sirovini za proizvodnju sira dobila željena koncentracija mliječne masti i proteina, što utječe na pozitivan randman sira. Također, potrebno je pronaći način uklanjanja vode iz retentata i mlijeka koji ulaze u siroztgotovljač, jer dodana voda ozbiljno narušava kemijski sastav mlijeka, a time utječe na fermentacijsku i proteolitičku aktivnost starter kulture. Smanjena je količina dodataka poput kalcij-klorida i sirila, čime se postiže ekonomska ušteda, kao i kod smanjenog utroška energije prilikom dogrijavanja mlijeka na temperaturu fermentacije u

siroztgotovljaču. Bolje ocjene sensor-ske procjene panel skupine ocjenjivača dobio je sir proizveden iz UF mlijeka s dodatkom specifičnih proteaza koje ubrzavaju zrenje sira u usporedbi sa sirom koji je proizveden iz mlijeka koje nije UF i bez dodatka specifičnih proteaza.

LITERATURA

- Jeličić, I. (2012): Primjena procesa mikrofiltracije i ultrafiltracije u mljekarskoj industriji. 40. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran.
- Ostojić, M. (1989): Ispitivanje kemijskog sastava sira tipa Trapist proizvedenog od ultrafiltriranog mlijeka. *Mljekarstvo* 39 (12), 323-325.

Popović-Vranješ A. i sur., (2009): Utjecaj mlijeka, aditiva i tehnologije na kemijski sastav i senzorska svojstva sira Trapist. *Mljekarstvo* 59 (1), 70-77.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): Sirarstvo. Poglavlje 4, u: Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 231.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (1996): Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* (12), 457-509.

SUMMARY

THE APPLICATION OF ULTRAFILTRATION PROCESS IN THE PRODUCTION OF SEMI-HARD TRAPPIST CHEESE TYPE - CASE STUDY

Katarina Tonković, Ljerka Gregurek, Željka Kršev Šurić

PROBIOTIK d.o.o., Zagreb, Croatia

Ultrafiltration process has its applications in the production of most cheese types and fermented milk products for last 40 years, in order to increase the nutritional value and yield of cheese. More and more, ultrafiltration process is used in production of new varieties of cheese, milk with higher protein content and reduced content (or without) of lactose, dairy spreads, etc. The aim of this work was to study introduction of the milk ultrafiltration process in the production of semi-hard cheese Trappist type, with the focus on resolving the problems encountered in the production and to highlight the benefits which are achieved by introducing milk ultrafiltration in cheese production.

Key words: ultrafiltration • cheese • application • advantages • process problems

¹ HUSEJIN I. KERAN
¹ AMRA S. ODOBAŠIĆ
¹ SEAD O. ČATIĆ
¹ INDIRA J. ŠESTAN
¹ AMRA I. BRATOVIĆ
¹ EMA M. OBRALIĆ
² EMIRA E. OMERAGIĆ

¹ Univerzitet u Tuzli. Tehnološki fakultet,
 Bosna i Hercegovina

² PMG-VIP, Bosna i Hercegovina

ORIGINALNI NAUČNI RAD

UDK: 637.12:[546.47+546.56]

ODREĐIVANJE ESENCIJALNIH ELEMENATA U MLIJEKU PRIMJENOM VOLTAMETRIJSKE TEHNIKE

UVOD

Mlijeko je namirnica bogata mastima (lipidima), proteinima, ugljenim hidratima, mineralima, vitaminima i udjelom vode, u odnosima koji najbolje odgovaraju ljudskom organizmu. Po svom sastavu predstavlja najidealniju hranu, prirodna je hrana dojenčadi, upotrebljava se u normalnoj ishrani odraslih ljudi i važan je faktor u dijetoterapiji mnogih oboljenja. Iako su esencijalni elementi uobičajeni sastojci mlijeka mogu postati ozbiljni toksikanti, ako su prisutni u koncentracijama većim od dozvoljenih.

Cu i Zn su esencijalna vrsta metala i vrlo rijetko se pojavljuju kao kontaminanti u hrani. Međutim zbog svoje obilnosti u okolišu i uz moguća zagađenja mogu preći određenu prihvatljivu granicu i na taj način uzeti ulogu ozbiljnih toksikanata. Deficit bakra je praćen anemijom i želučano-crijevnim poremećajima, deformacijom kostiju, zastoje u rastu i depigmentacijom kose. Wilsonova bolest urođeni je poremećaj metabolizma primarno uzrokovana abnormalnom toksičnošću bakra. Takva greška uzrokuje toksični metabolizam bakra, i pogađa centralni nervni sistem.

Do apsorpcije Cu dolazi pod uticajem brojnih drugih dijetetskih, fizioloških i endogenih faktora. U zakonskoj regulativi države Bosne i Hercegovine nisu definisane maksimalne dozvoljene koncentracije bakra i cinka u mlijeku, mada se pretpostavlja da koncentracija cinka (Zn) kreće do 44 mg/kg, a bakra (Cu) 1,6 mg/kg. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je predložila minimalne dnevne potrebe bakra od 1,4 mg/dan za odrasle, a za djecu 0,75 mg/dan. Naučni komitet za hranu Evropske Unije (SCF of EU, 1993), je predložio unos bakra do 10 mg/dan.

Prosječan dnevni unos bakra hranom, kreće se u granicama od 2 do 5 mg/dan. Unos Zn za vegetarijance vrši se preko mlijeka. Neophodan je i za procese sinteze bjelancevina, kao i za izgradnju životno važne DNA kao osnovnog elementa stanične jezgre. Ukoliko se Zn unosi u organizam u većim količinama dolazi do određenih poteškoća kao što su: redukcija apsorpcije bakra, slabljenje imunog sistema, metalni okus u ustima, glavobolja, dijareja, oštećenje bubrega i pankreasa. Ekstremno niske ili visoke doze ovog metala mogu pospješiti sklonost nastanku kancerogenih oboljenja. Prosječan unos Zn u hrani zavisi od proteinskih izvora jer su oni važni nosioci ovog elementa. Sandstead i sar. predlažu dnevne koncentracije Zn od 3-5 mg za novorođenčad, 5-10 mg za odrasle i 13-25 mg za trudnice. Maksimalno dozvoljena tolerančna doza (PMTDI), koju je postavila Svjetska zdravstvena organizacija iznosi 1 mg cinka po kg tjelesne mase. Prema prilogu Naučnog komiteta za hranu EU (SCF of EU, 1993) vrijednost dnevnog unosa ne bi trebale prelaziti 30 mg kod odraslih. Poznavanje granica i količina u kojima se može uzimati odnosno konzumirati proizvodi koji sadrže Zn i Cu je veoma bitno iz razloga što čest unos suplemenata Zn može doprinjeti ili uzrokovati deficit Cu u organizmu.

MATERIJAL I METODI

Za mjerenje koncentracije metalnih jona cinka i bakra u mlijeku primijenjena je elektrodna metoda, diferencijalna pulsna anoda striping voltametrija (DPASV). DPASV je izvedena u elektroanalitičkoj ćeliji (Princeton Applied Research model 303 A) sa radnom, referentnom i pomoć-

Ključne riječi: mlijeko • Cu • Zn • diferencijalna pulsna anoda striping voltametrija

Author address:
 Prof. dr Indira Šestan, University of Tuzla,
 Faculty of Technology, Bosnia and Herzegovina
 e-mail: indira.sestan@untz.ba

nom elektrodom. Kao radna elektroda korištena je živina kapajuća elektroda, (Ag/AgCl) kao referentna elektroda i platinska žica kao pomoćna elektroda. Korišten je potencijostat/galvanostat, PAR model 263 A i računar sa instaliranim programom Model 270/250 Research Electrochemistry Software, version 4.3, za kontrolu i praćenje voltametrijskih mjerenja. Proces analize je započet u elektroanalitičkoj ćeliji (10 ml) sa uronjenim elektrodama u ispitivani medij (sa predhodno podešenim pH), provođenjem struje internog plina. Kao interni plin korišten je azot velikog stepena čistoće (99,999%) čijim uvođenjem je omogućeno uklanjanje atmosferski otopljenog kisika koji može oslabiti koncentraciju elektrolizom izlučenih metala u živi i tako smanjiti osjetljivost i reproducibilnost određivanja. U postupku deaeracije izlučuje se živina kap nakon čega slijedi proces elektrolize. Eksperiment anodne stripping voltametrije započinje procesom elektrodepozicije. Metalni jon iz rastvora se redukuje u metalni oblik gradeći amalgam na HMDE. Pretkoncentracija metalnih iona se dešava tokom zadanog vremena depozicije pri konstantnom potencijalu uz kontrolirane hidrodinamičke uslove. Tokom ovog procesa rastvor u ćeliji se intenzivno mijesha. Struja ćelije tokom depozicije je katodna. Nakon elektrodepozicije slijedi period mirovanja, a zatim proces anodnog otapanja depozita koji se odvija uz linearnu promjenu potencijala radne elektrode, odnosno dolazi do anode oksidacije prethodno izlučenih metala nazad u jonski oblik i smanjenja primijenjenog potencijala u pozitivnom smjeru. Tokom procesa anodnog otapanja mjeri se rezultujuća struja koja je proporcionalna koncentraciji istaloženog metala iz ispitivanog medija. Adicijom standardnog rastvora ispitivanog metala, proces se ponavlja sa novoformiranom živinom kapi pod zadanim uslovima. U procesu pripreme i analize uzoraka korištene su hemikalije visokog stepena čistoće (proizvođača Merck Chemik). Kod pripreme uzoraka i standardnih rastvora koristila se redestilovana voda dobivena postupkom trostruke destilacije.

Standardni rastvori metala koji su odabrani za analizu, pripremani su u koncentracijama od 10^{-3} mol/L i 10^{-4} mol/L. Cink standardni rastvor: $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ u HNO_3 (0.5 M) $C(\text{Zn}) = 1000$ mg/l (Mercet) i bakar standardni rastvor $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ u HNO_3 (0.5 M) $C(\text{Cu}) = 1000$ g/l (Mercet).

Tabela 1. POČETNI I KONAČNI POTENCIJALI CINKA I BAKRA

Table 1. INITIAL AND FINAL POTENTIAL OF ZINC AND COPPER

Metal	Početni potencijal	Konačni potencijal
Zn	-1.3 V ; -1.2 V	-0.9 V, -1 V
Cu	-0.3 V	0.1 V

Za analizu cinka i bakra uzete su četiri reprezentativne vrste mlijeka, od kojih mlijeko I nije lokalnog područja.

Analizom su određene ukupne koncentracije Cu i Zn u sva četiri uzorka.

Parametri korišteni za određivanje koncentracija Cu i Zn primjenom diferencijalne pulsne anodne stripping voltametrije:

- Vrijeme depozicije 600 s
- Vrijeme skeniranja 2 mV/s
- Vrijeme deaeracije 300 s
- Amplituda 0.05 V
- Potencijal.

Početni i konačni potencijali za Cu i Zn dati su u tabeli 1.

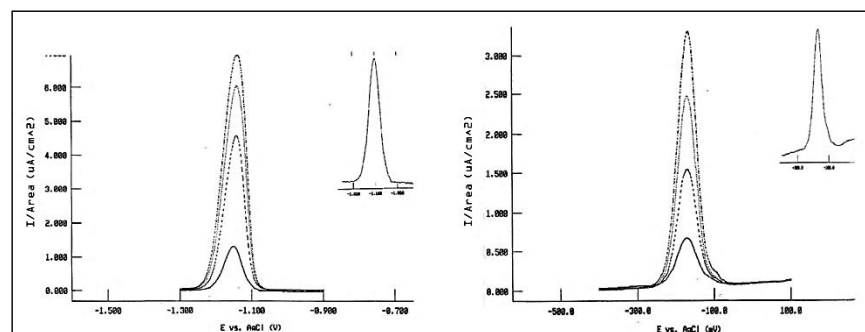
REZULTATI I DISKUSIJA

Koncentracije teških metala, odnosno esencijalnih elemenata Cu i Zn su dobivene primjenom matematičke metode standardnog dodatka u Mathcad programu i analizom rezultata dobivenih diferencijalnom anodnom stripping voltametrijom. U tabeli 2 su predstavljene koncentracije navedenih esencijalnih elemenata u četiri uzorka.

Tabela 2. PREGLED UKUPNIH PROSJEČNIH KONCENTRACIJA CINKA I BAKRA U MLJEKU

Table 2. THE REVIEW OF AVERAGE CONCENTRATIONS OF ZINC AND COPPER IN MILK

Uzorak mlijeka	Ukupna prosječna koncentracija bakra mg/kg	Ukupna prosječna koncentracija cinka mg/kg
I	0.35	4.96
II	0.39	5.03
III	0.2	2.2
IV	0.43	2.5



Slika 1. KARAKTERISTIČNI VOLTAMOGRAMI UZORAKA

Figure 1. CHARACTERISTIC VOLTAMMOGRAMS OF SAMPLES

se i u ovom slučaju Zn nalazi u količinama prirodne koncentracije u mlijeku. Najmanji sadržaj Cu (0.2 mg/l) se očituje u mlijeku III, dok u mlijeku IV Cu ima najveću koncentraciju 0.43 mg/l.

ZAKLJUČAK

Mlijeko i mliječni proizvodi predstavljaju važne prehrambene namirnice i dio su svakodnevne prehrane, te je zbog toga potrebna stalna kontrola. Sistemsku i preciznu kontrolu namirnica omogućavaju polarografske tehnike čiju primjenu opravdava veoma niska granica detekcije. Cink i ba-

kar su nađeni u okviru očekivanih prirodnih koncentracija u mlijeku i mogu se okarakterisati kao nutritivni elementi koji su neophodni za organizam i oni ne predstavljaju opasnost za konzumenta ukoliko se unose u dozvoljenim količinama. Opterećenost organizma bi bila veća za djecu ukoliko bi i samo konzumiranje bilo povećano u odnosu na tjelesnu masu. Praćenje koncentracije navedenih elemenata nije bitno samo radi povećanja njihove koncentracije nego i radi praćenja njihove prisutnosti, jer i samim deficitom dolazi do neželjenih oboljenja. Koncentracije Zn i Cu se moraju pratiti i porediti sa vrijednostima utvrđenim od

strane EU i WHO, jer ne postoji zakonska regulativa o njihovoj dozvoljenoj i maksimalnoj količini u Bosni i Hercegovini.

LITERATURA

- Emira Omeragić. Magistarski rad. Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet, 2002.
 Lewis A.G.: The Biological importance of Copper. INCA Project No. 223, 1-115, 1991.
 Rojas E., Herrera L. A., Ostrosky-Wegman P.: Are Metals Dietary Carcinogenes? Mutation Research. 443, 157-181, 1999.
 WHO, Zinc, Environmental Health Criteria (EHC) 200, International Programme on Chemical Safety (IPCS), World Health Organization, Geneva 2001.

SUMMARY

ESSENTIAL ELEMENTS CONTENT DETERMINATION IN MILK BY APPLYING THE VOLTAMMETRY METHOD

Husejin I. Keran¹, Amra S. Odobašić¹, Sead O. Čatić¹, Indira J. Šestan¹, Amra I. Bratovčić¹, Ema M. Obralić¹, Emira E. Omeragić²

¹ University of Tuzla, Faculty of Technology, Bosnia and Herzegovina

² PMG-VIP, Bosnia and Herzegovina

Milk is a complex organic substance containing all the essential substances necessary for human organism. Till today there have been found about 40 different mineral components in milk. According to the quantity, these are divided into macro and micro elements. Milk is rich in the following microelements: Zn, Cu, Fe, Se, Al, Cl, Sr, Mo etc. Cu and Zn belong to the heavy metals, which are essential for human organism. The intake of the food containing Zn and Cu is essential considering that these cannot be synthesized in organism. The lack of Cu and Zn can stimulate the emergence of serious diseases (cancer diseases). Therefore, the intake of the food containing Zn and Cu is very important, primarily with milk and dairy products. It is necessary to know the exact Cu and Zn concentration which has been taken in the organism. If the concentration is above the maximal allowed values it can cross the limits of essential to toxic. The aim of this article is to evaluate the concentration of essential elements (Zn and Cu) using Differential Pulse Anodic Voltammetry (DPASV) based on the representative alimentary milk products which are present in daily consumption.

Key words: milk • copper • zinc • differential pulse anodic stripping voltammetry

SINIŠA L. MARKOV,
NEVENA R. KLISARA,
DRAGOLJUB D. CVETKOVIĆ,
ALEKSANDRA S. VELIČANSKI

University of Novi Sad, Faculty of
Technology Novi Sad, Serbia

ORIGINALNI NAUČNI RAD

UDK: 637.352:579.67:339.175(497.113)

RASPROSTRANJENOST *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* U SVEŽIM SIREVIMA NA TRŽIŠTU NOVOG SADA

UVOD

Listerioza je bolest ljudi i životinja, koja je najviše uzrokovana *L. monocytogenes*, kao posledica kontaminacije hrane, životne sredine i infekcije životinja. U svetu, listerioza se ubraja u najopasnije bakterijske bolesti prenosive hranom, sa niskom učestalošću ali visokim stepenom smrtnosti. Cilj ovog istraživanja bio je da se izoluje i identifikuje *L. monocytogenes* iz svežih sireva (kriška i sitni) kupljenih u maloprodajnim objektima ili na pijaci. Šezdeset četiri uzorka svežeg sira, od kojih je 32 kupljeno u maloprodajnim objektima, a 32 sa pijace na području teritorije Novog Sada, ispitano je tokom 2011. i 2013. godine. Otkrivanje *L. monocytogenes* izvedeno je po međunarodnom standardu prihvaćenom u našoj zemlji SRPS ISO 11290-1. Za identifikaciju izolata korišćen je aparat VITEK2 Compact. Od 64 testirana uzorka svežeg sira, samo u dva uzorka kriška sira raznih proizvođača (jedan iz maloprodaje, a drugi sa pijace) detektovano je prisustvo *L. monocytogenes*. Na osnovu toga se može proceniti da je 0,25% uzoraka kontaminirano, odnosno nebezbedno za tržište.

Ključne reči: sveži sir • kriška sir • sitni sir
• listerije • *L. monocytogenes* fermented

Rod *Listeria* je dobila ime po lordu Džozefu Listeru, engleskom hirurгу koji je uveo postupak aseptične hirurgije, a zbog značaja za bakterijsku bezbednost hrane podsećanje na ovo svetlo ime je često u vezi sa gubicima ljudskih života. Najznačajniji predstavnik ovog roda je *L. monocytogenes* koja je otkrivena 1926. godine od strane Murray, Webb i Swann-a kao uzročnik epizotije među laboratorijskim kunićima i zamorcima (Kolarec, 2009). Prema aktuelnoj klasifikaciji razlikuje se šest vrsta ovog roda, a to su: *L. monocytogenes*; *L. innocua*; *L. ivanovii*; *L. seeligeri*; *L. welshimeri* i *L. grayi*. Smatra se da za bezbednost hrane ima značaja samo *L. monocytogenes*, mada po nekim podacima izvestan zdravstveni značaj ima i *L. Ivanovii* (Frece i sar., 2010).

Glavne ekološke karakteristike *L. monocytogenes* od značaja za bezbednost hrane su: sposobnost pojedinih sojeva da rastu pri niskim pH vrednostima (<4,1); sposobnost rasta u proizvodima sa visokim sadržajem NaCl (i do 20%); sposobnost rasta na niskim temperaturama, što obuhvata temperaturu skladištenja od 4°C, ali i nižu od 0°C što znači da se mogu umnožavati u hrani iz frižidera; biokinetička zona je između 3°C i 45°C, a optimalna je od 30-37°C; u odnosu na druge bakterije značajne za bezbednost/kvalitet hrane odlikuje je veća tolerancija na niže vrednosti aktivnosti vode, tj. duže preživljavaju u takvim matriksima (Popović i Milošević, 2008). Pored toga, važna svojstva su mogućnost rasta u hrani pakovanoj pod vakumom, ili u atmosferi azota. Rast se takođe ispoljava pri visokom sadržaju CO₂ (oko 30%), ali je inhibiran pri sadržaju od 75% CO₂ (Mullan, 2009). Nasuprot otpornosti ovu bak-

teriju odlikuje odumiranje pri pastemizaciji na 72°C tokom 15s, kao i veća osetljivost na UV zračenje od ostalih gram-pozitivnih bakterija. Takođe je od značaja što je ona slab konkurent pa ne raste u prisustvu više konkurentnih organizama kao što su npr. mlečno kisele bakterije (Liu i sar., 2007). Dokazano je da različite organske kiseline kao što su sirćetne, mlečna i limunska kiselina značajno inhibiraju rast *L. monocytogenes* (Graham i sar., 1996).

Prva opisana alimentarna epidemija listerioze desila se u Bostonu 1979. god., a drugi slučaj listerioze desio se u Novoj Škotskoj 1981. god., nakon konzumiranja salate od kupusa, koja je uzgajana u polju đubrenim ovčijim izmetom (Popović i Milošević, 2008). Prema istraživanjima, 1981. god. u Kanadi je obolela 41 osoba, a 1985. god. u Kaliforniji 142 osobe su obobile koje su konzumirale neku vrstu svežih sireva (Kaegar i Ghasemi, 2009). Od tog vremena su u mnogim zemljama uspostavljeni vrlo rigorozni kriterijumi za njeno detektovanje u hrani.

Dva tipa bolesti izaziva *L. monocytogenes*, pa se na osnovu toga patogeni sojevi orijentaciono dele na invazivne i neinvazivne. Neinvazivne listerioze su poznate kao febrilni gastroenteritis, koji se lako zameni sa blagim simptomima gripa. Može da se javi kod zdravih ljudi ako su uneli ogroman broj ćelija, a inkubacija neinvazivne forme listerioze traje od 11h do 7 dana. Invazivne listerioze se javljaju kao posledica konzumiranja hrane kontaminirane visoko patogenim sojevima može da izazove i niz drugih zdravstvenih problema, pa tako kod trudnica izaziva spontani abortus ili mrtvorođenje. Pored trudnica obolevaju ljudi sa slabim imunitetom, npr. stariji. Ukupno gledano mortalitet liste-

Adresa autora:

Prof. dr Siniša L. Markov, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Telefon: +381 21 485 3729
E-mail: sinisam@tf.uns.ac.rs

riozne je veći od 23%, a infektivna doza zavisi od osetljivosti konzumenta kontaminirane hrane, međutim mnogi lekari i naučnici se slažu da je količina od 100 do 1.000 ćelija dovoljna (Švačić-Vlahović, 2005).

Prvobitno stanište ove bakterije je zemljište i vegetacija, gde se nalazi kao saprofit, ali je otkrivena kod sisara, ptica i nekih vrsta riba i ljuskara. Rasprostranjena je i u površinskim vodama, silaži, industrijskom bilju i drugim prirodnim sredinama (Jovanov, 2010). Od osobitog značaja je što može da formira biofilmove na površini materijala koji su zastupljeni u prehrambenoj industriji (čelik, plastika, staklo, liveno gvožđe) (Mørseth i Langsrud, 2004).

Ubikvitarnost u prirodi je doprinela širokoj rasprostranjenosti u različitim prehrambenim proizvodima. Pronađena je u pasterizovanom mleku, svežem mleku, pašteti, jogurtu, sladoledu, mesu, itd. (Lake i sar., 2005). Dokazano je da je ručno pakovana hrana više kontaminirana nego hrana mašinski pakovana, kao posledica veće mogućnosti kontaminacije zbog njene sveprisutnosti. Prisustvo u nekoj hrani obavezuje državne organe i proizvođače na preduzimanje niza mera, kao što je povlačenje proizvoda sa tržišta, i njihovo uništavanje, privremeno zatvaranje fabrike i intenzivno čišćenje. Ovakav incident može prouzrokovati stvarno velik gubitak za proizvođača i može dovesti do gubitka poverenja konzumenata u bezbednost proizvoda (ADASC, 1999).

Pored navedenih proizvoda, *L. monocytogenes* je otkrivena u raznim mlečnim proizvodima, kao npr. u mekim i polumekim sirevima, a procenjena učestalost nalaza je u rasponu od 0,5 % do 46 % (Moscalewski Abrahao i sar., 2008). Prema istraživanjima u Brazilu zaključeno je da su najviše kontaminirani tipovi sira kao što su: mocarela, meki krem sirevi, meki sirevi za kulinarske svrhe (Moscalewski Abrahao i sar., 2008). U Meksiku najviše je obolelo ljudi koji su konzumirali sir kupljen „od vrata do vrata“ i na pijaci (Anon., 2001). Smatra se da mladi sirevi proizvedeni na tradicionalan način više kontaminirani usled loših higijenskih uslova-loš kvaliteta mleka, prljave ruke radnika, nečisti sudovi i prostorija u kojoj se proizvodi, itd. (Gebretsadik i sar., 2011). Slučajevi alimentarnih obolenja pored veze sa konzumacijom sireva, ukazuju i na sveže mleko gde se od brojnih izazivača bolesti nalazi i *L. monocytogenes* sa učešćem od 15% (Bu-

lajić i sar., 2010). Prema istraživanju koje je sprovedeno u Švedskoj, za razliku od direktne veze konzumiranja nepasterizovanog mleka i listerioze, nije utvrđena korelacija između konzumiranja svežih sireva i registrovanih listerioza (Carrique-Mas i sar., 2003).

Prema direktivi EU uspostavljeni su rigorozni kriterijumi za njenu detekciju u većini životnih namirnica (EC, 1999). U našoj zemlji se po prvi put uvodi u praksu ispitivanje na prisustvo *L. monocytogenes* tek od sredine 2011 godine (Pravilnik 72/10).

Masovno mikrobiološko analiziranje hrane na prisustvo listerija doprinelo je da su danas dostupne brojne metode za njihovo otkrivanje. Osnovni problem detekcije *L. monocytogenes* u hrani je što je najčešće ona prisutna u vrlo malom broju u odnosu na ostale vrlo heterogene mikrobiote. Samo jedna metoda data u ISO standardu je opšte priznata u prometu hrane na razna tržišta. Poznata su i izvesna ograničenja ove metode, kao što je npr. vreme (oko 5 dana da bi se potvrdio negativan rezultat i još oko 5 dana za potvrdu pozitivnog rezultata). Potvrđena je i mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata na prisustvo *L. monocytogenes*, jer i *L. innocua* daje iste pozitivne rezultate na potvrđnim oledima, ali nije patogena (Gnanou Besse i sar., 2010).

Cilj ovog rada je da se odredi prisustvo *L. monocytogenes* u svežim sirevima proizvedenim u mikro i malim proizvodnim sistemima, kao i u svežim sirevima sa pijace na teritoriji Novog Sada primenom međunarodnog standarda uz sagledavanje njegovih ograničenja. Takođe je cilj rada da se na osnovu obima uzorkovanja dobiju početni podaci i izvrši procena zastupljenost ove značajne bakterije u određenom tipu proizvoda.

MATERIJALI I METODE

Za prethodno umnožavanje, kao i za selektivno umnožavanje bakterijskih ćelija su korišćene tečne podloge proizvođača Biokar (Beauvais, Francuska), a za izolaciju su primenjene dve selektivne čvrste podloge: agar za *Listeria* po Oktavijaniju i Agostiju (ALOA) i Palcam agar istog, prethodno navedenog proizvođača. Biomasa dobro izdvojenih tipičnih kolonija je umnožavana na tripton soja agaru sa ekstraktom kvasca (Merck, Darmstadt, Nemačka), a za identifikaciju su korišćene GN kartice (Biomerieux, Marcy l'Étoile, Francuska).

Veći deo uzoraka sira (mladi kriška sir, sitni sir) su nabavljani u maloprodajnim objektima, a proizveli su ih mali proizvođači. Manji deo uzoraka kupljen je na pijaci direktno od individualnih proizvođača. Svi uzorci su uzimani u masi od oko 1/2 kg, a bili su u neupakovanom (rasutom) stanju.

Uzorci sira su istog dana po nabavljanju korišćeni za mikrobiološku analizu i za određivanje pH vrednosti (na pH-metru, HI 9321, Hanna Instruments).

Homogenizacija suspenzije odmerene količine sira i polubujona po Frejzeru vršena je na aparatu Easy Mix (ASE Laboratoire, Bruz, Francuska) u trajanju od 30 sekundi. Otkrivanje *L. monocytogenes* izvedeno je po međunarodnom standardu prihvaćenom u našoj zemlji SRPS ISO 11290-1. Identifikacija izdvojenih izolata urađena je primenom aparata VITEK 2 (Bio-Merieux, Marcy l'Étoile, Francuska).

REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu je ispitano 64 uzoraka svežeg sira, od kojih je 32 prikupljeno u maloprodajnim objektima, a 32 sa pijaca na području teritorije Novog Sada. Uzorci iz maloprodaje su predstavljali proizvodni program četiri mala proizvođača koji su snabdevali prodajne lance Novog Sada sa neupakovanim sirom, koji je odmeravan po zahtevu kupca i pakovan. Kriška sir i sitni sir su uzimani u masi koja je oko 10 puta veća od potrebne za analizu jednog uzorka. Ispitivanja su izvedena u period april-juli 2011. i septembar-oktobar 2013. godine. Svi rezultati ispitivanja su podeljeni, pre svega po proizvodnom poreklu sira, a potom po fazama mikrobiološke analize.

U prvom koraku ispitivanja uzorcima svežeg sira merena je pH vrednost. Kod sireva kupljenih na pijaci pH vrednost se kretala u opsegu 4,18-6,44, sa srednjom vrednošću oko 5,2. Kod sireva kupljenih u maloprodaji pH vrednost se kretala u opsegu 4,34-6,39, sa srednjom vrednošću oko 4,8. Na osnovu izmerenih pH vrednosti može se konstatovati da se obe grupe sireva svrstavaju u kategoriju hrane koja podržava rast *L. monocytogenes* (Anon, 2011).

Uzorci prikupljeni od mladih proizvođača ispitivani su u tri vremenski razdvojena uzorkovanja. U prvom uzorkovanju pozitivna promena boje podloge (polubujon po Frejzeru) konstatovana je kod 3/4 uzoraka (9 uzo-

raka), a samo kod 1/6 (2 uzorka) dobio je negativan rezultat. U sledećoj fazi analize uglavnom su potvrđeni ti rezultati. Što se tiče narednog, vremenski razdvojenog analiziranja proizvoda istih proizvođača rezultati su dosta slični prethodnim, tj. pozitivan nalaz je 1/2 uzoraka (5 uzoraka), a kod 1/4 uzoraka (3 uzorka) dobio je negativan rezultat. U sledećoj fazi rada takođe su uglavnom potvrđeni dobijeni rezultati u prvoj fazi analize. Pored navedenog, kod drugog uzorkovanja zapaža se da kod jednog uzorka nema promene boje podloge ni u predobogaćenju ni u selektivnom obogaćenju (bujon po Frejzeru) što upućuje na odsustvo *Listeria* vrsta. U trećem uzorkovanju značajnije manje uzoraka je sa pozitivnim rezultatom u prvoj fazi rada (samo 2 uzorka), a sa negativnim rezultatom je samo 1 uzorak. Nasuprot toga, u sledećoj fazi analize kod skoro svih uzoraka konstatovan je pozitivan rezultat. Uzimajući u obzir sve analizirane uzorke pojavljuje se i nekoliko specifičnih slučajeva. Konkretno kod nekih uzoraka dobio je pozitivan rezultat u prvoj fazi, a u selektivnom obogaćenju je dobio negativan rezultat, što se može objasniti činjenicom da je u predobogaćenju bio mali broj ćelija *L. monocytogenes* koji je dovoljan da svojim metabolitima izazove promenu boje podloge, ali nije dovoljan da se u 0,1 ml nađe bar jedna živa ćelija koja bi bila preneti u selektivnom obogaćenju. Takođe, konstatovani su takvi slučajevi da se u prvoj fazi dobija negativan rezultat, a u narednoj pozitivan. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat je da u uzorku, a time i u prvoj fazi analize postoji dovoljan broj ćelija za transfer u narednu fazu, ali da one nisu ispoljile fiziološku aktivnost, što indirektno znači da se i nisu značajnije umnožile.

Izolacija *L. monocytogenes* unutar prethodnog oglada izvodi se primenom dvostrukog obogaćenja. Smatra se da su ovo ključne faze u analizi zbog mogućih previda. Sojevi koji su predominantni u originalnom uzorku teže da zadrže svoju dominaciju do kraja obogaćivanja, mada u nekim primerima se javlja značajna promena dominacije tokom koraka obogaćivanja. Poznato je da nepatogene vrste listerija mogu da prerastu i maskiraju patogenu *L. monocytogenes* koja se nalazi u manjem broju u odnosu na ostale, pa takvi slučajevi mogu da dovedu do lažnih negativnih rezultata. Prerastanje sojeva *L. monocytogenes*

od strane sojeva *L. innocua* dešava se zbog interakcije koja se javlja u kasnijoj eksponencijalnoj fazi, gde je poremećen rast oba soja, a on se zaustavlja kada dominantni soj postigne stacionarnu fazu. Pored toga, predobogaćenje (polubujon po Frejzeru) je prvi stepen obogaćenja i ima najveći uticaj na stres i uništavanje ćelija. U selektivnom obogaćenju (bujon po Frejzeru) je dvostruko više glavnih selektivnih sastojaka koji inhibiraju rast ostalih bakterija, a pospešuju rast listerija. Zaključak aktuelnog istraživanja o performansama standardne metode je da razvoj populacije listerija, a time i *L. monocytogenes* poreklom iz hrane, tokom analiziranja zavisi od kompleksnog seta interakcija (Gnanou Besse i sar., 2010).

Izuzimajući jedan uzorak za koji nije dobio pozitivan rezultat u prve dve faze analize kod ostalih je potvrđivano prisustvo listerija, a time i *L. monocytogenes* shodno standardnoj proceduri, tj. presejavanjem na dve selektivne podloge. Na osnovu dobijenih rezultata potvrdne faze rada mogu se izdvojiti uzorci sira sa i bez listerija, tabela 1.

Na osnovu zbirnih rezultata za sva tri uzorkovanja, konstatuje se da kod 13 uzoraka (7 kriška sira i 6 sitnog sira) nije zabeležen rast na primenjenim podlogama pa se za njih analiza završava sa zaključkom da u 25 g uzorka nije detektovano prisustvo *Listeria*, a samim tim ni *L. monocytogenes*. Nasuprot toga, kod 2 uzorka

kriška sira detektovan je rast atipičnih kolonija što takođe upućuje na odsustvo listerija. Kod ostalih uzoraka sira dobijeni su u potvrdnom ogledu različiti rezultati primenom dve selektivne podloge, kao npr., na ALOA nije bilo rasta, a na Palcamu agaru rast atipičnih kolonija i obrnuto, ili na ALOA, odnosno Palcam agaru, su rasle tipične kolonije, a na drugoj primenjenoj podlozi nije bilo rasta.

Sledeća faza analize po standardnoj proceduri je presejavanje pet ili manje (ako ih nema više) tipičnih kolonija na TSYES da bi se dobila čista kultura sa dovoljno biomase za završni ogled, tj. za identifikaciju vrste. Međutim, kolonije listerija na ovoj podlozi se ne razlikuju puno od niza drugih bakterijskih vrsta, pa je za potrebe ovog ispitivanja uvedena međufaza rada – presejavanje na obe primenjene selektivne podloge na kojima je rađena prethodna faza, tj. potvrdni ogled. Za dva uzorka (kriška sir i sitni sir) gde su u potvrdnom ogledu dobijene „sumnjive“ kolonije, javio se atipičan rast na obe primenjene podloge što upućuje da u tim uzorcima najverovatnije nema listerija, kao ni *L. monocytogenes*. Dalje se zapaža da samo kod jednog uzorka iz različitih uzorkovanja selektivnog obogaćivanja, se javlja rast karakterističnih kolonija na obe primenjene podloge, a takođe i za 2 uzorka (kriška i sitni) na ALOA. Kod ostalih uzoraka dobio je rast atipičnih kolonija. U većini slučajeva tokom izolovanja čistih kultura pored rasta

Tabela 1. ZASTUPLJENOST LISTERIJA U UZORCIMA SVEŽIH SIREVA MALIH PROIZVOĐAČA NA OSNOVU PRETHODNOG I POTVRDNOG OGLEDRA ZA OTKRIVANJE LISTERIJA

Table 1. THE PRESENCE OF LISTERIA IN SAMPLES OF FRESH CHEESES OF SMALL PRODUCERS BASED ON PREVIOUS AND AFFIRMATIVE TESTS FOR DETECTION OF LISTERIA

redni broj proizvođača/ordinal number of producers	tip svežeg sira/type of fresh cheese	broj uzoraka pozitivnih na prisustvo listerija/number of positive samples for the presence of listeria
1	sitni/crumbled	1
	kriška/slice	0
2	sitni/crumbled	1
	kriška/slice	1
3	sitni/crumbled	1
	kriška/slice	1
4	sitni/crumbled	1
	kriška/slice	1
5	sitni/crumbled	1
	kriška/slice	1
6	sitni/crumbled	0
	kriška/slice	0

karakterističnih ili sumnjivih kolonija javljao se i rast atipičnih kolonija, što ukazuje da se u potvrdnom ogledu najčešće ne dobija čista kultura.

Sve karakteristične kolonije su presejane na TSYEA i nakon incubiranja identifikovane primenom aparata VITEK 2. Rezultati identifikacije su sledeći: kod jednog uzorka kriška sira identifikovana je *L. monocytogenes* sa verovatnoćom od 99 %, a za dva izolata identifikacija nije bila moguća jer njihove fiziološko-ekološke osobine baza podataka ne prepoznaje.

Na kraju ovog dela rada, pre svega se može zaključiti da se ni za jednog proizvođača u celini ne može izvesti određena pravilnost, nasuprot toga uzorci se mogu podeliti u tri grupe. Za prvu grupu uzoraka su karakteristični slučajevi gde se u prve dve faze rada dobija pozitivan rezultat, a u potvrdnom ogledu na obe korišćene podloge dobijan je različit rezultat. Vrlo često nakon pozitivnog prethodnog ogleda rezultat na selektivnim podlogama bio je odsustvo rasta što upućuje da nije detektovano prisustvo listerija, odnosno *L. monocytogenes*. Kod druge grupe uzoraka dobijeni rezultati na obe primenjene selektivne čvrste podloge su zahtevali nastavak analize, ali već u fazi dobijanja čiste kulture nije došlo do rasta kolonija te je i za ove uzorke konstatovano odsustvo rasta listerija. Treću grupu uzoraka čine oni gde je u potvrdnom ogledu dobijen rast sumnjivih kolonija i u fazi dobijanja čiste kulture rast karakterističnih kolonija, ali u identifikaciji Vitek2 aparatom nije registrovan rod *Listeria*.

Drugi deo ispitivanja obuhvatao je uzorke kupljene kod registrovanih primarnih proizvođača koji svoje sireve i druge mlečne proizvode prodaju na pijaci. Sirevi su ispitani u dva vremenski odvojena uzorkovanja.

Za uzorke svežih sireva sa pijace, kod prvog uzorkovanja, pozitivna promena boje podloge (polubujon po Frejzeru) konstatovana je kod 7/8 uzoraka (14 uzoraka), a u sledećoj fazi mikrobiološke analize ti rezultati su potvrđeni. Kod drugog vremenski odvojenog uzorkovanja, pozitivna promena boje podloge (polubujon po Frejzeru) konstatovana je kod 1/2 uzoraka (8 uzoraka), što je takođe potvrđeno u drugoj fazi analize. Na osnovu ovih rezultata može se konstatovati da većina uzoraka ispoljava pozitivan prethodni ogled na prisustvo listerija. Pored toga, zabeleženi su slučajevi gde se u predobogaćenju

javlja slabo pozitivna reakcija, a u selektivnom obogaćenju pozitivna reakcija. Poređenjem rezultata ova dva vremenski razdvojena uzorkovanja za prethodni test u okviru mikrobiološke analize dobijeni su dosta slični rezultati.

U fazi potvrdnog ogleda, prvog uzorkovanja, primećuje se da kod 4 uzorka (2 sitni i 2 kriška sir) se javlja atipičan rast na ALOA, a na Palcam agaru nije bilo rasta kolonija, dok kod jednog uzorka sitnog sira nakon inkubacije nije bilo rasta na obe primenjene podloge, pa se za njih analiza završava sa zaključkom da u 25 g uzorka nije detektovano prisustvo *L. monocytogenes*. Kod 3 uzorka kriška sira nakon inkubacije podloga na ALOA se javlja atipičan rast, a na Palcam agaru rast sumnjivih kolonija, gde se konfirmacionim ogledima potvrdilo da nije *L. monocytogenes*. U svim ostalim uzorcima dobijeni su razni rezultati na primenjenim podlogama, npr. kod uzoraka se javlja atipičan rast ili mešavina atipičnih i tipičnih kolonija na ALOA, dok na Palcam agaru su rasle tipične kolonije ili nije bilo rasta. Kod drugog vremenski razdvojenog uzorkovanja u fazi potvrdnog ogleda dobijeno je da kod 9 (5 sitni sir i 4 kriška sir) uzoraka nije bilo rasta, a kod 4 uzorka (2 sitni i 2 kriška) se javio atipičan rast na obe primenjene podloge, što bi upućivalo da u uzorku najverovatnije nema *L. monocytogenes*. Kod 2 uzorka (sitni i kriška) na ALOA se javio atipičan rast, a na Palcam agaru nije bilo rasta i za njih se analiza završava sa zaključkom da u 25 g uzorka nije detektovano prisustvo *L. monocytogenes*. Kod jednog uzorka kriška sira su rasle karakteristične kolonije na obe primenjene podloge, pa su prema sledećoj fazi analize presejane na TSYEA i nakon incubiranja identifikovane primenom aparata VITEK 2. U ovom koraku identifikovana je *L. monocytogenes* sa verovatnoćom od 95 %.

Za ovaj deo ispitivanja povezujući pojedine faze rada može se konstatovati da je skoro u svim slučajevima u predobogaćenju i selektivnom obogaćenju dobijen pozitivan rezultat, a u fazi potvrdnog ogleda na primarnoj podlozi (ALOA) uglavnom negativan rezultat (odsustvo rasta i rast atipičnih kolonija). Međutim, kod prvog uzorkovanja, na sekundarnoj podlozi (Palcam agar) se često javlja prisustvo sumnjivih kolonija i one su korišćene za dobijanje čiste kulture, pa je u toj fazi rada konstatovano da je samo u nekoliko uzoraka detektovano prisustvo listerija, tabela 2. Sve sumnjive kolonije su identifikovane primenom aparata VITEK 2. Rezultati identifikacije su sledeći: kod jednog uzorka identifikovana je *L. innocua* sa verovatnoćom od 98 %, kod sledećeg uzorka identifikovan je *Enterococcus gallinarum* sa verovatnoćom od 93 % i kod trećeg uzorka je identifikovan *Erysipelothrix rhusiopathiae* sa verovatnoćom od 86 %.

Na osnovu sprovedenih ispitivanja može se konstatovati da je u dva uzorka sira raznih proizvođača detektovano prisustvo *L. monocytogenes*. Na osnovu toga se može proceniti da je 0,25% uzoraka kontaminirano, odnosno nebezbedno za tržište. Precizniji podaci o nivou kontaminiranosti bi se dobili ukoliko bi se pratilo tržište ili neki njegov deo, ali sa uzorkovanjem po zahtevima Pravilnika (72/10), tj. Kada bi se analiziralo po pet uzoraka od jedne šarže nekog proizvoda. Na osnovu pregleda dostupne literature ovi podaci se ne mogu porediti sa nekim drugim istraživanjima u našoj zemlji, pa zato ostaje jedino da se uporede sa rezultatima za neka druga tržišta. Kargar i Ghasemi (2009) su ispitivali sveže sireve u Iranu, gde je *L. monocytogenes* nađena u 13,1% uzoraka. Takođe su ispitane različite vrste sireva u Brazilu, gde je od 90 uzoraka pozitivno na *L. monocytogenes* bilo 12,2% (Moscalewski Ab-

Tabela 2. ZASTUPLJENOST LISTERIJA U UZORCIMA SVEŽIH SIREVA SA PIJACE NA OSNOVU PRETHODNOG I POTVRDNOG OGLEDA ZA OTKRIVANJE LISTERIJA

Table 2. THE PRESENCE OF LISTERIA IN SAMPLES OF FRESH CHEESES OF MARKET BASED ON PREVIOUS AND AFFIRMATIVE EXPERIMENT FOR DETECTION OF LISTERIA

tip svežeg sira/ type of fresh cheese	redni broj proizvoda sa prisustvom listerija/ordinal number of produce with the presence of listeria
kriška/slice	1
sitni/crumbled	3

rahao i sar., 2008). Ispitivanja na *L. monocytogenes* su vršena i u Portugalu, gde je od 1035 uzoraka različitih prehrambenih proizvoda bilo 50 uzoraka svežeg sira od kojih su 2 bila pozitivna; kod sira napravljenog od pasterezovanog mleka u 6 uzoraka nađena je *L. monocytogenes* od ukupno ispitivanih 371 uzoraka (Mena i sar., 2004). U Švedskoj je ispitano 13 uzoraka svežeg sira i svi su bili pozitivni na bakteriju (Carrique-Mas i sar., 2002). Singh i Prakash (2008.) su ispitivali sveže sireve na području Agra (Indija), gde je od 13 uzoraka u 8 zabeleženo prisustvo *L. monocytogenes*.

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata rada može se zaključiti:

- Prema rezultatima iz pojedinih faza rada, za uzorke sireva u celini može se zaključiti da se ni za jednog subjekta u poslovanju sa hranom ne može izvesti određena pravilnost. Naime često je dobijan pozitivan rezultat u prve dve faze rada ali nije potvrđeno prisustvo listerija. Pored toga, za veći broj uzoraka sira rezultati u potvrdnoj fazi analize su različiti, ali u daljem toku nije otkriveno prisustvo listerija.
- *L. monocytogenes* je izolovana iz jednog uzorka svežeg sira koji je kupljen u maloprodajnom objektu.
- U svežim sirevima kupljenim na pijaci detektovana je *L. monocytogenes* u jednom uzorku. Takođe je identifikovana *L. innocua* koja nije patogena za čoveka, a pored njih izolovane su i druge bakterijske vrste.
- Od ukupno 64 ispitivanih uzoraka svežeg sira, *L. monocytogenes* je pronađena u 0,25% uzoraka, što ukazuje na vrlo nisku kontaminaciju i verovatno dobre higijenske uslove.

LITERATURA

- Anon: Australian Manual for Control of *Listeria* in the Dairy Industry, ADASC, 1999.
- Anon: Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*, EC - HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE – GENERAL, 1999.
- Anon: Outbreak of Listeriosis Associated With Homemade Mexican-Style Cheese - North Carolina, October 2000 - January 2001, MMWR, 50 (26) (2001) 560-562
- Arsenijević, N., Berger-Jekić, O., Jovanović, M., Kocić, B., Kulauzov, M., Nedeljković, M., Otašević, M., Pečić, J., Ranin, L., Savić, B., Stepanović, S., Švabić-Vlahović, M.: Opšta mikrobiologija, Savremena administracija, Beograd, 1999., str. 152-63
- Bulajić S., Mijačević Z.: Procena mikrobiološkog rizika kod sireva proizvedenih od sirovog mleka, Prehrambena industrija - Mleko i mlečni proizvodi, 1-2 (2010) 17-24.
- Carrique-Mas J.J., Hokeberg I., Andersson Y., Arneborn M., Tham W., Danielsson-Tham M.-L., Osterman B., M. Leffler M., Steen M., Eriksson E., Hedin G., Giesecke J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis?, Epidemiol. Infect., 130 (2003) 79-86
- Frece J., Markov K., Čvek D., Kolarec K., Delaš F.: Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia, Journal of Dairy Research, 77 (2010) 112–116
- Gaham C.G.M., O'Driscoll B. and Hill C.: Acid Adaptation of *Listeria Monocytogenes* Can Enhance Survival in Acidic Food and During Milk Fermentation, Applied and Environmental Microbiology, 62 (9) (1996) 3128-3132
- Gebreetsadik S., Kassa T., Alemayehu H., Huruy K., Kebede N.: Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia, Journal of Infection and Public Health, 4 (2011) 22-29
- Gnanou Bessie N., Barre L., Buhariwalla C., Leone Vignaud M., Khamissi E., Decourseulles E., Nirsimloo M., Chelly M., Kalmokoff M.: The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis, International Journal of Food Microbiology, 136 (2010) 345-351
- Jovanov O.: *Listeria* spp. u svežem mesu, specijalistički rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2010.
- Kargar M., Ghasemi A.: Role of *Listeria monocytogenes hlyA* gene isolated from fresh cheese in human habitual abortion in Marvdasht, Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases, 4 (4) (2009) 214-218
- Kolarec K.: Usporedba klasičnih mikrobioloških i molekularnih metoda u rutinskoj potvrdi, Diplomski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
- Lake R., Hudson A., Cressey P., Gilbert S.: Risk profile: *Listeria monocytogenes* in low moisture cheeses, New Zealand Food Safety Authority, Christchurch, New Zealand, 2005., 1-105
- Liu L., O'Conner P., Cotter P. D., Hill C., Ross R.P.: Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*, Journal of Applied Microbiology, 104 (2007) 1059-1066
- Mena C., Almeida G., Carveiro L., Teixeira P., Hogg T., A. Gibbs P.: Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal, Food Microbiology, 21 (2004) 213-216
- Mørseth T. i Langsrud S.: *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, Biofilms, 1 (2) (2004) 107-121
- Moscawski Abrahao W., da Silva Abrahao P.R., Bastos Monteiro C.L., Pon-tarolo R.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 44 (2) (2008) 289-296
- Mullan, W.M.A. (2009): Modelling the probability of *Listeria monocytogenes* growing in cheese. [On-line]. Available from: www.dairyscience.info/food-model/178-listeria-model.html, Accessed: 4 December, 2013. Updated 21 February 2010.
- Popović G., Đurđević-Milošević D.: Prisustvo bakterija *Listeria monocytogenes* u namirnicama i prateći rizik za zdravlje potrošača, Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroeonomik, 14 (3-4) (2008) 151-159
- Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, Službeni glasnik RS, 72/10
- Singh P., Prakash A.: Isolation of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *L. monocytogenes* from milk products sold under market conditions at Agra region, Acta agriculturae Slovenica, 92 (1) (2008) 83-88
- SRPS EN ISO 11290-1: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* – Deo 1: Metoda otkrivanja, 2010.
- Švabić-Vlahović, M.: Medicinska bakteriologija, Savremena administracija, Beograd, 2005., str. 232-248

SUMMARY

DISTRIBUTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FRESH CHEESES AT THE MARKET OF NOVI SAD

Siniša L. Markov, Nevena R. Klisara, Dragoljub D. Cvetković,
Aleksandra S. Veličanski

University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

Listeriosis is a disease of human and animal which is caused the most by *L. monocytogenes* as a result of contamination of food, environment and animal infections. In the world, listeriosis ranks among the most dangerous food-borne bacterial disease with a low incidence but high mortality rate. The aim of this study was to isolate and identify *L. monocytogenes* in retail cheese (slice cheese, crumbled cheese) and cheese bought at the market. Sixty-four samples of fresh cheese, of which 32 were bought in retail stores and 32 were bought at the market on the territory of Novi Sad, were examined during 2011th and 2013th year. Detection of *L. monocytogenes* was carry out according to international standards adopted in our country SRPS ISO 11290-1. The apparatus VITEK 2 Compact was used for indentification. *L. monocytogenes* was detected in two samples of 64 samples of fresh cheese from different producers. Based on this, it can be estimate that 0,25% of samples are contaminated or unsafe for the market.

Key words: fresh cheese • slice cheese • crumbled cheese • listeria • *L. monocytogenes*

UPUTSTVO AUTORIMA

Časopis **PREHRAMBENA INDUSTRIJA – MLEKO I MLEČNI PROIZVODI** objavljuje pregledne i originalne naučne radove, prikaze knjiga, tehnoloških novosti i drugih publikacija. Radovi se štampaju na srpskom ili engleskom jeziku.

Rad treba da je izložen jasno i da sadrži sledeće delove: **Izvod** (do 250 reči), **Ključne reči** (do 5 ključnih reči), **Uvod**, **Materijal i metodi**, **Rezultati i diskusija**, **Zaključak**, **Literatura** i **Izvod i Ključne reči na engleskom jeziku** (Abstract, Key words).

Prva strana rukopisa sadrži:

Naslov (koji ne treba da sadrži simbole, formule i skraćenice);
Ime, srednje slovo i prezime svakog autora (bez titula, zvanja i funkcija);
Nazive i mesto institucija u kojima rade autori;
Izvod;
Ključne reči;
Predlog autora za kategoriju rada (pregledni ili originalni naučni rad);
Punu adresu jednog autora, zvanje, e-mail i telefon.

Literatura

Literaturu navoditi u tekstu na sledeći način:

Glibowski and Kowalska (2012) su istraživali uticaj...;

Ako ima više od dva autora: Slični rezultati su objavljeni od strane drugih autora (Giggisberg et al., 2011)...;

Ako ima više radova od strane istog autora ili grupe istih autora u jednoj godini treba ih hronološki predstaviti: (Bönisch et al., 2007a; Bönisch et al., 2007b; Bönisch et al., 2009);

Radovi istih autora iz različitih godina treba da budu citirani na sledeći način: (Bönisch, 2006, 2007, 2009).

Spisak literature daje se po abecednom redu i prilaže na odvojenom listu.

PRIMERI:

ČASOPISI: Buriti, F.C.A., da Rocha, J.S., Saad, S.M.I. (2005): Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.

KNJIGE: Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2004): Yoghurt Science and Technology, Woodhead publishing limited, Cambridge, England, p. 619.

POGLAVLJE U KNJIZI: Kindstedt, P., Carić, M., Milanović, S. (2004): 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, 251-277.

ZBORNİK RADOVA: Fox, P.F., Kelly, A.L. (2004): Milk proteins: Technological aspects, International Dairy Symposium "Recent Developments In Dairy Science and Technology", Isparta-Turkey, 24-28 May, Proceedings, 17-19.

TEZA (Ph.D., M.Sc.): prezime, inicijali imena.: naslov doktorske disertacije ili magistarske teze, naziv univerziteta, godina.

NEOBJAVLJENI (NEPUBLIKOVANI) PODACI: Treba da budu citirani uz komentar „u štampi“, „neobjavljeni rezultati“ ili „lične beleške“.

PODACI PREUZETI SA INTERNETA: Treba da sadrže ime autora, naslov, internet adresu i datum pristupa podacima (primer: Wright, N.A.: The Standing of UK Histopathology Research 1997-2002. <http://pathsoc.org.uk> (pristupljeno 7. oktobra 2004).

Skraćeni nazivi časopisa treba da budu napisani u skladu sa International Codex for Abbreviations of Journal Titles (Chemical Abstracts).

Radove pisati u Microsoft Office Word-u. 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 i u posebnom **grafičkom fajlu** (*.bpm ili *.tif) u rezoluciji od najmanje **300 dpi**. Kolor ili crno-bele **fotografije**, ukoliko ih ima u radu, treba dostaviti u *.jpg formatu, najmanje **300 dpi**. Ako je vektorska grafika u pitanju, u obzir dolaze

***.cdr** i ***.wmf** formati. 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**.

Sve nazive **TABELA** i **SLIKA** i upise u njima u tekstu napisati **i na engleskom jeziku**. Nazive tabela i slika pisati velikim slovima. Za tabele i slike u integralnom tekstu ne koristiti skraćenice.

Pridržavati se Međunarodnog sistema jedinica (SI) i uobičajene hemijske nomenklature.

Preporučuje se da obim rukopisa, uključujući priloge, ne bude veći od 15 strana.

Svi radovi podležu recenziji. Konačnu odluku o kategorizaciji i štampanju rada donosi Uredništvo časopisa.

Rukopis poslati u dva odštampana primerka na adresu: Prof. dr Spasenija Milanović, glavni urednik (Prehrambena industrija-Mleko i mlečni proizvodi), Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad i elektronski na e-mail: mleko@uns.ac.rs.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Journal **PREHRAMBENA INDUSTRIJA – MLEKO I MLEČNI PROIZVODI / FOOD INDUSTRY- MILK AND DAIRY PRODUCTS** publishes reviews and original research papers, review of books, technological innovations and other publications. Papers are published in Serbian or in English language.

All papers should clearly present conducted research and contain: **Abstract** (up to 250 words), **Key words** (up to 5 key words), **Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusion, References**, including **Abstract** and **Key words** in Serbian language.

First page should contain:

Title (it must not contain symbols, formulas and abbreviations);
Name, initial and surname of the authors (without titles or positions);
Affiliations of all author;
Abstract;
Key words;
Suggestion for the type of the paper (review or original research paper);
The full name, mailing address, phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author should appear at the bottom of the title page.

References

Cite references in the text by name and year in parentheses.

Some examples:

Glibowski and Kowalska (2012) investigated the effect...;

If there are more than two authors: Similar results were published by the other authors (Giggisberg et al., 2011)...;

If there are more papers the same author(s) in the same year it should be listed chronologically: (Bönisch et al., 2007a; Bönisch et al., 2007b; Bönisch et al., 2009);

Papers from the same authors and different years should be cited as: (Bönisch, 2006, 2007, 2009).

References should be listed alphabetically and prepared on separate sheet.

Reference should be listed as follows:

JOURNALS: Buriti, F.C.A., da Rocha, J.S., Saad, S.M.I. (2005): Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.

BOOKS: Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2004): Yoghurt Science and Technology, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, p. 619.

BOOK WITH MORE CHAPTERS: Kindstedt, P., Carić, M., Milanović, S. (2004): 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, 251-277.

PROCEEDINGS: Fox, P.F., Kelly, A.L. (2004): Milk proteins: Technological aspects, International Dairy Symposium "Recent Developments in Dairy Science and Technology", Isparta-Turkey, 24-28 May, Proceedings, 17-19.

THESIS: (Ph.D., M.Sc.): surname, initial: title, University, year of publication.

UNPUBLISHED DATA: Should be cited with one of the following comments "in press", "unpublished work" or "personal communication".

ONLINE CITATIONS: Should include the author, title, website and date of access (example: Wright, N.A.: The Standing of UK Histopathology Research 1997-2002. <http://pathsoc.org.uk> (accessed 7 October 2004).

Abbreviations of journal titles should be given according to the International Codex for Abbreviations of Journal Titles (Chemical Abstracts).

Papers should be written in Microsoft Office Word, in the **A4** format with **25 mm** margins and **Times New Roman** font **12 pt**. Abstract should be size **10 pt**. Special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. The titles should be in capital boldface letters, size **12 pt** and the sub-headings (title) in lowercase at **12 pt (bold)**. Do not disassemble words.

The illustrations and tables should be placed at their appropriate position in the text. Illustrations must be prepared in grayscale (black and white), and given even in a separate **file** (*.bpm or *.tif). Minimum resolution is **300 dpi**. If there are **photographs** in the paper, even color or grayscale, they should be submitted in *.jpg format, minimum **300 dpi**. If the vector graphics are used, the illustration must be in *.cdr and *.wmf formats. Also, all the charts that were produced using Microsoft Office Excel program, should be submitted in the original excel format. If the some non-standard fonts are used in the illustrations, they should **be converted into curves**. Captions of tables and figures must be capitalized and written on Serbian as well. For tables and figures citations in the body of the text, do not use abbreviations.

Authors should use International SI system and usual chemical symbols during manuscript writing.

It is recommended that manuscript including all appendixes should not exceed 15 pages.

All manuscripts will be reviewed by at least two independent referees. Final decision on the publication will be made by the Editorial Board.

Manuscript should be sent in two hard copies to the address: Prof. Dr. Spasenija Milanovic, Editor-in-Chief (Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi / Food Industry-Milk and Dairy Products), Faculty of Technology, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia, and **electronic form on the e-mail:** mlekotf@uns.ac.rs