

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Maja Lj. Bulatović

**PROIZVODNJA I KARAKTERISTIKE
FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH
NAPITAKA NA BAZI SURUTKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Maja Lj. Bulatović

**PRODUCTION AND
CHARACTERISTICS OF FUNCTIONAL
FERMENTED WHEY BASED
BEVERAGES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Dr Marica Rakin, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Maja Vukašinović Sekulić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet.

Dr Jagoda Jorga, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet.

Dr Danica Zarić, naučni saradnik,
IHIS Tehnoexperts, Istraživačko-razvojni centar, Beograd.

DATUM ODBRANE: _____

ZAHVALNICA

Od srca se zahvaljujem mojoj mentorki

dr Marici Rakin

vanrednom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta,

koja mi je nesebično otvorila vrata jednog potpuno novog sveta u kome me je svojom neobičnom snagom, velikim iskustvom, a nadasve stručnošću i znanjem uvek držala na pravom putu. Hvala joj na divnoj saradnji, zalaganju i uloženom trudu, na hrabrosti, entuzijazmu, ogromnoj pozitivnoj energiji i poverenju koje mi je ukazala.

Beskrajno joj hvala što je uvek bila vetar u mojim jedrima, prijatelj i čovek, u lepim a naročito u teškim životnim situacijama.

*Najlepše hvala **dr Maji Vukašinović-Sekulić**, van. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta, na strpljenju, podršci i velikoj pomoći tokom čitavog eksperimentalnog rada.*

*Najlepše hvala **dr Jagodi Jorgi**, red. prof. Medicinskog fakulteta, na strpljenju i stručnom usmeravanju pri izradi pilot studije koja je na najbolji način unapredila kvalitet ove doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvanost želim da iskažem **dr Danici Zarić**, naučnom saradniku Istraživačko-razvojnog centra IHIS Tehnoexperts, na velikom trudu koji je uložila da me uvede u oblast označavanja i deklarisanja prehrambenih proizvoda. Neizmerno joj hvala na toploj saradnji, svakoj reči podrške i svakom prijateljskom savetu.*

*Veliko hvala **dr Marku Rakinu**, van. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta, na podršci i ohrabrivanju u veoma važnim momentima tokom realizacije ove doktorske disertacije.*

Marijani Stamenković-Đoković, dipl. inž. na odličnoj saradnji tokom rada na Inovacionim projektima, realizovanim u saradnji sa Istraživačko-razvojnim centrom IHIS Tehnoexperts, koji su značajno ubrzali izradu ove disertacije.

*Najlepše hvala dipl. inž. **Ivanu Zoriću**, kao i dipl. inž. **Đuri Kneževiću** iz kompanije Imlek a.d. na redovnom snabdevanju surutkom, čime su mi u velikoj meri olakšali rad i uticali na realnu sliku o mogućnosti praktične primene rezultata prikazanih u ovoj disertaciji.*

*Beskrajno hvala kolegini dipl. inž. **Mariji Gnjatović**, istraživaču saradniku Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, na otvorenosti za saradnju, logistici, prenesenim znanjima, na divnom prijateljstvu i pozitivnoj energiji tokom zajedničkog rada a naročito odmora.*

*Neizmerno hvala kolegini dipl. inž. **Dragani Lazić**, na nesebičnoj pomoći, strpljenju i ohrabrivanju tokom finalnog sređivanja disertacije, kao i divnom prijateljstvu koje traje još od studentskih dana.*

*Hvala kolegini dipl. inž. **Tanji Krunić**, na pomoći u eksperimentalnom radu, razumevanju, strpljenju i lepoj saradnji.*

*Veliko hvala svim **dragim profesorima** sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na znaju stečenom tokom studija, pomoći i podršci tokom realizacije ove disertacije.*

Koleginicama i kolegama sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju hvala na podršci, pomoći, druženju i uvek dobroj atmosferi čime su mi statistički značajno ($p < 0.05$) olakšali i pomogli u realizaciji ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem **dr Ivoni Radović**, van. prof., i koleginicama sa Katedre za hemijsko inženjerstvo za nesebičnu pomoć pri ispitivanju reoloških svojstava napitaka.

Veliko hvala **mr Ivoni Janković-Častvan** na angažovanju pri ispitivanju reoloških svojstava napitaka obavljenih na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju.

Najlepše hvala **dr Dragani Davidović** na entuzijazmu koji je pokazala pri izradi pilot studije, kao i **Sanji Stošić** i **Mirjani Nedeljković** koje su uvek bile tu kad je bilo hitno.

Veliko hvala **Vladinoj porodici** na svim rečima podrške.

Mojim **divnim prijateljima** neizmerno hvala na iskrenoj ljubavi, razumevanju i podršci tokom svih ovih godina.

Hvala mojoj **Jasmini, Bobi, Dragani, Goci, Jeleni, Daki, Neli, Jovici**,
i sudbini koja mi je dozvolila da budem okružena ovim izuzetnim ljudima.

Mojoj ljubavi, mom princu, mom Vladi, neizmerno hvala na beskrajnoj ljubavi, razumevanju, podršci i najtoplijim emocijama koje su bile i ostale temelj svakog mog uspeha.

I na kraju, najveće hvala dugujem mojoj mami i mom tati čiji je svaki treptaj oka bio ispunjen bezuslovnom ljubavlju i podrškom, i naravno mom bratu Mirku na ljubavi, podršci, ohrabrivanju i energiji koja obasjava moje srce.

**“Dve najsjajnije zvezde na nebu, gledajte danas kroz oči moje,
da možete videti svu ovu sreću koju ste satkale iz ljubavi svoje.”**

Posvećeno mom tati Ljubomiru Bulatoviću,
mom drugarstvu iz detinjstva.

28.04.2015.

PROIZVODNJA I KARAKTERISTIKE FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH NAPITAKA NA BAZI SURUTKE

REZIME

Količina proizvoda od surutke na tržištu je zanemarljivo mala u odnosu na količinu fermentisanih mlečnih proizvoda. To navodi na zaključak da bi se unapređenjem procesa fermentacije surutke mogli dobiti novi nekonvencionalni proizvodi koji bi zauzeli značajnije mesto u paleti mlečnih proizvoda namenjenih širokoj potrošnji. U tom smislu, cilj ove doktorske disertacije je bio proizvodnja i karakterisanje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke.

U cilju proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke izvršena je selekcija odgovarajuće kulture mikroorganizama, optimizacija procesa fermentacije i karakterizacija proizvedenog fermentisanog napitka.

Tokom selekcije, optimizacije i karakterizacije praćeno je: vreme trajanja fermentacije, sadržaj mlečne kiseline, promena pH, preživljavanje mikroorganizama, sadržaj aminokiselina, sadržaj antioksidanasa, viskozitet, sinerezis kao i nutritivni sastav proizvedenog napitka. Takođe je izvršeno *in vitro* karakterisanje probiotske aktivnosti odabranih mikroorganizama praćenjem sposobnosti preživljavanja u uslovima simuliranog gastričnog soka, antimikrobne aktivnosti i rezistencije na antibiotike primenom klasičnih mikrobioloških tehnika.

U sklopu nutritivne karakterizacije praćena je razgradnje proteina surutke nakon fermentacije. Proizvedeni napitak je nutritivno okarakterisan preračunavanjem nutritivne vrednosti proizvoda, što je predstavljalo polaznu tačku njegovog deklarisanja u skladu sa Pravilnikom o deklarisanju RS, označavanju i reklamiranju hrane 85/2013, ali i EU Regulative 1169/2011. Pored toga, u skladu sa nutritivnim sastavom, napitku su dodeljene nutritivne i/ili zdravstvene izjave odobrene od strane EFSA (European Food Safety Authority), prema EU Regulativi 11924/2011 i Direktivi 432/2012. Proizvod je upakovan u specijalno kreiranu ambalažu, koja je u skladu sa propisima za pakovanje mlečnih proizvoda, čime je dobijeni napitak u potpunosti pripremljen za plasman na tržište.

Ispitivanje mogućnosti proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke, primenom različitih sojeva bakterija mlečne kiseline pokazalo je da svi sojevi bakterija mlečne kiseline (ukupno 15) testirani u ovom istraživanju mogu biti primenjeni u procesu

proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke koji kao osnovni šećer sadrže laktozu. Najveći potencijal za primenu u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke, po pitanju sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida kao funkcionalnih nutrijenata, od svih testiranih sojeva ispoljio je soj *L. rhamnosus* ATCC 7469. Zatim je pokazano da soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 nije sposoban da preživi prisustvo većine testiranih sojeva, dok soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava antimikrobnu aktivnost prema sojevima *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525 i *L. helveticus* ATCC 15009, tako da se ovi sojevi ne mogu istovremeno koristiti za formulaciju mešanih kultura. Sojevi *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 i *L. johnsonii* NRRL B-2178 predstavljaju najbolje kandidate za korišćenje u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke, pri čemu soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava najbolje proizvodne karakteristike. Primenom 2,0% inokuluma ovog soja, nakon 10,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve materije, na temperaturi 37,0 °C, proizvodi se napitak čija titracijska kiselost iznosi 9,2 °SH a broj živih ćelija oko 6,80 log (CFU/mL). Nakon optimizacije procesa proizvodnje napitka na bazi surutke sojem *L. johnsonii* NRRL B-2178, primenom 8,42% inokuluma, nakon 4,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve materije, na temperaturi 39,0 °C, u prisustvu 1,0% inulina i 3,0% ekstrakta kvasca, proizvodi se napitak čija titracijska kiselost iznosi 22,6 °C a broj živih ćelija 8,70 log (CFU/mL).

Pri ispitivanju mogućnosti proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka primenom komercijalne ABY-6 kulture pokazano je da se fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka, proizvodi napitak zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,40, titracijska kiselost 23,2 °SH, sinerezis 67,5%, viskozitet 2,7023 cP antioksidativna aktivnost 46,0%, ukupan broj živih ćelija 8,65 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,52 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

Pri ispitivanju mogućnosti proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture pokazano je da se fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka, proizvodi napitak zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,34, titracijska kiselost 24,2 °SH, sinerezis 50,6%, viskozitet 2,6984 cP, antioksidativna aktivnost 49,2%, ukupan broj živih ćelija 8,85 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,20 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

Postavljanjem senzorne ocene kao ključnog parametra za plasiranje proizvoda, zaključeno je da se napitak optimalnog kvaliteta dobija fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka, primenom komercijalne ABY-6 kulture. Ovako dobijen napitak može na

ambalaži imati nutritivne izjave: "*Bogat proteinima*" i "*Prirodan izvor kalcijuma*", zdravstvene izjave "*Proteini doprinose normalnom održavanju kostiju*", "*Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju*" i "*Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze*" i izjavu: "*Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života*"

U daljem postupku unapređenja pokazano je da se dodatkom stabilizatora i soka od jabuke vrednosti parametara kvaliteta, napitka proizvedenog fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture, mogu značajno unaprediti. Dodatkom 0,2% pektina, 0,7% želatina i 2,0% koncentrata proteina surutke proizvodi se napitak odličnih senzornih karakteristika sa vrednošću sinerezisa od 1,5% i vrednošću viskoziteta od 158,9 cP. Dodatkom 30,0% soka od jabuke, proizvodi se napitak sledećih vrednosti parametara kvaliteta: pH vrednost 4,62, titracijska kiselost 18,8 °SH, sinerezis 64,7%, viskozitet 2,7922 cP, antioksidativna aktivnost 91,3%, ukupan broj živih ćelija 8,93 log (CFU/mL), senzorna ocena 9,01, koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja. Pokazano je da dodatak soka od jabuke, osim što u velikoj meri doprinosi unapređenju senzornih karakteristika, utiče i na smanjenje količine masti u napitku sa 0,88 na 0,5 g, što dodatno unapređuje kvalitet napitka i omogućava jednostavnije pridobijanje potrošača. Ovako dobijen napitak može na ambalaži imati nutritivne izjave: "*Light*" ili "*Smanjen sadržaj masti*", "*Prirodan izvor kalcijuma*", zdravstvene izjave "*Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju*", "*Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze*" i izjavu: "*Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života*"

Na osnovu rezultata pilot studije o uticaju proteina surutke na apetit/sitost pokazano je da unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na suzbijanje osećaja gladi, povećanje osećaja sitosti i smanjenje količine hrane koju bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² mogli da pojedu. Rezultat ove pilot studije otvara vrata daljim istraživanjima vezanim za primenu proteina surutke u ishrani ljudi.

Finalni rezultat disertacije je funkcionalni fermentisani napitak *Active drink* u originalno dizajniranom pakovanju, koji je kao takav spreman za plasman na tržište. Rezultati i zaključci izneti u ovoj disertaciji predstavljaju bazu za dalji razvoj funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke.

Ključne reči: surutka, fermentacija, funkcionalni napitak, bakterije mlečne kiseline, probiotici, komercijalna ABY-6 kultura, suplementi, ugušćivači, apetit/sitost.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo.

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

UDK broj : 663 : 637 . 142

PRODUCTION AND CHARACTERISTICS OF FUNCTIONAL FERMENTED WHEY BASED BEVERAGES

SUMMARY

Number of whey based products on the market is negligible compared to the number of fermented dairy products, which suggests that the improvement of the whey fermentation process could result in new unconventional products that take up a significant place in the wide range of dairy products intended for direct consumption. In accordance with that, the aim of this PhD thesis was the production and characterisation of functional fermented whey based beverages.

In order to produce the functional fermented whey based beverages, selection of microorganisms, optimisation of the fermentation process and the characterisation of the produced beverages were carried out.

During the selection, optimisation and characterisation, fermentation time, titratable acidity, pH value, amino acid content, antioxidative activity, viscosity, syneresis, as well as nutritional composition of produced beverages were followed. *In vitro* characterisation of probiotic character of the selected microorganisms, by tracking ability to survive under simulated gastric juice, antimicrobial activity and resistance to antibiotics using conventional microbiological techniques were also performed.

Within the nutritional characterisation, percentage of whey protein degradation obtained after the fermentation, was examined. Manufactured beverages were nutritionally characterised by recalculating the nutritional value, which was the starting point of its declaration in accordance with the Serbian Regulations on declaration, labelling and advertising of food 85/2013. Also, in accordance with the nutritional composition of the beverages, nutritional and/or health claims approved by EFSA (European Food Safety Authority) and according to EU Regulation 1169/2011 and Regulation 432/2012 were given. The product was packaged in a specially created packaging that complies with the regulations for dairy products, and thus obtained beverage was fully prepared for the market.

When examining the possibilities of whey based beverages production using different strains of lactic acid bacteria, it has been shown that all strains of lactic acid bacteria (total of 15) tested in this study can be applied in the production of functional fermented whey based

beverages that contain lactose as the main sugar. Among the all tested microorganisms, strain *L. rhamnosus* ATCC 7469 showed the greatest potential for use in the whey based beverage production, in terms of its ability to produce exopolysaccharide as functional nutrients. In addition, it has been shown that *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 was not able to survive the presence of most of the tested strains, while *L. johnsonii* NRRL B-2178 expresses antimicrobial activity against *L. helveticus* ATCC 15009 and *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL-B 4525 strains, so these strains can not be used for the formulation of mixed cultures. The strains *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 and *L. johnsonii* NRRL B-2178 are the good candidates for use in the production of whey beverages, while *L. johnsonii* NRRL B-2178 exhibits the best production characteristics. Applying the 2,0% inoculum of this strain, after 10,0 h of whey (8,0% dry matter) fermentation at 37,0 °C, the beverage with titratable acidity of 9,2 °SH and the viable cell count of 6,80 log (CFU/mL) can be produced. After optimisation of the production process, for 4,0 h of whey (8,0% dry matter) fermentation at 39,0 °C in the presence of 1,0% and inulin 3,0% extract yeast, whey based beverage with titratable acidity of 22,6 °SH and the viable cell count of 8,70 log (CFU/mL) can be produced by applying 8,42% inoculum of the *L. johnsonii* NRRL B-2178 strain.

When examining the possibilities of whey based beverages production using commercial culture ABY-6, it has been shown that the fermentation of whey supplemented with 30,0% milk lead to the production of beverage with satisfactory values of quality parameters as follows: pH value of 4,40, titratable acidity of 23,2 °SH, syneresis 67,5%, viscosity of 2,7023 cP antioxidant activity of 46,0%, the viable cell count of 8,65 log (CFU/mL) and sensory characteristics value of 8,52, that is stable during 28 days of storage.

When examining the possibilities of whey based beverages production using mixed ABY-6 : *L. rhamnosus* culture, it has been shown that the fermentation of whey supplemented with 30,0% milk lead to the production of beverage with satisfactory values of quality parameters as follows: pH value of 4,34, titratable acidity 24,2 °SH, syneresis 50,6%, the viscosity of 2,6984 cP, the antioxidant activity of 49,2%, the total number of living cells of 8,85 log (CFU/mL), and sensory characteristics value of 8,20 that is stable during 28 days of storage.

Placing the sensory value as a key parameter for product placement, it was concluded that beverage with the optimal quality can be produced by fermentation of whey with the addition of 30,0% of milk using a commercial ABY-6 culture. Thus obtained beverage can be

labelled by nutritional claims: "*Rich in protein*" and "*Natural source of calcium*," health claims "*Proteins contribute to the maintenance of normal bone*", "*Calcium is required for the maintenance of normal bone*" and "*Live cultures in yogurt or fermented milk improve lactose digestion in people who have a problem with lactose digestion*" and a general claim "*The product should be used as part of a balanced diet and healthy lifestyle*".

In the further improvement process it has been shown that the quality parameter values of beverage produced by fermentation of whey supplemented with 30,0% milk using a commercial ABY-6 in culture, can be significantly improved by addition of stabilisers and apple juice. Addition of 0,2% pectin, 0,7% gelatine and 2,0% whey protein concentrate lead to the production of beverage with excellent flavour and values of syneresis of 1,5% and viscosity of 158,9 cP. Addition of 30,0% apple juice lead to the production of beverage with values of quality parameters as follows: pH value of 4,62, titratable acidity of 18,8 °SH, syneresis of 64,7%, viscosity of 2,7922 cP, antioxidant activity of 91,3%, the viable cell count of 8,93 log (CFU/mL), and sensory characteristics value of 9,01, that is stable during 28 days of storage. It has been shown that the addition of apple juice, not only greatly contributes to the improvement of sensory characteristics, but also additionally improves the quality of the beverage by decreasing the amount of fat from 0,88 to 0,5 g, that allows easier meet to the consumers demands. Thus obtained beverage can be labelled by nutritional claims: "*Light*" or "*Low fat*", "*Natural source of calcium*", health claims "*Calcium is required for the maintenance of normal bone*", "*Live cultures in yogurt or fermented milk improve lactose digestion with people who have problems with lactose digestion*" and a general claim "*The product should be used as part of a balanced diet and healthy lifestyle*".

Based on the results of a pilot study, on the effects of whey protein on appetite/satiety, it has been shown that intake of 25,0 g of whey protein has a significant impact on suppression of hunger, increase satiety and reduction of the amount of food that the subjects with BMI <30,0 kg/m² could eat. The results of the pilot study open the door to further research related to the application of whey protein in the human diet.

The final result of the dissertation is a functional fermented beverage *Active drink*, in the originally designed packaging, that is ready for the market. Results and conclusions expressed in this thesis are the basis for the further development of functional fermented whey beverages.

Key words: whey, fermentation, functional beverage, lactic acid bacteria, probiotics, commercial ABY-6 culture, supplements, thickener, appetite/satiety.

Scientific area: Technological Engineering.

Specialized scientific field: Biotechnological Engineering and Biotechnology.

UDC number : 663 : 637 . 142

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. Funkcionalna hrana.....	4
2.1.1. Istorijat nastanka koncepta funkcionalne hrane	4
2.1.2. Definicija funkcionalne hrane	6
2.1.3. Klasifikacija funkcionalne hrane	7
2.1.4. Klasifikacija funkcionalnih mlečnih proizvoda.....	8
2.1.5. Funkcionalni napici na bazi surutke	9
2.1.5.1. Funkcionalni nefermentisani napici na bazi surutke	9
2.1.5.2. Funkcionalni fermentisani napici na bazi surutke	10
2.1.6. Probiotici, prebiotici i sinbiotici.....	11
2.1.6.1. Probiotici.....	11
2.1.6.2. Prebiotici	12
2.1.6.3. Sinbiotici.....	14
2.2. Surutka	16
2.2.1. Dobijanje surutke tokom procesa prerade mleka.....	16
2.2.2. Sastav i svojstva surutke	19
2.2.3. Značaj i mogućnosti iskorišćavanja surutke	21
2.2.4. Stanje i perspektiva iskorišćavanja surutke	24
2.3. Proizvodnja fermentisanih napitaka na bazi surutke.....	26
2.3.1. Priprema sirovine	26
2.3.2. Formulisanje napitaka.....	27
2.3.2.1. Šećeri i zaslađivači.....	28
2.3.2.2. Stabilizatori - Ugušćivači.....	29
2.3.2.3. Voće i voćni sokovi	30
2.3.3. Fermentacija surutke.....	32
2.3.3.1. Jogurtne starter kulture	32
2.3.3.2. Probiotske starter kulture	35
2.3.3.3. Starteri producenti egzopolisaharida.....	37

2.3.4. Proizvodnja fermentisanih napitaka na bazi surutke	39
2.3.4.1. Šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke	39
2.3.4.1. Osnovni parametri procesa proizvodnje fermentisanih napitaka na bazi surutke	41
2.3.5. Pakovanje i obeležavanje napitaka na bazi surutke	44
2.3.5.1. Ambalaža	44
2.3.5.2. Nutritivne i zdravstvene izjave	46
2.4. Karakteristike fermentisanih napitaka na bazi surutke	54
2.4.1. Funkcionalne karakteristike napitaka na bazi surutke	54
2.4.1.1. Probiotske karakteristike napitaka	54
2.4.1.2. Bioaktivna jedinjenja u napitku	58
2.4.2. Senzorne karakteristike napitaka na bazi surutke	62
2.4.2.1. Ukus i miris	63
2.4.2.2. Tekstura - Sinerezis i viskozitet	64
2.5. Zdravstveni doprinos funkcionalnih napitaka na bazi surutke	66
2.5.1. Uloga surutke u prevenciji bolesti	66
2.5.2. Uloga surutke u lečenju bolesti	67
3. EKSPERIMENTALNI DEO	71
3.1. Materijali	71
3.1.1. Mikroorganizmi	71
3.1.2. Materijali	72
3.1.3. Supstance p.a čistoće	73
3.1.4. Uređaji	74
3.2. Metode	76
3.2.1. Priprema mikroorganizama	76
3.2.1.1. Priprema sojeva bakterija mlečne kiseline (BMK)	76
3.2.1.2. Priprema komercijalne ABY-6 kulture	76
3.2.2. Priprema podloga za gajenje mikroorganizama	76
3.2.2.1. Priprema MRS bujona	76
3.2.2.2. Priprema M17 bujona	76
3.2.2.3. Priprema MRS agara	77
3.2.2.4. Priprema MRS agara sa različitim izvorima ugljenika	77
3.2.2.5. Priprema M17 agara	77
3.2.3. Priprema sirovine	77

3.2.3.1. Priprema surutke u prahu	77
3.2.3.2. Priprema sveže surutke	78
3.2.3.3. Priprema mešavine surutke i mleka	78
3.2.3.4. Priprema mešavine surutke, mleka i voćnih sokova.....	78
3.2.4. Fermentacija.....	78
3.2.5. Parametri kvaliteta.....	79
3.2.5.1. Određivanje hemijskog sastava surutke	79
3.2.5.2. Određivanje pH vrednosti.....	79
3.2.5.3. Određivanje titracijske kiselosti.....	79
3.2.5.4. Određivanje sadržaja suve materije.....	79
3.2.5.5. Određivanje sadržaja šećera (DNS)	80
3.2.5.6. Određivanje broja živih ćelija	80
3.2.5.7. Određivanje sinerezisa	81
3.2.5.8. Određivanje viskoziteta	81
3.2.5.9. Određivanje sadržaja aminokiselina (OPA).....	82
3.2.5.10. Određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH).....	82
3.2.5.11. Određivanje redukcione snage (FRAP).....	83
3.2.5.12. Određivanje senzornih karakteristika	83
3.2.5.13. Određivanje probiotskih karakteristika	84
3.2.5.14. Određivanje uzajamne antimikrobne aktivnosti bakterija.....	84
3.2.5.15. Određivanje antibiograma ispitivanih vrsta bakterija.....	85
3.2.5.16. Određivanje frakcija proteina gel-elektroforezom (SDS-PAGE)	86
3.2.5.17. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja	88
3.2.5.18. Optimizacija procesa	89
3.2.5.19. Određivanje nutritivnih karakteristika napitka.....	89
3.2.5.20. Deklarisanje gotovog proizvoda.....	90
3.2.6. Statistička obrada eksperimentalnih podataka	90
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	91
4.1. Preliminarna ispitivanja bakterija mlečne kiseline (BMK)	91
4.1.1. Ispitivanje sposobnosti rasta bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika	91
4.1.2. Ispitivanje sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika.....	93
4.1.3. Ispitivanje antimikrobnog dejstva bakterija mlečne kiseline (BMK)	95

4.1.4. Zaključak	97
4.2. Selekcija sojeva iz roda <i>Lactobacillus</i> pogodnih za proizvodnju funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke	97
4.2.1. Selekcija sojeva iz roda <i>Lactobacillus</i> na osnovu fermentacione aktivnosti	97
4.2.2. Selekcija sojeva na osnovu ključnih parametara fermentacije.....	98
4.2.3. Selekcija sojeva na osnovu optimalnih karakteristika napitka.....	100
4.2.4. Zaključak	102
4.3. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	103
4.3.1. Optimizacija osnovnih parametara fermentacije surutke sojem <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	103
4.3.2. Ispitivanje uticaja različitih nutrijenata na rast soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178.....	111
4.3.2.1. Uticaj različitih izvora ugljenika na rast soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178.....	111
4.3.2.2. Uticaj različitih izvora azota na rast soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	114
4.3.2.3. Uticaj različitih izvora minerala na rast soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178.....	117
4.3.2.4. Uticaj različitih izvora vitamina na rast soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178.....	119
4.3.2.5. Selekcija ključnih nutrijenata u proizvodnji napitka na bazi surutke primenom soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178.....	122
4.3.3. Optimizacija procesa proizvodnje napitka na bazi surutke primenom soja <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178 uz dodatak selektovanih nutrijenata	125
4.3.4. Zaključak	131
4.4. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom komercijalne ABY-6 kulture.....	132
4.4.1. Ispitivanje uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom ABY-6 kulture.....	132
4.4.1.1. Uticaj koncentracije inokuluma na rast komercijalne ABY-6 kulture	132
4.4.1.2. Uticaj sadržaja mleka na rast komercijalne ABY-6 kulture	134
4.4.1.3. Uticaj temperature fermentacije na rast komercijalne ABY-6 kulture	136
4.4.1.4. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na rast komercijalne ABY-6 kulture.....	138
4.4.2. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost komercijalne ABY-6 kulture.....	140
4.4.3. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture.....	142
4.4.4. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture	144

4.4.5. Ispitivanje probiotskih svojstava komercijalne ABY-6 kulture	147
4.4.6. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom komercijalne ABY-6 kulture.....	151
4.4.7. Zaključak.....	154
4.5. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	155
4.5.1. Ispitivanje uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture.....	155
4.5.1.1. Uticaj sastava inokuluma na rast mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture..	155
4.5.1.2. Uticaj sadržaja mleka na rast mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	157
4.5.1.3. Uticaj temperature na rast mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture.....	158
4.5.1.4. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na rast mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture.....	160
4.5.2. Uticaj temperature i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	162
4.5.3. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	164
4.5.4. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	167
4.5.5. Ispitivanje probiotskih svojstava mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	169
4.5.6. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469.....	172
4.5.7. Zaključak	175
4.6. Analiza kvaliteta napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	176
4.6.1. Određivanje promene sastava proteinskih frakcija prisutnih u napicima na bazi surutke proizvedenim primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture.....	176
4.6.2. Poređenje parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke i mleka proizvedenih primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture	179

4.6.3. Ispitivanje osetljivosti primenjenih kultura na antibiotike	180
4.6.4. Zaključak	182
4.7. Unapređenje kvaliteta napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture	183
4.7.1. Uticaj dodatka stabilizatora na kvalitet napitka na bazi surutke proizvedenog pomoću ABY-6 kulture	183
4.7.2. Uticaj dodatka voćnih sokova na kvalitet napitka na bazi surutke i mleka proizvedenog pomoću ABY-6 kulture	188
4.7.3. Zaključak	191
4.8. Analiza sastava i deklarisanje napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture.....	192
4.8.1. Analiza sastava proizvedenih napitaka na bazi surutke	192
4.8.2. Deklarisanje napitka na bazi surutke i mleka proizvedenog primenom ABY-6 kulture.....	193
4.8.3. Deklarisanje napitka na bazi surutke, mleka i voćnog soka proizvedenog primenom ABY-6 kulture	194
4.8.4. Finalni izgled napitka na bazi surutke, mleka i soka od jabuke proizvedenog primenom ABY-6 kulture.....	196
4.8.5. Zaključak	197
4.9. Pilot studija o uticaju proteina surutke na apetit/sitost	198
4.9.1. Zaključak	204
5. ZAKLJUČAK.....	206
Spisak tabela.....	210
Spisak slika	213
6. LITERATURA	217
Biografija autora.....	261
Prilog 1. Izjava autorstvu.....	263
Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	264
Prilog 3. Izjava o korišćenju.....	265

1. UVOD

Predmet istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na iskorišćavanje otpadne surutke mlekare Imlek A.D. i njeno prevođenje, primenom postupka mlečno-kisele fermentacije, u novi fermentisani napitak na bazi surutke unapređenih funkcionalnih, nutritivnih i senzornih karakteristika.

Surutka koja nastaje u procesima proizvodnje sira i kazeina predstavlja glavni sporedni proizvod industrije mleka koji spada u jedan od najslabije iskorišćenih sporednih proizvoda prehrambene industrije u Srbiji¹. Osnovni problem industrije mleka je što se svega 10,0-20,0% mleka iskoristi za dobijanje sira ili kazeina, dok 80,0-90,0% mleka otpada na surutku². Usled neiskorišćavanja, surutka postaje veoma veliki zagađivač, što je u potpunosti u neskladu sa potencijalima koje kao sirovina poseduje. Svetska proizvodnja surutke iznosi preko 100 miliona tona godišnje, a samo u Evropskoj Uniji (EU) proizvedeno je 1997. godine oko 50,0% od ove količine³. Na osnovu podataka o proizvodnji sira projektovanim do 2019. godine, proizilazi da će svetska proizvodnja surutke do kraja 2019. godine beležiti stalni rast od oko 2,0% godišnje⁴.

Svega 50,0% otpadne surutke biva iskorišćeno u prehrambenoj i industriji vrenja, dok se ostatak ispušta u vodotokove bez prethodne obrade. Ispuštanje surutke u vodotokove sa jedne strane predstavlja neoprostiv gubitak nutritivno vredne sirovine, a sa druge strane prouzrokuje velike ekološke probleme s obzirom na visoke vrednosti HPK (hemijska potrošnja kiseonika) i BPK (biološka potrošnja kiseonika). Kako je BPK vrednost (35,0-40,0 g/L) za razgradnju 1 L surutke jednaka BPK vrednosti otpadne vode koju za 24 sata načini jedna osoba, a budući da je količina surutke koju proizvodi jedna veća sirana oko 50 000 litara na dan (što odgovara proizvodnji od oko šest tona sira dnevno), postrojenje za biološki tretman takve fabrike prema veličini odgovaralo bi postrojenju za biološki tretman otpadne vode grada od 50.000 stanovnika. Problem je još složeniji i zbog toga što za razliku od komunalnog otpada, koji u vodotokove stiže kontinuirano, slučaj surutke podrazumeva istakanje velikih količina odjednom, pa postrojenja za preradu mogu biti prekomerno opterećena usled čega postoji opasnost od havarije⁵. Što se tiče HPK vrednosti za kiselu

surutku ona iznosi oko 75,0 g/L dok za deproteinizovanu iznosi oko 57,0 g/L, dok sadržaj organskog azota u kiseloj surutki iznosi oko 10,3 g/L⁶.

Sa druge strane, savremeni tempo i način života, kao i sve zagađenije životno okruženje nameću potrebu proizvodnje unapređenih prehrambenih proizvoda koji bi pomogli ljudskom organizmu u borbi protiv štetnih agenasa kojima je svakodnevno izložen. Jedno od efikasnijih rešenja vezanih za iskorišćavanje surutke jeste proizvodnja funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke. Proizvodnjom ove vrste napitaka u okviru samo jednog procesa iskorišćavaju se svi potencijali surutke kao sirovine, iz životne sredine se uklanja materijal koji predstavlja biološki veoma opasan zagađivač a sa druge strane dobija se jeftin, zdrav i potpuno prirodan proizvod¹.

Ovakav način prerade surutke podrazumeva proces nakon koga ne zaostaje ni najmanja količina otpada i predstavlja alternativu procesima prerade surutke u proizvode kao što su mlečna kiselina, etanol, mikrobni proteini, β -D-galaktozidaza i vitamini koji nose sa sobom velike zahteve u pogledu energije i tehnološke opreme³. Ovim postupkom prerade surutke ostvaruje se velika ušteda energije u odnosu na komplikovanije procese prerade surutke koji zahtevaju prečišćavanje finalnog proizvoda što dovodi do generisanja nove količine otpada koji je neophodno dalje obrađivati.

Uzimajući u obzir nedovoljno iskorišćen potencijal surutke kao sirovine, sve izraženiju nestašicu hrane na svetskom tržištu kao i sve zagađenije životno okruženje, ova disertacija je usmerena upravo na proizvodnju funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke zadovoljavajućih senzornih svojstava sa ciljem da se ukaže na značaj surutke kao sirovine i proizvoda u ljudskoj ishrani, kao i mogućnost njenog prevođenja iz otpada u proizvod.

U ovom radu biće izvršeno ispitivanje različitih sojeva bakterija mlečne kiseline (BMK) sa aspekta sposobnosti fermentacije surutke i produkcije bioaktivnih komponenti. Izvršiće se ispitivanje velikog broja bakterija mlečne kiseline iz kolekcije kultura Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, kao i komercijalnih kultura koje se u industriji primenjuju u procesu proizvodnje jogurta. Nakon odabira proizvodnih mikroorganizama, pristupiće se optimizaciji procesa fermentacije surutke pri proizvodnji funkcionalnih napitaka.

Proizvodnja funkcionalnih napitaka može biti poboljšana izborom odgovarajućeg sastava fermentacionog supstrata i uslova uzgajanja mikroorganizama. Time bi se ostvarilo

pozitivan uticaj na rast primenjenih mikroorganizama, skratila dužina trajanja procesa fermentacije i unapredila funkcionalna, nutritivna i senzorna svojstva proizvedenih napitaka.

Obzirom da bakterije mlečne kiseline za rast zahtevaju veoma složene supstrate⁷, ispitaće se uticaj različitih vrsta i količina izvora azota, ugljenika, vitamina i mineralnih materija na broj ćelija u proizvedenom funkcionalnom napitku. Statistička obrada dobijenih rezultata pružiće kvantitativni uvid u uticaj svakog od ispitivanih parametara ili njihove interakcije na rast i aktivnost primenjenih proizvodnih sojeva. Odabrani sojevi će se detaljno ispitati sa aspekta stabilnosti, posedovanja probiotskih i antimikrobnih svojstava i rezistencije na antibiotike.

Na osnovu utvrđenih svojstava odabranih mikroorganizama, razmotriće se mogućnost njihove primene u svrhu proizvodnje funkcionalnih napitaka, odnosno ispitaće se njihova sposobnost produkcije bioaktivnih jedinjenja u cilju zadovoljenja kriterijuma funkcionalnosti proizvedenih napitaka.

Najveći deo istraživanja biće posvećen ispitivanju mogućnosti fermentacije surutke komercijalnom ABY-6 kulturom koja se u industriji primenjuje za proizvodnju jogurta. Kao komercijalna kultura, ova kultura je već okarakterisana za fermentaciju mleka, pa je pretpostavljeno da bi se i fermentacijom surutke mogao dobiti napitak prihvatljivih senzornih karakteristika sličnih jogurtu na koje su domaći potrošači već naviknuti.

Radi unapređenja senzornih svojstava proizvedenih napitaka ispitaće se uticaj dodatka voćnih sokova u formulacije⁸, čime će biti takođe unapređena funkcionalna i nutritivna svojstva finalnog proizvoda. Utvrdiće se uticaj dodatka različitih voćnih sokova pre i posle fermentacije, čime će biti omogućeno ispitivanje uticaja ovih dodataka na funkcionalnost, stabilnost, nutritivna i senzorna svojstva proizvedenih napitaka. Biće predloženo nekoliko formulacija napitaka različitog ukusa bez dodatih aditiva, konzervanasa, boja i aroma, kao i opšta šema procesa proizvodnje ove vrste napitaka. Napitak će biti u potpunosti nutritivno okarakterisan i deklarisan čime će moći da se ukaže na njegov značaj u domenu zdrave ishrane i pozitivanog uticaja na zdravlje ljudi koji se ostvaruje njegovom konzumacijom.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Funkcionalna hrana

2.1.1. Istorijat nastanka koncepta funkcionalne hrane

Savremeni tempo i način života kao i sve zagađenije životno okruženje nameću potrebu konzumiranja hrane sposobne da ljudskom organizmu pomogne u borbi protiv štetnih agenasa kojima je svakodnevno izložen, a time i u očuvanju zdravlja. U novije vreme definicija zdravlja nije više ograničena samo na odsustvo bolesti, već se sve više odnosi i na ukupno fizičko, mentalno i psihološko blagostanje ljudskog organizma. Hrana koju konzumiramo osim što igra presudnu ulogu u rastu i razvoju, danas je prepoznata i kao jedan od ključnih faktora koji određuju kvalitet života⁹. U prilog ovakvom načinu shvatanja hrane ide rečenica » *Neka hrana bude tvoj lek i lek bude tvoja hrana* « kojom je pre više od 2500 godina Hipokrat, začetnik moderne medicine, istakao značaj hrane u nastanku i lečenju raznih vrsta bolesti¹⁰.

Radi razumevanja značaja funkcionalne hrane neophodno je razumeti kako se kroz istoriju menjao način života čoveka, njegova hrana pa samim tim i nauka o ishrani.

U dalekoj prošlosti ljudi su bili lovci-sakupljači koji su živeli konzumirajući uglavnom hranu životinjskog porekla, ribu, školjke i divlje jestive plodove. Meso divljači je obilovalo proteinima i Ω -3 masnim kiselinama dok je sa druge strane bilo siromašno prostim mastima. Obzirom da poljoprivreda nije postojala, pračovjek u svojoj ishrani nije imao zastupljene namirnice bogate žitaricama i mlekom, i za razliku od savremenog čoveka nije konzumirao meso domaćih životinja, prerađena ulja i masti, rafinisane ugljene hidrate i alkohol¹¹.

Pre oko 10 000 godina sa opadanjem broja divljači dostupne za ishranu smatra se da je, u cilju zadovoljenja potreba za kalorijama, započeo razvoj poljoprivrede i okretanje čoveka žitaricama i mahunarkama. U to vreme fokus čovekove ishrane lagano se pomera sa visoko proteinske na hranu bogatu ugljenim hidratima. Ova promena načina ishrane je, kako se veruje, imala veoma negativan, a po nekima čak i ugrožavajući, uticaj na ljudsko zdravlje. Sa razvojem čoveka, naučni i kulturni napredak koji su nam kao vrsti omogućili da rastemo i napredujemo,

doveli su do pojave nenamernih posledica koje su neke činioce naše ishrane učinile manje zdravim od onih koje su konzumirali naši preci¹⁰.

U bližoj prošlosti nutritivno uravnotežena ishrana je predstavljala unos hrane koja je dovoljna da se izbegne nedostatak neke od hranljivih materija. Sa razvojem društva napredovalo se do shvatanja da uravnotežena ishrana zapravo predstavlja unos one hrane koja doprinosi zdravlju i smanjuje rizik od nastanka nekih hroničnih bolesti⁹. Uzbudljiv i ubrzani razvoj nauke o ishrani koji je započeo u prvoj polovini 20. veka doveo je do toga da su naučnici bili u stanju da precizno definišu esencijalne nutrijente i propišu nutritivne standarde koji se odnose na prevenciju nedostataka i promovisanje rasta i razvoja. Ovim propisima utvrđeni su: preporučeni dnevni unos nutrijenata, dijetetske smernice koje se odnose na sveukupno zdravlje, kao i već dobro poznata piramida ishrane. U drugoj polovini 20. veka nutricionisti markiraju pojedine nutrijente kao potencijalne izazivače nekih bolesti kao što su slabost srca, dijabetes tip 2, visok krvni pritisak i rak. To dovodi do razvoja prehrambenih proizvoda sa smanjenim sadržajem štetnih nutrijenata kao što su masnoće, šećer i so⁹.

Na početku 21. veka industrijalizovani svet se suočava sa sve većim troškovima zdravstvene zaštite, dužim životnim vekom, razvojem novih tehnologija i njihovim sve izraženijim štetnim uticajima na zdravlje ljudi. Da bi odoleli svim ovim izazovima nutricionisti su na velika vrata uveli ideju » *optimalne ishrane* « koja se fokusira na optimizovanje kvaliteta svakodnevnne ishrane po pitanju sadržaja hranljivih i ostalih materija kao i drugih svojstava hrane koja favorizuju očuvanje čovekovog zdravlja. Tu na scenu stupa optimalna ishrana, bazirana na primeni funkcionalne hrane, koja ima za cilj optimizaciju fizioloških funkcija čime bi svakom od nas pojedinačno bio obezbeđen zdraviji, duži i kvalitetniji životni vek. Da bi se ovo ostvarilo, optimalni izbor hranljivih materija mora biti baziran na boljem razumevanju interakcija između gena, nutritivnih faktora i bolesti, jer jedino takva ukupna slika može odrediti reakciju pojedinca na korisne i na štetne sastojke hrane⁹.

U budućnosti će dakle ljudi koji imaju sklonost ka srčanim oboljenjima možda biti u mogućnosti da za svoju ishranu biraju hranu koja je prilagođena njihovim predispozicijama, čime će svom organizmu moći da pomognu da se na prirodan način izbori za svoje zdravlje⁹.

2.1.2. Definicija funkcionalne hrane

Funkcionalna hrana je potpuno nova kategorija proizvoda koja je nastala u poslednjih desetak godina, na osnovu povećanog interesa potrošača za poboljšanjem kvaliteta života i zdravlja. Pojam funkcionalna hrana se prvi put pojavio u Japanu još 1991. godine kada je korišćen za opisivanje prehrambenih proizvoda obogaćenih nutrijentima sa pozitivnim fiziološkim delovanjem^{12,13,14}. Ministarstvo zdravlja Japana izdalo je tada odobrenje za uvođenje specijalne kategorije hrane FOSHU-*Food for Specified Health Uses* ili *Hrana za određenu zdravstvenu primenu*, a samim tim i uspostavlja pravila za specifične zdravstvene izjave za taj tip hrane^{13,15,16,17}. U većini zemalja ne postoje zakonom regulisane definicije pojma » *funkcionalna hrana* « tako da postavljanje granice između konvencionalne i funkcionalne hrane predstavlja izazov kako za nutricioniste tako i za prehrambene tehnologe^{18,19}. Funkcionalna hrana je hrana sa uravnoteženim odnosom hranljivih materija. To je hrana koja svojim karakteristikama, utiče pozitivno na različite aspekte ljudskog zdravlja. Ona nije klasičan lek niti farmaceutski preparat ali svojim osobinama pruža kako preventivni tako i terapijski efekat na ljudsko zdravlje.

Danas, funkcionalna hrana predstavlja jedan od najperspektivnijih pravaca u Nutricionizmu i Dijetetici. Pod funkcionalnom hranom se podrazumevaju proizvodi koji imaju povoljan uticaj na ljudsko zdravlje pored svojih uobičajenih funkcija. To je hrana koja u svom sastavu ima biološki aktivne komponente koja je čine funkcionalnom, i koja u skladu sa naučnim potvrdama, ukoliko se konzumira u uobičajenoj količini, pozitivno utiče na određene funkcije u organizmu⁹.

Postoji više različitih definicija funkcionalne hrane. Jedna od definicija koja na jednostavan način objašnjava ovaj pojam je ta da se hrana može nazvati » *funkcionalna* « ako pored svoje osnovne nutritivne vrednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utiče na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu, smanjujući rizike za nastanak i razvoj pojedinih bolesti²⁰. Funkcionalna hrana, dakle može poboljšati opšte stanje organizma, smanjiti rizik oboljevanja, a čak može biti i korisna tokom lečenja nekih oboljenja^{16,18}.

Jedna nevladina organizacija pod nazivom *International Food Information Council-IFIC* je dala definiciju koja kaže: Funkcionalna hrana je ona koja pruža veću dobrobit za zdravlje nego

osnovna hrana. Evropska komisija za koordinaciju aktivnosti vezanih za funkcionalnu hranu FUFOS (Functional Food Science in Europe-Nauka o Funkcionalnoj Hrani) koordinisana od strane ILSI Europe (International Life Science Institute-Evropski Međunarodni Institut Prirodnih Nauka) je sa druge strane dala jedinstvene odrednice prema kojima funkcionalna hrana:

- treba da bude konvencionalna i svakodnevna hrana,
- može da se konzumira kao deo uobičajene ishrane,
- je prirodnog sastava (suprotno od sintetskog) sa komponentama koje se mogu prirodno naći u toj hrani ili su dodate u većoj količini od koncentracije specifične za tu hranu,
- ima pozitivan uticaj na fiziološke funkcije,
- može poboljšati opšte zdravstveno stanje ili smanjiti rizik od bolesti,
- ima potvrđene i utemeljene zdravstvene tvrdnje^{20,21}.

Funkcionalna hrana ne mora nužno biti funkcionalna za celu populaciju, i spajanje individualnih biohemijskih potreba sa određenim komponentama hrane može uticati na napredak u razumevanju interakcija između gena i hrane. Međutim, jako je bitno shvatiti razliku između hrane i leka. Ako se u proizvodu prepoznaju indikacije za lečenje ili prevenciju određenih bolesti onda je taj proizvod lek i izvesna doza toksičnosti je tolerantna, ali ako se u proizvodu ne prepoznaju indikacije za lečenje ili prevenciju određenih bolesti onda je to hrana i u tom slučaju pri normalnim količinama unosa ne sme izazivati nikakve toksične efekte²².

2.1.3. Klasifikacija funkcionalne hrane

Prema načinu nastanka funkcionalna hrana može biti klasifikovana u pet grupa²³:

1. Nemodifikovana i neprerađena hrana, eng. *whole food*
 - najjednostavniji oblik funkcionalne hrane, hrana u svom prirodnom obliku.
2. Pojačana hrana, eng. *fortified food*
 - nastala povećanjem količine postojećih nutrijenata.
3. Obogaćena hrana, eng. *enriched food*
 - nastala dodatkom novih nutrijenata koji prirodno u njoj nisu prisutni.
4. Unapređena hrana, eng. *altered food*
 - nastala zamenom postojećih nutrijenata novim koji imaju povoljan efekat.

5. Poboljšana hrana, eng. *enhanced commodities*

- hrana kod koje su jedan ili više nutrijenata prirodno obogaćeni putem specijalnih uslova gajenja ili genetskih manipulacija.

Ova podela predstavlja osnovnu podelu funkcionalne hrane koja ne govori mnogo o poreklu i osobinama same hrane. Mnogo detaljnija klasifikacija, koja se može primeniti na svaku od prethodno navedenih grupa, opisuje funkcionalnu hranu kroz nekoliko nivoa i to na osnovu²⁴:

1. Grupe namirnica kojoj pripada (mleko, meso, jaja, žitarice, ulja i masti, konditorski, pekarski proizvodi itd.);
2. Fizičko-hemijskih i organoleptičkih osobina (čvrsta hrana, napitak, krem, sos);
3. Procesu proizvodnje (fermentacija, inkapsulacija, zamrzavanje);
4. Vrsti bioaktivne komponente (npr. mineralne materije, antioksidansi, lipidi, probiotici, prebiotici);
5. Bolesti koju sprečava ili ublažava (dijabetes, osteoporoza, rak debelog creva);
6. Fiziološkog efekta (imunološki ili anti-tumorski efekat, varenje).

2.1.4. Klasifikacija funkcionalnih mlečnih proizvoda

Mlečni proizvodi spadaju u vodeće proizvode u domenu razvoja funkcionalne hrane. Vrednost ukupnog svetskog tržišta funkcionalne hrane samo u 2005. godini iznosilo je oko 16 milijardi dolara. Čak 43% od ove vrednosti odnosi se na funkcionalnu hranu baziranu na mleku, koja je skoro u potpunosti prisutna u obliku fermentisanih mlečnih proizvoda²⁵. Fermentisani mlečni proizvodi se tradicionalno smatraju zdravim i u tom kontekstu pružaju široke mogućnosti za nadogradnju i unapređenje po pitanju funkcionalnosti. To su proizvodi koji u sebi pored tradicionalnih bakterija mlečne kiseline (BMK) sadrže dodatne probiotske sojeve, sa dokazanim terapijskim efektom, i predstavljaju najsvetliji primer unapređenja tradicionalnih mlečnih proizvoda u funkcionalne mlečne proizvode²⁶.

Mleko je kompleksna mešavina specifičnih bioaktivnih proteina, masti i šećera koja sadrži veliki broj biološki aktivnih supstanci kao što su imunoglobulini, enzimi, antimikrobni peptidi, oligosaharidi, hormoni, citokini i različiti faktori rasta²⁷. Sveže mleko sadrži mešavinu antimikrobnih supstanci koje poseduju kako bakteriostatičko tako i baktericidno dejstvo^{28,29}.

Proteini mleka uključujući kazein, β -laktoglobulin, α -laktalbumin, imunoglobuline, laktoferin i serum albumin, koji ispoljavaju svoju biološku aktivnost bilo direktno bilo putem svojih metabolita, utiču ne samo na imuni već u velikoj meri i na kardiovaskularni i nervni sistem čoveka³⁰.

Funkcionalni mlečni proizvodi se, prema obliku u kom se nalaze, mogu podeliti na:

1. Funkcionalni mlečni proizvodi u čvrstom stanju;
2. Funkcionalni mlečni napici.

Funkcionalni mlečni napici se zatim prema sastavu osnovne sirovine mogu podeliti na:

1. Funkcionalni napici na bazi mleka;
2. Funkcionalni napici na bazi surutke.

Funkcionalni napici na bazi surutke se prema načinu proizvodnje mogu podeliti na:

1. Funkcionalni nefermentisani napici na bazi surutke;
2. Funkcionalni fermentisani napici na bazi surutke.

2.1.5. Funkcionalni napici na bazi surutke

2.1.5.1. Funkcionalni nefermentisani napici na bazi surutke

Napici na bazi surutke slični mleku

Predstavljaju napitke koji se dobijaju obogaćivanjem mleka ili mlečnih proizvoda kazeinima, koncentratom proteina surutke (KPS) i izolatom proteina surutke (IPS)³¹.

Osvežavajući napici na bazi surutke

Predstavljaju napitke koji se dobijaju iz permeata surutke koji ne sadrži proteine surutke. Smatraju se funkcionalnim samo ukoliko sadrže neku naknadno dodatu funkcionalnu komponentu. Na tržištu postoji veoma mali broj ovih napitaka a među njima najpoznatija je švajcarska *Rivella* tačnije *Rivella-green* formulisana uz dodatak ekstrakta zelenog čaja^{32,33}. Tržište ove vrste napitaka je veoma malo i trenutno se mogu naći u prodavnicama svega šest evropskih zemalja³³.

Energetski napici na bazi surutke

Predstavljaju napitke koji se dobijaju iz surutke ili njenih komponenata, najčešće izolata proteina surutke (IPS), a sadrže neke dobro poznate visoko energetske komponente kao što su

kofein, taurin ili vitamine B kompleksa. Najpoznatiji napitak iz ove grupe proizvoda je američki *Whey-UP* koji je zapravo pionirski brend tržišta visoko energetske napitaka³⁴.

Voćni napici na bazi surutke

Predstavljaju napitke koji osim surutke u svom sastavu imaju i voćnu komponentu. Funkcionalnost ove vrste napitaka potiče od prisustva raznih komponenti koje su sastavni deo voća pa se tako npr. dodatkom soka od paradajza u surutku unosi likopen koji u velikoj meri pojačava funkcionalnu snagu ovako formulisanog napitka. Ova vrsta proizvoda se često dodatno obogaćuje mineralnim materijama i vitaminima i kao takva nailazi na veoma dobar odziv kod potrošača.

2.1.5.2. Funkcionalni fermentisani napici na bazi surutke

Neprobiotski napici na bazi surutke

Predstavljaju napitke koji se dobijaju fermentacijom surutke pomoću bakterija mlečne kiseline koje ne spadaju u probiotike. Najčešće primenjivani mikroorganizmi u proizvodnji ove vrste napitaka su razne jogurtne kulture koje se tradicionalno koriste u proizvodnji jogurta. Sa druge strane pri proizvodnji ovih napitaka veoma često se koriste sojevi koji proizvode neku fiziološki aktivnu komponentu koja zapravo doprinosi funkcionalnosti samog napitka.

Probiotski napici na bazi surutke

U protekloj deceniji veoma velika pažnja je posvećena proizvodnji funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke koji sadrže probiotske bakterije. Najčešće korišćene probiotske bakterije pri formulaciji ove vrste napitaka su *Lactobacillus acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12³⁵, slede ih *Lactobacillus rhamnosus* NCDO 243, *Bifidobacterium bifidum* NCDO 2715 i *Propionibacterium freudenreichi* ssp. *shermanii* MTCC 1371³⁶. Takođe u često korišćene sojeve spadaju i *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4, *Enterococcus faecium* L3³⁷, *Lactobacillus reuteri* i *Bifidobacterium bifidum*³⁸. U kombinaciji sa ovim sojevima često se primenjuju i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* kao nosioci procesa fermentacije³⁹. Usled veoma slabe proteolitičke aktivnosti kao i smanjene sposobnosti da fermentišu laktozu, neke od ovih bakterija veoma sporo rastu u mleku, a naročito u surutki⁴⁰. Da bi se unapredio njihov rast i preživljavanje neophodno je prisustvo

određenih supstanci koje se jednim imenom nazivaju prebiotici. Napici u čiji sastav ulaze i probiotici i prebiotici nazivaju se sinbiotici.

2.1.6. Probiotici, prebiotici i sinbiotici

2.1.6.1. Probiotici

Tokom čitavog niza godina reč probiotik je tumačena na nekoliko različitih načina. Prvobitno je korišćena za opisivanje supstanci proizvedenih od strane jedne protozoe stimulisane prisustvom druge protozoe⁴¹, da bi se kasnije koristila za opisivanje dodataka prisutnih u hrani za životinje koji ostvaruju blagotvoran uticaj na crevnu floru domaćina (životinje)⁴². Crawford⁴³ je definisao probiotike kao kulturu specifičnih živih mikroorganizama (pre svega *Lactobacillus* ssp.) koja se implantira u probavni sistem životinje radi efikasnog uspostavljanja intestinalne populacije kako korisnih tako i patogenih mikroorganizama. Nešto kasnije Fuller⁴⁴ daje jedinstvenu definiciju probiotika kao živog mikrobnog dodatka u stočnoj hrani koji blagotvorno utiče na životinju-domaćina poboljšanjem mikrobne ravnoteže njenog crevnog trakta. Američka Nacionalna Asocijacija za hranu predstavlja probiotik (direktni izvor mikroba) kao izvor živih prirodnih mikroorganizama i to bakterija, gljiva i kvasaca⁴⁵. Prema trenutno usvojenoj definiciji FAO/WHO (World Health Organisation) probiotici su živi mikroorganizmi koji konzumirani u odgovarajućoj količini (broju) ostvaruju pozitivan uticaj na zdravlje domaćina⁴⁶. Tačnije, probiotici su mikroorganizmi netoksične i nepatogene prirode koji prolaskom kroz digestivni trakt ispoljavaju pozitivan uticaj na zdravlje domaćina⁴⁷.

Da bi se jedan mikroorganizam mogao smatrati probiotikom mora da zadovolji nekoliko važnih kriterijuma, i to da:

- bude izolovan iz vrste kojoj pripada domaćin kome je namenjen;
- ima dokazano blagotvorno dejstvo na zdravlje domaćina;
- je nepatogen i netoksičan;
- pokazuje dobre karakteristike rasta, otpornosti i genetske stabilnosti;
- je sposoban da preživi tranzit kroz gastrointestinalni trakt (otpornost na kiseline i žuč);
- ima sposobnost adsorpcije na epitelne ćelije creva;
- poseduje sposobnost kolonizacije creva;

- ima sposobnost proizvodnje antimikrobnih supstanci;
- je sposoban da preživi tokom obrade i dugog perioda skladištenja u velikom broju^{48,49,50}.

U najčešće korišćene probiotske sojeve spadaju vrste roda *Lactobacillus* i to: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* (GG), *L. gasseri*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. farciminosi*. Takođe u probiotike spadaju i Gram-pozitivne koke i to: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, *Streptococcus intermedius*, kao i vrste roda *Bifidobacterium* među kojima su najkorišćenije: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. thermophilum*^{49,51}.

Probiotici se odlikuju velikim brojem potvrđenih pozitivnih efekata kao i efekata koji su još uvek u razmatranju. U neke od pozitivnih efekata spadaju: uspostavljanje balansa crevne mikroflore, povećanje otpornosti na patogene mikroorganizme i prevencija dijareje, sistematsko snižavanje nivoa serumskog holesterola, redukcija količine fekalnih enzima kao potencijalnih mutagena koji mogu izazvati tumore, metabolisanje laktoze i ublažavanje efekata netolerancije na laktozu, unapređenje imunog sistema organizma, povećanje apsorpcije kalcijuma, sinteza vitamina i digestija proteina^{52,53,54}.

Pored ovih postoje i dokazi o pojedinim sojevima sposobnim da proizvode bakteriocine koji imaju veoma važnu ulogu u uništavanju patogenih mikroorganizama. Međutim osnovni problem kod primene probiotskih bakterija leži u njihovoj nesposobnosti da kolonizuju debelo crevo i postanu deo stalne mikroflore creva. Usled toga, neophodna je primena dodatnih supstanci koje će omogućiti ili unaprediti sposobnost kolonizacije creva gde na scenu stupaju prebiotici kao atraktivna alternativa⁵⁵.

2.1.6.2. Prebiotici

Prebiotici su nesvarljivi sastojci hrane koji pozitivno utiču na domaćina selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija prisutnih u crevima. U hrani se moraju nalaziti u odgovarajućoj koncentraciji koja će omogućiti ispoljavanje njihovog pozitivnog efekta u većoj meri od efekata uobičajenih nutritivnih sastojaka⁵⁶.

Da bi jedan sastojak hrane mogao da bude okarakterisan kao prebiotik mora da zadovolji nekoliko važnih kriterijuma:

1. Da ne podleže hidrolizi niti absorpciji u gornjem delu gastrointestinalnog trakta;
2. Da je selektivno fermentabilan od strane jedne ili ograničenog broja potencijalno korisnih bakterija stanovnika debelog creva tj. laktobacila i bifidobakterija, koje su njegovim prisustvom stimulisane da rastu i/ili da postanu metabolički aktivne;
3. Da bude u stanju da promeni mikrofloru debelog creva ka zdravijem sastavu, npr. da poveća broj saharolitičkih a smanji broj putrefaktivnih (truležnih) bakterija⁵⁷.

Među najčešće korišćene prebiotike spadaju nesvarljivi oligosaharidi koji stimulišu rast bifidobakterija koji se delimično ili uopšte ne apsorbuju u želucu. U najvažnije oligosaharide spadaju glukani, fruktani i manani. Među fruktanima najznačajnije mesto zauzimaju inulin i oligifruktoze koji pored metaboličkog ispoljavaju i efekat zaštite probiotskih mikroorganizama⁵⁸. Tolerancija na nesvarljive oligosaharide kao sastojke svakodnevne ishrane zavisi od vrste, vremena konzumiranja (lošija na prazan stomak nego nakon obroka), individualnih faktora kao što su apsorpcioni kapacitet, stanja, pokretljivosti i osetljivosti debelog creva⁴⁸.

Još davne 1997. godine Crittenden i Playne⁵⁹ su predstavili grupu od 12 prehrambenih oligosaharida koji se mogu komercijalno proizvoditi među kojima su: laktuloza, galakto-oligosaharidi, frukto-oligosaharidi, izomalto-oligosaharidi, malto-oligosaharidi, palatinoza-oligosaharidi, gentio-oligosaharidi, ksilo-oligosaharidi, glukozil-saharoza, lakto-saharoza, ciklodekstrini i sojini oligosaharidi. Prebiotski efekat većine od ovih oligosaharida se najverovatnije ogleda u sposobnosti selektivnog stimulanja rasta bifidobakterija, osim glukozil-saharoze, malto-oligosaharida i ciklodekstrina koji nisu prepoznati kao bifidogeni faktori. Prebiotski oligosaharidi prolaze kroz gornji deo gastrointestinalnog trakta i netaknuti stižu do debelog creva zahvaljujući specifičnim vezama između monomera koje nisu podložne raskidanju pod dejstvom enzima sisara. Međutim, mikrobni enzimi su u stanju da manje ili više utiču na ove veze omogućavajući njihovu selektivnu razgradnju. Ova selektivnost je potkrepljena činjenicom da nemaju svi mikroorganizmi odgovarajuće enzime sposobne da razgrade veze unutar molekula oligosaharida. Sa druge strane, takođe postoji veoma veliki broj

namirnica koji se usled visokog sadržaja frukto-oligosaharida mogu svrstati u namirnice sa prebiotskim efektom a najpoznatije među njima su: cikorija, beli luk, crni luk i blitva⁶⁰.

Postoji veoma veliki broj studija koje potvrđuju pozitivan efekat frukto-oligosaharida na intestinalne bakterije čoveka. Frukto-oligosaharidi povećavaju broj bifidobakterija i laktobacila, koncentraciju masnih kiselina kratkog lanca, smanjuju broj klostridije, fusobakterija i bakteroida (anaerobnih gram-negativnih štapića) a takođe smanjuju i pH vrednost debelog creva^{61,62,63,64}. Pored ovih, u novije vreme je kroz patente obelodanjeno i nekoliko novih prebiotskih oligosaharida među kojima su gluko-oligosaharidi, hito-oligosaharidi, agar-oligosaharidi⁶⁵ kao i transgalakto-oligosaharidi koji pored bifidogenog efekta utiču (*in vitro*) na povećanje koncentracije ATP-a, masnih kiselina kratkog lanca, acetata kao i na smanjenje pH vrednosti, a koji su skoro potpuno (95,0%) biorazgradivi u roku od 4 dana⁶⁶. Neki od najčešće korišćenih prebiotika su: FOS (oligo-fruktoza), inulin, laktuloza i laktitol.

Na osnovu rezultata nekoliko kliničkih studija, dnevna doza FOS koja ispoljava bifidogeni efekat kreće se u rasponu od 4,0 do 15,0 g/dan. Međutim preporuka je da se ipak koristi najmanja moguća doza sposobna da izazove odgovarajući efekat⁶⁷. Obzirom da se radi o ugljenim hidratima, oni bi mogli kao dodatni sastojci biti uvedeni u obične namirnice kao što su žitarice, keks, kolači, formule za decu, formule za mršavljenje, pri čemu bi bilo neophodno voditi računa da se ne naruše senzorni kvalitet i tekstura obogaćenog proizvoda. Obzirom na njihov koristan zdravstveni efekat, ovakav pomak bi mogao biti izuzetno atraktivan potencijalnim potrošačima.

2.1.6.3. Sinbiotici

Još jedan od načina upravljanja mikroflorom creva jeste primena sinbiotika. Sinbiotikom se smatra mešavina probiotika i prebiotika koja pozitivno utiče na domaćina unapređujući preživljavanje i implantaciju živih probiotskih sojeva u gastrointestinalnom traktu. Obrazloženje načina dejstva sinbiotika svodi se na činjenicu da odabrana kombinacija probiotika i prebiotika postiže veći pozitivan efekat na zdravlje od efekta koji se postiže pri individualnoj primeni ove dve komponente⁶⁸.

Iako sama reč aludira na sinergizam (sadejstvo, timski rad, udruženo delovanje) u kontekstu ishrane ona treba da bude rezervisana isključivo za proizvode u kojima primenjena prebiotska komponenta selektivno favorizuje primenjenu probiotsku komponentu. Strogo govoreći, proizvod koji sadrži kao prebiotik oligofruktozu a kao probiotik bifidobakteriju bi mogao da zadovolji ovu definiciju jer se oligofruktoza smatra isključivo bifidogenim faktorom. U tom smislu, proizvod koji kao prebiotik sadrži oligofruktozu a kao probiotik npr. vrstu *Lactobacillus casei* ne bi mogao da se okarakteriše kao sinbiotik. Ovakav proizvod bi se mogao smatrati delimičnim sinbiotikom čiji bi *in vivo* efekat bio ispoljen usled prisustva probiotske bakterije sa jedne strane, i stimulisanja autohtonih bifidobakterija domaćina sa druge strane⁶⁹. Proizvod koji bi sadržao prebiotik Laktitol, koji ima uticaj na probiotsku bakteriju *Lactobacillus casei*, bi kao takav mogao da se smatra sinbiotikom.

Dakle, sinbiotik predstavlja kombinaciju jednog određenog prebiotika i jednog određenog mikroorganizma (probiotika) na koji taj prebiotik deluje, stimulišući njegov rast i preživljavanje, čijom bi primenom mogao da bude ostvaren pozitivan uticaj na mikrofloru domaćina. U najčešće sinbiotske kombinacije spadaju: *Bifidobakterije + FOS*, *Laktobacili + lactitol* i *Bifidobakterije + GOS*.

Za sada postoji nekoliko studija koje svedoče o pozitivnim efektima terapije sinbioticima. Primena sinbiotika koji sadrži prebiotik *Synergy* i probiotik *B. longum* ostvaruje pozitivan efekat u lečenju ulceroznog kolitisa⁷⁰. Zatim, primena sinbiotika sastavljenog od prebiotika *Immunofortis* i probiotika *B. breve* M-16V smanjuje alergijske reakcije miševa na alergene iz kravljeg mleka⁷¹. Primena *L. plantarum* 299v kao probiotika u kombinaciji sa prebioticima poreklom iz ovsenih vlakana utiče na smanjenje učestalosti sepse kod pacijenata kod kojih je vršena hepatotomija, pankreatomija, resekcija debelog creva ili crevni baj-pas⁷². Kombinacija probiotika *L. casei* *Shirota* i *B. breve* *Yakult*, u količini od 3,0 g i prebiotika galakto-oligosaharida 6,6 g/dan značajno unapređuje intestinalnu mikrofloru pacijenata nakon operacije raka žuči i time smanjuje komplikacije vezane za pojavu infekcije ili sepse⁷³.

Pored pozitivnog uticaja na infekcije sinbiotici pokazuju i odlične rezultate u redukciji tri-acilglicerola, ukupnog holesterola i LDL holesterola (probiotik *L. acidophilus* ATCC 4962 i

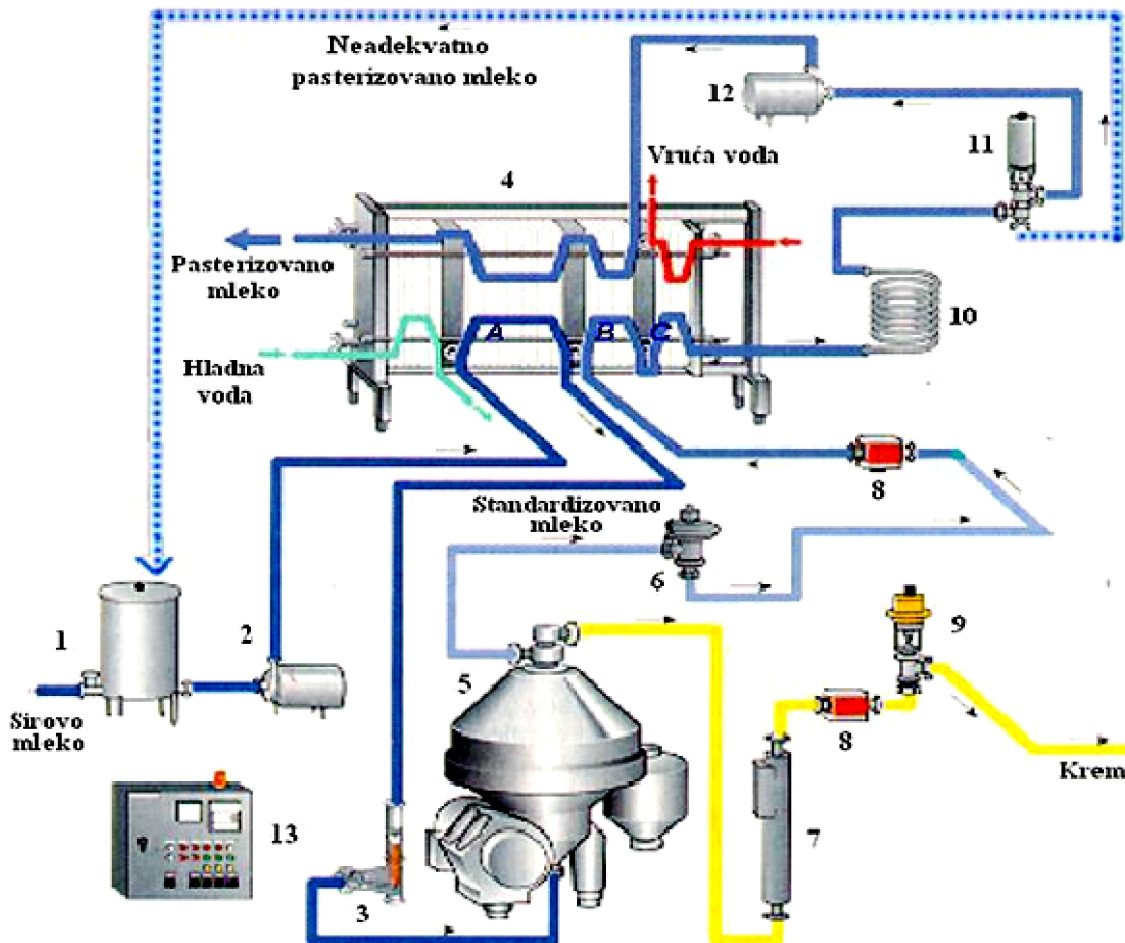
prebiotici frukto-oligosaharidi, manitol i inulin)⁷⁴ kao i povećanju nivoa HDL holesterola (probiotici *L. acidophilus* 145, *B. longum* 913 i prebiotik oligofruktoza)⁷⁵.

2.2. Surutka

2.2.1. Dobijanje surutke tokom procesa prerade mleka

Surutka je glavni sporedni proizvod industrije mleka koji nastaje pri kiselinskom ili enzimskom tretmanu mleka. Sama po sebi predstavlja ogroman problem jer se pri preradi mleka svega 10,0-20,0% iskoristi za dobijanje sira, dok 80,0-90,0% mleka otpada na surutku².

Mleko predstavlja hranljivu tečnost ne samo za ljude i životinje već i za veliki broj mikroorganizama koji mogu dovesti do njegovog kvarenja. Upravo iz tog razloga mleko dobijeno neposredno nakon muže se odmah hladi na temperaturu 4,0 °C na kojoj se čuva tokom procesa transporta od farme do fabrike za preradu mleka. Šema procesa prerade mleka prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Šema industrijskog procesa prerade mleka

Sirovo mleko koje dolazi sa farme i ulazi u fabriku prikuplja se u sabirnim tankovima (1) iz kojih se dalje pomoću pumpe (2) transportuje u sekciju A pločastog razmenjivača toplote (4). U pločastom razmenjivaču toplote vrši se zagrevanje mleka na temperaturu od oko 60,0 °C što predstavlja pripremu mleka za proces standardizacije masti. Mleko se greje iskorišćavanjem povratnog toka pasterizovanog mleka koje se pri tome hladi na temperaturu 45,0 °C. Ovakvim načinom grejanja i hlađenja, potrošnja energije se svodi na minimum. Nakon grejanja mleko napušta sekciju A na temperaturi 60,0 °C i pomoću pumpe (3) se transportuje u separator masti (5) gde se vrši njegoa standardizacija. Standardizacija podrazumeva podešavanje sadržaja masti njihovim delimičnim uklanjanjem u uređaju koji se naziva separator masti. U separatoru

se pod dejstvom centrifugalne sile komponente mleka razdvajaju zahvaljujući razlici njihovih relativnih gustina. Masne globule čija je gustina oko $890,0 \text{ kg/m}^3$ na $60,0 \text{ }^\circ\text{C}$, se pod dejstvom centrifugalne sile kreću ka vrhu separatora, ostaju bliže osi rotacije i dospevaju u vidu pavlake u posebnu komoru. Sadržaj masti u pavlaci je obično oko 35,0-40,0% mada se može podesiti na željeni nivo u skladu sa potrebama. Obrano mleko sa gustinom od oko $1017,0 \text{ kg/m}^3$ na $60,0 \text{ }^\circ\text{C}$ napušta separator klizeći po ivici separatora, tj. udaljeno od ose rotacije, do komore za priklupljanje obranog mleka. Važeći standardizovani sadržaj masti u mleku je 0,05% za obrano mleko, 1,5-3,5% za konzumno mleko i 2,5-4,0% za mleko za proizvodnju sira.

Nakon procesa standardizacije, sadržaj masti izdvojene pavlake se održava konstantnim primenom kontrolnog sistema koji se sastoji od merača gustine (7), regulatora protoka (8) i regulacionog ventila (9). Mleko standardizovano na sadržaj masti od 2,5 do 3,5% (pomoću separatora masti) se prolazeći kroz ventil (6) i regulator protoka (8) transportuje u pločasti razmenjivač toplote (sekcije B i C) u kome se vrši njegova pasterizacija 15s na $72,0 \text{ }^\circ\text{C}$ radi uništavanja vegetativnih ćelija patogenih mikroorganizama. Potrebno vreme zadržavanja od 15s postiže se pomoću posebne spiralne cevi (10) u kojoj se mleko sa temperaturom $72,0 \text{ }^\circ\text{C}$ zadržava tačno 15s. Mogući pad temperature beleži se transponderom koji u tom slučaju aktivira povratni ventil (11) koji nedovoljno pasterizovano mleko vraća u sabirni tank (1). Ukoliko je mleko adekvatno pasterizovano ono se pomoću pumpe (12) transportuje u razmenjivač toplote kao povratni fluid iz koga izlazi sa temperaturom od $45,0^\circ\text{C}$. Ovako dobijeno standardizovano i pasterizovano mleko odlazi u dalje postupke prerade^{76,77,78}. Dalji postupci prerade mleka odnose se na procese koji se primenjuju pri proizvodnji fermentisanih mleka, sireva, kajmaka, putera, sladoleda itd.

Proces proizvodnje sira podrazumeva kiselinski ili enzimski tretman mleka u kome nastaje velika količina surutke. U praktičnom smislu to podrazumeva da se za proizvodnju 1,0 kg sira utroši oko 10,0 L mleka pri čemu se izdvaja 9,0 L surutke.

Kiselinski tretman mleka je postupak u kome nastaju kazein i kazeinska surutka (kisel). Kazeinski gruš i kazeinati se dobijaju acidifikacijom obranog mleka dejstvom bakterija mlečne kiseline na $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ili upotrebom prehrambene hlorovodonične ili sumporne kiseline na $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Kazein se taloži pri $\text{pH} \approx 4,5$. Nakon toga, vrši se separacija kazeinskog gruša i kisele

kazeinske surutke, centrifugiranjem ili dekantiranjem. Tečnost dobijena nakon separacije kazeinskog gruša je kiselna kazeinska surutka koja se dalje može prerađivati.

Enzimski tretman mleka je tehnološki postupak u kome nastaju sir i sirna surutka (slatka). Sličan je za većinu sireva, sa malim modifikacijama vezanim za tvrdoću sira. Nakon toga, mleko se hladi na temperaturu 30,0 °C i zasejava starter kulturom (kultura bakterija mlečne kiseline) i enzimskom mešavinom-sirilom, koja sadrži enzime renin (himozin) i pepsin. U daljim procesima, nakon formiranja gruša kao supernatant se izdvaja surutka^{76,77,78}.

2.2.2. Sastav i svojstva surutke

Sastav i svojstva surutke zavise od kvaliteta mleka i tehnologije proizvodnje sira, tj. načina koagulacije proteina mleka pri proizvodnji sira⁷⁹. Prema prosečnom sastavu, surutka sadrži oko 93,0% vode, i u nju prelazi preko 50,0% suve materije mleka. Najveći deo surutke čini laktoza, dok manje od 1,0% čine proteini surutke⁸⁰. Količina mineralnih materija zavisi uglavnom od načina njenog dobijanja, a najveća variranja su u sastavu kalcijuma, fosfata, mlečne kiseline i laktata kojih u kiseljoj surutki ima više nego u slatkoj⁸¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Prosečan hemijski sastav slatke i kisele surutke (g/L)⁸¹

Sastojak	Slatka surutka	Kiselja surutka
Ukupna suva materija	63,0-70,0	63,0-70,0
Laktoza	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteini	6,0-10,0	6,0-8,0
Kalcijum	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfati	1,0-3,0	2,0-4,5
Laktati	2,0	6,4
Hloridi	1,1	1,1

Udeo proteina u kiseljoj i slatkoj surutki je veoma sličan, i upravo su oni ti koji surutku stavljaju u središte pažnje što se tiče tržišta mlečnih proizvoda. U tradicionalnoj proizvodnji sira, bez obzira na način koagulacije mleka, proteini surutke u celosti prelaze u surutku jer su neosetljivi na dejstvo kiselina i enzima⁷⁹, što nije slučaj kod surutke dobijene u proizvodnji sira iz ultrafiltriranog ili termički tretiranog mleka⁸¹. Proteine surutke čine različite termolabilne

frakcije kao što su α -laktalbumin, β -laktoglobulin, albumin krvnog seruma, imunoglobulini i termostabilne frakcije proteoza-peptona⁸. Slatka surutka osim proteina sadrži i glikomakropeptid (GMP) koji nastaje pri enzimskoj hidrolizi κ -kazeina⁸¹. Proteini surutke spadaju u nutritivno najvrednije proteine zahvaljujući svom sastavu koji karakteriše veliki udeo esencijalnih aminokiselina (najviše lizina, cisteina i metionina). Zbog ovakvog aminokiselinskog sastava, proteini surutke imaju mnogo veću biološku vrednost (ali i druge parametre hranjive vrednosti) u poređenju sa kazeinom i drugim proteinima animalnog porekla, uključujući i proteine jaja koji su dugo smatrani referentnim. Iskoristljivost proteina surutke u organizmu usko je povezana i sa odnosom cistein/metionin koji je kod proteina surutke oko 10 puta veći nego kod kazeina. Stoga ne čudi činjenica da se toplotno denaturisani proteini surutke gotovo potpuno (100%) resorbuju u probavnom sistemu, dok je taj procenat kod kazeina znatno manji i iznosi oko 75,0%⁸.

Pored proteina surutka sadrži i slobodne aminokiseline čiji udeo u surutki može biti veoma različit i najviše zavisi od stepena hidrolize kazeina pri proizvodnji sireva. Tako je udeo slobodnih aminokiselina u slatkoj surutki oko 4 puta veći u nego u kiseloj, u kojoj je udeo istih čak 10 puta veći nego u mleku⁷⁹ (Tabela 2).

Tabela 2. Udeo aminokiselina u slatkoj i kiseloj surutki (mg/L)⁷⁹

Surutka	Slobodne aminokiseline		U proteinima	
	Ukupne	Esencijalne	Ukupne	Esencijalne
Slatka	132,7	51,00	6,490	3,326
Kisela	450,0	356,0	5,590	2,849

Proteini surutke imaju odlična funkcionalna svojstva, poput dobre rastvorljivosti, viskoznosti, sposobnosti želiranja i emulgovanja, pa se njihovi koncentracije veoma često koriste u prehrambenoj industriji. Činjenica da su proteini surutke lakše svarljivi od kazeina, koristi se u proizvodnji hrane za bebe, kao i radi povećanja hranjive vrednosti ne samo mlečnih, nego i brojnih drugih prehrambenih proizvoda. Isto tako, potrebno je spomenuti i imunoglobuline i druge glikoproteine (laktoferin, transferin), kao i enzime (lizozim, laktoperoksidaza) surutke

koji su veoma bitni činioci imunoaktivnog potencijala surutke jer poseduju antimikrobna svojstva, a takođe mogu redukovati ili inhibirati alergijske reakcije⁸².

Najveći deo suve materije surutke čini laktoza (oko 70,0%) koja je vrlo važan energetski izvor koji doprinosi vrednosti surutke, a koja ima višestruku ulogu. Neki od blagotvornih efekata laktoze su podsticanje peristaltike creva, olakšavanje apsorpcije kalcijuma i fosfora, uspostavljanje blago kisele reakcije u crevima, čime se sprečava rast i razmnožavanje štetnih bakterija. Laktoza osigurava optimalni nivo magnezijuma, pa time poboljšava razgradnju mlečne masti i ostalih hranljivih sastojaka u ljudskom organizmu, a ne učestvuje u nastanku zubnog plaka. Termička obrada surutke prouzrokuje pretvaranje određenog procenta laktoze u laktulozu koja se ubraja u promotore rasta bifidobakterija⁸. Iz mleka u surutku prelaze i vitamini rastvorni u vodi, s tim da je njihov udeo veoma promenljiv i znatno zavisi od načina čuvanju surutke. Najznačajnije su količine riboflavina (B₂), kao i kobalamina i folne kiseline koji su uglavnom vezani za proteine surutke pa pri proizvodnji sira velikim delom prelaze u surutku. Zanimljivo je da surutka može da sadrži veće količine vitamina B₂ nego mleko, što je posledica metaboličke aktivnosti nekih bakterija mlečne kiseline pri proizvodnji sira. Zahvaljujući relativno velikoj količini riboflavina, surutka ima karakterističnu žuto-zelenu boju^{79,83}.

Sastav mineralnih materija u suvoj materiji surutke je najpromenljiviji (7,0-12,0%) i zavisi od tehnološkog postupka proizvodnje sira⁸³. U surutku prelaze skoro sve rastvorne soli i mikroelementi iz mleka, ali i soli dodate u proizvodnji sira. S tim u vezi, udeo kalcijuma i fosfora je mnogo veći u kiseloj surutki s obzirom na to da je pri većoj kiselosti medijuma veća i rastvorljivost ovih mineralnih materija⁷⁹.

2.2.3. Značaj i mogućnosti iskorišćavanja surutke

Mlečna industrija na globalnom nivou generiše veoma veliku količinu surutke po litri prerađenog mleka, u zavisnosti od primenjenog procesa i finalnog proizvoda. Oko 50,0% od ukupne količine svetske surutke se tretira i transformiše u različite prehrambene proizvode. Od ove količine oko 45,0% se koristi direktno u tečnom obliku, 30,0% u obliku surutke u prahu, 15,0% kao laktoza, a ostatak kao proteinski koncentrat⁸⁴.

Zbog svog nutritivno vrednog sastava surutka je veoma dobar supstrat za primenu u različitim biotehnološkim procesima kao što su proizvodnja mikrobne biomase i mikrobnih metabolita. Bez obzira na to, još uvek se svega polovina svetske surutke iskorišćava u prehrambenoj i industriji vrenja, dok se ostatak ispušta u vodotokove bez prethodne obrade^{85,86,87,88,89,90}. Ispuštanje surutke u vodotokove sa jedne strane predstavlja neoprostiv gubitak nutritivno vredne sirovine, a sa druge strane prouzrokuje velike ekološke probleme obzirom na visoke vrednosti HPK (hemijska potrošnja kiseonika) i BPK (biološka potrošnja kiseonika). HPK vrednost za kiselu surutku iznosi oko 75,0 kg/L dok za deproteinizovanu iznosi oko 57,0 kg/L, dok sadržaj organskog azota u kiseloj surutki iznosi oko 1,03 kg/L⁶.

Kako je BPK (35,0-40,0 g/L) za razgradnju 1,0 L surutke jednak BPK otpadne vode koju za 24,0 h načini jedna osoba, a budući da je količina surutke koju proizvodi jedna veća sirana oko 50 000 L/dan (što odgovara proizvodnji od oko šest tona sira dnevno), postrojenje za biološki tretman otpadne vode sirane prema veličini bi odgovaralo postrojenju za biološki tretman otpadne vode grada od 50 000 stanovnika. Problem je još složeniji i zbog toga što, za razliku od komunalnog otpada koji u vodotokove stiže kontinuirano, odlaganje surutke podrazumeva istakanje velikih količina odjednom, pa postrojenja za preradu mogu biti prekomerno opterećena usled čega postoji stalna opasnost od havarije⁵. Čak se ni primenom procesa prerade surutke ne uklanja rizik od zagađenja životne sredine. Prerada surutke proizvodnjom proteinskih koncentrata podrazumeva primenu procesa ultrafiltracije pri čemu kao filtrat nastaje permeat surutke. Permeat surutke sadrži skoro celu količinu laktoze i soli poreklom iz mleka što uslovljava i visoku vrednost HPK (hemijska potrošnja kiseonika) od oko 20,0-60,0 kg O₂/t. Usled ovako visoke vrednosti HPK odlaganje permeata surutke predstavlja veoma veliki problem obzirom da njegovo tretiranje u fabrikama za preradu otpadnih voda nije ekonomski isplativo a često ni moguće⁹¹. Odlaganje surutke kao otpada prouzrokuje niz problema po pitanju zagađenja životne sredine, obzirom da utiče na fizičku i hemijsku strukturu zemljišta, dovodi do smanjenja prinosa useva, a pri ispuštanju u vodotokove negativno utiče na vodeni svet iscrpljivanjem količine rastvorenog kiseonika. Biološki tretman otpadne surutke može da doprinese njenom bezbednijem odlaganju ali je ovaj način prerade otpadne surutke veoma skup⁷⁹.

Da bi se rešio problem odlaganja surutke, za sada najbolja alternativa je iskorišćavanje surutke procesima prerade kojima može biti proizveden proizvod sa dodatom vrednošću, čime se u potpunosti ili delimično mogu umanjiti troškovi njenog odlaganja.

Mogućnost iskorišćavanja surutke i njenih komponenata kao funkcionalnih ili nutritivnih suplemenata u prehrambenim proizvodima je veoma široka. Surutka kao i njeni konstituenti nalaze primenu u mlečnim, konditorskim, pekarskim, mesnim/ribljim proizvodima kao i u infant formulama, dijetetskim proizvodima, farmaceuticima i nutraceuticima. Laktoza kao najzastupljeniji sastojak surutke doprinosi boji i ukusu konditorskih i pekarskih proizvoda. Surutka i sastojci surutke doprinose ukusu, aromi, boji, teksturi a u nekim slučajevima trajnosti pekarskih proizvoda. Primena demineralizovane surutke je preporučljiva zbog njenog blagog ukusa koji je neophodan za primenu u proizvodnji mlečnih i ostalih proizvoda. Frakcionalizacijom surutke se dobijaju proteinski koncentri, bogati funkcionalnim sastojcima, čija je primena naročito značajna u pekarskoj, mesnoj i ribljoj industriji. Termolabilnost kao važno funkcionalno svojstvo proteina surutke doprinosi strukturi mnogih prehrambenih proizvoda tokom procesa zagrevanja. Surutke iz koje je uklonjena laktoza nalazi primenu u infant formulama, dok izdvojena laktoza, sa druge strane, nalazi veliku primenu u farmaceuticima. Nutritivno vredni proteini surutke kao i prisustvo različitih faktora rasta čine surutku važnom sirovinom za proizvodnju hrane za odrasle. Visokonutritivi izolati surutke koji se hromatografski mogu izdvojiti nalaze primenu kao bioaktivna jedinjenja (obično su to prebiotici) koja utiču na aktivnost probiotskih bakterijskih kultura kojima se proizvodi zdrava hrana u koju spadaju razne vrste jogurta^{72,92}.

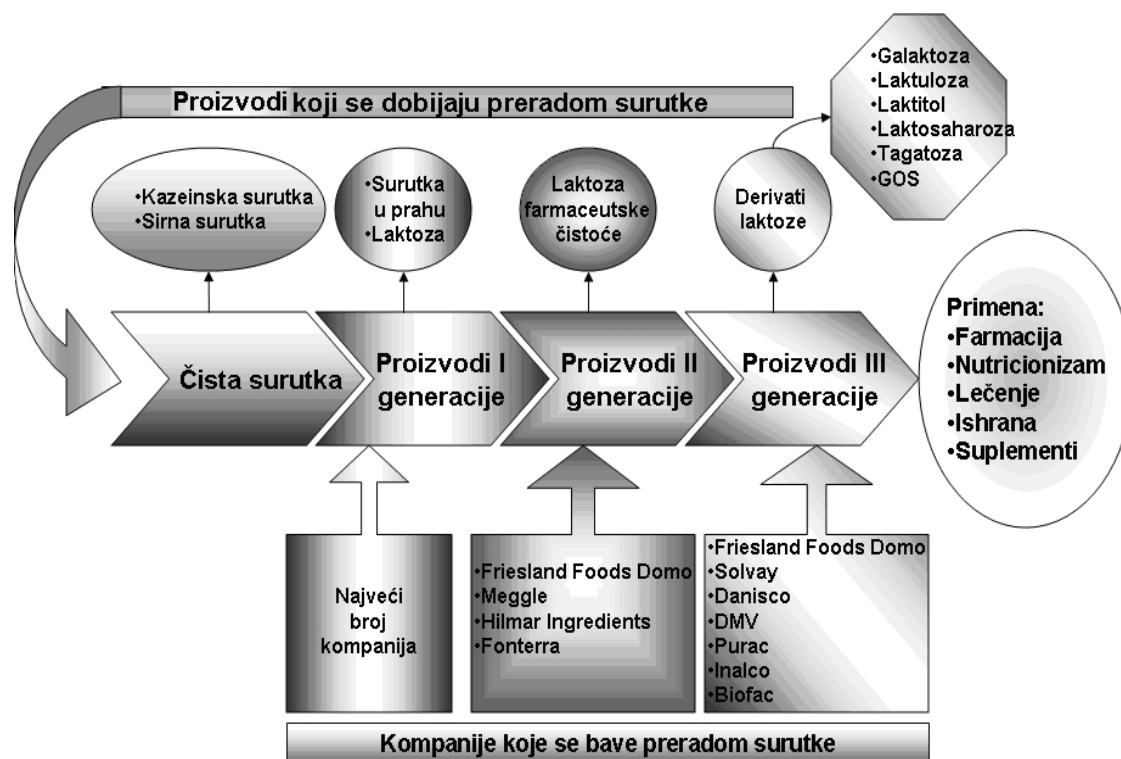
Do sada je veliki broj studija analizirao različite načine za iskorišćavanje surutke bazirane na primeni laktoze, proteina, vitamina rastvornih u vodi, minerala sa ciljem da se proizvede koristan proizvod od industrijskog značaja. Svi ovi načini iskorišćavanja surutke podrazumevaju prethodnu preradu surutke kroz procese koji mogu biti veoma skupi, što opet celu priču vraća na kolosek već ustaljenog neiskorišćavanja surutke. Međutim, ohrabrujuća je činjenica da je iskorišćavanje surutke u velikim količinama i na jeftin način moguće primenom procesa fermentacije laktoze bakterijama mlečne kiseline. Među brojnim procesima koji se mogu primeniti za valorizaciju surutke, biološka konverzija laktoze u mlečnu kiselinu

primenom odgovarajućih vrsti roda *Lactobacillus* ima dvostruku prednost. Jednim procesom se rešava problem zagađenja i u isto vreme proizvodi komercijalni proizvod⁹³.

2.2.4. Stanje i perspektiva iskorišćavanja surutke

Uzimajući u obzir predviđanja vezana za proizvodnju sira projektovana do kraja 2019. godine, proizvodnja surutke će beležiti stalni rast od oko 2,0% godišnje⁴. Obzirom na stalni porast proizvodnje i činjenicu da je surutka prepoznata kao sirovina sa velikim potencijalom, sve je veći broj istraživanja usmeren na njeno maksimalno iskorišćavanje. Osnovni cilj kome se poslednjih godina teži jeste proizvodnja visokovrednih proizvoda kao što su mlečna kiselina, etanol, mikrobni proteini, β -D-galaktozidaza, vitamini, kao i proizvodnja unapređenih prehrambenih proizvoda na bazi surutke^{79, 80, 81, 82, 83, 90}. Ovi procesi uglavnom se baziraju na iskorišćavanju laktoze, dominantnog šećera u surutki.

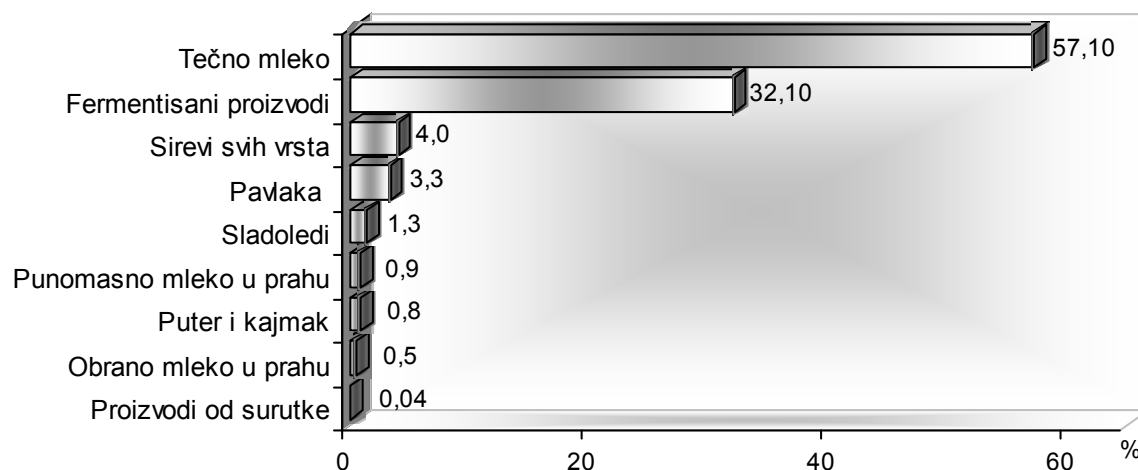
Veliki zahtevi u pogledu tehnološke opreme i kreiranja prihvatljivih tehnoloških rešenja čine ove procese i dalje veoma skupim za realizaciju, pa se većina fabrika ograničava samo na prvu generaciju proizvoda izvedenih iz laktoze³ (Slika 2). Usled toga svetska prerada surutke bazirana je uglavnom na njenom iskorišćavanju u proizvodnji proizvoda koji ne zahtevaju skupe tehnološke procese.



Slika 2. Razvoj procesa proizvodnje i iskorišćavanja surutke

Jedan od novijih pravaca u iskorišćavanju surutke je i proizvodnja zaštitnog sloja na bazi proteina surutke koji bi se koristio za pakovanje prehrambenih proizvoda tj. zamenjivao delove ambalaže koji se teško recikliraju. Takozvana „folija“ od proteina surutke, koja bi mogla da se koristi kao sloj prehrambene ambalaže, intenzivno se ispituje u nemačkom istraživačkom centru TTZ u Bremerhafenu⁹⁴.

Trenutno stanje na srpskom tržištu je takvo da su proizvodnja i izvoz surutke neznatni. Godišnje se iz Srbije izveze surutke u vrednosti od nekoliko desetina hiljada dolara, dok je uvoz značajniji i kreće se od 1,9 do 4,7 miliona dolara. Najviše se uvozi iz Hrvatske, Belgije, Holandije, Mađarske i Holandije⁹⁵. Srbija je zemlja u kojoj je struktura mlečne proizvodnje takva da skoro 90,0% proizvoda proizvedenih svake godine spadaju u grupu fermentisanih proizvoda i tečnog mleka⁹⁶ (Slika 3).



Slika 3. Zastupljenost proizvoda na tržištu mlečnih proizvoda u Srbiji

Nije teško uočiti da je proizvodnja i prerada mleka u Srbiji uglavnom usmerena na proizvode koji ne zahtevaju puno vremena, za koje tehnološki procesi proizvodnje nisu složeni i dugotrajni. Takvi proizvodi imaju kratko vreme trajanja, ali se najviše koriste na tržištu⁹⁶. Količina proizvoda od surutke je zanemarljivo mala u odnosu na fermentisane proizvode, što navodi na zaključak da bi se fermentacijom surutke mogli dobiti proizvodi koji bi zauzeli značajnije mesto u paleti mlečnih proizvoda namenjenih širokoj potrošnji. Obzirom na trenutno nepostojanje postrojenja za preradu surutke, podsticanje prerade surutke u Srbiji uštedelo bi ogroman novac koji se trenutno usmerava na njen uvoz. U pogledu perspektive iskorišćavanja surutke kao sirovine i u skladu sa postojećim stanjem opreme u Srbiji, osnovni cilj bi trebalo da bude podsticanje iskorišćenja surutke u prehrambenoj industriji.

2.3. Proizvodnja fermentisanih napitaka na bazi surutke

2.3.1. Priprema sirovine

Proizvodnja fermentisanih napitaka na bazi surutke nosi sa sobom određene poteškoće koje ponekad nije lako prevazići. Kao prvo, visok udeo vode zajedno sa njenim sastavom čine surutku veoma pogodnom podlogom za rast i razmnožavanje mikroorganizama, zbog čega je neophodna njena termička obrada. S druge strane, proteini surutke su termolabilni i počinju da

se denaturišu već pri temperaturi od 60,0 °C⁹⁷ pa se pri uobičajenoj termičkoj obradi (72,0 °C/15-20 s) deo prisutnih proteina taloži što u velikoj meri komplikuje proces njene termičke obrade. Stoga se nastoji da se termički tretman na visokim temperaturama zameni membranskim procesima (npr. mikrofiltracijom), primenom ultrazvuka ili nekim drugim postupcima. Upotrebom ultrazvuka može se povećati rastvorljivost proteina surutke⁹⁸ pa bi se tako mogla smanjiti količina taloga nastalog tokom čuvanja napitaka. Osim toga, zakiseljavanjem surutke na pH<3,9, proteini surutke postaju termostabilni pa se na taj način može sprečiti njihova koagulacija, čak i pri upotrebi UHT sterilizacije⁹⁹.

2.3.2. Formulisanje napitaka

Relativno visok udeo mineralnih materija u suvoj materiji surutke predstavlja još jedan problem u proizvodnji napitaka na bazi surutke, budući da su upravo mineralne materije odgovorne za nepoželjni slani ukus surutke. Taj problem posebno je izražen kod kisele surutke u kojoj je zbog povišenog udela mlečne kiseline prisutna veća količina rastvorenih mineralnih materija (posebno Ca-fosfata i Ca-laktata) što u proizvodnji napitaka na bazi surutke prouzrokuje grudičavost i povećanu kiselost konačnog proizvoda, kao i nastanak veće količine taloga pri termičkoj obradi⁸². Rešavanje ovih problema svodi se na obogaćivanje surutke raznim dodacima koji bi maskirali nepoželjna senzorna svojstva napitaka na bazi surutke. Međutim, osnovni nedostatak koji se javlja kod većine ovih receptura baziranih na obogaćivanju surutke (pogotovo kod onih s dodatkom voća poput jabuke, kruške i banane) jeste učestala pojava taloženja usled visokog udela suve materije nastalog interakcijom proteina surutke i sastojaka u suvoj materiji dodatka. Količina taloga se tokom dužeg skladištenja tj. stajanja proizvoda još više povećava, te zbog toga na kraju ovi proizvodi loše prolaze na tržištu. S druge strane, konačni proizvod nema dovoljno dobra ostala senzorna svojstva ukoliko je udeo suve materije voćne ili neke druge komponente prenizak¹⁰⁰. Stoga se veoma velikim izazovom pokazalo pronalaženje optimalne mešavine voćnog koncentrata ili drugih dodataka i surutke koja će imati za potrošača prihvatljiva senzorna svojstva. U tu svrhu sprovedena su brojna istraživanja iz kojih je proizašla čitava paleta mogućih rešenja kako bi se na kraju kao

proizvod dobio napitak sa što manje nedostataka. Tako se za postizanje prijatnog ukusa i mirisa predlaže dodatak metalnih glukonata⁸.

Kako surutka ima upola manje suve materije (6,0-7,0%) od mleka, tako se njenom fermentacijom dobijaju napici koji imaju slabiju punoću ukusa od fermentisanih mleka. Taj problem je moguće rešiti upotrebom probiotskih kultura koje proizvode egzopolisaharide ili dodatakom hidrokoloida. Hidrokoloide dodati u relativno malim količinama povećavaju viskoznost proizvoda i sprečavaju pojavu taloženja, a izbor pogodne vrste i udela ovih dodatka ključan je činilac za proizvodnju fermentisanih napitaka. Naime, veoma je bitno da dodati hidrokoloide ne prekrivaju željenu aromu proizvoda, kao i da su delotvorni pri pH vrednostima između 4,0 i 4,6 karakterističnim za ovu grupu proizvoda. Pogodnim za upotrebu u proizvodnji fermentisanih napitaka na bazi surutke pokazali su se karboksimetil celuloza, pektin, alginati i ksantan guma, čiji dodatak značajno poboljšava punoću ukusa konačnog proizvoda¹⁰¹.

2.3.2.1. Šećeri i zaslađivači

Kvalitet života današnjeg čoveka veoma zavisi od čula ukusa. Ukus je zapravo finalni test koji ljudi koriste za nesvesno ispitivanje kvaliteta hrane koju konzumiraju. Konačnu odluku o kvalitetu hrane ljudi donose na osnovu osećaja zadovoljstva ili nezadovoljstva koje osećaju pri njenom konzumiranju. Brojna istraživanja pokazuju da je ukus slatkog urođeno poželjna senzacija kod odojčadi koja ovaj ukus favorizuju u odnosu na ostale ukuse (slano, gorko, kiselo i ljuto) koje karakterišu kao neprimamljive. Ovakav urođeni način prepoznavanja slatkog ukusa je zapravo i potvrda zašto slatke namirnice spadaju u najomiljenije.

Šećeri i zaslađivači su komponente koje se dodaju pri formulisanju napitka, neposredno pre procesa fermentacije ili tokom procesa konzervisanja voća ili voćnih sokova koji bi kasnije bili uključeni u formulaciju. Pri formulisanju ove vrste napitaka najčešće korišćeni šećer je saharoza koja obezbeđuje čist sladak ukus bez propratnih neželjenih aroma i mirisa. Saharozu može biti korišćena u obliku praha, granula, kristala ili u obliku sirupa (67,0 w/w). Primena preko 5,0% saharoze u formulaciji sa 16,0-20,0% suve materije može dovesti do inhibicije starter kulture i nemogućnosti proizvodnje aromatičnih jedinjenja koja se prirodno proizvode tokom procesa fermentacije. Što se tiče veštačkih zaslađivača u dijetetskim napicima u

najkorišćenije spadaju Aspartam i Nutrasweet. Ovi zaslađivači imaju dugotrajan prateći ukus u ustima usled čega nisu baš omiljeni kod potrošača. Osim ovih u novije vreme se koriste i Actilight, Acesulfam-k, Natren, Neohesperidin, Taumatín, i to pojedinačno ili u kombinaciji. Izbor zaslađivača u svakom slučaju zavisi od dostupnosti, cene i zakonskog statusa njegove primene^{102,103,104,105}.

2.3.2.2. Stabilizatori - Ugušćivači

Stabilizatori se pri proizvodnji prehrambenih proizvoda koriste u različite svrhe, uključujući ugušćivanje i povećanje stabilnosti proizvoda, a veoma često i u cilju poboljšanja ukusa^{106,107}. Stabilizatori mogu biti prirodni, modifikovani ili sintetički. Izbor stabilizatora ili kombinacije stabilizatora koji se koriste u prehrambenim proizvodima u velikoj meri zavisi od nekoliko faktora: funkcionalnih karakteristika stabilizatora, namene proizvoda, interakcije stabilizatora sa drugim sastojcima hrane kao i pravne regulative vezane za primenu stabilizatora. U jogurt stabilizatori se dodaju iz dva osnovna razloga: za zgušnjavanje ili želiranje i stabilizaciju jogurnog matriksa^{108,109}. Za postizanje ovih rezultata u najčešće korišćene stabilizatore spadaju želatin, karboksimetilceluloza i visoko metilovani pektin.

Želatin je prirodni stabilizator izveden iz kolagena obično poreklom iz svinjske kože, goveđe kože ili goveđih kostiju. Na čvrstinu gelova dobijenih primenom želatina može uticati nekoliko faktora i to pH, temperatura, vreme, stajanje i interakcije sa drugim sastojcima. Slično, ovi faktori mogu da utiču i na druge karakteristike želatinskog gela pa tako tačka topljenja, na primer, može biti izmenjena promenom koncentracije gela, dužinom stajanja, kao i usled prisustva drugih sastojaka^{106,107}. Isto tako, na viskoznost gela mogu uticati pH i koncentracija gela a posebno temperatura. Ovi uticaji na tačku topljenja i viskozitet mogu da utiču na osećaj u ustima i druge senzorne karakteristike.

Pektini, iako se obično povezuju za voćne žele i slatkiše, takođe mogu biti korišćeni u proizvodnji jogurta. Ova vrsta stabilizatora je izvedena iz kore citrusa i komine jabuke^{106,107}. Pektin je ne-adsorbujući polimer kada je u rastvoru sa kazeinskim micelama pri pH 6,7. Adsorpcija pektina na kazeinske micelle je višeslojna i odvija se pri $\text{pH} \leq 5,0$ ¹¹⁰. Mehanizam stabilizacije pomoću pektina podrazumeva distribuciju naelektrisanja duž lanca pektina.

Adsorpcija pektinskog lanca na micelarnu površinu se odvija na naelektrisanim delovima, dok su nanaelektrisani delovi u obliku entropijski bogatih petlji koje se prostiru u rastvor. Sterna odbojnost izazvana prisustvom ovih petlji održava pektinom obložene kazeinske micelle stabilnim na niskim pH vrednostima^{111,112}. Međutim, u stabilnom sistemu, ne adsorbuje se sav pektin na kazeinske micelle. Stoga, slab gel ili mrežna struktura koja se sastoji od neadsorbiranog pektina u serumu i pektinom obloženih kazeinskih micela promoviše dugoročnu stabilnost fermentisanih mleka¹¹³.

Koncentrat proteina surutke (KPS) se koristi za poboljšanje fizičkih osobina i nutritivne vrednosti fermentisanih mlečnih proizvoda¹¹⁴. Poboljšanje fizičkih karakteristika ove vrste napitaka dodatkom KPS je do sada veoma ispitivano. Obogaćivanje uzoraka rekonstituisanog obranog mleka (6,0% suve materije) sa KPS u količini od 0,5 do 3,0% pre procesa termičke obrade, dovodi do povećanja koeficijenta konzistencije, tiksotropije i smanjenja veličine čestica u uzorcima. Kazein se smatra neophodnim za formiranje strukture a proteini surutke samo podržavaju njeno formiranje. Do nivoa od 2,0% KPS uticaj na strukturu se može pripisati više kazein-proteini surutke interakcijama i proteini surutke-proteini surutke interakcijama. Međutim, iznad ovog nivoa, proteini surutke slabe strukturu usled smanjenja odnosa kazein-proteini surutke i povećanja agregacije denaturisanih proteina surutke sa kazeinom i međusobno¹¹⁵. Napici obogaćeni proteinima mleka ili kazeinom su grublje strukture i manje privlačni od napitaka obogaćenih proteinima surutke. Radi postizanja što boljih senzornih karakteristika preporuka je koristiti proteine surutke u kombinaciji sa ostalim stabilizatorima.

2.3.2.3. Voće i voćni sokovi

Voće se oduvek koristi za poboljšanje ukusa različitih mlečnih proizvoda. Međutim, zbog prisustva fitohemikalija u većini voćnih plodova, njegov angažman je uvećan u smislu postizanja tzv. "wellness" efekta velikog broja proizvoda koji ga sadrže. Voćni plodovi su bogat izvor raznih važnih fito sastojaka kao što su vitamini, mineralne materije, antioksidansi i prehrambena vlakna. Ugrađivanje voća u mlečne proizvode ne samo da pomaže u "uvećanju vrednosti" i "uvećanju raznovrsnosti" proizvoda, već takođe pomaže u umanjeњу gubitaka nakon berbe.

Spajanje mlečnih proizvoda i voćnih sokova formulisanjem tzv. "juicecenticals" voćnih jogurta, koji su tipični primeri hibridnih mlečnih proizvoda, nudi odličan zdravstveni efekat, ukus i praktičnost takvih proizvoda.

Tipični primeri vezani za uključivanje voća u mlečne proizvode su sladoled i zamrznuti deserti, voćni jogurti, razni namazi itd. Postoji veliki broj receptura koje su do sada razvijene na principu kombinacije mlečnih proizvoda i voća ili voćnih sokova^{116,117}.

Visoko prihvatljiv napitak je i mango *burfi* koji se priprema od bivoljeg mleka uz dodatak 15,0% mango pulpe (m/v), 5,0% šećera (v/v) i 0,15% kurkuma praha (v/v)¹¹⁸. Korišćenje mango pulpe pomaže u postizanju željene boje *burfi*-ja, čime se izbegava dodavanje sintetičkih boja.

Voćni jogurt od maline prihvatljivog kvaliteta dobija se mešanjem koncentrata malina (64,0 °Briksa) u količini od 10,0% sa 0,5% pektina, posle inkubacije¹¹⁹.

Nedavno, dolazi do rasta trenda obogaćivanja fermentisanih mlečnih proizvoda sa voćem i voćnim sokovima. Dodatak voća, voćnih aroma i voćnih koncentrata poboljšava punoću ukusa, teksturu, boju i proširuje paletu fermentisanih mleka. Prerađeno voće se sve češće primenjuje kao dodatak fermentisanih mleka u oblicima kao što su voćne kaše, voćni komadići, voćni sirupi/sokovi, gnječeno voće, smrznuto voće¹²⁰, itd. Količina voća koje se dodaje se kreće u rasponu od 4,0 do 20,0% u zavisnosti od vrste voća i njegove koncentracije. Mango pulpa i sok od ananasa mogu da se koriste na zadovoljavajuć način u količinama do 20,0% pri pripremi voćnih jogurta¹²¹.

U literaturi postoji veliki broj formulacije za tečne proizvode na bazi surutke, proteina surutke ili čak permeata surutke. Jedna od najranijih referenci vezanih za voćne sokove pojavljuje se još 1976. godine, kada istraživač Bangert¹²² predlaže koncentrisani sok od narandže sa dodatkom limunske kiseline kao acidulanta. Od tada, napici sa narandžom i limunom predstavljaju najčešće formulisane napitke^{123,124,125}. Međutim, i niz drugih vrsti voća se takođe veoma uspešno primenjuje u formulacijama, i to tropsko voće (grejpfrut ili mandarina, banana, mango, papaja¹²⁶) i voća kao što su jabuke, kruške, trešnje, dinje ili kajsije¹²⁷. Bobičasto voće (grožđe, borovnica, jagoda, malina, kupina ili dud) takođe spada u

posebno zdrave dodatke napicima, pa tako npr. napitak na bazi surutke sa dodatkom jagode predstavlja napitak bogat gvožđem koji utiče na vrednost hemoglobina¹²⁸.

2.3.3. Fermentacija surutke

Tradicionalni funkcionalni i probiotski napici podrazumevaju mleko kao osnovnu sirovinu u proizvodnji. Usled sve veće nestašice hrane, u koju se takođe ubraja i mleko, u poslednje vreme se sve više aktuelizuje proizvodnja funkcionalnih i probiotskih napitaka na bazi surutke kao primarne sirovine. Glavni nosioci procesa proizvodnje funkcionalnih napitaka na bazi surutke su, pored same sirovine, bakterije mlečne kiseline (BMK).

Kao industrijski proizvodni mikroorganizmi najčešće se koriste vrste roda *Lactobacillus* od kojih većina spada u probiotike zbog svog povoljnog dejstva na zdravlje ljudi i životinja, a sposobne su i za stereospecifičnu proizvodnju mlečne kiseline¹²⁹. U prirodi naseljavaju staništa bogata aminokiselinama, peptidima, nukleotidima, masnim kiselinama, vitaminima B grupe, mineralima i drugim neophodnim faktorima rasta, kao što je na primer digestivni trakt ljudi i životinja. Ove bakterije uglavnom koriste dosta složene medijume za rast jer ne mogu same da sintetišu sve potrebne nutrijente⁷. U industrijskim uslovima je najčešće neophodno obogaćivanje medijuma izvorima azota i vitaminima za postizanje visokih prinosa, što se odražava na ukupne troškove proizvodnje¹²⁹.

2.3.3.1. Jogurtne starter kulture

Ispitivanjem mikroflore tradicionalnog jogurta koji se prvo počeo proizvoditi na Bliskom Istoku, utvrđeno je da su dominantne bakterijske vrste Gram-pozitivni štapići i koke. Iako se nomenklatura ovih vrsti tokom godina menjala generalno je usvojeno da u bakterije neophodne za proizvodnju jogurta spadaju *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*¹³⁰. Ove dve vrste bakterija sinergistički rastu u mleku, povećavajući njegovu kiselost produkcijom mlečne kiseline, koagulišu proteine mleka i proizvode specifična jedinjenja koja doprinose aromi jogurta. U nekim zemljama, postoji zakonska obaveza da *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bude primenjen kao kultura za svaki mlečni proizvod označen kao "jogurt", jer tipičan ukus jogurta zavisi isključivo od prisustva *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus. Međutim, u drugim zemljama, kao što je npr. slučaj sa Australijom, dozvoljena je primena i drugih termofilnih bakterija mlečne kiseline, kao što su *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus jugurti*. Prema zakonodavstvu u oblasti prehrambene industrije nekih zemalja, primenjene bakterije u proizvodu moraju biti prisutne u velikom broju, i takođe da taj broj bude stabilan tokom procesa skladištenja proizvoda. U literaturi, starter kulture su definisane kao preparati jednog ili više sojeva jedne ili više mikrobioloških vrsta¹³¹. Mlečni starteri su najbitnija komponenta u proizvodnji visokokvalitetnih fermentisanih mleka. Mlečne kulture su bezopasni, bezbedni, aktivni mikroorganizmi koji pružaju poželjan i predvidljiv ukus i teksturu fermentisanih mlečnih proizvoda. U zavisnosti od koncentracije, oni se dodaju direktno ili više puta umnožavaju pre upotrebe.

Istorijski gledano, starter kultura je jednostavno uzorak fermentisane hrane. Ovi tipovi startera se nazivaju zanatske ili nedefinisane kulture. Oni sadrže istorijski testirane mešavine starter kultura. Često stvarni identitet mikroorganizama prisutnih u mešovitoj kulturi nije poznat, a pojedinačne vrste nije lako okarakterisati ni mikrobiološki ni biohemijski. Procenat različitih mikroorganizama u mešovitoj kulturi varira od proizvoda do proizvoda. Stoga je glavna mana zanatskih kultura da daju nedosledan kvalitet proizvoda. Pored toga, dužina fermentacije može da varira iz dana u dan, što veoma utiče na dinamiku proizvodnje. Usled toga, velikim proizvodnim pogonima gde je precizna dinamika i dosledan kvalitet proizvoda od suštinskog značaja, zanatski starteri se ne mogu koristiti. Umesto njih, definisane kulture su postale dominantne¹³². Definisane kulture sadrže fiziološki, biohemijski i genetički okarakterisane sojeve, koji se koriste pojedinačno ili kao mešavina. Većina tih sojeva je izolovana iz divljih ili zanatskih kultura. Oni su okarakterisani i zatim selektovani na osnovu poželjnih osobina. Otuda ove kulture daju konstantan kvalitet, i fleksibilnost po pitanju modifikacije proizvodnje prema zahtevima, npr. visoke produktivnosti tj. kvaliteta i bezbednosti¹³³.

Streptococcus thermophilus je jedini mlečni starter iz roda *Streptococcus*, preferira disaharide laktozu i saharozu, dok je rast na konstitutivnim monosaharidima, glukozi, fruktozi i galaktozi znatno sporiji od rasta na disaharidima¹³⁴. *S. thermophilus* ima ograničenu proteolitičku aktivnost i zahteva dodatne slobodne aminokiseline za svoj rast. To su glutaminska kiselina, histidin, cistein, metionin, valin, leucin, izoleucin, triptofan, arginin i tirozin. Međutim,

slobodne aminokiseline prirodno prisutne u mleku nisu dovoljne za postizanje zadovoljavajuće aktivnosti ovog mikroorganizma. Slobodne aminokiseline se obezbeđuju pri procesu termičke obrade mleka, ili se apsorbuju iz peptida kratkog lanca koji nastaju razgradnjom proteina mleka pomoću *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*¹³⁵.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* pripada vrsti *L. delbrueckii*, sposoban je da fermentiše laktozu i poseduje enzim β -galaktozidazu¹³⁶. Proteolitički sistem laktobacila se sastoji od proteinaza i peptidaza koji se u ćelijama nalaze na različitim lokacijama. Proteinaze se uglavnom nalaze u ćelijskom zidu, i njihova aktivnost je regulisana temperaturom i fazom rasta. Visoka proteolitička aktivnost je važna u proizvodnji jogurta, jer peptidi koji se oslobađaju dejstvom *L. bulgaricus*, stimulišu rast *S. thermophilus*. Iako je aktivnost proteinaza veoma visoka, aktivnost peptidaza je ograničena i oslanja se na metabolizam peptida kao izvora slobodnih aminokiselina od strane *S. thermophilus*¹³⁰.

Hiljadama godina ove dve bakterije su se koristile radi združene fermentacije mleka. Postoje važni razlozi za ovu sinergističku vezu na osnovu metaboličke kompatibilnosti između dve vrste. Studije su pokazale da kombinovana kultura bakterija proizvodi mnogo veću kiselost nego izolovani sojevi. Dok kombinovana kultura proizvodi kiselost > 10,0 g/L u roku od 4,0 h, vrednosti koje se dobijaju primenom pojedinačnih sojeva su 4,0 g/L i 2,0 g/L za *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, respektivno¹³⁰. *S. thermophilus* raste brže nego *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, barem u početku procesa fermentacije, i već tada proizvodi značajnu količinu mlečne kiseline. *S. thermophilus* tokom rasta oslobađa CO₂ razgradnjom uree i mravlje kiseline, koristi kiseonik u medijumu, čime obezbeđuje povoljan oksidoredukcionni potencijal za *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Povećana kiselost (pH oko 5,4), CO₂ i mravlja kiselina stimulišu rast laktobacila koji su tolerantniji na kisele uslove od *S. thermophilus*. Međutim rast *S. thermophilus* zavisi takođe od metaboličkog učinka *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* koji ima izraženu proteolitičku aktivnost. On oslobađa ekstracelularne proteinaze koje hidrolizuju kazein i druge mlečne proteine i proizvodi esencijalne aminokiseline, posebno valin, neophodne za rast *S. thermophilus*, koji ima slabu proteolitičku aktivnost. Temperatura 42,0 °C je optimalna temperatura sinergističkog rasta ove dve bakterije. Optimalna temperatura rasta *S. thermophilus* je 37,0 °C, dok je optimalna temperatura rasta *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 45,0 °C. Kada se temperatura

inkubacije povećá iznad 42,0 °C, favorizovan je rast laktobacila, dok temperature ispod 42,0 °C dovode do povećanog rasta streptokoka. Promene temperature fermentacije dovode do promene odnosa streptokoka i laktobacila. Optimum za postizanje odgovarajućih senzornih karakteristika jogurta je da ove dve kulture budu u odnosu 1 : 1¹³⁷.

Starter kultura takođe poboljšava hranljivu vrednost i svarljivost jogurta kao probiotika. Iako se zna da *S. thermophilus* ne kolonizuje intestinalni trakt, konzumiranje živih ćelija može poboljšati varenje laktoze kod laktoza-netolerantnih ljudi. Takođe je pokazano da takvi pojedinci tolerišu jogurt bolje od ostalih mlečnih proizvoda koji sadrže istu količinu laktoze. Jedno objašnjenje za ovu pojavu je da žive ćelije *S. thermophilus* opstaju u želucu i bivaju lizirane tek u gastrointestinalnom traktu. Tek tada se intracelularna β -galaktozidaza oslobađa i hidrolizuje laktozu, koja u tom slučaju ne dospeva do debelog creva i simptomi netolerancije na laktozu se ne javljaju¹³⁸.

2.3.3.2. Probiotske starter kulture

Probiotici su mikroorganizmi prevashodno izolovani iz gastrointestinalnog trakta čoveka. Među najpoznatije spadaju vrste *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, neke *Bacillus* vrste, kao i kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces boulardii*^{139,140,141,142}.

Interes za probioticima je u poslednjih nekoliko godina znatno porastao, posebno u pogledu dodavanja vrsti *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri* u fermentisane mlečne proizvode kao što je jogurt. *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* su bakterije koje sporo rastu u mleku jer nemaju značajnu proteolitičku aktivnost i iz tog razloga obično se kombinuju sa vrstom *Streptococcus thermophilus*¹⁴³. Probiotski mlečni proizvodi osim probiotskih moraju da imaju i poželjna senzorna svojstva. Za postizanje optimalnih senzornih svojstava obično se koristi mešavina različitih bakterija. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ima široku primenu u tim kombinacijama zbog formiranja i proizvodnje aromatičnih jedinjenja. Jedna od optimalnih kombinacija probiotskih bakterija je kultura pod nazivom ABT koja sadrži kombinaciju *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* i *S. thermophilus*. ABY kulture sadrže istu kombinaciju

mikroorganizama kao i ABT kulture, uz dodatak soja *L. bulgaricus*, i ove dve kulture se uspešno primenjuju u proizvodnji jogurta^{144,143,140}.

L. acidophilus je Gram pozitivna, anaerobna ili fakultativno anaerobna, nepokretna, katalaza (-), štapicaasta bakterija. To je homofermentativna bakterija koja ima optimalan rast na 35,0-38,0 °C i pH intervalu od 5,5-6,0¹⁴⁵. Prvi put je izolovan iz dečije stolice od strane Ernst Moroa 1900. godine, da bi 1970. godine bio zvanično priznat kao *L. acidophilus* od strane Hansena i Mockuata. Ovaj termin označava bakterije mlečne kiseline koje mogu rasti u kiseloj sredini^{146,147}. *L. acidophilus* ima antimikrobnu aktivnost zbog formiranja organskih kiselina (mlečna kiselina, sircetna kiselina, itd), H₂O₂ i bakteriocina (Lactocidin, Acidophilin, Acidolin, Lactocin B). Kao rezultat dejstva *L. acidophilus*, crevne infekcije i bolesti mogu se staviti pod kontrolu i negativni efekti antibiotskih tretmana mogu biti eliminisani. *L. acidophilus* je otporan na žučne kiseline i ima jak antibiotski efekat na *E. coli* i druge crevne patogene¹⁴⁸.

Upotreba vrsta roda *Bifidobacterium* u fermentisanim mlečnim proizvodima kao i sve bolje poznavanje njihove taksonomije i ekologije rezultiralo je povećanjem njihove popularnosti u kasnim 1970-im godinama prošlog veka. One postaju sve popularnije obzirom na formiranje niskog sadržaja mlečne kiseline tokom procesa skladištenja i veće produkcije L (+) mlečne kiseline u odnosu na D (-) mlečnu kiselinu. Među mnogim probiotskim osobinama koje su pripisane bifidobakterijama spadaju i indukcija proizvodnje imunoglobulina, poboljšanje hranljive vrednosti namirnica asimilacijom nutrijenata koji ne mogu biti metabolisani od strane domaćina, anti-kancerogena aktivnost i sposobnost sinteze folne kiseline¹⁴⁹. U okviru različitih probiotskih bakterija, *Bifidobacterium lactis* je intenzivno proučavan i njegov pozitivan uticaj na zdravlje domaćina je već veoma poznat. *B. lactis* je poželjna vrsta u industrijskoj proizvodnji zbog izraženije tolerancije na kiseonik i kisele uslove u poređenju sa drugim vrstama bifidobakterija^{150,151}.

L. casei spada u podgrupu *Streptobacteria* i ima prečnik manji od 1,5 μm, tendenciju da obrazuje lance, nema flagele, i predstavlja nepokretan fakultativno homofermentativan štapić. Ima temperaturni optimum rasta na 28,0-32,0 °C a može rasti i na 15,0 °C, izuzetno u nekim uslovima čak može pokazati rast i na 6,0-7,0 °C. *L. casei* koristi sorbitol i sorbat ali pokazuje nisku stopu fermentacijske aktivnosti na maltozi i saharozi. Za rast zahteva riboflavin, folnu

kiselinu, Ca-pantotenat i niacin. Ne formira gas i pokazuje jaku proteolitičku aktivnost nakon liziranja^{152,153}. *L. casei* se koristi kao pojedinačna kultura ili u smeši sa drugim kulturama radi poboljšanja senzornih svojstava u tradicionalnim mlečnim proizvodima kao što su kefir "ve Laban Zeer", sirevi Provolone i Parmezan, i noviji proizvodi kao što su Yakult, Actimel, GEFILUS i Vifit.

Zbog svojih svojstava, probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG ili *Lactobacillus* GG je najčešći mikroorganizam koji se koristi u mlečnim proizvodima namenjenim bebama i deci. *Lactobacillus rhamnosus* GG, je izolovan iz čovekove stolice 1983. godine i patentiran je 1985. To je jedan od najispitivanijih sojeva i jedna je od najčešće primenjivanih vrsta bakterija u pripremi probiotske hrane. Ima sufiks "GG" jer je otkriven u Univerzitetu Tufts od strane dva naučnika Shervood Gorbach i Barri Goldin. *Lactobacillus rhamnosus* GG je prvi put korišćen u studijama 1990. godine kada je i otkriven njegov pozitivan uticaj na zdravlje dece. Neke od glavnih osobina *Lactobacillus rhamnosus* GG su to što je poreklom iz ljudske intestinalne flore, otporan je na niske pH vrednosti i naseljava gastrointestinalni trakt¹⁵⁴.

2.3.3.3. Starteri producenti egzopolisaharida

U mnogim fermentisanim mlečnim proizvodima, bakterije mlečne kiseline se koriste za poboljšanje teksturalnih karakteristika fermentisanog prehrambenog proizvoda putem proizvodnje egzopolisaharida (EPS). EPS su polimerna jedinjenja koja se smatraju prirodnim ugušćivačima koji doprinose strukturi fermentisanih mlečnih proizvoda¹⁵⁵.

Do sada je oko 30 vrsta laktobacila okarakterisano kao izraziti producenti egzopolisaharida. Među njima, najpoznatiji su: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, itd. Oni uglavnom rastu na temperaturama između 30,0 i 37,0 °C u bogatim medijumima kao što su MRS bujon, mleko ili derivati mleka. Mnogi od ovih sojeva proizvode ekstracelularne polisaharide¹⁵⁶ koji daju lepljivu reološku strukturu fermentisanih proizvoda. Količina EPS-a koja se proizvodi primenom bakterija mlečne kiseline je relativno niska (40,0-800,0 mg/L) u poređenju sa količinom ksantan gume (10,0-25,0 g/L) proizvedenom npr. iz *Xs. campestris*¹⁵⁷. Postoji veliki broj sojeva koji su u stanju da proizvedu EPS i koji se komercijalno već koriste.

Lactobacillus fermentum proizvodi oko 100,0 mg/L EPS u MRS bujonu. Prečišćeni rastvor (1,0%, m/v) egzopolisaharida proizvedenog pomoću ovog soja pokazuje visoku viskoznost od 0,88 Pa x s pri brzini smicanja od 10 s^{-1} ¹⁵⁸.

Lactobacillus rhamnosus proizvodi od 931,0 do 1275,0 mg/L egzopolisaharida iz glukoznog ili laktoznog medijuma na temperaturama 32,0 ili 37,0 °C¹⁵⁹. Proizvedeni egzopolisaharid poseduje 72,0% glukozni ekvivalent i 1,1% sadržaj proteina. Pri najvećoj koncentraciji (oko 20,0 g/L), viskozitet rastvora ovog egzopolisaharida iznosi oko 17,7 mPa x s¹⁶⁰.

Streptococcus thermophilus proizvodi 20,0-100,0 mg/L egzopolisaharida u mlečnom medijumu. Egzopolisaharidi sintetizovani iz ovog soja su različitih molekulskih masa, u rasponu od 10 do više od 5000 kDa. Oni su sastavljeni od galaktoze i ramnoze u molskom odnosu 2,5:1¹⁶¹. Proizvedeni egzopolisaharid ispoljava 94,0% glukozni ekvivalent i sadržaj proteina oko 0,6%. Rastvor sa najvećom koncentracijom egzopolisaharida (20,0 g/L) ispoljava viskoznost od 13,14 mPa x s¹⁶⁰.

Bifidobakterije nakon 24 sata gajenja proizvode od 0,32 do 0,53 g/L¹⁶². *B. longum* BB-79 produkuje oko 0,47 g/L¹⁶³. EPS iz *B. infantis* sadrži 55,0% glukozni ekvivalent i 0,7% proteina, visoka koncentracija rastvora (20,0 g/L) ovog egzopolisaharida postiže viskoznost od 9,518 mPa x s¹⁶⁰.

Ova jedinjenja imaju veliki značaj jer mogu delovati kao prirodni ugušćivači koji poboljšavaju teksturu, smanjuju sineresis i nivo masti u kiselo-mlečnim proizvodima. U prehrambenoj industriji, EPS se najčešće koriste kao aditivi u hrani za njeno želiranje, stabilizovanje ili ugušćivanje. Danas postoji sve veći interes za mikrobnom proizvodnjom polisaharida¹⁶⁴.

Uvid u biološku funkciju EPS-a može ponuditi bolje razumevanje ovih jedinjenja pre dizajniranja fizioloških parametara koji vode ka većoj proizvodnji EPS-a. Štaviše, takve informacije bi omogućile da se pronađu optimalni parametri za povećanje njihove proizvodnje. Međutim, fiziološka funkcija EPS-a nije još uvek dovoljno jasna. Oni verovatno ne služe kao rezervni izvor energije i ugljenika, jer vrste bakterija koje ih proizvode uglavnom nisu sposobne

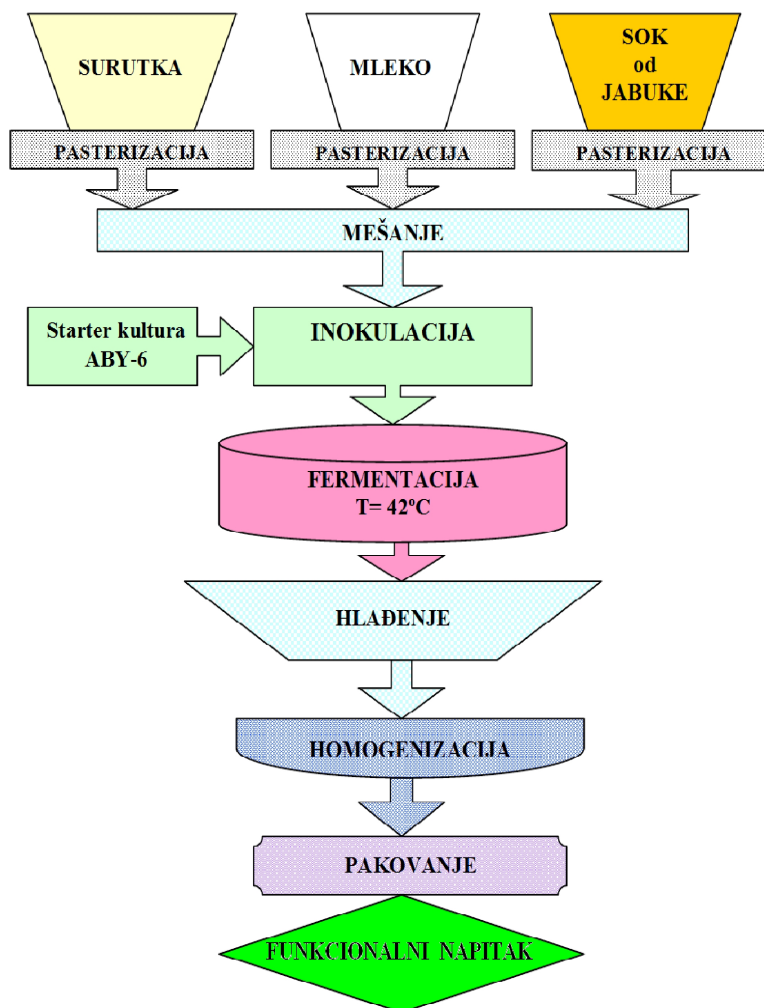
da razgrađuju sopstvene egzopolisaharide, dok različiti mikroorganizmi imaju sposobnost da metabolišu polisaharide drugih bakterija¹⁶⁵.

2.3.4. Proizvodnja fermentisanih napitaka na bazi surutke

2.3.4.1. Šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke

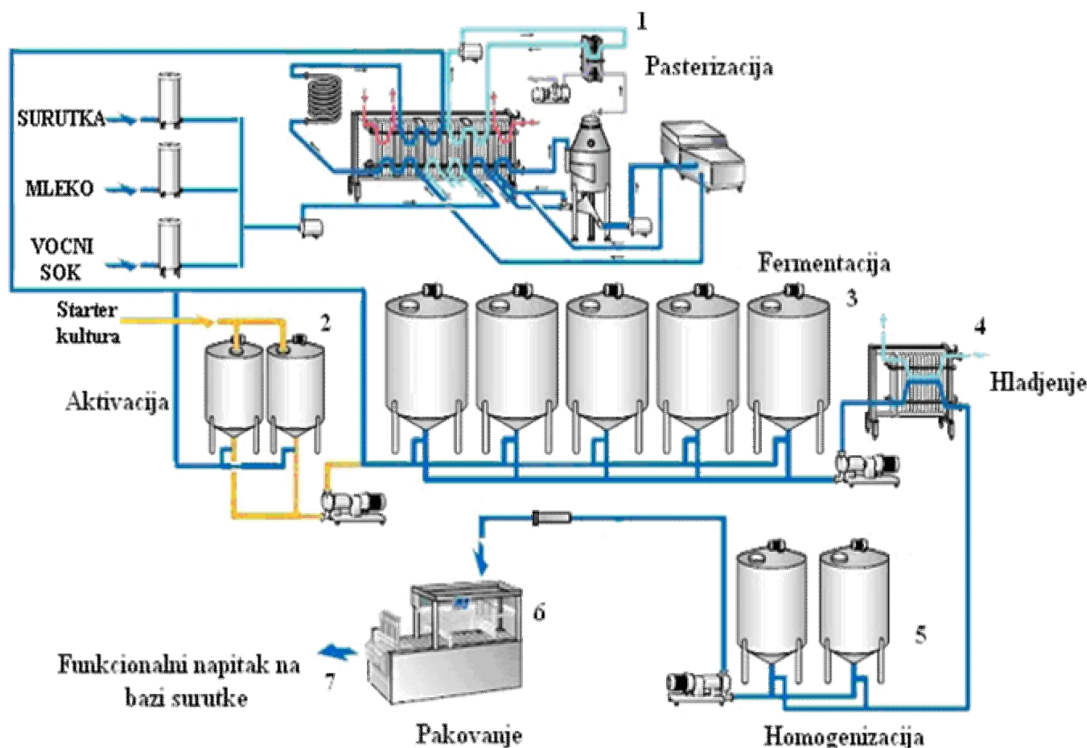
Obzirom da je postupak proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke praktično isti kao postupak koji se već primenjuje u proizvodnji jogurta, ne postoje posebni zahtevi za implementaciju ovog procesa u postojeće pogone mlečne industrije.

Na Slici 4 data je šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke, mleka i voćnog soka.



Slika 4. Šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke

Na Slici 5 data je tehnološka šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke, mleka i voćnog soka.



Slika 5. Tehnološka šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke

2.3.4.1. Osnovni parametri procesa proizvodnje fermentisanih napitaka na bazi surutke

Pri proizvodnji fermentisanih napitaka na bazi surutke neophodno je ispunjavanje nekoliko važnih kriterijuma:

- Ekonomičnost procesa
- Funkcionalnost proizvoda (broj ćelija, sadržaj mlečne kiseline i proteina)
- Zadovoljavajuća senzorna svojstva proizvoda
- Stabilnost tokom dužeg perioda čuvanja proizvoda

U osnovne parametre procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke spadaju: pH vrednost, temperatura, vreme fermentacije, koncentracija inokuluma, broj ćelija. Jedino adekvatnim podešavanjem ovih parametara moguće je maksimalno optimizovati proces proizvodnje i ispuniti zadate kriterijume.

pH vrednost

Dosadašnja istraživanja vezana za proizvodnju napitaka na bazi surutke su koncipirana tako da se proces fermentacije surutke vodi do postizanja pH vrednosti približno 4,6^{166,167,168} čime se postiže ispunjavanje sva četiri važna kriterijuma u proizvodnji napitaka na bazi surutke. Prema navodima Gorskog¹⁶⁹ i Ravula¹⁷⁰, a u skladu sa Food Standards Code H8, vrednosti $\text{pH} \leq 4,5$ mogu negativno uticati na metabolizam i preživljavanje bakterija primenjenih u procesu proizvodnje napitaka. Postavljanje vrednosti $\text{pH} \approx 4,6$ kao završne tačke fermentacije bitno je sa stanovišta preživljavanja bakterija, a samim tim i funkcionalnosti dobijenog napitka. Da bi se napitak smatrao probiotskim mora sadržati minimum 10^6 CFU/mL živih ćelija¹⁶⁷ tako da je radi ispunjavanja kriterijuma funkcionalnosti neophodno da se pH vrednost na kraju fermentacije ne spusti ispod vrednosti 4,5.

Temperatura

Bakterije mlečne kiseline se mogu klasifikovati kao termofilni ili mezofilni mikroorganizmi. *Lactobacillus delbrueckii* spada u mezofilne bakterije, koje rastu na 17,0-50,0 °C i imaju optimalan rast između 20,0-40,0 °C¹⁷¹.

U nekim slučajevima najveća produktivnost ovih bakterija postiže se na nižim temperaturama, dok se maksimalni prinos postiže na nešto višim temperaturama. Za *L. amilophilus*, za koji je poznato da raste na 15,0 °C, ali ne i na 45,0 °C, optimalne temperature za maksimalnu produktivnost i prinos iznose 25,0 i 35,0 °C, respektivno. Za *L. casei* i *L. paracasei* optimalne temperature su 37,0 i 44,0 °C, dok *Lc. lactis* i *L. rhamnosus* ostvaruju najveći prinos i produktivnost na 33,0 do 35,0 °C i 41,0 do 45,0 °C, respektivno¹⁷².

Vreme

U pogledu vremena trajanja fermentacije, BMK se znatno duže prilagođavaju i rastu u surutki. Posledica toga je dugo trajanje fermentacije surutke, 15,0 h i više^{167,168}. Prema navodima iz literaturi vreme trajanja fermentacije može da zavisi od vrste primenjenih sojeva, koncentracije inokuluma, prisustva prebiotika, kao i od toga da li se fermentacija izvodi pojedinačnim ili mešanim starter kulturama. Uobičajeno vreme trajanja fermentacije monokulturama je 11,0-17,0 h^{40,166}, dok se za mešane kulture ono kreće 6,0-8,0 h¹⁶⁷. Vreme trajanja fermentacije monokulturama vrsta roda *Lactobacillus* je kraće u odnosu na fermentaciju

monokulturama vrsti roda *Bifidobacterium*⁴⁰. Poznato je da su vrste roda *Lactobacillus*, u pogledu fermentativnih sposobnosti, manje aktivne u surutki nego u mleku. Fermentacija mleka vrstama roda *Lactobacillus* može trajati 15,0-17,0 h, a da se ne postigne pH vrednost niža od 5 jedinica. Prema navodima u literaturi, fermentacija mleka probiotskom monokulturom *L. acidophilus* La-5 do postizanja pH vrednosti 4,6 jedinica traje oko 10,5 h, što je čak 5,0 h kraće u odnosu na fermentaciju surutke. Uzrok tako duge fermentacije je slabija aktivnost bakterija u surutki koja nije njihovo prirodno stanište⁴⁰. Produženo trajanje fermentacije surutke u odnosu na fermentaciju mleka objašnjava se time što surutka u svom sastavu ima znatno manji sadržaj nutrijenata neophodnih za rast BMK, za koje je poznato da zahtevaju jako složene medijume jer nisu u stanju da same sintetišu sve nutrijente koji su im neophodni.

Koncentracija inokuluma

Koncentracija inokuluma koja se najčešće koristi u fermentaciji surutke je 2,0%¹⁷³, 2,5%¹⁶⁷, mada su rađena i istraživanja sa 4,0%³⁶ i 10,0%³⁷. Količina inokuluma utiče na skraćenje vremena fermentacije u proseku za oko 2,0 h kod monokultura vrsta roda *Lactobacillus*, dok kod monokultura vrsta roda *Bifidobacterium* uglavnom nema značajnijeg uticaja⁴⁰.

Broj živih ćelija

Da bi se jedan napitak svrstao u probiotik neophodno je da sadrži dovoljan broj živih probiotskih bakterija. Postoje različita mišljenja vezana za broj bakterija koje moraju preživeti u probiotskom napitku da bi mogle da ispolje svoj efekat. Opšte prihvaćeno mišljenje je da probiotski mlečni proizvodi moraju sadržati $\geq 10^6$ CFU/mL živih ćelija da bi ispoljili pozitivan efekat nakon konzumiranja³⁸. Broj živih ćelija se tokom procesa fermentacije povećava za oko 1,0-1,5 logaritamskih jedinica⁴⁰, tako da konačni broj nakon završetka fermentacije iznosi 10^6 - 10^9 CFU/mL živih ćelija. Ovaj broj bakterija je neophodno dostići tokom fermentacije, ali isto tako i zadržati tokom predviđenog perioda čuvanja proizvoda. U većini istraživanja, kao maksimalni period čuvanja probiotskih napitaka navedeno je 15-28 dana na temperaturama 4,0-10,0 °C^{174,36,173,167}.

Suplementi

Na rast, aktivnost i preživljavanje probiotskih bakterija u samom procesu fermentacije, a takođe i pri čuvanju proizvoda, značajno utiče i dodatak različitih suplemenata. U prvom redu tu spadaju prebiotici kao nesvarljivi sastojci koji utiču na stimulisanje bakterijskih vrsta kako proizvodnih, tako i onih korisnih prisutnih u crevima čoveka. Najčešće primenjivani prebiotici koji se navode u literaturi su inulin i laktuloza. Kao suplement koji značajno utiče na rast bakterija tokom fermentacije, ali i na senzorne karakteristike finalnog proizvoda, veoma često se koristi i koncentrat proteina surutke^{173,166}.

Bakterije mlečne kiseline zahtevaju visok stepen suplementacije nutrijentima kao što su aminokiseline, vitamini, ili ekstrakt kvasca. Dodatak hranljivih materija i nutrijenata generalno ima pozitivan efekat na proizvodnju mlečne kiseline. Mineralne soli igraju vitalnu ulogu u mlečno kiseloj fermentaciji. Komponente kao što su K_2HPO_4 , natrijum acetat, natrijum sulfat, $FeSO_4 \times 7H_2O$, i $MnSO_4 \times 4H_2O$ utvrđeno je da imaju značajan uticaj na tok mlečne fermentacije¹⁷⁵.

2.3.5. Pakovanje i obeležavanje napitaka na bazi surutke

2.3.5.1 Ambalaža

Širok spektar materijala se danas koristi za pakovanje fermentisanih mlečnih proizvoda^{176,177,178}. Najpopularniji materijal u upotrebi za pakovanje čvrstih jogurta (kiselo mleko, jogurt u čaši, voćni jogurt) je termo-HIPS (High Impact Polystyrene) koji je zapravo modifikovana formula polistirena sa mešavinom polibutadiena. Najčešće je ova vrsta pakovanja prisutna u obliku malih šoljica ili većih čaša, poklopljenih bilo aluminijumskom folijom, plastičnim poklopcem ili termički zavarenom plastičnom prevlakom. U ovu vrstu pakovanja obično se dodaju pigmenti kao npr. TiO_2 u cilju poboljšanja izgleda pakovanja i obezbeđivanja svetlosne barijere. Pigmenti takođe pomažu u omekšavanju materijala pri termičkoj obradi u procesu formiranja¹⁷⁹. Takođe, često se koriste i nalepnice koje pružaju dodatnu zaštitu od svetlosti. Ova pakovanja obično imaju debljinu zida od oko 0,2 mm. Pravougaona kartonska pakovanja ili čaše (sa ili bez aluminijumske folije), staklene posude, polipropilen (PP) i ambalaža sa polietilenom visoke gustine (PEVG) se sve češće upotrebljavaju. Takođe se veoma često

predlažu i neretko upotrebljavaju i materijali kao što su poli-etilen-tereftalat (PET), polivinil-hlorid (PVC), poliviniliden-hlorid-kopolimer (PVDC) i polilactate (PLA), a za neke specijalne namene kao i tržišta sa posebnim zahtevima, koriste se keramičke posude^{180,178}. Za pasterizovane, čvrste jogurte, poželjno je da materijali imaju dug rok trajanja, obzirom da neki od tih proizvoda imaju rok trajanja 4,0-6,0 meseci na sobnoj temperaturi. Za ambalažu za ove proizvode, zahteva se nizak koeficijent prenosa vodene pare (KPVP) da bi se sprečio gubitak vode tokom čuvanja. Dobra prepreka kiseoniku takođe štiti proizvod od oksidacije, a dobra svetlosna barijera pruža zaštitu od promene boje proizvoda osetljivih na svetlost kao i zaštitu od svetlosno indukovane oksidacije. Fermentisani proizvodi sa niskim sadržajem alkohola danas postaju sve popularniji. Za ove proizvode, najbolja pakovanja su HDPE boce toplotno zaptivene i zapečaćene aluminijumskom folijom ili zatvaračima izrađenim od polietilen niske gustine (PENG). Boce napravljene od drugih plastičnih materijala (npr. PET) se takođe veoma često koriste. Za boce je uobičajena primena navlaka koje se koriste za obeležavanje i dekoraciju proizvoda. Za dugotrajnost, termički tretiranih tečnih jogurta, plastična/alu/kartonska pakovanja sa odgovarajućim koeficijentom prenosa vodene pare i O₂, i svetlosnom barijerom se takođe često koriste.

Kao i kod praktično svih upakovanih prehrambenih proizvoda, pakovanje u kome jogurt dolazi do potrošača je od velikog značaja. Pakovanje mora da bude bezbedno, pogodno za tu vrstu proizvoda, atraktivno, funkcionalno i isplativo. Takođe je neophodno da pakovanje bude adekvatno za zaštitu proizvoda tokom distribucije i trgovine, za predstavljanje potrošaču i da omogućava laku potrošnju. Faktori koji utiču na životnu sredinu a odnose se na ambalažu moraju takođe biti uzeti u obzir, što će verovatno postati još važnije u budućnosti. Dakle, materijal za pakovanje i dizajn mora obezbediti fizičku zaštitu proizvoda, zaštitu senzornih svojstava, bezbednost proizvoda, estetiku, funkcionalnost, zaštitu životne sredine kao prihvatljivost cene. Tržište proizvoda tipa jogurta odlikuje se veoma velikom konkurencijom usled čega inovativnost igra veoma značajnu ulogu. Kao i u mnogim segmentima prehrambene industrije, postoji nekoliko faktora koji utiču na izbor ambalaže proizvoda; od onih koji se odnose na pitanje troškova prihvatljivih za potrošača i u kojima presudnu ulogu igra cena proizvoda (jer je cena pakovanja veoma veliki deo fabričkih troškova), do onih koji se odnose

na potrebe specijalne zaštite proizvoda ili karakteristični dizajn koji omogućava izdvajanje datog proizvoda iz ponude konkurencije na prodajnim rafovima.

U poslednjih nekoliko godina, dodavanje probiotskih kultura u fermentisane proizvode postaje sve popularnije. Postoji veoma veliki broj istraživanja na temu zdravstvenog efekta dodavanja različitih probiotskih kultura u fermentisane proizvode, i sada je sasvim jasno da probiotske kulture konzumirane redovno i u dovoljnoj količini mogu da pomognu u očuvanju zdravlja i blagostanja čovekovog organizma^{181,182}. Probiotske kulture se međusobno razlikuju po pitanju osetljivosti na O₂^{183,184,185}, a postoje saznanja da se broj nekih vrsta *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* značajno smanjuje tokom roka trajanja probiotskih jogurta. Iako to može biti posledica niza faktora, uključujući dejstvo niskog pH, veoma su aktuelna istraživanja u cilju rasvetljavanja efekta O₂ na preživljavanje probiotika tokom skladištenja proizvoda i uticaja smanjenja sadržaja O₂ koji je moguće ostvariti izborom adekvatne ambalaže. Nekoliko pristupa je razmatrano o upotrebi materijala za pakovanje koji su manje propustljivi za O₂¹⁸⁶. Korišćenje materijala koji upijaju višak O₂¹⁸⁶, dodavanje O₂-akceptora u jogurt¹⁸³, inkapsulaciju O₂-osetljivih probiotskih kultura u cilju zaštite od O₂¹⁸⁷, primena različitih proizvodnih metoda za smanjenje nivoa O₂ u proizvodu¹⁸⁶, dodavanje prebiotskih jedinjenja^{188,189}, dodavanje koncentrata proteina surutke^{190,191}. Međutim, treba napomenuti da je najrasprostranjeniji pristup u komercijalnoj praksi odabir probiotskih sojeva sa robusnim tehnološkim karakteristikama, što znači da se najčešće biraju sojevi koji su sposobni da opstanu tokom procesa proizvodnje i skladištenja pod normalnim uslovima¹⁹². Na primer, Miller i sar.^{193,186} su pokazali da opstanak *Lactobacillus acidophilus* 2409 i *Bifidobacterium infantis* 1912 nije bio u značajnoj meri promenjen bilo u normalnom jogurtu ili u jogurtu sa smanjenim sadržajem O₂, sa zadržavanjem broja od $\geq 10^7$ CFU/g tokom 42 dana skladištenja u frižideru.

2.3.5.2. Nutritivne i zdravstvene izjave

Počevši od 1990. godine državne institucije kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju stavljaju veći akcenat na promociju zdravlja i prevenciju nastanka raznih vrsta bolesti. S tim u vezi nova kategorija hrane, nazvana "funkcionalna hrana", je poslednjih godina dobila na značaju čime započinje i njen ubrzani razvoj. To je jedan od najperspektivnijih segmenata

tržišta hrane u Evropi i širom sveta. Funkcionalna hrana je okarakterisana kao hrana koja poboljšava zdravlje, pruža blagostanje organizmu i daje zdravstvene efekte koji su u određenoj meri veći od zdravstvenih efekata konvencionalne hrane. Međutim, ovi proizvodi su uvedeni u posebno osetljivom trenutku kad su se u svetu pojavili brojni skandali vezani za prehrambene proizvode (BSE, dioksin, bolesti stopala i usta, itd.). Poverenje potrošača u bezbednost hrane se smanjilo i javne vlasti su uložile značajan trud u povećanje institucionalne podrške prehrambenoj industriji¹⁹⁴. Tako su uvedene nove institucije koje se bave bezbednošću hrane i to Evropska Agencija za Bezbednost Hrane (EFSA-European Food Safety Authority) osnovana 2002., kao i novi zakoni među kojima je najznačajniji Zakon o Bezbednosti Hrane usvojen na nacionalnom nivou kao i Regulativa 1924/2006 o Nutritivnim i Zdravstvenim tvrdnjama. Sa institucionalne tačke gledišta, takođe je specijalna pažnja posvećena analizi materijalne koristi koju bi proizvođači dobili primenom zdravstvenih izjava.

Najznačajniji efekti tržišta funkcionalne hrane su često analizirani u literaturi^{195,196}. Najkorisniji efekat za politiku javne ishrane je širenje zdravstvenih informacija koje potrošači nisu mogli dobiti putem drugih, redovnih medija. Informacije su ranije imale komponentu troška koji je potrošač plaćao iz sopstvenog džepa kupovinom informacije (npr. plaćanjem cene neke knjige ili časopisa u kojem bi došao do takve informacije), ili komponentu utrošenog vremena koje bi potrošač uložio u potragu, usvajanje i razumevanje određene zdravstvene informacije. Marketinške poruke vezane za zdravlje mogu biti efikasan katalizator za aktiviranje potrošača da istražuju više, kao i efikasan način proizvođača da komuniciraju sa populacijom kojoj se ne može pričati drugim izvorima informacija. Konačni efekat se može videti u smanjenju troškova zdravstvene zaštite, jer će usled boljeg informisanja, potrošači izabrati zdraviju hranu i modifikovati svoje aktivnosti orjentišući se ka zdravijem načinu života.

Efekti drugog reda odnose se na tržište npr. na reakciju konkurencije^{197,198,199}. Razvoj tržišta funkcionalne hrane znatno povećava obim zdravstvenih istraživanja, i stoga poboljšava kvalitet proizvoda. Međutim, ulaganje u razvoj novih funkcionalnih proizvoda može koštati koliko i inovacija u farmaceutskoj industriji²⁰⁰. Vodeće kompanije su izložene ogromnim budžetskim troškovima za razvoj proizvoda. Štaviše, strategija nastavljanja razvoja je uobičajena reakcija konkurenata čime se stvara začarani krug rastućih troškova jedne kompanije. Takođe, problem kopiranja postaje izraženiji, što ima negativan uticaj na delatnost

istraživanja i industrijskog razvoja, podrivajući time ukupnu efikasnost inovacija. Lažne zdravstvene izjave koje dovode u zabludu potrošača jednako loš uticaj imaju i na same proizvođače. Pri primeni zdravstvenih izjava mogu se javiti dve vrste grešaka:

- *Greška Tip I* odnosi se na postavljanje štetnih zdravstvenih izjava: (a) potrošač plaća više za hranu neopravdano verujući da će od te hrane imati zdravstvene koristi, ili što je još gore izlaže svoj organizam hrani koja predstavlja zapravo opasnost po njegovo zdravlje; (b) kredibilitet svih zdravstvenih izjava se smanjuje i kompanije polako gube svoju poziciju na tržištu.

- *Greška Tip II* se odnosi na zabranjivanje korisnih zdravstvenih izjava, a može biti posledica nestručnosti, neodgovornosti i neadekvatnosti državnog upravljanja što dovodi do toga da: (a) potrošači nisu efikasno informisani i (b) kompanije gube važan izvor tržišnog pozicioniranja i diferencijacije dok javne vlasti ostaju bez korisnih sredstava upravljanja javnim zdravljem.

Zato vlasti treba blisko da sarađuju sa privatnim sektorom, potrošačkim grupama, akademskim građanima i istraživačkim zajednicama u cilju ostvarivanja punog potencijala razvoja tržišta funkcionalne hrane u budućnosti²⁰¹.

Uvođenje reda u EU tržište funkcionalne hrane počelo je 2003. godine. Evropska Komisija je tokom 2003. godine prihvatila predlog o nutritivnim i zdravstvenim izjavama da bi ista bila prihvaćena tek 20.12.2006. godine kao Regulativa (EZ) br. 1924/2006²⁰². Nakon toga, 25.09.2011. godine donesena je nova Regulativa (EZ) br. 1169/2011²⁰³ Evropskog parlamenta i Veća o informisanju potrošača o hrani koja obuhvata niz zakonodavnih okvira: Direktivu 200/13/EZ o označavanju, reklamiranju i prezentovanju hrane i Direktivu 90/496/EZ o navođenju hranljivih vrednosti hrane, kojima se menjaju i dopunjuju Uredba (EZ) br. 1924/2006²⁰² o nutritivnim i zdravstvenim izjavama i Regulativa (EZ) br. 1925/2006²⁰³ o dodavanju minerala, vitamina i drugih materija u hranu^{204,205}. U maju 2012. na nivou Evropske Unije²⁰⁶, objavljene su opšte zdravstvene izjave (ukupno 222) koje se odnose na vitamine, minerale i druge materije iz hrane, a koje se mogu navoditi i citirati isključivo pod određenim uslovima. Osim ovih opštih zdravstvenih izjava, postoje takođe i izjave o smanjenju rizika od bolesti (definisane u okviru poglavlja III, člana 13 stav 1., Regulativa (EZ) br. 1924/2006) i izjave o razvoju i zdravlju dece koje se odobravaju samo za pojedine hranljive materije (definisane u okviru poglavlja III, član 14, Regulativa (EZ) br. 1924/2006). Izjave koje su

zasnovane na novim naučnim dokazima posebno se objavljuju u Službenom listu Evropske Unije nakon čega one postaju odobrene za korišćenje, a među njima postoje i izjave za koje je podnosilac zahteva za evaluaciju zahteva pravo ekskluziviteta na pet godina u okviru kojih ih samo i isključivo podnosilac ima pravo koristiti (definisane u okviru poglavlja III, član 13 stav 5, Regulativa (EZ) br. 1924/2006). Od 2008. godine od ukupno 44 000 izjava koje su podnete na autorizaciju EFSA-i, Evropska komisija je u maju 2012. godine odobrila samo 222 zdravstvene izjave, 1.500 izjava je odbačeno, a za ostale podnete izjave provera je u toku. Prema fazi u kojoj se nalaze, razlikuju se odobrene zdravstvene izjave, neodobrene zdravstvene izjave (navedene u EU Registru) i izjave koje su još na čekanju tzv. on-hold izjave, tako da u ovom trenutku postoji ukupno oko 250 zdravstvenih izjava od kojih su neke još uvek u procesu razmatranja. Sve tri Regulative su omogućile da deklarisanje na prehrambenim proizvodima i suplementima postane znatno uniformisanije.

Izjava je kratka informacija istaknuta na deklaraciji proizvoda, koja upućuje da proizvod može biti nutritivno i zdravstveno koristan u smislu ublažavanja, olakšavanja, poboljšanja, regulisanja određenih stanja organizma. Izjavom se dakle izjavljuje i sugeriše da hrana ima određena svojstva²⁰⁷. Izjavom na proizvodu ne smeju se pripisivati svojstva proizvoda koja se odnose na prevenciju, terapiju i lečenje bolesti ljudi ili upućivati na takva svojstva²⁰⁴.

Regulativom (EZ) br. 1924/2006 Evropskog parlamenta i Veća od 20.12.2006. o nutritivnim i zdravstvenim izjavama koje se navode na hrani, razlikuju se sledeće izjave²⁰⁷:

1. Nutritivne izjave

Nutritivna izjava predstavlja svaku izjavu koja sugeriše, tvrdi ili ukazuje da hrana ima specifična nutritivna svojstva, uključujući, ali ne ograničavajući se samo na, energetske vrednosti i količine proteina, masti i ugljenih hidrata, kao i količine vitamina i minerala. Dele se na: izjava o sadržaju nutrijenta: "izvor kalcijuma", "visok sadržaj vlakana", "nizak sadržaj masti", "bez holesterola" i komparativne izjave: "smanjen sadržaj ...", "povećan sadržaj ...", "obogaćeno ...".

Ukoliko sadrži nutritivnu izjavu, namirnica mora da ima i nutritivnu deklaraciju. Nutritivne izjave mogu biti uslovljene određenim svojstvima hrane i to:

- energijom koju ona: a) pruža i/ili osigurava, b) osigurava u smanjenoj ili povećanoj količini i/ili c) ne osigurava.

- hranljivom ili drugom materijom koju: a) sadrži, b) sadrži u smanjenoj ili povećanoj količini i/ili c) ne sadrži.

Nutritivne izjave u Republici Srbiji su pre početka usklađivanja sa EU zakonodavstvom, bile propisane Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica ("Sl. list SCG", br. 4/2004, 12/2004 i 48/2004)²⁰⁸.

2. Zdravstvene izjave

Zdravstvene izjave su vezane za aktivnu materiju kao komponentu proizvoda, njenu količinu i uticaj na zdravlje. Zdravstvenom izjavom se izjavljuje, sugeriše ili naznačava da postoji odnos između neke kategorije hrane, određene hrane ili jedne njene komponente i zdravlja.

Definicije nutritivnih i zdravstvenih izjava, citati i uslovi za navođenje nutritivnih izjava regulisani su još 2006. godine Regulativom (EZ) br. 1924/2006²⁰², dok su citati i uslovi navođenja zdravstvenih izjava regulisani tek 2012. godine Regulativom (EZ) br. 432/2012²⁰⁹. U međuvremenu, u nekim slučajevima je čak i ime proizvoda (npr. probiotik ili antioksidans) smatrano zdravstvenom izjavom, jer je kako je navedeno u Vodiču Evropske komisije²¹⁰ iz 2007. godine upućivalo na fiziološke funkcije proizvoda.

U Republici Srbiji je usklađivanje sa EU zakonodavstvom još uvek u toku, usled čega se za regulisanje u oblasti označavanja prehrambenih proizvoda primenjuje samo član 30 iz Pravilnika o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica ("Sl. list SCG", br. 4/2004, 12/2004 i 48/2004)²⁰⁸. Pravilnik o nutritivnim i zdravstvenim izjavama za prehrambene proizvode je urađen, ali još uvek nije objavljen. U okviru tog pravilnika o nutritivnim i zdravstvenim izjavama za prehrambene proizvode navedene su 32 nutritivne izjave i on je potpuno usklađen sa Regulativom (EZ) br. 1924/2006²⁰². U prelaznoj fazi, dok se ne objavi Pravilnik o nutritivnim i zdravstvenim izjavama, na proizvodima mogu da se koriste autorizovane izjave iz EFSA i EU Registra.

Izjave koje se odnose na sadržaj i funkciju kalcijuma

Kalcijum je prirodno prisutan u mleku i mlečnim proizvodima, međutim, njegovo prisustvo je moguće istaći na deklaraciji proizvoda u obliku nutritivne i zdravstvene izjave.

Sadržaj kalcijuma se na proizvodu može navesti kroz nutritivnu izjavu kao "izvor" ili "sadrži" kalcijum, uz zadovoljenje uslova količine od najmanje 15,0% PDU (preporučenog dnevnog unosa). Preporučeni dnevni unos kalcijuma je 800,0 mg, dok je 15,0% PDU 120 mg. Za navođenje nutritivne izjave "bogato kalcijumom" potrebno je da proizvod sadrži 30,0% PDU, odnosno 240,0 mg kalcijuma^{204,207}.

Brojne su odobrene zdravstvene izjave vezane za kalcijum koje se mogu navesti na deklaraciji proizvoda isključivo ukoliko je zadovoljen osnovni uslov da proizvod sadrži 15,0% PDU²⁰⁶, i to sledeće:

- kalcijum doprinosi normalnoj funkciji mišića;
- kalcijum doprinosi normalnoj neurotransmisiji (prenosu nervnih vlakana);
- kalcijum doprinosi normalnoj funkciji enzima za varenje;
- kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju;
- kalcijum je potreban za održavanje normalnih zuba;
- kalcijum ima ulogu u regulaciji deljenja i diferencijacije ćelija;
- kalcijum doprinosi normalnom metabolizmu stvaranja energije;
- kalcijum doprinosi normalnom zgrušavanju krvi.

Ako se na proizvodima namenjenim isključivo deci želi navoditi zdravstvena izjava, tada je ona propisana Regulatora (EZ) br. 983/2009 i glasi "Kalcijum je potreban za normalan rast i razvoj kostiju kod dece".

Izjave koje se odnose na sadržaj i funkciju vitamina D

Mleko je jedna od retkih životnih namirnica koja sadrži vitamin D pa se izjave o sadržaju i funkciji vitamina D mogu navoditi na deklaraciji ovog proizvoda ali isključivo ukoliko je vitamin D prisutan u odgovarajućoj količini. Sadržaj vitamina D se kroz nutritivnu izjavu može navoditi kao "izvor" ili "sadrži" vitamin D ukoliko je on u mleku prisutan u količini od najmanje 15% PDU. PDU vitamina D je 5,0 µg. Potrebno je da proizvod sadrži minimum 0,75 µg za navođenje nutritivne izjave. Za navođenje nutritivne izjave "bogato

vitaminom D" potrebno je prisustvo vitamina D u količini od 30,0% PDU odnosno 1,5 μg ^{204,207}.

Brojne su odobrene zdravstvene izjave vezane za vitamin D koje se mogu navesti na deklaraciji proizvoda isključivo ukoliko je zadovoljen osnovni uslov da proizvod sadrži 15,0% PDU²⁰⁶:

- vitamin D doprinosi normalnoj apsorpciji/iskorišćenju kalcijuma i fosfora;
- vitamin D doprinosi normalnom nivou kalcijuma u krvi;
- vitamin D ima ulogu u procesu deljenja ćelija;
- vitamin D doprinosi normalnoj funkciji imunog sistema;
- vitamin D doprinosi održavanju normalne funkcije mišića;
- vitamin D doprinosi održavanju normalnih kostiju;
- vitamin D doprinosi održavanju normalnih zuba.

Sve ove izjave odobrene su u skladu sa odredbama Regulativom 432/2012 i odnose se isključivo na odrasle osobe. Ako se na proizvodima namenjenim isključivo deci želi navoditi zdravstvena izjava, tada je ona propisana Regulativa (EZ) br. 983/2009 i glasi "Vitamin D potreban je za normalan rast i razvoj kostiju kod dece"²¹¹.

Izjave koje se odnose na sadržaj i funkciju belančevina

Mleko i mlečni proizvodi smatraju se bitnim izvorom belančevina. Zbog prirodnog sadržaja belančevina moguće je navođenje nutritivnih i zdravstvenih izjava na mleku i mlečnim proizvodima. Uslov za navođenje nutritivne izjave "izvor belančevina" je da mleko ili mlečni proizvod sadrži najmanje 12,0% energetske vrijednosti iz belančevina. Uslov za navođenje nutritivne izjave "bogat belančevinama" je da mleko ili mlečni proizvod sadrži najmanje 20,0% energetske vrednosti iz belančevina^{204,207}.

Ukoliko mleko ili mlečni proizvod zadovoljavaju uslov za navođenje nutritivne izjave "izvor belančevina" mogu se navesti sledeće zdravstvene izjave koje su odobrene za belančevine²⁰⁶:

- belančevine doprinose održavanju normalnih kostiju;
- belančevine doprinose održavanju mišićne mase;
- belančevine doprinose rastu mišićne mase.

Sve ove izjave su odobrene su u skladu sa odredbama Regulativom (EZ) br. 432/2012 i odnose se isključivo na odrasle osobe. Do danas nisu odobrene specifične zdravstvene izjave o belančevinama koje bi se navodile na proizvodima namenjenim isključivo deci.

Izjave koje se odnose na kulture bakterija mlečnog vrenja

Po pitanju kultura bakterija mlečnog vrenja, jedina odobrena zdravstvena izjava je ona koja se odnosi na žive kulture jogurta uz zadovoljenje uslova količine od 10^8 *Colony Forming Units (CFU)* živih starter mikroorganizama (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) po gramu, i ta izjava glasi: "Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze"²⁰⁶.

Izjave na fermentisanim mlečnim proizvodima

Tokom poslednjih dvadeset godina razvijeni su brojni proizvodi s probioticima kojima su pripisivane izjave blagotvornog uticaja na imuni sistem. Stoga je zabrana navođenja reči "probiotik" i odbacivanje svih izjava o uticaju probiotika na zdravlje proizvođače stavilo u nepovoljan položaj u smislu pozicioniranja proizvoda. Budući da su dugi niz godina uz te proizvode plasirane komunikacijske poruke usmerene na imuni sistem, proizvođači su reformulisali proizvode tako što su dodali vitamine - naročito vitamin C, D i B kojima su odobrena zdravstvena izjava "Doprinosi održanju normalnog imunog sistema". Vitamine je potrebno dodati u dovoljnoj količini, tako da zadovoljavaju uslov 15,0% preporučenog dnevnog unosa, odnosno zadovoljiti uslov za navođenje nutritivne izjave "izvor"^{206,207}.

Dodatkom prehrambenih vlakana čija količina i vrsta mora biti jasno naznačena na deklaraciji moguće je navoditi i izjave vezane za normalnu funkciju creva, što je takođe slično ranijem korišćenju pomenutih komunikacijskih poruka.

Trenutna situacija je takva da fermentisani mlečni proizvodi nemaju navedenu reč "probiotik" i ne sadrže navode koji bi upućivali na bilo kakvu funkciju kultura bakterija. Umesto toga, navode se zdravstvene izjave za dodate vitamine, najčešće vezane za imuni sistem i probavu.

Izjave koje se odnose na laktozu i gluten

Osim brojnih propisanih nutritivnih i zdravstvenih izjava, neki proizvođači žele istaknuti i ono čega u proizvodu zapravo nema. Takav način navođenja nije dopušten obzirom na to da potrošača dovodi u zabludu²⁰⁴. Međutim, postoji nekoliko *free from* izjava, od kojih se

jedna odnosi na gluten i propisana je Regulativom (EZ) br. 41/2009 o sastavu i označavanju hrane prikladne za osobe intolerantne na gluten. Za navođenje izjave "bez glutena" propisane su tačne količine glutena i njegovih izvora, kao i posebne kategorije hrane koje ga sadrže.

Druga zanimljiva izjava je nutritivna izjava "bez laktoze". Ta izjava odobrena je jedino kao nutritivna izjava prema Direktivi 2006/141/ EZ²⁰⁹. Izjava "bez laktoze" može se navoditi samo na početnoj hrani za odojčad, i to ako sadržaj laktoze nije veći od 2,5 mg/100 kJ, odnosno 10,0 mg/100 kcal. Navođenje izjave "bez laktoze" na svoj ostaloj hrani nije regulisano EU zakonodavstvom. Regulativom (EU) br. 1169/2011 o informisanju potrošača o hrani²⁰⁴ daje se mogućnost zadržavanja postojećih ili uvođenja novih odgovarajućih nacionalnih mera za prikladnost upotrebe izjava "bez laktoze" ili "bez glutena", uz određene uslove.

2.4. Karakteristike fermentisanih napitaka na bazi surutke

2.4.1. Funkcionalne karakteristike napitaka na bazi surutke

2.4.1.1. Probiotske karakteristike napitaka

Mlečni proteini su poznati kao primarni izvor bioaktivnih peptida, kodiranih unutrašnjim aminokiselinskim sastavom i procesom proteolize koja dovodi do njihovog oslobađanja i aktivacije^{212,213}. Među jogurtnim kulturama, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* poseduje veću proteolitičku aktivnost (820,0 µg tirozin/mL) u odnosu na *S. thermophilus* (240,0 µg tirozin/mL) zbog čega je veoma česta njihova kombinovana primena koja rezultira proteolitičkom aktivnošću od 660,0 µg tirozina/mL²¹⁴. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* oslobodi približno 50,0% od ukupnih aminokiselina tokom prvog sata rasta i do kraja procesa fermentacije ta vrednost se penje na oko 70,0%, od kojih ≤ 70,0% biva asimilovano od strane *S. thermophilus*²¹⁵. Proizvedene aminokiseline kao što su leucin, lizin, cistein, asparaginska kiselina, izoleucin, tirozin, glutaminska kiselina, metionin^{216,217}, glicin i histadin²¹⁸ od strane *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* predstavljaju stimulatore rasta *S. thermophilus*. Sa druge strane, mravlja kiselina, piruvinska kiselina^{219,220} i ugljen-dioksid²²¹ proizvedene od strane *S. thermophilus* pokazuju stimulatorni efekat na rast *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Srinivas i sar. (1997)²²² su objavili rezultate o povećanju proteolitičke aktivnosti jogurtne kulture nastale primenom mešane kulture *L. acidophilus* i *B. bifidum* (0,49 mg tirozin/mL) u odnosu na samostalne kulture *L. acidophilus* (0,29 mg tirozin/mL) ili *B. bifidum* (0,43 mg tirozin/mL). Sarkar i Misra (1998)²²³ takođe objavljuju povećanje proteolitičke aktivnosti jogurtne kulture tokom zajedničkog rasta sa *B. bifidum* i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, pri čemu je veći efekat ispoljen u punomasnom mleku (185,0 prema 195,0 µg tirozin/mL) nego u obranom mleku (130,0 prema 155,0 µg tirozin/mL).

Preživljavanje u proizvodu

Sveže pripremljen jogurt sadrži laktobacila i streptokoka $5,5 \times 10^7$ - $6,5 \times 10^8$ i $3,5 \times 10^7$ - $1,2 \times 10^9$ CFU/mL, respektivno²²⁴. Broj živih ćelija jogurtne kulture raste do trećeg dana skladištenja, nakon čega ćelije počinju da odumiru, da bi devetog dana skladištenja broj streptokoka bio oko 5,0% veći nego broj živih ćelija laktobacila²²⁵. Preživljavanje ćelija probiotika u jogurtu zavisi od pH medijuma²²⁶ kao i ostalih primenjenih sojeva²²⁷. Vinderola i sar. (2002)²²⁶ beleže da je pad broja ćelija *L. acidophilus* i bifidobakterija bio zanemarljiv pri pH 5,0, dok je pri pH 4,0 pad broja ćelija iznosio 1,6 do 6,2 log jedinica i od 0,1 do 7,6 log jedinica, respektivno. Lamourek i sar. (2002)²²⁸ objavljuju primetan rast *B. animalis*, *B. infantis* i *B. breve* u jogurtu. Tokom istraživanja vezanih za preživljavanje mikroorganizama primenjenih u proizvodnji jogurta zabeležena je veća stabilnost *B. longum* i *L. fermentum* od *B. infantis*²²⁹, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* i *B. bifidum* od jogurtne kulture²³⁰, *L. acidophilus* od *L. rhamnosus*²³¹, *B. animalis* od *B. longum*, *B. animalis* ssp. *lactis* od *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* i *B. adolescentis*²³² i *L. acidophilus* i *L. paracasei* od *B. lactis*²³³. Slabije preživljavanje bifidobakterija (0,0-6,0 log (CFU/mL)) od *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (6,63-9,42 log (CFU/mL)) i *S. thermophilus* (0,0-9,36 log (CFU/mL)) u komercijalnim jogurtima je takođe dokumentovano²³⁴. Prisustvo *B. bifidum* u jogurtu indukuje povećanje broja ćelija *S. thermophilus* (sa 8,37 na 8,42 log (CFU/mL)) i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (sa 8;17 na 8;28 log (CFU/mL)) i uz broj ćelija *B. bifidum* od 8,55 log (CFU/mL). Uključivanje *L. acidophilus* dovodi do daljeg povećanja broja ćelija *S. thermophilus* (na 8,47 log (CFU/mL)), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (na 8,30 log (CFU/mL)) uz broj ćelija *L. acidophilus* od 8,42 log (CFU/mL), međutim dolazi do pada broja ćelija *B. bifidum* na 8,52 log

(CFU/mL)²³⁵. Guerin-Danan i sar. (1998)²³⁶ beleže porast broja ćelija *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ($3,0 \times 10^6$ na $3,9 \times 10^6$ CFU/g) i *S. thermophilus* ($1,7 \times 10^9$ na $1,8 \times 10^9$ CFU/g) zbog uključivanja *L. casei* ($9,1 \times 10^7$ CFU/g) u jogurt.

Slabije preživljavanje *L. acidophilus* od *B. bifidum* u jogurtu²³⁷ može biti posledica prisustva vodonik peroksida produkovanog od strane *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*²³⁸. Broj ćelija bifidobakterija u jogurtu brže opada u periodu do tri nedelje²³⁹ i postiže broj od 5,5 log (CFU/mL)²⁴⁰, koji se dodatno smanjuje za tri log jedinice posle četiri nedelje čuvanja na 4,0 °C²³⁹. Broj ćelija *B. infantis*, *L. gasseri* i *L. casei* u jogurtu se povećava sa $2,6 \times 10^8$ na $4,0 \times 10^9$, $3,1 \times 10^8$ na $4,8 \times 10^8$, $2,5 \times 10^8$ na $5,0 \times 10^8$ CFU/mL do 10. dana skladištenja, da bi produžetak skladištenja na 15 dana rezultirao padom na vrednosti od $2,3 \times 10^9$, $2,9 \times 10^8$ i $1,9 \times 10^8$ CFU/mL, respektivno²⁴¹.

Rogelj i sar. (1998)²⁴² beleže preživljavanje *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *B. bifidum* od $>10^8$, $>10^7$ i $>10^6$ tokom 4 nedelje skladištenja jogurta na $7,0 \pm 1,0$ °C. Međutim nešto niže preživljavanje od $>10^7$ i $>10^6$ ćelija je zabeleženo kod jogurtne bakterije i probiotske kulture (*L. acidophilus* + *Bifidobacterium* sp.) nakon 30 dana skladištenja²⁴³. Za ispoljavanje terapijskih efekata početna koncentracija živih ćelija jogurtne kulture u proizvodu mora biti na nivou od 10^8 - 10^9 CFU/mL mleka, dok preporučena dnevna terapijska doza iznosi oko 10^8 CFU/mL²⁴⁴. Za bolje preživljavanje *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* sp. tokom proizvodnje i skladištenja jogurta predlažu se različiti postupci koji podrazumevaju dodatak određenih sastojaka, kao što su proteini surutke^{245,246}, rafinoza²⁴⁷, inulin²⁴⁸, cistein²⁴⁹ ili manipulisanje tehnološkim parametrima kao na primer smanjenje temperature inkubacije do 37,0 °C²⁵⁰, prekid fermentacije pri postizanju pH 5,0²⁵¹, održavanje temperature skladištenja na $< 3,0$ - $4,0$ °C²⁵², podvrgavanje jogurta dejstvu hidrostatičkog pritiska od 200-300 Mpa u trajanju od 10,0 min na sobnoj temperaturi²⁵³ ili toplotnog šoka na 58,0 °C u trajanju od 5,0 min da bi se sprečila post-acidifikacija²⁵⁴.

Vitalnost i crevni tranzit

In vitro eksperimenti su pokazali da preživljavanje BMK ili probiotskih kultura u gornjem delu gastrointestinalnog trakta zavisi od različitih faktora. Faktori koji utiču na preživljavanje bakterija su pH gastričnog soka, digestivni enzimi²⁵⁵, trajanje izloženosti žučnim solima i kiselinu, aktivnost žučne hidrolaze i svojstava probiotskih kultura²⁵⁶. Među raznim sojevima bifidobakterija, *B. infantis* pokazuje veliku otpornost na žučne soli, zatim slede *B. bifidum* i *B. breve* i *B. longum*²⁵⁷. Izlaganje žučnim solima (0,0 - 1,5% u trajanju od 3,0 h) dobro podnose i vrste *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudolongum* i *L. acidophilus*²⁵⁸. Marteau i sar. (1997)²⁵⁹ koristeći veštački modelovan sistem organa za varenje, naglašavaju da su *B. bifidum* i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* znatno otporniji na dejstvo želudačne kiseline (preživljavanje 140,0 min) nego *S. thermophilus* i *L. acidophilus* (preživljavanje 40,0 min). Tolerancija *Bifidobacterium* sp. na kisele uslove u stomaku zavisi od primenjenog soja²⁶⁰ i rast *B. bifidum* je značajno usporen pri pH vrednostima ispod 5,0. Takođe je prijavljeno i bolje preživljavanje *B. longum* nego *B. infantis*, *B. adolescentis* i *B. bifidum*²⁶¹, zatim *L. acidophilus* od *B. bifidum* u kiselim uslovima²⁵⁰ i *L. acidophilus* i *L. johnsonii* nego *L. paracasei* i *L. rhamnosus* u želudačnom soku koji sadrži pepsin pri pH 2,0²⁶². Collado i sar. (2005)²⁶³ su zaključili da je efikasnost sojeva *Bifidobacterium* sp. bilo kao mlečnih startera ili probiotika određena mogućnošću njihove adaptacije i opstanka na niskoj pH. Sposobnost jogurtne kulture da prežive gastrointestinalni tranzit je potvrđena prisustvom *S. thermophilus* ($6,3 \times 10^4$ CFU/g) i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ($7,2 \times 10^4$ CFU/g) u fecesu²⁶⁴. Elli i sar. (2006)²⁶⁵, takođe potvrđuju da je jogurtnu kulturu, posebno *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* moguće detektovati iz fecesa zdravih pojedinaca posle nekoliko dana od uzimanja komercijalnih jogurta. Detekcija *Lactobacillus* F-16 i *B. animalis* ssp. *lactis* Bb 12 u fecesu (u količini od 100,0 i 79,0%, respektivno) posle uzimanja jogurta koji sadrži ove organizme, takođe pokazuje njihovu sposobnost preživljavanja tokom crevnog tranzita²⁶⁶.

Intestinalna kolonizacija

Intestinalna kolonizacija predstavlja i specifično vezivanje i umnožavanje ćelija mikroorganizama na površini membrane gastrointestinalnih epitelnih ćelija. Obe ove pojave učestvuju u kritičnom mehanizmu uspostavljanja probiotske flore u intestinalnom traktu.

Schillinger i sar. (2005)²⁶² primećuju sposobnost *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* i *L. rhamnosus* da se adsorbuju na ćelije HT29MTKS koje luče sluz kao i na kolegen IV fibrinogen i fibronektin. Ugrađivanje *B. bifidum* u jogurt pokazalo se efikasnijim u poboljšanju sastava intestinalne flore pri primeni standardnog jogurta²⁶⁷ jer indukuje značajno povećanje populacije bifidobakterija u crevima²⁶⁸ i fecesu²⁶⁹. Unošenje jogurta koji sadrži *L. acidophilus* ili *Lactobacillus* GG indukuje ne tako značajnu promenu u sastavu crevne flore²⁷⁰, međutim, u literaturi²⁷¹ postoje podaci o nešto nižoj učestalosti dijareje (13,0 u odnosu na 23,0%) zbog uzimanja jogurta koji sadrži *L. acidophilus*. Sarkar i Misra (2002)²⁷² su takođe uočili povećanje broja ćelija bifidobakterija (od 0,0 do 28,7 x 10⁶ CFU/g fecesa) i laktobacila (1,52 x 10⁶ do 14,9 x 10⁶ CFU/g fecesa,) kao i pad koliformnih bakterija (sa 1,58 x 10⁷ na 0,48 x 10⁷ CFU/g fecesa) kod pacova hranjenih jogurtom koji sadrži *B. bifidum* i *P. freudenreichii* ssp. *sbermanii*. Objavljeno je takođe da je uzimanje kiselog mleka koje sadrži probiotske kulture rezultiralo preživljavanjem 23,5 ± 10,4% bifidobakterija²⁷³, 30,0% *B. bifidum* i 10,0% *L. acidophilus*²⁵⁹ u fecesu. Sarkar i Misra (2000)²⁷² dalje prijavljuju veći opstanak bifidobakterija i laktobacila u slepom crevu (10,2 x 10⁶ i 8,8 x 10⁶ CFU/g, respektivno) nego u debelom crevu (6,8 x 10⁶ i 7,6 x 10⁶ CFU/g, respektivno) pacova koji su hranjeni jogurtom.

2.4.1.2. Bioaktivna jedinjenja u napitku

Kontrolisana hidroliza proteina surutke dovodi do sinteze bioaktivnih peptida, od kojih većina još uvek nije okarakterisana u istoj meri kao peptidi poreklom iz kazeina. Svejedno, bioaktivni peptidi poreklom iz surutke imaju potencijal da igraju važnu ulogu u nekoliko važnih oblasti, i to kao deo preventivnog i terapijskog zdravstvenog pristupa, zbog povoljne kombinacije različitih biohemijskih i fizioloških karakteristika. Do sada postoje brojni eksperimentalni dokazi da određeni bioaktivni peptidi mogu biti poreklom iz α -La, β -Ig, BLF i BSA pa tako neki od ovih peptida nose i posebne oznake: α - i β -laktorfin, β -laktotensin, serofin, albutensin A, laktofericin B, i laktoferampin (iako postoje i mnogi drugi). Osim što podležu neorganskoj (kiseloj ili baznoj) hidrolizi, proteini surutke mogu biti hidrolizovani putem želudačnih, pankreasnih i mikrobioloških proteaza i na taj način obrazovati peptide koji

mogu da imaju određenu fiziološku ulogu^{274,275,276}, ali sa akcentom na njihove nutritivne karakteristike.

Peptidi sa antihipertenzivnom i antikoagulantnom aktivnošću

Mlečni proteini su identifikovani kao izvori ACE inhibitornih peptida koji su trenutno najpoznatija klasa bioaktivnih peptida.

Peptidi iz α -Laktalbumina i β -Laktoglobulina

Peptidi sa ACE-inhibitornom aktivnošću izvedeni iz kazeina se nazivaju kazokinini, dok se oni izvedeni iz surutke (α -La, β -Lg) nazivaju laktokinini²⁷⁷. Inhibicija ACE enzima se obično meri kao koncentracija nekog jedinjenja potrebna da inhibira 50,0% prvobitne ACE aktivnosti enzima²⁷⁸. Heptapeptid *ALPMHIR* poreklom iz β -Lg je do danas najsnažniji ACE-inhibitor ($IC_{50}=43,0$ uM) izolovan iz surutke. Tripsin je najrasprostranjeniji enzim za proizvodnju hidrolizata sa ACE-inhibitornom aktivnošću. Trenutno, glavni izazov u proizvodnji bioaktivnih peptida enzimskom hidrolizom *in vitro* je pronalaženje odgovarajućeg enzima i uslova hidrolize koji pri proizvodnji poboljšavaju bioaktivnost i prinos peptida. Razlaganje α -La i β -Lg različitim enzimima (npr. pepsin, α -himotripsina, pankreatin, elastaze ili karboksipeptidaze A i B) ukazuje da je tripsin neophodan za proizvodnju peptida visoke ACE-inhibitorne aktivnosti iz ovih proteina surutke²⁷⁹, npr. peptidi f (104-108) i f (142-148), dobijeni iz α -La i β -Lg pomoću tripsina, poseduju ACE inhibitornu aktivnost 77,0 i 43,0 uM, respektivno. Sa druge strane, gastrointestinalna proteaza elastaza je povezana sa lošim prinosom ACE-inhibitornih peptida iz α -La i β -Lg^{280,279}. Proteaza N Amano (EK 3.4.24.28) je komercijalna proteolitička mešavina proizvedena fermentacijom pomoću *Bacillus subtilis*, koja proizvodi veoma složenu mešavinu peptida. Treba naglasiti da visoka ACE-inhibitorna aktivnost *in vitro* ne podrazumeva visoku antihipertenzivnu aktivnost *in vivo*; nažalost, samo nekoliko *in vivo* studija obuhvatilo je ispitivanje hidrolizata proteina surutke^{281,282,283}, i one shodno tome pružaju samo ograničenu potvrdu te tvrdnje. Postojanje (negativne) korelacije između *in vitro* ACE inhibitorne aktivnosti i *in vivo* smanjenja krvnog pritiska je ilustrovano u literaturi²⁸⁴. Hidrolizati dobijeni dejstvom tripsina i aktinaze (proteinaze iz *Actinomyces* spp.) poseduju relativno visoku *in vitro* ACE inhibitornu aktivnost (141,0 uM), ali prouzrokuju

relativno veliki pad krvnog pritiska kod spontano hipertenzivnih pacova, dok hemijski sintetisan laktozin B (APLM) pokazuje visoku IC_{50} vrednost (928,0 uM), ali veoma slabu ACE-inhibitornu aktivnost²⁸⁴. Pored inhibicije ACE, tačan molekularni mehanizam kojim bioaktivni peptidi vrše svoj antihipertenzivni efekat nije u potpunosti jasan, ali se sve uglavnom svodi na povećanje vaskularnog opuštanja. Trenutno se za proteinski izolat, poznat kao BioZate (Danisco Foods International, Le Sueur, MN,) koji čine fragmenti β -Lg dobijeni hidrolizom surutke, tvrdi da smanjuje krvni pritisak. Studija koja je sprovedena za BioZate proizvod na 30 granično hipertenzivnih osoba u okviru 6 nedelja, u kojoj je placebo proizvod bio nehidrolizovani izolat proteina iz surutke, dala je za rezultat smanjenje krvnog pritiska od 8,0 mmHg stuba kod osoba koje su ga konzumirale, u poređenju sa placebo grupom²⁸⁵.

Peptidi sa antimikrobnom i imunomodulatornom aktivnošću

Peptidi iz α -Laktalbumina i β -Laktoglobulina

Peptidi proizvedeni proteolitičkom razgradnjom α -La i β -Lg pomoću endopeptidaza^{286,287} poseduju baktericidna svojstva, uglavnom prema Gram pozitivnim bakterijama. Hidroliza proteina surutke takođe menja biološku aktivnost proteina u pogledu njihove sposobnosti da promene imunološki sistem (imunomodulacija).

Dva sintetička peptida, YG i YGG, koja odgovaraju frakcijama f(50-51) i f(18-20) iz α -La, respektivno, poboljšavaju *in vitro* proliferaciju i sintezu proteina A-stimulisanih humanih limfocita periferne krvi. Nedavno, određene peptidne frakcije surutke dobijene hidrolizom pomoću tripsina i himotripsina su pokazale sposobnost modulacije imunog odgovora kod nezaraženih miševa i miševa zaraženih *E. coli*, izazivanjem povećanja IgA u odsustvu infekcije²⁸⁸. Antibakterijska aktivnost i imunostimulatorna aktivnost hidrolizata α -La i β -Lg imaju sinergističko dejstvo²⁸⁹. Ovi hidrolizati ne samo da stimulišu autolitički sistem prirodno autolizirajućih i nekih prirodno neautolizirajućih sojeva mikroorganizama, već povećavaju fagocitnu sposobnost peritonealnih makrofaga kod miševa posle oralne primene.

Peptidi iz κ -kazeina

Glikomakropeptid se nalazi u slatkoj (ali ne u kiseloj) surutki i oslobađa se kada himozin (glavni enzim sirila) deluje na κ -kazein u primarnoj fazi proizvodnje sira koja dovodi do taloženja α_s -kazeina i β -kazeina. Glikomakropeptid se sastoji od 64 AA ostataka, sa

ukupnom molekularskom masom od 6,7 kDa. Unutar GMP nalazi se jedinstvena AA sekvenca u kojoj aromatične AA nisu prisutne, ali je sekvenca bogata AA razgranatog lanca. Step en glikozilacije GMP je promenljiv i pod uticajem je faze laktacije i genetskog fenotipa κ -kazeina²⁹⁰. Metabolička aktivnost GMP zavisi od sadržaju i strukture šećernih ostataka, koji učestvuju u stabilizaciji celog κ -kazein kompleksa. Najvažnije ugljenohidratne komponente su N-acetilneuraminska kiselina i N-acetilgalaktozamin²⁹¹. Put razgradnje zavisi od ugljenohidratnih grupa koje određuju biološku funkciju GMP, još uvek nije dovoljno razjašnjen; u stvari, manji peptidi bez šećernih jedinica koji se oslobađaju hidrolizom pomoću tripsina i himotripsina ne mogu sačuvati biološku funkciju originalnog GMP. *In vitro* postupci su pokazali da GMP sprečava lepljenje kariogenih bakterija na površinu zuba, što ukazuje da je ovaj peptid surutke sposoban da inhibira nastanak dentalnog plaka i karijesa²⁹². Ovaj glikoprotein ispoljava antivirusnu aktivnost prema hemaglutininu iz virusa gripa²⁹³. Osim toga, razgradnja GMP dejstvom pepsina dovodi do povećanja fagocitne aktivnosti, što ukazuje da povećanje imunostimulatornog efekta usled stvaranja fragmenata GMP tokom procesa razgradnje pepsinom. Li i Mine (2004)²⁹⁴ su takođe pokazali da je i ugljenohidratna i polipeptidna kompozicija lanca GMP neophodna za ispoljavanje takvog stimulatornog efekta.

Ostali bioaktivni peptidi

Za razliku od osnovnih proteina surutke, malo se zna o mogućim prednostima kiselih proteina surutke. Kisela (tj. sa niskom izoelektričnom tačkom) proteinska komponenta surutke sadrži fosforilisane proteine i peptide²⁹⁵, od kojih neki mogu igrati ulogu u apsorpciji kalcijuma. Pored toga, kisela proteinska komponenta surutke sadrži osteopontin i njegove fragmente koji su od suštinske važnosti za mineralizaciju kostiju²⁹⁶. Kisela proteinska komponenta surutke izolovana iz koncentrata proteina surutke ima antiresorptivni efekat *in vitro*²⁹⁷, i ispoljava koštanu bioaktivnost *in vivo* kod pacova kod kojih su uklonjeni jajnici²⁹⁸.

Proteoza-pepton komponenta 3 (PP3) je fosforilovan glikoprotein izolovan iz kravljeg mleka, ali obično u slobodnom obliku samo u surutki²⁹⁵, takođe je poznat kao laktoforicin. Sastoji se iz polipeptidnog lanca sa 135 AA ostataka. Tačna *in vivo* funkcija PP3 još nije dovoljno istražena, međutim, nekoliko studija²⁹⁹ je pokazalo da PP3 ima sposobnost da

inhibira aktivnost lipoprotein lipaza, što ukazuje na potencijalnu ulogu inhibitora spontane lipolize u mleku. Prema nekim imunološkim studijama, ostaci PP3 nađeni u globulama mlečne masti pokazuju da PP3 formira multimerne agregate u kravljjoj surutki³⁰⁰. Obzirom na sposobnost formiranja frakcije f (113-135) C-terminalnog peptida iz kravljeg PP3, moguće je da je ovaj peptid u interakciji sa prirodnim lipidnim dvoslojem, koji je sličan bakterijskoj membrani. Na osnovu ovih saznanja izvedeni su i antimikrobni i hemolitički testovi, koristeći odgovarajući sintetički peptid koji su pokazali da on predstavlja inhibitor rasta Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, ali nije dokazana njegova hemolitička aktivnost u testiranom koncentracijskom opsegu (<200,0 uM)³⁰¹.

Hidroliza proteina, proteina surutke posebno, poboljšava svarljivost (reguliše proces varenja) i smanjuje nivo holesterola. Poboljšanje svarljivosti je korisno za pacijente koji boluju od digestivnih poremećaja kao što su cistična fibroza, sindrom kratke utrobe ili pankreatitis, i poboljšanje stanja ovih pacijenata se može lako postići primenom hidrolizovanih proteina surutke³⁰².

2.4.2. Senzorne karakteristike napitaka na bazi surutke

Senzorna svojstva probiotskih napitaka na bazi surutke predstavljaju kriterijum koji je od presudnog značaja za plasiranje proizvoda na tržište i pridobijanje potrošača. Prema navodima iz literature, od senzornih svojstava neophodno je da napitak poseduje zadovoljavajući ukus, miris i izgled. Ukus ovih napitaka može varirati od kiselog, preko slatkog, do gorkog, izgled može biti narušen pojavom taloga, dok miris može biti svež, kiseo i sladak¹⁷⁵. Pri čuvanju proizvoda osnovni problem koji se može javiti je post-acidifikacija koja dovodi do narušavanja senzornih svojstava, kao i odumiranja ćelija čime proizvod može izgubiti svoj probiotski karakter. Prilikom post-acidifikacije, vrednost pH se može spustiti ispod 4,5 što dovodi do odumiranja probiotskih bakterija^{169,170}, do pojave kiselog ukusa i mirisa zbog novonastale mlečne kiseline. Takođe, pH 4,5 predstavlja izoelektričnu tačku proteina surutke³⁰³, pa postizanjem ove pH vrednosti može doći do razgradnje proteina i pojave taloga koji narušava izgled proizvoda.

2.4.2.1. Ukus i miris

Miris i ukus fermentisanih proizvoda se karakterišu prisustvom brojnih isparljivih bakterijskih metabolita, od kojih su neki nusproizvodi mlečne fermentacije ili su proizvedeni putem drugih reakcionih mehanizama. Sama mlečna kiselina je jedno od glavnih jedinjenja koje značajno doprinosi ukusu jogurta³⁰⁴. Miris i ukus jogurta uglavnom potiču od prisustva neisparljivih ili isparljivih kiselina i karbonilnih jedinjenja, a posebno se smatra da funkcionalne grupe karbonilnih jedinjenja imaju značajan uticaj na finalnu aromu jogurta zbog njihovih relativno visokih koncentracija³⁰⁵. Najvažnije aromatične komponente koje učestvuju u formiranju ukusa i mirisa su acetaldehid, aceton, acetoin i diacetil a takođe tu spadaju sirćetna, mravlja, buterna i propionska kiselina. Tipična aroma jogurta uglavnom potiče od acetaldehida, koji se smatra najznačajnijim jedinjenjem u formiranju ukusa. Prema navodima iz literature acetaldehid je najvažniji sastojak jogurtne arome i visoke koncentracije acetaldehida su neophodne za postizanje poželjnog ukusa jogurta^{306,307}. Visoke koncentracije acetaldehida (u opsegu od 5,0 do 21,0 ppm) uglavnom postoje usled veoma niske stope iskorišćavanja ovog jedinjenja od strane mikroorganizama. Nedostatak enzima alkohol-dehidrogenaze kod bakterija, koji je odgovoran za konverziju acetaldehida u etanol, je kako se pretpostavlja osnovni razlog slabog korišćenja acetaldehida³⁰⁸. Neki istraživači su pokazali da je netipično slaba aroma rezultat prisustva manje od 4,0 ppm acetaldehida, dok dobar ukus nastaje kada je ovo jedinjenje prisutno u količini većoj od 8,0 ppm³⁰⁹. Za najvažniju putanju u formiranju acetaldehida smatra se razgradnja treonina i glicina do acetaldehida, i enzim odgovoran za katalizu ove reakcije, treonin aldolaza, je prisutna kod oba mikroorganizma koji su sastavni deo jogurtne kulture (*L. bulgaricus* i *S. thermophilus*). Aktivnost treonin aldolaze kod *S. thermophilus* je značajno smanjena pri većim temperaturama rasta od 30,0 do 42,0 °C^{310,311}, dok kod *L. bulgaricus* njena aktivnost ostaje nepromenjena. Obzirom da se jogurt proizvodi na višim temperaturama, očekuje se da acetaldehid bude uglavnom proizveden od strane *L. bulgaricus*
312

Kasnijim istraživanjima je takođe utvrđeno da neki proizvodi sa niskim sadržajem acetaldehida još uvek imaju tipičnu jogurtanu aromu, što sugerise da je acetaldehid samo jedna od komponenti jogurtne arome a ne njen jedini element³¹³. Lindzi i sar. (1965)³¹⁴ su pokazali

da je oštar ukus izazvan hiperprodukcijom acetaldehida u vezi sa produkcijom diacetila. Uprkos kontradikciji oko uloge diacetila u ukupnoj aromi jogurta, diacetil je drugo glavno jedinjenje koje učestvuje u formiranju arome³¹⁵. *S. thermophilus* se od strane pojedinih istraživača smatra kao isključivo odgovoran za proizvodnju diacetila³¹⁶ dok neki istraživači podržavaju tvrdnju da je *L. bulgaricus* glavni nosilac proizvodnje diacetila³¹⁷. Za prekursore u proizvodnji diacetila uglavnom se smatraju laktoza i citrat³¹⁸. Osim ovih jedinjenja utvrđeno je da i mnoga druga jedinjenja doprinose aromi krajnjeg proizvoda, uključujući 2,3-butandion, 2,3-pentandiona, dimetil-sulfid i benzaldehid³⁰⁵. Takođe u istraživanjima Ott i sar. (1997)³¹⁹ jedinjenja među kojima 1-octen-3-on, 1-nonen-3-on, metional, 2-metil-tetrahidro-tiofen-3-on, (2E)-nonenal i gvajakol su označena kao nosioci intenzivnog mirisa i jogurtne arome. Iz svega navedenog može se primetiti da acetaldehid značajno doprinosi jogurtnoj aromi, ali nije jedini sastojak arome već da je neto aromatični efekat rezultat kombinacije svih prisutnih aromatičnih komponenti. Tokom ispitivanja ukusa i mirisa tradicionalnih kiselih i blagih jogurta, od strane panela obučanih degustatora korišćenjem opisnih skala, uočeno je postojanje bitnih razlika u ukusu jogurta koje su poticale uglavnom od razlike u njihovoj kiselosti a ne od razlike u koncentracijama prisutnih aromatičnih jedinjenja (acetaldehid, 2,3-butandion i 2,3-pentandion)³²⁰. Ovo zapažanje naglašava važnost kiselosti jogurta u doživljaju njegovog ukusa.

2.4.2.2. Tekstura - Sinerezis i viskozitet

Tekstura i senzorne karakteristike fermentisanih proizvoda (npr. osećaj u ustima i kremasta struktura) su od ključne važnosti za prihvatljivost proizvoda od strane potrošača³²¹. Glavni procesni parametri koji utiču na teksturu fermentisanih proizvoda uključuju^{322,323,324}:

- Primenjene materije i njihove količine;
- Tip i količina stabilizatora;
- Sadržaj masti i uslovi homogenizacije;
- Uslovi termičke obrade;
- Starter kultura (tip, aktivnost i proizvodnja egzopolisaharida);
- Temperatura inkubacije (utiče na rast starter kulture, agregaciju gela i čvrstoću);
- pH vrednost pri razbijanju ili sečenju gela;

- Uslovi hlađenja;
- Postproizvodna obrada (npr. fizička ili temperaturna).

Povećan sadržaj kazeina i masti (homogenizovane) dovodi do veće čvrstine i viskoznosti proizvoda. Matriks u većini fermentisanih proizvoda se sastoji se od kazeinskih čestica, tako da povećanje broja ovih čestica dovodi direktno do unapređenja čvrstine i viskoznosti proizvoda. Prirodne globule mlečne masti nisu u interakciji sa kazeinskim matriksom ali pri homogenizaciji one dobijaju proteinsku membranu što im omogućava da deluju kao "pseudo kazeinske čestice"³²³.

Povećanje sadržaja proteina surutke i smanjenje odnosa kazeina i proteina surutke povećava čvrstinu gela pri tretiranju visokim temperaturama (koje su potrebne radi denaturacije proteina surutke i njihove asocijacije sa kazeinskim micelama). Prekomerni dodatak proteina surutke (u zavisnosti od proizvoda i uslova obrade) može dovesti do pojave zrnaste teksture proizvoda³²². Za proizvode tipa jogurta, primena nižih temperatura inkubacije (npr. 40,0 °C umesto 45,0 °C) dovodi do nešto dužeg trajanja procesa geliranja ali i do stvaranja čvršćih i viskoznijih gelova koji su manje skloni izdvajanju surutke³²⁴. Korišćenje nižih temperatura inkubacije može omogućiti formiranje gelova sa nižim sadržajem čvrstih čestica i/ili stabilizatora. Tako npr. kod proizvodnje Švapskog sira, vrlo niske temperature (npr. 20,0 °C) daju mekše gelove u poređenju sa nešto višim temperaturama (npr. 26,0 °C) što je verovatno posledica veoma sporog procesa geliranja. Pri smanjenju pH vrednosti od 5,1 do 4,6 do kog dolazi tokom procesa proizvodnje fermentisanih proizvoda javlja se povećanje čvrstoće gela. Daljim snižavanjem pH vrednosti (npr. do 4,0) dolazi do obrnutog procesa koji se ogleda u omekšavanju nastalog gela, a koji je posledica povećanja dejstva odbojnih sila među molekulima proteinskog matriksa.

Novi postupci koji se razvijaju u cilju poboljšanja teksture fermentisanih proizvoda podrazumevaju primenu stabilizatora, raznih sastojaka izvedenih iz mleka, različitih tipova koncentrata ili proteinskih frakcija, specifičnih kultura mikroorganizama (npr. producenata egzopolisaharida), različitih enzima npr. transglutaminaza za unakrsno povezivanje mlečnih proteina, visokog hidrostatičkog pritiska (>200 MPa) radi izazivanja denaturacije proteina surutke i veoma visokog pritiska pri homogenizaciji proizvoda.

2.5. Zdravstveni doprinos funkcionalnih napitaka na bazi surutke

2.5.1. Uloga surutke u prevenciji bolesti

Uticaj na metabolizam lipida i glukoze

U dosadašnjim istraživanjima izneta je činjenica da dugoročni unos proteina surutke (12 nedelja) ima uticaj na smanjenje koncentracije triglicerida kod gojaznih i osoba sa prekomernom težinom^{325,326,327}. Iako mehanizmi uticaja proteina surutke na triacilglicerol nisu do kraja razjašnjeni, Mortensen i sar.³²⁸ govore o tome da unošenje obroka koji sadrži surutku ima za rezultat smanjene proizvodnje hilomikrona i ubrzano uklanjanje hilomikrona, koje proizilazi iz stimulacije lipoproteinskih lipaza. Pal i sar.³²⁶ dodatno podržavaju ovaj rezultat navodeći da usled efekata surutke na varenje i apsorpciju dolazi do smanjenja količine cirkulišućih hilomikrona bogatih triacilglicerolom. Pored toga, McGregor i sar.³²⁹ ističu pozitivan uticaj proteina surutke na nivo lipida, uključujući smanjenje triglicerida, slobodnih masnih kiselina i hilomikrona bogatih lipoproteinima posle obroka sa visokim sadržajem masti kod pacijenata sa dijabetesom Tip 2. Brojne studije su takođe pokazale da postoji uticaj proteina surutke na metabolizam glukoze i insulina^{330,326}. Većina od ovih studija je pokazala da unos proteina surutke smanjuje nivo glukoze i insulina u krvi, uključujući 11,0% smanjenja nivoa insulina posle 12 nedelja unosa proteina surutke (54,0 g/dan) kod odraslih³²⁶. Sa druge strane, McGregor i sar. ukazuju da proteini surutke povećavaju nivo insulina kod osoba sa dijabetesom Tip 2³²⁹. Oni takođe iznose činjenicu da su akutni efekti proteina surutke na nivo glukoze u krvi uporedivi sa efektima lekova iz grupe sulfonilurea kao i farmaceutskih zamena za insulin koje se koriste za kontrolu hiperglikemije kod obolelih od dijabetesa Tip 2. Nasuprot tome, Hoppe i sar. prijavljuju da unos 10,5 g/dan surutkinih proteina tokom 7 dana povećava nivo insulina za 7% kod mladih momaka, što ukazuje na povećanje otpornosti na insulin³³¹. Proteini surutke, putem bioaktivnih peptida i aminokiselina koje nastaju tokom varenja, pojačavaju oslobađanje nekoliko hormona koji dovode do smanjenog unosa hrane i povećanja sitosti, uključujući holecistokinin, peptid II, glukoza-zavisni insulinotropni polipeptid (GIP), glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) i insulin. Sekretija insulina je povezana sa smanjenjem

koncentracije glukoze i kontrolom unosa hrane. Dobijeni rezultati povećanja sitosti, termogeneze, i smanjenja glukoze u krvi, koji se mogu uporediti sa farmaceutskim tretmanom, podržavaju upotrebu proteina surutke u regulaciji dijabetesa Tip 2 i gojaznosti³³².

Uticaj na metabolizam mišića

Po pitanju uticaja na mišićni metabolizam fokus se stavlja na izobilje aminokiselina poreklom iz proteina surutke, korisnih za sportiste i pojedince koji naporno vežbaju, i njihovog uticaja na sintezu mišića³³³. Unos proteina i neophodnih aminokiselina pre ili posle vežbanja može povećati sintezu mišićnih proteina i rezultirati pozitivnim neto proteinskim bilansom, korisnim kod mišićne hipertrofije³³⁴. Naporno vežbanje nakon koga sledi unošenje proteina surutke stimuliše sintezu proteina u mišićima³³⁵ i isključuje moguća oštećenja proteina nastala vežbanjem³³³. Lollo i sar.³³⁶ su poredili efekte 3 vrste proteinskih suplemenata (proteini surutke, hidrolizat proteina surutke i kazein) na telesnu kompoziciju, biohemijske parametare, i performanse kod najboljeg brazilskog profesionalnog fudbalskog tima tokom sezone turnira. Suplementacija proteina odmah nakon treninga tokom takmičarskog perioda bila je korisan i bezbedan način da fudbaleri zadrže ili čak povećaju mišićnu masu. Proteini surutke i hidrolizat proteina surutke, posebno su favorizovali održavanje početnog sastava mišićne mase. McGregor³²⁹ predočava da unos proteina mleka u kombinaciji sa vežbanjem može rezultirati većom hipertrofijom skeletnih mišića, iz čega proizilazi povećanje insulinske osetljivosti, metaboličke kontrole i bazalnog metabolizma. Tipton i sar.³³⁷ takođe ukazuju da unos proteina surutke rezultira povećanjem neto mase mišića posle napornih treninga. Akutna, rana faza, sinteze mišićnih proteina posle vežbanja takođe je bila veća nakon unošenja hidrolizata proteina surutke u odnosu na kazein³³⁸.

2.5.2. Uloga surutke u lečenju bolesti

Zahvaljujući visokom sadržaju bioaktivnih jedinjenja u surutki, uključujući laktoferin, imunoglobuline, glutamin i laktalbumin, proteini surutke su povezani sa smanjenjem rizika nastanka metaboličkih poremećaja i drugih bolesti.

Uloga surutke u lečenju raka

Brojne studije na životinjama su se bavile ispitivanjem antikancerogenog potencijala surutke, i veruje se da je prvenstveno povezan sa antoksidativnim, detoksikujućim i imunomodulatornim efekatom GSH i laktoferina³³⁹. U prisustvu laktoferina, rak debelog creva kod pacova je pokazao smanjenu ekspresiju, dok je metastaziranje primarnih tumora bilo znatno inhibirano^{340,341}. Rezultati *in vitro* studija su takođe bili ohrabrujući, demonstrirajući inhibiciju nekih od važnih koraka u razvoju raka dojke koji je tretiran goveđim proteinom BSA (goveđi serum albumin), iako mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni³⁴². Nekoliko kliničkih ispitivanja je pokazalo da visok nivo GSH u tumorskim ćelijama daje rezistenciju prema hemoterapeutskim agensima. Jedna od studije je pokazala da je od 20 bolesnika u fazi IV maligniteta koji su tretirani svakodnevno sa 40,0 g surutke u kombinaciji sa dodacima kao što je askorbinska kiselina i multivitaminske/mineralne formule³⁴³, 16 preživelih imalo povećanje nivoa funkcije ćelija prirodnih ubica, GSH, hemoglobina i hematokrita nakon 6 meseci primene.

Uloga surutke u lečenju hepatitisa

Rezultati ispitivanja uticaja surutke na virus hepatitisa B su bili pozitivni, posebno oni iz studije koja je obuhvatala 8 pacijenata tretiranih sa 12,0 g surutke/dan³⁴⁴. Pacijenti su imali poboljšanje markera funkcije jetre, smanjenje nivoa lipid peroksidaze u serumu, i povećanu interleukin-2 aktivnost kao i aktivnost ćelija prirodnih ubica. U pogledu hepatitisa C, postoji nekoliko neubedljivih studija, iako je polazna *in vitro* studija u tim istraživanjima pokazala da je goveđi laktoferin delotvoran u prevenciji hepatitisa C³⁴⁵.

Uloga u lečenju kardiovaskularnih bolesti

Prema rezultatima velikog broja studija, mleko i mlečni proizvodi mogu smanjiti krvni pritisak i rizik od pojave hipertenzija³³⁹. Klinička studija koja je trajala 8 nedelja u kojoj je učestvovalo 20 zdravih muškaraca koji su konzumirali kombinaciju fermentisanog mleka i koncentrata proteina surutke dala je kao rezultat ispitivanja seruma veći sadržaj lipoproteina velike gustine, niži sadržaj triglicerida i niži sistolni krvni pritisak³⁴⁶. Pal i sar. su takođe publikovali studiju uticaja proteina surutke na kardiom metaboličke faktore rizika u kojoj su mnogi od navedenih rezultata demonstrirali koristan efekat surutke na kardiovaskularne

bolesti. Poboljšanje u pogledu smanjenja gojaznosti unosom surutke možda najviše doprinose snižavanju krvnog pritiska³⁴⁷.

Uloga surutke u lečenju hipertenzije

Hipertenzija je glavni problem po pitanju javnog zdravlja, a njen specifični tretman verovatno utiče na smanjenje rizika od razvoja kardiovaskularnih oboljenja. U velikom broju istraživanja zastupa se hipoteza da pojedini bioaktivni peptidi formirani nakon hidrolize proteina prisutnih u hrani imaju sposobnost inhibicije ACE, a ova tema je detaljno razmatrana u velikom broju studija³⁴⁶. Generalna tvrdnja se odnosi na to da je ishrana bogata namirnicama koje sadrže antihipertenzivne peptide efikasno sredstvo za prevenciju i lečenje hipertenzije. ACE inhibitorni peptidi se mogu dobiti iz prekursora proteina hrane putem enzimske hidrolize, upotrebom živih ili liziranih mikroorganizama ili specifičnih proteaza^{348,349}. Međutim, studije koje se odnose na peptide surutke sa ACE inhibitornom aktivnošću su u određenoj meri ograničene; uglavnom zbog krute strukture β -laktoglobulina, što ga čini posebno otpornim na dejstvo enzima. ACE inhibitorni peptidi mogu smanjiti krvni pritisak u procesu koji je delimično regulisan od strane renin-angiotensin sistema. Renin je proteaza, koja se luči kao odgovor na razne fiziološke stimulanse, koja cepa protein angiotenzinogen proizvodeći neaktivni dekapeptid angiotenzina I. Pored toga, ACE deluje na kalikrein-kinin sistem, katalizujući razgradnju nonapeptida bradikininina, koji je vazodilatator³⁵⁰, a ACE inhibitorni peptidi ispoljavaju hipotenzivni efekat sprečavanjem formiranja angiotenzin II i degradacijom bradikininina.

Uloga surutke u lečenju osteoporoze

Caroli i sar.³⁵¹ su u svojoj nedavno objavljenoj studiji objavili vezu između unosa mlečnih proizvoda i zdravlja kostiju, u kojoj naglašavaju postojanje složene veze između mleka i mlečnih proizvoda i osteoporoze. Osnovni protein mleka (milk basic protein-MBP) je komponenta surutke koji demonstrira sposobnost ne samo suzbijanja resorpcije kostiju već i stimulacije proliferacije i diferencijacije ćelija osteoblasta³³⁹. MBP pre svega sadrži laktoferin i laktoperoksidazu. Ispitivanja na životinjama sugerišu da je laktoferin ključna aktivna komponenta, koji stimuliše aktivnost osteoblasta³⁵². Unos kalcijuma je najkritičniji nutritivni faktor u postizanju optimalnog pika koštane mase i uvećanje mineralne mase kostiju. Prema

brojnim kliničkim ispitivanjima dnevne doze od 40,0 mg MBP (ekvivalent 400-800 mL mleka) su dovoljne za značajno povećanje koštane gustine i smanjenje resorpcije kostiju^{353,354,355}.

Uloga surutke u lečenju gastrointestinalnog sistema

Surutka se veoma često koristi i kao podrška gastrointestinalnom zdravlju. Njena uloga u zaštiti sluzokože je dokumentovana u nekoliko studija na životinjama i pretpostavlja se da je povezana sa njenim GSH-stimulišućim svojstvom³³⁹. Osim njene uloge u sintezi GSH, glutamat može igrati dodatnu ulogu kada se konvertuje u glutamin, aminokiselinu koja se koristi kao gorivo od strane crevne sluznice³⁵⁶. Formule bazirane na peptidima surutke u manjoj meri izazivaju dijareju od formula baziranih na kazeinu zbog bolje i brže resorpcije (neobjavljeni podaci). Obzirom da je kod teško obolelih pacijenata funkcija varenja značajno narušena, proteini surutke igraju značajnu ulogu u zaštiti od dijareje i pratećih komplikacija.

Uloga surutke u lečenju sarkopenije i trošenju mišićne mase

Proteini surutke i esencijalne aminokiseline promovišu smanjenje masnog tkiva i povećavaju sintezu mišićnih proteina tokom nisko kaloričnih dijeta kod starijih i gojaznih osoba³⁵⁷. Sarkopenija je udružena sa smanjenom sintezom mišićnih proteina kao odgovorom na unos hrane. Razlika u varenju i apsorpcionoj kinetici dijetetskih proteina ili njihovih aminokiselina, ili oboje, modulira nagomilavanje proteina u mišićima. Pennings i sar.³⁵⁸ su poredili varenje proteina, apsorpcionu kinetiku i nagomilavanje proteina mišića nakon uzimanja surutke, kazeina i hidrolizata kazeina kod zdravih starijih osoba i zaključili da proteini surutke stimulišu nagomilavanje proteina mišića efikasnije nego kazein i hidrolizat kazeina kod starijih muškaraca. Ovaj efekat se pripisuje kombinaciji bržeg varenja i apsorpcije surutke i većim sadržajem leucine, što doprinosi u prevenciji sarkopenije i trošenja mišićne mase.

Pored svega navedenog, nekoliko studija naglašava da surutka može biti indikovana kao terapija kod alergija, dijabetesa, amiotrofične lateralne skleroze i opekotina. Međutim, dokazi za kliničku efikasnost u ovim stanjima su ograničeni, posebno po pitanju doza i dužine trajanja terapije.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Bakterije mlečne kiseline:

Lactobacillus acidophilus antibiophilus (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus casei ssp. *casei* NRRL B-441 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus casei ssp. *casei* ATCC 27139 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* NRRL B-1924 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* NRRL B-4525 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus gasseri NRRL B-14168 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus gasseri NRRL B-4240 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus helveticus ATCC 15009 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus helveticus NRRL B-734 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus johnsonii NRRL B-2178 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus paracasei ssp. *paracasei* NRRL B-4564 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus reuteri ATCC 23272 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Lactobacillus rhamnosus TM1 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermanii* NRRL B-3524 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Streptococcus thermophilus S2 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Streptococcus thermophilus CNRZ S3 (389) (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Streptococcus thermophilus S36 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Streptococcus thermophilus S39 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Bifidobacterium bifidum NRRL B-41410 (Kolekcija laboratorije za mikrobiologiju TMF, Beograd)

Komercijalna ABY-6 kultura:

Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus* (80,0%, m/m)

Lactobacillus acidophilus (13,0%, m/m)

Bifidobacterium bifidum (6,0%, m/m)

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* (1,0%, m/m)

3.1.2. Materijali

Antibiogram test tablete: Tetraciklin (30,0 µg), Ampicilin (30,0 µg), Streptomycin (30,0 µg), Kanamicin (30,0 µg), Hloramfenikol (30,0 µg), Penicilin (10,0 IU), Eritromicin (15,0 µg), Gentamicin (15,0 µg), Vankomicin (30,0 µg), Nalidiksična kiselina (30,0 µg), Torlak, Srbija
Agar, Torlak, Beograd, Srbija

De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Torlak, Beograd, Srbija

Ekstrakt kvasca, Torlak, Beograd, Srbija

Goveđa žuč, Torlak, Beograd, Srbija

Hranljivi bujon, Torlak, Beograd, Srbija

M17 bujon, Biolife, Italiana s.r.l., Viale Monza, Milano, Italija

Mesni ekstrakt, Torlak, Beograd, Srbija

Mleko 0,5% m.m., Imlek, Beograd, Srbija

Pepton-1, Torlak, Srbija

Pepton-4, Torlak, Beograd, Srbija

Polisorbat 80, Tween 80, DIFCO, BD, SAD

Sok od jabuke (Foodland d.o.o., Beograd, Srbija)

Sok od šargarepe (Foodland d.o.o., Beograd, Srbija)

Surutka u prahu, LENIC Laboratories, Beograd, Srbija

Sveža surutka, Imlek a.d., Beograd, Srbija

Tripton soja, Torlak, Beograd, Srbija

Ugljenihidrati: Arabinoza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Ksilozna (Acros Organics, New Jersey, SAD), Ramnoza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Galaktoza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Fruktioza (Centrohem, Beograd, Srbija), Manoza (Acros Organics, New Jersey, SAD), Saharozna (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Celobioza (Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Maltoza (Torlak, Bgd, Srbija), Laktoza (Torlak, Bgd, Srbija), Trehalozna (Acros Organics, New Jersey, SAD), Rafinoza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Melobioza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Riboza (Acros Organics, New Jersey, SAD), Sorbitol (Fluka, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Inulin (Sigma-Aldrich, Gilligham, UK), Salicin (Sigma-Aldrich, Gilligham, UK).

Pektin, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Želatin (svinjski), Dr. Oetker, Janossomorja, Mađarska.

Koncentrat proteina surutke WPC-80, LENIC Laboratories, Beograd, Srbija

3.1.3. Supstance p.a čistoće

3,5-dinitrosalicilna kiselina ($C_7H_4N_2O_7$), Acros Organics, New Jersey, SAD

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Akrlamid (C_3H_5NO), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Amonijum-citrat ($(NH_4)_3C_6H_5O_7$), Hemos, Beograd, Srbija

Amonijum-persulfat ($H_8N_2O_8S_2$) (APS), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Amonijum-sulfat ($(NH_4)_2SO_4$), Hemos, Beograd, Srbija

β -Merkaptoetanol (C_2H_6SO), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Bromfenol plavo ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Cink-sulfat ($ZnSO_4$), Hemos, Beograd, Srbija

Etilen-glikol ($C_2H_6O_2$), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Glicerol ($C_3H_5(OH)_3$), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Glicin (NH_2CH_2COOH), Biochemica, Sigma-Aldrich Chemi GmbH, China

Gvožđe-trihlorid ($FeCl_3$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Hlorovodonična kiselina (HCl), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Kalijum-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska
Kalijum-fericijanid ($\text{C}_6\text{FeK}_3\text{N}_6$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Kalijum-natrijum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$), Centrohema, Beograd, Srbija
Leucin ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Magnezijum-sulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
Mangan-sulfat (MnSO_4), Hemos, Beograd, Srbija
Metanol (CH_4O), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
 $\text{N,N}'$ -Meten-bis-akrilamid ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$) (Bis-Akrlamid), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Natrijum-acetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), EuroHemija, Beograd, Srbija
Natrijum-hlorid (NaCl), Centrohema, Beograd, Srbija
Natrijum-hidrogen-karbonat (NaHCO_3) Centrohema, Beograd, Srbija
Natrijumdodecil-sulfat ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), Centrohema, Beograd, Srbija
Natrijum-hidroksid (NaOH), Centrohema, Beograd, Srbija
Ortoftalaldehid (OPA) ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Sirćetna kiselina (CH_3COOH), Centrohema, Beograd, Srbija
Tetrametiletendiamin ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) (Temed), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Trihlor sirćetna kiselina ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Tris(hidroksimetil)aminometan ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Tris), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin B₁ ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$) (Tiamin), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin B₂ ($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$) (Riboflavin), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin B₅ ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$) (Pantotenska kiselina), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin B₆ ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{P}$) (Piridoksin), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin I ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Inozitol), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin C ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Askorbinska kiselina), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Vitamin H ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) (Biotin), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Pronaza E, Calbiochem-Behring Corp.

3.1.4. Uređaji

Analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)

Autoklav (Sutjeska, Beograd)

Centrifuga (Sigma model 2-16, Shropshire, Engleska)
Homogenizator (Yellowline, DI 25 basic, Ica Works Inc., Wilmington)
Električna peć za žarenje (Instrumentaria (50-1200 °C), Hrvatska)
Električni rešo Bauer GH-525 (JTD Ltd., Severna Koreja)
Uređaj za vertikalnu elektroforezu (LKB SE 600 Ruby, Power Supply EPS601, Amershom Bioscience)
Laboratorijska sušnica (Sutjeska (60-200 °C), Fabrika medicinskih uređaja, Beograd)
Magnetna mešalica (ARE Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica srl, Italija)
Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemacka)
pH-metar (inoLab pH 720, Nemacka)
Tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000)
Termostat za rast mikroorganizama (Mettler, Nemacka)
Ultrazvučno kupatilo, tip USK 28, radna frekvencija 40 kHz (EI, Niš, Niš)
UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, Engleska)
Vakuum sušnica (Binder VD 23, Binder GmbH, Nemacka)
Viskozimetar (Brookfield DV II+Pro, Brookfield Engineering Lab Inc, Stoughton, MA)
Vodeno kupatilo sa mešanjem, model WB/OB 7-45 (Mettler, Nemacka)
Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemacka)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema mikroorganizama

3.2.1.1. Priprema sojeva bakterija mlečne kiseline (BMK)

Različiti sojevi bakterija mlečne kiseline su pre primene čuvani u obliku stok-kultura na -18,0 °C, u kriotubama koje su sadržale odgovarajući bujon i 50%-tni glicerol kao krioprotektivni agens. Sojevi su pre eksperimentalne primene, nakon uzorkovanja iz stoka dva puta presejavani u odgovarajući bujon. Oko 1,0% (v/v) bakterijske kulture je zasejavano u odgovarajući bujon nakon čega je kultura inkubirana 18,0 h na temperaturi 37,0 °C, pod anaerobnim uslovima. Dobijena kultura (18,0 h stara) je nakon toga korišćena za inokulaciju uzoraka.

3.2.1.2. Priprema komercijalne ABY-6 kulture

Komercijalna ABY-6 (DVS) kultura je pre primene aktivirana pripremom 1,0% (w/v) rastvora kulture u mleku (0,5% m.m., Imlek, Beograd), nakon čega je vršena inkubacija u vodenom kupatilu u trajanju od 40,0 min na temperaturi 42,0 °C. Ovako aktivirana kultura korišćena je za inokulaciju uzoraka.

3.2.2. Priprema podloga za gajenje mikroorganizama

3.2.2.1. Priprema MRS bujona

51,0 g MRS bujona je rastvaran u destilovanoj vodi (1 L) nakon čega je vršeno kuvanje u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0° C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.2.2. Priprema M17 bujona

42,0 g M17 bujona je rastvarano u destilovanoj vodi (1 L) nakon čega je vršeno kuvanje u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0° C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.2.3. Priprema MRS agara

MRS bujon (51,0 g/L) i agar (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0° C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.2.4. Priprema MRS agara sa različitim izvorima ugljenika

MRS agar sa različitim izvorima ugljenika pripreman je mešanjem sledećih sastojaka: pepton 4 (1,0%, m/v), mesni ekstrakt (1,0%, m/v), ekstrakt kvasca (0,5%, m/v), tween (0,1% v/v), di-kalijum hidrogenfosfat (K_2HPO_4 , 0,2%, m/v), natrijum acetat ($Na(CH_3COO) \times 3 H_2O$, 0,55, m/v), amonijum citrat ($((NH_4)_3C_6H_5O_7)$, 0,2%, m/v), rastvor soli (0,5%, v/v), agar (1,8%, m/v). Rastvor soli je sadržao: mangan sulfat ($MnSO_4 \times 4H_2O$, 2,8%, m/v) i magnezijum sulfat ($MgSO_4 \times 7H_2O$, 11,5%, m/v). U zavisnosti od željenog izvora ugljenika dodavano je 2,0% odgovarajućeg ugljenog hidrata. Sastojci su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0° C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.2.5. Priprema M17 agara

M17 bujon (42,0 g/L) i agara (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0° C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.3. Priprema sirovine

3.2.3.1. Priprema surutke u prahu

Surutka u prahu je neposredno pre korišćenja rekonstituisana do željenog sadržaja suve materije (% w/v), otapanjem praha surutke u destilovanoj vodi sterilisanoj u autoklavu 30,0 min na 120,0 °C. Pripremljena surutka je zatim termički tretirana postupkom pasterizacije, 60,0 min na temperaturi 60,0 °C. Nakon termičkog tretmana mešavina je hlađena na odgovarajuću temperaturu fermentacije.

3.2.3.2. Priprema sveže surutke

Sveža surutka je nakon sakupljanja čuvana na temperaturi $-18,0 \pm 1$ °C do primene (ne duže od 7 dana). Neposredno pre korišćenja surutka je termički tretirana postupkom pasterizacije, 60,0 min na temperaturi 60,0 °C. Nakon termičkog tretmana surutka je hlađena na odgovarajuću temperaturu fermentacije.

3.2.3.3. Priprema mešavine surutke i mleka

Mešavina surutke i mleka (0,5% m.m., Imlek, Beograd) u odgovarajućem procentnom odnosu (% v/v) je termički tretirana postupkom pasterizacije, 60,0 min na temperaturi 60,0 °C. Nakon termičkog tretmana mešavina je hlađena na odgovarajuću temperaturu fermentacije.

3.2.3.4. Priprema mešavine surutke, mleka i voćnih sokova

Voćni sokovi (Sok od jabuke, Sok od šargarepe, Foodland d.o.o., Beograd, Srbija) korišćeni u eksperimentima predstavljaju komercijalne pasterizovane sokove koji nakon otvaranja pakovanja imaju rok trajanja do 3 dana. Svi sokovi su korišćeni odmah nakon otvaranja. Bez obzira na to, radi isključivanja mogućnosti kontaminacije sokovi su pre primene termički tretirani postupkom pasterizacije, 60,0 min na temperaturi 60,0 °C.

Nakon toga pripremana je mešavina surutke, mleka i voćnog soka u procentnom odnosu 40:30:30 (% v/v), respektivno. Nakon pripreme vršeno je podešavanje pH vrednosti mešavine primenom 2,0% (w/v) rastvora natrijum-hidrogen-karbonata (NaHCO_3) na 6,2. Pripremljena mešavina je zatim termički tretirana postupkom pasterizacije, 60,0 min na temperaturi 60,0 °C. Nakon termičkog tretmana mešavina je hlađena na odgovarajuću temperaturu fermentacije.

3.2.4. Fermentacija

Pripremljena sirovina je zasejavana odgovarajućom količinom inokuluma ispitivane vrste bakterija. Uzorci su zatim prenošeni u vodeno kupatilo u kome su inkubirani na odgovarajućoj temperaturi sve do postizanja $\text{pH} \approx 4,6$, nakon čega je fermentacija zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka. Promena pH vrednosti je praćena sterilnim uzorkovanjem (2,0 mL) medijuma na svakih 1,0 h.

3.2.5. Parametri kvaliteta

3.2.5.1. Određivanje hemijskog sastava surutke

Hemijski sastav surutke određivan je standardnim hemijskim metodama³⁵⁹. Analize su obuhvatale određivanje sadržaja suve materije, proteina, rastvornih šećera, masti, mineralnih materija (ukupan Ca). Sadržaj masnih kiselina određivan je gasnom hromatografijom, pri čemu je razdvajanje metilovanih masnih kiselina izvedeno na kapilarnoj koloni gasnog hromatografa³⁶⁰.

3.2.5.2. Određivanje pH vrednosti

Vrednost pH uzoraka određivana je pomoću pH-metra. Merenje je izvođeno pod apsolutno sterilnim uslovima koji su obezbeđeni sterilnim uzorkovanjem fermentacionog medijuma. Uzorak je prebacivan u kivete pH-metra u kojima je vršeno merenje.

3.2.5.3. Određivanje titracijske kiselosti

Titracijska kiselost uzoraka je određivana metodom po Soxhlet-Henkelu³⁶¹. U čašu od 100,0 mL uzorkovano je pod sterilnim uslovima 10,0 mL fermentacionog medijuma i dodat 1,0 ml 2% rastvora indikatora fenol-ftaleina u 70,0% etanolu. Ovako pripremljen uzorak titrisan je standardnim rastvorom 0,1 M NaOH do promene boje iz blede žute u blede ružičastu. Za završnu tačku titracije je smatrano postizanje pH vrednosti uzorka 8,2, što je praćeno pomoću pH metra. Titracijska kiselost je izražavana u stepenima Soxhlet-Henkela (°SH) a računata je prema jednačini:

$$^{\circ}\text{SH} = V_{\text{utrošenog NaOH (mL)}} \times 4 \times f_{\text{NaOH}}$$

gde je: f_{NaOH} -faktor 0,1 M rastvora NaOH dobijen pri standardizaciji.

3.2.5.4. Određivanje sadržaja suve materije

Za određivanje suve materije (SM) korišćena je metoda sušenja do konstantne mase u sušnici. Prazan vegeglas u kome je vršeno određivanje je sušen najmanje 1,0 h na 100,0-105,0 °C, hlađen u eksikatoru na sobnu temperaturu i meren sa tačnošću $\pm 0,001\text{g}$ (Mv). U vegeglas je brzo prenošena određena količina uzorka, oko 10,0 g, vegeglas je pokrivan poklopcem nakon

čega je merena ukupna masa (M). Poluotvoren vegeglas sa uzorkom je nakon toga sušen na 105,0 °C u sušnici do postizanja konstantne mase nakon čega je merena konačna masa (Mu). Sadržaj suve materije (SM) je izražavan u %, a računat je prema jednačini:

$$SM (\%) = (M_u - M_v) / (M - M_v) \times 100$$

gde je:

SM - sadržaj suve materije (%).

M_u - masa vegeglasa sa osušenim uzorkom, g.

M_v - masa praznog vegeglasa, g.

M - masa vegeglasa sa odmerenim uzorkom, g.

3.2.5.5. Određivanje sadržaja šećera (DNS)

Sadržaj šećera u ispitivanim uzorcima određivan je spektrofotometrijskom metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS)³⁶² uz minimalne modifikacije. Fermentisani uzorci su mešani sa 10,0% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) u odnosu 1:1 i centrifugirani 10,0 min na 10 000 rpm. Nakon toga 1,0 mL supernatanta se razblaži destilovanom vodom, u normalnom sudu od 100,0 ili 250,0 mL u zavisnosti od očekivane koncentracije šećera. Iz normalnog suda se prenese 3,0 mL razblaženog rastvora u epruvetu, a zatim se doda 3,0 mL rastvora DNS. Istovetno se pripremi slepa proba u kojoj se koristi 3,0 mL destilovane vode umesto ispitivanog razblaženog uzorka. Epruvete se zatvore i zagrevaju u vodenom kupatilu na 90,0 °C u trajanju od 5-15 minuta do pojave crveno-braon obojenja. Slepa proba zadržava žutu boju. Zatim se u topao rastvor dodaje 1,0 mL rastvora kalijum-natrijum-tartarata i promeša. Sadržaj u epruvetama se ohladi do sobne temperature i zatim se meri apsorbanca na spektrofotometru na 510 nm. Koncentracija šećera je računata prema jednačini standardne krive:

$$C_{g/L} = (0,21882 \times A + 0,09498) \times R \times 2$$

gde je A - apsorbanca uzorka a R - faktor razblaženja

3.2.5.6. Određivanje broja živih ćelija

Određivanje broja živih ćelija je vršeno mešanjem 1,0 mL fermentacionog medijuma sa 9,0 mL sterilnog 0,85% (w/v) rastvora NaCl, pod sterilnim uslovima, da bi se uzorak razblažio

10 puta. Nakon toga vršeno je prenošenje po 1,0 mL prethodnog razblaženja u novih 9,0 mL sterilnog 0,85% rastvora NaCl da bi se dobila serija od ukupno 8 razblaženja, pri čemu je svako sledeće razblaženje deset puta veće od prethodnog. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u fermentacionom medijumu birana su tri razblaženja iz kojih je po 1,0 mL prenošen u Petri šolje. Uzorci u Petri šoljama su zatim prelivani odgovarajućom hranljivom podlogom. Po očvršćavanju prvog sloja agara, u Petri šolje je nanošen još jedan dodatni sloj agara, radi obezbeđivanja mikroaerofilnih uslova za rast bakterija. Nakon zasejavanja, Petri šolje su inkubirane u termostatu na optimalnoj temperaturi rasta bakterija (30,0 ili 37,0 °C) u trajanju od 48,0 h, u zavisnosti od ispitivane vrste bakterija. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1,0 mL fermentacionog medijuma računat je množenjem ukupnog broja kolonija izraslih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slučaju pojave kolonija na više različitih razblaženja u Petri šoljama, broj ćelija je računat kao srednja vrednost.

3.2.5.7. Određivanje sinerezisa

Sinerezis fermentisanih uzoraka je određivan metodom centrifugiranja³⁶³. Fermentisani uzorci (20,0 ml) su centrifugirani 10,0 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja vršeno je merenje mase dekantovanog supernatanta (mL). Sinerezis je računat prema jednačini:

$$\text{Sinerezis (\%)} = \frac{\text{M supernatanta (g)}}{\text{M uzorka (g)}} \times 100$$

gde je:

M supernatanta - masa supernatanta nakon centrifugiranja, g.

M uzorka - masa uzorka pre centrifugiranja, g.

3.2.5.8. Određivanje viskoziteta

Određivanje viskoziteta vršeno je primenom delimično modifikovane metode³⁶⁴. Viskozitet ispitivanih uzoraka je meren na temperaturi 8,0 °C na dva načina, pomoću digitalnog Stabinger viskozimetra Anton Paar SVM 3000 i digitalnog DV-II+Pro viskozimetra, primenom spindle SP N°61 pri brzini 10 rpm, i izražavan je kao prividni viskozitet u cP. Viskozitet svakog uzorka je meren u trajanju od 30 s što je bilo dovoljno za prikupljanje oko 70

vrednosti viskoziteta. Nakon toga je računata srednja vrednost viskoziteta svakog uzorka. Krajnja vrednost viskoziteta je računata kao srednja vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak.

3.2.5.9. Određivanje sadržaja aminokiselina (OPA)

Sadržaj aminokiselina je određivan OPA metodom³⁶⁵. Fermentisani uzorci su mešani sa 0,75 M trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) u odnosu 1:3 i inkubirani 30,0 min na 4,0 °C. Ovako pripremljeni uzorci su centrifugirani 15,0 min na 5000 rpm. Nakon centrifugiranja 50,0 µL supernatanta je mešano sa 1,0 mL OPA reagensa i nakon isteka 5,0 min vršeno je merenje apsorbance uzoraka na talasnoj dužini 340 nm. Uporedo sa pripremom uzoraka pripremana je i slepa proba koja je umesto supernatanta sadržala 50,0 µL destilovane vode. Sadržaj aminokiselina u uzorcima je određivan na osnovu standardne krive za L-leucin, izražavan je kao µg_(Le/ml) a računat je prema jednačini:

$$\mu\text{g}_{(Le/ml)} = 434,7826 \times A + 4,552$$

gde je A - apsorbancia uzorka

3.2.5.10. Određivanje antioksidativne aktivnosti (DPPH)

U metodi³⁶⁶ određivanja antioksidativne aktivnosti kao slobodan radikal korišćen je 0,1 mM rastvor 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) u 95,0% metanolu. Uzorci su centrifugirani na 12000 rpm u trajanju od 30,0 min. Nakon centrifugiranja 500,0 µL supernatanta je u epruveti mešano sa 1,5 mL metanola i 1,0 mL rastvora DPPH. Sadržaj epruvete je snažno mućkan i ostavljan da stoji u mraku 30,0 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je vršeno merenje apsorbance uzoraka na talasnoj dužini 517 nm. Kao kontrolni uzorak pripreman je rastvor koji je sadržao 1,5 mL DPPH i 1,5 mL metanola. Kao slepa proba korišćen je metanol. Dobijeni rezultat je izražen kao procenat inhibicije DPPH radikala, koji zapravo predstavlja procenat neutralizacije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolu i računat je pomoću jednačine:

$$\text{Inhibicija DPPH radikala (\%)} = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

gde je:

A_k - apsorbancia kontrole, A_a - apsorbancia uzorka.

3.2.5.11. Određivanje redukcijske snage (FRAP)

U metodi³⁶⁷ određivanja redukcijske snage, 1,0 mL uzorka je mešan sa 2,5 mL 0,2 M fosfatnog pufera (pH 6,6) i 2,5 mL kalijum-fericijanida (1,0%, w/v), smeša je inkubirana 30,0 min na 50,0 °C. Nakon inkubacije smeši je dodavano 2,5 mL TCA (10,0%, v/v) nakon čega je vršeno centrifugiranje na 10000 rpm u trajanju od 10,0 min. Nakon centrifugiranja 2,5 mL supernatanta je mešano sa 2,5 mL vode i 0,5 mL gvožđe-(III)-hlorida (0,1%, w/v). Nakon 10,0 minuta je merena apsorbanca uzorka na talasnoj dužini 700 nm. Paralelno sa uzorkom pripremana je i slepa proba koja je umesto 2,5 mL supernatanta sadržala 2,5 mL vode. Redukcijska snaga je izražavana kao A_{700} .

3.2.5.12. Određivanje senzornih karakteristika

Senzorne karakteristike uzoraka su određivane primenom delimično modifikovane metode³⁶⁸. 55 netreniranih nasumično odabranih učesnika (35 žena i 20 muškaraca između 25 i 55 godina starosti) je pozvano da učestvuje u ocenjivanju senzornih karakteristika uzoraka procenom njihove ukupne prihvatljivosti. Svaki učesnik je dobio anketni list sastavljen od 4 pitanja: Ime i prezime, godine, pol i ocena ukupne prihvatljivosti testiranog uzorka na hedonističkoj skali od 9 tačaka (ocena).

Po 20,0 mL testiranih uzoraka je servirano na temperaturi $4,0 \pm 1,0$ °C, u zasebnim plastičnim čašama označenim trocifrenim brojevima. Učesnicima je davano najviše 4 različita uzorka u jednom ispitivanju, olovka, anketni list i čaša hladne vode za ispiranje usta između dva uzorka. Učesnici su zamoljeni da zaokruže ocenu, na skali u anketnom listu, koja na najbolji način iskazuje meru koliko im se neki od uzoraka sviđa ili ne sviđa po pitanju ukupne prihvatljivosti. Pri proceni prihvatljivosti korišćena je hedonistička skala od 9 tačaka (ocena) koje su predstavljale sledeće utiske: 1-ekstremno mi se ne sviđa, 5-niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa i 9-ekstremno mi se sviđa. Senzorna analiza je obuhvatila 275 upitnika podeljenih u 5 serija. Pre serviranja svi uzorci su podvrgnuti mikrobiološkoj analizi radi procene higijenske i sanitarne ispravnosti.

3.2.5.13. Određivanje probiotskih karakteristika

U ispitivanju preživljavanja probiotskih bakterija u simuliranim uslovima u želucu korišćena je delimično modifikovana metoda Prasad i sar. (1998)³⁶⁹.

Za ispitivanje uticaja kisele sredine na preživljavanje bakterija korišćen je bujon korigovane pH vrednosti 2,5. Korekcija pH vrednosti vršena je dodavanjem 2,0 M rastvora HCl, nakon čega je ovako pripremljen bujon sterilisan u autoklavu 30,0 min na 120,0 °C.

Za ispitivanje uticaja prisustva govede žuči na preživljavanje bakterija, korišćen je sterilni bujon u koji je dodat sterilni 10,0% (w/v) rastvor govede žuči, tako da je konačna koncentracija govede žuči u bujonu iznosila 0,3% (w/v). pH vrednost ovako pripremljenog bujona se kretala u opsegu 5,6 do 6,2.

Kao kontrolni uzorak je korišćen sterilni rastvor bujona pH vrednosti od 5,7-6,5.

Svaki od erlenmajera je zasejavan sa 2,0% (v/v) ispitivane kulture. Promena broja ćelija u uzorcima je praćena ukupno 4,0 h, što odgovara maksimalnom zadržavanju hrane u želucu, uzorkovanjem nakon 1,0 h, 2,0 h, 3,0 h i 4,0 h. Broj ćelija u svakom od uzoraka je određivan nakon serije razblaženja u fiziološkom rastvoru Kohovom metodom na agarnim ploćama (postupak opisan u Odeljku 3.2.5.6). Petri šolje su inkubirane 48,0 h u termostatu na temperaturi 37,0 °C, nakon čega su brojane izrasle kolonije.

3.2.5.14. Određivanje uzajamne antimikrobne aktivnosti bakterija

Za ispitivanje uzajamne antimikrobne aktivnosti bakterija korišćena je agar difuziona metoda. Na Petri šolje sa slojem agara postavljani su plastićni bunarićii, prećnika 5,0 mm, nakon čega je nanošen sloj odgovarajućeg otopljenog top agara (0,7%, m/v) zasejanog sa 2,0% prekonoćne kulture test bakterije (Tabela 3) na koju je testirana antimikrobna aktivnost ispitivanih bakterija.

Tabela 3. Test bakterije korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti primenjenih bakterija

Test bakterije	Kolekcija
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC ¹ , Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	ATCC, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	NRRL ² , Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	ATCC, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	NRRL, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	ATCC, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	ATCC, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> NRRL B-3524	NRRL, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>S. thermophilus</i> CNRZ S3 (389)	NRRL, Laboratorija za mikrobiologiju TMF
<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410	NRRL, Laboratorija za mikrobiologiju TMF

¹ ATCC - American Type Culture Collection

² NRRL - Northern Regional Research Laboratory

Nakon očvršćavanja top agara plastični bunarići su vađeni iz svog ležišta i u formirane otvore dodato je po 100,0 µl prekonocne kulture ispitivane vrste bakterija. U cilju ispitivanja hemijske prirode prisutne antimikrobne supstance na rub svakog bunarića stavljan je kristal pronaze E. Ukoliko je proizvedena supstanca proteinske prirode (bakteriocin) na zoni inhibicije se uočava polumesečasta zona nastala usled razgradnje antimikrobnih supstanci proteinske prirode pod dejstvom proteinaze. Petri šolje su inkubirane preko noći na 37,0 °C. Pojava svetle (halo) zone oko bunarića bila je znak da ispitivana vrsta bakterije ima antimikrobnu aktivnost prema odgovarajućoj test bakteriji. Merenjem prečnika zone inhibicije kvantifikovana je osetljivost test bakterija na prisustvo ispitivane vrste bakterije.

3.2.5.15. Određivanje antibiograma ispitivanih vrsta bakterija

Za određivanje osetljivosti ispitivanih vrsta bakterija na različite antibiotike korišćena je modifikovana agar difuziona metoda. Na Petri šolje je nanošen sloj otopljenog top agara (0,7% agara) zasejanog sa 2,0% prekonocne kulture ispitivane vrste bakterije. Nakon očvršćavanja na površinu top agara su postavljane test tablete antibiotika za antibiogram test, prečnika 10,0 mm. Petri šolje su inkubirane 24,0 h na 37,0 °C, nakon čega je meren prečnik zone inhibicije rasta oko svake od tableta test antibiotika. Prisustvo zone inhibicije rasta tumačeno je kao osetljivost ispitivane vrste bakterije na odgovarajući antibiotik. Za kvantifikaciju osetljivosti

korišćena je vrednost prečnika zone inhibicije rasta, koja je poređena sa prečnicima datim u Tabeli 4 koji služe kao kriterijum za procenu osetljivosti.

Tabela 4. Kriterijumi za procenu osetljivosti mikroorganizama na različite antibiotike

Test antibiotik	Sadržaj antibiotika u test tableti	Prečnik zone inhibicije, Rzi (mm)		
		S	I	R
Tetraciklin	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Ampicilin	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Streptomycin	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Kanamycin	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Hloramfenikol	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Penicilin	10 IU	≥ 26	23-25	≤ 22
Eritromicin	15 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Gentamicin	15 µg	≥ 26	23-25	≤ 22
Vankomicin	30 µg	≥ 12	10-11	≤ 9
Nalidiksična kiselina	30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22

Merenjem prečnika zone inhibicije i upoređivanjem sa vrednostima datim u Tabeli 4 utvrđeni su antibiotici koji deluju na ispitivane vrste bakterija, kao i oni na koje je ispitivana vrsta bakterije rezistentna.

3.2.5.16. Određivanje frakcija proteina gel-elektroforezom (SDS-PAGE)

U cilju određivanja proteinskog sastava uzoraka vršeno je razdvajanje proteina primenom metode vertikalne SDS-PAGE gel-elektroforeze nakon čega je za procenu promene proteinskog sastava korišćena tehnika denzitometrije pomoću programa ImageJ.

Razdvajanje proteina vršeno na 12,5% akrilamidnom (AA) gelu za razdvajanje, dok je kao gel za koncentrisanje korišćen 4,0% akrilamidni (AA) gel. Priprema za izvođenje ove metode se sastojala iz nekoliko faza:

1. Priprema rastvora za pravljenje gelova

Tabela 5. Recepture za pripremu rastvora za pravljenje gelova

	Rastvori za gelove			
	Tris (1.5M) pH 8,8*	Tris (0.5M) pH 6,8*	Akrilamid, 30%	APS, 10%
Tris	18,7 g	6,06 g	/	/
SDS	0,40 g	0,40 g	/	/
Akrilamid	/	/	29,2 g	/
Bis-Akrilamid	/	/	0,80 g	/
APS	/	/	/	0,10 g
dest. H ₂ O	do 100 mL	do 100 mL	do 100 mL	do 1 mL

* pH podešavan sa konc. HCl

2. Priprema pufera

Tabela 6. Recepture za pripremu rastvora za pravljenje pufera

	Pufer	
	Pufer za elektroforezu pH 8,3	Pufer za uzorke
Tris	3,0 g	/
Glicin	14,4 g	/
SDS	1,0 g	/
Tris (0,5M) pH 6,8	/	2,5 mL
10,0% SDS	/	4,0 mL
Glicerol	/	2,0 mL
β -Merkaptoetanol	/	1,0 mL
0,1% Bromfenol plavo R-250	/	0,5 mL
dest. H ₂ O	do 1000 mL	do 10 mL

3. Priprema rastvora za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje gelova

Tabela 7. Recepture za pripremu rastvora za fiksiranje, bojenje i ispiranje

	Rastvor		
	Rastvor za fiksiranje	Rastvor za bojenje	Rastvor za ispiranje
Metanol (40,0%)	500,0 mL	500,0 mL	250,0 mL
Sirćetna kiselina (10,0%)	100,0 mL	100,0 mL	100,0 mL
Etilen-glikol	/	30,0 mL	30,0 mL
Bromfenol plavo R-250	/	1,00 g	/
dest. H ₂ O	do 1000 mL	do 1000 mL	do 1000 mL

Nakon pripreme rastvora vršeno je pravljenje gelova koji će se nalivati u sistem za elektroforezu. Gelovi su pripremani prema sledećim recepturama:

Tabela 8. Recepture za pripremu gelova

	Gel	
	Gel za razdvajanje (12,5%)	Gel za koncentrisanje (4,0%)
dest. H ₂ O	9,40 mL	6,15 mL
Akrilamid (30,0%)	12,50 mL	1,33 mL
Tris-pufer (1,5M)	7,50 mL	/
Tris-pufer (0,5M)	/	2,50 mL
SDS (10,0%)	0,30 mL	0,10 mL
APS (10,0%)	0,60 mL	0,20 mL
TEMED	0,024 mL	0,01 mL

Nakon pravljenja svih potrebnih rastvora vršena je priprema 12,5%-og gela za razdvajanje jer se on prvi naliva u sistem za elektroforezu. Nakon nalivanja gel je ostavljan oko 60,0 min, da polimerizuje. Nakon toga pripreman je gel za koncentrisanje, koji se naliva u preostali prostor sistema u koji se ubacuje češalj koji će napraviti prostor za nanošenje uzoraka. Ovaj gel se takođe ostavlja oko 60,0 min da polimerizuje.

Nakon toga vršena je priprema uzorka koja je podrazumevala mešanje uzorka sa puferom za uzorke (PZU). Uzorak (20,0 μ L) je mešan sa PZU (20,0 μ L), kuvan 90,0 s na 100,0 °C i nakon toga ostavljan 5,0 min na $-18,0 \pm 1,0$ °C. Ovako pripremljen uzorak je nanošen u prostor predviđen za nanošenje uzoraka u gelu za koncentrisanje. Sistem je zatim napunjen puferom za elektroforezu i priključen na izvor struje. Parametri struje su podešavani na vrednosti 35,0 mA i 100,0 W. Proces razdvajanja proteina na gelu za razdvajanje je prekidan kada se vidljivi trag boje nalazio na 1,5 cm od kraja gela. Po završetku procesa razdvajanja gel je potapan u rastvor za fiksiranje (15,0 min) a zatim u rastvor za bojenje (30,0 min). Pošto je gel obojen vršeno je njegovo ispiranje radi uklanjanja viška boje a u cilju uočavanja proteinskih traka. Ovako dobijene obojene proteinske trake su slikane kamerom visoke rezolucije i dobijene slike su analizirane tehnikom denzitometrije primenom programskog paketa ImageJ (Fiji 1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Na osnovu podataka dobijenih primenom ovog programa određivana je promena proteinskog sastava ispitivanih uzoraka.

3.2.5.17. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja

Stabilnost proizvedenih napitaka procenjavana je određivanjem ključnih parametara kvaliteta (pH vrednost, titracijska kiselost, sinerezis, viskozitet, antioksidativna aktivnost,

ukupan broj živih ćelija, senzorna ocena) tokom čuvanja na $4,0 \pm 1,0$ °C u vremenskom intervalu od 28 dana. Napici su pod sterilnim uslovima uzorkovani nakon 1, 7, 14, 21 i 28 dana i na osnovu vrednosti parametara procenjivan je maksimalni period u kome napitak zadržava zadovoljavajući kvalitet.

3.2.5.18. Optimizacija procesa

Selekcija značajnih faktora

U procesu selekcije značajnih faktora procesa korišćeni su $2^{(4-1)}$, $2^{(5-2)}$, $2^{(6-3)}$, $2^{(7-4)}$ frakcionalni faktorijalni i 2^3 puni faktorijalni dizajn. Primena dizajna daje informacije o uticaju faktora kao i uticaju interakcija različitih faktora na željeni odziv sistema. Promenljive su varirane na tri nivoa, izvedeno je 20 nezavisnih eksperimenata uključujući dva ponavljanja i četiri centralne tačke. Svi eksperimenti su izvođeni po slučajnom redosledu da bi se smanjio uticaj slučajne greške na odziv sistema. Za selekciju značajnih faktora procesa korišćen je softverski program Design Expert 7.0 (Statease Inc., Silicon Valley, CA, USA)

Optimizacija uslova fermentacije

U procesu optimizacije uslova fermentacije korišćen je Box-Behnkenov faktorijalni dizajn. Promenljive su varirane na tri nivoa, izvedeno je 15 nezavisnih eksperimenata uključujući tri ponavljanja u centralnoj tački. Za optimizaciju uslova fermentacije korišćena je metoda odzivnih površina (RSM-Response Surface Methodology) u okviru koje je primenjivan koncept željene funkcije. Generalni pristup se sastoji u konvertovanju odziva u individualnu željenu funkciju čije se vrednosti kreću u intervalu od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije "0" predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost "1" predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva. Ukupna željena funkcija jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija. Svi eksperimenti su izvođeni po slučajnom redosledu da bi se smanjio uticaj slučajne greške na odziv sistema. Za optimizaciju uslova fermentacije korišćen je softverski program Design Expert 7.0 (Statease Inc., Silicon Valley, CA, USA)

3.2.5.19. Određivanje nutritivnih karakteristika napitka

Nutritivni sastav proizvedenih napitaka je određivan na osnovu analize hemijskog sastava uz korišćenje faktora za preračunavanje energetske vrednosti za osnovne komponente

u napitku. Faktori za preračunavanje pojedinih komponenti hrane mogu se naći u pravilnicima o deklarisanju^{370,203}.

3.2.5.20. Deklarisanje gotovog proizvoda

Na osnovu analize hemijskog sastava, fermentisani napitak je deklarisan u skladu sa srpskim^{370,208} i evropskim pravilnicima²⁰³ o deklarisanju, dok su nutritivne i zdravstvene izjave izabrane na osnovu evropskih Regulative i Direktiva^{202,209}, jer je u Srbiji trenutno na snazi samo Nacrt pravilnika o nutritivnim i zdravstvenim izjavama za prehrambene proizvode.

3.2.6. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu. Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje. Prikom analize podataka, a u cilju procene statističkog značaja rezultata korišćena je analiza varijanse (ANOVA). U zavisnosti od broja parametara čiji je uticaj ispitivan za poređenje aritmetičkih sredina, korišćena je jednostruka (One-way ANOVA) ili dvostruka analiza varijanse (Two-way ANOVA) sa naknadnim Tukey testom. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Preliminarna ispitivanja bakterija mlečne kiseline (BMK)

4.1.1. Ispitivanje sposobnosti rasta bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika

U cilju selekcije bakterija mlečne kiseline pogodnih za primenu u proizvodnji napitaka na bazi surutke, izvršeno je ispitivanje sposobnosti rasta 22 testirana soja (Odeljak 3.1.1.) na 17 različitih izvora ugljenika. Svi sojevi su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i gajeni na MRS agaru pripremanom prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.2.4. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Sposobnost rasta bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika

Ispitivana bakterija	Izvor ugljenika																
	Arabinoza	Ksiloza	Ramnoza	Galaktoza	Fruktoza	Manoza	Saharoza	Celobioza	Maltoza	Laktoza	Trehaloza	Rafinoza	Melobioza	Riboza	Sorbitol	Inulin	Salicin
<i>L. acidophilus</i> antibiophilus	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> NRRL B-441	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 27139	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-1924	±	-	±	+	+	±	±	+	±	+	+	+	+	±	±	+	±
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	±	±	±	+	+	±	±	+	±	+	+	+	+	±	±	+	±
<i>L. gasseri</i> NRRL B-14168	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	+
<i>L. gasseri</i> NRRL B-4240	-	-	±	±	±	±	+	±	±	+	±	±	±	-	±	±	±
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	+	-	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+
<i>L. helveticus</i> NRRL B-734	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NRRL B-4564	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> TM1	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i> NRRL B-3524	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+
<i>S. thermophilus</i> S2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>S. thermophilus</i> CNRZ S3 (389)	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>S. thermophilus</i> S36	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>S. thermophilus</i> S39	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sposobnost BMK da metabolišu različite ugljene hidrate je veoma značajna karakteristika po pitanju mogućnosti njihove primene u različitim procesima proizvodnje hrane. Na osnovu sposobnosti da metabolišu različite ugljene hidrate BMK se koriste kao konzervansi ili pojačivači aroma u prehrambenoj industriji, emulgatori u kozmetičkoj industriji, producenti optički čistih farmaceutika i intermedijatori u različitim procesima farmaceutske industrije³⁷¹. Sa druge strane, pojedini ugljeni hidrati imaju zaštitnu ulogu u procesu konzervisanja i čuvanja proizvoda koji sadrže BMK. Ugljeni hidrati kao što su trehaloza, sorbitol, manitol, saharoza, maltoza i manoza poboljšavaju preživljavanje bakterija tokom procesa sušenja i zamrzavanja koji se veoma često koriste u prehrambenoj industriji³⁷². Takođe

je dokazana i zaštitna uloga koju glukoza ima na preživljavanje *L. rhamnosus* GG tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt³⁷³.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 9 može se uočiti da sojevi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. gasseri* NRRL B-4240, *L. johnsonii* NRRL B-2178 nemaju sposobnost metabolisanja ksiloze i arabinoze. Sojevi *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-1924, *L. helveticus* ATCC 15009 i *L. reuteri* ATCC 23272 nisu sposobni da metabolišu ksilozu dok soj *L. bulgaricus* ATCC 11842 nema sposobnost metabolizma galaktoze. Sposobnost metabolisanja riboze nemaju sojevi *L. gasseri* NRRL B-4240, *L. johnsonii* NRRL B-2178, *L. reuteri* ATCC 23272 kao i sva četiri testirana soja vrste *S. thermophilus* koja takođe nisu u stanju da metabolišu ksilozu. Svi ostali izvori ugljenika mogu biti metabolisani od strane ispitivanih sojeva pri čemu je na većini uočen veoma dobar rast sojeva (+). Među ispitivanim sojevima najveću selektivnost po pitanju metabolizma ugljenih hidrata pokazali su sojevi *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-1924, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525, *L. gasseri* NRRL B-14168 i *L. gasseri* NRRL B-4240. Sposobnost metabolizma laktoze zabeležena je kod svih testiranih sojeva, s tim što su vrste *L. delbrueckii* i *L. gasseri* pokazale umereno smanjenu sposobnost rasta na ovom izvoru ugljenika. Na osnovu analiziranih rezultata može se zaključiti da svi testirani sojevi mogu biti primenjeni u procesu proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke koji kao osnovni šećer sadrže laktozu. U slučaju primene različitih izvora ugljenika kao suplemenata neophodno je obratiti pažnju na sposobnost svakog pojedinačnog soja da metabolíše određeni izvor ugljenika.

4.1.2. Ispitivanje sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika

U cilju selekcije sojeva bakterija mlečne kiseline pogodnih za primenu u proizvodnji napitaka na bazi surutke, izvršeno je ispitivanje sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida 22 testirana soja (Odeljak 3.1.1.) na 17 različitih izvora ugljenika. Svi sojevi su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i gajeni na MRS agaru pripremanom prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.2.4. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 10.

Tabela 10. Sposobnost proizvodnje egzopolisaharida kod bakterija mlečne kiseline (BMK) gajenih na različitim izvorima ugljenika

Ispitivana bakterija	Izvor ugljenika																
	Arabinoza	Ksilioza	Ramnoza	Galaktoza	Fruktoza	Manoza	Saharoza	Celobioza	Maltoza	Laktoza	Trehaloza	Rafinoza	Melobioza	Riboza	Sorbitol	Inulin	Salicin
<i>L. acidophilus</i> antibiophilus	-	-	-	S	S	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> NRRL B-441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 27139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-1924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> NRRL B-14168	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> NRRL B-4240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i> NRRL B-734	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NRRL B-4564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	-	S	-	-
<i>L. rhamnosus</i> TM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i> NRRL B-3524	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> CNRZ S3 (389)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> S36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> S39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410	-	-	-	S	S	-	-	S	-	-	S	-	-	-	-	-	-

Gde je: S - pozitivan rast u obliku sluzavih kolonija

Sposobnost proizvodnje egzopolisaharida spada u veoma važna funkcionalna svojstva BMK koje se koriste u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda³⁷⁴. Prava uloga egzopolisaharida nije još detaljno razjašnjena ali je uočeno da egzopolisaharidi mogu povoljno uticati na preživljavanje bakterija u surovim uslovima gastrointestinalnog trakta, doprineti adheziji mikroorganizama na epitel creva, a ništa manje značajno nije ni njihovo imunomodulatorno i antikancerogeno dejstvo^{375,376}. Takođe pojedine vrste egzopolisaharida proizvedenih od strane BMK imaju svojstvo prebiotika³⁷⁷, iako ova svojstva veoma zavise od hemijskog sastava samog egzopolisaharida.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 10 može se uočiti da sposobnost proizvodnje egzopolisaharida postoji kod 5 od ukupno 22 testirana soja. Među sojeve koji su sposobni da proizvode egzopolisaharide spadaju *L. acidophilus* antibiophilus, *L. gasseri* NRRL B-14168, *L. rhamnosus* ATCC 7469, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* NRRL B-3524 i *B. bifidum* NRRL B-41410. Najveći potencijal u proizvodnji egzopolisaharida pokazuje soj *L. rhamnosus* ATCC 7469 tokom rasta na galaktozi, saharozi, fruktozi, celobiozi, maltozi, laktozi, trehalozi, rafinozi i sorbitolu kao izvorima ugljenika. Sposobnost proizvodnje egzopolisaharida je veoma važna karakteristika koja doprinosi unapređenju kako funkcionalnih tako i senzornih karakteristika napitaka. Proizvedeni egzopolisaharidi povećavaju mogućnost preživljavanja bakterija tokom tranzita kroz gastrointestinalni trakt, njihovim oblaganjem i stvaranjem svojevrsne zaštitne barijere. Prisustvo egzopolisaharida takođe štiti bakterije povećanjem viskoziteta medijuma čime sprečava direktan kontakt ćelija sa slobodnim H⁺ jonima prisutnim u velikoj količini u želudačnom soku. Zbog svoje rastegljivosti i sposobnosti vezivanja sa proteinima tokom stvaranja proteinskog matriksa, egzopolisaharidi u značajnoj meri doprinose gustini proizvoda a time i unapređenju njihovih senzornih svojstava.

Na osnovu analiziranih rezultata može se zaključiti da, po pitanju sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida, *L. rhamnosus* ATCC 7469 spada u soj sa najvećim potencijalom za primenu u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke.

4.1.3. Ispitivanje antimikrobnog dejstva bakterija mlečne kiseline (BMK)

U cilju selekcije bakterija mlečne kiseline pogodnih za primenu u proizvodnji napitaka na bazi surutke, izvršeno je ispitivanje unakrsnog antimikrobnog dejstva 10 testiranih sojeva. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 11.

Tabela 11. Antimikrobno dejstvo različitih sojeva ispitivanih bakterija na test bakterije

Test bakterija	Ispitivana bakterija									
	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i> NRRL B-3524	<i>S. thermophilus</i> CNRZ S3 (389)	<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i> NRRL B-3524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> CNRZ S3 (389)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> NRRL B-41410	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 11, može se uočiti da soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 nije sposoban da preživi prisustvo većine testiranih sojeva, dok soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava antimikrobnu aktivnost prema sojevima *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525 i *L. helveticus* ATCC 15009.

Na osnovu analize rezultata može se zaključiti da sojevi kod kojih je uočeno antimikrobno dejstvo ne mogu biti primenjivani u kombinaciji sa sojevima osetljivim na njihovo prisustvo. To je veoma značajan parametar pri selekciji sojeva i analizi mogućnosti njihove istovremene primene u proizvodnji napitaka pomoću mešanih kultura.

4.1.4. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da svi testirani sojevi mogu biti primenjeni u procesu proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke koji kao osnovni šećer sadrže laktozu. Po pitanju sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida, *L. rhamnosus* ATCC 7469 spada u soj sa najvećim potencijalom za primenu u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke. Soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 nije sposoban da preživi prisustvo većine testiranih sojeva, dok soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava antimikrobnu aktivnost prema sojevima *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525 i *L. helveticus* ATCC 15009.

4.2. Selekcija sojeva iz roda *Lactobacillus* pogodnih za proizvodnju funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke

4.2.1. Selekcija sojeva iz roda *Lactobacillus* na osnovu fermentacione aktivnosti

U procesu ispitivanja fermentacione aktivnosti sojeva iz roda *Lactobacillus*, u cilju proizvodnje napitaka na bazi surutke, korišćena je rekonstituisana surutka u prahu sa sadržajem suve materije 8,0%, (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Uzorci su zasejavani sa 2,0% (v/v) inokuluma testiranog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i fermentisani 24,0 h na temperaturi 37,0 °C.

U cilju analize fermentacione sposobnosti ispitana je aktivnost 15 testiranih sojeva vrsti roda *Lactobacillus*. Aktivnost je procenjivana određivanjem produktivnosti testiranih sojeva na osnovu količine mlečne kiseline proizvedene tokom 24,0 h rasta na surutki. Produktivnost je izražavana kao P (g/(L·h)) a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 12.

Tabela 12. Produktivnost testiranih bakterijskih sojeva nakon 24,0 h fermentacije surutke

Redni broj	Ispitivani soj	P (g/(L· h))
1	<i>L. gasseri</i> NRRL B-14168	0,124
2	<i>L. gasseri</i> NRRL B-4240	0,059
3	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 27139	0,262
4	<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> NRRL B-441	0,244
5	<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	0,358
6	<i>L. helveticus</i> NRRL B-734	0,088
7	<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	0,123
8	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NRRL B-4564	0,083
9	<i>L. rhamnosus</i> TM1	0,239
10	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	0,280
11	<i>L. acidophilus</i> antibiophilus	0,262
12	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0,267
13	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-1942	0,097
14	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525	0,341
15	<i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178	0,207

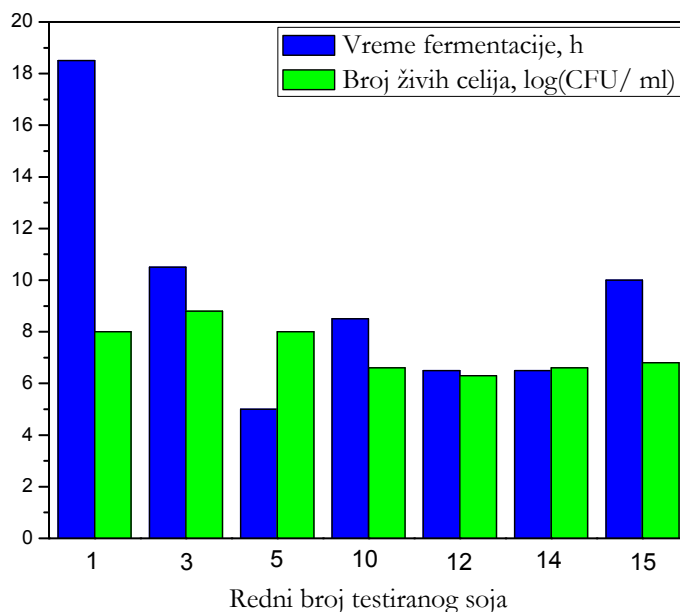
Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 12 veći broj sojeva (62,5%) je pokazao prihvatljiv nivo fermentacione aktivnosti. Najveća produktivnost od 0,358 g/L·h je postignuta pri fermentaciji surutke sojem *L. helveticus* ATCC 15009, dok je najmanju produktivnost od 0,059 g/L·h ispoljio soj *L. gasseri* NRRL B-4240.

Na osnovu dobijenih rezultata, po jedan soj svake vrste je izabran za dalju selekciju baziranu na ispitivanju ključnih parametara fermentacije. Izabrani sojevi su *L. gasseri* NRRL B-14168, *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139, *L. helveticus* ATCC 15009, *L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. acidophilus* ATCC-4356, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525, *L. johnsonii* NRRL B-2178.

4.2.2. Selekcija sojeva na osnovu ključnih parametara fermentacije

U procesu selekcije sojeva pogodnih za proizvodnju napitaka na bazi surutke korišćena je surutka sa sadržajem suve materije 8,0% (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Uzorci su zasejavani sa 2,0% (v/v) inokuluma testiranog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i fermentisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. na temperaturi 37,0 °C.

Sedam preliminarno selektovanih sojeva (Odeljak 4.2.1.) je analizirano na osnovu ključnih parametara fermentacije i to vremena trajanja fermentacije (h), ukupnog broja živih ćelija (log (CFU/mL)). Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 6.



Slika 6. Vreme fermentacije (h) i broj živih ćelija (log (CFU/mL)) postignuti tokom procesa fermentacije surutke preliminarno selektovanim sojevima (**1**-*L. gasseri* NRRL B-14168; **3**-*L. casei* ssp.*casei* ATCC 27139; **5**-*L. helveticus* ATCC 15009; **10**-*L. rhamnosus* ATCC 7469; **12**-*L. acidophilus* ATCC 4356; **14**-*L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525; **15**-*L. johnsonii* NRRL B-2178)

U pogledu vremena trajanja fermentacije, bakterije mlečne kiseline rastu znatno sporije u surutki nego u mleku. Posledica toga je dugo trajanje fermentacije surutke od oko 15,0 h i više^{167,168,378}. Prema podacima iz literature vreme trajanja fermentacije može da zavisi od vrste primenjenih sojeva, količine inokuluma, prisustva prebiotika, kao i od toga da li se fermentacija izvodi pojedinačnim ili mešanim starter kulturama. Uobičajeno vreme trajanja fermentacije monokulturama je 11,0-17,0 h^{166,40}, dok se za mešane kulture ono kreće u intervalu 6,0-8,0 h^{36,167}. Vreme trajanja fermentacije monokulturama vrsti roda *Lactobacillus* je kraće u odnosu na fermentaciju monokulturama vrsti roda *Bifidobacterium*⁴⁰.

Kao što je prikazano na Slici 6, relativno kratko vreme trajanja fermentacije (5,0-6,5 h) postignuto je primenom sojeva *L. helveticus* ATCC 15009, *L. acidophilus* ATCC-4356 i *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525, od kojih je soj *L. helveticus* ATCC 15009 za najkraće vreme

trajanja fermentacije (5,0 h) postigao najveći broj živih ćelija koji je iznosio 8,0 log (CFU/mL). Ovako kratko vreme fermentacije je očekivano za ovaj soj koji, prema navodima iz literature^{379,380}, spada u najefikasnije producente mlečne kiseline među BMK.

Soj *L. rhamnosus* ATCC 7469 je postigao umereno kratko vreme trajanja fermentacije (8,5 h) i broj ćelija od oko 6,6 log (CFU/mL) dok su sojevi *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 i *L. johnsonii* NRRL B-2178 postigli vreme trajanja fermentacije od 10,5 i 10,0 h i broj ćelija od oko 8,8 log (CFU/mL) i 6,8 log (CFU/mL), respektivno. Soj *L. gasseri* NRRL B-14168 je imao veoma dugo vreme trajanja fermentacije od oko 18,0 h. Dobijeni rezultati su nešto bolji od rezultata navedenih u literaturi prema kojima se vreme trajanja fermentacije najčešće korišćenim vrstama roda *Lactobacillus* u fermentaciji surutke, kao što su *L. acidophilus* i *L. casei* do postizanja $\text{pH} \approx 4,6$ kreće u intervalu 15,0-20,0 h¹⁷³.

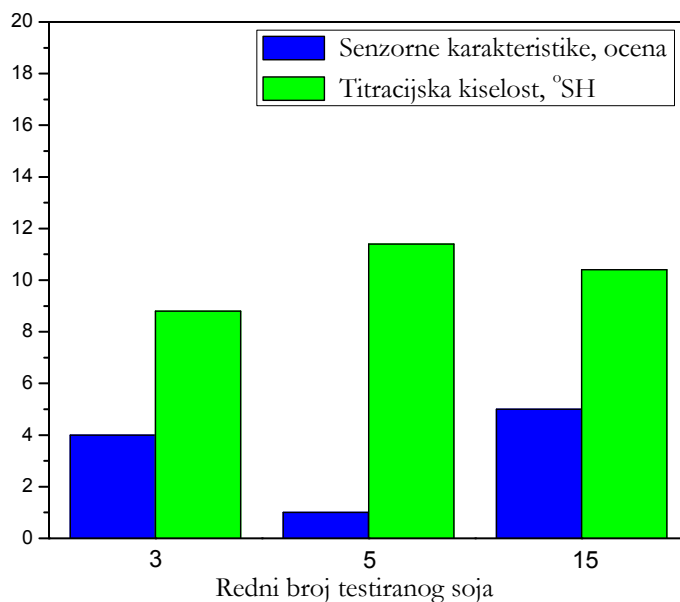
Ovde je veoma zanimljivo istaći da je soj *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525 koji je u prethodnom koraku selekcije (Odeljak 4.2.1.) imao veoma dobru produktivnost (0,341 g/L·h) i kratko vreme trajanja fermentacije (6,0 h), postigao dosta nizak broj ćelija (6,0 log (CFU/mL)). Prema tome može se reći da kod ovog soja postoji veoma izražena neusaglašenost između sposobnosti soja da proizvodi mlečnu kiselinu i sposobnosti rasta.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom koraku selekcije, kao najoptimalniji sojevi izabrani su *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139, *L. helveticus* ATCC 15009 i *L. johnsonii* NRRL B-2178.

4.2.3. Selekcija sojeva na osnovu optimalnih karakteristika napitka

U procesu selekcije sojeva pogodnih za proizvodnju napitaka na bazi surutke korišćena je rekonstituisana surutka sa sadržajem suve materije 8,0% (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Uzorci su zasejavani sa 2,0% (v/v) inokuluma selektovanog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i ferementisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. na temperaturi 37,0 °C.

Tri soja selektovana u prethodnom koraku (Odeljak 4.2.2.) su analizirana na osnovu optimalnih karakteristika napitka i to titracijske kiselosti (°SH) i ocene senzornih karakteristika. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 7.



Slika 7. Ocena senzornih karakteristika i titracijska kiselost (°SH) napitaka proizvedenih fermentacijom surutke selektovanom sojevima (**3**-*L. casei* ssp.*casei* ATCC 27139; **5**-*L. helveticus* ATCC 15009; **15**-*L. johnsonii* NRRL B-2178)

Senzorna svojstva probiotskih napitaka na bazi surutke su kriterijum koji je od presudnog značaja za plasiranje proizvoda na tržište i pridobijanje potrošača. Prema navodima iz literature, od senzornih svojstava neophodno je da napitak poseduje zadovoljavajući ukus, miris i izgled. Ukus ovih napitaka može varirati od kiselog, preko slatkog, do gorkog, izgled može biti narušen pojavom taloga, dok miris može biti svež, kiseo i sladak¹⁷³. Pri čuvanju proizvoda osnovni problem koji se može javiti je post-acidifikacija koja dovodi do narušavanja senzornih svojstava, kao i odumiranja ćelija čime proizvod može izgubiti svoj probiotski karakter. Prilikom post-acidifikacije, vrednost pH se može spustiti ispod 4,5 što dovodi do odumiranja probiotskih bakterija^{169,170}, do pojave kiselog ukusa i mirisa zbog novonastale mlečne kiseline. Takođe, pH 4,50 predstavlja izoelektričnu tačku proteina surutke³⁰³, pa postizanjem ove pH vrednosti može doći do razgradnje proteina i pojave taloga koji narušava izgled proizvoda.

Kao što je prikazano na Slici 7 soj *L. helveticus* ATCC 15009 je postigao veoma niske ocene za senzorne karakteristike napitka, što je uglavnom posledica ispoljavanja veoma neprijatne arome koja je podsećala na aromu kiselog kupusa. Usled toga ovaj soj je eliminisan iz daljeg razmatranja po pitanju primene u proizvodnji napitka.

Sa druge strane, sojevi *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 i *L. johnsonii* NRRL B-2178 su ocenjeni visokim ocenama (4 i 5, respektivno) po pitanju senzornih karakteristika. Ovi sojevi su ostvarili titracijsku kiselost napitaka 8,8 i 9,2 °SH, respektivno, i može se reći da su veoma slični po pitanju kvaliteta proizvedenog napitka na bazi surutke. Rezultati zabeleženi za titracijsku kiselost napitaka proizvedenih primenom ovih sojeva su u skladu sa rezultatima navedenim u literaturi prema kojima se pri fermentaciji surutke najčešće korišćenim vrstama roda *Lactobacillus*, kao što su *L. acidophilus* i *L. casei* postiže titracijska kiselost od oko 12,0-15,0 °SH¹⁷³.

Nakon analize rezultata, soj *L. johnsonii* NRRL B-2178, koji je postigao bolju ocenu senzornih karakteristika (5), je odabran kao najbolji kandidat za proizvodnju napitka. U prilog njegovom izboru idu i činjenice da ovaj soj spada u probiotske mikroorganizme i pokazuje visok nivo preživljavanja u prisustvu proteina surutke što je veoma važno za stabilnost broja ćelija u napitaka tokom čuvanja³⁸¹.

4.2.4. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da sojevi *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 i *L. johnsonii* NRRL B-2178 predstavljaju dobre kandidate za korišćenje u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke. Od 15 testiranih sojeva, soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 se pokazao kao soj sa najboljim proizvodnim karakteristikama koji za 10,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve materije, na temperaturi od 37,0 °C, primenom 2,0% inokuluma, postiže titracijsku kiselost od 9,2 °SH i broj živih ćelija od oko 6,80 log (CFU/mL). U cilju povećanja efikasnosti procesa proizvodnje napitka primenom soja *L. johnsonii* NRRL B-2178 i unapređenja parametara kvaliteta proizvoda neophodno je izvršiti naknadnu optimizaciju uslova fermentacije što će biti razmatrano u Odeljku 4.3.

4.3. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

4.3.1. Optimizacija osnovnih parametara fermentacije surutke sojem *L. johnsonii* NRRL B-2178

U procesu optimizacije osnovnih parametara fermentacije surutke sojem *L. johnsonii* korišćena je rekonstituisana surutka sa sadržajem suve materije 3,0, 7,0 i 11,0% (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Uzorci su zasejavani sa 1,0, 5,5 i 10,0% (v/v) inokuluma testiranog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i ferementisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. na temperaturama 35,0, 39,0 i 43,0 °C. Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje broja živih ćelija u testiranim uzorcima metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.6. primenom MRS agara (3.2.2.3.).

U cilju optimizacije osnovnih parametara fermentacije korišćen je softverski program Design Expert 7.0 u okviru koga je pripreman eksperimentalni plan, vršena statistička obrada podataka na osnovu koje je vršena optimizacija vrednosti parametara.

Eksperimentalni plan i obrada podataka

U okviru ispitivanja korišćen je Box-Behnken-ov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. U Tabeli 13 prikazan je Box-Behnken-ov plan eksperimenta sa variranim vrednostima za temperaturu (A), koncentraciju inokuluma (B) i sadržaj suve materije (C) kao ulaznih promenljivih i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Tabela 13. Box-Behnken-ov plan eksperimenta sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti			Odziv sistema
	A Temperatura (°C)	B Koncentracija inokuluma (% v/v)	C Sadržaj suve materije (% w/v)	Y Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(0) 39,0	(1) 10,0	(-1) 3,00	6,70 ± 0,123
2	(-1) 35,0	(0) 5,50	(-1) 3,00	7,00 ± 0,145
3	(-1) 35,0	(0) 5,50	(1) 11,0	7,88 ± 0,165
4	(0) 39,0	(-1) 1,00	(1) 11,0	6,85 ± 0,124
5	(0) 39,0	(0) 5,50	(0) 7,00	7,26 ± 0,206
6	(0) 39,0	(1) 10,0	(1) 11,0	7,48 ± 0,147
7	(1) 43,0	(0) 5,50	(-1) 3,00	5,95 ± 0,128
8	(0) 39,0	(0) 5,50	(0) 7,00	7,48 ± 0,147
9	(1) 43,0	(0) 5,50	(1) 11,0	7,00 ± 0,214
10	(1) 43,0	(-1) 1,00	(0) 7,00	6,60 ± 0,184
11	(-1) 35,0	(-1) 1,00	(0) 7,00	7,48 ± 0,166
12	(0) 39,0	(-1) 1,00	(-1) 3,00	6,04 ± 0,143
13	(1) 43,0	(1) 10,0	(0) 7,00	7,48 ± 0,142
14	(-1) 35,0	(1) 10,0	(0) 7,00	7,95 ± 0,127
15	(0) 39,0	(0) 5,50	(0) 7,00	7,30 ± 0,114

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru Box-Behnken-ovog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta. Za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija *L. johnsonii*) primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C + \beta_{12} \times A \times B + \beta_{23} \times B \times C + \beta_{13} \times A \times C + \beta_{11} \times A^2 + \beta_{22} \times B^2 - \beta_{33} \times C^2$$

U cilju određivanja koeficijenata regresione jednačine i analize značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke, sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 14. Značajnost uticaja svakog od parametra kao i njihovih interakcija određivana je analizom p vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Regresioni koeficijenti, pri nivou značajnosti od 95,0%, su značajni ukoliko je njihova p-vrednost manja od 0,05 i takvi su u Tabeli 14 naglašeni zvezdicom.

Tabela 14. Koeficijenti regresione jednačine i njihova značajnost za broj živih ćelija *L. johnsonii* NRLL B-2178

Parametar	Koeficijent	Standardna devijacija	t-vrednost	p-vrednost ^a	Nivo značajnosti, %
A	-0,4100	0,04594	79,65	0,0002942*	99,97
B	0,3300	0,04594	51,60	0,0008137*	99,91
C	0,4400	0,04594	91,74	0,0002102*	99,98
AB	0,1025	0,06497	2,489	0,1755	82,45
AC	0,04250	0,06497	0,4279	0,5419	45,81
BC	-0,007500	0,06497	0,01333	0,9126	8,740
A²	0,1104	0,06762	2,666	0,1634	83,66
B²	-0,07958	0,06762	1,385	0,2922	70,78
C²	-0,4996	0,06762	54,58	0,0007145*	99,93

Za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija) u okviru Box-Behnken-ovog dizajna može se primeniti polinom drugog reda:

$$Y = 7,347 - 0,41 \times A + 0,33 \times B + 0,44 \times C + 0,1025 \times A \times B - 0,0075 \times B \times C + 0,0425 \times A \times C + 0,1104 \times A^2 - 0,07958 \times B^2 - 0,4996 \times C^2$$

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 14 dobijenih regresionom analizom, na osnovu p-vrednosti svakog od faktora u okviru Box-Behnken-ovog dizajna, interakcijski članovi AB, AC i BC kao i kvadratni članovi A² i B² nemaju statistički značajan uticaj (p > 0,05) na broj živih ćelija (Y) *L. johnsonii*. Shodno tome, ova tri člana su isključena iz modela tako da je za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija) primenjen prilagođeni model opisan modifikovanim polinom drugog reda:

$$Y = 7,364 - 0,41 \times A + 0,33 \times B + 0,44 \times C - 0,518 \times C^2$$

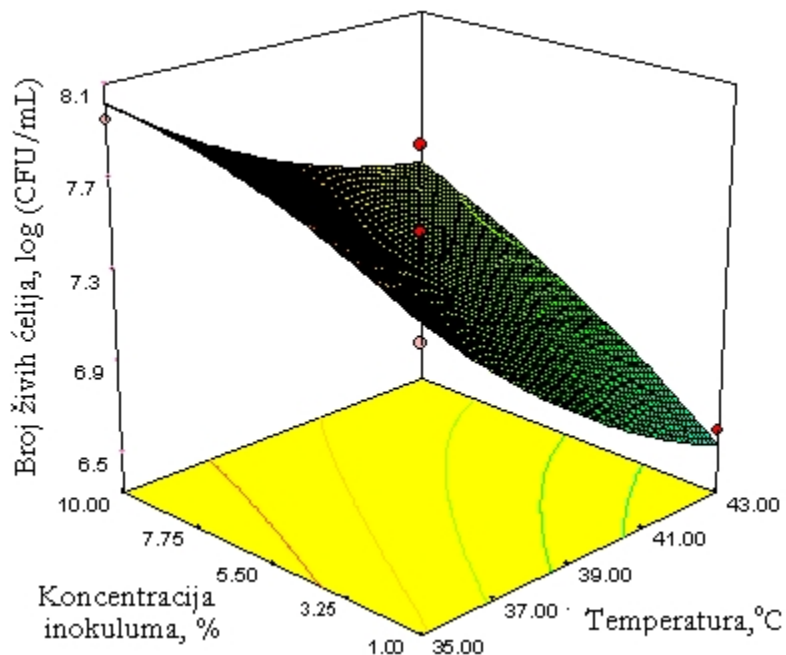
U cilju određivanja značajnosti prilagođenog modela sprovedena je analiza varijanse (ANOVA), i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Određivanje značajnosti modela analizom varijanse Box-Behnken-ovog modela primenjenog za predviđanje broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Poreklo varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Srednja vrednost kvadrata	f-vrednost	p-vrednost
Model	4,705	4	1,176	56,62	< 0,0001*
Rezidual	0,2077	10	0,02077		
Odstupanje	0,1803	8	0,02253	1,641	0,4329
Čista greška	0,02747	2	0,01373		
Ukupno	4,913	14			
R ² = 0,96					

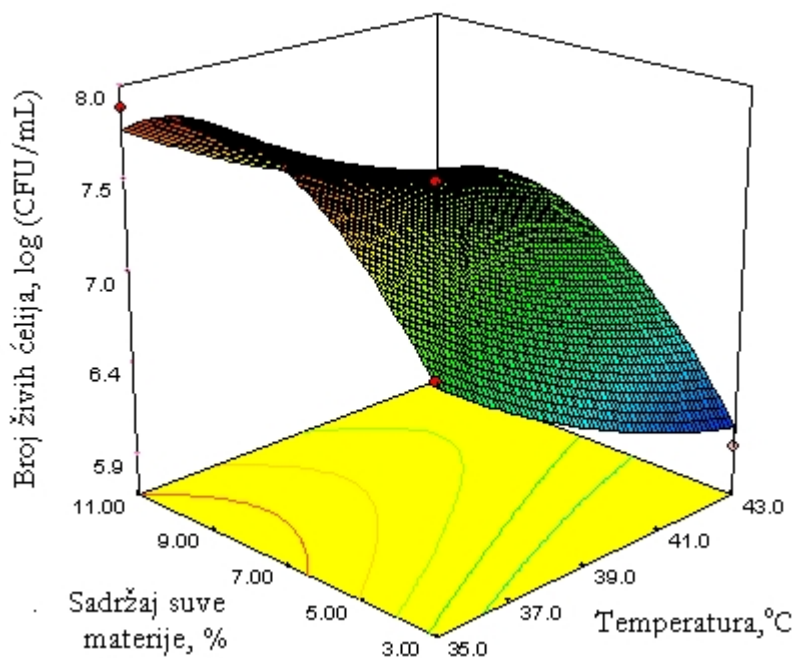
Kao što je prikazano u Tabeli 15 prilagođeni model je statistički značajan ($p < 0,0001$). Koeficijent determinacije od 0,96, potvrđuje da 96,0% varijacija odgovora sistema može biti predviđeno prilagođenim modelom.

Kako bi se razumeo uticaj parametara fermentacije na broj živih ćelija *L. johnsonii* crtane su odzivne površine (Slika 8, 9 i 10). Svaka odzivna površina prikazuje modelom predviđen uticaj dva parametra na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnoj vrednosti trećeg, i pruža mogućnost procene optimalne vrednosti parametara za postizanje maksimalnog broja živih ćelija *L. johnsonii*.



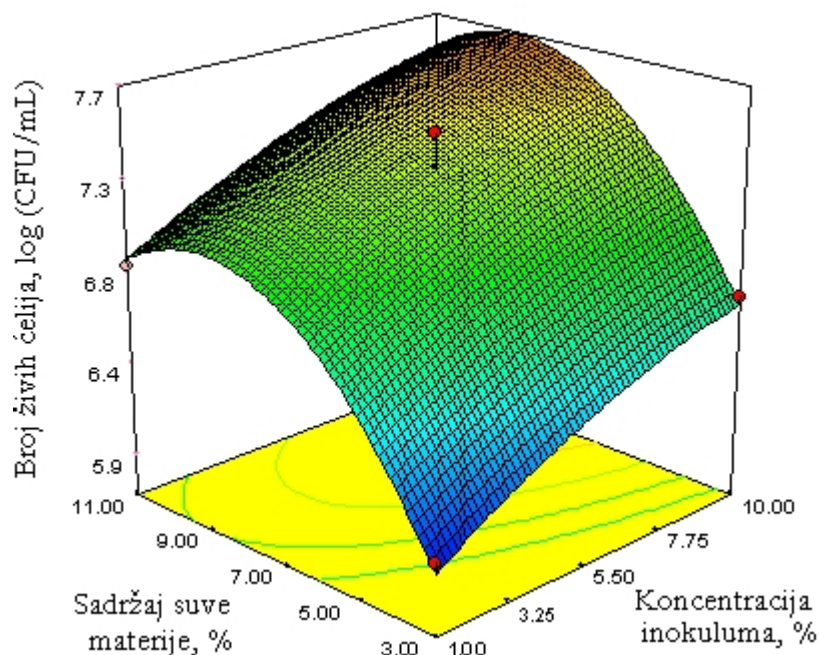
Slika 8. Uticaj koncentracije inokuluma i temperature na broj živih ćelija *L. johnsonii* NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti sadržaja suve materije (7,0%)

Slika 8 ilustruje modelom predviđen uticaj koncentracije inokuluma i temperature na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnom sadržaju suve materije (7,0%). Analizom prikazanih rezultata se uočava da se maksimalni broj ćelija postiže nakon 9,0 h fermentacije surutke na temperaturi 35,0 °C pri koncentraciji inokuluma od 10,00%. Relativno visok broj ćelija se postiže u opsegu temperature od 35,0-37,0 °C, i opsegu koncentracija inokuluma od 7,0-10,0%.



Slika 9. Uticaj sadržaja suve materije i temperature na broj živih ćelija *L. johnsonii* NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti koncentracije inokuluma (5,5%)

Slika 9 ilustruje modelom predviđen uticaj sadržaja suve materije i temperature na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnoj koncentraciji inokuluma (5,5%). Analizom prikazanih rezultata se uočava da se maksimalni broj ćelija nakon 9,0 h fermentacije surutke postiže na temperaturi 35,0 °C i sadržaju suve materije od oko 9,0%. Visok broj ćelija može se postići i pri temperaturama u opsegu od 35,0-37,0 °C i sadržaju suve materije u opsegu od 7,0-11,0%.



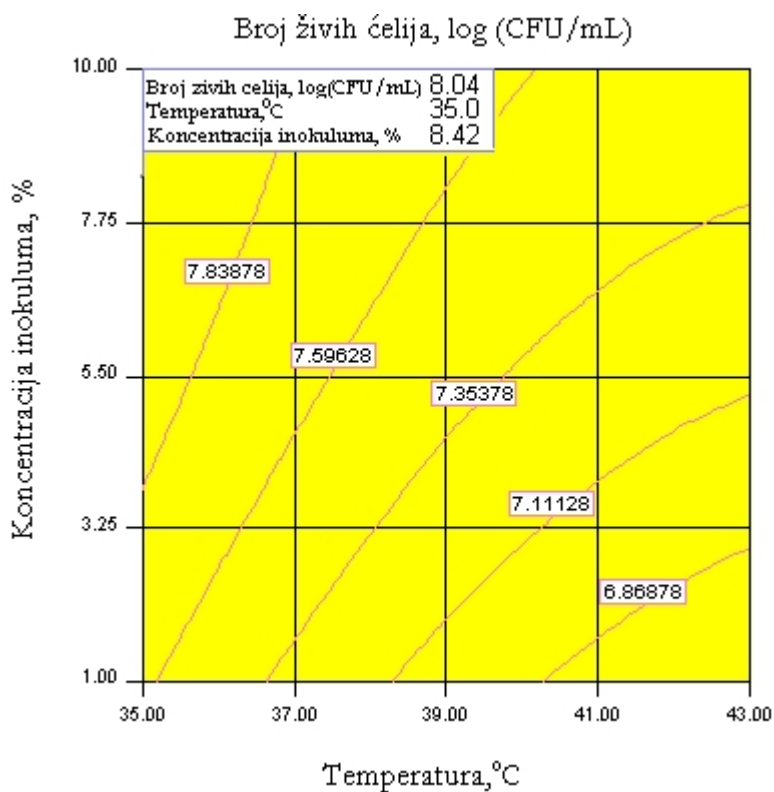
Slika 10. Uticaj sadržaja suve materije i koncentracije inokuluma na broj živih ćelija *L. johnsonii* NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti temperature (39,0 °C)

Slika 10 ilustruje modelom predviđen uticaj sadržaja suve materije i koncentracije inokuluma na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnoj temperaturi (39,0 °C). Analizom prikazanih rezultata se uočava da se maksimalni broj ćelija postiže pri koncentraciji inokuluma 10,0% i sadržaju suve materije 9,0%, dok se relativno visok broj ćelija dobija u opsegu koncentracije inokuluma 8,0 -10,0% i sadržaja suve materije 8,0-11,0%.

Nakon analize uticaja parametara fermentacije izvršena je optimizacija uslova fermentacije sa ciljem podešavanja uslova pri kojima bi bilo moguće postići maksimalni broj ćelija u napitku na bazi surutke.

Za optimizaciju procesa u okviru postupka odzivnih površina korišćen je koncept željene funkcije. U prvom ciklusu optimizacije sa ograničenjima definisanim minimizacijom ili maksimizacijom nekog od faktora ili odziva dobijeni su sledeći rezultati koji podrazumevaju najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije (1): Maksimalni broj živih ćelija *L. johnsonii* od 8,13 log (CFU/mL) se postiže nakon 9,0 h fermentacije surutke sa sadržajem suve materije 10,0% na temperaturi 35,07 °C, primenom 9,82% inokuluma.

Obzirom da je tokom eksperimenata uočeno da pri sadržajima suve materije većim od 9,0% dolazi do pojave taloga koji značajno narušava izgled konačnog proizvoda, kao i nemogućnosti održavanja temperature na zadatih 35,07 °C (nedovoljna preciznost uređaja), izveden je još jedan ciklus optimizacije u kome su kao pojedinačne željene funkcije zadati minimalni sadržaj suve materije od 8,0% i temperatura 35,0 °C, pri kojima se postiže maksimalni broj živih ćelija *L. johnsonii* od 8,04 log (CFU/mL). Rezultati drugog ciklusa optimizacije prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Uticaj koncentracije inokuluma i temperature na broj ćelija *L. johnsonii* NRRL B-2178 nakon 9,0 h fermentacije surutke sa sadržajem suve materije 8,0%

Kao što se može uočiti na Slici 11 za postizanje maksimalnog broja ćelija, pri sadržaju suve materije od 8,0%, neophodno je da koncentracija inokuluma i temperatura budu podešeni na 8,42% i 35,0 °C, respektivno. Podešavanjem ovih uslova, nakon 9,0 h fermentacije surutke moguće je postići broj ćelija *L. johnsonii* od 8,04 log (CFU/mL).

Poređenjem rezultata sa rezultatima zabeleženim u prethodnom ispitivanju (Odeljak 4.2.2.) može se uočiti da se smanjenjem temperature sa 37,0 na 35,0 °C i povećanjem koncentracije inokuluma sa 2,0 na 8,42%, pri istom sadržaju suve materije (8,0%), vreme fermentacije skraćuje za 1,0 h (sa 10,0 na 9,0 h), a ukupan broj živih ćelija *L. johnsonii* povećava sa 6,80 log (CFU/mL) na 8,04 log (CFU/mL).

Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature prema kojima količina inokuluma utiče na skraćenje vremena trajanja fermentacije u proseku za oko 2,0 h kod monokultura vrsti roda *Lactobacillus*, dok kod monokultura vrsta roda *Bifidobacterium* uglavnom nema značajnijeg uticaja⁴⁰. Sa druge strane, primenjena koncentracija inokuluma odgovara koncentracijama inokuluma koje se najčešće koriste u fermentaciji surutke vrstama roda *Lactobacillus* a koje iznose 2,0%^{173,174}, 2,5%^{38,167}, a ne retko i 4,0%³⁶ i 10,0%³⁷.

4.3.2. Ispitivanje uticaja različitih nutrijenata na rast soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

U procesu ispitivanja uticaja različitih nutrijenata na rast soja *L. johnsonii* korišćena je surutka sa sadržajem suve materije 8,0% (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Uzorci su nakon toga obogaćivani odgovarajućim nutrijentom, zasejavani sa 8,42% (v/v) inokuluma testiranog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i fermentisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. na temperaturi 35,0 °C. Nakon postizanja pH vrednosti 4,6, vršeno je određivanje broja živih ćelija u testiranim uzorcima metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.6. primenom MRS agara (3.2.2.3.).

U cilju optimizacije parametara fermentacije korišćen je softverski program Design Expert 7.0 u okviru koga je pripreman eksperimentalni plan, vršena statistička obrada podataka i selekcija ključnih parametara na osnovu dobijenih rezultata.

4.3.2.1. Uticaj različitih izvora ugljenika na rast soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

Ispitivani izvori ugljenika su korišćeni u obliku rastvora koncentracije 0,333 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C. Pripremljeni uzorci rekonstituisane surutke sa 8,0% suve materije, su obogaćeni odgovarajućom količinom izvora ugljenika, dodatkom rastvora prema definisanom eksperimentalnom planu.

Ekperimentalni plan i obrada podataka

U okviru ispitivanja korišćen je $2^{(6-3)}$ frakcionalni faktorijalni dizajn (FFD) sa šest faktora na tri nivoa, dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 16 prikazan je plan eksperimenata sa variranim vrednostima za inulin (A), sorbitol (B), manitol (C), fruktozu (D), laktulozu (E) i saharozu (F) kao ulaznih promenljivih i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

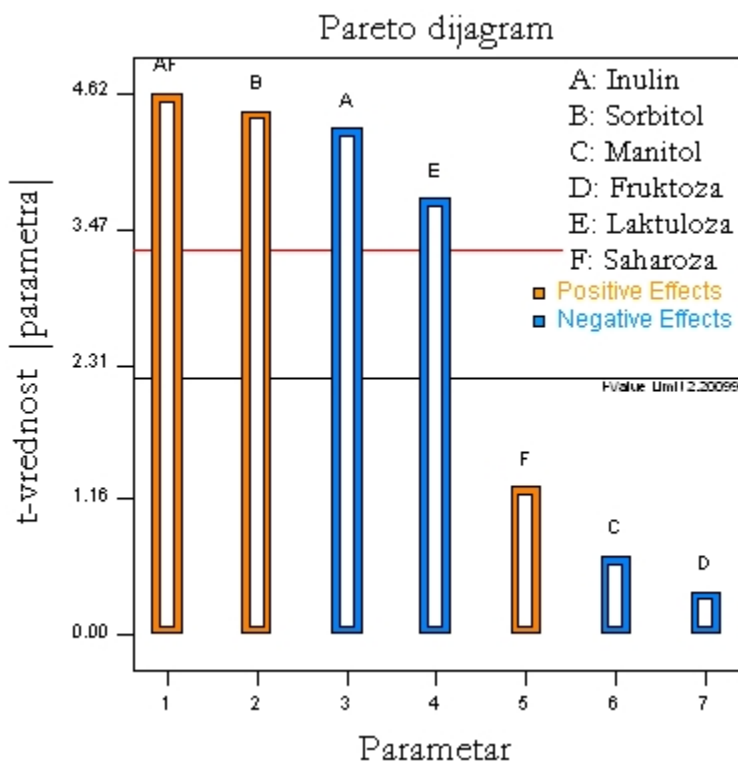
Tabela 16. Frakcionalni faktorijalni $2^{(6-3)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenata	Varirane i (kodirane) vrednosti						Odziv sistema
	A	B	C	D	E	F	Y
	Inulin (%, w/v)	Sorbitol (%, w/v)	Manitol (%, w/v)	Fruktoza (%, w/v)	Laktuloza (%, w/v)	Saharoza (%, w/v)	Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	8,30 ± 0,114
2	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	8,00 ± 0,263
3	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	7,81 ± 0,152
4	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	7,25 ± 0,112
5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	7,66 ± 0,098
6	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	7,80 ± 0,124
7	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	8,25 ± 0,214
8	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	7,66 ± 0,164
9	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	7,70 ± 0,187
10	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	7,78 ± 0,163
11	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	8,00 ± 0,142
12	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	6,68 ± 0,086
13	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	8,00 ± 0,178
14	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	7,38 ± 0,101
15	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	7,54 ± 0,124
16	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	7,80 ± 0,082
17	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	(0) 1,0	7,83 ± 0,216
18	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(1) 1,5	7,81 ± 0,159
19	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	8,00 ± 0,164
20	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	(-1) 0,5	(1) 1,5	(-1) 0,5	8,00 ± 0,159

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru $2^{(6-3)}$ frakcionalnog faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni

koeficijenti regresione jednačine, crtani Pareto dijagrami i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke, i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora ugljenika na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke

Rezultati dobijeni analizom p-vrednosti svakog od faktora u okviru $2^{(6-3)}$ FFD pokazali su da na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiču tri parametra i to inulin (A), sorbitol (B) i laktuloza (E). Osim pojedinačnih parametara na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiče i jedna interakcija (AF) koja je rezultat udruženog dejstva inulina (A) i saharoze (E). Dakle, sa povećanjem koncentracije inulina u kombinaciji sa saharozom i sorbitola dolazi do značajnog povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*. Sa druge strane povećanje koncentracije inulina i laktuloze dovodi do smanjenja broja živih ćelija.

Obzirom da je u slučaju proizvodnje napitaka na bazi surutke neophodno voditi računa o interesu potrošača primena inulina i saharoze ima ogromne prednosti u odnosu na primenu

sorbitola, to je pri selekciji izvora ugljenika kao najuticajnji parametar izabrana kombinacija inulina i saharoze koja prema dobijenim rezultatima u najvećoj meri dovodi do povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Stoga su, na osnovu izračunatih regresionih koeficijenata, tj. njihove apsolutne vrednosti (Slika 12), iz daljeg ispitivanja eliminisani parametri sa manjim uticajem na broj živih ćelija (Y) *L. johnsonii* kao odgovor sistema.

4.3.2.2. Uticaj različitih izvora azota na rast soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

Ispitivani izvori azota su korišćeni u obliku rastvora koncentracije 0,50 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C. Pripremljeni uzorci rekonstituisane surutke sa 8,0% suve materije, su obogaćeni odgovarajućom količinom izvora azota dodatkom rastvora prema definisanom eksperimentalnom planu.

Eksperimentalni plan i obrada podataka

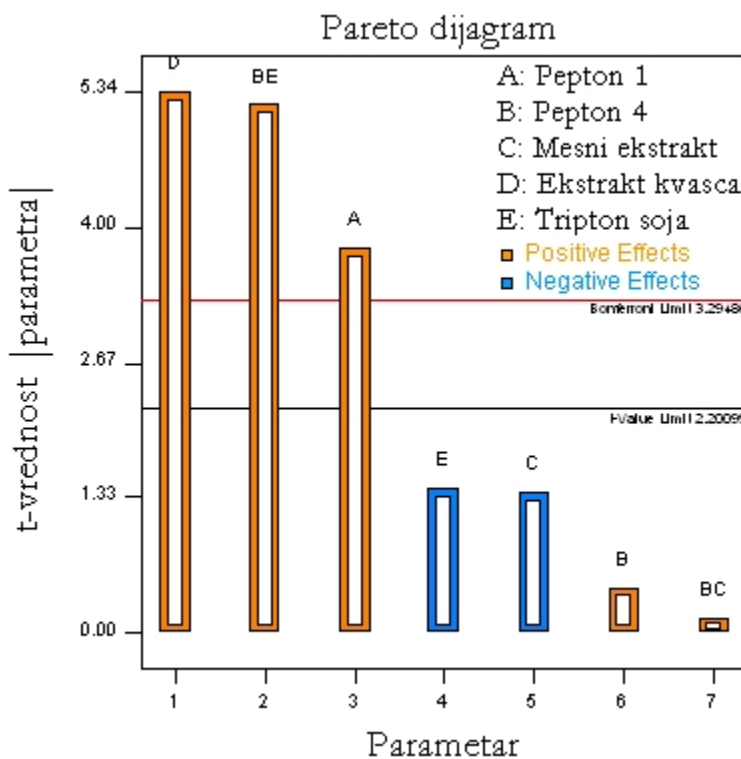
U okviru ispitivanja korišćen je $2^{(5-2)}$ frakcionalni faktorijalni dizajn (FFD) sa pet faktora na tri nivoa, dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 17 prikazan je plan eksperimenata sa variranim vrednostima za pepton 1 (A), pepton 4 (B), mesni ekstrakt (C), ekstrakt kvasca (D) i tripton soju (E) kao ulazne promenljive i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Tabela 17. Frakcionalni faktorijalni $2^{(5-2)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti					Odziv sistema
	A	B	C	D	E	Y
	Pepton 1 (%, w/v)	Pepton 4 (%, w/v)	Mesni ekstrakt (%, w/v)	Ekstrakt kvasca (%, w/v)	Tripton soja (%, w/v)	Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	8,60 ± 0,124
2	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,90 ± 0,163
3	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	8,90 ± 0,112
4	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	8,50 ± 0,182
5	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,85 ± 0,078
6	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	8,90 ± 0,224
7	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,00 ± 0,144
8	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	8,85 ± 0,164
9	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	8,80 ± 0,137
10	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	8,95 ± 0,163
11	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	8,85 ± 0,167
12	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	8,45 ± 0,072
13	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,03 ± 0,128
14	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	8,62 ± 0,113
15	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	8,60 ± 0,174
16	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	8,90 ± 0,092
17	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	(0) 0,5	8,95 ± 0,143
18	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	8,90 ± 0,149
19	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	8,87 ± 0,134
20	(-1) 0,0	(1) 1,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 1,0	8,62 ± 0,169

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru $2^{(5-2)}$ frakcionalnog faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni koeficijenti regresione jednačine, crtani Pareto dijagrami i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke, i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 13.



Slika 13. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora azota na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke

Rezultati dobijeni analizom p-vrednosti svakog od faktora u okviru $2^{(5-2)}$ FFD pokazali su da na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiču dva parametra i to ekstrakt kvasca (D) i pepton 1 (A). Osim pojedinačnih parametara na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiče i jedna interakcija (BE) koja je rezultat udruženog dejstva dva parametra i to peptona 4 (B) i tripton soje (E). Dakle, sa povećanjem koncentracije kvašćevog ekstrakta, peptona 1, peptona 4 i tripton soje dolazi do značajnog povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Obzirom da je u slučaju proizvodnje napitaka na bazi surutke neophodno voditi računa o senzornim karakteristikama napitka poželjno je da broj dodataka bude sveden na najmanji mogući, što je takođe bitno i sa aspekta isplativosti procesa proizvodnje. Prema tome pri selekciji izvora azota kao najuticajnijih parametara izabran je ekstrakt kvasca koji prema dobijenim rezultatima u najvećoj meri dovodi do povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Stoga su, na osnovu izračunatih regresionih koeficijenata, tj. njihove apsolutne vrednosti (Slika 13), iz daljeg ispitivanja eliminisani parametri sa manjim uticajem na broj živih ćelija (Y) *L. johnsonii* kao praćeni odgovor sistema.

4.3.2.3. Uticaj različitih izvora minerala na rast soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

Ispitivani izvori minerala su korišćeni u obliku rastvora koncentracije 0,15 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C. Pripremljeni uzorci rekonstituisane surutke sa 8,0% suve materije, su obogaćeni odgovarajućom količinom minerala dodatkom rastvora prema definisanom eksperimentalnom planu.

Eksperimentalni plan i obrada podataka

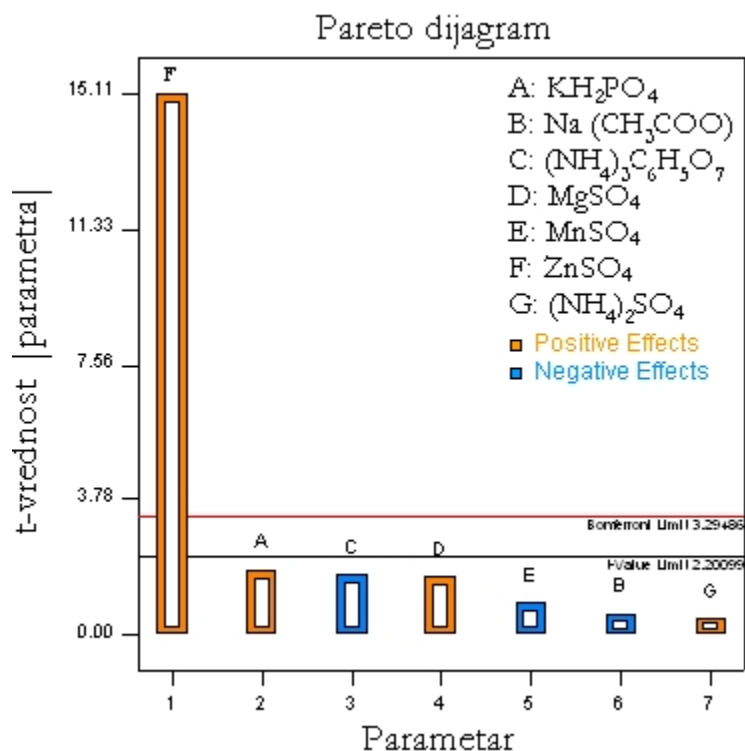
U okviru ispitivanja korišćen je $2^{(7-4)}$ frakcionalni faktorijalni dizajn (FFD) sa sedam faktora na tri nivoa, dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 18 prikazan je plan eksperimenata sa variranim vrednostima za KH_2PO_4 (A), $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$ (B), $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (C), MgSO_4 (D), MnSO_4 (E), ZnSO_4 (F) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (G) kao ulaznih promenljivih i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Tabela 18. Frakcionalni faktorijalni $2^{(7-4)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti							Odziv sistema
	A KH ₂ PO ₄ (%, w/v)	B Na(CH ₃ COO) (%, w/v)	C (NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (%, w/v)	D MgSO ₄ (%, w/v)	E MnSO ₄ (%, w/v)	F ZnSO ₄ (%, w/v)	G (NH ₄) ₂ SO ₄ (%, w/v)	Y Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	7,67 ± 0,154
2	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	7,87 ± 0,148
3	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	7,22 ± 0,123
4	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	7,62 ± 0,148
5	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	7,24 ± 0,098
6	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	7,88 ± 0,162
7	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	7,64 ± 0,121
8	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	7,89 ± 0,145
9	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	(0) 0,55	7,65 ± 0,187
10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	7,14 ± 0,112
11	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	7,87 ± 0,084
12	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	7,37 ± 0,183
13	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	7,80 ± 0,141
14	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	7,57 ± 0,148
15	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	7,79 ± 0,194
16	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	7,90 ± 0,161
17	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	7,23 ± 0,157
18	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	7,13 ± 0,136
19	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(1) 1,0	7,25 ± 0,149
20	(1) 1,0	(1) 1,0	(-1) 0,10	(1) 1,0	(-1) 0,10	(-1) 0,10	(-1) 0,10	7,29 ± 0,111

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru $2^{(7-4)}$ frakcionalnog faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni koeficijenti regresione jednačine, crtani Pareto dijagrami i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke, i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora minerala na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke

Rezultati dobijeni analizom p-vrednosti svakog od faktora u okviru $2^{(7-4)}$ FFD pokazali su da na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiče samo jedan parametar i to ZnSO_4 (F). Dakle, sa povećanjem koncentracije ZnSO_4 dolazi do značajnog povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Obzirom da je u slučaju primene izvora minerala uočeno da broj živih ćelija *L. johnsonii* ne prelazi vrednost $7,90 \pm 0,161 \log$ (CFU/mL) što je približno jednako broju živih ćelija koji je dobijen nakon optimizacije procesa fermentacije surutke bez primene dodatka iz daljeg ispitivanja eliminisani svi izvori minerala. Dobijeni rezultat se može objasniti činjenicom da surutka verovatno već sadrži dovoljnu količinu minerala neophodnih za rast soja *L. johnsonii*.

4.3.2.4. Uticaj različitih izvora vitamina na rast soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

Ispitivani izvori vitamina su korišćeni u obliku rastvora koncentracije 0,50 mg/mL. Rastvori su sterilisani primenom filtera veličine pora 20,0 μm . Pripremljeni uzorci

rekonstituisane surutke sa 8,0% suve materije, su obogaćeni odgovarajućom količinom vitamina dodatkom rastvora prema definisanom eksperimentalnom planu.

Eksperimentalni plan i obrada podataka

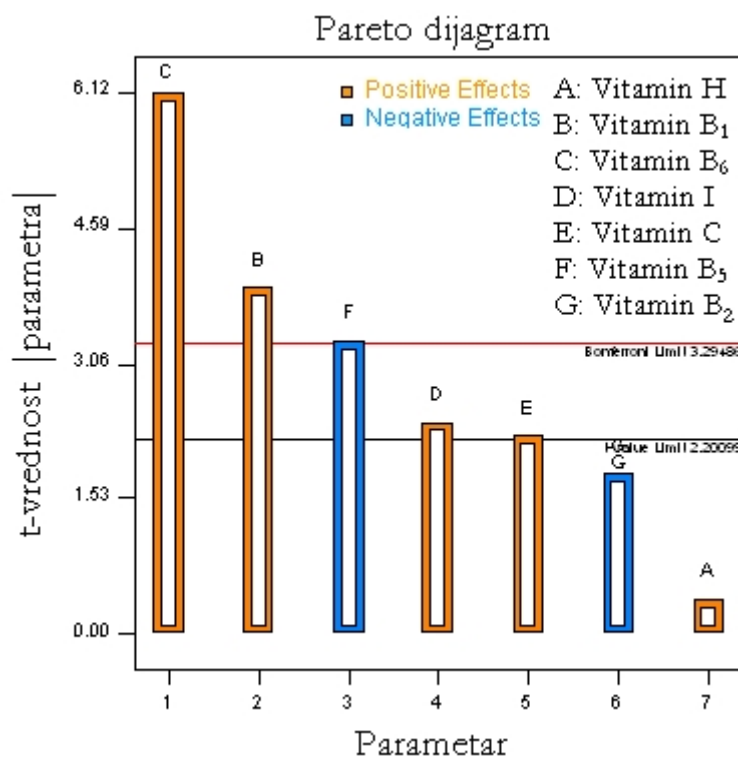
U okviru ispitivanja korišćen je frakcionalni $2^{(7-4)}$ faktorijalni dizajn (FFD) sa sedam faktora na tri nivoa, dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 19 prikazan je plan eksperimenta sa variranim vrednostima za vitamin H (A), vitamin B₁ (B), vitamin B₆ (C), vitamin I (D), vitamin C (E), vitamin B₅ (F) i vitamin B₂ (G) kao ulaznih promenljivih i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Tabela 19. Frakcionalni faktorijalni $2^{(7-4)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti							Odziv sistema
	A	B	C	D	E	F	G	Y
	Vitamin H (%, w/v)	Vitamin B ₁ (%, w/v)	Vitamin B ₆ (%, w/v)	Vitamin I (%, w/v)	Vitamin C (%, w/v)	Vitamin B ₅ (%, w/v)	Vitamin B ₂ (%, w/v)	Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,30 ± 0,126
2	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	7,89 ± 0,145
3	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	7,92 ± 0,165
4	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	7,00 ± 0,072
5	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	8,00 ± 0,064
6	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	8,30 ± 0,143
7	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	8,00 ± 0,184
8	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	7,56 ± 0,168
9	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	7,61 ± 0,192
10	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	7,30 ± 0,147
11	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	8,18 ± 0,162
12	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,00 ± 0,045
13	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,00 ± 0,158
14	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	7,59 ± 0,124
15	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	7,95 ± 0,136
16	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	(0) 0,0005	7,87 ± 0,137
17	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(-1) 0,0	8,00 ± 0,124
18	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	(1) 0,001	8,09 ± 0,111
19	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	8,00 ± 0,121
20	(-1) 0,0	(1) 0,001	(1) 0,001	(-1) 0,0	(-1) 0,0	(1) 0,001	(-1) 0,0	8,00 ± 0,132

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru frakcionalnog $2^{(7-4)}$ faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni koeficijenti regresione jednačine, crtani Pareto dijagrami i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke, i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 15.



Slika 15. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora vitamina na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke

Rezultati dobijeni analizom p-vrednosti svakog od faktora u okviru $2^{(7-4)}$ FFD pokazali su da na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiče pet parametara i to: vitamin B₁ (B), vitamin B₆ (C), vitamin I (D), vitamin C (E), vitamin B₅ (F). Dakle, sa povećanjem koncentracije vitamina B₁, vitamina B₆, vitamina I i vitamina C, dolazi do značajnog povećanja

broja živih ćelija *L. johnsonii*, dok povećanje koncentracije vitamina B₅ dovodi do smanjenja broja živih ćelija.

Obzirom da je u slučaju proizvodnje napitaka na bazi surutke neophodno voditi računa o isplativosti procesa proizvodnje, pri selekciji izvora vitamina kao najuticajniiji parametar izabran je vitamin B₆ koji prema dobijenim rezultatima u najvećoj meri dovodi do povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*. Na osnovu regresionih koeficijenata, tj. njihove apsolutne vrednosti (Slika 15), iz daljeg ispitivanja eliminisani su parametri sa manjim uticajem na broj živih ćelija (Y) *L. johnsonii* kao praćenim odgovorom sistema.

4.3.2.5. Selekcija ključnih nutrijenata u proizvodnji napitka na bazi surutke primenom soja *L. johnsonii* NRRL B-2178

Nutrijenti selektovani u prethodnim ispitivanjima su korišćeni u obliku rastvora sledećih koncentracija: ekstrakt kvasca 0,50 g/mL; inulin 0,333 g/mL; saharoza 0,333 g/mL; vitamin B₆ 0,50 mg/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C, osim rastvora vitamina B₆ koji je sterilisan primenom filtera veličine pora 20,0 µm. Pripremljeni uzorci rekonstituisane surutke sa 8,0% suve materije, su obogaćeni odgovarajućom količinom nutrijenata dodatkom rastvora prema definisanom eksperimentalnom planu.

Eksperimentalni plan i obrada podataka

U okviru ispitivanja korišćen je 2⁽⁴⁻¹⁾ frakcionalni faktorijalni dizajn (FFD) sa četiri faktora na tri nivoa, dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 20 prikazan je plan eksperimenata sa variranim vrednostima za ekstrakt kvasca (A), inulin (B), saharozu (C) i vitamin B₆ (D) kao ulazne promenljive i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Na osnovu prethodnih istraživanja maksimalne koncentracije ekstrakta kvasca, inulina, i saharoze su povećane sa 1,0% na 1,50%. Obzirom na relativno manje izražen uticaj vitamina na broj ćelija *L. johnsonii* u odnosu na izvore azota i ugljenika, koncentracija vitamina B₆ je zadržana na istom nivou.

Tabela 20. Frakcionalni faktorijalni $2^{(4-1)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti				Odziv sistema
	A Kvašćev ekstrakt (%, w/v)	B Inulin (%, w/v)	C Saharoza (%, w/v)	D Vitamin B ₆ (%, w/v)	Y Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,0005	7,95 ± 0,183
2	(1) 1,50	(-1) 0,00	(1) 1,50	(-1) 0,0000	8,42 ± 0,283
3	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(1) 1,50	(1) 0,0010	7,81 ± 0,219
4	(-1) 0,00	(1) 1,50	(1) 1,50	(-1) 0,0000	7,65 ± 0,257
5	(1) 1,50	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(1) 0,0010	8,45 ± 0,277
6	(1) 1,50	(-1) 0,00	(1) 1,50	(-1) 0,0000	8,40 ± 0,261
7	(1) 1,50	(1) 1,50	(1) 1,50	(1) 0,0010	8,10 ± 0,350
8	(1) 1,50	(1) 1,50	(-1) 0,00	(-1) 0,0000	8,00 ± 0,087
9	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,0005	7,98 ± 0,220
10	(1) 1,50	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(1) 0,0010	8,50 ± 0,229
11	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,0005	7,92 ± 0,106
12	(1) 1,50	(1) 1,50	(-1) 0,00	(-1) 0,0000	8,12 ± 0,485
13	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(-1) 0,0000	7,81 ± 0,265
14	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(-1) 0,0000	7,75 ± 0,130
15	(-1) 0,00	(1) 1,50	(-1) 0,00	(1) 0,0010	7,60 ± 0,182
16	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,75	(0) 0,0005	7,95 ± 0,218
17	(-1) 0,00	(1) 1,50	(-1) 0,00	(1) 0,0010	7,65 ± 0,062
18	(-1) 0,00	(-1) 0,00	(1) 1,50	(1) 0,0010	7,80 ± 0,095
19	(1) 1,50	(1) 1,50	(1) 1,50	(1) 0,0010	8,05 ± 0,131
20	(-1) 0,00	(1) 1,50	(1) 1,50	(-1) 0,0000	7,70 ± 0,046

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru $2^{(4-1)}$ frakcionalnog faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni koeficijenti regresione jednačine i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 8,0 h fermentacije surutke, i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 21. Značajnost uticaja svakog od parametra kao i njihovih interakcija određivana je analizom p-vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Regresioni koeficijenti, pri nivou značajnosti od 95,0%, su značajni ukoliko je njihova p-vrednost manja od 0,05 i takvi su u Tabeli 21 označeni zvezdicom.

Tabela 21. Koeficijenti regresione jednačine i značajnost njihovog uticaja u $2^{(4-1)}$ frakcionalnom faktorijalnom modelu primenjenom za predviđanje broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Parametar	Koeficijent	Standardna devijacija	t-vrednost	p-vrednost ^a	Nivo značajnosti, %
A	0,267	0,00955	27,9	< 0,0001*	>99,9
B	-0,129	0,00955	13,5	< 0,0001*	>99,9
C	0,00312	0,00955	0,326	0,750	25,0
D	0,00687	0,00955	0,719	0,487	51,3
AB	-0,0581	0,00955	6,08	< 0,0001*	>99,9
AC	-0,0156	0,00955	1,63	0,130	87,0
AD	0,0131	0,00955	1,37	1,97	80,3

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 21 dobijenih regresionom analizom, na osnovu p-vrednosti svakog od faktora u okviru $2^{(4-1)}$ FFD na broj živih ćelija (Y) statistički značajno utiču dva parametra i to ekstrakt kvasca (A) i inulin (B) i interakcija (AB) koja je rezultat udruženog dejstva ova dva parametra. Dakle, sa povećanjem koncentracije kvašćevog ekstrakta odnosno smanjenjem koncentracije inulina dolazi do značajnog povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature prema kojima dodatak kvašćevog ekstrakta i inulina pozitivno utiče na rast vrsti roda *Lactobacillus*³⁸². Na osnovu visoke vrednosti koeficijenta determinacije R^2 od 0,98 može se smatrati da 98,0% varijacija odgovora sistema može biti predviđeno modelom. Obzirom na p-vrednosti > 0,05 dobijene za saharozu i vitamin B₆ ovi dodaci su isključeni iz daljeg ispitivanja. Ovo ukazuje da surutka verovatno već sadrži dovoljnu količinu vitamina neophodnih za rast ćelija. Takođe, ovaj rezultat se može delimično pripisati vitaminima eventualno prisutnim u ekstraktu kvasca. Obzirom da saharoza nije ostvarila značajan uticaj na rast ćelija *L. johnsonii* može se pretpostaviti da ovaj soj nije sposoban da sa visokom efikasnošću metaboliše druge ugljene hidrate u prisustvu inulina³⁸³. Zanimljivo je napomenuti da je fermentacija surutke sojem *L. johnsonii* u prisustvu odabranih nutrijenata trajala 4,0 h, do postizanja pH 4,6. Ovaj rezultat je u skladu sa navodima iz literature prema kojima vreme fermentacije surutke uz dodatak 50,0% mleka iznosi oko 4,0-4,5 h^{384,385}, dok vreme fermentacije u prisustvu 1,0-3,0% prebiotika iznosi oko 3,0-3,25 h. Približno isti rezultat dobijen je u istraživanju³⁸⁶ pri fermentaciji mleka u

prisustvu prebiotika (1,0% inulin i 5,0% oligofruktoza), u kome je fermentacija prosečno trajala oko 6,0 h. Sa druge strane, rezultat se razlikuje od rezultata prijavljenih od strane Dave i Shah (1998)³⁸⁷ za fermentaciju mleka primenom probiotskih mikroorganizama prema kojima vreme fermentacije iznosi oko 7,0-9,5 h.

Obzirom da je u ovom segmentu istraživanja ekstrakt kvasca ostvario pozitivan uticaj na rast ćelija *L. johnsonii* u nastavku istraživanja neophodno je izvršiti povećanje koncentracije ovog nutrijenta. S druge strane, obzirom na značajan ($p < 0,05$) negativan uticaj inulina, u nastavku istraživanja je neophodno da koncentracija ovog nutrijenta bude smanjena.

4.3.3. Optimizacija procesa proizvodnje napitka na bazi surutke primenom soja *L. johnsonii* NRRL B-2178 uz dodatak selektovanih nutrijenata

Nutrijenti selektovani u prethodnom ispitivanju su korišćeni u obliku rastvora sledećih koncentracija: ekstrakt kvasca 0,50 g/mL; inulin 0,333 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C.

U procesu optimizacije proizvodnje napitaka na bazi surutke sojem *L. johnsonii* korišćena je surutka sa sadržajem suve materije 8,0% (w/v) koja je pripremana prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.1. Pripremljeni uzorci surutke su obogaćeni odgovarajućom količinom nutrijenata definisanom prema eksperimentalnom planu. Nakon toga uzorci su zasejavani sa 8,42% (v/v) inokuluma testiranog mikroorganizma pripremanog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.1. i ferementisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. na temperaturama 35,0, 39,0 i 43,0 °C. Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje broja živih ćelija u testiranim uzorcima metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.6. primenom MRS agara (3.2.2.3.).

Eksperimentalni plan i obrada podataka

U okviru ispitivanja korišćen je Box-Behnken-ov eksperimentalni plan sa tri faktora, na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. U Tabeli 22 prikazan je Box-Behnken-ov plan eksperimenta i varirane vrednosti za temperaturu (A), ekstrakt kvasca (B) i inulin (C) kao ulaznih promenljivih i brojem živih ćelija (Y) koji predstavlja odziv sistema.

Na osnovu prethodnog istraživanja maksimalne koncentracije ekstrakta kvasca su povećane sa 1,5% na 3,0%, dok je koncentracija inulina smanjena sa 1,5% na 1,0%. Vrednosti temperature su varirane u opsegu odgovarajućem za rast probiotskih mikroorganizama.

Tabela 22. Box-Behnken-ov plan eksperimenta sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija *L. johnsonii* kao odzivom sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti			Odziv sistema
	A Temperatura (%, w/v)	B Kvašćev ekstrakt (%, w/v)	C Inulin (%, w/v)	Y Broj živih ćelija, log (CFU/mL)
1	(0) 39,0	(-1) 0,00	(-1) 0,00	8,00 ± 0,295
2	(0) 39,0	(0) 1,50	(0) 0,50	7,80 ± 0,196
3	(0) 39,0	(0) 1,50	(0) 0,50	7,85 ± 0,058
4	(1) 43,0	(0) 1,50	(-1) 0,00	7,14 ± 0,252
5	(0) 39,0	(0) 1,50	(0) 0,50	7,90 ± 0,221
6	(1) 43,0	(0) 1,50	(1) 1,00	7,50 ± 0,166
7	(1) 43,0	(-1) 0,00	(0) 0,50	7,10 ± 0,219
8	(1) 43,0	(1) 3,00	(0) 0,50	7,70 ± 0,180
9	(0) 39,0	(1) 3,00	(-1) 0,00	8,50 ± 0,173
10	(-1) 35,0	(1) 3,00	(0) 0,50	7,88 ± 0,072
11	(0) 39,0	(1) 3,00	(1) 1,00	8,70 ± 0,104
12	(-1) 35,0	(0) 1,50	(-1) 0,00	7,81 ± 0,165
13	(0) 39,0	(-1) 0,00	(1) 1,00	8,08 ± 0,154
14	(-1) 35,0	(-1) 0,00	(0) 0,50	7,85 ± 0,115
15	(-1) 35,0	(0) 1,50	(1) 1,00	7,80 ± 0,156

Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru Box-Behnken-ovog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 22 najveći broj živih ćelija, od 8,70 log (CFU/mL), postignut je na temperaturi 39,0 °C u prisustvu 3,0% ekstrakta kvasca i 1,0% inulina (Tabela 22, eksp. 11). Postignuti broj ćelija je statistički značajno ($p < 0,05$) veći u odnosu na broj živih ćelija postignut na istoj temperaturi bez prisustva nutrijenata, kao i na temperaturama 35,0 °C (Tabela 22, eksp. 10) i 43,0 °C (Tabela 22, eksp. 8), u prisustvu oba nutrijenta. Shodno tome može se reći da temperatura od 39,0 °C zajedno sa nutrijentima, u značajnoj meri doprinosi rastu soja *L. johnsonii*. Povećanje broja živih ćelija u odnosu na

početni broj je iznosilo oko 1,70 log (CFU/mL) što se može smatrati umerenim do visokim rastom³⁸⁸ u poređenju sa sojevima koji poseduju izraženu proteolitičku aktivnost.

Takođe, interesantno je primetiti da je rast ćelija direktno povezan sa koncentracijom ekstrakta kvasca pri uslovima konstantne koncentracije inulina (1,0%) i temperature 39,0 °C. Sadržaj nukleotida, peptida i proteina u ekstraktu kvasca direktno utiče na rast ćelija. Potrebna količina ekstrakta kvasca direktno zavisi od sadržaja ovih komponenti što takođe može da varira u zavisnosti od proizvođača³⁸⁹. Povećanje koncentracije ekstrakta kvasca sa 0,0 na 3,0% dovodi do povećanja broja živih ćelija za oko 0,70 log jedinica (Tabela 22, eksp. 11 i 13). Međutim dodatak ovog nutrijenta u fermentisane mlečne proizvode može dovesti do promene boje proizvoda ili pojave neprijatne arome. Ovaj problem se na osnovu naših ranijih istraživanja³⁹⁰ može rešiti obogaćivanjem napitaka različitim voćnim bazama koje imaju kapacitet da maskiraju negativan uticaj ekstrakta kvasca na senzorne karakteristike napitka.

Takođe je neophodno istaći da se povećanje broja živih ćelija od 1,70 log jedinica nakon 4,0 h fermentacije može smatrati značajnim unapređenjem u poređenju sa rezultatima navedenim u literaturi³⁹¹ prema kojima se u fermentaciji mleka povećanje broja ćelija od 2,0 log jedinice registruje tek nakon 24,0 h.

Za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija) u okviru Box-Behnken-ovog dizajna primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C + \beta_{12} \times A \times B + \beta_{23} \times B \times C \\ + \beta_{13} \times A \times C + \beta_{11} \times A^2 + \beta_{22} \times B^2 - \beta_{33} \times C^2$$

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na broj živih ćelija *L. johnsonii* kao odziv sistema, sprovedena je analiza varijanse (ANOVA). Analizom varijanse određeni su koeficijenti regresione jednačine i analizirane značajnosti uticaja svakog od parametara modela na broj živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 23. Značajnost uticaja svakog od parametara kao i njihovih interakcija određivana je analizom p-vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Regresioni koeficijenti,

pri nivou značajnosti od 95,0%, su značajni ukoliko je njihova p-vrednost manja od 0,05 i takvi su u Tabeli 23 obeleženi zvezdicom.

Tabela 23. Koeficijenti regresione jednačine i značajnost njihovog uticaja u Box-Behnken-ovom modelu primenjenom za predviđanje broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Parametar	Koeficijent	Standardna devijacija	t-vrednost	p-vrednost*	Nivo značajnosti, %
A	-0,238	0,0299	7,96	0,000512*	99,95
B	0,219	0,0299	7,32	0,000751*	99,92
C	0,0787	0,0299	2,63	0,0468*	95,32
AB	0,143	0,0423	3,38	0,0200*	98,00
AC	0,0925	0,0423	2,19	0,0805	91,95
BC	0,0300	0,0423	0,71	0,510	49,00
A²	-0,488	0,0441	11,1	0,000105*	99,98
B²	0,270	0,0441	6,12	0,00168*	99,83
C²	0,200	0,0441	4,54	0,00617*	99,38

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 23, za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija) u okviru Box-Behnken-ovog dizajna može se primeniti polinom drugog reda:

$$Y = 7.85 - 0.238 \times A + 0.219 \times B + 0.0787 \times C + 0.143 \times A \times B + 0.0925 \times A \times C + 0.03 \times B \times C - 0.488 \times A^2 + 0.270 \times B^2 + 0.200 \times C^2$$

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 23, analizom p-vrednosti svakog od faktora u okviru Box-Behnken-ovog dizajna, interakcija ekstrakta kvasca i inulina (BC) kao i temperature i inulina (AC) nema statistički značajan uticaj ($p > 0,05$) na broj živih ćelija (Y) *L. johnsonii*. Shodno tome ova dva člana su isključena iz modela tako da je za opis odzivne funkcije Y (broj živih ćelija) primenjen prilagođeni model opisan modifikovanim polinom drugog reda:

$$Y = 7.85 - 0.238 \times A + 0.219 \times B + 0.0787 \times C + 0.143 \times A \times B - 0.488 \times A^2 + 0.270 \times B^2 + 0.200 \times C^2$$

U cilju određivanja značajnosti prilagođenog modela sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 24.

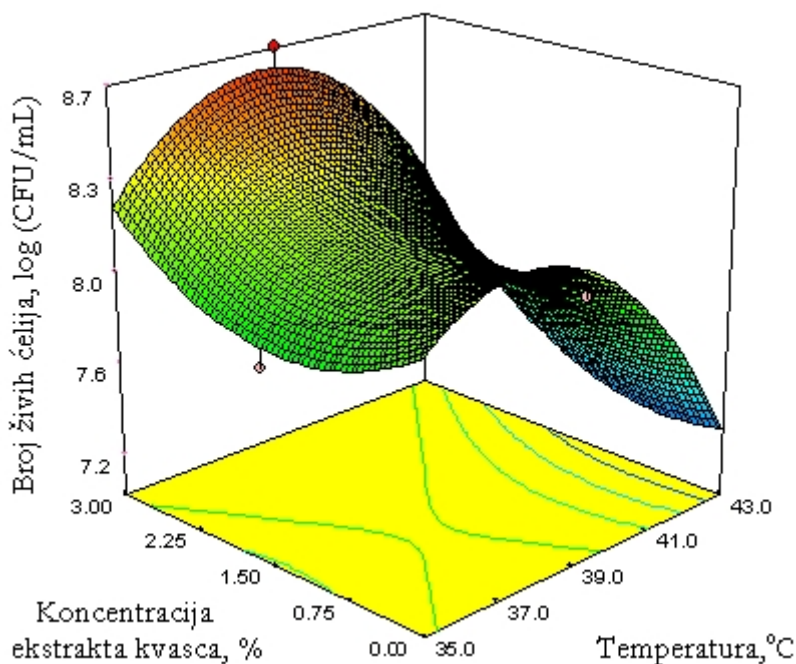
Tabela 24. Određivanje značajnosti modela analizom varijanse Box-Behnken-ovog modela primenjenog za predviđanje broja živih ćelija *L. johnsonii* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Poreklo varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Srednja vrednost kvadrata	f-vrednost	p-vrednost
Model	2,37	7	0,338	32,1	< 0,0001*
Rezidual	0,0736	7	0,0105		
Odstupanje	0,0686	5	0,0137	5,49	0,161
Čista greška	0,005	2	0,00250		
Ukupno	2,44	14			

R² = 0,97

Kao što je prikazano u Tabeli 24 prilagođeni model je statistički značajan ($p < 0,0001$). Koeficijent determinacije od 0,97, potvrđuje da 97,0% varijacija odgovora sistema može biti predviđeno prilagođenim modelom.

Kako bi se razumeo uticaj parametara na broj živih ćelija *L. johnsonii* nacrtana je odzivna površina (Slika 16) koja prikazuje modelom predviđen uticaj dva parametra na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnoj vrednosti trećeg (koncentracija inulina 1,0%). Sa odzivne površine moguće je proceniti optimalne vrednosti parametara pri kojima se postiže najveći broj živih ćelija *L. johnsonii*.



Slika 16. Uticaj koncentracije ekstrakta kvasca i temperature na broj živih ćelija *L. johnsonii* pri konstantnoj koncentraciji inulina (1,0%).

Kao što je prikazano na Slici 16, sa povećanjem koncentracije ekstrakta kvasca i temperature dolazi do povećanja broja živih ćelija *L. johnsonii*.

Za optimizaciju procesa u okviru postupka odzivnih površina korišćen je koncept željene funkcije. U prvom ciklusu optimizacije sa ograničenjima definisanim minimizacijom ili maksimizacijom nekog od faktora ili odziva dobijeni su sledeći rezultati koji podrazumevaju najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije (1): Maksimalni broj živih ćelija *L. johnsonii* od 8,65 log (CFU/mL) se postiže nakon 4,0 h fermentacije surutke na temperaturi 39,0 °C pri koncentraciji inulina od 1,0% i koncentraciji ekstrakta kvasca od 3,0%.

Radi validacije modela izveden je eksperiment u kome je surutka fermentisana 4,0 h sojem *L. johnsonii* u prisustvu 1,0% inulina i 3,0% ekstrakta kvasca na temperaturi 39,0 °C.

Dobijeni broj živih ćelija iz validacionog eksperimenta je iznosio $8,70 \pm 0,159$ log (CFU/mL) što se nije statistički značajno ($p > 0,05$) razlikovalo od broja ćelija predviđenog prilagođenim modelom.

Poređenjem rezultata sa rezultatima zabeleženim u prethodnom ispitivanju (Odeljak 4.3.1.) može se uočiti da se, pri istoj koncentraciji inokuluma (8,42%) i istom sadržaju suve materije (8,0%), sa povećanjem temperature sa 35,0 na 39,0 °C, dodatkom 1,0% inulina i 3,0% ekstrakta kvasca vreme fermentacije skraćuje za 5,0 h (sa 9,0 na 4,0 h) a ukupan broj živih ćelija *L. johnsonii* povećava sa 8,04 log (CFU/mL) na 8,70 log (CFU/mL).

Značajno smanjenje vremena trajanja fermentacije može biti objašnjeno činjenicom da su vrste roda *Lactobacillus*, po pitanju fermentativnih sposobnosti, aktivnije u nutritivno bogatijim supstratima. Prema podacima navedenim u literaturi, fermentacija surutke vrstama roda *Lactobacillus* može trajati 15,0-17,0 h, a da se ne postigne pH vrednost niža od 5,0 jedinica¹⁹¹, dok fermentacija mleka probiotskim sojem *L. acidophilus* La-5 do postizanja pH vrednosti 4,6 jedinica traje oko 10,5 h, što je čak 5,0 h kraće u odnosu na fermentaciju surutke. Uzrok tako duge fermentacije je slabija aktivnost bakterija na surutki koja nije njihovo prirodno stanište i u svom sastavu ima znatno manji sadržaj nutrijenata neophodnih za rast BMK, za koje je poznato da zahtevaju jako složene medijume jer nisu u stanju da same sintetišu sve nutrijente koji su im neophodni⁴⁰.

4.3.4. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se maksimalni broj živih ćelija *L. johnsonii* od 8,70 log (CFU/mL) u napitku postiže nakon 4,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve materije primenom 8,42% inokuluma, na temperaturi 39,0 °C, pri koncentraciji inulina od 1,0% i koncentraciji ekstrakta kvasca od 3,0%.

4.4. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom komercijalne ABY-6 kulture

4.4.1. Ispitivanje uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom ABY-6 kulture

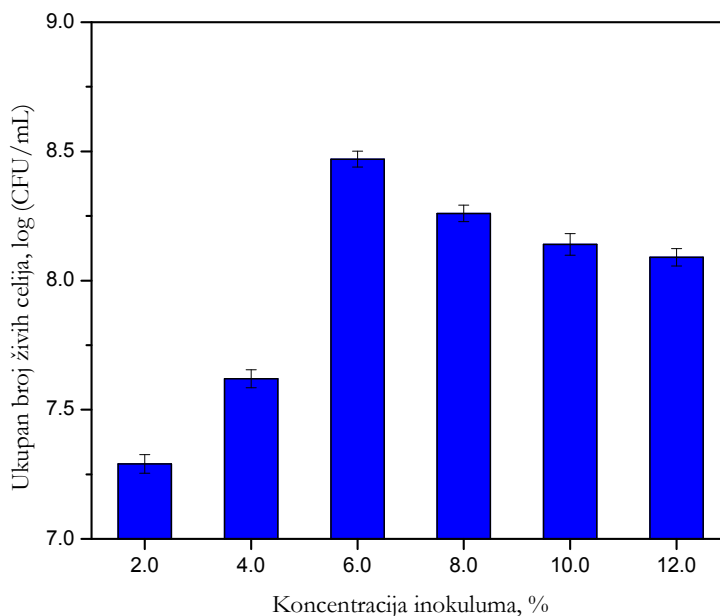
Pri ispitivanju uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka. Tokom ispitivanja praćen je uticaj koncentracije inokuluma, temperature, sadržaja mleka, dodatka ekstrakta kvasca i inulina na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture.

Uzorci su pripremani prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.3., zasejavani odgovarajućom količinom inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2. i fermentisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje ukupnog broja živih ćelija (\log (CFU/mL)) u testiranim uzorcima metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.6., sabiranjem broja izraslih kolonija *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* i *B. bifidum* na MRS agaru (Odeljak 3.2.2.3.) i *S. thermophilus* na M17 (Odeljak 3.2.2.5.) agaru.

4.4.1.1. Uticaj koncentracije inokuluma na rast komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja koncentracije inokuluma uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2. Uzorci su zatim zasejavani sa 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 i 12,0% (v/v) inokuluma ABY-6 kulture i fermentisani na temperaturi 42,0 °C (preporuka proizvođača). Rezultati ispitivanja uticaja koncentracije inokuluma na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture prikazani su na Slici 7.



Slika 17. Uticaj koncentracije inokuluma na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture

Tokom ispitivanja uticaja koncentracije inokuluma vreme trajanja fermentacije do postizanja pH vrednosti 4,6 u svim uzorcima se kretalo u intervalu 3,5-4,5 h. Najveći ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture koji je iznosio $8,47 \pm 0,031$ log (CFU/mL) je postignut primenom 6,0% inokuluma nakon 4,0 h fermentacije, dok je najmanji ukupan broj živih ćelija od $7,29 \pm 0,036$ postignut primenom 2,0% inokuluma nakon 4,5 h fermentacije (Slika 17)

Zanimljivo je istaći da su koncentracije inokuluma veće od 6,0% bez obzira na relativno brzo (3,5 h) postizanje pH vrednosti 4,6, dovele do sporijeg rasta ABY-6 kulture čiji se ukupan broj živih ćelija kretao u intervalu 8,09-8,26 log (CFU/mL). Sa slike se jasno može uočiti da sa porastom koncentracije inokuluma preko 6,0% dolazi do smanjenja ukupnog broja živih ćelija ABY-6 kulture. Ovo može biti objašnjeno sporijim razmnožavanjem ćelija usled nedostatka hranljivih materija u kasnijim fazama fermentacije kao posledice prisustva visoke početne koncentracije ćelija.

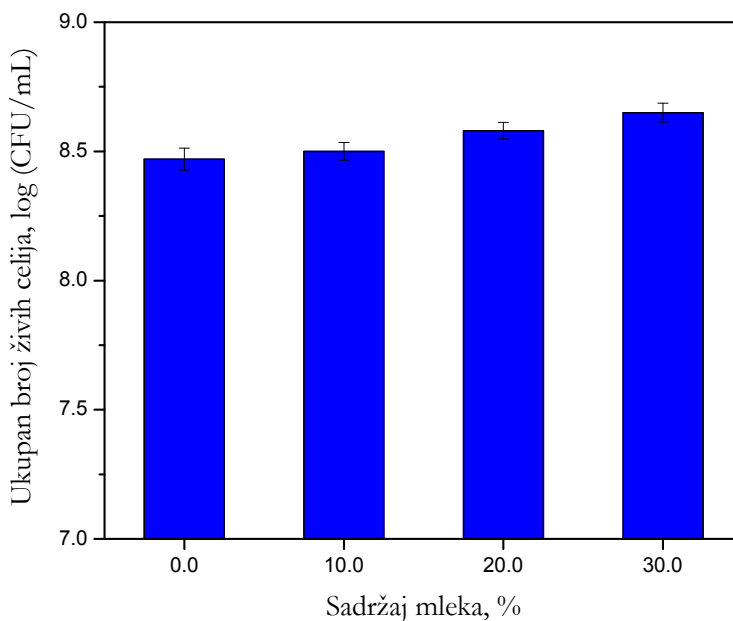
Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature⁴⁰ prema kojima sa porastom koncentracije inokuluma dolazi do porasta ukupnog broja živih ćelija probiotskih mikroorganizama. Sa druge strane prema navodima iz literature³⁹² indeks rasta probiotske

kulture može biti obrnuto proporcionalan koncentraciji inokuluma pa primena visokih koncentracija inokuluma ABY kulture može dovesti do pojave da je brzina rasta ćelija znatno manja od brzine odumiranja ćelija

Obzirom da je za proizvodnju napitaka na bazi surutke primarno bitan faktor broj živih ćelija prisutnih u napitku, u daljem istraživanju kao optimalna koncentracija inokuluma za rast komercijalne ABY-6 kulture korišćena je koncentracija od 6,0% kojom se u uzorku sa 0,0% mleka za 4,0 h fermentacije postiže ukupan broj živih ćelija od $8,47 \pm 0,031 \log$ (CFU/mL).

4.4.1.2. Uticaj sadržaja mleka na rast komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0; 10,0; 20,0 i 30,0% (v/v) mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma ABY-6 kulture i fermentisani na temperaturi 42,0 °C (preporuka proizvođača). Rezultati ispitivanja uticaja sadržaja mleka na ukupni broj živih ćelija ABY-6 kulture prikazani su na Slici 18.



Slika 18. Uticaj sadržaja mleka na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke

Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture kretao se u intervalu $8,47 \pm 0,042$ do $8,65 \pm 0,037$ log (CFU/mL). Najniži broj ćelija zabeležen je u uzorku koji je sadržao 0,0% mleka dok je najveći broj živih ćelija zabeležen u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka (Slika 18). Ovo može biti objašnjeno činjenicom da se dodatkom mleka surutka, koja u svom sastavu ima nizak sadržaj nutrijenata⁴⁰ neophodnih za rast ove vrste mikroorganizama, na najprirodniji način obogaćuje što doprinosi unapređenju rasta primenjene kulture. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima iz literature³⁹³ prema kojima dodatak 12,0% mleka u prahu dovodi do povećanja broja živih ćelija ABY-2 kulture u jogurtu za oko 1,0 log jedinicu.

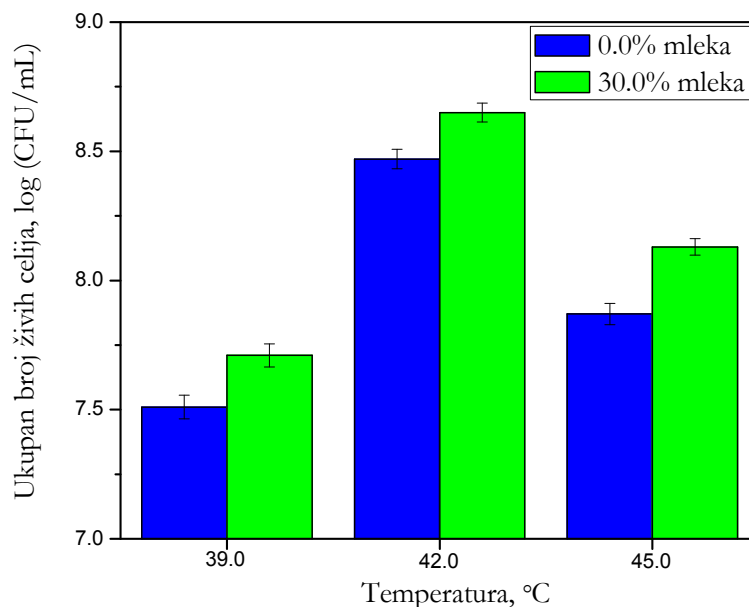
Zanimljivo je takođe istaći da bi dodatak 40,0 ili 50,0% mleka verovatno još izraženije uticao na rast ABY-6 kulture, međutim, količina od 30,0% je izabrana kao maksimalna količina čijim se dodatkom teži formulisanju supstrata čiji je sastav veoma sličan sastavu humanog mleka³⁹⁴ koje ima odnos kazein/proteini surutke oko 30,0 : 70,0%. Na ovaj način se, osim izbegavanja prekomernih troškova obogaćivanjem otpadne sirovine relativno skupim

dodatkom, dobija brzo i lako svarljiv napitak koji je pogodan čak i za osobe sa osetljivim intestinalnim traktom.

U daljem istraživanju kao optimalni sadržaj mleka za rast komercijalne ABY-6 kulture korišćen je sadržaj od 30,0% mleka pri kojem se sa 6,0% inokuluma za 4,0 h postiže broj ćelija od $8,78 \pm 0,031$ log (CFU/mL).

4.4.1.3. Uticaj temperature fermentacije na rast komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja temperature fermentacije uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0% i 30,0% (v/v) mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma ABY-6 kulture i fermentisani na temperaturama 39,0; 42,0 i 45,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Rezultati ispitivanja uticaja temperature fermentacije na ukupni broj živih ćelija ABY-6 kulture prikazani su na Slici 19.



Slika 19. Uticaj temperature fermentacije na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke

Tokom ispitivanja uticaja temperature fermentacije ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture kretao se u intervalu $7,51 \pm 0,046$ do $8,65 \pm 0,039$ log (CFU/mL). Najniži broj ćelija zabeležen je u uzorku sa 0,0% mleka koji je fermentisan na 39,0 °C dok je najveći broj živih

ćelija zabeležen u uzorku sa 30,0% mleka koji je fermentisan na 42,0 °C (Slika 19). Kao što se može uočiti na Slici 19 najveći broj ćelija je zabeležen na temperaturi 42,0 °C ($8,47 \pm 0,038$ i $8,65 \pm 0,039$ log (CFU/mL) u obe vrste uzoraka (0,0 i 30,0% mleka, respektivno). Dobijeni rezultati su nešto bolji od rezultata navedenih u literaturi³⁹⁵ prema kojim se za 8,0 h fermentacije surutke na temperaturi 40,0 °C postiže ukupan broj živih ćelija od oko 8,0 log (CFU/mL).

Ono što je neophodno istaći pri tumačenju rezultata prikazanih na Slici 19 je činjenica da je temperatura od 42,0 °C, optimalna temperatura rasta soja *S. thermophilus* koji je dominantan soj komercijalne ABY-6 kulture, sa zastupljenošću od 80,0% (Odeljak 3.1.1.), dok je temperatura od 45,0 °C optimalna temperatura rasta soja *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* koji je u ABY-6 kulturi zastupljen u količini od oko 1,0%.

Obzirom da se soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* odlikuje izrazitom proteolitičkom aktivnošću kojom obezbeđuje dodatnu količinu aminokiselina neophodnih za rast soja *S. thermophilus*, ukupan broj živih ćelija ($7,87 \pm 0,041$ i $8,13 \pm 0,032$ log (CFU/mL)) zabeležen na temperaturi 45,0 °C je statistički značajno ($p < 0,05$) veći od broja ($7,51 \pm 0,046$ i $7,71 \pm 0,045$ log (CFU/mL)) zabeleženog na temperaturi 39,0 °C u obe vrste uzoraka 0,0 i 30,0% mleka, respektivno. Sa druge strane broj ćelija zabeležen na temperaturi 45,0 °C je značajno manji od broja ćelija zabeleženog na 42,0 °C koja predstavlja optimalnu temperaturu rasta dominantnog soja u ABY-6 kulturi. Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature³⁹² prema kojima inkubacijom jogurtne i probiotskih kultura na 44,0 °C umesto na 40,0 °C dolazi do razvijanja antagonizma između soja *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i ostalih sojeva. Na temperaturama 44,0-45,0 °C soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* postaje dominantan proizvodi veliku količinu mlečne kiseline, vodonik-peroksida i verovatno bakteriocine čime inhibira rast ostalih mikroorganizama. Sojevi prisutni u kulturama tipa ABY su, prema navodima iz literature^{396,397,398,399,400}, veoma osetljivi na dejstvo vodonik-peroksida koji proizvodi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

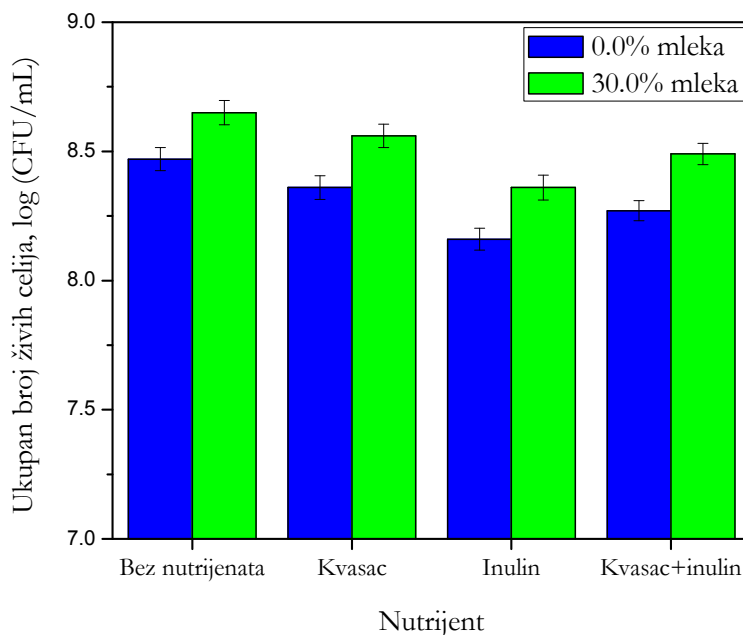
Ono što se takođe može uočiti jeste da je ukupan broj živih ćelija zabeležen na temperaturi 42,0 °C u uzorku sa 30,0% mleka statistički značajno ($p < 0,05$) veći od broja zabeleženog u uzorku sa 0,0% mleka, što potvrđuje pozitivan uticaj mleka na rast ABY-6 kulture.

U daljem istraživanju kao optimalna temperatura za rast komercijalne ABY-6 kulture korišćena je temperatura od 42,0 °C na kojoj se pri sadržaju mleka od 30,0% i koncentraciji inokuluma od 6,0% za 4,0 h postiže ukupan broj živih ćelija od $8,65 \pm 0,031 \log$ (CFU/mL).

4.4.1.4. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na rast komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja inulina i ekstrakta kvasca na rast komercijalne ABY-6 kulture uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0% i 30,0% (v/v) mleka. Pripremljeni uzorci su obogaćeni dodatkom 3,0% (w/v) ekstrakta kvasca i 1,0% (w/v) inulina. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Ispitivani izvori inulina i ekstrakta kvasca su korišćeni u obliku rastvora sledećih koncentracija: ekstrakt kvasca 0,50 g/mL i inulin 0,333 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C. Rezultati ispitivanja uticaja inulina i ekstrakta kvasca na ukupni broj živih ćelija ABY-6 kulture prikazani su na Slici 20.



Slika 20. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke

Tokom ispitivanja uticaja dodatka inulina i ekstrakta kvasca broj živih ćelija ABY-6 kulture u kontrolnom uzorku bez dodataka je iznosio $8,47 \pm 0,045$ u uzorku sa 0,0% mleka i $8,65 \pm 0,047$ log (CFU/mL) u uzorku sa 30,0% mleka. Dodatak inulina, ekstrakta kvasca kao i kombinacije inulina i ekstrakta kvasca statistički značajno ($p < 0,05$) utiče na smanjenje ukupnog broja živih ćelija ABY-6 kulture (Slika 20). Najizraženiji negativan uticaj na rast ćelija zabeležen je u uzorcima sa dodatkom 1,0% inulina u kojima je ukupan broj živih ćelija iznosio $8,16 \pm 0,042$ i $8,36 \pm 0,048$ log (CFU/mL) za uzorke sa 0,0 i 30,0% mleka, respektivno. Ovakav rezultat se razlikuje od rezultata navedenih u literaturi³⁹⁵ prema kojima ekstrakt kvasca utiče na rast termofilnih mikroorganizama pri fermentaciji surutke. Sa druge strane, prema navodima iz literature¹⁷³ inulin kao prebiotik ne mora imati uticaj na rast probiotskih kultura. Takođe, obzirom na relativno kratko vreme fermentacije može se pretpostaviti da primena složenih ugljenih hidrata (inulin) i dodatnih izvora proteina (ekstrakt kvasca) usporava metabolizam primenjene kulture, a obzirom da se radi o komercijalnoj kulturi specijalno dizajniranoj za fermentaciju laktoze i proteina mleka to verovatno dovodi do usporavanja njenog rasta.

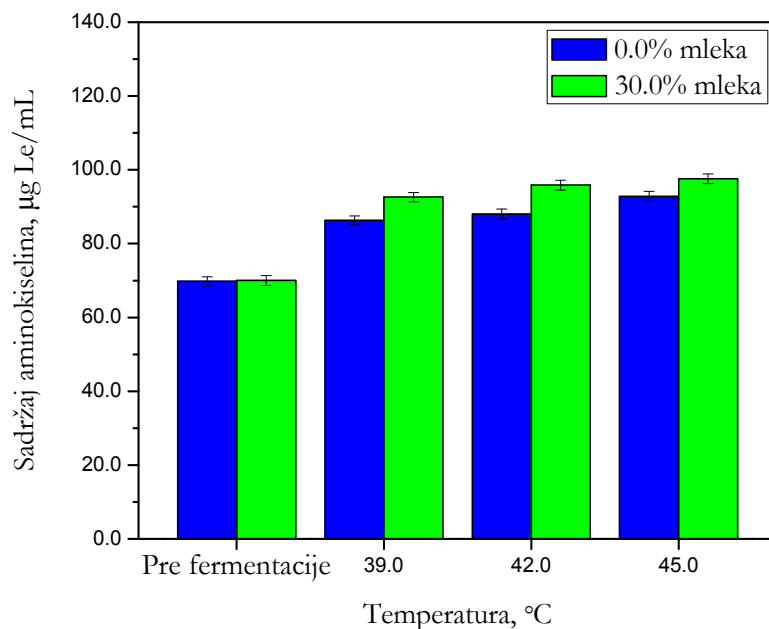
Obzirom da su ispoljili negativan uticaj na rast ABY-6 kulture, oba dodatka su isključena iz daljeg istraživanja.

4.4.2. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost komercijalne ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturama 39,0; 42,0 i 45,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje proteolitičke aktivnosti komercijalne ABY-6 kulture pri opisanim uslovima, praćenjem sadržaja aminokiselina izraženih kao $\mu\text{gLe/mL}$, prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.9. Rezultati ispitivanja uticaja temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost ABY-6 kulture prikazani su na Slici 21.



Slika 21. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na sadržaj aminokiselina u napitku dobijenom nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture

Tokom ispitivanja uticaja temperature i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost komercijalne ABY-6 kulture maksimalan sadržaj aminokiselina od $97,59 \pm 1,26 \mu\text{gLe/mL}$ zabeležen je u uzorku fermentisanom na temperaturi $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$ koji je sadržao 30,0% mleka (Slika 21). Dobijeni rezultati su značajno bolji od rezultata prijavljenih u literaturi¹⁷⁴ prema kojima se sličan sadržaj aminokiselina dobija nakon 12,0 h fermentacije surutke, na osnovu čega se sojevi u primenjenoj ABY-6 kulturi mogu smatrati izrazitim proteoliticima.

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 21, sadržaj aminokiselina zabeležen u uzorku sa 30,0% mleka fermentisanom na temperaturi $42,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($95,86 \pm 1,32 \mu\text{gLe/mL}$) je statistički značajno ($p < 0,05$) veći od sadržaja aminokiselina koji je zabeležen u istom uzorku pri temperaturi fermentacije $39,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($92,58 \pm 1,24 \mu\text{gLe/mL}$). Sa druge strane, razlika u sadržaju aminokiselina u uzorku fermentisanom na temperaturi $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($97,59 \pm 1,26 \mu\text{gLe/mL}$) ne razlikuje se značajno ($p > 0,05$) od sadržaja aminokiselina zabeleženog pri temperaturi fermentacije $42,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature⁴⁰¹ prema kojima temperatura nema značajan uticaj na proteolitičku aktivnost ove vrste mikroorganizama.

Potpuno isti trend u pogledu razlike u sadržaju aminokiselina na različitim temperaturama (Slika 21), zabeležen je i u uzorcima koji su sadržali 0,0% mleka, s tim što je sadržaj aminokiselina zabeležen ovim uzorcima statistički značajno ($p < 0,05$) manji od sadržaja aminokiselina zabeleženih u uzorcima sa 30,0% mleka na svim temperaturama.

Zanimljivo je napomenuti da se na osnovu ovih rezultata i rezultata prikazanih u Odeljku 4.4.1.3. koji se odnose na uticaj temperature na ukupan broj živih ćelija, sada može zaključiti da se bez obzira na povećan sadržaj aminokiselina na temperaturi 45,0 °C koji potiče od aktivnosti soja *L. bulgaricus*, maksimalan ukupan broj živih ćelija ipak postiže na optimalnoj temperaturi rasta (42,0 °C) soja *S. thermophilus* kao dominantnog soja u ABY-6 kulturi (koji je zastupljen 80,0%). Drugim rečima, soj *S. thermophilus* na temperaturi 45,0 °C nije u stanju da iskoristi dostupne aminokiseline što za posledicu ima zaostajanje određene količine (oko 1,73 $\mu\text{gLe/mL}$) aminokiselina u uzorku.

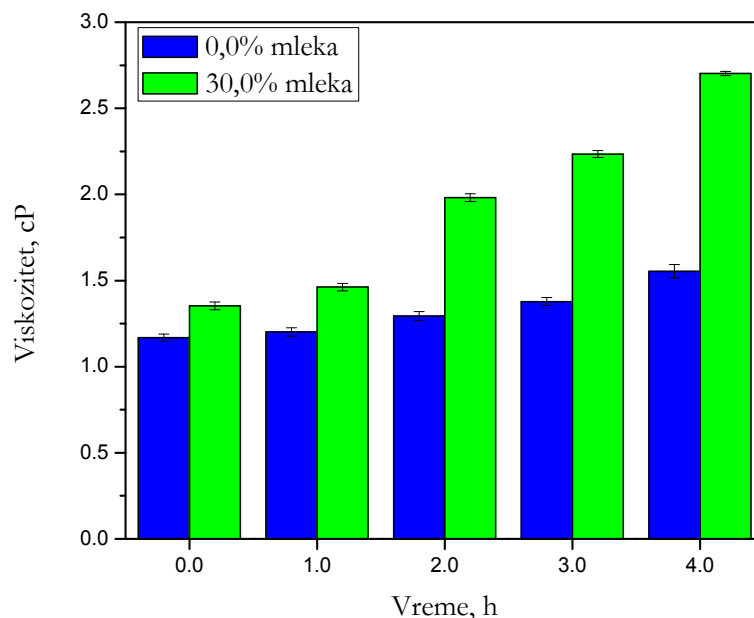
Na osnovu prikazanih rezultata kao i rezultata koji se odnose na ukupan broj živih ćelija može se zaključiti da se pri temperaturi fermentacije od 42,0 °C i sadržaju mleka od 30,0% ostvaruje adekvatan sadržaj aminokiselina od $95,86 \pm 1,32 \mu\text{gLe/mL}$ fermentisanog napitka.

4.4.3. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka.

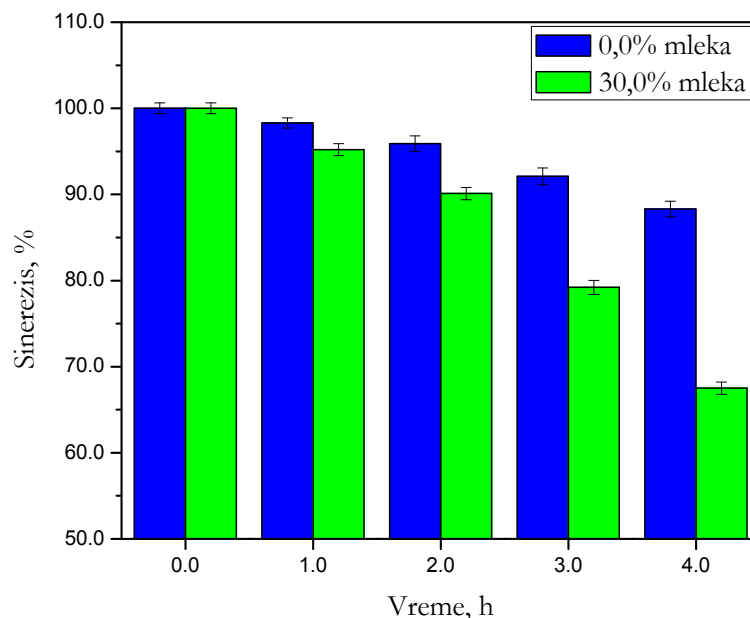
Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje viskoziteta i sinerezisa proizvedenih napitaka prema metodama opisanim u Odeljku 3.2.5.7. i Odeljku 3.2.5.8. Rezultati ispitivanja uticaja sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitaka na bazi surutke prikazani su na Slici 22.



Slika 22. Uticaja sadržaja mleka na viskozitet napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture

Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka na viskozitet napitka na bazi surutke maksimalna vrednost viskoziteta od $2,7023 \pm 0,0123$ cP zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka. Vrednost viskoziteta zabeležena u uzorku sa 0,0% mleka ($1,554 \pm 0,0388$ cP) je nakon 4,0 h fermentacije bila statistički značajno ($p < 0,05$) manja od vrednosti zabeležene u uzorku sa 30,0% mleka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da prisustvo mleka značajno utiče na povećanje viskoziteta fermentisanog napitka na bazi surutke. Dobijeni rezultati koji ukazuju na veoma izražen uticaj mleka na teksturu napitka su u skladu sa rezultatima iz literature⁴⁰² prema kojima sadržaj kazeina ima veoma pozitivan uticaj na teksturu fermentisanih mleka. Proizvedena mlečna kiselina snižava pH vrednost mleka na izoelektričnu tačku (pH=4,6) kazeina dovodeći do formiranja proteinskog gela. U skladu sa tim, obogaćivanje napitaka na bazi surutke dodatnom količinom kazeina dovodi do čvršćeg povezivanja proteina u matriksu gela i formiranja čvršće teksture^{403,404} napitaka.



Slika 23. Uticaja sadržaja mleka na sinerezis napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture

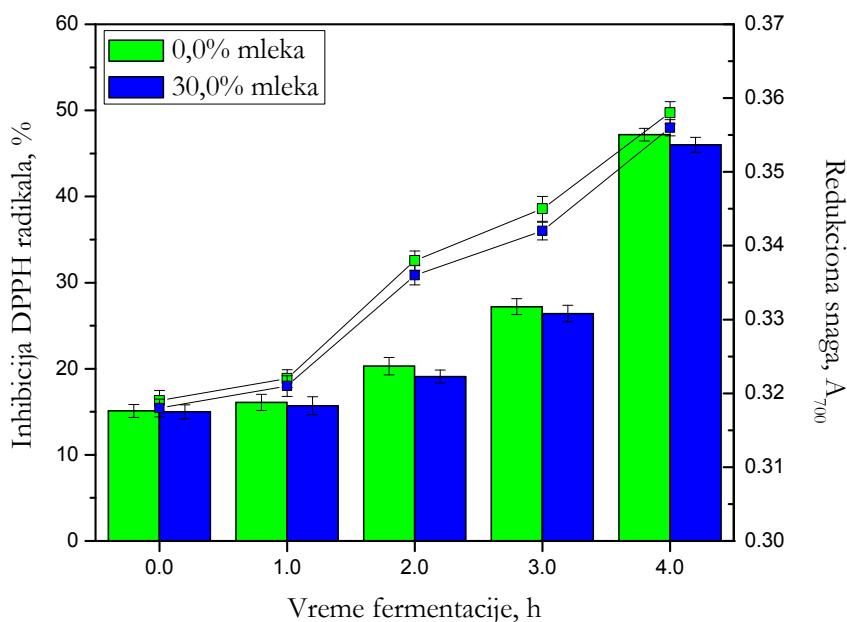
Kao što je prikazano na Slici 23 minimalna vrednost sinerezisa od $67,5 \pm 0,70$ cP zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka. Vrednost sinerezisa zabeležena u uzorku sa 30,0% mleka je nakon 4,0 h fermentacije bila statistički značajno ($p < 0,05$) manja od vrednosti sinerezisa zabeležene u uzorku sa 0,0% mleka ($88,3 \pm 0,91$ cP). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa gore navedenim rezultatima dobijenim za viskozitet. Formiranje gela koje je praćeno povećanjem viskoziteta, dovodi do stvaranja matriksa u čiju se strukturu ugrađuje višak surutke dovodeći tako do smanjenja sinerezisa napitka.

4.4.4. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog pomoću komercijalne ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na a temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje antioksidativne aktivnosti i redukcionne snage napitaka na bazi surutke proizvedenih pomoću komercijalne ABY-6 kulture pri opisanim uslovima, prema metodama opisanim u Odeljku 3.2.5.10. i Odeljku 3.2.5.11., respektivno. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti i redukcionne snage napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture prikazani su na Slici 24.



Slika 24. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture

Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke maksimalna vrednost inhibicije DPPH radikala od $47,2 \pm 0,70\%$ zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 0,0% mleka. Dobijeni rezultati su u saglasnostima sa rezultatima iz literature⁴⁰⁵ prema kojima fermentacija značajno doprinosi povećanju antioksidativne aktivnosti surutke. Vrednost inhibicije DPPH radikala zabeležena u

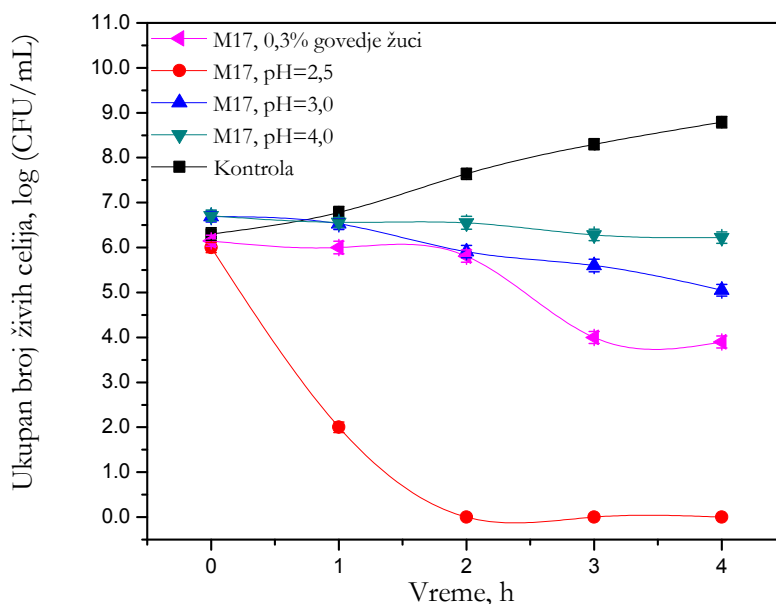
uzorku sa 0,0% mleka je nakon 4,0 h fermentacije se nije značajno razlikovala ($p > 0,05$) od vrednosti inhibicije zabeležene u uzorku sa 30,0% mleka ($46,0 \pm 0,87\%$). Postojanje razlike u vrednostima procenta inhibicije DPPH radikala između napitaka mogla bi biti objašnjena prisustvom kazeina u uzorcima sa 30,0% mleka, čije proteinske frakcije, prema navodima iz literature^{406,407}, imaju manji antioksidativni kapacitet od proteinskih frakcija surutke čijom razgradnjom verovatno nastaju peptidi sa izraženijim antioksidativnim potencijalom.

Surutka je bogat izvor sulfhidrilnih aminokiselina kao što je cistein, čije oslobodjenje tokom fermentacije može povećati redukcionu snagu napitka. Pored toga, formiranje reduktanata tokom fermentacije može biti još jedan razlog za povećanje redukcionog snage. Oni mogu da reaguju sa slobodnim radikalima, stabilizuju ih i suzbijaju radikalsku lančanu reakciju. U literaturi postoje podaci o uticaju mnogih bakterija mlečne kiseline na povećanje redukcionog snage fermentacionih medijuma⁴⁰⁸. Sa druge strane, povećanju redukcionog snage mogu takođe da doprinesu i unutarćelijski antioksidansi i peptidi starter organizama i njihova hidrogen donorska sposobnost⁴⁰⁹.

Rezultati zabeleženi za redukcionu snagu napitaka su u skladu sa navedenim rezultatima koji se odnose na antioksidativnu aktivnost čime je potvrđeno prisustvo antioksidativnih materija izvedenih iz proteina surutke odnosno mleka. Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature⁴¹⁰ prema kojima fermentacija u značajnoj meri doprinosi redukcionoj snazi napitka.

4.4.5. Ispitivanje probiotskih svojstava komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju probiotskih karakteristika ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka. Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2., zasejavani sa 6,0% inokuluma pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Fermentisani uzorci su zatim korišćeni kao bakterijski inokulum za određivanje probiotskih svojstava ABY-6 kulture prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.13. Rezultati ispitivanja probiotskih svojstava soja *S. thermophilus* su prikazani na Slici 25.



Slika 25. Probiotska svojstava soja *S. thermophilus* poreklom iz ABY kulture nakon njene primene u fermentaciji surutke

Kao što je prikazano na Slici 25, u kontrolnom uzorku tokom 4,0 h ispitivanja zabeležen je rast soja *S. thermophilus*, čime je potvrđeno prisustvo i aktivnost testiranog soja.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja soja *S. thermophilus* u prisustvu 0,3% govede žuči tokom 2,0 h zabeleženo je blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,15 \pm 0,123 \log (\text{CFU}/\text{mL})$), praćeno procentom preživljavanja od oko 94,5% nakon čega u

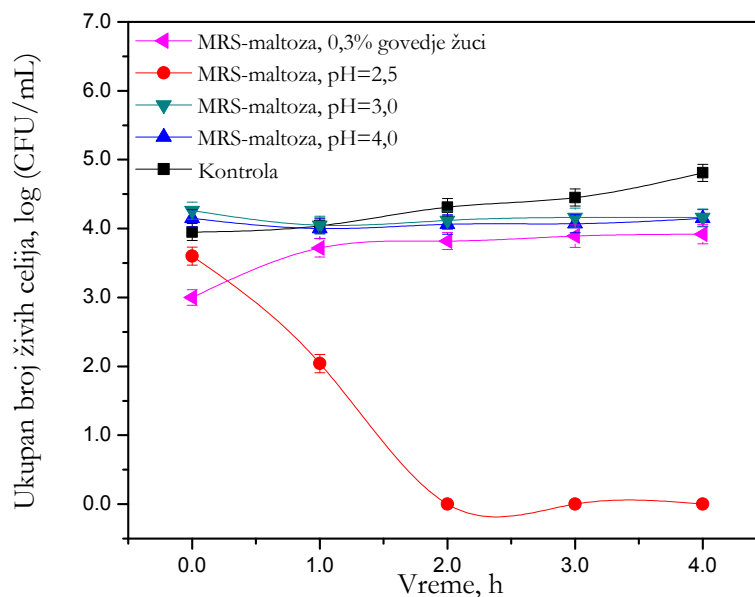
naredna 2,0 h dolazi do intenzivnog odumiranja ćelija. Ukupan broj živih ćelija nakon 4,0 h inkubacije u prisustvu 0,3% govede žuči je iznosio $3,90 \pm 0,132 \log$ (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 63,4%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 63,4% od ukupnog broja živih ćelija soja *S. thermophilus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima prisustva 0,3% govede žuči.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja soja *S. thermophilus* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je intenzivno odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,0 \pm 0,111 \log$ (CFU/mL)). Nakon 1,0 h inkubacije procenat preživljavanja je iznosio 33,3% da bi već nakon 2,0 h bio zabeležen procenat preživljavanja od 0,0% koji je zatim zadržan do kraja procesa inkubacije (4,0 h). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da soj *S. thermophilus* nije sposoban da preživi u zadovoljavajućem procentu, ni najkraće (1,0 h) izlaganje uslovima pH 2,5.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja soja *S. thermophilus* pri uslovima pH 3,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,69 \pm 0,124 \log$ (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 97,6%. Trend blagog odumiranja ćelija nastavljen je sve do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $5,05 \pm 0,128 \log$ (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 75,5%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 75,5% od ukupnog broja živih ćelija soja *S. thermophilus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 3,0.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja soja *S. thermophilus* pri uslovima pH 4,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,71 \pm 0,123 \log$ (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 97,8%. Trend blagog odumiranja ćelija nastavljen je sve do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $6,22 \pm 0,126 \log$ (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 92,7%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 92,7% od ukupnog broja živih ćelija soja *S. thermophilus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 4,0.

Na Slici 26 su prikazani rezultati ispitivanja probiotskih svojstava mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* poreklom iz ABY kulture nakon njene primene u fermentaciji surutke.



Slika 26. Probiotska svojstva mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* poreklom iz ABY kulture nakon njene primene u fermentaciji surutke

Kao što je prikazano na Slici 26, u kontrolnom uzorku tokom 4,0 h ispitivanja zabeležen je rast mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum*, čime je potvrđeno prisustvo i aktivnost testirane kulture.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* u prisustvu 0,3% govede žuci zabeležen je blagi rast ćelija tokom čitavog procesa inkubacije (4,0 h) u odnosu na početni broj ($3,00 \pm 0,112$ log (CFU/mL)). Ukupan broj živih ćelija zabeležen nakon 4,0 h inkubacije u prisustvu 0,3% govede žuci je iznosio oko $3,92 \pm 0,142$ log (CFU/mL). Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da mešana kultura sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* osim što je sposobna da preživi 4,0 h izlaganja uslovima prisustva 0,3% govede žuci, ona zadržava i sposobnost rasta u datim uslovima.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je intenzivno odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($3,60 \pm 0,131$ log (CFU/mL)). Nakon 1,0 h inkubacije procenat preživljavanja je iznosio 66,7% da bi već nakon 2,0 h bio zabeležen procenat preživljavanja od

0,0% koji je zatim zadržan do kraja procesa inkubacije (4,0 h). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da mešana kultura sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* nije sposobna da preživi u zadovoljavajućem procentu, ni najkraće (1,0 h) izlaganje uslovima pH 2,5.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 3,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($4,26 \pm 0,126 \log$ (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 95,1%. Nakon 1,0 h dolazi do blagog rasta ćelija koji se nastavlja do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $4,16 \pm 0,124 \log$ (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 97,6%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 97,6% od ukupnog broja živih ćelija mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 3,0.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 4,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($4,15 \pm 0,122 \log$ (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 96,3%. Nakon 1,0 h dolazi do blagog rasta ćelija koji se nastavlja do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $4,15 \pm 0,123 \log$ (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 100,0%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je mešana kultura sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* sposobno u potpunosti da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 4,0.

Veoma je bitno istaći da na pH vrednost u digestivnom traktu može uticati prisustvo hrane⁴¹¹, naročito proteina sa značajnim puferskim kapacitetom. Na osnovu zapažanja Kathwer i sar. (2010) i Sánchez i sar. (2010), dodatak proteina u vidu kazeina ili mleka značajno povećava procenat preživljavanja probiotskih bakterija^{412,413}.

U cilju simulacije uticaja dodate količine fermentisane surutke na pH vrednost želudačnog soka vršeno je mešanje bujona (pH=2,5) koji se primenjuju za ispitivanje probiotskih svojstava sojeva i fermentisane surutke u različitom odnosu. Rezultati su prikazani u Tabeli 25.

Tabela 25. Uticaj dodate količine fermentisane surutke na promenu pH vrednosti bujona primenjenih u ispitivanju probiotskih svojstava ispitivanih sojeva

Procentni odnos (v/v)		pH vrednost
Bujon (M17, MRS)	Surutka	
0,0	1,0	4,60
1,0	0,0	2,50
10,0	1,0	2,73
5,0	1,0	2,86
4,0	1,0	2,90
3,0	1,0	3,00
2,0	1,0	3,16
1,0	1,0	3,55

Ako se uzme da se tokom konzumacije mešane hrane u želucu izluči oko 750,0 mL želudačnog soka⁴¹⁴ koji ima $\text{pH} \approx 2,5$, onda se na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 25 može pretpostaviti da bi unošenje 250,0 mL surutke koja ima $\text{pH} \approx 4,6$ dovelo do podizanja pH vrednosti želudačnog soka na $\approx 3,00$.

Na osnovu rezultata ispitivanja probiotskih svojstava i rezultata vezanih za uticaj fermentisanog napitka na bazi surutke na pH vrednost bujona, proizilazi da bi nakon konzumacije 250,0 mL napitka na bazi surutke koji u sebi sadrži ukupan broj živih ćelija od $8,65 \pm 0,031 \log$ (CFU/mL) prolazak kroz želudac preživelo 75,5% ćelija. To znači da bi do creva stiglo oko 6,50 log (CFU/mL) odnosno $3,4 \times 10^6$ bakterija, što je broj neophodan da dospele bakterije ispolje svoje probiotsko delovanje.

4.4.6. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom komercijalne ABY-6 kulture

Pri ispitivanju promene parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom komercijalne ABY-6 kulture, formulisana su dva napitaka:

N1: koji je sadržao svežu surutku pripremanu prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2.

N2: koji je sadržao mešavinu sveže surutke i 30,0% mleka, pripremanu prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3.

Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Ispitivanje stabilnosti parametara kvaliteta proizvedenih napitaka tokom procesa čuvanja vršeno je metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.17. određivanjem: pH vrednosti (Odeljak 3.2.5.2.), titracijske kiselosti (Odeljak 3.2.5.3.), sinerezisa (Odeljak 3.2.5.7.), viskoziteta (Odeljak 3.2.5.8.), antioksidativne aktivnosti (Odeljak 3.2.5.10.), ukupnog broj živih ćelija (Odeljak 3.2.5.6.) i senzornih ocena (Odeljak 3.2.5.12.) napitaka.

U Tabeli 26 i Tabeli 27 dat je pregled parametara kvaliteta kao i rezultati ispitivanja stabilnosti parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke, proizvedenih primenom ABY-6 kulture, tokom 28 dana čuvanja.

Tabela 26. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom surutke pomoću komercijalne ABY-6 kulture

Napitak N1 (0,0% mleka)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,19 ± 0,01	4,51 ± 0,03	4,21 ± 0,04	4,16 ± 0,02	4,10 ± 0,03	3,89 ± 0,01
Titracijska kiselost, °SH	3,19 ± 0,01	16,1 ± 0,10	21,53 ± 0,11	22,7 ± 0,10	23,03 ± 0,06	23,2 ± 0,17
Sinerezis, %	100,0 ± 0,00	88,3 ± 0,91	90,1 ± 0,61	91,2 ± 0,75	87,9 ± 0,68	85,0 ± 0,73
Viskozitet, cP	1,1677 ± 0,0214	1,5537 ± 0,038	1,6689 ± 0,052	1,6563 ± 0,050	1,5836 ± 0,030	1,5518 ± 0,052
Antioksidativna aktivnost, %	15,1 ± 0,08	47,2 ± 1,03	42,1 ± 0,09	38,3 ± 0,07	40,1 ± 0,08	41,6 ± 0,08
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,68 ± 0,123	8,47 ± 0,148	8,45 ± 0,127	8,20 ± 0,136	7,96 ± 0,112	7,58 ± 0,129
Senzorna ocena, ocena	3,25 ± 1,56	6,20 ± 1,22	6,08 ± 1,08	5,96 ± 1,17	5,80 ± 1,19	5,52 ± 1,16

Tabela 27. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke i mleka pomoću komercijalne ABY-6 kulture

Napitak N2 (30,0% mleka)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,50 ± 0,01	4,40 ± 0,04	4,22 ± 0,06	4,10 ± 0,01	4,02 ± 0,02	3,88 ± 0,03
Titracijska kiselost, °SH	4,43 ± 0,06	23,2 ± 0,20	29,4 ± 0,40	30,6 ± 0,30	31,1 ± 0,06	31,2 ± 0,20
Sinerezis, %	100,0 ± 0,00	67,5 ± 0,70	72,3 ± 0,97	75,1 ± 0,75	76,1 ± 1,10	78,3 ± 0,76
Viskozitet, cP	1,3534 ± 0,0223	2,7023 ± 0,0122	2,7491 ± 0,0482	2,8350 ± 0,0232	2,893 ± 0,0099	2,9530 ± 0,0264
Antioksidativna aktivnost, %	15,0 ± 0,07	46,0 ± 0,07	41,8 ± 0,08	38,1 ± 1,09	39,2 ± 0,09	39,8 ± 0,08
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,61 ± 0,123	8,65 ± 0,132	8,53 ± 0,147	8,46 ± 0,143	8,35 ± 0,122	8,19 ± 0,116
Senzorna ocena, ocena	6,51 ± 1,01	8,52 ± 1,01	8,52 ± 1,00	8,40 ± 1,15	8,32 ± 1,14	8,12 ± 1,13

Poređenjem rezultata prikazanih u Tabelama 26 i 27, uočava se postojanje značajnih razlika u vrednostima parametara kvaliteta napitaka, u zavisnosti od njihove formulacije, izuzev pH vrednosti za koju je u oba napitka zabeležena približno ista vrednost tokom čitavog ispitivanja.

Titracijska kiselost napitka N2 je statistički značajno ($p < 0,05$) veća u odnosu na napitak N1, tokom čitavog perioda ispitivanja (Tabela 27). Veća titracijska kiselost napitka N2 doprinosi njegovoj izraženijoj jogurtnoj aromi, što se odražava i na bolje senzorne ocene ovog napitka (koje se kreću u intervalu $8,52 \pm 1,01$ - $8,12 \pm 1,13$) tokom čitavog perioda ispitivanja. Ravnomerno povećanje titracijske kiselosti tokom 28,0 dana u oba napitka, predstavlja pokazatelj očuvanja aktivnosti primenjene ABY-6 kulture, što za rezultat ima održanje ukupnog broja živih ćelija na zadovoljavajućem nivou ($\geq 6,0$ log (CFU/mL)). Sa druge strane, obzirom da napitak N2 prema formulaciji predstavlja nutritivno bogatiji supstrat, jer u svom sastavu ima 30,0% mleka, ukupan broj živih ćelija koji se tokom ispitivanja kretao u intervalu $8,65 \pm 0,132$ - $8,19 \pm 0,119$ log (CFU/mL) je značajno veći od broja ćelija u napitku N1 koji se kretao u intervalu $8,47 \pm 0,148$ - $7,58 \pm 0,129$ log (CFU/mL).

Positivan uticaj dodatka 30,0% mleka pri formulisanju napitka N2 ogleda se takođe u vrednostima sinerezisa i viskoziteta. Vrednost sinerezisa koja se tokom ispitivanja kretala u

intervalu od $67,5 \pm 0,70$ - $78,3 \pm 0,76\%$ je značajno manja ($p < 0,05$) od vrednosti sinerezisa napitka N1, dok je vrednost viskoziteta koja se tokom ispitivanja kretala u intervalu od $2,7023 \pm 0,0122$ - $2,9530 \pm 0,0264$ cP značajno veća ($p < 0,05$) od vrednosti viskoziteta napitka N1.

Vrednost antioksidativne aktivnosti napitaka N1 i N2 se razlikuje u korist napitka N1, mada zabeležena razlika nije u velikoj meri izražena, te se po pitanju ovog parametra napici mogu smatrati relativno sličnim.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da dodatak 30,0% mleka pri formulisanju napitka N2, značajno utiče na unapređenje parametara kvaliteta kao i njihovu stabilnost tokom čuvanja.

4.4.7. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se dodatkom 30,0% mleka pri formulaciji napitka N2 proizvodi napitak zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,40, titracijska kiselost, 23,2 °SH, sinerezis 67,5%, viskozitet 2,7023 cP antioksidativna aktivnost 46,0%, ukupan broj živih ćelija 8,65 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,52, koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

4.5. Proizvodnja napitaka na bazi surutke primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

4.5.1. Ispitivanje uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

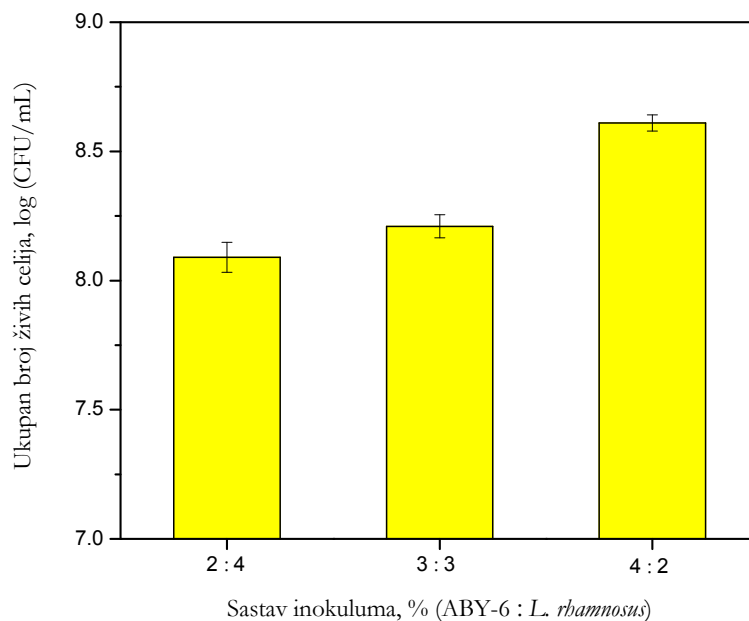
Pri ispitivanju uticaja osnovnih parametara fermentacije na proces proizvodnje napitaka na bazi surutke primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je sveža surutka. Tokom ispitivanja praćen je uticaj sastava inokuluma, temperature, sadržaja mleka, dodatka ekstrakta kvasca i inulina na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus*.

Uzorci su pripremani prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.3., zasejavani odgovarajućom količinom inokuluma ABY-6 kulture i soja *L. rhamnosus* ATCC 7469 pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.1. i Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje ukupnog broja živih ćelija mešane kulture (log (CFU/mL)) u testiranim uzorcima metodom opisanim u Odeljku 3.2.5.6. sabiranjem broja izraslih kolonija *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* i *B. bifidum* na MRS agaru (Odeljak 3.2.2.3.) i *S. thermophilus* i na M17 (Odeljak 3.2.2.5.) agaru.

4.5.1.1. Uticaj sastava inokuluma na rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja sastava inokuluma uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama u odnosima 2:4, 3:3 i 4:2 pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1. Uzorci su zatim fermentisani na temperaturi 42,0 °C (preporuka proizvođača), prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Rezultati ispitivanja uticaja sadržaja inokuluma na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture prikazani su na Slici 27.



Slika 27. Uticaj sastava inokuluma na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

Tokom ispitivanja uticaja sastava inokuluma vreme trajanja fermentacije do postizanja pH vrednosti 4,6 u svim uzorcima se kretalo u intervalu 3,5-4,0 h. Najveći ukupan broj živih ćelija koji je iznosio $8,61 \pm 0,032$ log (CFU/mL) je postignut, nakon 4,0 h fermentacije, primenom 6,0% inokuluma mešane kulture koja je sadržala ABY-6 : *L. rhamnosus* u odnosu 4 : 2, dok je najmanji ukupan broj živih ćelija od $8,09 \pm 0,045$ postignut, nakon 4,5 h fermentacije, primenom 6,0% inokuluma mešane kulture koja je sadržala ABY-6 : *L. rhamnosus* u odnosu 2 : 4 (Slika 27)

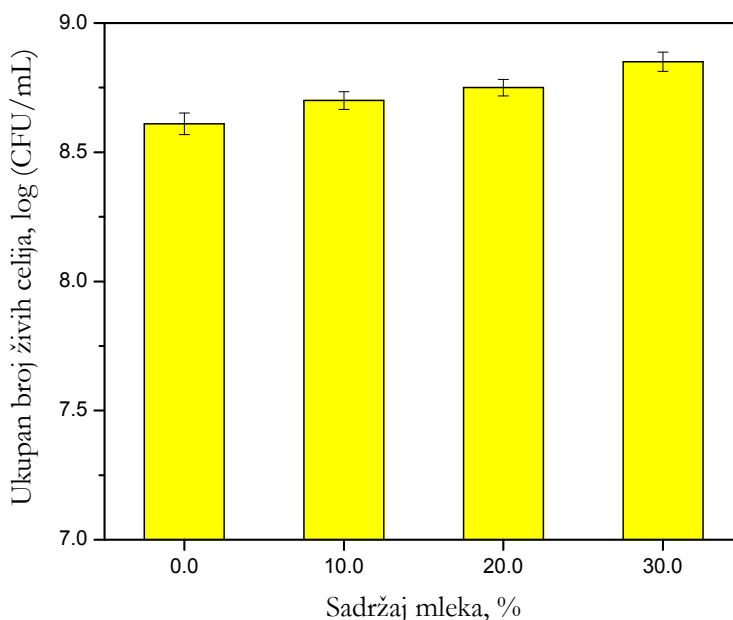
Zanimljivo je istaći da je pri odnosu ABY-6 : *L. rhamnosus* od 2 : 4 došlo do nešto dužeg trajanja fermentacije iz čega se može zaključiti da je *S. thermophilus* kao dominantni soj u ABY-6 kulturi nosilac fermentacije. Sa Slike 27 se jasno može uočiti da sa porastom udela ABY-6 kulture dolazi do povećanja ukupnog broja živih ćelija prisutnih u napitku.

Obzirom da je za proizvodnju napitaka na bazi surutke primarno bitan faktor broj živih ćelija prisutnih u napitku, u daljem istraživanju kao optimalni sastav inokuluma za proizvodnju napitaka na bazi surutke primenom mešane kulture korišćen je odnos ABY-6 : *L. rhamnosus* od

4 : 2 kojim u količini od 6,0% se u uzorku sa 0,0% mleka za 4,0 h fermentacije postiže ukupan broj živih ćelija od $8,61 \pm 0,032 \log$ (CFU/mL).

4.5.1.2. Uticaj sadržaja mleka na rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0; 10,0; 20,0 i 30,0% (v/v) mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4 : 2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1. i fermentisani na temperaturi 42,0 °C (preporuka proizvođača), prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Rezultati ispitivanja uticaja sadržaja mleka na ukupni broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* prikazani su na Slici 28.



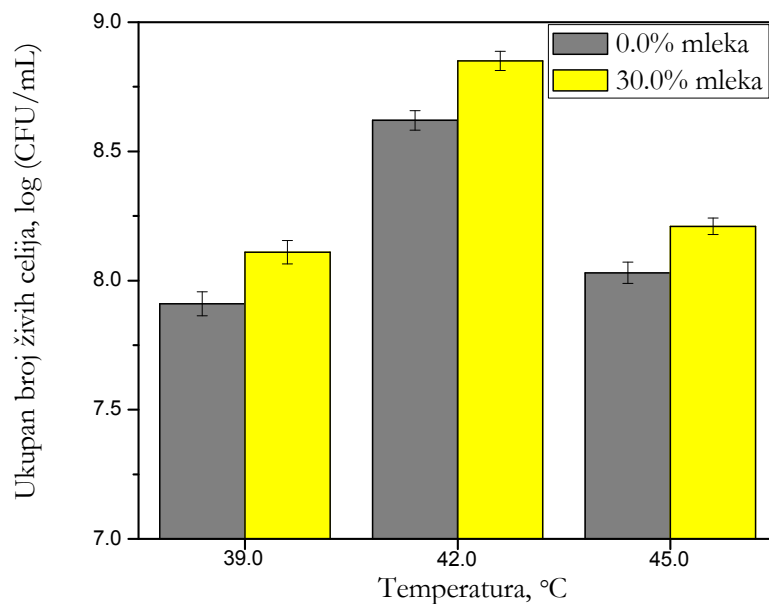
Slika 28. Uticaj sadržaja mleka na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kretao se u intervalu $8,61 \pm 0,045$ do $8,85 \pm 0,032 \log$ (CFU/mL). Najniži broj živih ćelija zabeležen je u uzorku koji je sadržao 0,0% mleka dok je najveći broj živih ćelija zabeležen u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka (Slika 28). Dodatkom mleka, surutka koja u svom

sastavu ima nizak sadržaj nutrijenata⁴⁰ neophodnih za rast ove vrste mikroorganizama se na najprirodniji način obogaćuje, što doprinosi unapređenju rasta primenjene mešane kulture. Dodatkom 30,0% mleka formulisan je supstrat čiji je sastav veoma sličan sastavu humanog mleka (koje ima odnos kazein : proteini surutke oko 30,0 : 70,0%)³⁹⁴ pri čemu je dobijen brzo i lako svarljiv napitak koji je pogodan čak i za osobe sa osetljivim intestinalnim traktom. U daljem istraživanju kao optimalni sadržaj mleka za rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* korišćen je sadržaj od 30,0% mleka pri kojem se sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* za 4,0 h postiže broj ćelija od $8,85 \pm 0,032 \log$ (CFU/mL).

4.5.1.3. Uticaj temperature na rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja temperature fermentacije uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0% i 30,0% (v/v) mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1. i fermentisani na temperaturama 39,0; 42,0 i 45,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Rezultati ispitivanja uticaja temperature fermentacije na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* prikazani su na Slici 29.



Slika 29. Uticaj temperature fermentacije na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* nakon 4,0 h fermentacije surutke

Tokom ispitivanja uticaja temperature fermentacije ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kretao se u intervalu $7,91 \pm 0,037$ do $8,85 \pm 0,032$ log (CFU/mL). Najniži broj ćelija zabeležen je u uzorku sa 0,0% mleka koji je fermentisan na $39,0$ °C dok je najviši broj živih ćelija zabeležen u uzorku sa 30,0% mleka koji je fermentisan na temperaturi $42,0$ °C (Slika 29). Kao što se može uočiti na Slici 29, najveći broj ćelija je zabeležen na temperaturi $42,0$ °C ($8,62 \pm 0,041$ i $8,85 \pm 0,032$ log (CFU/mL) u obe vrste uzoraka (0,0 i 30,0% mleka, respektivno).

Ono što je neophodno istaći pri tumačenju rezultata prikazanih na Slici 29 je činjenica da je temperatura $42,0$ °C optimalna temperatura rasta soja *S. thermophilus* koji je dominantan soj komercijalne ABY-6 kulture sa zastupljenošću od 80,0%, dok je temperatura od $45,0$ °C optimalna temperatura rasta soja *L. bulgaricus* koji je u ABY-6 kulturi zastupljen u količini od oko 1,0% kao i soja *L. rhamnosus*. Obzirom da se sojevi *L. bulgaricus* i *L. rhamnosus*⁴¹⁵ odlikuju izrazitom proteolitičkom aktivnošću kojom obezbeđuje dodatnu količinu aminokiselina neophodnih za rast soja *S. thermophilus*, ukupan broj živih ćelija ($8,03 \pm 0,031$ i $8,21 \pm 0,047$ log

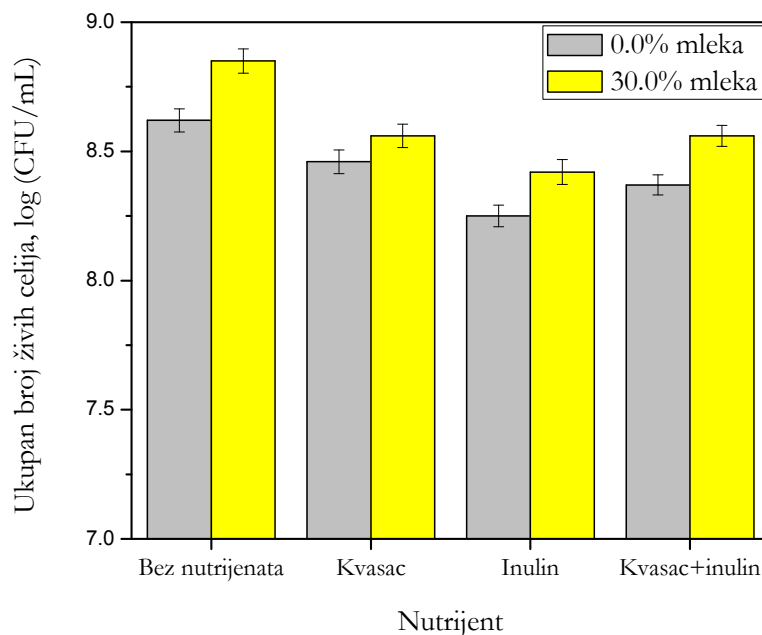
(CFU/mL)) zabeležen na temperaturi 45,0 °C je statistički značajno ($p < 0,05$) veći od broja ($7,91 \pm 0,036$ i $8,11 \pm 0,041$ log (CFU/mL)) zabeleženog na temperaturi 39,0 °C u obe vrste uzoraka (0,0 i 30,0% mleka, respektivno). Sa druge strane broj ćelija zabeležen na temperaturi 45,0 °C je značajno manji od broja ćelija zabeleženog na 42,0 °C koja predstavlja optimalnu temperaturu rasta sojeva *S. thermophilus* kao dominantnog soja u ABY-6 kulturi i soja *L. rhamnosus*. Ono što se takođe može uočiti jeste da je ukupan broj živih ćelija zabeležen na temperaturi 42,0 °C u uzorku sa 30,0% mleka statistički značajno ($p < 0,05$) veći od broja zabeleženog u uzorku sa 0,0% mleka, što govori o veoma pozitivnom uticaju mleka na rast ABY-6 kulture.

U daljem istraživanju kao optimalna temperatura za rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je temperatura od 42,0 °C na kojoj je pri sadržaju mleka od 30,0% i koncentraciji inokuluma od 6,0% za 4,0 h postiže broj ćelija od $8,85 \pm 0,032$ log (CFU/mL).

4.5.1.4. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja dodatka inulina i ekstrakta kvasca na rast mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0% i 30,0% (v/v) mleka. Pripremljeni uzorci su obogaćeni dodatkom 3,0% (w/v) ekstrakta kvasca i 1,0% (w/v) inulina. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4 : 2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Ispitivani izvori inulina i ekstrakta kvasca su korišćeni u obliku rastvora sledećih koncentracija: ekstrakt kvasca 0,50 g/mL i inulin 0,333 g/mL. Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C. Rezultati ispitivanja uticaja inulina i ekstrakta kvasca na ukupni broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture prikazani su na Slici 30.



Slika 30. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* nakon 4,0 h fermentacije surutke

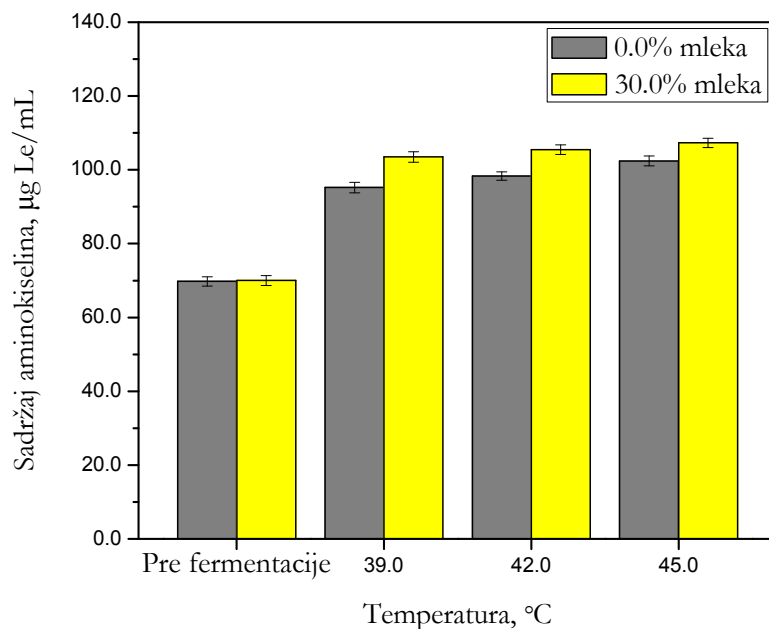
Tokom ispitivanja uticaja dodatka inulina i ekstrakta kvasca ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture u kontrolnom uzorku bez dodataka je iznosio $8,62 \pm 0,041$ u uzorku sa 0,0% mleka i $8,85 \pm 0,032$ log (CFU/mL) u uzorku sa 30,0% mleka. Dodatak inulina, ekstrakta kvasca kao i kombinacije inulina i ekstrakta kvasca statistički značajno ($p < 0,05$) utiče na smanjenje ukupnog broja živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* (Slika 30). Najizraženiji negativan uticaj na rast ćelija zabeležen je u uzorcima sa dodatkom 1,0% inulina u kojima je ukupan broj živih ćelija iznosio $8,25 \pm 0,036$ i $8,42 \pm 0,028$ log (CFU/mL) za uzorke sa 0,0 i 30,0% mleka, respektivno. Ovakav rezultat se razlikuje od rezultata navedenih u literaturi³⁹⁵ prema kojima izvori proteina kao i razne vrste prebiotika doprinose rastu sojeva koji se koriste u fermentaciji mleka. Međutim, obzirom na relativno kratko vreme fermentacije može se pretpostaviti da primena složenih ugljenih hidrata (inulin) i dodatnih izvora proteina (ekstrakt kvasca) usporava metabolizam primenjene kulture, a obzirom da se radi o komercijalnoj kulturi specijalno dizajniranoj za fermentaciju laktoze i proteina mleka to verovatno dovodi do usporavanja njenog rasta. Obzirom da su ispoljili negativan uticaj na rast ABY-6 kulture, oba dodatka su isključena iz daljeg istraživanja.

4.5.2. Uticaj temperature i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturama 39,0; 42,0 i 45,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje proteolitičke aktivnosti komercijalne ABY-6 kulture pri opisanim uslovima, praćenjem sadržaja aminokiselina izraženih kao µgLe/mL, prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.9. Rezultati ispitivanja uticaja temperature fermentacije i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture prikazani su na Slici 31.



Slika 31. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na sadržaj aminokiselina u napitku dobijenom nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

Tokom ispitivanja uticaja temperature i sadržaja mleka na proteolitičku aktivnost mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture maksimalan sadržaj aminokiselina od $107,32 \pm 1,27$ $\mu\text{gLe/mL}$ zabeležen je u uzorku fermentisanom na temperaturi $45,0$ °C koji je sadržao 30,0% mleka (Slika 31). Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 31 sadržaj aminokiselina zabeležen u uzorku sa 30,0% mleka fermentisanom na temperaturi $42,0$ °C ($105,46 \pm 1,34$ $\mu\text{gLe/mL}$) je statistički značajno ($p < 0,05$) veći od sadržaja aminokiselina koji je zabeležen u istom uzorku pri temperaturi fermentacije $39,0$ °C ($103,49 \pm 1,43$ $\mu\text{gLe/mL}$). Sa druge strane, razlika u sadržaju aminokiselina u uzorku fermentisanom na temperaturi $45,0$ °C ($107,32 \pm 1,27$ $\mu\text{gLe/mL}$) ne razlikuje se značajno ($p > 0,05$) od sadržaja aminokiselina zabeleženog pri temperaturi fermentacije $42,0$ °C. Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature¹⁷⁴. Potpuno isti trend u pogledu razlike u sadržaju aminokiselina na različitim temperaturama, zabeležen je i u uzorcima koji su sadržali 0,0% mleka, s tim što je sadržaj aminokiselina zabeležen ovim uzorcima statistički značajno ($p < 0,05$) manji od sadržaja aminokiselina zabeleženih u uzorcima sa 30,0% mleka na svim temperaturama. Na osnovu prikazanih rezultata kao i rezultata koji se

odnose na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture može se zaključiti da se pri temperaturi fermentacije od 42,0 °C i sadržaju mleka od 30,0% ostvaruje adekvatan sadržaj aminokiselina od $105,46 \pm 1,34 \mu\text{gLe/mL}$ fermentisanog napitka.

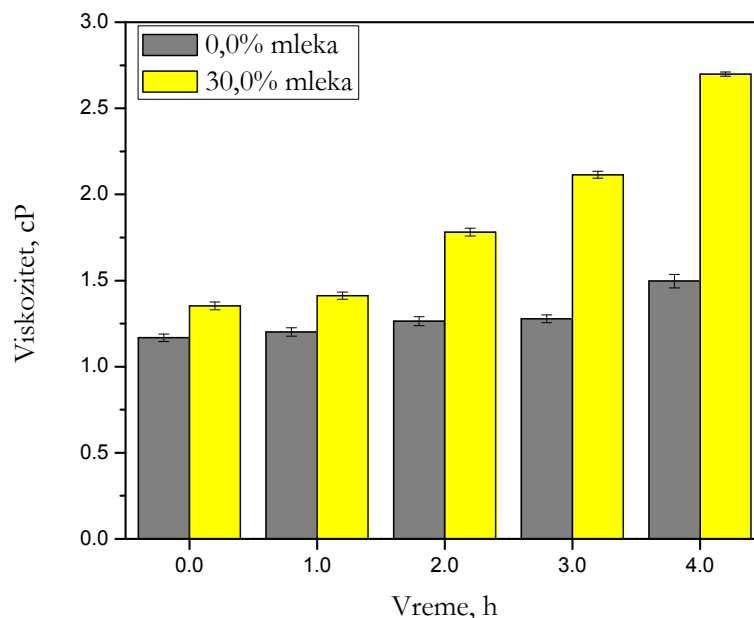
4.5.3. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitka na bazi surutke proizvedenog primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

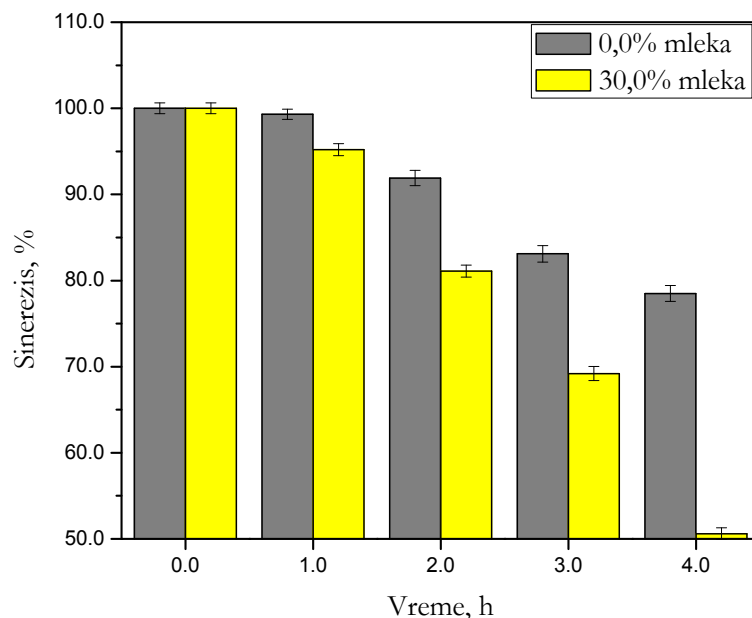
Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje viskoziteta i sinerezisa proizvedenih napitaka prema metodama opisanim u Odeljku 3.2.5.7. i Odeljku 3.2.5.8.

Rezultati ispitivanja uticaja sadržaja mleka na viskozitet i sinerezis napitaka na bazi surutke prikazani su na Slici 32.



Slika 32. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka na viskozitet napitka na bazi surutke maksimalna vrednost viskoziteta od $2,6984 \pm 0,0122$ cP zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka. Vrednost viskoziteta zabeležena u uzorku sa 0,0% mleka ($1,4969 \pm 0,0376$ cP) je nakon 4,0 h fermentacije bila statistički značajno ($p < 0,05$) manja od vrednosti zabeležene u uzorku sa 30,0% mleka. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da prisustvo mleka značajno utiče na povećanje viskoziteta fermentisanog napitka na bazi surutke. Dobijeni rezultati koji ukazuju na veoma izražen uticaj mleka na teksturu napitka su u skladu sa rezultatima iz literature^{402,403,404} prema kojima sadržaj kazeina ima veoma pozitivan uticaj na teksturu fermentisanih mleka. Proizvedena mlečna kiselina snižava pH vrednost mleka na izoelektričnu tačku ($\text{pH}=4,6$) kazeina dovodeći do formiranja proteinskog gela. U skladu sa tim, obogaćivanje napitaka na bazi surutke dodatnom količinom kazeina dovodi do čvršćeg povezivanja u matriksu gela i formiranja čvršće teksture^{403,404} napitaka.



Slika 33. Uticaj sadržaja mleka na sinerezis napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

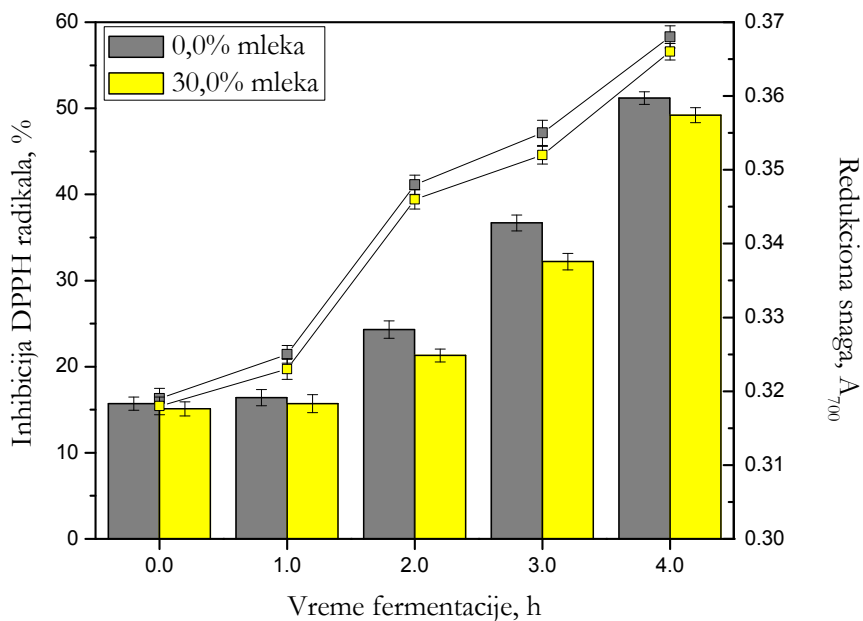
Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka na sinerezis napitka na bazi surutke minimalna vrednost sinerezisa od $50,6 \pm 0,67$ cP zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 30,0% mleka. Vrednost sinerezisa zabeležena u uzorku sa 30,0% mleka je nakon 4,0 h fermentacije bila statistički značajno ($p < 0,05$) manja od vrednosti sinerezisa zabeležene u uzorku sa 0,0% mleka ($78,5 \pm 0,81$ cP). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa gore navedenim rezultatima dobijenim za viskozitet. Formiranje gela koje je praćeno povećanjem viskoziteta, dovodi do stvaranja matriksa u čiju se strukturu ugrađuje višak surutke dovodeći tako do smanjenja sinerezisa napitka.

4.5.4. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju uticaja sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog pomoću mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 0,0 i 30,0% mleka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturama 39,0; 42,0 i 45,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje antioksidativne aktivnosti i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenih pomoću mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture pri opisanim uslovima, prema metodama opisanim u Odeljku 3.2.5.10. i Odeljku 3.2.5.11., respektivno. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti i redukcionu snagu napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture prikazani su na Slici 34.



Slika 34. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

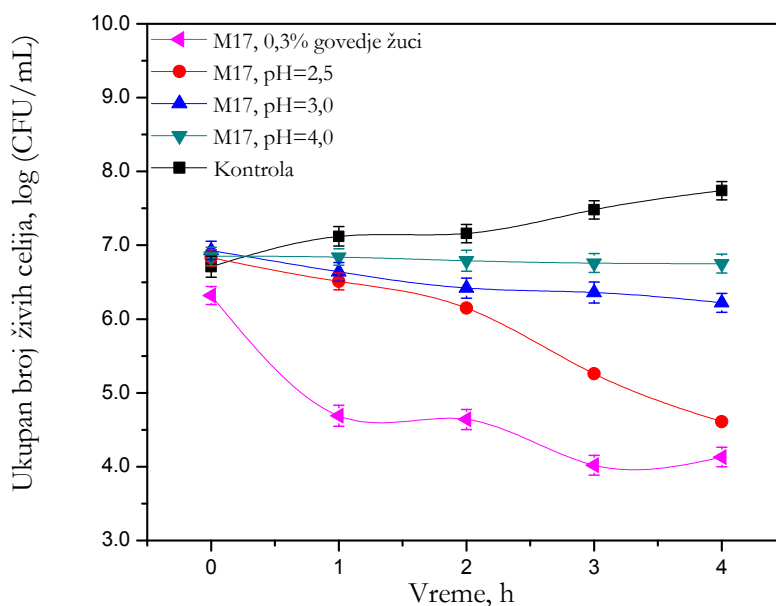
Tokom ispitivanja uticaja sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka na bazi surutke maksimalna vrednost inhibicije DPPH radikala od $51,2 \pm 0,87\%$ zabeležena je nakon 4,0 h fermentacije u uzorku koji je sadržao 0,0% mleka. Vrednost inhibicije DPPH radikala zabeležena u uzorku sa 30,0% mleka je nakon 4,0 h fermentacije se nije značajno razlikovala ($p > 0,05$) od vrednosti inhibicije zabeležene u uzorku sa 0,0% mleka ($49,2 \pm 0,87\%$). Postojanje razlike u procentu inhibicije DPPH radikala između napitaka mogla bi biti objašnjena prisustvom kazeina u uzorcima sa 30,0% mleka čijom razgradnjom nastaju peptidi sa manje izraženim antioksidativnim potencijalom⁴⁰⁶.

Rezultati zabeleženi za redukcionu snagu napitaka su u skladu navedenim rezultatima koji se odnose na antioksidativnu aktivnost čime je potvrđeno prisustvo antioksidativnih materija izvedenih iz proteina surutke odnosno mleka.

4.5.5. Ispitivanje probiotskih svojstava mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri ispitivanju probiotskih karakteristika mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture korišćena je sveža surutka.

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2., zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture, sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Fermentisani uzorci su zatim korišćeni kao bakterijski inokulum za određivanje probiotskih svojstava mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.13. Rezultati ispitivanja probiotskih svojstava kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* prikazani su na Slici 35.



Slika 35. Probiotska svojstava kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* nakon njihove primene u fermentaciji surutke

Kao što je prikazano na Slici 35 u kontrolnom uzorku tokom 4,0 h ispitivanja zabeležen je rast kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus*, čime je potvrđeno prisustvo i aktivnost testiranih sojeva.

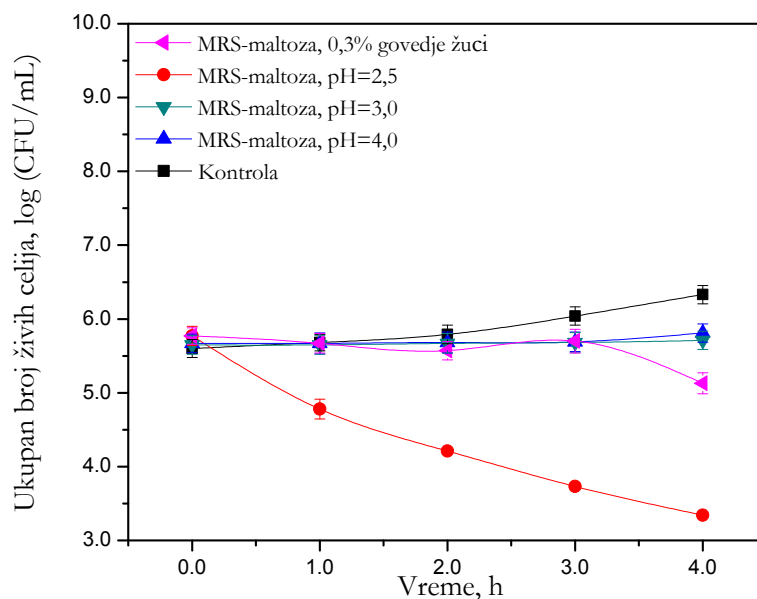
Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* u prisustvu 0,3% govede žuči tokom 2,0 h zabeleženo je blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,32 \pm 0,131$ log (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od oko 73,4% nakon čega se odumiranje ćelija nastavlja nešto blažim intenzitetom. Ukupan broj živih ćelija nakon 4,0 h inkubacije u prisustvu 0,3% govede žuči je iznosio $4,13 \pm 0,127$ log (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 65,3%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 65,3% od ukupnog broja živih ćelija *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima prisustva 0,3% govede žuči.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,83 \pm 0,121$ log (CFU/mL)). Nakon 2,0 h inkubacije procenat preživljavanja je iznosio 90,0% da bi nakon 4,0 h bio zabeležen procenat preživljavanja od 67,5%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 67,5% od ukupnog broja živih ćelija *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 2,5.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 3,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,93 \pm 0,114$ log (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 95,8%. Trend blagog odumiranja ćelija nastavljen je sve do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $6,22 \pm 0,136$ log (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 89,75%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 89,75% od ukupnog broja živih ćelija *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 3,0.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 4,0 tokom 1,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($6,85 \pm 0,123$ log (CFU/mL)), praćeno procentom preživljavanja od 99,8%. Trend blagog odumiranja ćelija nastavljen je sve do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $6,75 \pm 0,116$ log (CFU/mL), što predstavlja procenat preživljavanja od oko 98,5%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 98,5% od ukupnog broja živih ćelija *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 4,0.

Na Slici 36 su prikazani rezultati ispitivanja probiotskih svojstava kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus*.



Slika 36. Probiotska svojstava kombinacije sojeva *S. thermophilus* i *L. rhamnosus* nakon njihove primene u fermentaciji surutke

Kao što je prikazano na Slici 36 u kontrolnom uzorku tokom 4,0 h ispitivanja zabeležen je rast kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* čime je potvrđeno prisustvo i aktivnost testiranih sojeva.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* u prisustvu 0,3% govede žuci zabeležen je blagi rast ćelija tokom čitavog procesa inkubacije (4,0 h) u odnosu na početni broj ($5,60 \pm 0,122$ log (CFU/mL)). Ukupan broj živih ćelija zabeležen nakon 4,0 h inkubacije u prisustvu 0,3% govede žuci je iznosio oko $6,33 \pm 0,152$ log (CFU/mL). Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* osim što je sposobna da preživi 4,0 h izlaganja uslovima prisustva 0,3% govede žuci, ona zadržava i sposobnost rasta u datim uslovima.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je blago

odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($5,77 \pm 0,121 \log$ (CFU/mL)). Nakon 1 h inkubacije procenat preživljavanja je iznosio 82,8% da bi nakon 2,0 h bio zabeležen procenat preživljavanja od 72,9% da bi nakon 4,0 h bio zabeležen procenat preživljavanja od 57,9%. Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da je 57,9% od ukupnog broja živih ćelija sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* sposobno da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 2,5.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 3,0 tokom 1,0 h nije zabeleženo odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($5,65 \pm 0,128 \log$ (CFU/mL)). Nakon 1,0 h dolazi do blagog rasta ćelija koji se nastavlja do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $5,71 \pm 0,134 \log$ (CFU/mL). Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da kombinacija sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* osim što je sposobna da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 3,0 ona zadržava i sposobnost rasta u datim uslovima.

Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja kombinacije sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* pri uslovima pH 4,0 tokom 1,0 h nije zabeleženo odumiranje ćelija u odnosu na početni broj ($5,67 \pm 0,131 \log$ (CFU/mL)). Nakon 1,0 h dolazi do blagog rasta ćelija koji se nastavlja do kraja procesa inkubacije (4,0 h) kada je zabeležen ukupan broj živih ćelija od $5,81 \pm 0,143 \log$ (CFU/mL). Na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da kombinacija sojeva *L. acidophilus*, *B. bifidum* i *L. rhamnosus* osim što je sposobna da preživi 4,0 h izlaganja uslovima pH 4,0 ona zadržava i sposobnost rasta u datim uslovima.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa navodima iz literature⁴¹⁶ prema kojima *L. rhamnosus* ATCC 7469 spada u probiotike i ima sposobnost preživljavanja u ekstremnim uslovima gastrointestinalnog trakta.

4.5.6. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469

Pri ispitivanju parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture, formulisana su dva napitka:

R1: koji je sadržao svežu surutku pripremanu prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2.

R2: koji je sadržao mešavinu sveže surutke i 30,0% mleka, pripremanu prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3.

Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Ispitivanje stabilnosti parametara kvaliteta proizvedenih napitaka tokom procesa čuvanja vršeno je metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.17. određivanjem: pH vrednosti (Odeljak 3.2.5.2), titracijske kiselosti (Odeljak 3.2.5.3.), sinerezisa (Odeljak 3.2.5.7.), viskoziteta (Odeljak 3.2.5.8.) , antioksidativne aktivnosti (Odeljak 3.2.5.10.), ukupnog broj živih ćelija (Odeljak 3.2.5.6.) i senzornih ocena (Odeljak 3.2.5.12.) napitaka.

U Tabeli 28 i Tabeli 29 dat je pregled parametara kvaliteta kao i rezultati ispitivanja stabilnosti parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke, proizvedenih primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture, tokom 28 dana čuvanja.

Tabela 28. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom surutke pomoću mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

Napitak R1 (0,0% mleka)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,20 ± 0,01	4,37 ± 0,02	4,2 ± 0,02	4,07 ± 0,03	4,03 ± 0,01	3,84 ± 0,02
Titracijska kiselost, °SH	3,19 ± 0,04	20,1 ± 0,11	22,3 ± 0,15	28,8 ± 0,06	30,1 ± 0,16	30,2 ± 0,12
Sinerezis, %	100,0 ± 0,00	78,5 ± 0,95	82,5 ± 0,82	84,3 ± 0,74	81,2 ± 0,58	80,2 ± 0,53
Viskozitet, cP	1,1677 ± 0,0214	1,4969 ± 0,0516	1,5293 ± 0,0112	1,6281 ± 0,0437	1,5594 ± 0,0129	1,4852 ± 0,034
Antioksidativna aktivnost, %	15,1 ± 0,08	51,2 ± 0,09	44,1 ± 0,06	40,3 ± 0,05	41,1 ± 0,04	42,3 ± 0,07
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,68 ± 0,123	8,62 ± 0,13	8,55 ± 0,117	8,40 ± 0,142	8,21 ± 0,12	8,03 ± 0,119
Senzorna ocena, ocena	3,25 ± 1,56	6,92 ± 1,25	6,80 ± 1,08	6,60 ± 1,13	5,52 ± 1,21	5,16 ± 1,14

Tabela 29. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke i mleka pomoću mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture

Napitak R2 (30,0% mleka)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,50 ± 0,01	4,34 ± 0,02	4,15 ± 0,05	4,03 ± 0,04	3,98 ± 0,06	3,82 ± 0,01
Titracijska kiselost, °SH	4,46 ± 0,04	24,2 ± 0,10	27,5 ± 0,37	28,2 ± 0,41	33,5 ± 0,16	35,4 ± 0,28
Sinerezis, %	100,0 ± 0,00	50,6 ± 0,60	64,9 ± 0,87	70,0 ± 0,95	67,9 ± 1,00	65,9 ± 0,46
Viskozitet, cP	1,3534 ± 0,0223	2,6984 ± 0,0137	2,7351 ± 0,0481	2,7732 ± 0,0212	2,5251 ± 0,0129	2,3755 ± 0,0224
Antioksidativna aktivnost, %	15,0 ± 0,07	49,2 ± 0,08	46,7 ± 0,04	44,1 ± 1,01	45,1 ± 0,05	46,2 ± 0,07
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,61 ± 0,123	8,85 ± 0,136	8,63 ± 0,127	8,56 ± 0,123	8,45 ± 0,142	8,31 ± 0,136
Senzorna ocena, ocena	6,51 ± 1,01	8,20 ± 1,04	8,12 ± 1,09	8,00 ± 1,12	7,48 ± 1,17	7,20 ± 1,16

Poređenjem rezultata prikazanih u Tabelama 28 i 29, uočava se postojanje značajnih razlika u vrednostima parametara kvaliteta napitaka, u zavisnosti od njihove formulacije, izuzev pH vrednosti za koju je u oba napitka zabeležena približno ista vrednost tokom čitavog ispitivanja.

Titracijska kiselost napitka R2 je statistički značajno ($p < 0,05$) veća u odnosu na napitak R1, tokom čitavog perioda ispitivanja (Tabela 29). Veća titracijska kiselost napitka R2 se odražava i na bolje senzorne ocene ovog napitka (koje se kreću u intervalu $7,20 \pm 1,16$ - $8,20 \pm 1,04$) tokom čitavog perioda ispitivanja. Ravnomerno povećanje titracijske kiselosti tokom 28 dana u oba napitka, predstavlja pokazatelj očuvanja aktivnosti primenjene ABY-6 kulture, što za rezultat ima održanje ukupnog broja živih ćelija na zadovoljavajućem nivou ($\geq 6,0$ log (CFU/mL)). Sa druge strane, obzirom da napitak R2 prema formulaciji predstavlja nutritivno bogatiji supstrat, jer u svom sastavu ima 30,0% mleka, ukupan broj živih ćelija ($8,85 \pm 0,136$ - $8,31 \pm 0,136$ log (CFU/mL)) zabeležen tokom čitavog ispitivanja je značajno veći od broja ćelija u napitku R1 ($8,62 \pm 0,132$ - $8,03 \pm 0,119$ log (CFU/mL)).

Positivan uticaj dodatka 30,0% mleka pri formulisanju napitka R2 ogleda se takođe u vrednostima sinerezisa i viskoziteta. Vrednost sinerezisa koja se tokom ispitivanja kretala u intervalu od $50,6 \pm 0,60$ - $65,9 \pm 0,46\%$ je značajno manja ($p < 0,05$) od vrednosti sinerezisa

napitka R1, dok je vrednost viskoziteta koja se tokom ispitivanja kretala u intervalu od 2,6984 \pm 0,0137-2,3755 \pm 0,0224 cP značajno veća ($p < 0,05$) od vrednosti viskoziteta napitka R1.

Vrednost antioksidativne aktivnosti napitaka R1 i R2 se razlikuje u korist napitka R2, mada zabeležena razlika nije u velikoj meri izražena, te se po pitanju ovog parametra napici mogu smatrati relativno sličnim.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da dodatak 30,0% mleka pri formulisanju napitka R2, značajno utiče na unapređenje parametara kvaliteta kao i njihovu stabilnost tokom čuvanja.

4.5.7. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se dodatkom 30,0% mleka pri formulaciji napitka R2 proizvodi napitak zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,34, titracijska kiselost 24,2 °SH, sinerezis 50,6%, viskozitet 2,6984 cP, antioksidativna aktivnost 49,2%, ukupan broj živih ćelija 8,85 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,20 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

4.6. Analiza kvaliteta napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Pri analizi kvaliteta napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture formulisana su četiri napitka:

N1: formulisana primenom surutke pripremane prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2.

R1: formulisana primenom surutke pripremane prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.2.

N2: formulisana mešanjem surutke sa 30,0% mleka prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3.

R2: formulisana mešanjem surutke sa 30,0% mleka prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3.

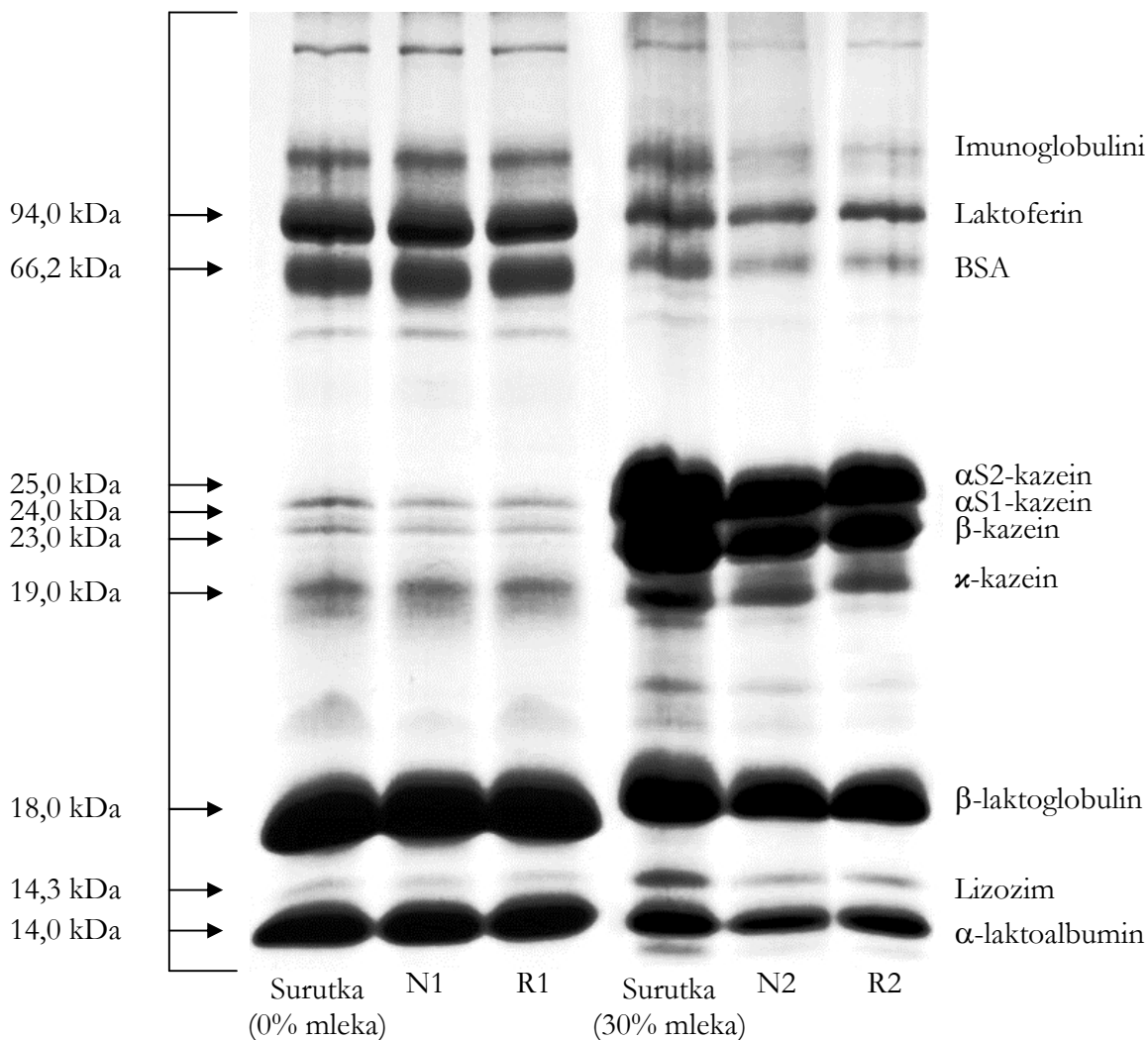
Uzorci N1 i N2 su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2.

Uzorci R1 i R2 su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture sastavljenog od mikroorganizama (odnos 4:2) pripremanih prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.2. i Odeljku 3.2.1.1.

Svi uzorci su fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4. Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršena je detekcija i analiza proteinskih frakcija prisutnih u navedenim napicima prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.16.

4.6.1. Određivanje promene sastava proteinskih frakcija prisutnih u napicima na bazi surutke proizvedenim primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Rezultati analize proteinskih frakcija prisutnih u napicima na bazi surutke proizvedenim primenom komercijalne ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture prikazani su na Slici 37.



Slika 37. Promena sastava proteinskih frakcija prisutnih u napicima na bazi surutke proizvedenim primenom ABY-6 kulture (N1 i N2) i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture (R1 i R2)

Pri analizi proteinskih frakcija u svim napicima je detektovano prisustvo α -laktalbumina, lizozima, β -laktoglobulina, različitih frakcija kazeina, imunoglobulina, goveđeg serum albumina (BSA) i laktoferina (Slika 37).

U cilju određivanja uticaja sadržaja mleka i primenjene kulture na procenat razgradnje proteina tokom procesa fermentacije, sa akcentom na razgradnji β -laktoglobulina i kazeina kao

najznačajnijih alergena u mleku, tehnikom denzitometrije određena je promena sastava ovih proteinskih frakcija u napicima N1, N2, R1 i R2.

Poređenjem napitaka N1 i R1 dobijenih fermentacijom surutke (0,0% mleka) uočeno je da je procenat razgradnje β -laktoglobulina od strane mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture koji je iznosio 9,51%, značajno ($p < 0,05$) veći od procenta razgradnje ostvarenog primenom ABY-6 kulture koji je iznosio 8,38%.

Poređenjem napitaka N2 i R2 dobijenih fermentacijom mešavine surutke i 30,0% mleka uočeno je da je procenat razgradnje β -laktoglobulina od strane mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture od 29,13% značajno ($p < 0,05$) veći od procenta razgradnje ostvarenog primenom ABY-6 kulture a koji je iznosio 21,93%.

Dakle, u napicima koji sadrže 0,0% mleka dodatkom soja *L. rhamnosus* moguće je ostvariti povećanje procenta razgradnje β -laktoglobulina za 1,13%. Sa druge strane, u napicima koji sadrže 30,0% mleka dodatkom soja *L. rhamnosus* moguće je ostvariti povećanje procenta razgradnje β -laktoglobulina za 7,20%.

Poređenjem napitaka N1 i R1 dobijenih fermentacijom surutke (0,0% mleka) uočeno je da je procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) od strane mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture koji je iznosio 31,79% značajno veći od procenta razgradnje ostvarenog primenom ABY-6 kulture a koji je iznosio 28,80%.

Poređenjem napitaka N2 i R2 dobijenih fermentacijom mešavine surutke i 30,0% mleka uočeno je da je procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) od strane mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture koji je iznosio 30,62% značajno veći od procenta razgradnje ostvarenog primenom ABY-6 kulture a koji je iznosio 25,18%.

Dakle, u napicima koji sadrže 0,0% mleka dodatkom soja *L. rhamnosus* moguće je ostvariti povećanje procenta razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) od 2,99%. Sa druge strane, u napicima koji sadrže 30,0% mleka dodatkom soja *L. rhamnosus* moguće je ostvariti povećanje procenta razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) za 5,44%.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da obogaćivanje surutke dodatkom 30,0% mleka zajedno sa dodatkom proteolitičkog soja *L. rhamnosus* dovodi do značajnije razgradnje β -laktoglobulina i kazeina. Ovo može biti objašnjeno time da se u prisustvu dodatnih nutrijenata (što je ostvareno obogaćivanjem surutke sa 30,0% mleka), povećava

metabolička aktivnost primenjenih mikroorganizama, naročito soja *L. rhamnosus*, usmerena na razgradnju β -laktoglobulina i kazeina kao glavnih alergena u mleku. Na ovaj način dobija se napitak sa smanjenom količinom β -laktoglobulina i kazeina, odnosno smanjenim alergijskim potencijalom.

4.6.2. Poređenje parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke i mleka proizvedenih primenom ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* ATCC 7469 kulture

Poređenje parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom komercijalne ABY-6 kulture i mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture vršeno je na osnovu vrednosti parametara kvaliteta napitaka N2 i R2 prikazanih u Tabeli 27 i Tabeli 29.

Dodatkom 30,0% mleka pri formulaciji napitka N2 proizvodi se napitak sa vrednostima parametara kvaliteta: pH vrednost 4,40, titracijska kiselost 23,2 °SH, sinerezis 67,5%, viskozitet 2,7023 cP antioksidativna aktivnost 46,0%, ukupan broj živih ćelija 8,65 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,52 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja. Procenat razgradnje β -laktoglobulina iznosi 21,93%, dok procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) iznosi 25,18%.

Dodatkom 30,0% mleka pri formulaciji napitka R2 proizvodi se napitak sa vrednostima parametara kvaliteta: pH vrednost 4,34, titracijska kiselost 24,2 °SH, sinerezis 50,6%, viskozitet 2,6984 cP, antioksidativna aktivnost 49,2%, ukupan broj živih ćelija 8,85 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,20 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja. Procenat razgradnje β -laktoglobulina iznosi 25,18%, dok procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) iznosi 30,62%.

Na osnovu analize rezultata može se uočiti da dodatak soja *L. rhamnosus* značajno utiče na smanjenje sinerezisa (za 16,9%) napitka R2 u odnosu na napitak N2. Dobijeni rezultat može biti objašnjen prisustvom veće količine mlečne kiseline u napitku R2 (što se vidi iz vrednosti titracijske kiselosti i pH napitka) kao i egzopolisaharida proizvedenih od strane soja *L. rhamnosus*. Prema navodima iz literature⁴¹⁷, proteinski gelovi su pH osetljivi pa niža pH vrednost kao i prisustvo egzopolisaharida koji dovode do stvaranja protein-polisaharid veza koje su znatno slabije od protein- protein veza⁴¹⁸, dovode do slabljenja strukture gela. Usled

ova dva uticaja polipeptidne veze u gelu slabe, dolazi do hidratacije gela a samim tim i do opadanja vrednosti sinerezisa i viskoziteta napitka⁴¹⁹.

Dodatak soja *L. rhamnosus* takođe utiče na povećanje antioksidativne aktivnosti napitka R2 verovatno usled sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida. Prema navodima iz literature⁴²⁰ egzopolisaharidi mogu delovati kao stimulatori sojeva prisutnih u ABY-6 kulturi koji u tom slučaju mogu proizvoditi metabolite kao što su bioaktivni peptidi i time doprineti antioksidativnoj aktivnosti napitka. Sa druge strane soj *L. rhamnosus* kao soj izražene proteolitičke aktivnosti⁴¹⁵ razgradnjom proteina prisutnih u napitku takođe u značajnoj meri može doprineti povećanju antioksidativne aktivnosti napitka. Ove pretpostavke su potvrđene i značajno većim procentom razgradnje β -laktoglobulina i dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) kao i brojem živih ćelija prisutnih u napitku R2 u odnosu na napitak N2.

4.6.3. Ispitivanje osetljivosti primenjenih kultura na antibiotike

Pri ispitivanju osetljivosti primenjenih kultura na antibiotike, mikroorganizmi su pripremani prema procedurama opisanim u Odeljku 3.2.1.1. i Odeljku 3.2.1.2. Osetljivost mikroorganizama na antibiotike je određivana prema metodi opisanoj u Odeljku 3.2.5.15. Rezultati ispitivanja bazirani na prečnicima zone inhibicije testiranih mikroorganizama u prisustvu 10 ispitivanih antibiotika prikazani su u Tabeli 30.

Tabela 30. Prečnici zona inhibicije i osetljivost testiranih kultura na prisustvo različitih antibiotika.

Antibiotik	Prečnik zone inhibicije (mm)			Osetljivost soja na antibiotik			
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
Tetraciklin	22	41	30	R	S	S	
Ampicilin	24	35	23	R	S	I	
Streptomycin	14	+	0	R	S	R	
Kanamycin	-	-	0	R	R	R	
Hloramfenikol	19-20	+	22	R	S	R	
Penicilin	25	+	28	I	S	S	
Eritromicin	22	+ / 35	30	R	S	S	
Gentamicin	-	-	0	R	R	R	
Vankomicin	12	-	0	S	R	R	
Nalidiksična kiselina	-	-	0	R	R	R	

Svetska zdravstvena organizacija je u okviru svojih preporuka za upotrebu određenih mikroorganizama u ljudskoj ishrani kroz ispitivanje i procenu probiotskih svojstava uvela i ispitivanje prisustva rezistencije mikroorganizama na različite vrste antibiotika³⁷⁴.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 30 može se zaključiti da je korišćeni soj *L. rhamnosus* pokazao osetljivost na prisustvo eritromicina (15,0 µg), tetraciklina (30,0 µg) i penicilina (10,0 IU). Na prisustvo ampicilina (30,0 µg) ispitivani soj je pokazao delimičnu osetljivost, dok je na antibiotike iz grupe aminoglikozida (gentamicin, streptomycin, kanamicin), vankomicin i nalidiksičnu kiselinu rezistentan. U prisustvu hloramfenikola je uočena uža zona inhibicije pa se može zaključiti da je na dejstvo ovog antibiotika ispitivani soj delimično rezistentan. Uočava se da je *L. rhamnosus* rezistentan na sve ispitane antibiotike iz grupe aminoglikozida što je u skladu sa navodima iz literature⁴²¹ prema kojima je 95,0% sojeva ove vrste osetljivo na penicilin G, 100% rezistentno na vankomicin i gotovo sve antibiotike iz grupe aminoglikozida dok je samo 2% sojeva je pokazalo osetljivost na gentamicin. Takođe veoma izraženu rezistenciju na antibiotike ispoljio je soj *S. thermophilus* koji je pokazao osetljivost isključivo na vankomicin i penicilin, dok su sojevi *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* i *B. bifidum* ispoljili rezistenciju samo na kanamicin, gentamicin, vankomicin i nalidiksičnu kiselinu.

Budući da je rezistencija mikroorganizama na antibiotike danas široko rasprostranjena, veoma je čest slučaj da se za probiotske sojeve utvrdi prisustvo gena odgovornih za rezistenciju na više antibiotika^{422,423}. Među bakterijama *Lactobacillus* sp. veoma je česta rezistencija na penicilin i tetraciklin, dok su mnoge vrste BMK prirodno otporne na vankomicin i aminoglikozide⁴²⁴ mada, se prenos prirodnih plazmida veoma retko javlja kod vrsti roda *Lactobacillus*⁴²⁵. Prema navodima iz literature geni odgovorni za rezistenciju na klindamicin, streptomycin, eritromicin i tetraciklin kod vrste *L. lactis* uglavnom su bili locirani na bakterijskom hromozomu, a ne na prenosnom plazmidu⁴²⁴ čime je otežan prenos rezistencije između vrsta. Ovakvi rezultati delimično opravdavaju upotrebu probiotskih sojeva sa dokazanom rezistencijom ukoliko se pokaže da ne dolazi do prenosa ovih gena između vrsta. U slučaju ispitivanih sojeva bilo bi neophodno izvršiti detaljna genetička ispitivanja u cilju utvrđivanja potencijala za širenje konkretnih gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike.

4.6.4. Zaključak

Analizom vrednosti parametra kvaliteta napitaka N2 i R2 ali uz postavljanje senzornih ocena kao ključnog parametra za plasiranje proizvoda, može se zaključiti da se napitak optimalnog kvaliteta dobija ferementacijom surutke i 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture (N2). Tokom proizvodnje ovog napitka procenat razgradnje β -laktoglobulina iznosi 21,93%, dok procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) iznosi 25,18%.

4.7. Unapređenje kvaliteta napitka na bazi surutke proizvedenog primenom ABY-6 kulture

4.7.1. Uticaj dodatka stabilizatora na kvalitet napitka na bazi surutke proizvedenog pomoću ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja dodatka stabilizatora na kvalitet napitka na bazi surutke proizvedenog pomoću ABY-6 kulture uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.3. mešanjem surutke sa 30,0% (v/v) mleka. Pripremljeni uzorci su obogaćeni odgovarajućom količinom stabilizatora definisanom prema eksperimentalnom planu (Tabela 31). Nakon toga uzorci su zasejavani sa 6,0% (v/v) inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Ispitivani stabilizatori su korišćeni u obliku rastvora sledećih koncentracija: pektin 5,0% (w/v), želatin 5,0% (w/v) i KPS 25,0% (w/v). Rastvori su pasterizovani 20,0 min na 90,0 °C.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6, vršeno je određivanje sinerezisa (Odeljak 3.2.5.7.), viskoziteta (Odeljak 3.2.5.8.) i senzornih karakteristika (Odeljak 3.2.5.12.)

Eksperimentalni plan i obrada podataka

U okviru ispitivanja korišćen je puni (2^3) faktorijalni eksperimentalni plan sa tri faktora, na tri nivoa i dva ponavljanja i četiri centralne tačke. U Tabeli 31 prikazan je puni faktorijalni plan eksperimenta sa variranim vrednostima za pektin (A), želatin (B) i koncentrat proteina surutke (C) kao ulaznim promenljivim i vrednostima sinerezisa (Y1), viskoziteta (Y2) i senzornih ocena (Y3) kao odzivima sistema.

Tabela 31. Puni (2^3) faktorijalni plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i vrednostima sinerezisa, viskoziteta i senzornih ocena kao odziva sistema

Redni broj eksperimenta	Varirane i (kodirane) vrednosti			Odziv sistema		
	A Pektin (%, w/v)	B Želatin (%, w/v)	C KPS (%, w/v)	Y1 Sinerezis, %	Y2 Viskozitet, cP	Y3 Senzorna ocena, ocena
1	(0) 0,3	(0) 0,5	(0) 6,0	12,0 ± 0,7	160,8 ± 3,23	7,12 ± 1,01
2	(1) 0,4	(-1) 0,3	(1) 8,0	21,0 ± 0,4	346,0 ± 2,89	6,14 ± 0,98
3	(1) 0,4	(1) 0,7	(-1) 4,0	18,0 ± 0,2	349,2 ± 2,45	5,21 ± 0,94
4	(1) 0,4	(-1) 0,3	(-1) 4,0	14,7 ± 0,6	335,1 ± 3,12	4,14 ± 1,12
5	(-1) 0,2	(1) 0,7	(-1) 4,0	15,0 ± 0,6	159,6 ± 2,96	8,24 ± 0,72
6	(0) 0,3	(0) 0,5	(0) 6,0	13,5 ± 0,2	159,0 ± 3,42	7,18 ± 0,76
7	(-1) 0,2	(1) 0,7	(1) 8,0	1,50 ± 0,4	174,0 ± 3,25	8,17 ± 0,78
8	(1) 0,4	(-1) 0,3	(1) 8,0	20,0 ± 0,5	345,8 ± 3,14	6,16 ± 0,65
9	(1) 0,4	(1) 0,7	(-1) 4,0	17,1 ± 0,6	348,5 ± 2,68	5,23 ± 0,95
10	(-1) 0,2	(-1) 0,3	(1) 8,0	5,40 ± 0,8	202,2 ± 2,45	8,27 ± 0,68
11	(1) 0,4	(1) 0,7	(1) 8,0	15,0 ± 0,8	379,1 ± 2,14	5,22 ± 0,23
12	(1) 0,4	(-1) 0,3	(-1) 4,0	15,0 ± 0,5	335,0 ± 3,24	4,26 ± 0,45
13	(-1) 0,2	(-1) 0,3	(-1) 4,0	12,0 ± 0,3	149,7 ± 2,97	7,18 ± 1,01
14	(0) 0,3	(0) 0,5	(0) 6,0	12,0 ± 0,3	160,4 ± 3,65	7,14 ± 0,95
15	(0) 0,3	(0) 0,5	(0) 6,0	12,6 ± 0,2	161,0 ± 1,24	7,24 ± 0,91
16	(-1) 0,2	(1) 0,7	(-1) 4,0	1,50 ± 0,4	158,2 ± 1,45	8,11 ± 0,92
17	(-1) 0,2	(1) 0,7	(1) 8,0	1,50 ± 0,6	174,3 ± 2,41	8,14 ± 0,94
18	(-1) 0,2	(-1) 0,3	(-1) 4,0	10,5 ± 0,4	150,0 ± 1,89	7,24 ± 0,12
19	(1) 0,4	(1) 0,7	(1) 8,0	15,0 ± 0,5	379,1 ± 1,24	5,28 ± 0,18
20	(-1) 0,2	(-1) 0,3	(1) 8,0	4,50 ± 0,6	202,7 ± 2,13	8,17 ± 0,18

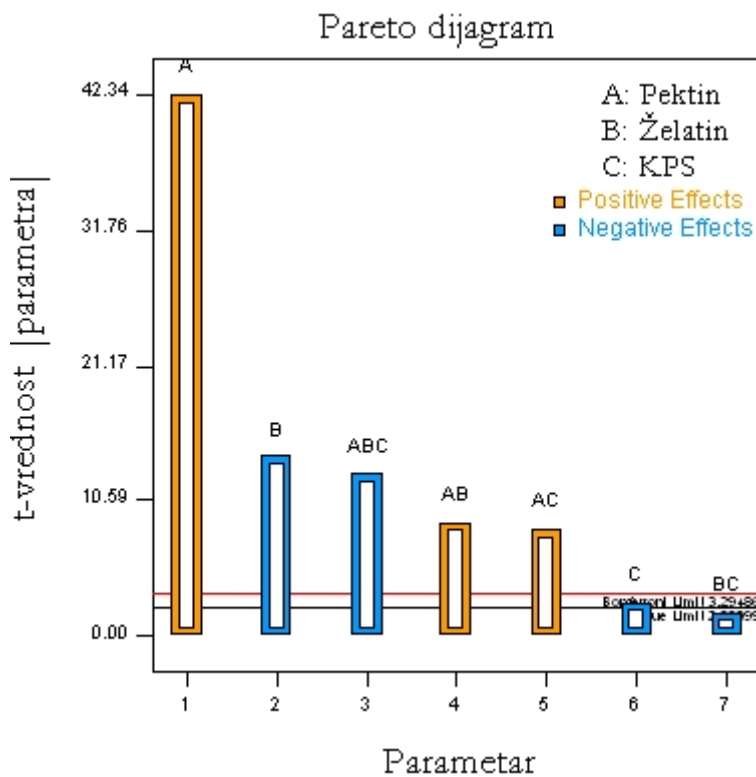
Rezultati eksperimenata izvedenih u okviru punog (2^3) faktorijalnog dizajna predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta.

Za opis odzivnih funkcija Y1 (Sinerezis), Y2 (Viskozitet) i Y3 (Senzorna ocena) u okviru punog (2^3) faktorijalnog dizajna primenjen je polinom trećeg reda:

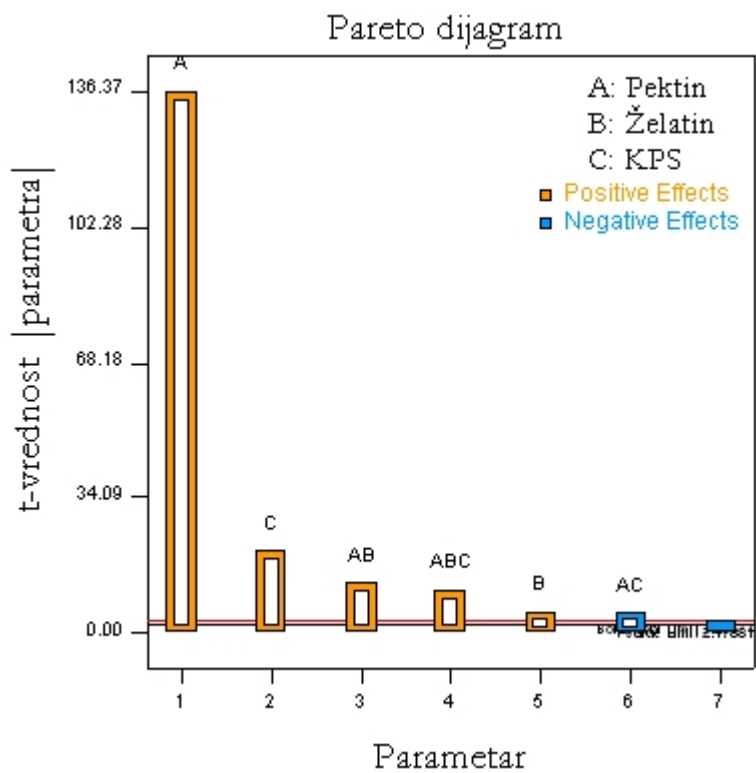
$$Y = \beta_0 + \beta_1 \times A + \beta_2 \times B + \beta_3 \times C + \beta_{12} \times A \times B + \beta_{23} \times B \times C + \beta_{13} \times A \times C + \beta_{123} \times A \times B \times C$$

U cilju selekcije parametara koji ostvaruju najveći uticaj na Y1 (Sinerezis), Y2 (Viskozitet) i Y3 (Senzorna ocena) sprovedena je analiza varijanse (ANOVA) pomoću koje su određeni koeficijenti regresione jednačine, konstruisani Pareto dijagrami i analizirane

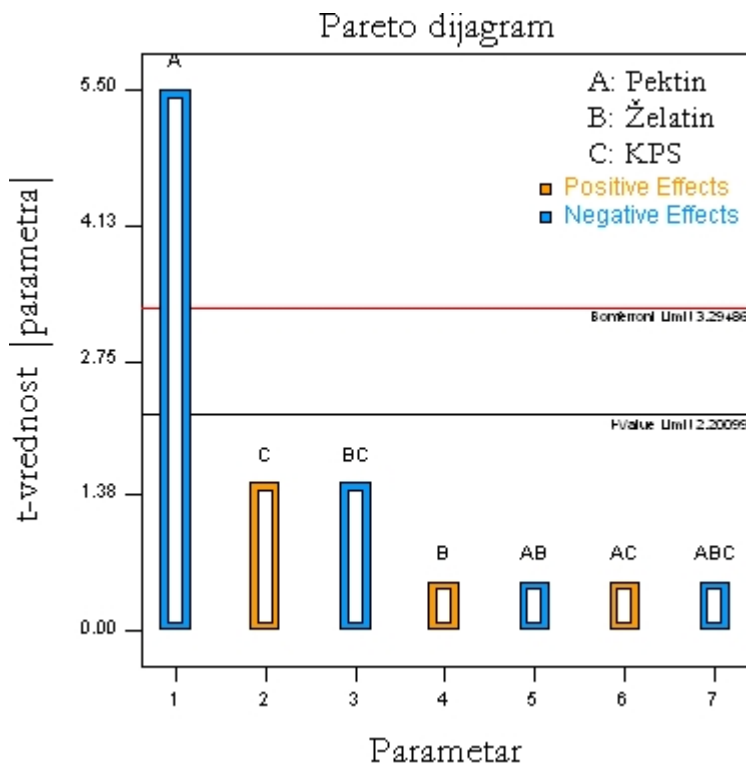
značajnosti uticaja svakog od parametara modela na navedene odzive sistema. Dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 38, 39 i 40.



Slika 38. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na sinerezis napitka na bazi surutke



Slika 39. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na viskozitet napitka na bazi surutke



Slika 40. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na senzornu ocenu napitka na bazi surutke

Rezultati dobijeni analizom t-vrednosti svakog od faktora u okviru punog (2^3) faktorijalnog dizajna ukazuju na to da pektin ostvaruje značajan ($p < 0,05$) pozitivan uticaj na sinerezis i viskozitet napitka, kao i značajan ($p < 0,05$) negativan uticaj na senzornu ocenu napitka. Obzirom da značajan pozitivan uticaj na sinerezis podrazumeva da sa povećanjem sadržaja pektina dolazi do povećanja sinerezisa, ovaj parametar je predstavljao ključnu tačku optimizacije sadržaja stabilizatora. Prema navodima iz literature¹⁶⁸ sadržaj KPS-a u proizvodima ove vrste ne bi trebao da prelazi vrednost od 3,0% usled čega je vrednost ovog parametara tokom procesa optimizacije ograničena na zadatu vrednost 3,5%.

Za optimizaciju sadržaja stabilizatora u okviru postupka odzivnih površina korišćen je koncept željene funkcije. U prvom ciklusu optimizacije vršeno je ograničenje ulaznih promenljivih definisano minimizacijom količine pektina, ograničenjem količine KPS-a na vrednosti 3,5%, uz ograničenje odziva definisano ograničenjem vrednosti viskoziteta na 150,0-300,0 cP, minimizacijom vrednosti sinerezisa, maksimizacijom vrednosti senzornih ocena.

Nakon prvog ciklusa optimizacije dobijeni su sledeći rezultati koji podrazumevaju najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije:

Maksimalna vrednost senzorne ocene (5) uz minimalnu vrednost sinerezisa (1,5%) i zadovoljavajuću vrednost viskoziteta (158,9 cP) se postiže nakon 4,0 h fermentacije mešavine surutke i 30,0% mleka na temperaturi 42,0 °C pri koncentraciji pektina 0,2%, želatina 0,7% i KPS-a 2,0%. Dobijeni rezultati su u skladu sa navodima iz literature⁴²⁶ prema kojima želatin i pektin u značajnoj meri utiče na sinerezis i viskozitet jogurta.

4.7.2. Uticaj dodatka voćnih sokova na kvalitet napitka na bazi surutke i mleka proizvedenog pomoću ABY-6 kulture

Pri ispitivanju uticaja dodatka voćnih sokova na kvalitet napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture korišćena je sveža surutka i voćni sokovi od šargarepe (V1) i jabuke (V2).

Uzorci su pripremani prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.3.4. mešanjem surutke sa 30,0% mleka i 30,0% voćnog soka. Uzorci su zatim zasejavani sa 6,0% inokuluma ABY-6 kulture pripremljenog prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.1.2., i fermentisani na temperaturi 42,0 °C prema proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.4.

Nakon postizanja pH vrednosti 4,6 vršeno je određivanje osnovnih parametara kvaliteta: pH vrednosti (Odeljak 3.2.5.2.), titracijske kiselosti (Odeljak 3.2.5.3.), sinerezisa (Odeljak 3.2.5.7.), viskoziteta (Odeljak 3.2.5.8.), antioksidativne aktivnosti (Odeljak 3.2.5.10.), ukupnog broj živih ćelija (Odeljak 3.2.5.6.) i senzornih ocena (Odeljak 3.2.5.12.) napitaka kao i praćenje njihove stabilnosti tokom 28 dana čuvanja metodom opisanom u Odeljku 3.2.5.17. Na osnovu dobijenih rezultata izabran je napitak optimalnog kvaliteta čiji su parametri zatim poređeni sa parametrima kvaliteta napitka N2 koji je formulisan u Odeljku 4.6.5.

U Tabelama 32 i 33, dat je pregled parametara kvaliteta kao i rezultati ispitivanja stabilnosti parametara kvaliteta napitaka na bazi surutke, proizvedenih primenom ABY-6 kulture, tokom 28 dana čuvanja.

Tabela 32. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke, mleka i soka od šargarepe pomoću ABY-6 kulture

Napitak V1 (30,0% mleka, 30,0% sok od šargarepe)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,50 ± 0,02	4,60 ± 0,06	4,52 ± 0,04	4,49 ± 0,03	4,47 ± 0,01	4,47 ± 0,05
Titracijska kiselost, °SH	4,80 ± 0,04	20,0 ± 0,10	21,4 ± 0,20	22,6 ± 0,50	22,8 ± 0,09	25,2 ± 0,10
Sinerezis, %	90,0 ± 0,00	66,7 ± 0,70	68,3 ± 0,86	72,1 ± 0,72	75,1 ± 1,41	75,3 ± 0,68
Viskozitet, cP	1,5534 ± 0,0113	2,6932 ± 0,0142	2,7191 ± 0,0651	2,79350 ± 0,0425	2,813 ± 0,0147	2,9812 ± 0,0193
Antioksidativna aktivnost, %	76,1 ± 0,05	90,5 ± 0,09	89,8 ± 0,04	87,2 ± 1,03	92,9 ± 0,04	94,6 ± 0,07
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,41 ± 0,154	8,66 ± 0,182	8,73 ± 0,162	8,80 ± 0,187	8,32 ± 0,112	8,20 ± 0,134
Senzorna ocena, ocena	7,41 ± 1,45	8,97 ± 1,21	8,92 ± 1,10	8,51 ± 1,32	8,46 ± 1,36	8,28 ± 1,41

Tabela 33. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke, mleka i soka od jabuke pomoću ABY-6 kulture

Napitak V2 (30,0% mleka, 30,0% soka od jabuke)						
Parametar kvaliteta	Vreme merenja					
	Pre fermentacije	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
pH vrednost	6,53 ± 0,02	4,62 ± 0,06	4,56 ± 0,05	4,49 ± 0,04	4,41 ± 0,01	4,48 ± 0,05
Titracijska kiselost, °SH	1,60 ± 0,04	18,8 ± 0,10	19,4 ± 0,30	20,1 ± 0,4	20,8 ± 0,09	21,1 ± 0,30
Sinerezis, %	85,0 ± 0,00	64,7 ± 0,40	65,9 ± 0,87	70,1 ± 0,85	71,1 ± 1,32	73,3 ± 0,89
Viskozitet, cP	1,4514 ± 0,0243	2,7922 ± 0,0131	2,7931 ± 0,0542	2,8135 ± 0,0312	2,8915 ± 0,0247	2,9812 ± 0,0334
Antioksidativna aktivnost, %	72,1 ± 0,08	91,3 ± 0,06	88,3 ± 0,08	86,2 ± 0,04	93,9 ± 1,03	95,6 ± 0,06
Ukupan broj živih ćelija, log (CFU/mL)	6,58 ± 0,117	8,93 ± 0,142	8,82 ± 0,157	8,78 ± 0,163	8,45 ± 0,112	8,27 ± 0,126
Senzorna ocena, ocena	7,41 ± 1,2	9,01 ± 1,03	9,54 ± 1,05	8,91 ± 1,00	8,76 ± 1,15	8,58 ± 1,23

Poređenjem rezultata prikazanih u Tabelama 32 i 33, uočava se postojanje značajnih razlika u vrednostima parametara kvaliteta napitaka u zavisnosti od njihove formulacije, izuzev

pH vrednosti za koju je u oba napitka zabeležena približno ista vrednost tokom čitavog ispitivanja.

Titracijska kiselost napitka V2 je statistički značajno ($p < 0,05$) manja u odnosu na napitak N1, tokom čitavog perioda ispitivanja (Tabela 33). Manja titracijska kiselost napitka V2 verovatno doprinosi izraženijem ukusu voća, što se odražava i na bolje senzorne ocene ovog napitka (koje se kreću u intervalu $8,58 \pm 1,23$ - $9,01 \pm 1,03$) tokom čitavog perioda ispitivanja. Ravnomerno povećanje titracijske kiselosti tokom 28 dana u oba napitka, predstavlja pokazatelj očuvanja aktivnosti primenjene ABY-6 kulture, što za rezultat ima održanje ukupnog broja živih ćelija na zadovoljavajućem nivou ($\geq 6,0$ log (CFU/mL)). Ukupan broj živih ćelija u napitku V2 ($8,93 \pm 0,142$ log (CFU/mL)) zabeležen nakon fermentacije je značajno veći ($p < 0,05$) od ukupnog broja živih ćelija u napitku V1 ($8,66 \pm 0,182$ log (CFU/mL)). Sa druge strane, ukupan broj živih ćelija u napitku V2 ($8,27 \pm 0,126$ log (CFU/mL)) zabeležen nakon 28 dana čuvanja je veći od ukupnog broja živih ćelija u napitku V1 ($8,20 \pm 0,134$ log (CFU/mL)) mada razlika nije statistički značajna ($p > 0,05$).

Pozitivan uticaj dodatka soka od jabuke pri formulisanju napitka V2 ogleda se takođe u vrednostima sinerezisa i viskoziteta. Vrednost sinerezisa napitka V2 je značajno manja ($p < 0,05$) od vrednosti sinerezisa napitka V1, dok je vrednost viskoziteta napitka V2 značajno veća ($p < 0,05$) od vrednosti viskoziteta napitka V1. Veća vrednost viskoziteta praćena manjom vrednošću sinerezisa napitka V2 je verovatno posledica prisustva pektina koji igra ulogu stabilizatora koji se u industriji veoma često koristi za ugušćivanje različitih formulacija.

Vrednost antioksidativne aktivnosti napitaka V1 i V2 se razlikuje u korist napitka V1 mada zabeležena razlika nije u velikoj meri izražena, te se po pitanju ovog parametra napici mogu smatrati relativno sličnim.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da voćni sok od jabuke korišćen pri formulisanju napitka V2, značajnije unapređuje vrednosti parametara kvaliteta kao i njihovu stabilnost tokom čuvanja u poređenju sa sokom od šargarepe. Dodatkom soka od jabuke pri formulaciji napitka V2 proizvodi se napitak zadovoljavajućeg kvaliteta koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

Poređenjem parametara kvaliteta napitka V2 (surutka, 30,0% mleka i 30,0% sok od jabuke) i parametara kvaliteta napitka N2 (surutka i 30,0% mleka) formulisanog u Odeljku 4.4.6 može se uočiti da dodatak 30,0% soka od jabuke značajno utiče na unapređenje kvaliteta

napitka. Upoređivanjem parametara kvaliteta nakon fermentacije (0. dan) može se uočiti da napitak V2 ima manju titracijsku kiselost i sinerezis ($18,8 \pm 0,10$ °SH i $64,7 \pm 0,40\%$, respektivno) u odnosu na napitak N2 ($23,2 \pm 0,20$ °SH i $67,5 \pm 0,70\%$, respektivno). U prilog tome stoji i činjenica da su viskozitet, antioksidativna aktivnost, ukupan broj živih ćelija kao i senzorne ocene ($2,7922 \pm 0,0131$ cP, $91,3 \pm 0,06\%$, $8,93 \pm 0,142$ log (CFU/mL) i $9,01 \pm 1,03$, respektivno) napitka V2 značajno veće u odnosu na vrednosti istih parametara zabeležene u napitku N2 ($2,7023 \pm 0,0122$ cP, $46,0 \pm 0,07\%$, $8,65 \pm 0,132$ log (CFU/mL) i $8,52 \pm 1,01$, respektivno). Potpuno isti trend razlika u vrednostima parametara kvaliteta u korist napitka V2 zabeležen je tokom čitavog ispitivanja. Dakle, tokom svih 28 dana čuvanja napitka V2 ispoljava i zadržava bolji kvalitet u odnosu na napitak N2.

Iz svega navedenog može se zaključiti da dodatak 30,0% soka od jabuke u formulaciju koja sadrži surutku i 30,0% mleka dovodi do značajnog unapređenja vrednosti parametara kvaliteta napitka.

4.7.3. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da dodatak 30,0% soka od jabuke u formulaciju koja sadrži surutku i 30,0% mleka dovodi do značajnog unapređenja vrednosti parametara kvaliteta napitka. Dodatkom voćnog soka od jabuke proizvodi se napitak čije su vrednosti parametara kvaliteta: pH vrednost 4,62, titracijska kiselost 18,8 °SH, sinerezis 64,7%, viskozitet 2,7922 cP, antioksidativna aktivnost 91,3%, ukupan broj živih ćelija 8,93 log (CFU/mL), senzorna ocena 9,01 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

Dodatno unapređenje kvaliteta može se postići primenom stabilizatora koji u značajnoj meri unapređuju kvalitet napitka proizvedenog fermentacijom surutke i mleka primenom ABY-6 kulture. Dodatkom 0,2% pektina, 0,7% želatina i 2,0% koncentrata proteina surutke proizvodi se napitak odličnih senzornih karakteristika sa vrednošću sinerezisa od 1,5% i optimalnom vrednošću viskoziteta od 158,9 cP.

4.8. Analiza sastava i deklarisanje napitaka na bazi surutke proizvedenih primenom ABY-6 kulture

4.8.1. Analiza sastava proizvedenih napitaka na bazi surutke

Sastav i svojstva surutke zavise od kvaliteta mleka i tehnologije proizvodnje sira tj. načina koagulacije mleka. Proteini surutke u celosti prelaze u surutku jer su neosetljivi na dejstvo kiselina i primenjenih enzima u proizvodnji sira, dok su značajna variranja moguća u sadržaju minerala, naročito kalcijuma i fosfora.

Sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka prikazan je u Tabeli 34, dok je sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke prikazan u Tabeli 35.

Tabela 34. Sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka primenom ABY-6 kulture

Parametar	Vrednost
pH vrednost	4,60 ± 0,12
Suva materija, %	9,80 ± 0,14
Proteini, %	2,30 ± 0,03
Masti, %	0,88 ± 0,04
Šećeri, %	3,30 ± 0,04
Kalcijum, g/L	1,940 ± 0,27

Tabela 35. Sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture

Parametar	Vrednost
pH vrednost	4,60 ± 0,12
Suva materija, %	10,2 ± 0,12
Proteini, %	2,30 ± 0,03
Masti, %	0,50 ± 0,04
Šećeri, %	7,57 ± 0,02
Kalcijum, g/L	1,378 ± 0,19

Kao što je prikazano u Tabelama 34 i 35 sadržaj suve materije u fermentisanim napicima N2 i V2 se kretao u intervalu 9,8-10,2%, što je u skladu sa sadržajem suve materije

polaznih sirovina. Zanimljivo je napomenuti da je polazna sirovina imala nešto veći sadržaj suve materije od uobičajenih vrednosti za surutku navedenih u literaturi koje se kreću u intervalu 6,0-8,0%. Povećan sadržaj suve materije uslovljen je sadržajem proteina u surutki, koji je oko 2,5 puta veći od uobičajenih vrednosti navedenih u literaturi⁴⁰² koje iznose oko 1,0%. Ovako visok sadržaj proteina ukazuje da su tokom procesa prerade mleka i nastanka surutke primenjeni tehnološki postupci koji nisu značajno uticali na smanjenje sadržaja proteina. Visok sadržaj suve materije surutke rezultirao je takođe visokim sadržajem kalcijuma u napitku proizvedenom fermentacijom surutke i 30,0% mleka.

Zbog kvalitetnog hemijskog sastava, deklaracija napitaka na bazi surutke može da sadrži veliki broj nutritivnih i zdravstvenih izjava. Uslov za navođenje nutritivnih i zdravstvenih izjava je da se na ambalaži proizvoda nalazi nutritivni sastav.

4.8.2. Deklarisanje napitka na bazi surutke i mleka proizvedenog primenom ABY-6 kulture

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 34 može se predstaviti nutritivna informacija (nutritivna tablica) o fermentisanom napitku, koja je data u Tabeli 36.

Tabela 36. Nutritivna tablica napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka primenom ABY-6 kulture

Hranljiva vrednost	Porcija od 100 mL	Porcija od 250 mL*	% PDU**, po porciji
Energetska vrednost	100 kJ/32 kcal	335 kJ/80 kcal	4,00
Masti	0,88 g	2,20 g	3,10
- Od toga zasićene masne kiseline	0,66 g	1,65 g	8,25
Ugljeni hidrati	3,30 g	8,25 g	3,20
- Od toga šećeri	3,30 g	8,25 g	9,20
Proteini	2,30 g	5,75 g	11,5
Soli	0,11 g	0,27 g	4,50
Minerali			
-Kalcijum	194,0 mg	485,0 mg	60,0

* **Porcija:** 250 ml; Broj porcija u pakovanju: 1, ** **PDU-** Preporučeni dnevni unos za prosečnu odraslu osobu (8400 kJ/2000 kcal)

Kao što je prikazano u Tabeli 36, sadržaj proteina u 100 mL fermentisanog napitka iznosi 2,3 g. Prema važećim pravilnicima o hrani i evropskim regulativama²⁰², proizvod koji ima najmanje 20% energetske vrednosti koja potiče od proteina, može da ima nutritivnu izjavu "Bogat proteinima".

U 100 mL proizvoda se nalazi 194,0 mg kalcijuma, što zadovoljava 24,2% dnevnih potreba za ovim mineralom. Prema važećim standardima za hranu²⁰², proizvod koji ima više od 15,0% dnevnih potreba na 100 mL može poneti nutritivne i zdravstvene izjave²⁰⁹. Od nutritivnih izjava za kalcijum biramo izjavu "Prirodan izvor kalcijuma", a od zdravstvenih izjava "Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju".

Zbog količine proteina, ovaj proizvod može da ima i zdravstvenu izjavu koja se odnosi na proteine: "Proteini doprinose normalnom održavanju kostiju". Prema EU Direktivi²⁰⁹ uslov za ovu izjavu je da fermentisani napitak ima više od 12,0% energije koja potiče od proteina. Napitak ima čak 29,0% energije koja potiče od proteina.

Ukoliko proizvod sadrži najmanje 10^8 (CFU/g ili CFU/mL) živih mikroorganizama (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) a fermentisani napitak ispunjava ovaj zahtev nakon fermentacije i minimum do 14. dana čuvanja-proizvod može na deklaraciji da ima i zdravstvenu izjavu "Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze"²⁰⁹. Takođe, ukoliko na proizvodu postoji bar jedna zdravstvena izjava, mora se navesti i izjava "Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života"²⁰².

4.8.3. Deklarisanje napitka na bazi surutke, mleka i voćnog soka proizvedenog primenom ABY-6 kulture

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 35 može se predstaviti nutritivna informacija (nutritivna tablica) o fermentisanom napitku, koja je data u Tabeli 37.

Tabela 37. Nutritivna tablica napitka dobijenog fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture

Hranljiva vrednost	Porcija od 100 mL	Porcija od 250 mL*	% PDU** po porciji
Energetska vrednost	181 kJ/43,3 kcal	452,5 kJ/109,95 kcal	5,49
Masti	0,50 g	1,25 g	1,76
- Od toga zasićene masne kiseline	0,38 g	0,95 g	4,72
Ugljeni hidrati	7,57 g	18,9 g	7,26
- Od toga šećeri	7,57 g	18,9 g	21,0
Proteini	1,61 g	4,02 g	8,05
Soli	0,11 g	0,27 g	4,50
Minerali			
Kalcijum	137,8 mg	344,6 mg	42,6

* **Porcija:** 250 mL; Broj porcija u pakovanju: 1, ** **PDU**-Preporučeni dnevni unos za prosečnu odraslu osobu (8400 kJ/2000 kcal)

Kao što je prikazano u Tabeli 37, 100 mL proizvoda sadrži 0,5 g masti što zadovoljava 0,7% dnevnih potreba za mastima. Prema pravilniku o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica²⁰⁸ koji je usklađen za SRB i EU tržište, proizvod može na deklaraciji da ima nutritivnu izjavu "Light" ili "Smanjen sadržaj masti".

U 100 mL proizvoda se nalazi 137,8 mg kalcijuma, što zadovoljava 17,0% dnevnih potreba za ovim mineralom. Prema važećim standardima za hranu²⁰², proizvod koji ima više od 15,0% dnevnih potreba na 100 mL može poneti nutritivne i zdravstvene izjave²⁰⁹. Od nutritivnih izjava za kalcijum biramo izjavu "Prirodan izvor kalcijuma", a od zdravstvenih izjava "Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju".

Ukoliko proizvod sadrži najmanje 10^8 (CFU/g ili CFU/mL) živih mikroorganizama (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*), a napitak od surutke, mleka i voćnog soka ispunjava ovaj zahtev nakon fermentacije i minimum do 14. dana čuvanja, proizvod može na deklaraciji da ima i zdravstvenu izjavu "Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze"²⁰⁹. Takođe, ukoliko na proizvodu postoji bar jedna zdravstvena izjava, mora se navesti i izjava "Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života"²⁰².

4.8.4. Finalni izgled napitka na bazi surutke, mleka i soka od jabuke proizvedenog primenom ABY-6 kulture

Active drink je proizvod namenjen ljudskoj ishrani. Po svojim svojstvima je veoma sličan voćnom jogurtu na koji su domaći potrošači već prilično naviknuti. Sličnost sa voćnim jogurtom, po pitanju senzornih karakteristika, zapravo predstavlja prednost u pogledu implementacije napitka *Active drink* u svakodnevnu ishranu ljudi. Obzirom da se radi o unapređenom i inovativnom proizvodu ovaj proizvod je sposoban da probudi znatiželju potrošača koja neće biti izneverena jer se radi o proizvodu sa starim dobrim ukusom voćnog jogurta ali sa mnogo većom količinom korisnih hranljivih materija.

Preradom surutke u fermentisani napitak u okviru samo jednog procesa iskorišćavaju se svi potencijali surutke kao sirovine, a iz životne sredine se uklanja materijal koji predstavlja biološki opasan zagađivač, a sa druge strane dobija se jeftin, potpuno prirodan proizvod prikazan na Slici 41.



Slika 41. Finalni izgled napitka proizvedenog fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture

Ovakav način prerade surutke podrazumeva proces nakon koga ne zaostaje ni najmanja količina otpada i predstavlja alternativu procesima prerade surutke u proizvode kao što su mlečna kiselina, etanol, mikrobni proteini, β -D-galaktozidaza i vitamini koji nose sa sobom velike zahteve u pogledu energije i tehnološke opreme. Ovim postupkom prerade surutke ostvaruje se velika ušteda energija u odnosu na komplikovanije procese prerade surutke koji zahtevaju prečišćavanje finalnog proizvoda što dovodi do generisanja nove količine otpada koji je neophodno dalje obrađivati.

4.8.5. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da dodatak soka od jabuke, osim što u velikoj meri doprinosi unapređenja senzornih karakteristika, utiče i na smanjenje količine masti u napitku sa 0,88 na 0,50 g, što dodatno unapređuje kvalitet napitka i omogućava jednostavnije pridobijanje potrošača.

Napitak *Active drink* poseduje najviši stepen finalizacije proizvoda. Obzirom da je postupak proizvodnje praktično isti kao postupak koji se već primenjuje u proizvodnji jogurta, ne postoje posebni zahtevi za implementaciju ovog procesa u postojeće pogone mlečne industrije. Receptura, postupak proizvodnje, ambalaža, deklaracije i način skladištenja su definisani što znači da je proizvod potpuno spreman za proizvodnju i distribuciju.

Napitak dobijen fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke može na ambalaži imati:

- Nutritivnu izjavu: "*Light*" ili "*Smanjen sadržaj masti*"
- Nutritivnu izjavu: "*Prirodan izvor kalcijuma*"
- Zdravstvenu izjavu "*Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju*"
- Zdravstvenu izjavu: "*Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze*"
- Izjavu: "*Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života*"

4.9. Pilot studija o uticaju proteina surutke na apetit/sitost

Ispitivanje uticaja proteina surutke na apetit/sitost vršeno je primenom vizuelno analogne skale (VAS)⁴²⁷. U okviru pilot studije o uticaju proteina surutke na apetit/sitost za pripremu proteinskog napitka korišćen je koncentrat proteina surutke WPC-80. Napitak zapremine 250,0 mL koji je sadržao 25,0 g proteina surutke, pripreman rastvaranjem WPC-80 u vodi, je odmah nakon pripreme serviran ispitanicima.

26 zdravih nasumično odabranih ispitanika, od čega 13 sa BMI < 30,0 kg/m² i 13 sa BMI > 30,0 kg/m², ženskog pola starosti 25-45 godina, je pozvano da učestvuje u ispitivanju uticaja proteina surutke na apetit/sitost. Ispitanici su zamoljeni da na kliniku dođu u ranim jutarnjim časovima (8 h i 15 min) i da pre ispitivanja ne konzumiraju hranu. Pre ispitivanja svaki ispitanik je dobio pisano obaveštenje o vrsti i cilju ispitivanja, nakon čega je bio zamoljen da na osnovu svoje odluke potpiše izjavu o pristanku za učešće u ispitivanju koje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Za procenu uticaja proteina surutke na apetit/sitost korišćena je vizuelno analogna skala (VAS) koja se sastojala od tri pitanja: 1) Koliko ste gladni? 2) Koliko ste siti? i 3) Šta mislite koliko hrane biste sada mogli da pojedete?

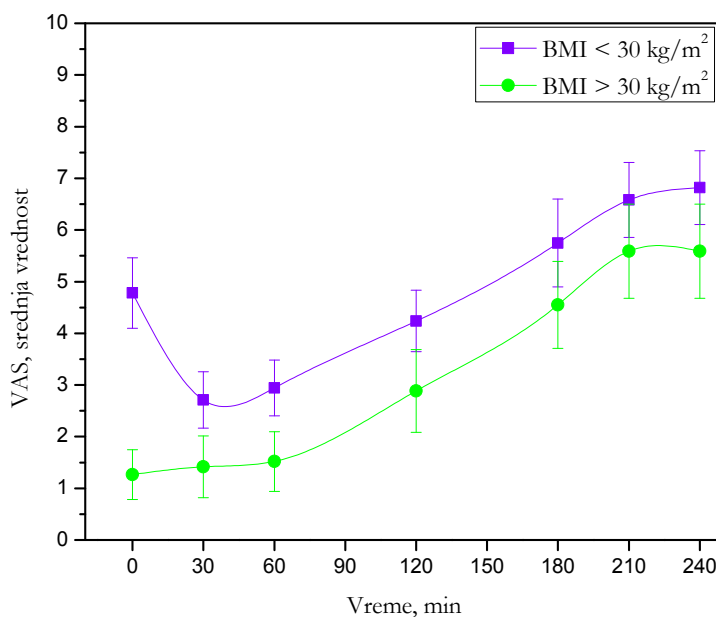
Za procenu senzornih karakteristika napitka korišćena je vizuelno analogna skala (VAS) koja se sastojala od tri pitanja: 1) Kakav je ukus? 2) Kakav je miris? 3) Ukupna ukusnost/jestivost?

Ispitanici su zamoljeni da na skali od 0,0 do 10,0 cm označe tačku koja najviše odgovara jačini osećaja za svaki mereni parametar u tačno određenim vremenskim intervalima: 1) 0,0 min - neposredno pre ispijanja napitka; i nakon isteka 30,0 min; 60,0 min; 120,0 min; 180,0 min; 210,0 min i 240,0 min. Ispitanici su zamoljeni da tokom ispitivanja (4,0 h) ne konzumiraju hranu.

Nakon prikupljanja popunjenih upitnika vršena je statistička obrada podataka primenom jednostruke (One-way ANOVA) analize varijanse sa naknadnim Tukey testom za procenu značajnosti razlike u vrednostima parametara. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$).

Dobijeni rezultati su prikazani na Slikama 42, 43 i 44.

Na Slici 42 prikazan je uticaj proteina surutke na osećaj gladi kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m².



Slika 42. Uticaj proteina surutke na osećaj gladi kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²

Pri ispitivanju uticaja proteina surutke na osećaj gladi vizuelno analogna skala (VAS) je prezentovana tako da je vrednost 0,0 cm predstavljala osećaj "Uopšte nisam gladna" dok je vrednost 10,0 cm predstavljala osećaj "Gladna sam kao što nikad nisam bila".

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 42 može se uočiti da si ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² tokom čitavog ispitivanja imali izraženiji osećaj gladi od ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m². Razlika u osećaju gladi zabeležena je samo u 0,0 min (pre ispijanja napitka) i to u korist ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² koji su u tom trenutku bili statistički značajno ($p=0,00167$) manje gladni od ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m².

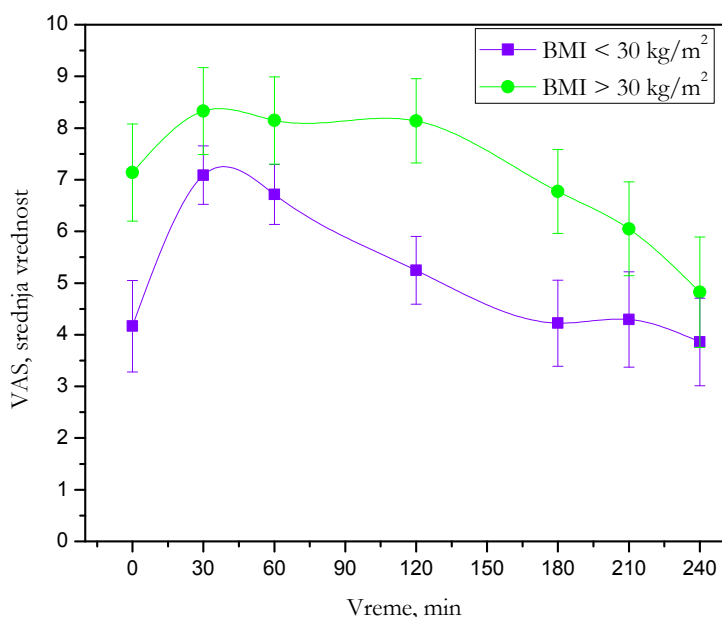
U prvih 30,0 min kod dve grupe ispitanika osećaj gladi menjao se na različit način. Kod ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m² u prvih 30,0 min dolazi do statistički značajnog ($p<0,001$) suzbijanja osećaja gladi, dok se kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² osećaj gladi u istom

intervalu povećava mada bez statističke značajnosti ($p > 0,05$). Nakon 30,0 min osećaj gladi ravnomerno raste kod obe grupe ispitanika pri čemu među grupama ne postoji značajna razlika u osećaju gladi.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima navedenim u literaturi⁴²⁸ prema kojima čak i 20,0 g proteina surutke doprinosi smanjenju osećaja gladi u prvih 30,0 min nakon konzumacije, kod zdravih žena sa BMI < 30,0 kg/m².

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na suzbijanje osećaja gladi kod ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m² dok kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² nema značajan uticaj.

Na Slici 43 prikazan je uticaj proteina surutke na osećaj sitosti kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²



Slika 43. Uticaj proteina surutke na osećaj sitosti kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²

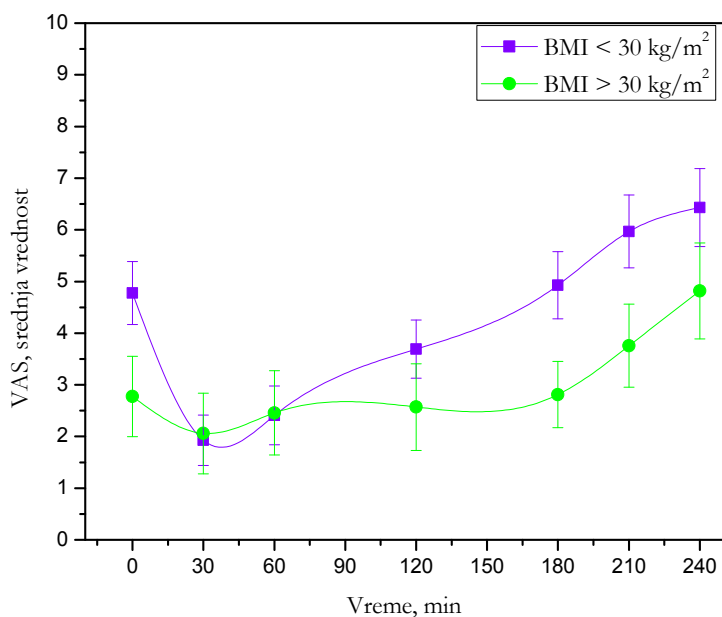
Pri ispitivanju uticaja proteina surutke na osećaj sitosti vizuelno analogna skala (VAS) je prezentovana tako da je vrednost 0,0 cm predstavljala osećaj "Uopšte nisam sita" dok je vrednost 10,0 cm predstavljala osećaj "Potpuno sam sita".

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 43 može se uočiti da su ispitanici sa BMI > 30,0 kg/m² tokom čitavog ispitivanja imali izraženiji osećaj sitosti od ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m². Razlika u osećaju sitosti zabeležena je nakon 120,0 i 180,0 min i to u korist ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² koji su u tom trenutku bili statistički značajno ($p(120 \text{ min})=0,0236$, $p(180 \text{ min})=0,0410$) više siti od ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m².

U prvih 30,0 min kod dve grupe ispitanika osećaj sitosti se menja na različit način. Kod ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m² u prvih 30,0 min dolazi do statistički značajnog ($p<0,001$) povećanja osećaja sitosti, dok se kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² osećaj sitosti povećava mada bez statističke značajnosti ($p>0,05$). Nakon 30,0 min osećaj sitosti ravnomerno opada kod obe grupe ispitanika pri čemu među grupama ne postoji značajna razlika u osećaju sitosti. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima zabeleženim pri ispitivanju uticaja proteina surutke na osećaj gladi, kako u prvih 30,0 min tako i do kraja ispitivanja a takođe su u skladu sa rezultatima navedenim u literaturi⁴²⁸ prema kojima unos 20,0 g proteina surutke doprinosi povećanju osećaja sitosti nakon konzumacije, kod zdravih žena sa BMI < 30,0 kg/m².

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na povećanje osećaja sitosti kod ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m² dok kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² nema značajan uticaj.

Na Slici 44 prikazan je uticaj proteina surutke na količinu hrane koja bi ispitanik mogao da pojede u datom trenutku kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m².



Slika 44. Uticaj proteina surutke na količinu hrane koja bi ispitanik mogao da pojede kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²

Pri ispitivanju uticaja proteina surutke na količinu hrane koju bi ispitanik mogao da pojede u datom trenutku, vizuelno analogna skala (VAS) je prezentovana tako da je vrednost 0,0 cm predstavljala osećaj "Baš ništa" dok je vrednost 10,0 cm predstavljala osećaj "Baš puno".

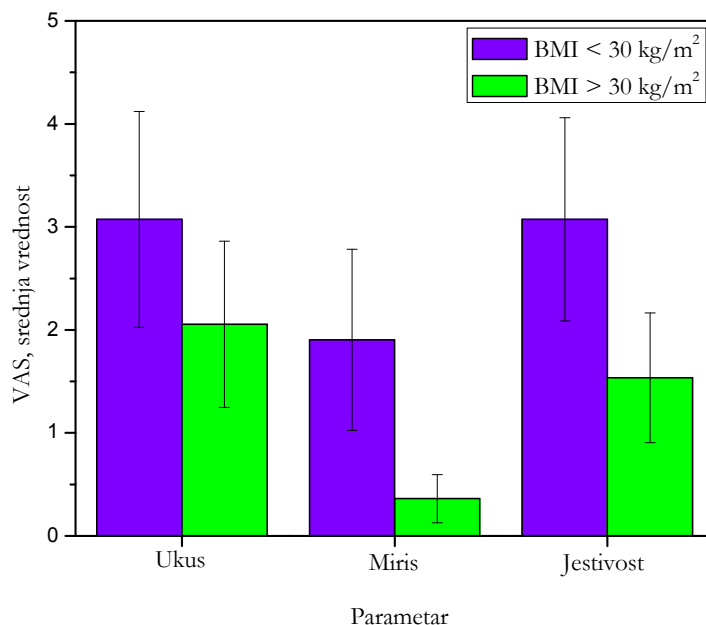
Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 44 može se uočiti da su ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² tokom čitavog ispitivanja ispoljili potrebu za većom količinom hrane od ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m². I pored svega navedenog razlika u količini hrane koju bi obe grupe ispitanika mogle da pojedu u datom trenutku nije bila statistički značajna ($p > 0,05$) tokom čitavog ispitivanja.

Zanimljivo je istaći da bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² nakon 30,0 min mogli da pojedu statistički značajno ($p < 0,001$) manju količinu hrane u odnosu na 0,0 min. Isto ponašanje je uočeno i kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² s tim da kod ove grupe ispitanika razlika u količini hrane u 0,0 i 30,0 min nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Nakon 30,0 min

količina hrane koju bi obe grupe mogle da pojedu ravnomerno raste pri čemu među grupama ne postoji značajna razlika u količini hrane koju bi mogli da pojedu tokom čitavog ispitivanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima zabeleženim pri ispitivanju uticaja proteina surutke na osećaj gladi i osećaj sitosti, kako u prvih 30,0 min tako i tokom čitavog procesa ispitivanja.

Na osnovu svega navedenog proizilazi da unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na smanjenje količine hrane koju bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² mogli da pojedu dok kod ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² nije zabeležen značajan uticaj. Rezultati su u skladu sa navodima iz literature⁴²⁸ prema kojima 20,0 g proteina surutke doprinosi smanjenju količine hrane koju bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² mogli da pojedu u prvih 30,0 min nakon konzumacije. Slični rezultati zabeleženi su i u istraživanju Zafar i sar.⁴²⁹ (2013) u kome je prikazano da unos 25,0 g proteina surutke značajno utiče na smanjenje apetita. Pozitivan uticaj proteina surutke na povećanje osećaja sitosti zabeležen je u mnogim istraživanjima^{430,431,330,432}, a može se objasniti time da brzo varenje proteina surutke dovodi do naglog povećanja koncentracije aminokiselina u plazmi a samim tim i koncentracije aminokiselina u mozgu^{431,433}, što zatim dovodi do oslobađanja nekoliko hormona sitosti^{434,435,436,437}, a time i suzbijanja osećaja gladi.

Na Slici 45 prikazana je senzorna ocena napitka koji sadrži proteine surutke od strane osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m².



Slika 45. Senzorna ocena napitka koji sadrži proteine surutke od strane osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²

Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 45 može se uočiti da kod ispitanika ne postoje statistički značajne razlike u percepciji ukusa, mirisa i jestivosti napitka. Sa druge strane u okviru grupe ispitanika sa BMI < 30,0 kg/m², postoji statistički značajna razlika u percepciji ukusa u odnosu na miris i jestivost. Ocena dobijena za ukus napitka je bila statistički značajno ($p < 0,05$) veća od ocena dobijenih za miris i jestivost. U okviru grupe ispitanika sa BMI > 30,0 kg/m² razlike u percepciji ukusa, mirisa i jestivosti nisu bile statistički značajne. Iz navedenih rezultata moglo bi se zaključiti da su ukusom ispitivanog napitka u najvećoj meri zadovoljni ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² što u velikoj meri olakšava njegovu primenu.

4.9.1. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na suzbijanje osećaja gladi, povećanje osećaja sitosti kod ispitanika sa

BMI < 30,0 kg/m² kao i na smanjenje količine hrane koju bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² mogli da pojedu. Ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² su zadovoljni ukusom ispitivanog napitka, što značajno olakšava njegovu primenu.

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitana mogućnost primene različitih sojeva u proizvodnji funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke. Predstavljeno je nekoliko unapređenih formulacija napitaka, koji su zatim ispitani po pitanju sastava i deklarirani u skladu sa važećim Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica. Za proizvedeni napitak, koji predstavlja najbolju formulaciju, dizajnirano je originalno pakovanje. U okviru rada je takođe sprovedena pilot studija o uticaju proteina surutke na apetit/sitost na osnovu koje je su izneti zaključci o ulozi ovih proteina u ishrani konzumenata. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji:

♦ **Pri ispitivanju mogućnosti proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke primenom različitih sojeva bakterija mlečne kiseline izvedeni su sledeći zaključci:**

- * Svi sojevi bakterija mlečne kiseline (ukupno 15) testirani u ovom radu mogu biti primenjeni u procesu proizvodnje funkcionalnog fermentisanog napitaka na bazi surutke koji kao osnovni šećer sadrži laktozu.
- * Najveći potencijal za primenu u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke po pitanju sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida kao funkcionalnih nutrijenata, od svih testiranih sojeva ispoljio je soj *L. rhamnosus* ATCC 7469.
- * Soj *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 nije sposoban da preživi prisustvo većine testiranih sojeva, tako da se pri formulaciji mešanih kultura ne može koristiti u kombinaciji sa ostalim sojevima.
- * Soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava antimikrobnu aktivnost prema sojevima *L. delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL B-4525 i *L. helveticus* ATCC 15009, tako da se ovi sojevi ne mogu koristiti za formulaciju mešanih kultura koje u sebi sadrže soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 .
- * Sojevi *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 i *L. johnsonii* NRRL B-2178 predstavljaju najbolje kandidate za korišćenje u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke, pri čemu soj *L. johnsonii* NRRL B-2178 ispoljava najbolje proizvodne karakteristike. Primenom 2,0% inokuluma ovog soja, nakon 10,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve

materije, na temperaturi 37,0 °C, proizvodi se napitak čija titracijska kiselost iznosi 9,2 °SH, a broj živih ćelija oko 6,80 log (CFU/mL).

* Nakon optimizacije procesa proizvodnje napitka na bazi surutke sojem *L. johnsonii* NRRL B-2178, primenom 8,42% inokuluma, nakon 4,0 h fermentacije surutke sa 8,0% suve materije, na temperaturi 39,0 °C u prisustvu 1,0% inulina i 3,0% ekstrakta kvasca, proizvodi se napitak čija titracijska kiselost iznosi 22,6 °SH a broj živih ćelija oko 8,70 log (CFU/mL).

◆ **Pri ispitivanju mogućnosti proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke primenom komercijalne ABY-6 kulture izvedeni su sledeći zaključci:**

* Pri fermentaciji surutke primenom komercijalne ABY-6 kulture uz dodatak 30,0% mleka, proizvodi se napitak (N2) zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,40, titracijska kiselost 23,2 °SH, sinerezis 67,5%, viskozitet 2,7023 cP antioksidativna aktivnost 46,0%, ukupan broj živih ćelija 8,65 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,52 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

* Pri fermentaciji surutke primenom mešane ABY-6 : *L. rhamnosus* kulture uz dodatak 30,0% mleka, proizvodi se napitak (R2) zadovoljavajućih vrednosti parametara kvaliteta i to: pH vrednost 4,34, titracijska kiselost 24,2 °SH, sinerezis 50,6%, viskozitet 2,6984 cP, antioksidativna aktivnost 49,2%, ukupan broj živih ćelija 8,85 log (CFU/mL), senzorna ocena 8,20 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

* Postavljanjem senzorne ocene kao ključnog parametra za plasiranje proizvoda, može se zaključiti da se napitak optimalnog kvaliteta dobija fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture (N2). Tokom proizvodnje ovog napitka procenat razgradnje β -laktoglobulina iznosi 21,93%, dok procenat razgradnje dominantnih frakcija kazeina (αS_2 i αS_1) iznosi 25,18% čime se dobija napitak smanjenog alergijskog potencijala.

* Napitak dobijen fermentacijom surutke i 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture može na ambalaži imati:

- Nutritivnu izjavu: "*Bogat proteinima*"

- Nutritivnu izjavu : "*Prirodan izvor kalcijuma*"

- Zdravstvenu izjavu: "*Proteini doprinose normalnom održavanju kostiju*"
- Zdravstvenu izjavu "*Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju*"
- Zdravstvenu izjavu: "*Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze*"
- Izjavu: "*Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života*"

* Dodatkom stabilizatora vrednosti parametara kvaliteta napitka proizvedenog fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture (N2) mogu se značajno unaprediti. Dodatkom 0,2% pektina, 0,7% želatina i 2,0% koncentrata proteina surutke proizvodi se napitak odličnih senzornih karakteristika sa vrednošću sinerezisa od 1,5% i vrednošću viskoziteta od 158,9 cP.

* Dodatkom soka od jabuke vrednosti parametara kvaliteta napitka proizvedenog fermentacijom surutke uz dodatak 30,0% mleka primenom komercijalne ABY-6 kulture (N2) mogu se značajno unaprediti. Dodatkom 30,0% soka od jabuke proizvodi se napitak (V2) čije su vrednosti parametara kvaliteta pH vrednost 4,62, titracijska kiselost 18,8 °SH, sinerezis 64,7%, viskozitet 2,7922 cP, antioksidativna aktivnost 91,3%, ukupan broj živih ćelija 8,93 log (CFU/mL), senzorna ocena 9,01 koji je stabilan tokom 28 dana čuvanja.

* Dodatak soka od jabuke, osim što u velikoj meri doprinosi unapređenju senzornih karakteristika, utiče i na smanjenje količine masti u napitku sa 0,88 na 0,5 g, što dodatno unapređuje kvalitet napitka i omogućava jednostavnije pridobijanje potrošača.

* Napitak dobijen fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom komercijalne ABY-6 kulture može na ambalaži imati:

- Nutritivnu izjavu: "*Light*" ili "*Smanjen sadržaj masti*"
- Nutritivnu izjavu: "*Prirodan izvor kalcijuma*"
- Zdravstvenu izjavu "*Kalcijum je potreban za održavanje normalnih kostiju*"
- Zdravstvenu izjavu: "*Žive kulture u jogurtu ili fermentisanom mleku poboljšavaju probavu laktoze kod osoba koje imaju problem sa probavom laktoze*"
- Izjavu: "*Proizvod treba koristiti kao deo uravnotežene ishrane i zdravog načina života*"

- ◆ **Na osnovu rezultata pilot studije o uticaju proteina surutke na apetit/sitost izvedeni su sledeći zaključci:**
 - * Unos 25,0 g proteina surutke u značajnoj meri utiče na suzbijanje osećaja gladi, povećanje osećaja sitosti i smanjenje količine hrane koju bi ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² mogli da pojedu.
 - * Ispitanici sa BMI < 30,0 kg/m² su zadovoljni ukusom ispitivanog napitka što značajno olakšava njegovu primenu.

Na osnovu pregleda dosada objavljenih eksperimentalnih podataka u literaturi i rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije ostvaren je značajan doprinos u pogledu iskorišćavanja i prerade surutke primenom procesa proizvodnje funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke. U okviru ove disertacije soj *L. johnsonii* i komercijalna ABY-6 kultura su prvi put uspešno primenjeni u procesu proizvodnje napitaka na bazi surutke uz potpuno definisanje optimalnih parametara procesa. Proizvedeni napitak je nutritivno okarakterisan i deklarisan u skladu sa važećim Pravilnikom o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica. Finalni rezultat disertacije je napitak u originalno dizajniranom pakovanju, koji je kao takav spreman za plasman na tržište. Rezultati i zaključci izneti u ovoj disertaciji predstavljaju bazu za dalji razvoj funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke.

Spisak tabela

Tabela 1. Prosečan hemijski sastav slatke i kisele surutke (g/L).....	19
Tabela 2. Udeo aminokiselina u slatkoj i kiseloj surutki (mg/L)	20
Tabela 3. Test bakterije korišćene za ispitivanje antimikrobne aktivnosti primenjenih bakterija	85
Tabela 4. Kriterijumi za procenu osetljivosti mikroorganizama na različite antibiotike	86
Tabela 5. Recepture za pripremu rastvora za pravljenje gelova.....	87
Tabela 6. Recepture za pripremu rastvora za pravljenje pufera.....	87
Tabela 7. Recepture za pripremu rastvora za fiksiranje, bojenje i ispiranje	87
Tabela 8. Recepture za pripremu gelova	88
Tabela 9. Sposobnost rasta bakterija mlečne kiseline (BMK) na različitim izvorima ugljenika	92
Tabela 10. Sposobnost proizvodnje egzopolisaharida kod bakterija mlečne kiseline (BMK) gajenih na različitim izvorima ugljenika	94
Tabela 11. Antimikrobno dejstvo različitih sojeva ispitivanih bakterija na test bakterije.....	96
Tabela 12. Produktivnost testiranih bakterijskih sojeva nakon 24,0 h fermentacije surutke	98
Tabela 13. Box-Behnken-ov plan eksperimenta sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema	104
Tabela 14. Koeficijenti regresione jednačine i njihova značajnost za broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> NRLL B-2178.....	105
Tabela 15. Određivanje značajnosti modela analizom varijanse Box-Behnken-ovog modela primenjenog za predviđanje broja živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke....	106
Tabela 16. Frakcionalni faktorijalni $2^{(6-3)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema.....	112
Tabela 17. Frakcionalni faktorijalni $2^{(5-2)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema.....	115
Tabela 18. Frakcionalni faktorijalni $2^{(7-4)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema.....	118
Tabela 19. Frakcionalni faktorijalni $2^{(7-4)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema.....	120

Tabela 20. Frakcionalni faktorijalni $2^{(4-1)}$ plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema.....	123
Tabela 21. Koeficijenti regresione jednačine i značajnost njihovog uticaja u $2^{(4-1)}$ frakcionalnom faktorijalnom modelu primenjenom za predviđanje broja živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke.....	124
Tabela 22. Box-Behnken-ov plan eksperimenta sa variranim vrednostima parametara i brojem živih ćelija <i>L. johnsonii</i> kao odzivom sistema	126
Tabela 23. Koeficijenti regresione jednačine i značajnost njihovog uticaja u Box-Behnken-ovom modelu primenjenom za predviđanje broja živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke.....	128
Tabela 24. Određivanje značajnosti modela analizom varijanse Box-Behnken-ovog modela primenjenog za predviđanje broja živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke....	129
Tabela 25. Uticaj dodate količine fermentisane surutke na promenu pH vrednosti bujona primenjenih u ispitivanju probiotskih svojstava ispitivanih sojeva	151
Tabela 26. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom surutke pomoću komercijalne ABY-6 kulture	152
Tabela 27. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke i mleka pomoću komercijalne ABY-6 kulture	153
Tabela 28. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom surutke pomoću mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture	173
Tabela 29. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke i mleka pomoću mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture	174
Tabela 30. Prečnici zona inhibicije i osetljivost testiranih kultura na prisustvo različitih antibiotika.....	181
Tabela 31. Puni (2^3) faktorijalni plan eksperimenata sa variranim vrednostima parametara i vrednostima sinerezisa, viskoziteta i senzornih ocena kao odziva sistema.....	184
Tabela 32. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke, mleka i soka od šargarepe pomoću ABY-6 kulture.....	189

Tabela 33. Promena parametara kvaliteta tokom procesa proizvodnje i čuvanja napitka proizvedenog fermentacijom mešavine surutke, mleka i soka od jabuke pomoću ABY-6 kulture	189
Tabela 34. Sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka primenom ABY-6 kulture	192
Tabela 35. Sastav napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture	192
Tabela 36. Nutritivna tablica napitka dobijenog fermentacijom surutke i 30,0% mleka primenom ABY-6 kulture	193
Tabela 37. Nutritivna tablica napitka dobijenog fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture	195

Spisak slika

Slika 1. Šema industrijskog procesa prerade mleka	17
Slika 2. Razvoj procesa proizvodnje i iskorišćavanja surutke	25
Slika 3. Zastupljenost proizvoda na tržištu mlečnih proizvoda u Srbiji.....	26
Slika 4. Šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke	40
Slika 5. Tehnološka šema procesa proizvodnje fermentisanog napitka na bazi surutke	41
Slika 6. Vreme fermentacije (h) i broj živih ćelija (log (CFU/mL)) postignuti tokom procesa fermentacije surutke preliminarno selektovanim sojevima (1 - <i>L. gasseri</i> NRRL B-14168; 3 - <i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 27139; 5 - <i>L. helveticus</i> ATCC 15009; 10 - <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469; 12 - <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356; 14 - <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL B-4525; 15 - <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178)	99
Slika 7. Ocena senzornih karakteristika i titracijska kiselost (°SH) napitaka proizvedenih fermentacijom surutke selektovanim sojevima (3 - <i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i> ATCC 27139; 5 - <i>L. helveticus</i> ATCC 15009; 15 - <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178).....	101
Slika 8. Uticaj koncentracije inokuluma i temperature na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti sadržaja suve materije (7,0%)	107
Slika 9. Uticaj sadržaja suve materije i temperature na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti koncentracije inokuluma (5,5%)	108
Slika 10. Uticaj sadržaja suve materije i koncentracije inokuluma na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178 pri konstantnoj vrednosti temperature (39,0 °C).....	109
Slika 11. Uticaj koncentracije inokuluma i temperature na broj ćelija <i>L. johnsonii</i> NRRL B-2178 nakon 9,0 h fermentacije surutke sa sadržajem suve materije 8,0%	110
Slika 12. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora ugljenika na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 8,0 h fermentacije surutke.....	113
Slika 13. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora azota na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 8,0 h fermentacije surutke.....	116
Slika 14. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora minerala na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 8,0 h fermentacije surutke.....	119

Slika 15. Pareto dijagram sa uticajima različitih izvora vitamina na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> nakon 8,0 h fermentacije surutke.....	121
Slika 16. Uticaj koncentracije ekstrakta kvasca i temperature na broj živih ćelija <i>L. johnsonii</i> pri konstantnoj koncentraciji inulina (1,0%).	130
Slika 17. Uticaj koncentracije inokuluma na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture.....	133
Slika 18. Uticaj sadržaja mleka na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke.....	135
Slika 19. Uticaj temperature fermentacije na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke	136
Slika 20. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na ukupan broj živih ćelija ABY-6 kulture nakon 4,0 h fermentacije surutke	139
Slika 21. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na sadržaj aminokiselina u napitku dobijenom nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture.....	141
Slika 22. Uticaja sadržaja mleka na viskozitet napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture.....	143
Slika 23. Uticaja sadržaja mleka na sinerezis napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture.....	144
Slika 24. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 kulture	145
Slika 25. Probiotska svojstva soja <i>S. thermophilus</i> poreklom iz ABY kulture nakon njene primene u fermentaciji surutke	147
Slika 26. Probiotska svojstva mešane kulture sojeva <i>L. acidophilus</i> i <i>B. bifidum</i> poreklom iz ABY kulture nakon njene primene u fermentaciji surutke	149
Slika 27. Uticaj sastava inokuluma na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture.....	156
Slika 28. Uticaj sadržaja mleka na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke.....	157
Slika 29. Uticaj temperature fermentacije na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke	159
Slika 30. Uticaj dodatka inulina i ekstrakta kvasca na ukupan broj živih ćelija mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> nakon 4,0 h fermentacije surutke	161

Slika 31. Uticaj temperature fermentacije i sadržaja mleka na sadržaj aminokiselina u napitku dobijenom nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture.....	163
Slika 32. Uticaj sadržaja mleka na viskozitet napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture.....	165
Slika 33. Uticaj sadržaja mleka na sinerezis napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom ABY-6 mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture.....	166
Slika 34. Uticaj sadržaja mleka na antioksidativnu aktivnost i redukcionu snagu napitka dobijenog nakon 4,0 h fermentacije surutke primenom mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> kulture	168
Slika 35. Probiotska svojstava kombinacije sojeva <i>S. thermophilus</i> i <i>L. rhamnosus</i> nakon njihove primene u fermentaciji surutke	169
Slika 36. Probiotska svojstava kombinacije sojeva <i>S. thermophilus</i> i <i>L. rhamnosus</i> nakon njihove primene u fermentaciji surutke	171
Slika 37. Promena sastava proteinskih frakcija prisutnih u napicima na bazi surutke proizvedenim primenom ABY-6 kulture(N1 i N2) i mešane ABY-6 : <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 kulture (R1 i R2).....	177
Slika 38. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na sinerezis napitka na bazi surutke	185
Slika 39. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na viskozitet napitka na bazi surutke	186
Slika 40. Pareto dijagram sa uticajima stabilizatora na senzornu ocenu napitka na bazi surutke	187
Slika 41. Finalni izgled napitka proizvedenog fermentacijom surutke, 30,0% mleka i 30,0% soka od jabuke primenom ABY-6 kulture	196
Slika 42. Uticaj proteina surutke na osećaj gladi kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m ² i BMI > 30,0 kg/m ²	199
Slika 43. Uticaj proteina surutke na osećaj sitosti kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m ² i BMI > 30,0 kg/m ²	200
Slika 44. Uticaj proteina surutke na količinu hrane koja bi ispitanik mogao da pojede kod osoba sa BMI < 30,0 kg/m ² i BMI > 30,0 kg/m ²	202

Slika 45. Senzorna ocena napitka koji sadrži proteine surutke od strane osoba sa BMI < 30,0 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m²204

6. LITERATURA

- ¹ Bulatović M.Lj., Rakin M.B., Mojović Lj.V., Nikolić S.B., Vukašinović-Sekulić M.S., Đukić - Vuković A.J. (2012). Surutka kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih napitaka, *Hemijska industrija*, 66, 567–579.
- ² Stanzer D., Stehlik-Tomas V., Gulan-Zetić V., Manenica J. (2002). Sirutka - alternativna sirovina za proizvodnju prehrambenog kvasca, *Mljekarstvo*, 52, 113–124.
- ³ Affersholt T. (2007). Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives, In IDF Symposium "Lactose & Its Derivates", Moscow, Russia.
- ⁴ OECD-FAO agricultural outlook 2010-2019, (2010), highlights, pp. 83, https://www.fao.org.br/download/OECDFAO_AgriculturalOutlook20102019.pdf (pristupljeno 27.04.2015)
- ⁵ Marić D., Vodotokovi bez pivarskog kvasca i surutke, <http://www.iofh.bg.ac.rs/wp-content/uploads/2014/08/SciTech-Bezotpadne-tehnologije-IV-2004.pdf> (pristupljeno 20.04.2015).
- ⁶ Klasnja M.T., Sciban M.B. (2000). Osnovi procesa anaerobnog prečišćavanja otpadnih voda prehrambene industrije i industrije pića, *Acta Periodica Technologica*, 31, 1–748.
- ⁷ Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 209–224.
- ⁸ Jeličić I., Božanić R., Tratnik IJ. (2008). Napitci na bazi sirutke - nova generacija mliječnih proizvoda, *Mljekarstvo*, 58, 257–274.
- ⁹ Ashwell M. (2002). Concept of functional foods, ILSI - International Life Sciences Institute Europe, B - 1200 Brussels, Belgium.
- ¹⁰ Brannon C.A. (2009). Functional Foods Part 2, Fermented Foods and Macronutrients, 3rd edition, Nutrition Dimension Inc., Talent, OR 97540.

- ¹¹ Challem J., Berkson B., Smith M. (2000). Syndrome X: The complete nutritional program to prevent and reverse insulin resistance, John Wiley & Sons.
- ¹² Hardy G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning, *Nutrition*, 16, 688–697.
- ¹³ Kwak N.S., Jukes D.J. (2001). Functional foods Part 1: The development of a regulatory concept, *Food Control*, 12, 99–107.
- ¹⁴ Stanton C., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Van Sinderen D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198–203.
- ¹⁵ Burdock G.A., Carabin I.G., Griffiths J.C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries, *Toxicology*, 221, 17–27.
- ¹⁶ Menrad K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe, *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188.
- ¹⁷ Roberfroid M.B. (2000). An European consensus of scientific concepts of functional foods, *Nutrition*, 16, 689–691.
- ¹⁸ Mark-Herbert C. (2004). Innovation of a new product category - functional foods, *Technovation*, 24, 713–719.
- ¹⁹ Niva M. (2007). All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health - oriented Finns, *Appetite*, 48, 384–393.
- ²⁰ Roberfroid M.B. (2000). Defining functional foods. In: *Functional foods concept to product*, pp. 9-28, Woodhead Publishing, Cambridge, U.K
- ²¹ Diploc A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern F.B., Roberfroid M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document, *British Journal of Nutrition*, 81, S1–S28.
- ²² Balenović J., Bačić M. (2002). Pregled zakonodavstva za područje dodataka prehrani u EU i nekim europskim zemljama, *Farmaceutski glasnik*, 58, 59-69.

- ²³ Spence J.T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4–S6.
- ²⁴ Juvan S., Bartol T., Boh B. (2005). Data structuring and classification in newly - emerging scientific fields, *Online Information Review*, 29, 483–498.
- ²⁵ Leatherhead Food International (2006). Health - related and functional foods show year - on - year growth, *Food News* 40, 2.
- ²⁶ Saarela M. (2007). *Functional dairy products*, vol 2, Woodhead publishing limited, Abington Hall, Abington, Cembriidge, England.
- ²⁷ Pouliot Y., Gauthier S.F. (2006). Milk growth factors as health products: Some technological aspects, *International Dairy Journal*, 16, 1415–1420.
- ²⁸ Abdel-Salam A.M. (2010). Functional foods: Hopefulness to good health, *American Journal of Food Technology*, 5, 86–99.
- ²⁹ Schanbacher F.L., Talhouk R.S., Murray F.A., Gherman L.I., Willett L.B. (1998). Milk - borne bioactive peptides, *International Dairy Journal*, 8, 393–403.
- ³⁰ Korhonen H., Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality, *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- ³¹ Peter S., Rattray W., Jelen P. (1996). Heat stability and sensory quality of protein - standardized 2% fat milk, *Milchwissenschaft*, 51, 611–615.
- ³² Barth R. (2001). From the original idea of a product to the introduction into the market and finally to the creation of a real brand name, In: *The importance of whey and whey components in food and nutrition*, Proceedings of the 3rd International Whey Conference, pp 147–156., Munich, Hamburg, Germany
- ³³ Jelen P., Paquin P. (2009). Whey-based functional beverages, In: *Functional and speciality beverage technology*, pp. 259-296, New York: CRC Press.
- ³⁴ Wright S. (2007). A protein punch, *Beverage World*, 126–135.

- ³⁵ Dragalić I., Tratnik Lj., Božanić R. (2005). Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey, *Lait*, 85, 171–179.
- ³⁶ Maity T.K., Kumar R., Misra A.K. (2008). Development of healthy whey drink with *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp *shermanii*, *Mljekarstvo*, 58, 315–325.
- ³⁷ Pavunc A. L., Turk J., Kos B., Beganović J., Frece J., Mahnet S., Kirin S., Šušković J. (2009). Production of fermented probiotic beverage from milk permeate enriched with whey retentate and identification of present lactic acid bacteria, *Mljekarstvo*, 59, 11–19.
- ³⁸ Hernandez-Mendoza A., Robles V.J., Angulo J.O., de la Cruz J., Garcia H.S. (2007). Preparation of a whey - based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*, *Food Technology and Biotechnology*, 45, 27–31.
- ³⁹ Almeida K.E., Tamime A.Y., Oliveria M.N. (2008). Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey, *LWT - Food Science and Technology*, 41, 311–316.
- ⁴⁰ Matijević B., Lisak K., Božanić R., Tratnik Lj. (2008). Utjecaj različitih početnih koncentracija probiotičkih bakterija na fermentaciju slatke sirutke, *Mljekarstvo* 58, 387–401.
- ⁴¹ Lilly D.M., Stillwell R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147, 747–748.
- ⁴² Parker R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Animal Nutrition Health*, 29, 4–8.
- ⁴³ Crawford J.S. (1979). "Probiotics" in animal nutrition, *Proceedings of Arkansas Nutrition Conference*, pp. 45–55, Arkansas, USA.
- ⁴⁴ Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- ⁴⁵ Bootwalla S.M, Miles R.D. (1991). Animal production. In: *Direct-fed Microbials in Animal Production*, National Food Ingredient Association, pp. 117–132, Iowa, USA.

- ⁴⁶ FAO/WHO (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; pp. 1–34, Córdoba, Argentina.
- ⁴⁷ Guillot J.F. (1998). Les probiotiques en alimentation animale, Cahiers Agricultures, 7, 49–54.
- ⁴⁸ Marteau P. (2001). Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health, Clinical Nutrition, 20, 41–45.
- ⁴⁹ Gorbach S.L. (2002). Probiotics in the third millenium, Digestive and Liver Disease, 34, S2–S7.
- ⁵⁰ Vasiljević T., Shah N.P. (2008). Probiotics - from Metchnikoff to bioactives, International Dairy Journal, 18, 714–728.
- ⁵¹ Penner R., Fedorak R.N., Madsen K L. (2005). Probiotics and nutraceuticals: No - medicinal treatments of gastrointestinal diseases, Current Opinion in Pharmacology, 5, 596–603.
- ⁵² Havenaar R., Huis J.H. (1992). Probiotics: a general view. In: The lactic acid bacteria Volume 1, pp. 151–170, Springer US.
- ⁵³ Lee Y.K., Salminen S. (1995). The coming age of probiotics, Trends in Food Science and Technology, 6, 241–245.
- ⁵⁴ Tannock G.W. (1995). Role of probiotics, In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology, pp. 257–271, CRC Press, Boca Raton, Florida
- ⁵⁵ Kullen M.J., Amann M.A., Shaughnessy M.J., O Sullivan D.J., Busta F.F., Brady L.J. (1997). Diferentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans, Journal of Nutrition, 127, 89–94.
- ⁵⁶ Angus F., Smart S., Shortt C. (2005). Prebiotic ingredients with emphasis on galacto - oligosaccharides and fructo – oligosaccharides. Probiotic Dairy Products. Blackwell publishing, Marcel Dekker, Oxford, 120–137.

- ⁵⁷ Collins D.M., Gibson G.R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1052S–1057S.
- ⁵⁸ Oliveira R.P. De S., Perego P., Converti A., De Oliveira M.N. (2009). Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co - culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin, *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1015–1021.
- ⁵⁹ Crittenden R.G., Playne M.J. (1996). Production, properties and applications of food - grade oligosaccharides, *Trends in Food Science and Technology*, 7, 353–361.
- ⁶⁰ Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- ⁶¹ Fuller R., Gibson G.R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics, *Gastroenterology*, 32, 28–31.
- ⁶² Gibson G.R., Beatty E.B., Wang X., Cummings J.H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin, *Gastroenterology*, 108, 975–982.
- ⁶³ Gibson G.R., Willems A., Reading S., Collins M.D. (1996). Fermentation of non - digestible oligosaccharides by human colonic bacteria, *Proceedings of the Nutrition Society*, 55, 899–912.
- ⁶⁴ O'Sullivan M.G. (1996). Metabolism of bifidogenic factors by gut flora - an overview. *IDF Bulletin*, 313, 23-30.
- ⁶⁵ Playne M.J., Crittenden R. (1996). Commercially available oligosaccharides, *IDF Bulletin*, 313, 10-22..
- ⁶⁶ Bouhnik Y., Flourie B., Agay-Abensour L., Pochart P., Gramet G., Durand M., Rambaud C. J. (1997). Administration of transgalacto - oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans, *Journal of Nutrition*, 127, 444–448.

- ⁶⁷ Buddington R.K., Williams C.H., Chen S.C., Witherly S.A. (1996). Dietary supplementation of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects, *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 709–716.
- ⁶⁸ Saxelin M., Korpela R., Mäyrä-Mäkinen A., Mattila-Sandholm T., Saarela M. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. *Functional dairy products*, 1–16.
- ⁶⁹ Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361S–364S.
- ⁷⁰ Furrie E., Macfarlane S., Kennedy A., Cimmings J.H., Walsh S.V., O'Neill D.A., Macfarlane G.T. (2005). Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: A randomised controlled pilot trial, *Gut*, 54, 242–249.
- ⁷¹ Schouten B., van Esch B.C.A.M., Hofman G.A., van Doorn S.A.C.M., Knol J., Nauta A.J., Garssen J., Willemsen L.E.M., Knippels L.M.J. (2009). Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey, *Journal of Nutrition*, 139, 1398–1403.
- ⁷² Rayes N., Hansen S., Seehofer D., Muller A.R., Serke S., Bengmark S., Neuhaus P. (2002). Early enteral supply of fiber and lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery, *Nutrition*, 18, 609–615.
- ⁷³ Kanazawa H., Nagino M., Kamiya S., Komatsu S., Mayumi T., Takagi K., Asahara T., Nomoto K., Tanaka R., Nimura Y. (2005). Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy, *Langenbeck's Archives of Surgery*, 390, 104–113.
- ⁷⁴ Liong M.T., Dunshea F.R., Shah N.P. (2007). Effects of a synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high - and low - fat diets, *British Journal of Nutrition*, 98, 736–744.

- ⁷⁵ Kiessling G.J., Schneider J., Jahreis G. (2002). Long - term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol, *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 843–849.
- ⁷⁶ Bylund G. (1995), *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing Systems A/B, Lund, Sweden.
- ⁷⁷ Varnam, A.H. & Sutherland, J.P. (2001) *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- ⁷⁸ Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., Van Boekel M. (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk, Properties and Processes*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
- ⁷⁹ Tratnik L., Rogelj I. (1998). *Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- ⁸⁰ Beucler J., Drake M., Foegeding E.A. (2005). Design of a beverage from whey permeate, *Journal of Food Science*, 70, 277–285.
- ⁸¹ Jelen P. (2003). Whey Processing, In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Academic Press, Boston, London, p. 2740.
- ⁸² Tratnik Lj. (2003). Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane, *Mljekarstvo*, 53, 325–352.
- ⁸³ Popović-Vranješ A., Vujičić I.F. (1997). *Tehnologija sirutke: monografija*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- ⁸⁴ Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi D.N., Bunko K. (2006). Bioutilisation of whey for lactic acid production, *Food Chemistry*, 105, 1–14.
- ⁸⁵ Mrvčić J., Stehlik-Tomas V., Grba S. (2007). Incorporation of copper ions by yeast *Kluyveromyces marxianus* during cultivation on whey, *Acta Alimentaria*, 36, 519–525.
- ⁸⁶ Stanzer D., Grba S., Stehlik-Tomas V., Mrvčić J. (2004). Utjecaj dodatka melase na kinetiku alkoholne fermentacije sirutke pomoću kvasca *Kluyveromyces marxianus*, *Mljekarstvo*, 54, 27–38.

- ⁸⁷ Ghaley A.E., Kamal M.A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction, *Water Research*, 38, 631–644.
- ⁸⁸ Grba S., Stehlik-Tomas V., Stanzer D., Vahčić N., Škrlin A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 16, 13–16.
- ⁸⁹ Ferrari M.D., Bianco R., Froche C., Loperena M.L. (2001). Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures, *Biotechnology Letters*, 23, 1–4.
- ⁹⁰ Siso M.I.G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey - a review, *Bioresource Technology*, 57, 1–11.
- ⁹¹ Börgardts P., Krischke W., Trösch W., Brunner H. (1998). Integrated bioprocess for the simultaneous production of lactic acid and dairy sewage treatment, *Bioprocess Engineering*, 19, 321–329.
- ⁹² De Boer R. (1991). New application of membrane processes, Special Issue Nr. 9201, International Dairy Federation, pp. 109-117, Brussels.
- ⁹³ Joglekar H.G., Rahman I., Babu S., Kulkarni B.D., Joshi A. (2006). Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid, *Separation and Purification Technology*, 52, 1–17.
- ⁹⁴ Surutka nova ambalaža, Radio televizija Srbije
<http://www.rts.rs/page/stories/sr/story/14/Nauka/27120/Surutka+nova+ambalaža.html>
(20.04.2015).
- ⁹⁵ Obućina B., Bardić D., Marković I. D., Bernardoni P. (2010). Studija "Efekti liberalizacije carina na poljoprivredu Republike Srbije ", konsultantska kuća SEEDEV (South East Europe Development), pp. 104–109.
- ⁹⁶ Jelinić J., Đurović S. (2009). Poljoprivredna politika-sektor mlekarske proizvodnje. Fond za otvoreno društvo, centar za primenjene evropske studije, Beograd, 54-56.

- ⁹⁷ Belec J., Jenness R. (1962). Dephosphorylation of casein by heat treatment, II. In skimmilks, *Journal of Dairy Science*, 45, 20–26.
- ⁹⁸ Larson B.L., Roller G.D. (1995). Heat denaturation of the specific serum proteins in milk, *Journal of Dairy Science*, 38, 351–360.
- ⁹⁹ Kresheck G.C., van Winkle Q., Gould I.A. (1964). Physical changes in milk proteins at elevated temperatures as determined by light scattering: I. Casein fractions, *Journal of Dairy Science*, 47, 117–125.
- ¹⁰⁰ Jambrak A.R., Mason T.J., Lelas V., Herceg Z., Ljubić-Herceg I. (2008). Effect of ultrasound on solubility and foaming properties of whey protein suspensions, *Journal of Food Engineering*, 86, 281–287.
- ¹⁰¹ Gallardo-Escamill F.J., Kelly A.J., Delahunty C.M. (2007). Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids, *International Dairy Journal*, 17, 308–315.
- ¹⁰² American Diabetes Association: www.diabetes.org.
- ¹⁰³ American Dietetic Association: www.eatright.org.
- ¹⁰⁴ Institute of Food Technologists: www.ift.org.
- ¹⁰⁵ International Food Information Council: www.ific.org.
- ¹⁰⁶ Harris, P. (1990) *Food gels*, Elsevier Science Publishers LTD., Essex, UK.
- ¹⁰⁷ Imeson A. (1997). *Thickening and gelling agents for food*. Blackie Academic & Professional, London, UK
- ¹⁰⁸ Phillips G.O., Williams P.A. (2009). *Handbook of hydrocolloids*, Elsevier.
- ¹⁰⁹ Tamime A.Y., Robinson R.K. (1999). *Yoghurt: Science and technology*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- ¹¹⁰ Tuinier R., Ten Grotenhuis E., De Kruif C.G. (2000). The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk, *Food Hydrocolloid*, 14, 1–7.

- ¹¹¹ Laurent M.A., Boulenguer P. (2003). Stabilization mechanism of acid dairy drinks (AMD) induced by pectin, *Food Hydrocolloid*, 17, 445–454.
- ¹¹² Tromp R.H., De Kruif C.G., Van Eijk M., Rolin C. (2004). On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin, *Food Hydrocolloid*, 18, 565–572.
- ¹¹³ Boulenguer P., Laurent M.A. (2003). Comparison of the stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin and soluble soybean polysaccharide (SSP). *Advanced in pectin and pectinase research*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 467–480.
- ¹¹⁴ Amatayakul T., Sherkat F., Shah N. (2006). Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS - producing starter cultures at 9 and 14% total solids, *Food Hydrocolloids*, 20, 314–324.
- ¹¹⁵ Ozen A.E., Kilic M. (2009). Improvement of physical properties of nonfat fermented milk drink by using whey protein concentrate, *Journal of Texture Studies*, 40, 288–299.
- ¹¹⁶ Kumar P., Tyagi S.M., Chauhan G.S., Sharma H.K. (2001). Physicochemical changes during fermentation of banana - whey blended beverages, *Egyptian Journal of Dairy Science*, 29, 53–61.
- ¹¹⁷ Ibrahim M.K.E., El-Abd M.M., Mehriz A.M., Ramadan F.A.M. (1993). Preparation and properties of guava milk beverage, *Egyptian Journal of Dairy Science*, 21, 59–68.
- ¹¹⁸ Kadam R.M, Bhambure C.V., Burte R.G., Joshi S.V. (2009). Process standardization for manufacture of Mango Burfi, In *Souvenir of the National seminar on 'Novel Dairy and Food Products of the Future'*, pp. 177 - 183.
- ¹¹⁹ Ramaswamy H.S., Basak S. (1992). Pectin and raspberry concentrate effects on the rheology of stirred commercial yoghurt, *Journal of Food Science*, 57, 357–360.
- ¹²⁰ Tamime A. Y., Robinson R. (1999). *Yoghurt Science and Technology*. 2nd edn., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, pp. 320 - 340.

- ¹²¹ Desai S.R., Toro V.A., Joshi S.V. (1994). Utilization of different fruits in the manufacture of yoghurt, *Indian Journal of*
- ¹²² Bangert J.G. (1975) US Patent 3,949,098.
- ¹²³ Scibelli G.E. (1980) US Patent 4, 309, 417.
- ¹²⁴ Remer R.K. (1982) US Patent 4, 325, 977.
- ¹²⁵ Dahlen A. (1984) US Patent 4, 478, 855.
- ¹²⁶ Girsh L.S. (2001) US Patent 0022986 A1.
- ¹²⁷ Girsh L.S. (1999) US Patent 5, 912, 040.
- ¹²⁸ Miglioranza L.H.S., Matsuo T., Caballero-Cordoba G.M., Dichi J.B., Syrion E.S., Oliveira I. B.N., Martins M.S., Polezer N.M., Dichi I. (2003). Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Paraná, Brazil, *Nutrition*, 19, 419–421.
- ¹²⁹ Đukić-Vuković A.J., Mojović Lj.V., Pejin D., Vukašinović-Sekulić M., Rakin M., Nikolić S., Pejin J. (2011). Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama, *Hemijaska Industrija*, 65, 103–114.
- ¹³⁰ Robinson R.K. (2002). Yoghurt, Role of Starter Cultures, In *Encyclopedia of Dairy Science*,. pp. 1059-1063, Academic Press, UK.
- ¹³¹ Wigley R.C. (1999). Starter Cultures: Uses in the Food Industry, In *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 2084-2095, Academic Press, UK,
- ¹³² Durso L., Hutkins R., (2003). Starter Cultures, In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp. 5583–5593 Academic Press, UK.
- ¹³³ Hebert E.M., Raya R.R., Tailliez P., Giori G.S. (2000). Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 59, 19.

- ¹³⁴ Hutkins R.W., Ponne C. (1998). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for galactose - lactose antiporter, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 941.
- ¹³⁵ Pearce L., Flint S., (1999). *Streptococcus thermophilus*, In *Encyclopedia of Dairy Science*, pp. 2577 - 2582., Academic Press, UK.
- ¹³⁶ Teixeira, P.C.M., 1999. *Lactobacillus bulgaricus* in *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 1136 - 1144, Academic Press, UK.
- ¹³⁷ Shah, N., (2003). The Product and its Manufacture, in *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, pp. 6252 - 6259, Academic Press, UK.
- ¹³⁸ Zirnstein G., Hutkins R., 1999. *Streptococcus thermophilus*, in *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 2127 - 2133, Academic Press, UK.
- ¹³⁹ Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1–24.
- ¹⁴⁰ Granato D., Branco G.F., Cruz G., Faria J.F., Shah N.P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 455–470.
- ¹⁴¹ Cutting, S.M. (2011). *Bacillus* probiotics, *Food Microbiology*, 28, 214–220.
- ¹⁴² Nagpal R., Kumar A., Kumar M., Behare P.V., Jain S., Yadav H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review, *FEMS Microbiology Letters*, 334, 1–15.
- ¹⁴³ Casarotti S.N., Monteiro D.A., Moretti M.M.S., Penna A.L.B. (2014). Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk, *Food Research International*, 59, 67–75.
- ¹⁴⁴ Parvez S., Malik K.A., Kang A., Kim H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171–1185.

- ¹⁴⁵ Tamime A.Y., Marshall V.M.E. (1997). Microbiology and technology of fermented milks. In *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, pp. 57–152, Springer US.
- ¹⁴⁶ Rettger L.F., Levy M.N., Weinstein L., Weiss J.E. (1935). *Lactobacillus acidophilus and its Therapeutic Application*, pp 1–203, Yale University Press, London.
- ¹⁴⁷ Ozden A. (2008). Other fermented dairy products: bioyogurt - probiotic yogurt. *Guncel Gastroenteroloji*, 12(3), 169 - 181.
- ¹⁴⁸ Ahmed Z., Wang Y., Cheng Q., Imran M. (2010). *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview, *African Journal of Biotechnology*, 9, 2843–2850.
- ¹⁴⁹ Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D., Souza Oliveira R.P.D. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp.: A review, *Biotechnology Advances*, 31, 482–488.
- ¹⁵⁰ Janer C., Peláez C., Requena T. (2004). Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk, *Food Chemistry*, 86, 263–267.
- ¹⁵¹ Elizaguível P., Sánchez G., Salvador A., Fiszman S., Dueñas M.T., López P., Fernández de Palencia P., Aznar R. (2011). Evaluation of yogurt and various beverages as carriers of lactic acid bacteria producing 2 - branched (1,3) - β - D - glucan, *Journal of Dairy Science*, 94, 3271–3278.
- ¹⁵² Ernas M., Karagozlu C. (2003). Probiotic properties of *Lactobacillus casei*, *Journal of Food*, 3, 64–69.
- ¹⁵³ Wu R., Wang W., Yu D., Zhang W., Li Y., Sun Z., Wu J., Meng H., Zhang H. (2009). Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home - made Koumiss in Inner Mongolia of China, *Molecular and Cellular Proteomics*, 8, 2321–2338.

- ¹⁵⁴ Canbulat Z., Ozcan T. (2007). The health impact of using *Lactobacillus rhamnosus* GG in infant formulas and children's dietary supplements, *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 21, 69–79.
- ¹⁵⁵ Mostefaoui A., Hakem A., Yabrir B., Boutaiba S., Badis A. (2014). Screening for exopolysaccharide - producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk, *African Journal of Microbiology Research*, 8, 2208–2214.
- ¹⁵⁶ Tabibloghmany F.S., Ehsandoost E. (2014). An overview of healthy and functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry, *European Journal of Nutrition and Food Safety*, 4, 63–86.
- ¹⁵⁷ Becker A., Niehaus K., Pühler A. (1995). Low - molecular - weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N - terminal domain and a missing C - terminal domain, *Molecular Microbiology*, 16, 191–203.
- ¹⁵⁸ Kenji F., Tala S., Kentaro N., Fiame L., Tadashi N., Kumi Y., Akitsugu S., Hidemasa M., Tadasu U. (2010). Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium, *Carbohydrate Polymers*, 79, 1040–1045.
- ¹⁵⁹ Van Calsteren M.R., Pau-Roblot C., Bégin A., Roy D. (2002). Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW - 9595M and R, *The Biochemical Journal*, 363, 7–17.
- ¹⁶⁰ Canquil N., Villarroel M., Bravo S., Rubilar M., Shene C. (2007). Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria, *Carbohydrate Polymers*, 68, 270–279.
- ¹⁶¹ Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics, *Applied Environmental Microbiology*, 70, 900–912.

- ¹⁶² Amrouche T., Boutin Y., Prioult G., Fliss I. (2006). Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production, *International Dairy Journal*, 16, 70–80.
- ¹⁶³ Roberts C.M., Fett W.F., Osman S.F., Wijey C., O'Connor J.V., Hoover D.G. (1995). Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB - 79, *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 463–468.
- ¹⁶⁴ Patel A.K., Michaud P., Singhania R.R., Socol C.R., Pandey A. (2010). Polysaccharides from probiotics: New developments as food additives, *Food Technology and Biotechnology*, 48, 451–463.
- ¹⁶⁵ Dudman W.F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. In: *Surface carbohydrates*
- ¹⁶⁶ Matijević B., Božanić R., Tratnik Lj. (2009). The influence of lactulose on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La - 5 and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB - 12 in reconstituted sweet whey, *Mljekarstvo*, 59, 20–27.
- ¹⁶⁷ Matijević B., Božanić R., Tratnik Lj. (2010). Rast bakterija ABT - 5 kulture u sirutki obogaćenoj koncentratom proteina sirutke, *Mljekarstvo*, 60, 175–182.
- ¹⁶⁸ Matijević B., Božanić R., Tratnik Lj., Jeličić I. (2008). Utjecaj koncentrata proteina sirutke na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija u sirutki, *Mljekarstvo*, 58, 243–255.
- ¹⁶⁹ Gorski D. (1995). International dairy foods: A culturally different world, *Dairy Foods*, 96, 30–32.
- ¹⁷⁰ Ravula R.R., Shah N.P. (1998). Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts, *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 175–179.
- ¹⁷¹ Buchta K. (1983). Lactic Acid: In *Biotechnology*, pp. 410-417, Verlag Chemie, Weinheim. Germany

- ¹⁷² Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87–107.
- ¹⁷³ Dragalić I., Tratnik Lj., Božanić R. (2005). Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey, *Lait*, 85, 171–179.
- ¹⁷⁴ Pescuma M., Hébert E.M., Mozzi F., Font de Valdez G. (2010). Functional fermented whey - based beverage using lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 141, 73–81.
- ¹⁷⁵ Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiri T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22, 245–264.
- ¹⁷⁶ Brody A.L. (2006). Fermented dairy packaging materials. In: *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, Blackwell Publishing, Oxford, England.
- ¹⁷⁷ Nilsen K.O., Evavold S., Solgaard R.T. (2002). Influence of packaging materials on the keeping quality of fermented milk. In: *Fermented Milk-Proceedings of the IDF Seminar on Aroma and Texture of Fermented Milk*, International Dairy Federation Special Issue 0301, pp. 215–224.
- ¹⁷⁸ Tamime A.Y., Robinson R.K. (1999). Packaging. In: *Yoghurt Science and Technology*, 2nd edition, pp. 90–103, Woodhead Publishing, Cambridge, England.
- ¹⁷⁹ Robertson G.L. (2006). Structure and related properties of plastic polymers. In: *Food Packaging Principles and Practice*, 2nd edition, pp. 9–42, Boca Raton, CRC Press, Florida.
- ¹⁸⁰ Frederiksen C.S., Haugaard V.K., Poll L., Becker E.M. (2003). Light - induced quality changes in plain yoghurt packed in polylactate and polystyren, *European Food Research and Technology*, 217, 61–69.
- ¹⁸¹ Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 12, 173–182.

- ¹⁸² Vasiljević T., Shah N.P. (2008). Cultured milk and yogurt. In: Dairy Processing and Quality Assurance, pp. 219–251, Wiley - Blackwell, Ames, Iowa.
- ¹⁸³ Dave R.I., Shah N.P. (1997). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures, *International Dairy Journal*, 7, 435–443.
- ¹⁸⁴ Talwalkar A., Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current issues in intestinal microbiology*, 5, 1-8.
- ¹⁸⁵ Talwalkar A., Kailasapathy K. (2004). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117–124.
- ¹⁸⁶ Miller C.W., Nguyen M.H., Rooney M. (2003). The control of dissolved oxygen content in probiotic yoghurts by alternative packaging materials, *Packaging Technology and Science* 16, 61–67.
- ¹⁸⁷ Kailasapathy K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *LWT - Food Science and Technology* , 39, 1221–1227.
- ¹⁸⁸ Donkor O.N., Nilmini S.L.I., Stolic P., Vasiljević T., Shah N.P. (2007a). Survival and activity of selected probiotic organisms in set - type yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 17, 657–665.
- ¹⁸⁹ Donkor O.N., Tsangalis D., Shah N.P. (2007b). Viability of probiotic bacteria and concentrations of organic acids in commercial yoghurts during refrigerated storage, *Food Australia*, 59, 121–126.
- ¹⁹⁰ Juhkam K., Elias P., Roasto M., Tamme T. (2007). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt containing inulin or oligofructose during refrigerated storage, *Milchwissenschaft*, 62, 52–54.

- ¹⁹¹ Antunes A.E.C., Cazetto T.F., Bolini H.M.A. (2005). Viability of probiotic micro - organisms during storage, postacidi ; cation and sensory analysis of fat - free yogurts with added whey protein concentrate, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 169–173.
- ¹⁹² Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 12, 173–182.
- ¹⁹³ Miller C.W. (2003). A Study of Packaging Methods to Reduce the Dissolved Oxygen Content in Probiotic Yoghurt, Ph.D.Thesis, Centre for Advanced Food Research, University of Western Sydney, Sydney, Australia.
- ¹⁹⁴ Chadwick R., Henson S., Moseley B., Koenen G., Liakopoulos M., Midden C., Palou A., Rechkemmer G., Schroder D.,vib Wright A. (2010). *Functional Foods*, Springer, Berlin.
- ¹⁹⁵ Burrows R., Nettleton S., Bunton R. (1995). Sociology and health promotion. Health, risk and consumption under late modernism. *The sociology of health promotion*, 1–12.
- ¹⁹⁶ Garde A. (2008). Food advertising and obesity prevention: What role for the European Union, *Journal of Consumer Policy*, 31, 25–44.
- ¹⁹⁷ Nestle M. (2002). *Food politics. How the food industry influences nutrition and health*, University of California Press, Berkeley.
- ¹⁹⁸ Herath D., Cranfield J., Henson S., Sparling D. (2008). Firm, market and regulatory factors influencing innovation and commercialization in Canada’s functional food and nutraceutical sector, *Agribusiness*, 24, 207–230.
- ¹⁹⁹ Thompson A., Moughan P. (2008). Innovation in the foods industry: Functional foods, *Innovation: management, policy and practice*, 10, 61–73.
- ²⁰⁰ Chadwick R., Henson S., Moseley B., Koenen G., Liakopoulos M., Midden C., Palou A., Rechkemmer G., Schroder D., vib Wright A. (2010). *Functional Foods*, Springer, Berlin.
- ²⁰¹ Stojanović Ž., Dragutinović-Mitrović R. (2012). The serbian functional food market: Does regulation make a difference?, *Economic Annals*, 193, 53–69.

²⁰² Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. OJ L 404, 30.12.2006, p. 9–25.

²⁰³ Regulation (EC) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011. OJ L 304, 22.11.2012, p. 18–59.

²⁰⁴ Food Standard Agency, Understanding of Food Labelling Terms Used to Indicate the Absence or Reduction of Lactose, Milk or Dairy, 2010.

²⁰⁵ Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to non-characterised microorganisms pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No. 1924/2006 (2009). EFSA Journal, 7, pp. 1247.

²⁰⁶ Guidance on the implementation of Regulation N° 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods; Conclusions of the Standing Committee on the food chain and animal health, 2007.

²⁰⁷ Council Directive 2000/13/EC of 20 March on the approximation of laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs

²⁰⁸ Pravilniku o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica (Sl. list SCG 4/2004, 12/2004 i 48/2004).

²⁰⁹ Commission Regulation (EU) No 432/2012 of the European Parliament and of the Council of 16 May 2012. OJ L 136, 25.05.2012, p. 1–40.

²¹⁰ EU Register on nutrition and health claims made on food, <http://ec.europa.eu/nuhclaims/> (02.11.2014.)

²¹¹ Uredba Komisije (EZ) br. 983/2009 od 21. listopada 2009. o odobrenju i uskracivanju odobrenja za određene zdravstvene tvrdnje navedene na hrani koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece.

²¹² Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2007a). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview, Biotechnology Journal, 2, 426–434.

- ²¹³ Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. (2007b). Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions, *Biotechnology Journal*, 2, 435–449.
- ²¹⁴ Patel A.M., Dave J.M., Sannabhadri S.S. (1983). Acid production by yoghurt starters and their effect on proteolytic and lactose utilization in buffalo skim milk, *Journal of Food Science and Technology*, 20, 317–319.
- ²¹⁵ Beshkova D.M., Simova E.D., Frengova G.I., Simov Z.I., Adilov E.F. (1998). Production of amino acid by yoghurt bacteria, *Biotechnology Progress*, 14, 963–965.
- ²¹⁶ Pette J.W., Lolkema H. (1950a). Acid production and aroma formation in yoghurt, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 4, 261–273.
- ²¹⁷ Pette J.W., Lolkema H. (1950b). Yoghurt I. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lb. bulgaricus* and *Str. thermophilus*, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 4, 197–208.
- ²¹⁸ Bautista E.S., Dahiya R.S., Speck M.L. (1966). Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk, *Journal of Dairy Research*, 33, 299–307.
- ²¹⁹ Higashio K., Yoshioka Y., Kikuchi T. (1977), Symbiosis in yoghurt cultures. I. Isolation and identification of a growth factor for *Streptococcus thermophilus* produced by *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 51, 203–208.
- ²²⁰ Higashio K., Kikuchi T., Furuichi E. (1978). The symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yoghurt cultures, XX International Dairy Congress, Vol. E, pp. 515 - 516.
- ²²¹ Driessen, F.M., Kingma F., Stadhouders J. (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon - dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 36, 135–44.

- ²²² Srinivas H., Prabha R., Shankar P.A. (1997). Characteristics of cultured milks, yoghurt and probiotic yoghurts prepared from pre - refrigerated milks, *Journal of Food Science and Technology*, 34, 162–164.
- ²²³ Sarkar S., Misra A.K. (1998). Selection of starter cultures for the manufacture of probiotic yoghurt, *Egyptian Journal of Dairy Science*, 26, 295–307.
- ²²⁴ Kneifel W., Jaros D., Erhard F. (1993). Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt-related products fermented with commercially available starter cultures, *International Journal of Food Microbiology*, 18, 179–189.
- ²²⁵ Božanić R., Tratnik L., Marić O. (1998). The influence of goat milk on the viscosity and microbiological quality of yoghurt during storage, *Mljekarstvo*, 48, 63–74.
- ²²⁶ Vinderola C.G., Costa G.A., Regenhardt S., Reinheimer J.A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products and the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 12, 579–589.
- ²²⁷ Gilliland S.E., Reilly S.S., Kim G.B., Kim H.S. (2002). Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yoghurt - like product, *Journal of Food Science*, 67, 3091–3095.
- ²²⁸ Lamoureux L., Roy D., Gauthier S.F. (2002). Production of oligosaccharide in yoghurt containing bifidobacteria and yoghurt culture, *Journal of Dairy Science*, 85, 1058–1069.
- ²²⁹ Garro M.S., de Valdez G.F., Oliver G., de Giori G.S. (1999). Starter culture activity in refrigerated fermented soy milk, *Journal of Food Protection*, 62, 808–810.
- ²³⁰ Sarkar S., Misra A.K. (2001). Characteristics of dietetic yoghurt, *Indian Journal of Dairy and Biosciences*, 12, 76–79.
- ²³¹ Sodini I., Lucas A., Oliveira M.N., Remeuf F., Corrieu G. (2002). Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing, *Journal of Dairy Science*, 85, 2479–2488.

- ²³² Jayamanne V.S., Adams M.R. (2006). Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio - yoghurts, *Letters in Applied Microbiology*, 42, 189–194.
- ²³³ Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljević T., Shah N.P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 16, 1181–1189.
- ²³⁴ Carr J.P., Ibrahim S.A. (2005). Viability of bifidobacteria in commercial yoghurt products in North Carolina, *Milchwissenschaft*, 60, 414–416.
- ²³⁵ Yamamah G.A.N., Mehana N., Salem M., Abou-Zekri M., Khashaba O., El-Fiki E. (2005). The role of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* as probiotics in controlling infantile watery diarrhoea, *Egyptian Medical Journal of the National Research Centre*, 4, 29–34.
- ²³⁶ Guerin-Danan C., Chabanet C., Pedone C., Popot F., Vaissade P., Bouley C., Szyt O., Andrieux C. (1998). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: Influence on intestinal microflora in healthy infants, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 111–117.
- ²³⁷ Vinderola C.G., Bailo N., Reinheimer J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinean yoghurts during refrigerated storage, *Food Research International*, 3, 97–102.
- ²³⁸ Gilliland S.E., Speck M.L. (1977). Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt, *Journal of Dairy Science*, 60, 1394–1398.
- ²³⁹ Christopher M.D., Padmanabha R.V., Venkateswarlu K. (2006b). Effect of whey protein concentrate supplementation on the viability of *Bifidobacterium bifidum* in probiotic yoghurt, *Journal of Food Science and Technology*, 43, 552–554.
- ²⁴⁰ Ibrahim S.A., Carr J.P. (2006). Viability of bifidobacteria in commercial yoghurt products in North Carolina during refrigerated storage, *International Journal of Dairy Technology*, 59, 272–277.

- ²⁴¹ Haddadin M.S.Y., Awaisheh S.S., Robinson R.K. (2004). The production of yoghurt with probiotic bacteria isolated from infants in Jordan, *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 290–293.
- ²⁴² Rogelj I., Miklič-Anderlič A., Bogovič-Matijašić B. (1998). The survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. during the storage of fermented milk, *Mljekarstvo*, 48, 27–36.
- ²⁴³ Dave R.I., Ramaswamy N., Boer R.J. (2002). Changes in fatty acid composition during yoghurt processing and their effects on yoghurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 197–202.
- ²⁴⁴ Lourens-Hattingh A., Viljoen B.C. (2001). Yoghurt as a probiotic carrier food, *International Dairy Journal*, 11, 1–17.
- ²⁴⁵ Supriadi D., Kailasapathy K., Hourigan J.A. (1994, September). Effect of partial replacement of skim milk powder with whey protein concentrate on buffering capacity of yogurt. In *Proceedings of the XXIV international dairy congress*, Melbourne.
- ²⁴⁶ Reddy V.P., Reddy I.S., Christopher M.D. (2005). Influence of whey protein concentrate on the viability of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic yoghurt, *Indian Journal of Dairy Science*, 58, 333–336.
- ²⁴⁷ Martinez-Villaluenga C., Frias J., Gomez R., Vidal-Valverde C. (2006). Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage, *International Dairy Journal*, 16, 768–774.
- ²⁴⁸ Varga L., Szigeti J., Gyenis B. (2006). Influence of chicory inulin on the survival of microbiota of a probiotic fermented milk during refrigerated storage, *Annals of Microbiology*, 56, 139–141.
- ²⁴⁹ Güler-Akin M.B., Akin M.S. (2007). Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio - yoghurt made from goat's milk, *Food Chemistry*, 100, 788–793.

- ²⁵⁰ Costello M. (1993). Probiotic foods, Proceedings of International Food Processing Machinery and Technology Exhibition and Conference, Sydney.
- ²⁵¹ Varnam A.H., Sutherland J.P. (1994). Milk and Milk Products Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, London, pp. 347 - 380.
- ²⁵² Sakai K., Mishima C., Tachiki T., Kumagi H., Tochikura T. (1987). Mortality of bifidobacteria in boiled yoghurt, Journal of Fermented Technology, 65, 215–220.
- ²⁵³ Tanaka T., Hatanaka K. (1992). Application of hydrostatic pressure to yoghurt to prevent its after acidification, Journal Japanese Society for Food Science and Technology, 39, 173–177.
- ²⁵⁴ Marshall V.M. (1992). Inoculated ecosystems in a milk environment, Journal of Applied Bacteriology, 73, 127–135.
- ²⁵⁵ Conway P.L., Gorbach S.L., Goldin B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, Journal of Dairy Science, 70, 1–12.
- ²⁵⁶ Noh D.O., Gilliland S.E. (1993). Influence of bile on cellular integrity and beta - galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*, Journal of Dairy Science, 76, 1253–1259.
- ²⁵⁷ Ibrahim S.A., Bezkorovainy A. (1993). Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt, Journal of the Science of Food and Agriculture, 62, 351–354.
- ²⁵⁸ Lankaputhra W.E.V., Shah N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. in the presence of acid and bile salts, Cultured Dairy Products Journal, 30, 2–7.
- ²⁵⁹ Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J.H.J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile, Journal of Dairy Science, 80, 1031–1037.
- ²⁶⁰ Berada N., Lemeland J., Laroche G., Thouvenot P., Piaia M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit, Journal of Dairy Science, 74, 409–413.

- ²⁶¹ Clark P.A., Cotton L.N., Martin J.H. (1993). Selection of *Bifidobacterium* spp. for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs, *Cultured Dairy Products Journal*, 28, 11–14.
- ²⁶² Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W.H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt - like products, *International Dairy Journal*, 15, 1289–1297.
- ²⁶³ Collado M.C., Moreno Y., Hernandez E., Cobo J.M., Hernandez M. (2005). In vitro viability of *Bifidobacterium* strains isolated from commercial dairy products exposed to human gastrointestinal conditions, *Food Science and Technology International*, 11, 307–314.
- ²⁶⁴ Mater D.D.G., Bretigny L., Firmesse O., Flores M.J., Mogenet A., Bresson J.L., Corthier G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yoghurt, *FEMS Microbiology Letters*, 250, 185–187.
- ²⁶⁵ Elli M., Callegari M.L., Ferrari S., Bessi E., Cattivelli D., Soldi S., Morelli L., Goupil-Feuillerat N., Antoine J.M. (2006). Survival of yogurt bacteria in the human gut, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5113–5117.
- ²⁶⁶ Mättö J., Fondén R., Tolvanen T., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Satokari R., Saarela M. (2006). Intestinal survival and persistence of probiotic lactobacillus and *Bifidobacterium* strains administered in triple - strain yoghurt, *International Dairy Journal*, 16, 1174–1180.
- ²⁶⁷ Ogato T., Kingaku M., Yaeshima T., Teraguchi S., Fukuwatari Y., Ishibashi N., Hayasawa H., Fujisawa T., Iino H. (1999). Effect of *Bifidobacterium longum* BB 536 yoghurt administration on the intestinal environment of healthy adults, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11, 41–46.
- ²⁶⁸ Chen R.M., Wu J.J., Lee S.C., Huang A.H., Wu H.M. (1999). Increase of intestinal bifidobacteria and supress of coliform bacteria with short term yoghurt ingestion, *Journal of Dairy Science*, 82, 2308–2314.

- ²⁶⁹ Yaeshima T., Takahashi S., Matsumoto N., Ishibashi N., Hayasawa H., Iino H. (1997). Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium longum* BB 536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency: A comparison with standard yoghurt, *Bioscience and Microflora*, 16, 73–77.
- ²⁷⁰ Wiest R., Chen F., Cadelina G., Groszmann R.J., Garcia-Tsro G. (2003). Effect of *Lactobacillus* fermented diets on bacterial translocation and intestinal flora in experimental prehepatic portal hypertension, *Digestive Diseases and Sciences*, 48, 1136–1141.
- ²⁷¹ Donabedian H. (2006). Nutritional therapy and infectious diseases: A two - edged sword, *Nutrition Journal*, 5, 21–30.
- ²⁷² Sarkar S., Misra A.K. (2002b). Effect of feeding dietetic yoghurt on the nutritional status and excretory pattern in rats and infants, *Egyptian Journal of Dairy Science*, 30, 63–73.
- ²⁷³ Pochart P., Marteau P., Bouhnik Y., Goderel I., Bourlioux P., Rambaud J.C. (1992). Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: An in vivo study using intestinal perfusion, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 78–80.
- ²⁷⁴ Shah N.P. (2000). Effects of milk - derived bioactives: An overview, *British Journal of Nutrition*, 84, S3–S10.
- ²⁷⁵ Smacchi E., Gobetti M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes, *Food Microbiology*, 17, 129–141.
- ²⁷⁶ Meisel H., FitzGerald R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1289–1295.
- ²⁷⁷ FitzGerald R.J., Meisel H. (1999). Lactokinins: Whey protein - derived ACE inhibitory peptides, *Food /Nahrung*, 43, 165–167).
- ²⁷⁸ Gerdes S.K., Harper W.J., Miller G. (2001). Bioactive components of whey and cardiovascular health. pp. 1-8, US Dairy Export Council, Arlington.

- ²⁷⁹ Pihlanto-Leppala A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., Korhonen. H. (2000). Angiotensin I - converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides, *Journal of Dairy Research*, 67, 53–64.
- ²⁸⁰ Mullally M. M., Meisel H., FitzGerald R. J. (1997). Angiotensin - I - converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins, *International Dairy Journal*, 7, 299–303.
- ²⁸¹ Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I - converting enzyme, *Journal of Dairy Science*, 78, 1253–1257.
- ²⁸² Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion, *Journal of Dairy Science*, 81, 3131–3138.
- ²⁸³ Yamamoto N., Maeno M., Takano T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt - like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4, *Journal of Dairy Science*, 82, 1388–1393.
- ²⁸⁴ Walsh D.J., Bernard H., Murray B. A., MacDonald J., Pentzien A.K., Wright G.A., Wal J.M., Struthers A.D., Meisel H., FitzGerald R.J. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin β - lactoglobulin fragment (142–148), *Journal of Dairy Science*, 87, 3845–3857.
- ²⁸⁵ Pins J.J., Keenan J.M. (2006). Effects of whey peptides on cardiovascular disease risk factors, *The Journal of Clinical Hypertension*, 8, 775–782.
- ²⁸⁶ Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., von Fellenberg R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α - lactalbumin molecule, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439–448.
- ²⁸⁷ Pellegrini A., Dettling C., Thomas U., Hunziker P. (2001). Isolation and characterisation of four bactericidal domains in the bovine α - lactoglobulin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131–140.

- ²⁸⁸ Saint-Sauveur D., Gauthier S. F., Boutin Y., Montoni A., Fliss I. (2009). Effect of feeding whey peptide fractions on the immune response in healthy and *Escherichia coli* infected mice, *International Dairy Journal*, 19, 537–544.
- ²⁸⁹ Biziulevičius G.A., Kislukhina O.V., Kazlauskaitė J., Žukaite V. (2006). Food - protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: A "cause and effect" theory of bifunctionality, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46, 131–138.
- ²⁹⁰ Dziuba J., Minkiewicz P. (1996). Influence of glycosylation on content of both micelle - stabilizing ability and biological properties of the C - terminal fragments of cow's κ - casein, *International Dairy Journal*, 6, 1017–1044.
- ²⁹¹ Brody E.P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide, *British Journal of Nutrition*, 84, 39–46.
- ²⁹² Schüpbach P., Neeser J.R., Golliard M., Rouvet M., Guggenheim B. (1996). Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutant streptococci, *Journal of Dental Research*, 75, 1779–1788.
- ²⁹³ Kawasaki Y., Kawakami H., Tanimoto M., Dosako S., Tomizawa A., Kotake M., Nakajima I. (1993). pH - Dependent molecular weight changes of κ - casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration, *Milchwissenschaft*, 48, 191–196.
- ²⁹⁴ Li E.W., Mine Y. (2004). Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage - like cells U937, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2704–2708.
- ²⁹⁵ Sorensen E.S., Petersen E.T. (1993). Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk, *Journal of Dairy Research*, 60, 189–197
- ²⁹⁶ Bayless K.J., David G.E., Meininger G.A. (1997). Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk, *Protein Expression and Purification*, 9, 309–314.

- ²⁹⁷ Reid I.R., Cornish J., Haggarty N.W., Palmano K.P. (2004). US patent US2004052860
- ²⁹⁸ Kruger M.C., Plimmer G.G., Schollum L.M., Haggarty N., Ram S., Palmano K. (2005). The effect of whey acidic protein fractions on bone loss in the ovariectomised rat, *British Journal of Nutrition*, 94, 244–252.
- ²⁹⁹ Girardet J.M., Linden G., Loye S., Courthaudon J.L., Lorient D. (1993). Study of a mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk proteose peptone component - 3, *Journal of Dairy Science*, 76, 2156–2163.
- ³⁰⁰ Sorensen E.S., Rasmussen L.K., Moller L., Petersen T.E. (1997). The localization and multimeric nature of component PP3 in bovine milk: Purification and characterization of PP3 from caprine and ovine milks, *Journal of Dairy Science*, 80, 3176–3181.
- ³⁰¹ Campagna S., Mathot A.G., Fleury Y., Girardet J.M., Gaillard J.L. (2004). Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23 - residue peptide derived from the sequence of bovine milk component - 3 of proteose peptone, *Journal of Dairy Science*, 87, 1621–1626.
- ³⁰² Yvon M., Beucher S., Guilloteau P., le Huerou-Luron I., Corring T. (1994). Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation, *Reproduction and Nutrition Development*, 34, 527–537.
- ³⁰³ Frederick E.J. (2007). Development and evaluation of a carbonated liquid whey based beverage system. Food science institute, College of agriculture, Kansas, 3.
- ³⁰⁴ Beshkova D., Simova E., Frengova G., Simov Z. (1998). Production of flavor compounds by yogurt starter cultures, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 180–186.
- ³⁰⁵ Imhof R., Glaettli H., Bosset J.O. (1995). Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures, *LWT-Food Science and Technology* 28, 78–86.
- ³⁰⁶ Pette J.W., Lolkema H. (1950). Yogurt, III: Acid production and aroma formation in yogurt, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 4, 261–273.

- ³⁰⁷ Hamdan I.Y., Kunsman J.E.Jr., Deane D.D. (1971). Acetaldehyde production by combined yogurt cultures, *Journal of Dairy Science*, 54, 1080–1082.
- ³⁰⁸ Chaves A.C.S.D., Fernandez M., Lerayer A.L.S., Mierau I., Kleerebezem M., Hugenholtz J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5656–5662.
- ³⁰⁹ Sandine W.E., Daly C., Elliker P.R., Vedamuthu E.R. (1972). Causes and control of culture related flavor defects on cultured dairy products, *Journal of Dairy Science*, 55, 1031–1039.
- ³¹⁰ Lees G.J., Jago G.R. (1976). Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Research*, 43, 75–83.
- ³¹¹ Wilkins D.W., Schmidt R.H., Shireman R.B., Smith K.L., Jezeski J.J. (1986). Evaluating acetaldehyde synthesis from L - [14C (U)] threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of Dairy Science*, 69, 1219–1224.
- ³¹² Zourari A., Accolas J.P., Desmazeaud M.J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review, *Lait*, 72, 1–34.
- ³¹³ Hamdan I.Y., Kunsman J.E.Jr., Deane D.D. (1971). Acetaldehyde production by combined yogurt cultures, *Journal of Dairy Science*, 54, 1080–1082.
- ³¹⁴ Lindsay R.C., Day E.A., Sandine W.E. (1965). Green flavor defect in lactic starter cultures, *Journal of Dairy Science*, 48, 863–869.
- ³¹⁵ GuerraHernández E.J., Estepa R.G., Rivas I.R. (1995). Analysis of diacetyl in yogurt by two new spectrophotometric and fluorometric methods, *Food Chemistry*, 53, 315–319.
- ³¹⁶ Rašić J., Kurmann J. (1978). Flavour and aroma in yoghurt. In: *Yoghurt. Scientific grounds, technology, manufacture and preparations*, pp. 90–8, Tech Dairy Publ House Distributors, Copenhagen, Denmark.
- ³¹⁷ Dutta S.M., Kuila R.K., Ranganathan B. (1973). Effect of different heat treatments of milk on acid and flavour production by five single - strain cultures, *Milchwissenschaft*, 28, 231–233.
- ³¹⁸ Nilsson D. (2008). US patent 7, 465, 575 B2.

- ³¹⁹ Ott A., Fay L.B., Chaintreau A. (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 850–858.
- ³²⁰ Ott A., Hugi A., Baumgartner M., Chaintreau A. (2000). Sensory investigation of yogurt flavour perception: Mutual influence of volatiles and acidity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 441–450.
- ³²¹ Muir D.D, Hunter A. (1992). Sensory evaluation of fermented milks: Vocabulary development and the relations between sensory properties and composition and between acceptability and sensory properties, *Journal of the Society of Dairy Technology*, 45, 73–80.
- ³²² Lucey J.A., Singh H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review, *Food Research International*, 30, 529–542.
- ³²³ Walstra P. (1998). Relation between structure and texture of cultured milk products. In *Texture of fermented milk products and dairy desserts-IDF Symposium*, Vicenza (Italy).
- ³²⁴ Lucey J.A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels, *Journal of Dairy Science*, 85, 281–294.
- ³²⁵ Pal S., Ellis V. (2010). The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals, *Obesity (Silver Spring)*, 18, 1354–1359.
- ³²⁶ Pal S., Ellis V., Dhaliwal S. (2010). Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals, *British Journal of Nutrition*, 104, 716–723.
- ³²⁷ Pal S., Ellis V., Ho S. (2010). Acute effects of whey protein isolate on cardiovascular risk factors in overweight, post - menopausal women, *Atherosclerosis*, 212, 339–344.
- ³²⁸ Mortensen L.S., Hartvigsen M.L., Brader L.J., Astrup A., Schrezenmeir J. (2009). Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat - rich meal in type 2 diabetes: Comparison of whey, casein, gluten, and cod protein, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 41–48.

- ³²⁹ McGregor R.A., Poppitt S.D. (2013). Milk protein for improved metabolic health: A review of the evidence, *Nutrition and Metabolism*, 10, 46.
- ³³⁰ Akhavan T., Luhovyy B.L., Brown P.H., Cho C.E., Anderson G.H. (2010). Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 966–975.
- ³³¹ Hoppe C., Mølgaard C., Dalum C., Vaag A., Michaelsen K.F. (2009). Differential effects of casein versus whey on fasting plasma levels of insulin, IGF - 1 and IGF - 1/IGFBP - 3: Results from a randomized 7 - day supplementation study in prepubertal boys, *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1076–1083.
- ³³² Jakubowicz D., Froy O. (2013). Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1–5.
- ³³³ Cooke M.B., Rybalka E., Stathis C.G., Cribb P.J., Hayes A. (2010). Whey protein isolate attenuates strength decline after eccentrically - induced muscle damage in healthy individuals, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 7, 30.
- ³³⁴ Hulmi J.J., Lockwood C.M., Stout J.R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein, *Nutrition and Metabolism*, 7, 51.
- ³³⁵ Pennings B., Boirie Y., Senden J.M., Gijsen A.P., Kuipers H. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 997–1005.
- ³³⁶ Lollo P.C., Amaya-Farfan J., de Carvalho-Silva L.B. (2011). Physiological and physical effects of different milk protein supplements in elite soccer players, *Journal of Human Kinetics*, 30, 49–57.

- ³³⁷ Tipton K.D., Elliott T.A., Cree M.G., Wolf S.E., Sanford A.P. (2004). Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36, 2073–2081.
- ³³⁸ Tang J.E., Moore D.R., Kujbida G.W., Tarnopolsky M.A., Phillips S.M. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: Effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men, *Journal of Applied Physiology*, 107, 987–992.
- ³³⁹ Marshall K. (2004). Therapeutic applications of whey protein, *Alternative Medicine Review*, 9, 136–156.
- ³⁴⁰ Sekine K., Watanabe E., Nakamura J., Takasuka N., Kim D.J. (1997). Inhibition of azoxymethane - initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats, *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 523–526.
- ³⁴¹ Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K. (1998). Bovine lactoferrin and Lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 443, 285–291.
- ³⁴² Duarte D.C., Nicolau A., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2011). The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines, *Journal of Dairy Science*, 94, 66–76.
- ³⁴³ See D., Mason S., Roshan R. (2002). Increased tumor necrosis factor alpha (TNF - alpha) and natural killer cell (NK) function using an integrative approach in late stage cancers, *Immunological Investigations*, 31, 137–153.
- ³⁴⁴ Watanabe A., Okada K., Shimizu Y., Wakabayashi H., Higuchi K. (2000). Nutritional therapy of chronic hepatitis by whey protein (non - heated), *Journal of Medicine*, 31, 283–302.
- ³⁴⁵ Ikeda M., Sugiyama K., Tanaka T., Tanaka K., Sekihara H. (1998). Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245, 549–553.

- ³⁴⁶ Kawase M., Hashimoto H., Hosoda M., Morita H., Hosono A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure, *Journal of Dairy Science*, 83, 255–263.
- ³⁴⁷ Pal S., Radavelli-Bagatini S. (2013). The effects of whey protein on cardiometabolic risk factors, *Obesity Reviews*, 14, 324–343.
- ³⁴⁸ Korhonen H., Pihlanto A. (2003). Food - derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
- ³⁴⁹ Hartmann R., Meisel H. (2007). Food - derived peptides with biological activity: From research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163–169.
- ³⁵⁰ Kang D.G., Kim Y.C., Sohn E.J., Lee Y.M., Lee A.S. (2003). Hypotensive effect of butein via the inhibition of angiotensin converting enzyme, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1345–1347.
- ³⁵¹ Caroli A., Poli A., Ricotta D., Banfi G., Cocchi D. (2011). Invited review: Dairy intake and bone health: A viewpoint from the state of the art, *Journal of Dairy Science*, 94, 5249–5262.
- ³⁵² Naot D., Grey A., Reid I.R., Cornish J. (2005). Lactoferrin - a novel bone growth factor, *Clinical Medicine and Research*, 3, 93–101.
- ³⁵³ Toba Y., Takada Y., Matsuoka Y., Morita Y., Motouri M. (2001). Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1353–1357.
- ³⁵⁴ Seto H., Toba Y., Takada Y., Kawakami H., Ohba H. (2007). Milk basic protein increases alveolar bone formation in rat experimental periodontitis, *Journal of Periodontal Research*, 42, 85–89.
- ³⁵⁵ Uenishi K., Ishida H., Toba Y., Aoe S., Itabashi A. (2007). Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women, *Osteoporos International*, 18, 385–390.

- ³⁵⁶ O'Dwyer S.T., Smith R.J., Hwang T.L., Wilmore D.W. (1989). Maintenance of small bowel mucosa with glutamine - enriched parenteral nutrition, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 13, 579–585.
- ³⁵⁷ Coker R.H., Miller S., Schutzler S., Deutz N., Wolfe R.R. (2012). Whey protein and essential amino acids promote the reduction of adipose tissue and increased muscle protein synthesis during caloric restriction - induced weight loss in elderly, obese individuals, *Nutrition Journal*, 11, 105.
- ³⁵⁸ Pennings B., Boirie Y., Senden J.M., Gijsen A.P., Kuipers H. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 997–1005.
- ³⁵⁹ AOAC (1990). *Official methods of analysis (15th Edition)*, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1298 pp.
- ³⁶⁰ SRPS EN ISO 15304, *Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Metode gasne hromatografije.*, 2008, 25 str.
- ³⁶¹ Varga L. (2006). Effect of acacia (*Robinia pseudo - acacia L.*) honey on the characteristic microflora on yogurt during refrigerated storage, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 272–275.
- ³⁶² Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
- ³⁶³ Keogh M. K., O'Kennedy B.T. (1998). Rheology of stirred yoghurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids, *Journal of Food Science*, 63, 108–112.
- ³⁶⁴ Aryana K. J., McGrewa P. (2007). Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics, *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1808–1814.
- ³⁶⁵ Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o - phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins, *Journal of Dairy Science*, 66, 1219–1227.

- ³⁶⁶ Balakrishnan G., Agrawal R. (2014). Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*, *Journal of Food Science and Technology*, 51, 4138–4142.
- ³⁶⁷ Oyaizi M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315.
- ³⁶⁸ Hemsworth J., Hekmat S., Reid G. (2011). The development of Micronutrient supplemented probiotic yogurt for people living with HIV: Laboratory testing and sensory evaluation, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 79–84.
- ³⁶⁹ Prasad J., Gill H., Smart J., Gopal P.K. (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic, *International Dairy Journal*, 8, 993–1002.
- ³⁷⁰ Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Sl. glasnik RS, 85/2013 i 101/2013)
- ³⁷¹ van Maris A.J., Konings W.N., van Dijken J.P., Pronk J.T. (2004). Microbial export of lactic acid and 3 - hydroxypropionic acid: Implications for industrial fermentation processes, *Metabolic Engineering*, 6, 245–255.
- ³⁷² Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures, *Food Microbiology*, 25, 429–441.
- ³⁷³ Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and environmental microbiology*, 71, 3060–3067.
- ³⁷⁴ Metchnikoff L.E. (2004). *The prolongation of life: Optimistic studies*, Springer Published Company (reprinted edition 1907); New. York, USA.
- ³⁷⁵ Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12, 163–171.

- ³⁷⁶ Welman A.D., Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges, *Trends in Biotechnology*, 21, 269–274.
- ³⁷⁷ De Vuyst L., Degeest B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS - Microbiology Reviews*, 23, 153–177.
- ³⁷⁸ Antunes A.E.C., Cazetto T.F., Bolini H.M.A. (2005). Viability of probiotic microorganisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat - free yogurts with added whey protein concentrate, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 169–173.
- ³⁷⁹ Roy D., Goulet J., LeDuy A. (1986). Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 206–213.
- ³⁸⁰ Cox G.C., MacBean R.D. (1977). Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltration, *The Australian Journal of Dairy Technology*, 32, 19–22.
- ³⁸¹ EL-Shafei K., Tawfik N.F., Dabiza N.M.A., Sharaf O.M., Effat B.A. (2010). In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic *Lactobacilli*, *Journal of American Science*, 6, 357–367.
- ³⁸² Demirci A., Pouetto L., Lee B., Hinz P.H. (1998). Media evolution in repeated batch lactic acid fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4771–4774.
- ³⁸³ Amaretti A., Bernardi T., Tamburini E., Zannoni S., Lomma M., Matteuzzi D., Rossi M. (2007). Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3637–3644.
- ³⁸⁴ Almeida K.E., Bonassi I.A., Roça R.O. (2001). Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas frescal, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21, 187–192.

- ³⁸⁵ Thamer K.G., Penna A.L.B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 589–595.
- ³⁸⁶ Fuchs R.H.B., Tanamati A.A.C., Antonioli C.M., Gasparello E.A., Doneda I. (2006). Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose, *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24, 83–98.
- ³⁸⁷ Dave R.I., Shah N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt, *Journal of Dairy Science*, 81, 2804–2816.
- ³⁸⁸ Pescuma M., Hébert E.M., Bru E., Font de Valdez G., Mozzi F. (2012). Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey, *Journal of Dairy Research*, 79, 201–208.
- ³⁸⁹ Mikhlin E.D., Radina V.P. (1981). Activation of lactic acid bacteria, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 17, 253–267.
- ³⁹⁰ Rakin M., Vukasinovic M., Siler-Marinkovic S., Maksimovic M. (2007). Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewers yeast autolysate, *Food Chemistry*, 100, 599–602.
- ³⁹¹ Elli M., Zink R., Reniero R., Morelli L. (1999). Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk, *International Dairy Journal*, 9, 507–513.
- ³⁹² Mortazavian A.M., Ghorbanipour S., Mohammadifa M.A., Mohammadi M. (2011). Biochemical properties and viable probiotic population of yogurt at different bacterial inoculation rates and incubation temperatures, *Philippine Agricultural Scientist*, 94, 155–160
- ³⁹³ Kim S.H., Lim C.H., Lee C., An G. (2009). Optimization of growth and storage conditions for lactic acid bacteria in yogurt and frozen yogurt, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, 76–79.

- ³⁹⁴ Eek-Poei T., Lay-Harn G. (2011). Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk, *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 19, 45–53.
- ³⁹⁵ Parente E., Zottola E.A. (1991). Growth of thermophilic starters in whey permeate media, *Journal of Dairy Science*, 74, 20–28.
- ³⁹⁶ Mortazavian A.M., Ehsani M.R., Mousavi S.M., Sohrabvandi S., Reinheimer J. (2007). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt, *International Journal of Dairy Technology*, 59, 123–127.
- ³⁹⁷ Mortazavian A.M., Ehsani M.R., Azizi A., Razavi S.H., Mousavi S.M., Sohrabvandi S. (2008). Viability of calcium alginate - microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during the refrigerated storage period and under the simulated gastrointestinal conditions, *Australian Journal of Dairy Technology*, 63, 24–29.
- ³⁹⁸ Korbekandi H., Mortazavian A.M., Irvani S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health*, New York: Nova Science Publishers Ltd. p. 131–169.
- ³⁹⁹ Tamime A.Y., Saarela M.A.K.S., Sondergaard A.K., Mistry V.V., Shah N.P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic dairy products*, 39–72.
- ⁴⁰⁰ Shah N.P. (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods, *Journal of Dairy Science*, 83, 894–907
- ⁴⁰¹ Pescuma M., Hebert E.M., Mozzi F., Font de Valdez G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content, *Food Microbiology*, 25, 442–451.
- ⁴⁰² Legarová V., Kouřimská L. (2010). Sensory quality evaluation of whey-based beverages, *Mljekarstvo*, 60, 280–287.

- ⁴⁰³ Guven 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 yogurt manufacture, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 180–184.
- ⁴⁰⁴ Ramchandran L., Shah N.P. (2009). Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin -I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage, *Journal of Dairy Science*, 92, 895–906.
- ⁴⁰⁵ Osuntoki A., Korie I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods, *Food Technology and Biotechnology*, 48, 505–511.
- ⁴⁰⁶ Chiang S.H., Chang C.Y. (2005). Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums, *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 57–63.
- ⁴⁰⁷ Shinmoto H., Dosako S., Nakajima I. (1992). Antioxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induced lipid peroxidation, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 2079–2080.
- ⁴⁰⁸ Lin M.Y., Yen C.L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460–1466.
- ⁴⁰⁹ Yang J.H., Mau J.L., Ko P.T., Huang L.C. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth, *Food Chemistry*, 71, 249–254.
- ⁴¹⁰ Nishino T., Shibahara-Sone H., Kikuchi-Hayakawa H., Ishikawa F. (2000). Transit of radical scavenging activity of milk products prepared by Maillard reaction and *Lactobacillus casei* strain Shirota fermentation through the hamster intestine, *Journal of Dairy Science*, 83, 915–922.
- ⁴¹¹ Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15–S28.

- ⁴¹² El-Shafei K., Tawfik N.F., Dabiza M.A., Sharaf O.M., Effat B.A. (2010). In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli, *Journal of American Science*, 6, 357–367.
- ⁴¹³ Sánchez B., Fernández-García M., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C.G., Ruas-Madiedo P. (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile - adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain, *International Dairy Journal*, 20, 800–805.
- ⁴¹⁴ Genadij-Petrovič M. (2003), *Lekovite sile: Ishrana i hrana*, IGP Prometej, Beograd.
- ⁴¹⁵ Di Cagno R., Quinto M., Corsetti A., Minervini F., Gobbetti M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system, *International Dairy Journal*, 16, 119–130.
- ⁴¹⁶ Mercenier A., Pavan S., Pot B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99–110.
- ⁴¹⁷ Zúñiga R.N., Troncoso E. (2012). Improving nutrition through the design of food matrices. In *tech Open Access Publisher*.
- ⁴¹⁸ Folkenberg D.M., Dejmeek P., Skriver A., Guldager H.S., Ipsen R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures, *International Dairy Journal*, 16, 111–118.
- ⁴¹⁹ Fernández-García E., McGregor J.U. (1997). Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber, *European Food Research and Technology*, 204, 433–437.
- ⁴²⁰ Madhu A.N., Amrutha N., Prapulla S.G. (2012). Characterization and Antioxidant Property of Probiotic and Synbiotic Yogurts, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 90–97.
- ⁴²¹ Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese, *Lait*, 85, 193–204.
- ⁴²² Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes, *Trends in Microbiology*, 12, 412–416.

- ⁴²³ Mathur S., Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review, *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281–295.
- ⁴²⁴ Snyderman D.R. (2008). The Safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 46, S104–S111.
- ⁴²⁵ Hibberd P.L., Davidson L.E. (2008). Safety of probiotics, *Agro Food Industry Hi Tech*, 19, 30–33.
- ⁴²⁶ Saeedeh E., Motamedzadegan A., Hosseini S.H., Comparative study on effect of pectin, gelatin and modified starch replacement with fish gelatin in textural properties and graininess of Non-fat yogurt.
http://confbank.um.ac.ir/modules/conf_display/conferences/iecfp2013/203_3.pdf
- ⁴²⁷ Flint A., Raben A., Blundell J.E., Astrup A. (2000). Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *International Journal of Obesity* 24, 38-48.
- ⁴²⁸ Poppitt S.D., Proctor J., McGill A.T., Wiessing K.R., Falk S., Xin L., Budgett S.C., Darragh A., Hall R.S. (2011). Low - dose whey protein - enriched water beverages alter satiety in a study of overweight women, *Appetite*, 56, 456–464.
- ⁴²⁹ Zafar T.A., Waslien C., AlRaefaei A., Alrashidi N., AlMahmoud E. (2013). Whey protein sweetened beverages reduce glycemic and appetite responses and food intake in young females, *Nutrition Research*, 33, 303–310.
- ⁴³⁰ Anderson G.H., Luhovyy B., Akhavan T., Panahi S. (2011). Milk proteins in the regulation of body weight, satiety, food intake and glycemia, *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series: Pediatric Program*, 67, 147–159.
- ⁴³¹ Luhovyy B.L., Akhavan T., Anderson G.H. (2007). Whey proteins in the regulation of food intake and satiety, *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 704S–712S.
- ⁴³² Pal S., Ellis V. (2010). The acute effect of four protein meals on insulin, glucose, appetite and energy intake in lean men, *British Journal of Nutrition*, 104, 1241–1248.

- ⁴³³ Anderson G.H., Li E.T. (1987). Protein and amino acids in the regulation of quantitative and qualitative aspects of food intake. *International Journal of Obesity*, 11, 97–108.
- ⁴³⁴ Pupovac J., Anderson G.H. (2002). Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin - A and peripheral opioid receptors in rats, *The Journal of Nutrition*, 132, 2775–2780.
- ⁴³⁵ Trigazis L., Vaccarino F.J., Greenwood C.E., Anderson G.H. (1999). CCK - A receptor antagonists have selective effects on nutrient - induced food intake suppression in rats, *American Journal of Physiology*, 276, R323–R330.
- ⁴³⁶ Aziz A., Anderson G.H. (2003). Exendin - 4, a GLP - 1 receptor agonist, interacts with proteins and their products of digestion to suppress food intake in rats, *The Journal of Nutrition*, 133, 2326–2330.
- ⁴³⁷ Nilsson M., Stenberg M., Frid A.H., Holst J.J., Björck I.M. (2004). Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose - equivalent meals of milk and other food proteins: The role of plasma amino acids and incretins, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1246–1253.

Biografija autora

Maja Lj. Bulatović je rođena 29.03.1980. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju Medicinsku školu "Beograd". Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu završila je 28.06.2007. godine, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta. Diplomski rad pod nazivom "Proizvodnja bioetanola pomoću *Saccharomyces ellipsoidens* istovremenom saharifikacijom i fermentacijom kukuruznog brašna", pod mentorstvom dr Marice Rakin, odbranila je ocenom 10.0 (deset). Po završetku redovnih studija, zasnovala je radni odnos u fabrici boja i lakova "Jugohem" d.o.o, na poziciji menadžera kvaliteta na poslovima istraživanja i razvoja novih proizvoda, gde je 2009. godine završila pripravnički staž.

Školske 2009/2010. god. upisala je doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija, uključujući i završni ispit, položila je sa prosečnom ocenom 10.0 (deset) nakon čega je u predviđenom roku prijavila izradu doktorske disertacije.

Od 01.02.2011. godine Maja Bulatović je zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, kao istraživač na projektu Tehnološkog razvoja TR 31017 pod nazivom "*Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehranbene i agro-industrije*", finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je 23.09.2011., a u zvanje istraživač saradnik 20.09.2012. godine. U periodu 2012-2013. učestvovala je u realizaciji Inovacionog projekta pod nazivom "*Fermentisani napici na bazi surutke kao novi funkcionalni mlečni proizvodi*", ev. broj 451-03-2372/2012-14/6 finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz koga je realizovano Tehničko rešenje pod nazivom "*Proizvodnja funkcionalnog fermentisanog napitka od surutke i mleka*" potvrđeno od strane AD Imlek Beograd kao krajnjeg korisnika. Od juna 2014. godine angažovana je u realizaciji Inovacionog projekta pod nazivom "*Proizvodnja i primena bioaktivnih proteina i peptida surutke i mleka*", ev. broj

451-03-2802/2013-16/176 finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Maja Lj. Bulatović je dobitnik nagrade za kreiranje novog ekoinovativnog fermentisanog napitka pod nazivom *Active drink* na prvom takmičenju studentskih timova u kreiranju ekoinovativnih prehrambenih proizvoda-*ECOTROPHELLA SRBIJA*, organizovanog od strane Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije, održanog 19 jula 2013. godine.

Maja Lj. Bulatović je kao saradnik angažovana na izvođenju vežbi iz predmeta Biotehnološki praktikum 2 (školske 2011/2012; 2012/2013; 2013/2014, 2014/2015) i Sirovine u biotehnologiji (školske 2012/2013, 2013/2014) na osnovnim akademskim studijama kao i predmeta Analitika prehrambenih proizvoda (školske 2014/2015) na master akademskim studijama.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: Maja Bulatović

broj indeksa: 4029/2009

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

PROIZVODNJA I KARAKTERISTIKE FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH NAPITAKA NA BAZI SURUTKE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.04.2015.

Majna Bulatović

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Bulatović Maja
Broj indeksa: 4029/2009
Studijski program: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija
Naslov rada: **PROIZVODNJA I KARAKTERISTIKE FUNKCIONALNIH
FERMENTISANIH NAPITAKA NA BAZI SURUTKE**

Mentor: Dr Marica Rakin, vanredni profesor
Potpisani/a: Marica Rakin

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.04.2015Maja Lj. Bulatović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**PROIZVODNJA I KARAKTERISTIKE FUNKCIONALNIH FERMENTISANIH
NAPITAKA NA BAZI SURUTKE**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.04.2015.

Majla Lj. Bulatović