



Dubravka Samaržija

Fermentirana
mlijeka



UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM ZAGRABIENSIS



Sveučilište u
Zagrebu

UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM ZAGRABIENSIS

ZAGREB, 2015.

Impressum

Izdavač	Hrvatska mljekarska udruga Ilica 31/III, 10000 Zagreb, Hrvatska
Za izdavača	Vera Volarić
Recenzenti	Prof. dr. sc. Irena Rogelj, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta Prof. dr. sc. Ljubica Tratnik, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Prof. dr. sc. Zdenko Puhan, Federal Institute of Technology (ETH) Prof. dr. sc. Sanja Sikora, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
Lektura	Jadranka Vrbnjak Ferenčak, prof.
Oblikovanje	Dragan Tupajić
Tisak	Hlad-plus d.o.o.
Naklada	300 primjeraka
Tiskano	Zagreb, 2015.

Objavlivanje ovog sveučilišnog udžbenika odobrio je Senat Sveučilišta u Zagrebu odlukom broj: 380-061/160-14-4 na sjednici održanoj 8. srpnja 2014.

Izdavanje ovog sveučilišnog udžbenika pripomogli su:

Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske

Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske

Dukat d.d. Zagreb

Euromilk d.o.o. Beloslavec

Probiotik d.o.o. Zagreb

Tetra Pak d.o.o. Zagreb

Vindija d.d. Varaždin

Zagrebačka županija, Upravni odjel za poljoprivredu, ruralni razvitak i šumarstvo

CIP zapis je dostupan u računalnome katalogu Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu pod brojem: 000910567.

ISBN 978-953-7472-10-8

ISBN 978-953-7472-13-9 (WEB)

Dubravka Samaržija

Fermentirana
mlijeka

Hrvatska mljekarska udruga

Predgovor

Fermentirana mlijeka prisutna su u prehrani brojnih civilizacija već tisućama godina. Duga povijest proizvodnje, njihova izuzetno visoka hranjiva i fiziološka vrijednost, i njihov veliki gospodarski i kulturološki značaj za svaku pojedinačnu zemlju, razlozi su da im je u znanosti i obrazovanju posvećena osobita pozornost. Na gotovo svim europskim fakultetima koja obrazuju mljekarske stručnjake fermentirana mlijeka predaju se kao jedinstveni temeljni predmet na diplomskim i poslijediplomskim studijima. Za opis fermentiranih mlijeka nastavna razina sadržaja predmeta pokriva područja fizike, kemije, biokemije, mikrobiologije, enzimologije, reologije i nutricionizma. Sukladno tome, u Europi postoje brojni udžbenici koji na različite načine obrađuju kompleksna međusobno nedjeljiva znanstvena i stručna područja koja opisuju fermentirana mlijeka. Međutim, većina raspoložive udžbeničke literature napisana je na način prikladan za usvajanje jedino općih temeljnih znanja, a za specifična znanja čitatelj se upućuje na dodatnu literaturu.

Knjiga Fermentirana mlijeka sadržajno je osmišljena tako da istodobno sveobuhvatno pokriva temeljna i specifična znanja nužna za potpun opis i proizvodnju različitih vrsta fermentiranih mlijeka. Zbog toga vjerujem da ova knjiga može općenito potaknuti studente i mlade nastavnike u razvijanju vlastitih ideja iz područja znanosti o hrani i tehnologiji. Svih osam poglavlja knjige tematski je usko povezano i čine jedinstvenu zaokruženu cjelinu. Velikim dijelom tekst svakog poglavlja knjige temelji se i na rezultatima znanstvenih dostignuća iz područja mljekarske znanosti ostvarenima u posljednjih pet godina. Također, u većoj ili manjoj mjeri svako poglavlje knjige sadržava dijelove teksta koji pokrivaju temeljna znanja iz područja fizike, kemije i biokemije, mljekarske mikrobiologije, nutricionizma i tehnologije, a istodobno ona čine i zasebnu cjelinu. Temeljna znanja iz različitih znanstvenih područja koja objedinjuju spoznaje o prirodnoj kompleksnosti fermentiranih mlijeka preduvjet su za razvitak kritičkoga i kreativnog mišljenja studenata. Također, i za praktičnu primjenu znanstvenih spoznaja u izboru i dizajnu novih proizvoda, i optimalnih tehnoloških procesa za njihovu proizvodnju. Konceptijski, u tom je smislu, osim za studente agronomije, knjiga podjednako prikladna i za studente viših razina različitih biotehnoloških studija. Knjiga je korisna i za sve stručnjake i istraživače koji se bave primijenjenim istraživanjima u područjima mljekarske znanosti, fermentirane hrane i tehnologije.

Tekst knjige pokriva i rezultate istraživanja ostvarene u opisu mehanizama i načina interakcijskog djelovanja između humane crijevne mikrobiote i probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka. Pema današnjim stavovima nutricionista i liječnika, primarna je uloga ljudske prehrane prvenstveno osiguranje uravnoteženog metabolizma koji pruža osjećaj zadovoljstva i smanjuje rizik od nastanka bolesti. Zbog toga su za usvajanje temeljnih i specifičnih znanja iz tog područja, poglavlja knjige Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija i Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka prilagođena i za korištenje studentima studija nutricionizma i medicine.

Knjiga će biti korisna i stručnjacima koji rade u mljekarskoj industriji u proizvodnji fermentiranih mlijeka ili se bave dizajniranjem novih proizvoda. Konačno, vjerujem da knjiga može biti korisna mnogim djelatnicima koji rade u državnim tijelima na poslovima savjetovanja, legislative i kontrole namirnica.

Autorica

O autorici

Dubravka Samaržija rođena je 1956. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i X. gimnaziju. Diplomirala je 1981., magistrirala 1993., a doktorirala 1998. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je u Zavodu za mljekarstvo zaposlena od 1981. godine. Od 1994. sudjeluje u nastavi, prvo kao asistentica, a od 1999. godine kao predavač na predmetima vezanim za mljekarsku mikrobiologiju, fermentirana mlijeka, sigurnost hrane i istraživanja u mljekarskoj znanosti na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima Agronomskog fakulteta. Za nastavne potrebe iz predmeta na kojima je predavač u koautorstvu je napisala dva sveučilišna udžbenika a autorica je dva sveučilišna priručnika. Voditeljica je diplomskog studija *Proizvodnja i prerada mlijeka* od 2008. godine.

Uži znanstveni interes i područje istraživanja su joj kvaliteta mlijeka, fermentirana mlijeka, mljekarska mikrobiologija i autohtono sirarstvo. Do sada je iz tih područja objavila brojne znanstvene i stručne radove, te rezultate svojih istraživanja prezentirala

na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih skupova. Na temelju rezultata vlastitih istraživanja u koautorstvu je objavila jednu monografsku knjigu. Od 2008. godine predsjednica je Znanstvenog odbora Hrvatskog simpozija mljekarskih stručnjaka. Članica je Uređivačkog odbora časopisa *Mljekarstvo* od 2005. i stručno popularnog časopisa *Ovčarski i kozarski list* od 2006. godine. Također, aktivna je članica u osam međunarodnih i nacionalnih stručnih društava.

Specijalizaciju iz područja opće mikrobiologije živežnih namirnica, mljekarske mikrobiologije i sirarstva obavila je u Hrvatskoj, Srbiji, Sloveniji, Italiji, Kanadi i SAD-u.

Svojim stručnim angažmanom u značajnoj je mjeri zaslužna za osnivanje i rad akreditiranog Referentnog laboratorija za mlijeko i mliječne proizvode, koji od 2001. godine djeluje u sklopu Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2012. godine redovita je profesorica u trajnom zvanju.

Sadržaj

1. Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani.....	1
Uvod.....	2
1.1. Povijesni razvitak fermentiranih mlijeka.....	3
1.2. Pojam i vrste fermentacija.....	8
1.2.1. Mliječna fermentacija.....	9
1.2.2. Alkoholna fermentacija.....	10
1.3. Fermentirana mlijeka.....	11
1.3.1. Definicija.....	11
1.3.2. Klasifikacija.....	13
1.4. Hranjiva i fiziološka vrijednost.....	15
1.5. Proizvodnja i potrošnja.....	23
2. Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija.....	27
Uvod.....	28
2.1. Osnove taksonomije.....	29
2.1.1. Klasične i molekularne metode.....	32
2.2. Taksonomija bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija.....	33
2.2.1. Genomska karakterizacija i metabolički inženjering.....	34
2.2.1.1. Plazmidi.....	40
2.3. Filogeneza bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija.....	41
2.3.1. Opis bakterija mliječne kiseline.....	45
2.3.1.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	46
2.3.1.2. Rod <i>Lactococcus</i>	49
2.3.1.3. Rod <i>Enterococcus</i>	49
2.3.1.4. Rod <i>Streptococcus</i>	50
2.3.1.5. Rod <i>Leuconostoc</i>	50
2.3.1.6. Rod <i>Pediococcus</i>	51
2.3.2. Opće karakteristike bifidobakterija.....	52
2.3.2.1. Rod <i>Bifidobacterium</i>	52
2.3.4. Osobine i svojstva najznačajnijih vrsta BMK i bifidobakterija.....	55
2.3.4.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	55
2.3.4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	57
2.3.4.3. <i>Lactobacillus casei</i> skupina bakterija.....	58
2.3.4.4. <i>Lactobacillus reuteri</i>	60
2.3.4.5. <i>Streptococcus thermophilus</i>	61

2.3.4.6.	<i>Lactococcus lactis</i>	62
2.3.4.7.	<i>Bifidobacterium animalis</i>	63
2.5.	Metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija	64
2.5.1.	Metabolizam proteina i lipida	64
2.5.2.	Metabolizam laktoze	66
2.5.2.1.	Bifidociklus razgradnje laktoze	72
2.5.2.1.1.	Mliječna kiselina	73
2.5.2.1.2.	Octena kiselina	75
2.5.3.	Metabolizam citrata	75
2.5.4.	Stvaranje acetaldehida	76
2.5.5.	Stvaranje egzopolisaharida	77
2.5.6.	Stvaranje bakteriocina	82
3.	Mikrobne kulture	85
	Uvod	86
3.1.	Definicija	87
3.2.	Sastav kultura	87
3.3.	Vrste kultura	87
3.3.1.	Mezofilna kultura	91
3.3.2.	Termofilna kultura	94
3.3.3.	Probiotička kultura	96
3.3.4.	Funkcionalna kultura	98
3.4.	Oblik kulture	101
3.4.1.	Tekuća kultura	101
3.4.2.	Koncentrirana – zamrznuta kultura	103
3.4.3.	Koncentrirana – zamrznuta – osušena kultura	104
3.4.4.	Kulture za direktnu inokulaciju	105
3.5.	Uloga kulture	108
3.6.	Čimbenici koji utječu na aktivnost kultura	111
3.6.1.	Mlijeko kao medij	111
3.6.2.	Inhibitorne tvari mlijeka	111
3.6.2.1.	Ostatci antibiotika	111
3.6.3.	Bakteriofagi	112
3.6.3.1.	Otkrivanje i kontrola	116
4.	Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka	121
	Uvod	122
4.1.	Mlijeko	123
4.1.1.	Kemijski sastav	123
4.1.1.1.	Voda	124
4.1.1.2.	Mliječna mast	124
4.1.1.3.	Proteini	130

4.1.1.3.1.	Kazein	130
4.1.1.3.2.	Proteini sirutke	134
4.1.1.3.3.	Albumini seruma	136
4.1.1.3.4.	Imunoglobulini	136
4.1.1.3.5.	Laktoza	136
4.1.1.3.6.	Minerali i vitamini	137
4.1.1.3.7.	Kolesterol	139
4.1.1.3.8.	Fosfolipidi i sfingolipidi	139
4.1.2.	Fizikalna svojstva	140
4.1.2.1.	Kiselost mlijeka	141
4.1.2.2.	Puferni kapacitet	141
4.1.3.	Izbor mlijeka	142
4.2.	Osnovni tehnološki principi proizvodnje	143
4.3.	Tehnološki procesi	147
4.3.1.	Priprema mlijeka	148
4.3.1.1.	Obogaćivanje suhe tvari i standardizacija mliječne masti	149
4.3.1.1.1.	Obogaćivanje suhe tvari	149
4.3.1.1.1.1.	Evaporacija	150
4.3.1.1.1.2.	Ultrafiltracija i reverzna osmoza	152
4.3.1.1.1.2.1.	Reverzna osmoza	153
4.3.1.1.1.2.2.	Ultrafiltracija	153
4.3.1.1.1.2.3.	Obrano mlijeko u prahu	153
4.3.1.1.1.2.4.	Koncentrati proteina mlijeka	155
4.3.1.1.1.2.5.	Kazein u prahu	155
4.3.1.1.1.2.6.	Sirutka u prahu	156
4.3.1.1.2.	Standardizacija udjela mliječne masti	158
4.3.1.1.3.	Ostali dodatci	159
4.3.1.1.3.1.	Stabilizatori	160
4.3.1.1.3.2.	Sladila, boje, arome, emulgatori i konzervansi	164
4.3.1.1.3.3.	Prebiotici	165
4.3.1.1.3.4.	Transglutaminaza	167
4.3.1.1.3.5.	Voćni dodatci	171
4.3.1.2.	Klarifikacija	171
4.3.1.3.	Deaeracija	172
4.3.1.4.	Homogenizacija	172
4.3.1.4.1.	Fizikalno-kemijske promjene mliječne masti i proteina	178
4.3.1.4.2.	Visokotlačna homogenizacija	179
4.3.1.5.	Toplinska obrada mlijeka	187
4.3.1.5.1.	Fizikalno-kemijske promjene sastojaka mlijeka	189
4.3.1.5.1.1.	Fizikalno-kemijske promjene mliječne masti	189

	4.3.1.5.1.2. Fizikalno-kemijske promjene proteina.....	189
	4.3.1.5.1.3. Fizikalno-kemijske promjene laktoze.....	194
	4.3.1.5.1.4. Fizikalno-kemijske promjene mineralnih soli	194
4.3.2.	Fermentacija mlijeka	194
4.3.2.1.	Tehnološko-tehnički uvjeti	194
4.3.2.2.	Oblikovanje gel-strukture	197
	4.3.2.2.1. Fizikalno-kemijski i biokemijski procesi	197
4.3.2.3.	Tvorba aromatskih spojeva	201
4.3.2.4.	Hlađenje.....	204
4.3.2.5.	Pakiranje.....	205
5.	Jogurt i druga fermentirana mlijeka.....	207
	Uvod.....	208
5.1.	Jogurt.....	209
5.2.	Tehnologija proizvodnje jogurta	210
5.2.1.	Jogurtna kultura	213
	5.2.1.1. Klasična jogurtna kultura	213
	5.2.1.2. Kultura za probiotički jogurt	216
	5.2.1.3. Izbor kulture i količina inokuluma	217
5.2.2.	Vrijeme i temperatura fermentacije.....	218
	5.2.2.1. Biokemijske promjene tijekom fermentacije.....	219
	5.2.2.1.1. Koncentracija mliječne kiseline.....	219
	5.2.2.1.2. Koncentracija aromatskih spojeva	220
5.2.3.	Hlađenje jogurta	222
5.2.4.	Čvrsti jogurt.....	223
5.2.5.	Tekući jogurt	225
5.2.6.	Pitki jogurt	226
5.2.7.	Voćne varijante jogurta	228
5.2.8.	Jogurti s produženim vijekom održivosti	232
5.2.9.	Koncentrirani jogurt.....	233
	5.2.9.1. Skyr.....	235
5.2.10.	Zamrznuti jogurt.....	236
5.2.11.	Jogurt u prahu.....	237
5.2.12.	Upjenjeni jogurt.....	238
5.2.13.	Ovčji i kozji jogurt	238
	5.2.13.1. Ovčji jogurt	238
	5.2.13.2. Kozji jogurt.....	241
5.3.	Ostala fermentirana mlijeka	243
5.3.1.	Kiselo mlijeko	243
5.3.2.	Bugarsko kiselo mlijeko.....	244

5.3.3.	Mlačénica.....	244
5.3.4.	Kefir.....	245
5.3.4.1.	Kefirna zrna.....	246
5.3.4.2.	Tehnologija proizvodnje kefir.....	249
5.3.4.2.1.	Aktivacija kefirnih zrna.....	250
5.3.4.2.1.1.	Matična kultura.....	250
5.3.4.2.1.1.1.	Tehnička kultura.....	251
5.3.4.2.1.2.	Komercijalna kefirna kultura.....	251
5.3.4.2.2.	Tehnološke operacije.....	252
5.3.5.	Kumis.....	254
5.3.5.1.	Tehnologija proizvodnje kumisa.....	255
5.3.6.	Ymer.....	255
5.3.7.	Viili.....	256
6.	Fizikalna i reološka svojstva jogurta.....	259
	Uvod.....	260
6.1.	Fizikalna svojstva jogurta.....	261
6.2.	Opći principi reologije hrane i reološka svojstva jogurta.....	263
6.2.1.	Opći principi reologije hrane.....	263
6.2.2.	Reološka svojstva jogurta.....	267
6.2.2.1.	Mjerenja.....	267
6.2.3.	Mikrostruktura.....	272
6.2.3.1.	Temperatura.....	273
6.2.3.2.	Vrsta mlijeka.....	274
6.2.3.3.	Vrsta i količina mliječnih ingredijenata za obogaćivanje Sbm mlijeka.....	275
6.2.3.4.	Udjel ukupnih proteina i omjer kazein : proteini sirutke.....	277
6.2.3.5.	Vrsta i svojstva kulture.....	282
6.2.3.6.	Vrsta i količina stabilizatora.....	289
6.2.3.7.	Udjel mliječne masti i uvjeti homogenizacije.....	293
6.2.4.	Permeabilnost.....	294
6.2.5.	Sinereza.....	294
7.	Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka.....	297
	Uvod.....	298
7.1.	Razvitak probiotičkih fermentiranih mlijeka.....	299
7.2.	Probiotički i prebiotički koncept.....	300
7.2.1.	Definicija probiotika.....	301
7.2.1.1.	Podrijetlo i svojstva probiotičkih bakterija.....	301
7.2.2.	Definicija prebiotika i simbiotika.....	302

7.3.	Nazivlje, vrste i tehnologija proizvodnje	303
7.3.1.	Biojogurt	303
7.3.2.	Vrste probiotičkih fermentiranih mlijeka	304
7.3.2.1.	Acidofilno mlijeko	306
7.3.2.2.	Acidofilno-kvaščevo mlijeko	307
7.3.2.3.	Yakult	308
7.3.3.	Sposobnost preživljavanja probiotičkih bakterija.....	308
7.4.	Preventivni i terapijski učinci	311
7.4.1.	Humana crijevna mikrobiota	311
7.4.2.	Probiotici, prebiotici i simbiotici.....	316
8.	Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka.....	329
	Uvod.....	330
8.1.	Kontrola kvalitete sirovog mlijeka	331
8.1.1.	Osnovne i specifične analize	331
8.2.	Kontrola kvalitete ingredijenata i voća	333
8.2.1.	Osnovne analize.....	333
8.3.	Kontrola kvalitete fermentiranih mlijeka.....	334
8.3.1.	Fizikalno-kemijske analize.....	334
8.3.2.	Mikrobiološke analize	338
8.3.2.1.	Mikrobni uzročnici kvarenja	339
8.3.2.2.	Pojavnost patogenih bakterija	340
8.3.2.3.	Utvrđivanje broja bakterija iz sastava kulture.....	340
8.3.2.3.1.	Mikrobne vrste jogurtne kulture	340
8.3.2.3.2.	Mikrobne vrste jogurtne i probiotičke kulture.....	342
8.3.2.3.3.	Mikrobne vrste laktokoka	347
8.3.2.4.	Aktivitet kulture	347
8.3.3.	Pogreške fermentiranih mlijeka	348
8.3.3.1.	Pogreške izgleda	348
8.3.3.2.	Pogreške okusa i arome.....	350
8.3.3.3.	Pogreške teksture	351
9.	Literatura.....	353
10.	Kazalo pojmova.....	373
	Kazalo pojmova	374
	Popis tablica	393
	Popis slika	396



Fermentirana mlijeka

- 1** Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani

Uvod

Fermentirana mlijeka, prema zapisima i artefaktima iz prošlosti, u prehrani brojnih civilizacija prisutna su već tisućama godina. Prvenstveni razlog dugog postojanja fermentiranih mlijeka kao zasebnih namirnica vjerojatno leži u činjenici da su ona u znatnoj mjeri produžila vijek održivosti sirovog mlijeka. U prošlosti, fermentacija mlijeka najvjerojatnije se dogodila slučajnom kontaminacijom. S vremenom je otkriveno da fermentacija djelovanjem različitih mikroorganizama omogućava razvitak brojnih vrsta fermentiranih mlijeka. Danas tržište nudi fermentirana mlijeka različitih okusa, teksture i konzistencije, a posljednjih dvadesetak godina i proizvode s funkcionalnim svojstvima.

Dugo postojanje i popularnost fermentiranih mlijeka u gotovo svim populacijama širom svijeta nisu samo posljedica blago kiselog okusa i ugodne arome koja im je svojstvena, već ih karakterizira i visoka hranjiva i funkcionalna vrijednost.

Za stjecanje osnovnih znanja o fermentiranom mlijeku u ovom poglavlju knjige ukratko su opisani njihov povijesni razvitak, pojam i vrste karakterističnih fermentacija, definicija i podjela, proizvodnja i potrošnja, i njihova hranjiva, fiziološka ili funkcionalna vrijednost.



1.1.

Povijesni razvitak fermentiranih mlijeka

Fermentacija je bez svake sumnje jedna od najstarijih metoda koja se koristi u konzerviranju hrane, ali nikada se egzaktno nije utvrdilo gdje i kada je započela fermentacija osnovne sirovine. Pretpostavlja se da je fermentacija započela slučajnom kontaminacijom hrane koja se lako kvarila, organizmima koji imaju sposobnost stvaranja kiseline. Stvorena kiselina dala je proizvodima drukčije karakteristike i produžila im vijek trajanja. Prema povijesnim podacima, može se također pretpostaviti da je čovjek počeo proizvoditi fermentirane proizvode prije 10.000 - 15.000 godina, kada je iz sakupljačkog prešao na proizvođački način života. Pronađeni ostatci mliječne masti u posudama iz razdoblja neolita (~ 6500 godina), nedvojbeno potvrđuju da su tadašnji stanovnici proizvodili fermentirane mliječne proizvode. Arheološka otkrića u obliku crteža i reljefa potvrđuju da su civilizacije poput Sumerana, Babilonaca i Indijaca imale naprednu poljoprivredu, i da su između ostalih fermentiranih namirnica proizvodili i poznavali fermentirana mlijeka. Jedinstveni prikazi poznavanja proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda nalaze se na reljefu Sumerana iz 2900. - 2460. g. pr. Kr. (slika 1.1.) i na pronađenoj amfori za kumis iz 4. st. pr. Kr. (slika 1.2.).

Početak proizvodnje fermentiranih mlijeka u cijelom svijetu, vrlo je vjerojatno povezan sa Srednjim istokom i zemljama Balkana, a pripisuje se kulinarskim vještinama stanovnika koji su živjeli na tim prostorima. Od fermentiranih mlijeka koja danas poznajemo, kefir, kumis, jogurt, kiselina, dahi, araka, kos, tarhó, kurunga, laben, ymer ili tätte, proizvodila su se i u

prošlim vremenima. Osobine tih prvih fermentiranih mlijeka odredili su prvenstveno područje i klimatski uvjeti u regiji njihove proizvodnje. U suptropskim predjelima Srednjeg istoka u fermentiranom mlijeku dominantna je bila termofilna, a u području sjeverne Europe mezofilna mikrobna populacija. Neovisno o dominantnosti mikrobne populacije, tadašnja fermentirana mlijeka, kako se pretpostavlja, karakterizirala je fermentacija istovremenim djelovanjem bakterija mliječne kiseline i drugih mikrobnih vrsta sposobnih hidrolizirati laktozu mlijeka. Odnosno, konzistencija, okus i miris proizvoda ovisili su o dominantnoj bakterijskoj vrsti u mješovitoj populaciji koja je uvjetovala



Slika 1.1.

Proizvodnja mlijeka, reljef Sumerana, Tell al-'Ubaid, 2900. - 2460. g. pr. Kr. (Kurman, 1984., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)



Slika 1.2.

Amfora za kumis, Certomlyk, 4. stoljeće pr. Kr. (Kurman, 1984.: s dopuštenjem FIL-IDF-a.)



Slika 1.3.

Plinije Stariji (Gaius Plinius Secundus Maior, 23. - 79. g.), imaginaran portret iz 19. stoljeća i naslovnica knjige *Naturalis Historia* izdana 1669. godine.



fermentaciju. Pretpostavlja se da su tadašnja fermentirana mlijeka bila neujednačene kvalitete.

Prema pisanim zapisima, proizvodnja kiselog mlijeka spominje se u Mezopotamiji oko 1300. g. pr. Kr. (Biblija), mlaćenice i dahija u Indiji 800. - 300. g. pr. Kr. (Sveta knjiga hinduizma), kumisa u Ukrajini oko 400. g. pr. Kr. (premda je velika vjerojatnost da je kumis u Rusiji bio poznat od 2000. g. pr. Kr.). Arapske medicinske knjige spominju poznavanje labena u Arabiji oko 633. g. pr. Kr. Proizvodnja jogurta u Turskoj datira iz 8. stoljeća, a tarhóa u Mađarskoj od 14. stoljeća. U zapisima iz razdoblja Rimskog Carstva (2. stoljeće pr. Kr.) nalaze se i dva recepta za proizvodnju kiselog mlijeka, *Opus lactarum* i *Oxygala*. Prvi se pripremao od kiselog mlijeka, meda, brašna i voća, a drugi je uz kiselo mlijeko sadržavao povrće i začine. Od ostalih fermentiranih proizvoda, u starim zapisima spominje se kruh u Egiptu prije 2500. g. pr. Kr. Fermentacija zrna soje u Kini zabilježena je 1000. g. pr. Kr., a fermentaciju mesa, kako se pretpostavlja, poznavali su ljudi iz rimskog razdoblja.

Vjerovanje da fermentirana mlijeka pozitivno djeluju na zdravlje i dugovječnost čovjeka nalazimo u zapisima Ayurvede (tradicionalne medicine liječenja koja je nastala u Indiji prije otprilike 5000 godina) i Starog zavjeta (geneza 18:8). U svom djelu *Naturalis Historiae* rimski pisac i znanstvenik Plinije Stariji (lat. Gaius Plinius Secundus Maior, 23. - 79.; slika 1.3.) piše da fermentirana mlijeka imaju pozitivan učinak na liječenje crijevnih infekcija.

Grčki liječnik i filozof Galenos (lat. Claudius Galenus, 129. - 216.; slika 1.4.) koristi fermentirana mlijeka u liječenju disbalansa crijevne populacije gastrointestinalnog sustava. U tom smislu, prema mnogim znanstvenicima, fermentirana mlijeka mogu se smatrati prvim originalnim prirodnim funkcionalnim proizvodima.

Poslije, kada su nomadska plemena Srednjeg istoka i Balkana već uzgajala krave, koze, ovce i deve započela je proizvodnja kiselog mlijeka od različitih vrsta mlijeka u prvim kontroliranim uvjetima. Tadašnji kontrolirani uvjeti uključivali su sljedeće postupke proizvodnje:



Slika 1.4.

Galenos (lat. Claudius Galenus, 129. - 216. g.), grčki liječnik i filozof; litografija, Pierre Roche Vigneron (Pariz: Lith de Gregoire et Deneux ca. 1865. godine).



Slika 1.5.

Jogurt u glinenoj posudi.

- korištenje uvijek istog posuđa, ili dodatka svježeg mlijeka postojećem kiselom mlijeku; postupak koji je osigurao postojanost prirodne autohtone mikrobnog populacije koja je pouzdano kiselila mlijeko
- zagrijavanje mlijeka iznad otvorene vatre; postupak koji je povećao gustoću mlijeka modifikacijom svojstava kazeina, što je osiguralo bolji i stabilniji viskozitet (izgled) gotovog proizvoda
- miješanje toplog ili hladnog mlijeka s kiselim mlijekom od prethodnog dana i pohranom na sobnoj temperaturi; postupak koji je omogućio razvitak mezofilnih ili termofilnih bakterija mliječne kiseline koje su tako postale dominantna populacija
- selekcijom bakterijskih sojeva koji su dobro podnosili kiselu sredinu; postupak koji je omogućio proizvodnju proizvoda različitih okusa, a istovremeno eliminirao velik broj patogenih bakterija prisutnih u mlijeku te je stvoren proizvod sigurniji za konzumaciju.

Premda se opisana proizvodnja temeljila isključivo na iskustvu i intuiciji, proizvodnju kiselog mlijeka prema tom jednostavnom receptu preuzele su i ostale

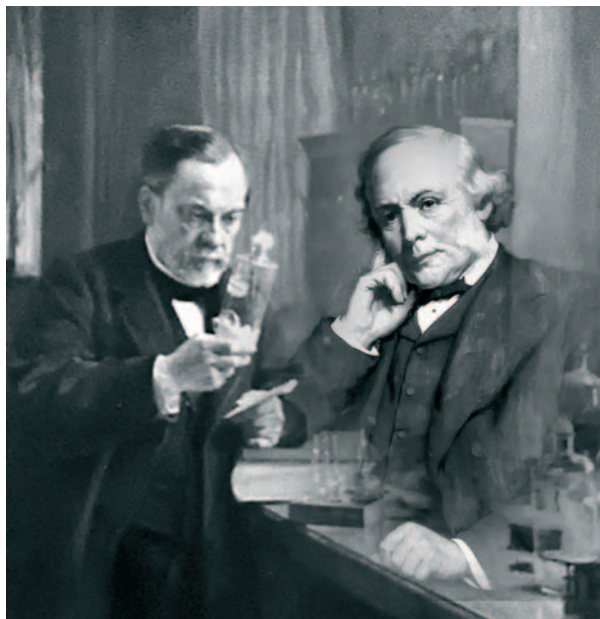
zajednice naseljene na području današnje Europe. Jedan od tako prvotno proizvedenih proizvoda upravo je jogurt (slika 1.5.), a ime je dobio prema turskoj riječi za kiselu mlijeko – *jogurt*. Postupno, tradicionalni su proizvodi standardizirani i neznatno modificirani za industrijsku proizvodnju.

Najpoznatija tradicionalna fermentirana mlijeka i zemlje njihova podrijetla prikazani su u tablici 1.1.

Louis Pasteur (1822. - 1895.; slika 1.6., lijevo) francuski kemičar i mikrobiolog, premda nije bio začetnik germinativne teorije, 1856. godine praktično je dokazao da se fermentacija ("život bez zraka") događa djelovanjem mikroorganizama kao posljedica biogeneze. Standardizacija mikrobnog kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka započela je nakon 1873. godine, kada je Joseph Lister (1827. - 1912.; slika 1.6., desno), engleski znanstvenik i liječnik, iz kiselog mlijeka slučajno izolirao bakteriju koju je nazvao *Bacterium lactis* (poslije *Lactococcus lactis*). Vrlo brzo nakon tog otkrića izolirani su i identificirani brojni mikroorganizmi koji su fermentirali mlijeko.

Početak 1900. godine bakterije mliječne kiseline (BMK) gotovo istovremeno počele su se koristiti u Danskoj i Njemačkoj u proizvodnji kiselog mlijeka i sira. Nedugo nakon toga tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka počela se razvijati u organiziranu, modernu i kontroliranu proizvodnju u mljekarama velikih kapaciteta prerade. Industrijsku proizvodnju jogurta, koristeći bugarsku kulturu, prvi je u Europi započeo Isaac Carasso 1919. godine otvorivši malu mljekaru u Barceloni. Nekoliko godina poslije njegov sin Daniel Carasso preuzeo je obiteljski posao i proizvodnju jogurta pod komercijalnim imenom Danone započeo u Francuskoj, a pod imenom Dannon u SAD-u. Godine 1929. u Andoveru, u državi Massachusetts (SAD), otvorena je mljekara za proizvodnju jogurta pod imenom *Colombo and Sons Creamery*, koja danas nosi ime *General Mills*, i najveći je proizvođač hrane u svijetu.

Znanstvenici Sigurd Orla-Jensen (1919.) i James M. Sherman (1937.) zaslužni su za prvu sustavnu klasifikaciju BMK. Slijedili su opisi fermentacijskih karakteristika izoliranih i klasificiranih bakterijskih sojeva, a specijalizirane kompanije započinj s proizvodnjom



Slika 1.6.

Louis Pasteur (1822. - 1895.) i Joseph Lister (1827. - 1912.)

Tablica 1.1.

	Ime	Zemlja
Imena najpoznatijih tradicionalnih fermentiranih mlijeka i njihovo podrijetlo (prilagođeno prema Kurmanu i sur., 1992., i Tamimu i Robinsonu, 1999.)	Jogurt/ Yoghurt/yogurt/yaort/yaourti/yogur/yaghourt	Turska
	Kiselo mlijeko/kiselo mleko/kiselo mlijeko	Balkanske zemlje
	Kefir	Kavkaz
	Kumis/kumys/kumyss/koumiss	Rusija, Mongolija, Tibet
	Tarhō	Mađarska
	Mezzoradu	Sicilija
	Tätte/ tettemjølkk	Norveška, Švedska
	Filmjölkk	Švedska
	Ymer	Danska
	Viili	Finska
	Skyr	Irska
	Yakult	Japan
	Zabady/zabade	Egipat, Sudan
	Kan zeer, eben zeer	Egipat, Sudan
	Kneh/Ken/Kneh/Knah/Kaneh	Saudijska Arabija, Libanon, Jordan, Sirija, istočni Mediteran
	Dahi/dadhi/dahee/dadih	Indija
Matzoon/Madzoon	Armenija	



Slika 1.7.

Ilja Iljič Mečnikov (1845. - 1916.)

standardiziranih mikrobnih kultura. Početak korištenja standardizirane mikrobne kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka postavio je temelje za današnju kontroliranu proizvodnju fermentiranih mlijeka i stalnost kvalitete proizvoda.

Suvremene metode molekularne biologije, koje su se počele koristiti otkrićem metode lančane reakcije polimerazom [engl. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)] i kasnijim njezinim modifikacijama, omogućile su izolaciju i determinaciju novih sojeva bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija. Zahvaljujući tim istraživanjima stvorena je relevantna praktična osnova za današnju i buduću sofisticiranu proizvodnju fermentiranih mlijeka različitih svojstava.

Početak 20. stoljeća ruski znanstvenik i nobelovac Ilja Iljič Mečnikov (1845. - 1916.; slika 1.7.) u svojoj teoriji o dugovječnosti tvrdio je da jogurt uz pomoć mliječne kiseline i ostalih svojih sastojaka usporava

rast anaerobnih sporetvornih bakterija (truležnih bakterija) u debelom crijevu. Kasnijim istraživanjima utvrđena je nemogućnost prihvatanja bakterija (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) sadržanih u jogurtu za sluznicu crijeva. Međutim, mnogi s punim pravom Mečnikova smatraju zaslužnim za današnju popularnost fermentiranih mlijeka. Mečnikova teorija potaknula je i mnogobrojna znanstvena istraživanja o važnosti bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija za ljudsko zdravlje.

Kronološki razvitak proizvodnje fermentiranih mlijeka u proizvodnom, stručnom i znanstvenom smislu može se sažeti na sljedeći način:

- 1910. - 1925. - na temelju Mečnikove teorije o dugovječnosti započinjaju istraživanja o povezanosti između konzumacije fermentiranih mlijeka i zdravog života
- 1925. - 1935. - utvrđeno je da bakterija *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (iz sastava jogurtne kulture) ne može preživjeti pasažu kroz želudac (pH- 1,5 - 3), a bakterija *Lactobacillus acidophilus* izolirana iz humanog intestinalnog sustava može
- 1945. - 1950. - fermentirana mlijeka u Europi konzumira malobrojna skupina potrošača
- 1950. - 1960. - na europsko tržište uvedene su voćne varijante jogurta, potrošnja počinje naglo rasti
- 1970-ih - u tehnologiju fermentiranih mlijeka uvedene su evaporacija i membranske tehnike, a kontinuirana proizvodnja postala je uobičajeni tehnološki postupak
- 1980-ih - znanstvene studije o povoljnom utjecaju probiotičkih bakterijskih sojeva određenih vrsta BMK i bifidobakterija na ljudsko zdravlje se intenziviraju, započinje komercijalna proizvodnja probiotičkih fermentiranih mlijeka
- 1990-ih - zahvaljujući razvitku genetičkog inženjeringa poboljšavaju se svojstva mikrobnih kultura (na fag rezistentnost, poboljšanje okusa i svojstva teksture)
- 2000-ih - u sastav mikrobnih kultura uvode se novi bakterijski sojevi s drukčijim svojstvima, započinje razvitak novih fermentiranih mlijeka obogaćenih dodatcima poput ω -3 masnih kiselina i prebiotika.

Pojam i vrste fermentacija

U biokemijskom smislu termin fermentacija odnosi se na metaboličke procese u kojima se organski spojevi (najčešće ugljikohidrati) razgrađuju uz oslobađanje energije bez sudjelovanja terminalnih akceptora elektrona (kisik). Djelomičnom oksidacijom oslobađa se relativno mala količina ATP (adenozintrifosfat) energije u usporedbi sa stvorenom energijom potpunom oksidacijom supstrata. Kada se fermentacija događa uz sudjelovanje mikroorganizama koji mogu koristiti organske akceptore elektrona za procese stvaranja energije, nastaju različiti organski međuprodukti različitim metaboličkim putovima razgradnje. Organski spojevi određenog proizvoda nastali fermentacijom međusobno se razlikuju ovisno o zahtjevima mikroorganizma prema kisiku. Tako izražena razlika u okusu proizvoda nastaje korištenjem kulture koja u svom sastavu može sadržavati aerobne ili fakultativno anaerobne, kisik neovisne ili striktno anaerobne bakterijske sojeve.

Pojam fermentacija koristi se i za bilo koji industrijski proces koji ovisi o aktivnosti jedne ili više mikrobnih vrsta. Većina industrijskih fermentacija događa se u aerobnim uvjetima, u kojima mikroorganizmi koristeći kisik u potpunosti razgrađuju supstrat. Primjer za potpunu razgradnju supstrata su stanice kvasaca koje se koriste u pekarskoj industriji, zatim različiti mikrobnii enzimi, bakteriocini. Ili je to gljivica *Fusarium graminearum* koja tvori mikoprotein koji se može u svojstvu dodatka koristiti u mnogim namirnicama namijenjenima vegetarijancima. Manji dio industrijskih fermentacija u biokemijskom su smislu fermentacije na kojima se temelji proizvodnja alkohola i svih fermentiranih mliječnih proizvoda. Industrijske fermentacije nazivaju se zajedničkim

imenom biotehnologija. Odnosno, biotehnologija je tehnologija koja koristi žive organizme i njihove produkte u proizvodnji različitih proizvoda.

Općenito, u fermentaciji osnovne sirovine postoji nekoliko različitih vrsta fermentacija. Neovisno o tome jesu li one za proizvod poželjne ili nepoželjne, za fermentirane mliječne proizvode karakteristično je pet glavnih fermentacijskih reakcija:

- mliječna
- propionska
- alkoholna
- koliformno-plinotvorna
- maslačna.

Nazivi pojedinačnih vrsta fermentacija izvedeni su iz imena konačnog produkta nastalog u najvećem udjelu nakon završene fermentacije. Prve tri (mliječna, propionska, alkoholna) poželjne su fermentacije i koriste se u proizvodnji točno određenih mliječnih proizvoda. Suprotno, posljednje su dvije (maslačna i koliformno-plinotvorna) nepoželjne fermentacije koje uzrokuju kvarenje fermentiranih mliječnih proizvoda. Vrste fermentacije laktoze, karakteristične za mliječne proizvode ovisno o raspoloživom kisiku u mediju prikazuje slika 1.8.

Sve te navedene vrste fermentacija čine iznimno složeni kemijski i biokemijski procesi uvjetovani brojnim čimbenicima. Zbog toga su za njihovo potpuno razumijevanje, korištenje i kontrolu potrebna fundamentalna znanja iz kemije i fizike mlijeka, biokemije, reologije i mikrobiologije. Od navedenih fermentacija, u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste se dvije - mliječna i alkoholna fermentacija.

Slika 1.8.

Mikrobne vrste i stvoreni metaboliti fermentacijom laktoze.

Šećer	Mikroorganizam	Metabolit	Vrsta fermentacije
Laktoza	→ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	→ etanol → CO ₂	» Alkoholna
	→ <i>Lactobacillus / Streptococcus / Lactococcus / Pediococcus</i>	→ mliječna kiselina	» Homofermentativna mliječna
	→ <i>Leuconostoc</i>	→ mliječna kiselina → metanol → CO ₂	» Heterofermentativna mliječna
	→ <i>Propionibacterium</i>	→ propionska kiselina → mliječna kiselina → CO ₂	» Propionska
	→ <i>E. coli</i>	→ mliječna kiselina → octena kiselina → jabučna kiselina → mravlja kiselina → etanol → CO ₂	» Atipična mliječna
	→ <i>Clostridium bytiricum</i>	→ maslačna kiselina → octena kiselina → butanol → propanol → aceton → etanol → CO ₂ → H ₂	» Maslačna

1.2.1.

Mliječna fermentacija

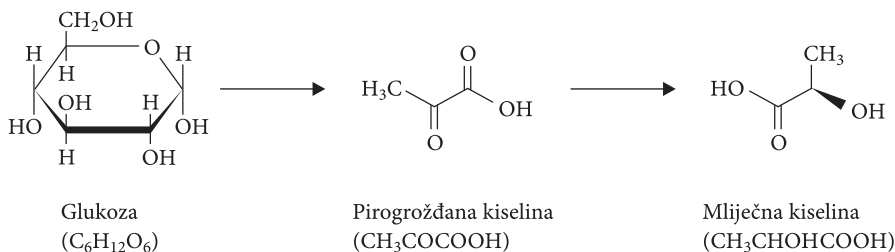
Mliječna fermentacija je pojam koji podrazumijeva niz lančano povezanih biokemijskih reakcija gdje je mliječna kiselina u najvećem udjelu konačan produkt razgradnje laktoze. Tijekom fermentacije mliječna kiselina nastaje djelovanjem bakterija koje su sposobne hidrolizirati laktozu i druge šećere u mliječnu kiselinu.

Na slici 1.9. shematski je prikazana mikrobn razgradnja glukoze u mliječnu kiselinu.

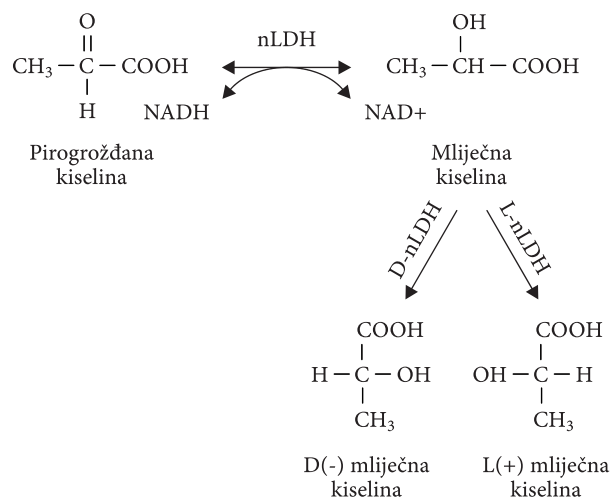
Intermedijarna komponenta u mliječnoj fermentaciji je pirogroždana kiselina koja nastaje metabolizmom laktoze složenim enzimatskim reakcijama.

Slika 1.9.

Shematski prikaz nastajanja mliječne kiseline iz glukoze djelovanjem bakterija koje imaju sposobnost fermentacije šećera.



Iz piruvata djelovanjem enzima NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid) ovisne laktat dehidrogenaze (nLDH) nastaje laktat. Istovremeno je stvaranje L(+) izomera ili D(-) izomera mliječne kiseline ovisno o prisutnosti specifičnih enzima laktat dehidrogenaza - L-nLDH ili D-nLDH. Zbog toga iz laktata u različitim omjerima u fermentiranom mlijeku mogu biti prisutni L(+) i D(-) izomeri mliječne kiseline. Slika 1.10. shematski prikazuje nastajanje mliječne kiseline iz pirogroždane kiseline.



Slika 1.10.

Shematski prikaz nastajanja mliječne kiseline iz pirogroždane kiseline djelovanjem bakterijskog enzima NAD^+ ovisne laktat-dehidrogenaze (nLDH).

Osim mliječne kiseline, iz piruvata kao intermedijarne komponente hidrolize laktoze nastaju i drugi organski spojevi. Svi ti nastali metabolički produkti služe za izvor energije jednim ili postaju letalni za druge mikrobnе vrste koje sudjeluju u fermentaciji. Zbog toga mliječna fermentacija nije jednostavna reakcija i vrlo često nije uvijek predvidiva. Biokemijskim reakcijama tijekom fermentacije nastali produkti

ostaju u supstratu i utječu na prirodu samog proizvoda. Uspješnost mliječne fermentacije koja se koristi u proizvodnji svih fermentiranih mliječnih proizvoda ovisna je o mnoštvu različitih čimbenika. U prvom redu, ovisna je o vrsti mliječnog proizvoda i o osobinama mikrobnih vrsta iz sastava kultura. Ne manje važni su čimbenici fermentacije i prisutnost ili odsutnost kisika, temperatura, prisutnost inhibitornih tvari, raspoloživosti energetskih izvora i pH-vrijednost medija određenoga mliječnog proizvoda.

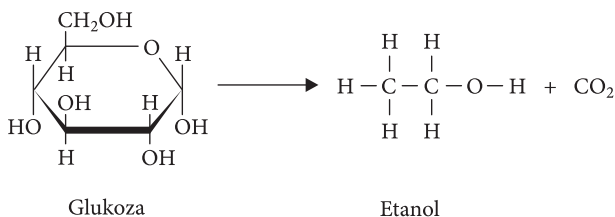
Za potrebe kemijske industrije produkti dobiveni mliječnom fermentacijom poput mliječne kiseline, diacetila ili amina izdvajaju se ili se pročišćavaju iz supstrata.

1.2.2.

Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je pojam koji podrazumijeva biokemijske reakcije u kojoj su alkohol i CO_2 u najvećem udjelu konačan produkt razgradnje laktoze. Prema važnosti alkoholna je fermentacija druga najznačajnija fermentacija koja se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Prvenstveno, alkoholna fermentacija je karakteristična za proizvodnju kefir i kumisa. Uz bakterije mliječne kiseline, kultura za proizvodnju tih dvaju proizvoda sadržava i kvasce (najčešće vrste roda *Torula* ili *Candida*). Za razliku od većine ostalih vrsta kvasaca, te vrste kvasaca mogu razgraditi laktozu u glukozu i galaktozu. Iz glukoze enzimatskim djelovanjem kvasaca potom nastaju etanol i CO_2 . Shematski prikaz nastajanja etanola i CO_2 iz glukoze prikazuje slika 1.11.

Zbog kontaminacije kvascima, alkoholna fermentacija događa se i u drugim vrstama fermentiranih mlijeka, gdje uzrokuje pogrešku okusa i konzistencije proizvoda. Okus je proizvoda izrazito voćni, a konzistencija plinovita. Zbog toga alkoholna fermentacija, osim za kefir i kumis, za sva ostala fermentirana mlijeka nije poželjna reakcija.



Slika 1.11.

Shematski prikaz hidrolize glukoze u etanol i CO₂ djelovanjem saharolitičkih kvasaca.

1.3.

Fermentirana mlijeka

Fermentirana mlijeka su mliječni proizvodi proizvedeni modifikacijom sirovog mlijeka djelovanjem mikroorganizama. Za proizvodnju fermentiranih mlijeka koja se okusom, teksturom i dužinom održivosti na policama razlikuju, najčešće se koriste bakterije ali se mogu koristiti i kvasci i plijesni. Između bakterijskih vrsta, bakterije mliječne kiseline (BMK) najčešće su korištene vrste. Kvasci i plijesni imaju nezamjenjivu ulogu u fermentacijama mlijeka gdje je za fermentirano mlijeko važno stvaranje etanola ili nekih drugih organskih spojeva.

Proizvodnja fermentiranih mlijeka u svojoj osnovi se temelji na sposobnosti BMK fermentaciji laktoze (mliječni šećer) do mliječne kiseline koja je osnovno obilježje za sve proizvode. Mezofilne bakterije mliječne kiseline *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Pediococcus* spp. koriste se za proizvodnju fermentiranih mlijeka gdje se inkubacija mlijeka provodi na temperaturama između 20 i 30 °C. Kada su za fermentaciju mlijeka potrebne više temperature (40 - 45 °C), kao u proizvodnji jogurta koriste se termofilne bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus* spp. i *Streptococcus* spp. Svojim osnovnim metabolizam sve te bakterijske

vrste u optimalnim uvjetima proizvodnje složenim biokemijskim reakcijama stvaraju metabolite koji osiguravaju senzornu kvalitetu proizvoda. Pažljivom selekcijom bakterijskih sojeva unutar i između vrsta BMK osigurava se identitet svakoga pojedinoga fermentiranog mlijeka.

Za proizvodnju kefira i kumisa, uz BMK koriste se i kvasci *Saccharomyces* spp., *Torula* spp. ili *Candida* spp. Bakterije mliječne kiseline razgrađuju laktozu u mliječnu kiselinu (50 - 96 %), a kvasci u etanol i druge organske komponente. Uz bakterije mliječne kiseline za proizvodnju skandinavskoga fermentiranog mlijeka – viilija koristi se i plijesan *Geotrichum candidum*. Plijesan *Geotrichum candidum*, za razliku od kvasaca koji se koriste u proizvodnji kefira i kumisa, ne fermentira laktozu već u proizvodnji viilija ima prvenstveno zaštitnu i lipolitičku ulogu.

Posljedično različitom mikrobnom utjecaju na fermentaciju, može se tvrditi da su osnovna i specifična obilježja svakoga fermentiranog mlijeka rezultat zajedničkog djelovanja specifičnih mikroorganizama i uvjeta proizvodnje koji osiguravaju optimalne uvjete za njihov rast i razmnožavanje.

Glavnina fermentiranih mlijeka u cijelom se svijetu proizvodi od kravljeg mlijeka. No, ona se u značajnim količinama proizvode i od ovčjega, kozjeg, mlijeka bivolice i kobiljeg mlijeka, a rjeđe se koriste mlijeko jaka, devino, mlijeko magarice i sobovo mlijeko. Također, u proizvodnji fermentiranih mlijeka istovremeno se može koristiti i mješavina različitih vrsta mlijeka.

1.3.1.

Definicija

Fermentirana mlijeka prema svojoj definiciji su proizvodi pripremljeni od punomasnog, djelomično ili potpuno obranog mlijeka, koncentriranog mlijeka ili mlijeka supstituiranog iz djelomično ili potpuno obranog mlijeka u prahu, nehomogeniziranog ili homogeniziranog pasteriziranog ili steriliziranog mlijeka

djelovanjem specifičnih mikroorganizama. U mlijeko dodana mikrobna populacija snižava pH s koagulacijom ili bez koagulacije mlijeka. Metaboličke supstancije nastale mikrobnim djelovanjem i dodana mikrobna populacija moraju biti prisutni u proizvodu do vremena njegove održivosti na policama. Međusobno, fermentirana se mlijeka razlikuju okusom, teksturom i postojanošću u odnosu na originalnu sirovinu. Proizvod ne smije sadržavati patogene mikroorganizme.

Osnovnu definiciju fermentiranih mlijeka Međunarodna mljekarska federacija [engl. *International Dairy Federation*; franc. *Fédération Internationale du Lait* (FIL-IDF)] prihvatila je 1969. godine. Na prijedlog znanstvenika Franka V. Kosikowskog definicija je 1984. godine dopunjena zahtjevom o nužnosti prisutnosti živih organizama u proizvodu do vremena njegove održivosti. Od tog vremena definicija fermentiranih mlijeka nije mijenjana, primjenjuje se u cijelom svijetu i odnosi se isključivo na fermentirana mlijeka tekuće i polučvrste konzistencije.

Od 2003. godine, uz definiciju za opis fermentiranih mlijeka kao zajednički dokument Međunarodne mljekarske federacije (IDF) i Codex Alimentarius organizacije prihvaćen je i primjenjuje se standard za fermentirana mlijeka - CODEX STAN 243-2003. Prema tom standardu, fermentirana mlijeka definirana su specifičnom mikrobnom kulturom koja se koristi za fermentaciju (I), teksturom (II) ili okusom (III). Posebnu skupinu proizvoda prema istom standardu čine fermentirani napitci (IV).

I. Fermentirana mlijeka definirana specifičnom kulturom

Specifična mikrobna kultura definira jogurt, jogurtu srodne vrste, acidofil, kefir i kumis (tablica 1.2.). Za proizvodnju ostalih vrsta fermentiranih mlijeka, osim navedenih, smiju se koristiti i druge mikrobne vrste.

II. Fermentirana mlijeka definirana teksturom

Fermentirana mlijeka definirana teksturom su koncentrirana fermentirana mlijeka s udjelom proteina od najmanje 5,6 %, bilo da se koncentracija proteina mlijeka povećava prije ili nakon fermentacije. Koncentrirana fermentirana mlijeka pripadaju skupini tradicionalnih fermentiranih mlijeka poput labneha, ymera i ylettea.

III. Fermentirana mlijeka definirana okusom

Fermentirana mlijeka definirana okusom ili aromatizirana fermentirana mlijeka su kompozitna (mješovita) fermentirana mlijeka koja ne smiju sadržavati više od 50 % nemliječnih komponenti (prirodna i umjetna sladila, voće i povrće, sokove, voćne pire, voćne kaše, pripremljene i obrađene pripravke žitarica, meda, čokolade, lješnjake, kavu, začine i druge neškodljive hranjive tvari, te prirodne i umjetne arome). Nemliječne komponente smiju se dodati prije fermentacije ili nakon fermentacije.

Tablica 1.2.

	Fermentirano mlijeko	Mikrobna kultura
Fermentirana mlijeka definirana mikrobnom kulturom	Jogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> i <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	Jogurtu srodne vrste	<i>Streptococcus thermophilus</i> i druge <i>Lactobacillus</i> vrste
	Acidofil	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
(CODEX STAN 243-2003., revidiran 2008., 2010.)	Kefir	pripremljen od kefirnih zrna: <i>Lactobacillus kefiri</i> i vrsta rodova <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> i <i>Acetobacter</i> koji rastu u jakom simbiotskom odnosu, laktoza fermentativni kvasci (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) i nefermentativni kvasci (<i>Saccharomyces uniporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i <i>Saccharomyces exiguus</i>)
	Kumis	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> i laktoza fermentativni kvasci <i>Kluyveromyces marxianus</i>

Tablica 1.3.

Svojstvo	Fermentirano mlijeko	Jogurt/ jogurtu srodne vrste/acidofil	Kefir	Kumis	
Kvalitativna i kvantitativna svojstva fermentiranih mlijeka	Protein* (% w/v)	min. 2,7	min. 2,7	min. 2,7	–
	Mliječna mast (% w/v)	< 10	< 15	< 10	< 10
	Titracijska kiselost izražena u % mliječne kiseline (% vol./w)	min. 0,3	min. 0,6	min. 0,6	min. 0,7
	Etanol (% vol./w)	min. 0,5	–	–	–
	Ukupan broj mikroorganizama iz sastava kulture (cfu/mL)	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷	min. 10 ⁷
	Kvasci (cfu/mL)	–	–	min. 10 ⁴	min. 10 ⁴

* udjel proteina od 6,38 pomnožen s ukupnim dušikom utvrđenim metodom po Kjeldahlu;

** primjenjuje se u slučajevima dodatka specifičnih mikroorganizama uz osnovnu kulturu (npr. probiotičke bakterijske sojeve). (CODEX STAN 243–2003., revidiran 2008., 2010.)

IV. Fermentirani mliječni napitci

Fermentirani mliječni napitci su kompozitni (mješoviti) proizvodi koji se dobivaju miješanjem fermentiranih mlijeka s pitkom vodom, s dodatkom ili bez dodatka drugih sastojaka poput sirutke, drugih nemliječnih sastojaka i aroma. Fermentirani mliječni napitci moraju u svom sastavu sadržavati najmanje 40 % fermentiranog mlijeka.

Standardom za fermentirana mlijeka propisane su i kvalitativne i kvantitativne karakteristike fermentiranih mlijeka. Minimalni fizikalni, kemijski i mikrobiološki zahtjevi kojima fermentirana mlijeka moraju udovoljavati sažeti su u tablici 1.3.

Za aromatizirana fermentirana mlijeka i fermentirane mliječne napitke kvalitativni i kvantitativni kriteriji navedeni u tablici 1.3. primjenjuju se jedino za udjel fermentiranog mlijeka sadržanog u proizvodu. Izdvajanje sirutke iz proizvoda nakon fermentacije nije dopušteno osim u proizvodnji koncentriranih fermentiranih mlijeka. Mikrobiološki kriteriji važeći su do minimalnog vremena održivosti proizvoda u kontroliranim uvjetima pohrane.

Prihvatanjem Codex Alimentarius standarda (CODEX STAN 243-2003.) za fermentirana mlijeka osigurana je dodatna zaštita potrošača, a pošteno tržišno natjecanje u prometu fermentiranih mlijeka unaprijeđeno.

1.3.2.

Klasifikacija

Osim jogurta kao najznačajnijeg i najpoznatijega fermentiranog mlijeka, danas se na tradicionalan ili industrijski način u svijetu proizvodi približno 400 različitih vrsta fermentiranih mlijeka. Međutim, točnija je tvrdnja da je različitih fermentiranih mlijeka svega nekoliko i da je zapravo riječ o vrlo sličnim proizvodima s različitim lokalnim (generičkim) imenima. Zajednička je karakteristika za sva fermentirana mlijeka razgradnja laktoze u mliječnu kiselinu djelovanjem bakterija mliječne kiseline ili bifidobakterija i rjeđe kvasaca. Njihovi bazični metabolizmi osiguravaju metabolite neophodne za kompleksne biokemijske i kemijsko-fizikalne interakcije kojima nastaju specifični okus, miris i tekstura proizvoda. Na temelju metaboličkih produkata nastalih fermentacijom prema Robinsonu i Tamimu (1990.) sva fermentirana mlijeka moguće je najtočnije podijeliti u tri različite osnovne skupine (I, II, III).

I. Fermentirana mlijeka s dominantnom mliječnom fermentacijom

Fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu za tu skupinu fermentiranih mlijeka nastaje djelovanjem mezofilnih ili termofilnih bakterija iz sastava mikrobnih

kultura. Pažljivom selekcijom sojeva određenih mikrobnih vrsta u sastavu kultura i izborom optimalne temperature fermentacije osiguravaju se identitet i senzorna kvaliteta svakoga pojedinačnog proizvoda. Kiselo mlijeko primjer je mezofilne, a jogurt i acidofilno mlijeko termofilne fermentacije. U cijelom su svijetu fermentirana mlijeka s dominantno mliječnom fermentacijom najbrojnija skupina te vrste proizvoda:

- kiselo mlijeko, filmjölk, tätmjök, långofil
- jogurt, bugarsko kiselo mlijeko, zabadi, dahi
- acidofilno mlijeko, yakult, AB kultura, ABT kultura, onaka, actimel, bioaktiv, vivis.

U skupinu proizvoda s dominantno mliječnom fermentacijom spadaju i koncentrirana fermentirana mlijeka, gdje se različitim metodama iz fermentiranog mlijeka u većem ili manjem postotku uklanja sirutka. Najpoznatiji su predstavnici te skupine fermentiranih mlijeka grčki jogurt, tätte, ymer, skyr i labneh. Zbog ocijeđenog dijela sirutke, koncentrirana fermentirana mlijeka imaju značajno veći udjel suhe tvari (~ 23 - 25 %). Također, za skandinavsku koncentrirana fermentirana mlijeka tätte, ymer i viili i irskog skyra karakteristična je sluzava gusto viskozna tekstura. Ta se skupina fermentiranih mlijeka proizvodi korištenjem različitih vrsta mezofilnih bakterija mliječne kiseline, od kojih mnoge vrste imaju sposobnost stvaranja egzopolisaharida. Koncentrirani grčki jogurt i labneh proizvode se korištenjem različitih vrsta termofilnih BMK, a zbog većeg udjela mliječne masti (~ 10 %) njihova je konzistencija gusto kremasta.

II. Fermentirana mlijeka s mliječnom i alkoholnom fermentacijom

Fermentirana mlijeka te skupine proizvode se zajedničkim djelovanjem BMK i kvasaca koji čine specifičnu asocijaciju mikroorganizama povezanih u simbiotski ili kooperativni odnos. Fermentirana mlijeka za koja je karakteristična istodobna mliječna i alkoholna fermentacija su:

- kefir
- kumis
- acidofilno - kvaščevo mlijeko.

III. Fermentirana mlijeka s mliječnom fermentacijom uz sudjelovanje plijesni

Uz mliječnu fermentaciju istovremena fermentacija djelovanjem plijesni specifična je jedino za proizvodnju finskoga fermentiranog mlijeka - viilija. Plijesan *Geotrichum candidum* raste na površini proizvoda u formi "pokrova", i osim lipolitičkog djelovanja na mliječnu mast ima za proizvod zaštitnu funkciju. Stvoreni "pokrov" na površini sprječava kontaminaciju proizvoda mikroorganizmima uzročnicima kvarenja.

Fizikalna struktura i udjel mliječne masti

Fermentirana mlijeka mogu se klasificirati i prema svojim fizikalnim osobinama. Neovisno o vrsti, razlikujemo četiri osnovna fizikalna oblika fermentiranih mlijeka: tekuća, čvrsta, koncentrirana i osušena. Klasifikacija fermentiranih mlijeka u različite skupine provodi se i na temelju kemijskog sastava (najčešće % mliječne masti) i okusa:

- punomasna (ne manje od 3,25 % masti), djelomično obrana (ne manje od 0,5 %, ali ne više od 2 % masti) i obrana fermentirana mlijeka (ne više od 0,5 % masti)
- prirodna ili okusa po dodatku; fermentirana mlijeka s dodatkom voća, povrća, žitarica i slično, aromatizirana fermentirana mlijeka, zaslađena fermentirana mlijeka i slično.

Temeljeno na klasifikaciji prema fizikalnim osobinama i svojstvu okusa, na primjeru jogurta prikazane su njegove varijante:

- čvrsti jogurt - jogurt kojemu se gel-struktura isključivo formira fermentacijom u prodajnoj ambalaži posljedica čega je čvrsta konzistencija, jede se žlicom
- tekući jogurt - jogurt kojemu se gel-struktura najprije formira u velikim spremnicima, potom se formirani jogurti gel mehanički razbija i puni u prodajnu ambalažu a konzistencijom u odnosu na čvrsti jogurt je manje čvrst
- pitki jogurt - jogurt koji se od tekućeg jogurta razlikuje rjeđom konzistencijom budući da se za njegovu proizvodnju nakon završene fermentacije

i mehaničkog razbijanja gel-strukture dodatno još jedanput homogenizira prije punjenja u prodajnu ambalažu

- pitki zaslađeni jogurt - jogurt koji za razliku od standardnog pitkog jogurta sadrži šećere umiješane u mlijeko radi poželjne gustoće, i često dodatke okusa (voće ili voćni sirup); proizvod zbog dodanog šećera ima višu pH-vrijednost i kraću održivost na policama (4 - 10 dana); djelomično izdvojena sirutka na površini proizvoda njegova je svojstvena karakteristika
- voćni jogurt - jogurt kojem su dodani voće ili voćni pripravci a mogu biti raspoređeni na vrhu ili na dnu (čvrsti jogurt), ili su umiješani u proizvod (tekući jogurt)
- zamrznuti jogurt - jogurt koji se nakon proizvodnje standardnog jogurta zamrzava, obično u kontinuiranim zamrzivačima
- osušeni jogurt - jogurt u prahu koji se nakon proizvodnje standardnog jogurta dobiva sprej-potupkom sušenja
- filtrirani jogurt - jogurt koja se filtrira kroz platneni ili papirnati filter radi uklanjanja sirutke i postizanja kremaste konzistencije, i izraženijeg ("pikantnijeg") okusa, a neke od tih varijanti dodatno se zbog uklanjanja sirutke zagrijevaju u otvorenim spremnicima (primjerice mishti dahi - popularni desert u Indiji)
- dahi/dadhi/dahee - jogurt proizveden od vodom razrijeđenog mlijeka bivolice koji fermentira u bambusovu drvetu (Indija)
- leban/labani/rayeb - filtrirani jogurt kojem se mogu dodati maslinovo ulje, masline, različito začinsko bilje i komadići krastavca, dodatno se može zgušćivati i formirati u kuglice, konzervirati u maslinovu ulju i dodatno fermentirati nekoliko tjedana (arapske zemlje).

Nakon proizvodnje, očekivani je vijek održivosti za standardna fermentirana mlijeka 4 - 7 tjedana. Nutritivna vrijednost proizvoda u tom razdoblju osigurava se hladnom pohranom proizvoda do potrošnje na temperaturi između 2 i 6 °C. Kako se radi o "živom

proizvodu", s vremenom dolazi do blagog povećanja kiselosti (~ 0,2 % mliječne kiseline) i otprilike za 1 log jedinicu dolazi do smanjenja broja živih bakterija iz sastava kulture.

Vijek održivosti zamrznutog jogurta je od 6 do 12 mjeseci. Očekivano, gubitak živih bakterijskih stanica u proizvodu na kraju vijeka održivosti je između 1 i 2 log jedinice. Formirani kristali leda nastali uslijed zamrzavanja proizvoda u određenom postotku oštećuju membranu bakterijskih stanica a posljedično tome broj živih bakterija na kraju vijeka održivosti je smanjen.

1.4.

Hranjiva i fiziološka vrijednost

Općenito, hranjiva vrijednost hrane pa tako i fermentiranih mlijeka definira se udjelom i biološkom vrijednošću za organizam raspoloživih pojedinačnih sastojaka. Nasuprot hranjivoj, pojam fiziološka vrijednost hrane odnosi se na količinu određenih nutrijenata sadržanih u hrani koji su neophodni za normalno funkcioniranje organizma. Svaki od tih fiziološki važnih nutrijenata u organizmu ima jednu ili više funkcija: (i) energetska, (ii) gradivna ili (iii) regulacijsko-zaštitna. U tom smislu, u usporedbi sa sirom i mlijekom, fermentirana mlijeka zbog sastava i udjela pojedinih nutrijenata koje sadržavaju imaju veću hranjivu i funkcionalnu vrijednost.

U kontekstu opisa fiziološke vrijednosti pojedinačnih sastojaka fermentiranih mlijeka koristi se i pojam nutraceutici. Naziv nutraceutik izveden je iz riječi *hranjiva* (nutritivna) i riječi *farmaceutska* (u smislu lijeka ili farmaceutskog spoja). Nutraceutici svojim specifičnim fiziološkim djelovanjem sudjeluju u dobrobiti funkcioniranja humanog organizma. Između ostalog, fermentirana mlijeka zbog specifičnog djelovanja BMK ili bifidobakterija u usporedbi s mlijekom sadrže više koncentracije nutraceutika. Prvenstveno se

to odnosi na više koncentracije niskokaloričnih šećera poput sorbitola i manitola, i oligosaharida i folne kiseline (vitamin B₉).

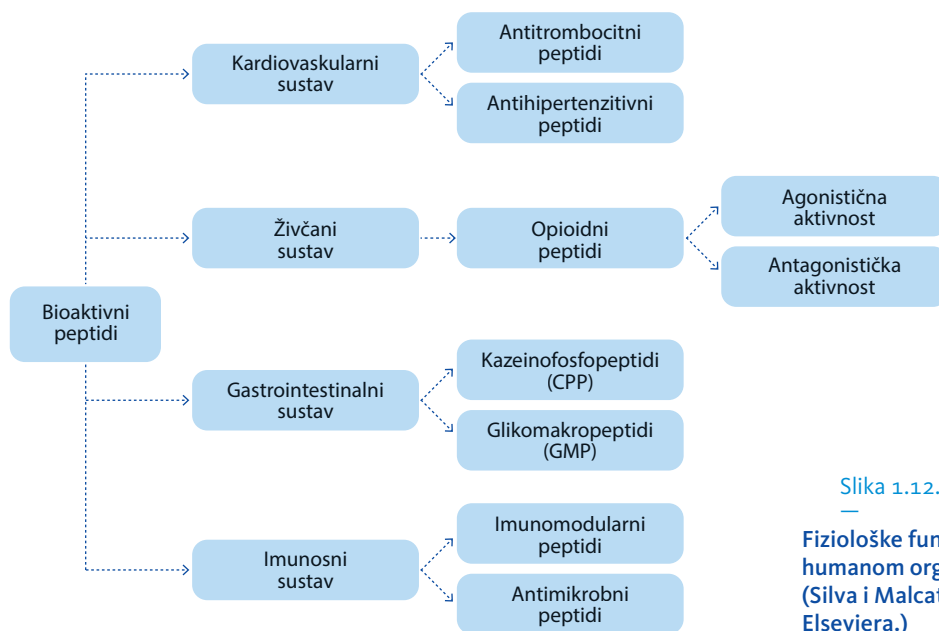
U proizvodnji sira, izdvajanjem sirutke gube se neki od prehrambeno značajnih sastojaka mlijeka, osobito proteini sirutke i vitamini topljivi u vodi. Suprotno, u proizvodnji fermentiranih mlijeka u finalnom su proizvodu sačuvani gotovo svi prirodni sastojci mlijeka. Drugim riječima, fermentirana mlijeka sadrže približno devet različitih vrsta proteina, osam različitih vrsta lipida, sve mikroelemente i makroelemente, vitamine topljive u vodi i laktozu i glukozu. Istodobno, promjenama pojedinih sastojaka mlijeka (prvenstveno laktoze, proteina i djelomično mliječne masti) tijekom fermentacije, fermentirana mlijeka u odnosu na mlijeko znatno su probavljivija. Bolja probavljivost fermentiranih mlijeka u usporedbi s mlijekom primarno je uvjetovana stvorenom mliječnom kiselinom (~ 0,95 - 1,20 %). Mliječna kiselina potiče izlučivanje želučanih sokova i ubrzava probavu u želucu. Zbog toga se značajno poboljšava ne samo njihova probavljivost, već i probavljivost ostale konzumirane hrane. Osim toga u ljudskom organizmu L(+) oblik mliječne kiseline, koju fermentirana mlijeka sadrže između 50 i 90 %, sudjeluje u sintezi glukoze i glikogena. Nakon fermentacije preostala laktoza i galaktoza, koje se razgrađuju sporije od glukoze, također su zaslužne za poboljšavanje samog procesa probave. Galaktoza sadržana u fermentiranom mlijeku, između ostalog, sudjeluje u sintezi živčanoga i moždanog tkiva.

Udjel proteina u komercijalnim vrstama fermentiranih mlijeka općenito je viši u usporedbi s mlijekom. Zbog poboljšanja prvenstveno reoloških svojstava proizvoda, suha tvar bez masti (**Sbm**) se obogaćuje dodatcima poput obranog mlijeka u prahu, kazeina, proteinima sirutke, ili se ono mehanički koncentrira. Posljedica toga je povećanje ne samo udjela proteina u finalnom proizvodu, već i veće biodostupnosti dijetalnog dušika (~ 93 %). Biodostupnost obaju proteina, kazeina i proteina sirutke koji su bogati izvori svih esencijalnih aminokiselina, očituje se njihovom brzom razgradnjom u humanom probavnom sustavu. Brža razgradnja proteina mlijeka posljedica je njihove

parcijalne digestije sve do vremena održivosti proizvoda, koja se događa zbog nepromijenjene aktivnosti bakterijskih proteolitičkih enzima. Također, zbog bakterijske proteolize proteina mlijeka koncentracija slobodnih aminokiselina u fermentiranom mlijeku udvostručuje se u prvih 24 sata, ali se i dalje povećava sve do kraja vijeka održivosti proizvoda (~ 10 - 28 dana). Apsolutna koncentracija slobodnih aminokiselina u finalnom proizvodu je određena vrstom mlijeka, bakterijskom asimilacijom i proteolizom. Kravlje mlijeko sadrži približno 3,3 - 10,3, ovčje 3,8, a kozje 21 mg 100 mL⁻¹ slobodnih aminokiselina. U usporedbi s kravljim i ovčjim, kozje mlijeko sadrži i značajno više koncentracije alanina, glicina, glutaminske kiseline, serina i treonina. Na kraju fermentacije aminokiseline poput glutaminske kiseline, prolina i u manjoj mjeri alanina i serina fermentirano mlijeko sadrži u značajnijoj koncentraciji u odnosu na ostale aminokiseline koje tijekom fermentacije koriste bakterije iz sastava kultura. U konačnici, ukupna koncentracija slobodnih aminokiselina koje humani organizam može direktno iskoristiti je u fermentiranom mlijeku od kravljeg približno 19 - 33, od ovčjeg 18,5, a od kozjeg mlijeka 33,5 mg 100 mL⁻¹.

Posljedica proteolize proteina mlijeka djelovanjem BMK ili bifidobakterija je i formiranje bioaktivnih peptida ili specifičnih fragmenata proteina mlijeka. Proteini mlijeka unutar svoje primarne sekvence u mlijeku su neaktivni, ali djelovanjem bakterija iz sastava kultura iz neaktivnih proteina deriviraju se bioaktivni peptidi. Oni za humani organizam, osobito derivati kazeina, β-laktoglobulina i α-laktalbumina, osim hranjive vrijednosti imaju i različite fiziološke funkcije. Tako je utvrđeno da bioaktivni peptidi poput inhibitora angiotenzin konverzijskih enzima (**ACE**) i kazeinfosopeptidi (**CPP**) u humanom organizmu imaju povoljan učinak na kardiovaskularni, gastrointestinalni, imunosni i živčani sustav (slika 1.12.).

Studije su pokazale da u renin-angiotenzinskom sustavu ACE pretvaraju angiotenzin I u angiotenzin II koji je jak vazokonstriktor. U isto vrijeme, angiotenzin uzrokuje razgradnju bradikina koji je vazodilatator. Angiotenzin II djeluje na nadbubrežnu žlijezdu, što



Slika 1.12.

Fiziološke funkcije bioaktivnih peptida u humanom organizmu deriviranih iz kazeina. (Silva i Malcata, 2005., s dopuštenjem Elseviera.)

uzrokuje lučenje aldosterona koji pospješuje izlučivanje K^+ i H^+ iona iz bubrega uz istovremeni unos Na^+ iona u bubrege. Takva izmjena iona uzrokuje lučenje enzima renina, koji djeluje na angiotenzinogen i pretvara ga u angiotenzin I. Inhibitori ACE sprječavaju pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II, kao i razgradnju bradikininina, a posljedica je snižavanje krvnog tlaka. Kazeinofosfopeptidi (CPP) također su kao i ACE inhibitori derivati kazeina, ali oni u svojoj strukturi sadrže fosfor koji je preko monoestera vezan na serilnu skupinu (skupina enzima transferaza). Zbog fosforilacije, negativan naboj molekule omogućava vezanje makroelemenata poput Ca, Mg i Fe, i mikroelemenata poput Zn, Se, Co, Cr i Ni iz mlijeka za strukturu CPP. Makroelementi i mikroelementi vezani za CPP zadržavaju svoju topljivost u probavnom sustavu, što povećava njihovu apsorpciju.

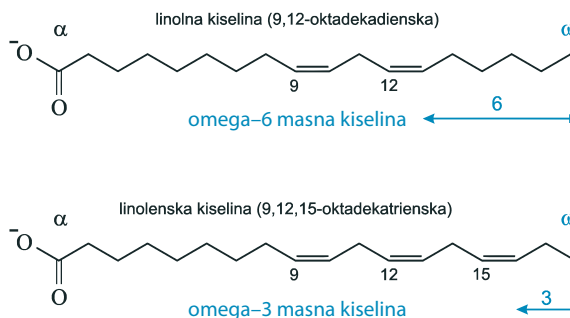
Bioaktivnim peptidima koji se deriviraju iz proteina sirutke β -laktoglobulina (β -Lg) i α -laktalbumina (α -La) također se pripisuju mnogobrojni pozitivni fiziološki učinci. Osobito je značajna njihova uloga u

metabolizmu masti i opioidna aktivnost. Velika je vjerojatnost da β -Lg participira u digestiji lipida povećanjem aktivnosti pregastične lipaze tako da veže masne kiseline koje inhibiraju djelovanje tog enzima. Bioaktivni peptidi β -Lg, a osobito β -laktorfin (tetrapeptid), u organizmu se ponašaju slično endogenim opioidnim receptorima i mogu pomoći u ublažavanju i blokiranju boli. Intenzitet boli je najjači neposredno nakon javljanja, a poslije se smanjuje (organizam se privikava na bol). Mehanizam prilagodbe organizma na bol temelji se na lučenju unutarnjih analgetika poput enkefalina, endorfina ili dinorfina koji svojim vezanjem na opioidne receptore ublažavaju i blokiraju daljnju bol. Opioidni receptori uglavnom su smješteni u središnjem živčanom i probavnom sustavu. Osim ublažavanja boli, opioidni receptori sudjeluju i u nizu drugih funkcija, od kojih su možda najvažnije sposobnost vezanja spojeva za poboljšanje raspoloživanja i sedativni učinak. Također, bioaktivni β -laktorfin poboljšava arterijsku funkciju i vaskularnu relaksaciju u odraslih osoba.

Biološka funkcija derivata α -La, kako se pretpostavlja, ogleda se prvenstveno u sposobnosti poboljšanja kognitivnog ponašanja u stresnim situacijama. Derivati α -La povećavaju koncentraciju triptofana u krvnoj plazmi, koji je prekursor izlučivanju serotonina iz mozga. Kliničke studije upućuju na to da bioaktivni peptidi α -La mogu povoljno utjecati i na ublažavanje simptoma poremećaja sna u odraslih osoba. Osim toga, zbog visokog stupnja homolognosti u aminokiselinskom sastavu s humanim α -La, α -laktalbumin kravljeg mlijeka se može koristiti i kao idealan ingredijent u prehrani male djece.

Veća probavljivost mliječne masti sadržane u fermentiranom mlijeku posljedica je oslobađanja esterskih vezova iz membrana globula mliječne masti tijekom fermentacije. Zbog izmijenjene membranske strukture masne globule, fermentirano mlijeko u usporedbi s mlijekom tako sadrži veći udjel slobodnog lecitina (fosfolipida). Lecitin je ključni spoj u metabolizmu masti u jetrima i održavanju fiziološke razine kolesterola u krvi. Bolja probavljivost mliječne masti uvjetovana je i većim udjelom kratkolančanih masnih kiselina (do 6 ugljika) i srednjelančanih masnih kiselina (do 10 ugljika) u triacilglicerolima membrana masnih globula. One povoljno djeluju na metabolizam masti i osiguravaju biološku ekonomičnost oksidacije masnih kiselina u organizmu. U usporedbi s dugolančanim masnim kiselinama, srednjelančane masne kiseline (kapronska, kaprilna, kaprinska) ne vežu se za proteine i ne trebaju transportne proteinske sustave ili translokaze. Zbog toga su one u organizmu primarni izvor energije, preko β -oksidacije masti. Također, u metabolizmu masti srednjelančane masne kiseline inkorporiraju se u triacilglicerole masnog tkiva i reduciraju sekreciju lipoproteina i tako reguliraju razinu masti u krvi. Posljedično, kroz redukciju sekrecije lipoproteina i umanjenja triacilglicerol postprandijalnog odgovora srednjelančane masne kiseline sudjeluju i u regulaciji tjelesne težine, a osobito u smanjenju tjelesnih masnih naslaga. U organizmu mogu ublažiti intestinalne ozljede i štiti jetra od hepatotoksičnosti. Biokemijskim promjena mliječne masti koje se događaju tijekom fermentacije, fermentirana mlijeka sadrže

i značajno višu koncentraciju slobodnih masnih kiselina koje ljudski organizam može odmah iskoristiti. Ukupna koncentracija slobodnih masnih kiselina u jogurtu proizvedenom od kravljeg mlijeka je približno 2500 $\mu\text{g g}^{-1}$, a u jogurtu proizvedenom od ovčjeg mlijeka 4900 $\mu\text{g g}^{-1}$ masti. Korištenjem termofilne kulture (jogurt, probiotički jogurt) koncentracija laurinske ($C_{12:0}$), miristinske ($C_{14:0}$), palmitinske ($C_{16:0}$), stearinske ($C_{18:0}$) i oleinske ($C_{18:1}$) viša je u odnosu na proizvode proizvedene mezofilnom kulturom (kiselo mlijeko, kefir). Međutim, kiselo mlijeko i kefir sadrže značajno višu koncentraciju octene ($C_{2:0}$) i maslačne ($C_{4:0}$) kiseline, čija je funkcija u organizmu dokazano zaštitna.



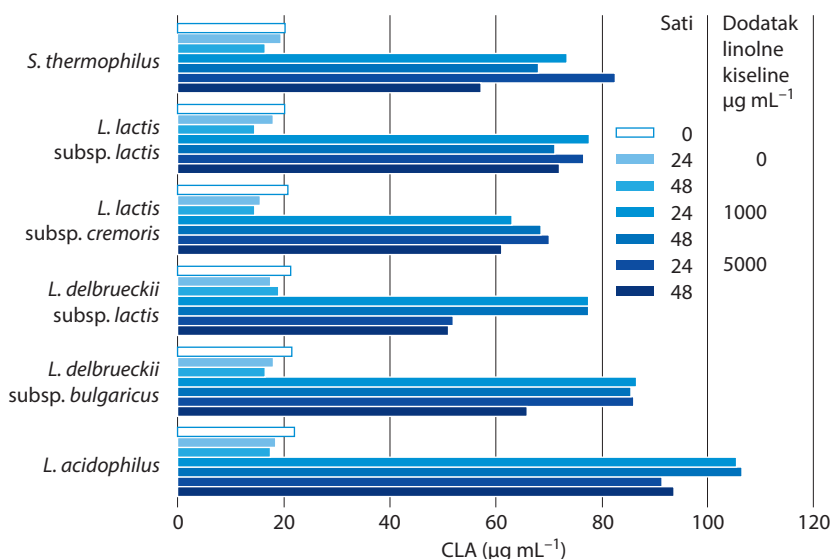
Slika 1.13.

Schematski prikaz konfiguracije konjugirane linolne kiseline (CLA) ili omega-3, 6 masne kiseline. (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=omega-3+masne+kiseline>.)

Osim navedenih slobodnih masnih kiselina, fermentirana mlijeka sadrže i konjugirane linolne kiseline (CLA) ili omega-3, 6, 9 masne kiseline, koje u humanom organizmu iskazuju različite fiziološke učinke. Pojam CLA odnosi se na pozicijski i geometrijski oblik izomera oktadekadienske kiseline ($C_{18:2}$) s konjugiranim dvostrukim vezovima u rasponu od 6,8 do 12,14 (slika 1.13.). Za svaki pozicijski izomer moguća su četiri geometrijska para izomera (*cis, trans*; *trans, cis*; *cis, cis* i *trans, trans*). U tom smislu CLA

Slika 1.14.

Koncentracija konjugirane linolne kiseline (CLA) u $\mu\text{g mL}^{-1}$ u fermentiranom mlijeku nakon dodatka linolne kiseline mlijeku u koncentraciji od 1000 i 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ovisno o korištenoj vrsti bakterija mliječne kiseline (Sieber i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)



prirodno postoje u 28 pozicijskih i geometrijskih izomera. Tako se razlikuju n-3 masne kiseline: 9,12,15-oktadekatrienska kiselina (α -linolna kiselina, 18:3n-3 - ALA), cis-ikoza-5,8,11,14,17- pentaenoična kiselina (eikosapentenska kiselina, 20:5n-3 - EPA) i cis-dokoza-4,7,10,13,16,19- heksaenoična kiselina (dokosaheksaenska kiselina, 22:6n-3 - DHA). Od ukupnog broja CLA, *cis*-9, *trans*-11 izomer CLA najzastupljeniji je i smatra se glavnim bioaktivnim izomerom u prehrani. Mliječna mast prirodno ga sadržava više od 90 %.

Prisutnost CLA u mliječnoj masti posljedica je izomerizacije i biohidrogenizacije nezasićenih masnih kiselina djelovanjem buražnih bakterija i aktivnosti enzima Δ^9 desaturaze u mliječnoj žlijezdi. Izomer *cis*-9, *trans*-11 CLA derivira se od linolne i α -linolenske kiseline. Međutim, njezina koncentracija u mliječnoj masti (2 - 37 mg g^{-1} masti) određena je hranidbom muznih životinja. Ako se krave hrane isključivo na paši, udjel CLA u mliječnoj masti je viši (~ 22,0 mg g^{-1} masti) u usporedbi sa 2/3 pašnog obroka (~ 14,0 mg g^{-1} masti) i sa 1/3 pašnog obroka (~ 9,0 mg g^{-1} masti). Također, od ukupnih masnih kiselina u mlijeku krava koje se hrane na paši, *cis*-9, *trans*-11 CLA zastupljena je približno sa 51,0 - 54,0 mg g^{-1} ukupnih masnih kiselina.

U fermentiranom mlijeku BMK i bifidobakterije koje se koriste u sastavu kultura, poput buražnih bakterija, imaju sposobnost formiranja CLA iz slobodne linolne kiseline. Zbog toga se neovisno o udjelu mliječne masti u mlijeku udjel ukupnih CLA u fermentiranom mlijeku dodatno povećava prosječno 0,9 - 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$. Znatnije povećanje udjela CLA od približno 3 $\mu\text{g g}^{-1}$ u fermentiranom mlijeku postiže se i dodatkom 0,1 % slobodne linolne kiseline mlijeku. Od ukupnih CLA povećanje *cis*-9, *trans*-11 CLA inducirano dodatkom slobodne linolne kiseline potvrđeno je za šest bakterijskih vrsta BMK koje čine uobičajeni sastav kultura. Pokus je proveden tako da su istraživane bakterijske vrste inokulirane u mlijeko pripremljeno od 120 g L^{-1} obranog mlijeka u prahu (12 % w/v) u koji nije dodana linolna kiselina, ili je ona dodana u koncentraciji od 1000 i 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Uzorci mlijeka, ovisno o bakterijskoj vrsti, inkubirani su na temperaturi od 26 ili 37 °C/24 - 48 sati. Najznačajnije povećanje koncentracije *cis*-9, *trans*-11 CLA (21,5 - 107 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nakon fermentacije od 24 sata utvrđeno je za slučajeve ako je linolna kiselina dodana u koncentraciji od 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Izmjerene koncentracije *cis*-9, *trans*-11 CLA za šest testiranih bakterijskih vrsta prikazane su slikom 1.14.

Nedavni dokazi da CLA stvaraju i bakterijske vrste intestinalnog humanog sustava, osobito bifidobakterije potaknuli su kreiranje novih kultura. Prvenstveno onih koje sadrže sojeve *Bifidobacterium* spp. koji su sposobni izomerizirati slobodnu linolnu kiselinu i tako povećati koncentraciju CLA u jogurtu ili siru. Pretpostavlja se da je molekularnom modulacijom tih bakterijskih sojeva moguće ostvariti *in situ* izomerizaciju linolne kiseline i tako obogatiti fermentirane mliječne proizvode biodostupnim CLA. Općenito se smatra kako postoji velika vjerojatnost da metabolički aktivne CLA u humanom organizmu imaju terapijski učinak u ublažavanju: (i) metaboličkih tegoba uzrokovanih bolestima jetre (masne jetre koje nisu izazvane alkoholom), (ii) kroničnim autoimunim upalnim bolestima crijeva (Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa), ali i (iii) određenih vrsta alergija. Naime, CLA imaju sposobnost mijenjanja sastava masnih kiselina u jetrima i masnom tkivu domaćina tako da povećavaju razinu CLA ili se ugrađuju u fosfolipide membrana tih tkiva zamjenjujući druge polinezasićene masne kiseline. Izmijenjeni sastav masnih kiselina uzrokuje promjenu staničnog metabolizma i posljedično signalnog imunskog odgovora domaćina. Ublažavanje upalnih procesa u organizmu nastaje tako da CLA reduciraju TNF- α (tumor-nekrotizirajući faktor) i IFN- γ (interleukin gama), uz istodobno povećanje razine interleukina (IL-1 β i IL-10). Osim toga, istovremenim metaboličkim reakcijama CLA povećavaju razinu imunoglobulina IgA i IgM, a snižavaju razinu IgE.

Cjeloviti pretpostavljeni fiziološki učinak fermentiranih mlijeka na humani organizam objedinjuje slika 1.15.

Međutim, treba istaknuti da istovremeni dodatak šećera, poput saharoze ili fruktoze koji se koriste u voćnim i aromatiziranim varijantama jogurta, inhibira bakterijsku hidrogenizaciju linolne kiseline.

Za dobro funkcioniranje humanog organizama posebno značenje ima i membrana masne globule (MMG) koja predstavlja jedinstveni biofiziološki koloidni sustav u prirodi. Poput svih bioloških membrana, čine je brojne bioaktivne molekule, poput polarnih



Slika 1.15.

Pretpostavljeni fiziološki učinak fermentiranih mlijeka na humani organizam.
Detalji: BMK - Bakterije mliječne kiseline, EPS - egzopolisaharidi.

lipida, proteina, glikoproteina, kolesterola i enzima. Od čega polarni lipidi i proteini zajedno čine više od 90 % MMG. U usporedbi s triacilglicerolima sadržanim u unutrašnjem dijelu masne globule polarni lipidi, glicerofosfolipidi i sfingolipidi MMG sadrže veći udjel nezasićenih masnih kiselina, oleinske (C_{18:1}), linolne (C_{18:2}) arahidonske (C_{20:4}) i linolenske (C_{18:3}) ili omega-3 masne kiseline.

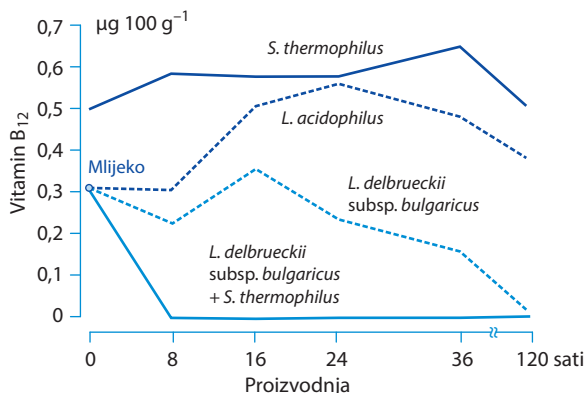
Istraživanja koja su potvrdila zaštitnu ulogu omega-3 masnih kiselina u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, upalnih bolesti crijeva, multiple skleroze, Alzheimerove bolesti i karcinoma navela su mnoge

ljude da te masne kiseline smatraju najboljim dodatkom u prehrani. Međutim, nedostaju fiziološke studije koje mogu odgovoriti na pitanja poput ispravne doze, potrebnog omjera između omega-3 i omega-6 masnih kiselina u organizmu i mogućih kontraindikacija ako se kombiniraju s drugim lijekovima, drugom hranom i biljnim preparatima. Drugim riječima, još uvijek nije odgovoreno na pitanje imaju li te masne kiseline uzimane kao dodatak prehrani negativne popratne učinke. Suprotno, koncentracije omega masnih kiselina u fermentiranom mlijeku znatno su niže a vjerojatnost da konzumiranje fermentiranih mlijeka pomaže u prevenciji nastanka određenih bolesti bez negativnih učinaka na zdrav organizam je na stanoovit način izvjesna.

Proteine MMG čini oko 40 različitih proteina, od kojih su mnogi glikoproteini. Glavni su glikoproteini MMG butirofilin, redoks enzim ksantin oksidaza/dehidrogenaza, i mucinu slični glikoproteini, laktdeherin i glikolizirani CD36 protein. Od neglikoproteina, MMG sadržava najviše adipofilin i proteine koji u svojoj strukturi sadrže masne kiseline.

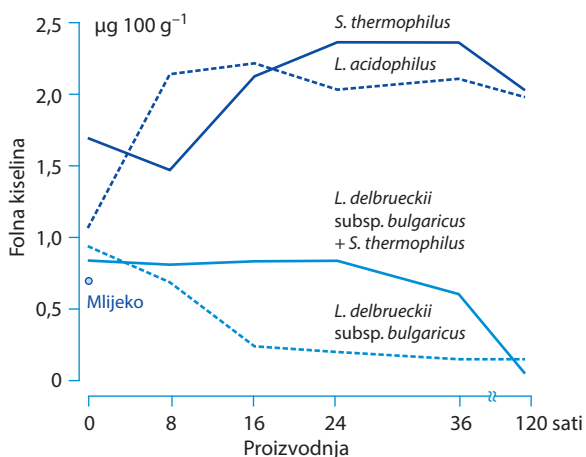
Osim polarnih lipida i proteina, na MMG su vezani i važni minerali mlijeka poput bakra i željeza, kobalta, mangana, molibdena i cinka. Također, vezani su i vitamini topljivi u mastima (A, D, E i K) i karotenoidi i različiti enzimi.

Koncentracija svih minerala sadržanih u mlijeku nakon fermentacije ostaje nepromijenjena u fermentiranom mlijeku. Posljedično, značajno niže pH-vrijednosti fermentiranog mlijeka većina je minerala, osobito kalcija, fosfora, magnezija i željeza, sadržana u ionskom obliku i njihova biodostupnost za čovjekov organizam je bolja. Jogurt u 100 g prosječno sadrži: 48 mg Na, 157 mg K, 120 mg Ca, 12 mg Mg, 92 mg P, 102 mg Cl i S, Fe, J, Cu, Mn, Co, F, Br i Zn u tragovima, što je u osnovi ekvivalentno njihovoj koncentraciji u mlijeku. Suprotno, na koncentraciju vitamina u fermentiranom mlijeku utječu tehnološki proces i naknadni uvjeti pohrane proizvoda. Temperatura inkubacije i vrijeme fermentacije ključni su za ravnotežu između vitamina koji se sintetiziraju i onih sadržanih u mlijeku koje utroše bakterije iz sastava kulture. Na



Slika 1.16.

Koncentracije kobalamina (B₁₂) u µg 100 g⁻¹ jogurta u odnosu na bakterijske vrste *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Blanc, 1984., s dopuštanjem FIL-IDF-a.)



Slika 1.17.

Koncentracije folne kiseline (B₉) u µg 100 g⁻¹ jogurta nastale metaboličkom aktivnošću bakterijskih vrsta *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Blanc, 1984., s dopuštanjem FIL-IDF-a.)

primjeru triju različitih bakterijskih vrsta koje se koriste u proizvodnji jogurta na slikama 1.16. i 1.17. prikazane su koncentracije vitamina kobalamina (B₁₂) i folne kiseline (B₉) u µg 100 g⁻¹ jogurta.

Tablica 1.4.	Nutrijent	Punomasni jogurt 3,2 (%)	5-god. djeca (%)	Žene (%)	Muškarci (%)
Hranjiva vrijednost jogurta (150 g) i količine (%) od preporučenih dnevnih potreba (prilagođeno prema McKinleyu, 2005.)	Protein (g)	8,6	44,4	18,6	15,7
	Folna kiselina(μg)	27,0	27,0	14,4	14,4
	Niacin (mg)	2,3	21,3	17,7	14,1
	Riboflavin (mg)	0,40	50,0	36,6	23,3
	Tiamin (mg)	0,09	13,0	11,5	9,0
	Vit. B12(μg)	0,3	37,8	19,8	19,8
	Kalcij (mg)	300,0	67,2	42,6	42,6
	Fosfor (mg)	255,0	72,6	46,0	46,3
	Magnezij (mg)	29,0	24,6	10,2	10,2
	Cink (mg)	1,1	16,5	11,0	11,0

Klasičan jogurt sadrži do 50 % niže koncentracije vitamina piridoksina (B₆), kobalamina (B₁₂), biotina (B₇) i pantotenske kiseline (B₅), ali zato sadrži i do 100 % višu koncentraciju folne kiseline (B₉), i veće koncentracije riboflavina (B₂) i tiamina (B₁) u odnosu na mlijeko. Folna je kiselina u humanom organizmu esencijalna za stvaranje eritrocita i sintezu purina, pirimidina i određenih aminokiselina, i sudjeluje u diobi stanica. Riboflavin (B₂) je esencijalan za oslobađanje energije u stanici, a tiamin (B₁) za metabolizam ugljikohidrata, neurološke i kardiovaskularne funkcije.

Svi sastojci fermentiranog mlijeka pojedinačno ili u kombinaciji imaju specifičnu hranjivu ili fiziološku funkciju u ljudskom organizmu. Zbog toga fermentirana mlijeka s potencijalno pozitivnim djelovanjem na ljudsko zdravlje pripadaju i skupini funkcionalne hrane. Za područje funkcionalne hrane krovne organizacije EU-a *European Functional Food Science Programme* (FUFOSE) i *International Life Science Institute of Europe* (ILSI) prihvatile su 1999. godine definiciju funkcionalne hrane a ona glasi: "Funkcionalna hrana je ona hrana koja osim osnovne hranjive vrijednosti ima i dodatno dokazan povoljan utjecaj na jednu ili više ciljanih funkcija u humanom organizmu tako da fiziološki potpomaže poboljšanje zdravlja i opće dobrobiti ili smanjenju rizika od nastanka bolesti. Mora ostati hranom i mora pokazivati dobrobit za organizam u količinama koje se očekivano konzumiraju". Hranjiva vrijednost i preporučene dnevne potrebe organizma za proteinima, mineralima i vitaminima prikazane su na primjeru punomasnog jogurta u tablici 1.4.

Općenito, ideja funkcionalne hrane je proizašla iz želje da se poboljša svakodnevna humana prehrana, a dostignućima u preradi hrane i biotehnologiji za to su stvorene mogućnosti. Novim tehnologijama prerade hrane moguće je za ljudski organizam obogaćivanjem ili modifikacijom određenog nutrijenta u hrani povećati njegovu biodostupnost i funkcionalnost. Između proizvoda funkcionalne hrane mlijeko i mliječni proizvodi u dizajniranju i razvijanju funkcionalnih svojstava čine najveću skupinu. Unutar skupine mliječnih proizvoda osobito se ističu fermentirana mlijeka koja za poboljšanje svojih funkcionalnih svojstava zahtijevaju jedino obogaćivanje ili modifikaciju svoje prirodno zadane osnove. U fiziološkom smislu, blagotvoran učinak fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje prvenstveno je određen biološkim svojstvima BMK i bifidobakterija koje se koriste za njihovu proizvodnju. Dobrobit na zdravlje čovjeka te bakterije ostvaruju na dva načina - direktno preko aktivnosti živih stanica, ili indirektno preko svojih metaboličkih produkata.

Sažeto, hranjiva vrijednost fermentiranih mlijeka mogla bi se opisati kao vrijednost koja pomaže poboljšanju prehrane i povećava izgleda da se dostignu preporučene prehrane potrebe organizma za pojedinim nutrijentima. Fermentirana mlijeka u tom smislu bogat su izvor biodostupnih nutrijenata (raspoloživih za laganu apsorpciju i korištenje u organizmu): proteina, kalcija, fosfora, magnezija, cinka, riboflavina (vit. B₂), tiamina (vit. B₁), folne kiseline (vit. B₉) i niacina (vit. B₃), i ako sadrže mliječnu mast konjugiranih masnih kiselina (CLA). Osobito se fermentirana mlijeka

odlikuju gotovo idealnim omjerom Ca : P, minerala koji uz magnezij imaju glavnu funkciju u formiranju i mineralizaciji kostiju u ljudskom tijelu. Potrebe za kalcijem i fosforom u prehrani povećavaju se rastom djece, tijekom trudnoće, dojenja i menopauze u žena.

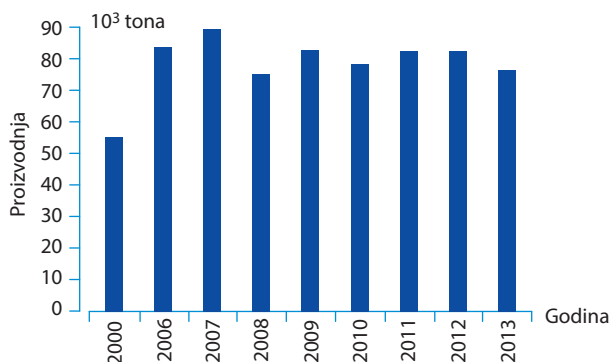
Nasuprot prehranbenoj, fiziološka vrijednost fermentiranog mlijeka određena je njegovim funkcionalnim komponentama:

- bioaktivnim peptidima
 - angiotenzin konvertirajući enzimi (ACE)
 - kazeinfosopeptidi (CPP)
 - α i β -laktorfin
 - glikoproteini (butirofilin, redoks enzim ksantinoksidaza/dehidrogenaza; mucinu slični glikoproteini, laktodeherin i glikolizirani CD36 protein) i negliceroproteini (acidofilin)
- biaktivnim lipidima
 - konjugirane linolne kiseline (CLA) ili ω -3, ω -6 masne kiseline
 - glicerofosfolipidi
 - sfingolipidi
 - maslačna kiselina
 - octena kiselina
- nutraceuticima
 - sorbitol
 - manitol
 - oligosaharidi
 - folna kiselina
 - L(+) mliječna kiselina.

1.5.

Proizvodnja i potrošnja

Uvođenjem voćnih i aromatiziranih varijanti jogurta u industrijsku proizvodnju 1950. godine, svjetska godišnja proizvodnja i potrošnja fermentiranih mlijeka bilježi stalan porast. U odnosu na prethodno razdoblje, veća potrošnja jogurta uvjetovana je i mogućnostima izbora proizvoda različitih okusa i



Slika 1.18.

Proizvodnja fermentiranih mlijeka u Hrvatskoj za razdoblje od 2000. do 2013. godine.

teksture i inovacijama u pakiranju. Danas kupac u trgovačkoj mreži može izabrati niskokalorični jogurt, blagi jogurt, jogurt za doručak, "trajni" jogurt, jogurt za bebe, jogurt smanjene količine laktoze i slično. Popularnost potrošnje fermentiranih mlijeka općenito se pripisuje i činjenici da se ona mogu konzumirati u svim prilikama. Za dostupnost fermentiranih mlijeka na širem svjetskom tržištu zaslužan je i učinkovit lanac distribucije i hlađenja proizvoda na temperaturu od ~ 5 °C tijekom pohrane, transporta i čuvanja na policama u trgovinama.

Za usporedbu, proizvodnja fermentiranih mlijeka u EU 2000. godine bila je 7,285.000 t, u 2008. godini 10,300.000 t, a u 2013. godini 9,290.000 t. Na svjetskoj se razini ona procjenjuje na 21,000.000 t/godišnje, s godišnjim predviđenim rastom od 4 %. Prema službenim podacima posljednjih nekoliko godina proizvodnja i potrošnja fermentiranih mlijeka je i u Hrvatskoj višestruko povećana (slika 1.18.). U 2000. ona je iznosila 55.000 tona, u 2005. godini 83.000 tona, ali se zbog opće krize u svijetu proizvodnja u 2013. smanjila na 75.000 tona.

Na hrvatskom tržištu 85 % fermentiranih mlijeka proizvode tri velika proizvođača: Dukat (45 - 50 %), Vindija (25 - 30 %) i Meggle (10 - 15 %), dok svega 7 % proizvođača dijeli preostali dio tržišta (slika 1.19.).

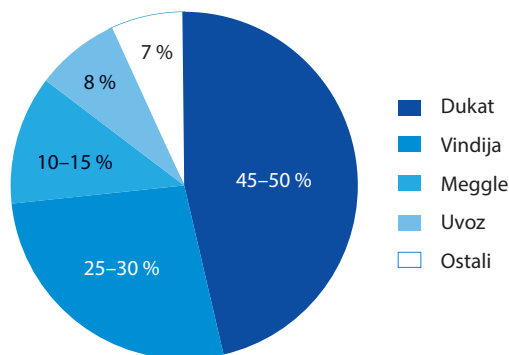
Također, za svoje potrebe Hrvatska godišnje uvozi približno 8 % fermentiranih mlijeka.

Unutar skupina fermentiranih mlijeka jogurt je i dalje najpopularniji s 50 %-tnim udjelom u ukupnoj proizvodnji. Prema raspoloživim podacima, njegove voćne varijante danas predstavljaju glavni izvor zarade u mljekarskoj industriji. Svoju popularnost jogurt zahvaljuje i činjenici da mu je zbog novih znanstvenih spoznaja povećana hranjiva i funkcionalna vrijednost, uz istovremeno zadržavanje poželjnih fizikalnih i organoleptičkih svojstava tijekom vremena održivosti. Povoljan utjecaj na zdravlje ljudi prvenstveno se pripisuje živim aktivnim bakterijama ($\sim 10^{7-8}$ cfu mL⁻¹) prisutnima u jogurtu.

Prema stalnim istraživanjima ukusa potrošača koja se provode na tržištu, u bliskoj budućnosti mljekarska će industrija tržištu morati ponuditi i fermentirana mlijeka drukčijih karakteristika od današnjih. Pretpostavljeni su novi prehrambeni trendovi za fermentirana mlijeka proizvodi:

- blagog okusa i niske kiselosti
- stabilne kiselosti tijekom vremena održivosti
- održivosti do 40 dana
- nježnije teksture - koja kada se proizvod jede nije previše "teška", "ljepljiva"
- "bogate" teksture - u smislu kremastog i viskoznoг okusa u ustima
- s dokazanim funkcionalnim svojstvima.

Zanimljiv je i podatak da proizvodnja pitkih fermentiranih mlijeka s niskim udjelom suhe tvari bez masti (Sbm) i niskim udjelom masti u nekim zemljama raste i do 30 % godišnje. Pitke varijante fermentiranih mlijeka, prema mnogim istraživanjima, idealno se uklapaju u globalno tržište, budući da ih potrošači smatraju zdravima, ukusnima i vrlo prikladnima za jelo u svim prilikama. U svijetu raste i potrošnja dječjih fermentiranih mlijeka, dizajnom prilagođenih likovima iz crtanih filmova, igračkama i drugim likovima iz filmova koje djeca mogu vidjeti na televiziji. Stalan i stabilan rast potrošnje fermentiranih mlijeka može se zahvaliti i ponudi brojnih probiotičkih fermentiranih



Slika 1.19.

Odnos između proizvođača fermentiranih mlijeka na hrvatskom tržištu i uvoza fermentiranih mlijeka na godišnjoj razini.

mlijeka. Znanstveno potvrđene činjenice o visokoj hranjivoj i dijetetsko-terapijskoj vrijednosti tih fermentiranih mlijeka pridonijele su da ona danas čine ~ 16 % ukupne proizvodnje. Fermentirana mlijeka posljednjih godina postaju i sve popularnija među stanovništvom u zemljama poput Kine, Tajlanda, Južne Koreje i Brazila, što prethodnih godina nije bio slučaj.

Kolika je stvarna potrošnja fermentiranih mlijeka po stanovniku vrlo je teško točno odrediti. Objektivniji je razlog nejedinstven sustav bilježenja potrošnje u svim zemljama. Međunarodna mljekarska federacija (IDF), prema dostupnim podacima, procjenjuje da je ona između 12 i 30 kg/osoba/godina. Prema istim dostupnim podacima, u svijetu su najveći potrošači fermentiranih mlijeka po glavi stanovnika na godišnjoj razini Danci i Islandčani s 40 - 45 kg, a najmanji u Kanadi (~ 7 kg), Meksiku (~ 4 kg), Argentini ($\sim 9,5$ kg) i Južnoj Africi ($\sim 1,5$ kg).

U predviđanju veličine proizvodnje i potrošnje fermentiranih mlijeka za svaku je zemlju preporučljivo da se u marketinški model ugrade sljedeći elementi: stav i znanje o proizvodu, i socijalno-ekonomske i demografske karakteristike. Istraživanja potrošnje

fermentiranih mlijeka u 11 europskih zemalja na temelju tih elemenata potvrdila su sljedeće činjenice:

- češće ih konzumiraju osobe mlađih dobnih skupina
- češće ih konzumiraju žene u usporedbi s muškarcima
- češće ih konzumiraju obrazovane osobe
- češće ih konzumiraju obitelji s djecom
- oznake poput bio ili organski proizvod manje su bitne za niže obrazovane osobe
- cijena nije presudna u izboru proizvoda.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2** Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija

Uvod

Bakterije mliječne kiseline (BMK) heterogena su skupina mikroorganizama koja se u formi kultura najviše koristi za fermentaciju mlijeka, ali i drugih sirovina poput mesa i povrća. Tijekom fermentacije, iz raspoloživog izvora ugljika BMK tvore mliječnu kiselinu čija je prvenstvena uloga konzerviranje novonastalog proizvoda. Osim kapaciteta za tvorbu mliječne kiseline, svojim metabolizmom BMK pridonose i drugim poželjnim karakteristikama proizvoda, poput izgleda, okusa/arome i teksture. Također, BMK su zaslužne za povećanu hranjivu vrijednost osnovnog proizvoda, a neki od bakterijskih sojeva određenih vrsta BMK na humani organizam imaju i probiotičko djelovanje. Općenito i za potrebe prehrambene industrije BMK zbog iznimno dugoga sigurnog korištenja i kapaciteta za stvaranje različitih metabolita imaju veliki potencijal za *in situ* proizvodnju različitih spojeva. Primjenom molekularno-genetičkih tehnika do danas je determinirano više od 100 kompletnih ili gotovo kompletnih genoma BMK. Korištenjem genomske sekvence *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 (čiji je genom prvi opisan) rekonstruirana je 621 reakcija i 509 metabolita koji predstavljaju važne fiziološke i biokemijske informacije za opis i korištenje BMK u cjelokupnoj prehrambenoj industriji.

Bifidobakterije od ukupne mikrobne populacije u humanom intestinalnom sustavu odraslog čovjeka

čine oko 3 % populacije. U probavnom sustavu te bakterije razgrađuju različite polisaharide i oligosaharide sadržane u hrani, od kojih su većina za domaćina nerazgradivi sastojci. Smatra se da većina vrsta bifidobakterija zbog te sposobnosti povoljno utječe na zdravlje čovjeka. Između dosad opisanih vrsta, u mljekarskoj industriji u svojstvu promotora zdravlja zasad se koristi pet vrsta bifidobakterija. Analize trenutno dostupnih genomskih sekvenci upućuju na to da te bakterije posjeduju gene za sintezu najmanje 19 aminokiselina, za sve enzime potrebne za sintezu pirimidinskih i purinskih nukleotida, kao i one potrebne za sintezu određenih vitamina B skupine.

U ovom poglavlju knjige navedena je važeća taksonomija bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija na razini roda i vrste. U cilju boljeg razumijevanja složenosti taksonomske sheme u opisu bakterijskih vrsta i specifičnosti bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija, u ovom poglavlju opisani su i osnovni termini i postupci vezani za sistematiku tih bakterija i njihov filogenetski odnos.

Također u ovom su poglavlju knjige opisane: morfološke i fiziološke karakteristike pojedinačnih bakterijskih vrsta koje se najčešće koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka i najznačajnija metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija.



2.1.

Osnove taksonomije

Taksonomija ili sistematika je znanstvena disciplina biologije/mikrobiologije koja se bavi kategorizacijom biološke raznovrsnosti bakterijskih vrsta. Klasifikacija, identifikacija i nomenklatura tri su odvojene ali usko povezane discipline taksonomije.

Klasifikacija (grupiranje) je proces raspoređivanja organizama u taksonomske skupine (takse) na temelju međusobne genetičke sličnosti ili rodstva. Taksonomske skupine (grč. *tassein* - svrstati; *nomos* - zakon, zakonitost) međusobno su uređene hijerarhijskim redom, što znači da su organizmi pojedinih kategorija povezani na temelju različite razine sličnosti. Za bakterijsku klasifikaciju taksonomsko je rangiranje:

- domena - skupina srodnih koljena
- koljeno (lat. *phylum*) - skupina srodnih razreda
- razred (lat. *classis*) - skupina srodnih redova
- red (lat. *ordo*) - skupina srodnih porodica
- porodica (lat. *familia*) - skupina srodnih rodova
- rod (lat. *genus*) - skupina srodnih vrsta
- vrsta (lat. *species*) - organizmi iste vrste.

Udaljavanjem od vrha taksonomske piramide prema njezinoj bazi povećava se sličnost između organizama. Na primjeru bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u tablici 2.1. prikazano je njezino taksonomsko rangiranje.

Osnovna jedinica u klasifikacijskoj shemi bakterija koje pripadaju prokariotskim organizmima je vrsta ili species (množina: species). Bakterijska vrsta, prema danas prihvaćenoj definiciji, genotipski je koherentni klaster (skupina) pojedinačnih organizama koji pokazuju visok stupanj sličnosti u mnogim neovisnim karakteristikama i mogu se razlikovati diskriminativnim fenotipskim svojstvima. U slučajevima ako se utvrdi razlika između organizama unutar iste vrste a nema dovoljno osnova za klasifikaciju u novu vrstu, oni se svrstavaju u dvije ili više podvrsta ili subspecies, u varijetete ili biovare. Drugim riječima, podvrsta i varijetet je minorna ali konstantna fenotipska ili

genetička varijacija sojeva koji čine zaseban klaster unutar iste vrste. U taksonomskoj hijerarhiji, podvrsta i varijetet određene bakterijske vrste taksonomske su jedinice nižeg ranga. Vrsta *Lactococcus lactis* višeg je taksonomskog ranga od svoje podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a još višeg ranga od svog biovara *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

Tablica 2.1.

Taksonomsko rangiranje bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

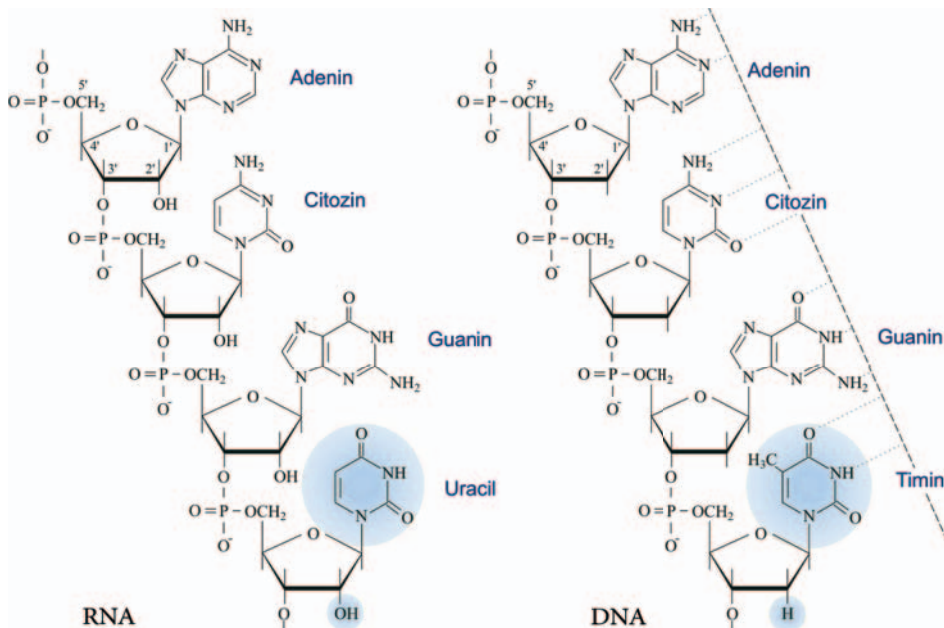
Klasifikacijski rang

Domena	<i>Bacteria</i>
Koljeno	<i>Firmicutes</i>
Razred	<i>Lactobacillales</i>
Red	<i>Lactobacillales</i>
Porodica	<i>Lactobacillaceae</i>
Rod	<i>Lactobacillus</i>
Vrsta	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Podvrsta	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Soj	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC11842

Općenito, dva su ključna polazišta u definiciji određene bakterijske vrste:

- filogenetski odnos (srodni organizmi imaju zajedničkog pretka)
- visok stupanj sličnosti (viši stupanj srodnosti između dviju taksonomskih skupina - viši stupanj sličnosti).

Prihvaćena metoda za utvrđivanje srodnosti organizama koji čine jednu bakterijsku vrstu je analiza rDNA molekula odnosno DNA sekvenci koje kodiraju 16S ili 23S rRNA. Početno, za tu svrhu potrebno je izvršiti DNA-rRNA hibridizaciju ili rRNA katalogizaciju. Molekula rRNA sadrži visoko konzervirane gene koji su se razvili u početku evolucije prokariota radi fundamentalne uloge biosinteze vlastitih proteina u ribosomima. Osim toga, fenomen horizontalnog transfera gena (HGT), koji je vrlo čest između bakterija, ne uključuje te gene. Usporedba bakterijskih genoma pokazala je dominantnu snagu HGT u



Slika 2.1.

Shematski prikaz kemijske građe nukleinskih kiselina: DNA (dezoksiribonukleinska kiselina) i RNA (ribonukleinska kiselina).

(Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=nukleinska+kiselina>.)

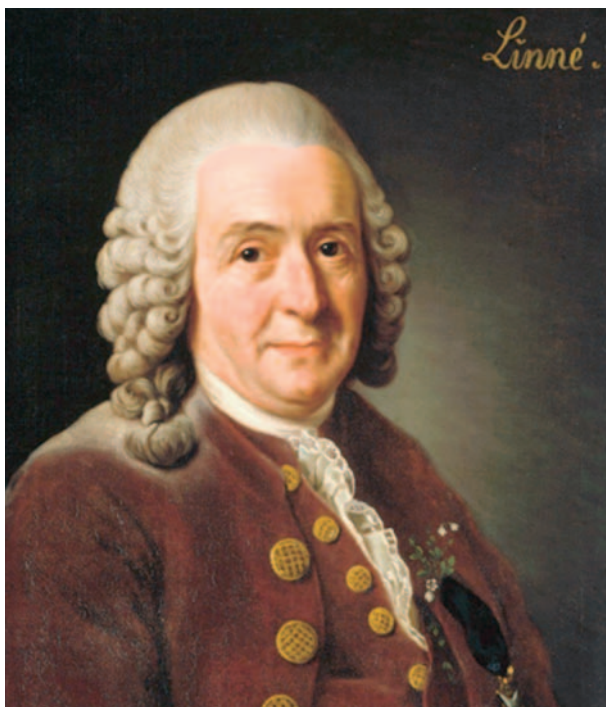
evoluciji prokariota koja je uzrokovala gubitak njihova genetskog materijala i genomske kontrakcije. Razmjena genetskog materijala u prokariotskom svijetu događa se zbog mobilnosti golemog broja virusa, plazmida i drugih pokretnih elemenata (bez samostalne replikacije) koji služe za stalnu razmjenu gena s puno stabilnijim bakterijskim kromosomom.

Metode temeljene na analizi rRNA (rDNA) molekule koriste njihov promjenjiv stupanj konzerviranih sekvenci unutar različitih regija koje su specifične za svaku vrstu. Općenito, operoni za prokariotske rRNA gene sadrže transkripcijsku razmaknicu ili takozvane ITS regije (engl. *Internal Transcribed Spacer*) između 16S i 23S rRNA gena (rDNA). Kontinuiranim razvojem tehnologije danas je moguće pročitati dužinu transkripcijske razmaknice rRNA gena do 1000 pa čak i 3000 parova baza (bp), čime je diskriminacijska sposobnost molekularnih tehnika znatno unaprijeđena.

Dužina i sekvenca ovog prostora smatra se visoko varijabilnom u svojim nukleotidnim sekvencama, a istovremeno sadrži segmente koji su nepromijenjeni u svih organizama. Konzervirane sekvence osiguravaju

mjesta na koja se vežu početnice, a druge regije 16S rRNA jedinstvene su za određeni organizam ili grupu srodnih organizama. Postotak sličnosti tih sekvenci između različitih organizama određuje varijaciju u genomima uspoređivanih organizama. Kada je sekvencijska sličnost između dvaju organizama manja od 97 %, znači da imaju manje zajedničkih gen sekvenci na razini genoma i pripadaju različitim vrstama. Dakle, da bi dva uspoređivana organizma pripadala istoj vrsti, njihova sličnost na razini genoma mora biti veća od 97 %, odnosno moraju imati više od 97 % zajedničkih gen sekvenci.

Razlika u kemijskoj građi molekula DNA i RNA prikazana je slikom 2.1. Dezoksiribonukleinska kiselina (DNA) izgrađena je od dušičnih purinskih baza adenina (A) i gvanina (G), dušičnih pirimidinskih baza citozina (C) i timina (T), šećera dezoksiriboze (pentozani) i fosforne kiseline. Ribonukleinska kiselina (RNA) ima istu kemijsku građu poput DNA molekule, osim što je pirimidinska baza timin zamijenjena uracilom (U), a umjesto šećera dezoksiriboze sadrži ribozu.



Slika 2.2.

Carl Linné (1703. - 1778.), portret, Aleksander Roslin (1718. - 1793.), Nationalmuseum, Stockholm, Švedska.

Nomenklatura (imenovanje) je dodjela imena taksonomskoj skupini prema internacionalnim pravilima o imenovanju vrsta. Odnosno, koristi se binominalni sustav imenovanja vrsta koji je u nomenklaturu uveo švedski znanstvenik Carl Linné (1703. - 1778.; slika 2.2.):

- svaki različiti organizam prepoznaje se kao vrsta (jednina species; množina species)
- svakoj vrsti daju se dva imena; prva riječ znači rod (genus; množina genera), ime roda latinska je ili grčka riječ, ili je riječ izvedenica od korijena tih jezika, ili je latinizirano ime osobe i uvijek se piše velikim slovom (latinska riječ: *Bacillus*, *Lactobacillus*; grčka riječ: *Micrococcus*, *Clostridium*; latinizirana imena osoba: *Pasteurella* (Louis Pasteur, 1822.

- 1895.), *Erwinia* (Erwin Frink Smith, 1854. - 1927.), *Escherichia* (Theodor Escherich, 1857. - 1911.); druga riječ je specifično ime bakterije obično deskriptivnog značenja i uvijek se piše malim slovom (primjerice, *coli* - povezan s crijevima)

Imena organizama ponekad se mijenjaju, no na sreću te promjene ne događaju se tako često. Do promjene imena određene bakterijske vrste može doći u sljedećim slučajevima:

- ako se ranija klasifikacija određenog organizma temeljila na ograničenom broju karakteristika
- ako se novim tehnikama i metodama utvrdi različiti odnos između pojedinih organizama od ranije utvrđenog (primjerice, analizama ribosomalne RNA).

Nomenklatura organizama prvenstveno omogućava međusobno razlikovanje vrsta. Bakterijska vrsta smatra se zasebnom vrstom ako se prema svojim brojnim osobinama i svojstvima razlikuje od udaljenog zajedničkog pretka. Međutim, utvrditi različitost između vrsta nije uvijek tako jednostavno kako se na prvi pogled čini. Ta tvrdnja posebno se odnosi na razlikovanje onih bakterijskih vrsta koje imaju sposobnost razmijeniti genetske informacije. Genetske informacije, bakterije mogu izmijeniti plazmidima ili dijelovima DNA konjugacijom, transdukcijom ili transformacijom i tako dijele isti izvor gena. Definiranje i imenovanje vrsta otežano je i zbog čisto praktičnog razloga. Odnosno, u istraživanjima bakterija uvijek se i isključivo testira soj (mikrobiološki individualan organizam), a ne vrsta. Zbog toga odrediti imenovanje određene vrste znači da je više različitih sojeva pod istim uvjetima analize homologno. Suprotno, za neke bakterije poput *E. coli* definicija vrste relativno je jednostavna i može se temeljiti na strukturi stanice, biokemijskim reakcijama ili molekularnim analizama.

Promjena imena određene bakterijske vrste, premda znanstveno utemeljena, u praksi može dovesti do ozbiljnih nesporazuma ako nije usvojena od svih stručnjaka i znanstvenika. Prvenstveno, problem neusvojenog novog imena za određenu bakterijsku vrstu ima za posljedicu različitost u tumačenju rezultata. Dobar je primjer za objašnjenje složenosti taksonomije u

nekoliko posljednjih godina dvaput izvršena revizija imena bakterijske vrste *Streptococcus thermophilus*. Originalno ime *Streptococcus thermophilus* (Orla-Jensen, 1919.) promijenjeno je u *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* prvi put 1984. godine a bakterija je dobila status podvrste. Na temelju novih znanstvenih istraživanja koja su uslijedila nakon toga, 1991. godine bakteriji *Streptococcus thermophilus* vraćen je status zasebne vrste i od 1995. u nomenklaturi se ponovno vodi pod originalnim imenom.

Identifikacija je proces utvrđivanja pripadnosti novog bakterijskog izolata jednoj od postojećih utvrđenih bakterijskih vrsta. Način identifikacije temelji se na sljedećim principima:

- zadanim vrijednostima (DNA-DNA hibridizacija)
- zadanim vrijednostima - sličnosti sekvenci
- referentnim vrijednostima soja i species konceptu
- referentni soj mora biti uključen u sve komparativne studije
- najmanje 2 referentna soja moraju biti iz priznate kolekcije, primjerice:
 - ATCC, www.atcc.org
 - LMG, www.bespo.be/bccm
 - DSZM, www.dsmz.de
 - JCM www.jcm.riken.jp

Imenovanje novih bakterija (izolata) provodi se prema internacionalno prihvaćenom protokolu, a ime vrste postaje važeće odobrenjem Međunarodnog vijeća za sistematiku prokariotskih organizama (engl. *International Committee on Systematics of Prokaryotes* www.the-icsp.org)

2.1.1.

Klasične i molekularne metode

Za taksonomska proučavanja bakterija preliminar- na determinacija vrsta provodi se metodama klasične fenotipske i biokemijske karakterizacije. Istodobno

metode koje proučavaju nukleinske kiseline omogućavaju stvarnu diferencijaciju vrsta na razini genoma. Bakterijski genom ili genetski materijal bakterije je materijal koji se nasljeđuje, a čine ga kromosom i plazmid(i). Unutar bakterijske citoplazme smješteni su ribosomi, mala zaobljena tjelešca izgrađena od proteina i RNA. U bakterijskoj stanici oni su odgovorni za sintezu proteina, a poznati su i kao 70 S ribosomi (S je Svedbergova jedinica - mjera relativnog omjera sedimentacije čestica koja nastaje centrifugiranjem pri velikoj brzini). Unutar bakterijskoga genoma nalaze se genomski otoci koji sadrže skupine (klustere) gena stečene horizontalnim transferom gena. Genomski otoci sadrže gene koji mogu kodirati različite bakterijske funkcije pa su često povezani s bakterijskom adaptacijom u različitim medijima. Također, mnogi bakterijski genomski otoci karakterizirani su ponavljajućim strukturama i nose fragmente drugih mobilnih elemenata, poput faga i plazmida. Bakterijski genom sadrži i genomske otoke koji se spontano mogu izdvojiti iz kromosoma i biti prebačeni u drugu pogodnu bakterijsku stanicu. Veličinom, oni su prilično veliki (5 - 10 kb) genomski strukturni elementi.

Najjednostavnija je tradicionalna klasifikacija svrstavanja bakterija u rodove i vrste na temelju karakteristika koje se mogu ispitati u običnim laboratorijima. Tako su bojanje po gramu, kratki i dugi biokemijski nizovi, opis morfoloških karakteristika najčešće korištene metode u klasičnoj klasifikaciji bakterija.

Revolucionarna metoda lančane reakcije polimerazom ili PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*), koju je 1983. otkrio Kary Mullins i za to otkriće 1993. podijelio Nobelovu nagradu s kanadskim znanstvenikom i kemičarom Michaelom Smithom (1932. - 2000.), omogućava amplifikaciju specifične regije DNA u cilju dobivanja dovoljnog broja razlikovnih fragmenata DNA za ciljanu analizu. Izum PCR tehnike okarakteriziran je kao najveće otkriće 20. stoljeća: "... koje je gotovo podijelilo biologiju na dva razdoblja, onu prije i onu poslije PCR izuma". Drugim riječima, neki geni u DNA molekuli mogu biti jednaki ili vrlo slični u različitim vrsta organizmima ali uvijek postoje jedinstveni geni čija je DNA sekvenca različita. Identifikacijom gena

koji se razlikuju može se zbog toga identificirati svaki pojedinačni organizam.

Od osnovne PCR metode razvile su se mnoge genotipske metode temeljene na DNA analizi, primjerice analize polimorfizama pomoću restrikcijskih fragmenata RFLP-PCR [engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)], RAPD-PCR analize (engl. *Random Amplified of Polymorphic DNA*) ili analize polimorfizama pomoću dužine restrikcijskih fragmenata [engl. *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP)]. Zajedničko je tim metodama da su ovisne o uzgoju bakterija na hranjivim podlogama, a DNA se ekstrahira iz bakterijske kolonije narasle na hranilištu.

Posljednjih desetak godina u determinaciji bakterija intenzivno se koriste molekularne analize koje nisu ovisne o bakterijskom rastu i razmnožavanju na mikrobnj podlozi, već se ekstrakcija DNA ili RNA obavlja direktno iz uzorka. Prednost tih molekularnih metoda, u usporedbi s metodama koje su ovisne o uzgoju bakterija na hranjivim podlogama je u sposobnosti sigurnog odvajanja bakterija od arheja.

Analize poput elektroforeze u gelu denaturirajućega gradijenta [engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (PCR-DGGE)], elektroforeze u denaturirajućem gradijentu temperature [engl. *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis* (PCR-TTGE)], analize SSCP-PCR (engl. *Single-Strand Conformation Polymorphism*), analize LH-PCR (engl. *Length Heterogeneity*), ili kvantitativni PCR u stvarnom vremenu [engl. *Quantitative Real Time PCR* (qPCR)] većinom se koriste za proučavanje raznovrsnosti unutar mikrobnih zajednica prirodnih sredina i mikrobnih zajednica u fermentiranim namirnicama. Posljedično, te analize značajno su obogatile saznanja o brojnosti raznovrsnih mikrobnih vrsta koje obitavaju u pojedinim ekosustavima ili su uključene u fermentacijske procese. Međutim, treba istaknuti da je za točnost i pouzdanost utvrđivanja biološke raznovrsnosti bakterijskih vrsta bilo kojom molekularnom analizom presudan izbor odgovarajućih početnica.

2.2.

Taksonomija bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija

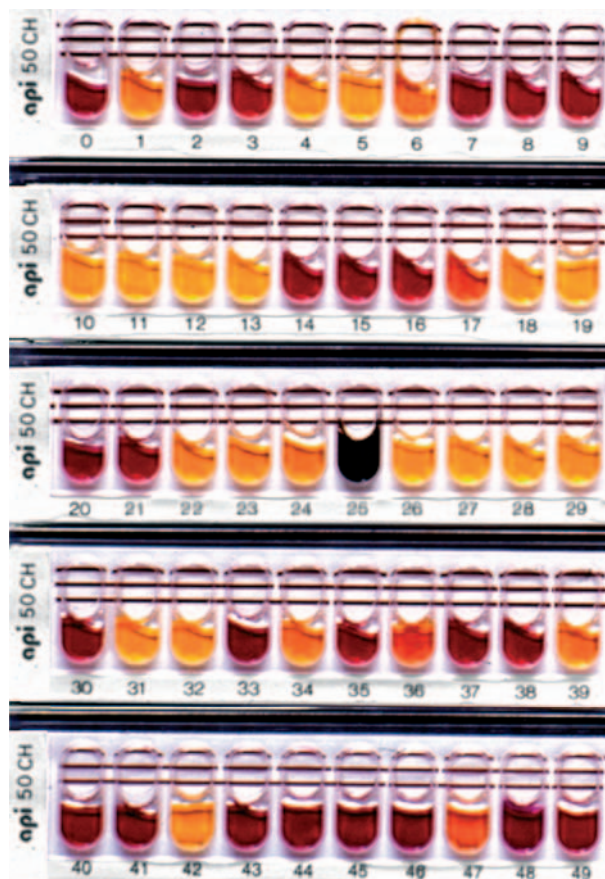
Taksonomsko klasificiranje bakterija mliječne kiseline (BMK) i bifidobakterija temelji se na istim principima koji vrijede za sve druge bakterijske vrste. Odnosno, temelji se na analizi rDNA sekvenci koje kodiraju 16S ili 23S rRNA. U cilju boljeg razumijevanja u nastavku teksta navedene su najčešće korištene klasične i molekularne metode za taksonomsku klasifikaciju BMK i bifidobakterija. Između ostalog, primjenom molekularno-genetičkih tehnika u determinaciji BMK i bifidobakterija značajno se promijenila njihova taksonomija.

Klasična klasifikacija BMK i bifidobakterija u različite rodove i vrste najčešće se temelji na preliminarnim testovima:

- bojanju po Gramu
- morfološkim karakteristikama
- katalaza reakciji
- rastu na temperaturi od 10, 40 i 45 °C
- toleranciji prema koncentracijama soli i pH
- konfiguraciji mliječne kiseline [L (+), D (-) i LD]
- fermentaciji šećera
- hidrolizi arginina
- formiranju acetoina (Vogues Proskauer test)
- stvaranju ekstracelularnih polisaharida
- utvrđivanju faktora rasta
- utvrđivanju određenih enzima.

Za ilustraciju korištenja klasičnog testa u determinaciji vrsta laktokoka na slici 2.3. prikazana je analiza za fermentaciju šećera API 50 CH testom.

Moderne su taksonomske fenotipske metode koje se primjenjuju za identifikaciju BMK i bifidobakterija analize: (i) sastava stanične stijenke (osobito za bifidobakterije), (ii) proteinskog otiska ukupnih topljivih citoplazmatskih proteina i (iii) elektroforetske mobilnosti proteina.



Slika 2.3.

Fermentacija 49 različitih šećera API 50 CH testom (bioMerieux, Francuska) za referentni baktericidni soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Chr. Hansen's lab. Danska).

Za potpunu identifikaciju i klasifikaciju BMK i bifidobakterija na razini vrste ili soja koriste se brojne molekularne metode. Od metoda ovisnih o uzgoju bakterija na hranjivim podlogama, najčešće se koriste genotipske metode: poliakrilamid elektroforeza PFGE (engl. *Polyacrylamide electrophoresis*), analiza polimorfizama pomoću restrikcijskih enzima [engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)], analiza gena koji kodiraju ulomak RNA ili ribotipizacija, i RAPD analiza.

Od molekularnih metoda koje nisu ovisne o bakterijskom uzgoju na hranjivim podlogama najčešće se koriste: PCR-DGGE (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu ili gradijentu temperature PCR-TTGE (engl. *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*), nakon čega slijedi amplifikacija 16S ribosomalnih rRNA gena (rDNA). U slučajevima ako se koristi kompletna DNA mikrobne zajednice iz mikrobne kulture, PCR-DGGE analiza omogućava utvrđivanje njihove međusobne genetske različitosti. Ili ako se za analizu koristi ukupna RNA, PCR-DGGE, analiza omogućava utvrđivanje metaboličke aktivnosti bakterija u analiziranom supstratu.

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu [engl. *Quantitative Real Time PCR* (qPCR)] brza je i osjetljiva metoda koja se sve više primjenjuje za kvantifikaciju bakterija iz mikrobnih kultura ili mliječnih proizvoda. Metoda omogućava amplifikaciju ciljane DNA u stvarnom vremenu. Da bi se kvantificirala prisutnost određenih bakterijskih vrsta, količina bakterijske DNA mora biti u korelaciji s bakterijskom biomasom. Analiza qPCR koristi fluorescentne probe za utvrđivanje amplificiranih ciljanih sekvenci.

Za ilustraciju, na slici 2.4. prikazan je RAPD otisak za različite sojeve vrste *L. lactis* subsp. *cremoris* izolirane iz tradicionalne mezofilne kulture, koji su fenotipski isti ili vrlo slični, a genotipski različiti. Na slici 2.5., također za ilustraciju, prikazan je profil V-3 regije 16S rDNA gena primijenjen za praćenje mikrobne populacije iz uzoraka konzorcija izoliranog iz tradicionalno proizvedenoga svježega ovčjeg sira dobiven PCR-DGGE analizom.

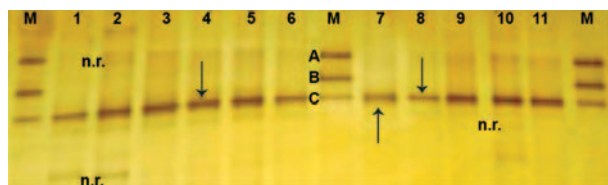
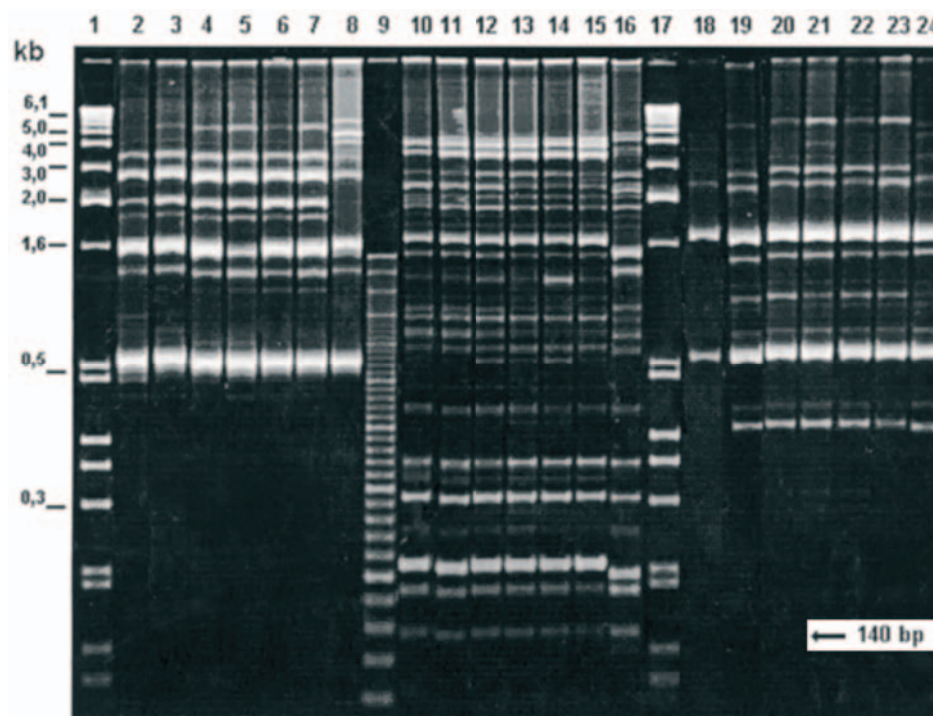
2.2.1.

Genomska karakterizacija i metabolički inženjering

Posljednja dva desetljeća genomska je karakterizacija osobito BMK ekspanzirala i do danas je više od 100 kompletnih ili gotovo kompletnih genoma

Slika 2.4.

Različiti RAPD profil sojeva *L. lactis* subsp. *cremoris* dobiven pomoću triju početnica [5-GATCGGACGG-3 (P₂), 5-CTGGGCACGA-3 (P₁₅), 5-TCGCCAGCCA (P₁₆)]. Detalji: Kolona 1: M₁ marker, 1kb ladder; kolone 2-8: sojevi označeni slovima C₁, C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ i referentni soj B (P₂); kolona 9: M₂ marker, 100bp ladder; kolone 10-16: sojevi C₁, C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ i referentni soj B (P₁₅); kolona 17: M₁ marker, 1kb ladder; kolone 18-24: sojevi C₁, C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁ i referentni soj B (P₁₆). Zajednički fragment veličine 140 bp dobiven početnicom P₁₅ označen je strelicom.



Slika 2.5.

PCR-DGGE obrasci dobiveni amplifikacijom V₃ regije 16S rDNA iz uzoraka konzorcija izoliranog od tradicionalno proizvedenoga svježega ovčjeg sira. Detalji: slijeva na desno, M – marker sastavljen od: (A) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*; (B) *Enterococcus faecalis*; (C) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Sekvence izabranih vrpca (označene strelicom) pokazuju 100 %-tnu homolognost s *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. (Pogačić i sur., 2010., s dopuštenjem izdavača Springer Science + Business media.)

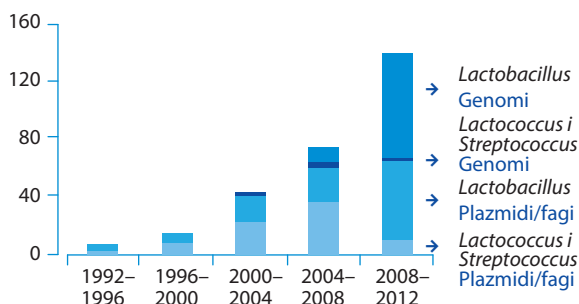
dostupno, od kojih mnogi služe kao znanstvena paradigma (slika 2.6.).

Za ilustraciju, na slici 2.7. prikazani su genomi probiotičkih bakterija *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* JCM 8130, *L. rhamnosus* ATCC 53103. Filogenetski i fenotipski te bakterije su blisko srodni organizmi i pripadaju *L. casei* skupini bakterija unutar fakultativno heterofermentativnih bakterija roda *Lactobacillus*. Na temelju genomske analize *L. casei* skupine bakterija, utvrđeno je da one imaju stabilnu genomsku strukturu. Svaki genom tih bakterijskih vrsta sadrži specifične gene od kojih su mnogi grupirani u klastere u genomskim otocima. Unutar genoma *L. casei* skupine bakterija broj genomskih otoka je različit. Bakterija *L. paracasei* ima između 12 i 19 genomskih otoka (> 5 kb), a *L. rhamnosus* 26 (> 5 kb). Između tih 26 genomskih otoka sadržanih u genomu *L. rhamnosus* šest ih čine

Slika 2.6.

Razvitak genomskog sekvencioniranja genoma bakterija mliječne kiseline u posljednja dva desetljeća.

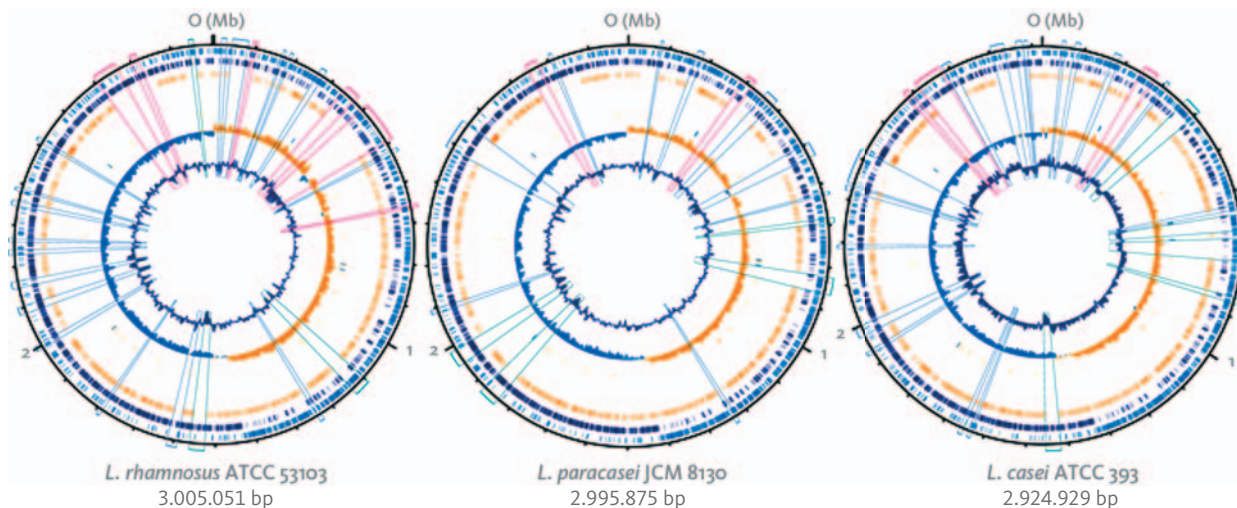
Detalji: broj upisanih podataka uzet je iz NCBI baze podataka te je sumiran rezultat za opisane genome vrsta rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus*, koji se smatraju bakterijama mliječne kiseline. Također, u analizu su uvršteni i rezultati sekvencioniranja pripadajućih bakterijskih plazmida i bakteriofaga. (de Vos, 2011., CC BY 2,0.)



gen klasteri za korištenje ugljikohidrata, od kojih su samo četiri klastera potpuno ili samo djelomično prisutna u genomu *L. paracasei*. U konkretnom slučaju to znači da bakterija *L. paracasei* u usporedbi s bakterijom *L. rhamnosus* ima manji broj gena povezanih s transportom i metabolizmom ugljikohidrata. Za te probiotičke bakterijske sojeve horizontalni transfer

gena smatra se značajnim za njihovu adaptaciju u različite ekološke niše i diferencijaciju između sojeva unutar iste vrste.

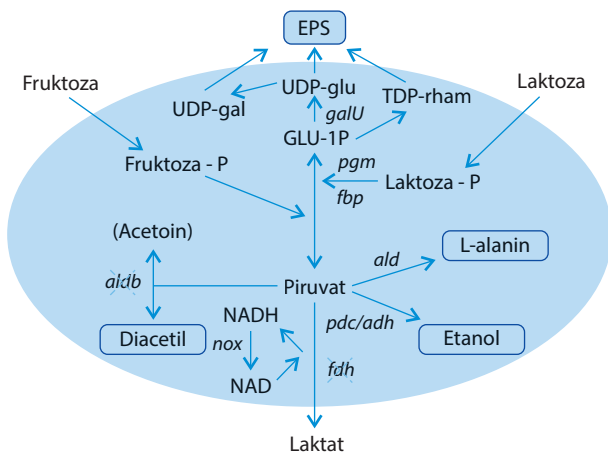
Usporedbom genoma između i unutar vrsta BMK i bifidobakterija danas je moguće kontrolirati i preusmjeravati njihove metaboličke reakcije koje imaju



Slika 2.7.

Shematski prikaz genoma *L. casei* skupine bakterija.

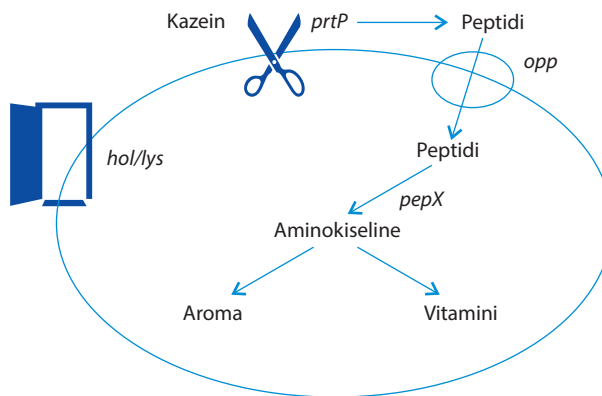
Detalji: kružnice predstavljaju kromosome bakterija *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. paracasei* JCM 8130 i *L. casei* ATCC 393. Od vanjske strane, kružnice 1 i 2 pokazuju poziciju gena na kromosomu za kodiranje proteina, geni na pozitivnoj i negativnoj strani uzvojnice. Kružnica 3 pokazuje poziciju gena za kodiranje proteina koji su zajednički za 10 kompletno sekvencioniranih genoma bakterija *L. casei* skupine. Kružnica 4 pokazuje poziciju tRNA gena (narančasto) i rRNA gena (plavo). Kružnica 5 pokazuje mjesto GC vezanja [G-C (G+C)]; narančasto pokazuje vrijednost > 0; plavo pokazuje vrijednost < 0. Kružnica 6 pokazuje udjel G+C. Genomski su otoci u svakom soju zasebni: klaster gena za korištenje ugljikohidrata (ružičasta boja), profag regija (zeleno) i ostalo (plava boja). (Toh i sur., 2013., CC BY -SA 3,0.)



Slika 2.8.

Shematski prikaz metaboličkim inženjeringom uspješnoga preusmjeravanju primarnoga homofermentativnog metabolizma ugljika u stanici bakterije *L. lactis* u heterofermentativni metabolizam.

Detalji: skraćenice, ald - L-alanin dehidrogenaza; aldb - α -acetolaktat dehidrogenaza; fbp - fruktoza bifosfataza; gal - galaktoza; galU - UDP-glukoza pirofosforilaza, glu-glukoza; ldh - laktat dehidrogenaza; nox - NADH oksidaza; P-fosfat; pgm - fosfoglukomutaza; ram - ramnoza. (Hugenholtz i Kleerebezem 1999., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 2.9.

Shematski prikaz utjecaja metaboličkog inženjeringa na razinu proteolitičke aktivnosti i biosinteze dušičnih spojeva u stanici bakterije *L. lactis*.

Detalji: skraćenice, hol/lys - holin i lizin iz bakteriofaga; opp - oligopeptidni transportni sustav; pepX - različite peptidaze; PrtP - proteinaza stanične stijenke bakterije. (Hugenholtz i Kleerebezem, 1999., s dopuštenjem Elseviera.)

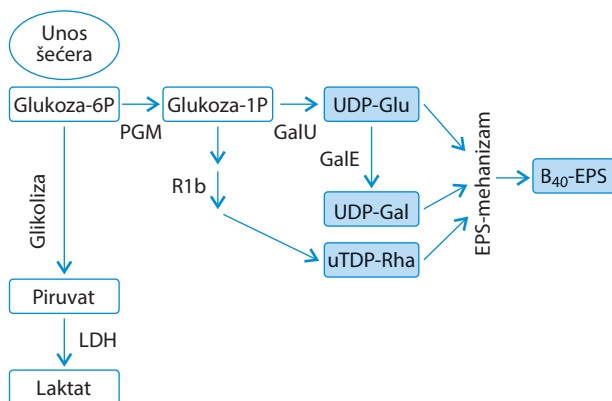
veliko značenje u proizvodnji kvalitetnih fermentiranih mlijeka. Između ostalog, analiza bakterijskih genoma i njihova međusobna usporedba omogućuje: (i) utvrđivanje korelacije između genotipa sa željenim fenotipskim karakteristikama bakterijskih sojeva, (ii) utvrđivanje kriterija za selekciju sojeva, (iii) poboljšavanje stabilnosti kultura, i (iv) način za usmjeravanje bakterijskog metabolizma učinkovitijoj probiotičkoj funkciji u humanom organizmu.

Genomsko sekvencioniranje omogućilo je metabolički inženjering BMK u smislu preusmjeravanja njihova primarnoga ili sekundarnog metabolizma. Odnosno, rekombinacijom određenih gena ili modifikacijom uvjeta rasta, te bakterije su sposobne započeti *de novo* biosintezu. Krajnji produkt *de novo* biosinteze generira nove spojeve drugačijih svojstava

koji: (i) na prirodan način poboljšavaju okus i teksturu hrane ili (ii) nutraceutike koji povoljno utječu na ljudsko zdravlje.

Metaboličkim inženjeringom relativno je lako preusmjeriti piruvat metabolizam laktokoka iz homofermentativnog u heterofermentativni, ili povećati tvorbu diacetila, aromatske komponente fermentiranih mlijeka (slika 2.8.).

Činjenica da su bakterije mliječne kiseline razvile svoj vlastiti proteolitički sustav za razgradnju kazeina do slobodnih aminokiselina neophodnih za rast u mlijeku, dovela je do ideje za preusmjeravanje njihova metabolizma dušika (slika 2.9.). Drugim riječima, metaboličkim inženjeringom može se povećati proteolitička aktivnost bakterija, tako da je uspješno



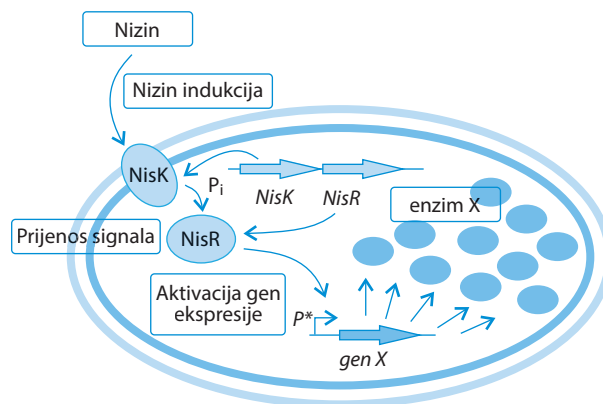
Slika 2.10.

Shematski prikaz načina preusmjerenja biosinteze egzopolisaharida (EPS) u stanici bakterije *L. lactis* koji vodi do sinteze specifičnog B₄₀-EPS.

Detalji: glikolizom (prikazana na lijevoj strani slike) glukoze nastaje piruvat koji se konvertira u laktat djelovanjem enzima laktat dehidrogenaze (LDH). Glikolitički međuspoj glukoza-6-fosfat (glukoza-6P) konvertira se u glukoza-1-fosfat (glukoza-1P) aktivnošću enzima fosfoglukomutaze (PGM). Glukoza-1P je glavni međuspoj za konverziju UDP-glukoze, UDP-galaktoze i dTDP-ramnoze u B₄₀-EPS. Zadnja reakcija biosinteze B₄₀-EPS je multienzimatska reakcija kodirana *eps* genima. Skraćenice: GalU-UDP-glukoza pirofosforilaza; GalE-UDP-galaktoza izomeraza; Rfb- glukoza-1-fosfat timidiltransveraza; TDP-glukoza oksidoreduktaza; dTDP-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraza; dTDP-4-keto-L ramnoza reduktaza. (Kleerebezem i Hugenholtz, 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

veće stvaranje aminokiselina prekursora arome (primjerice metanetiola, produkta metionin metabolizma) ili vitamina.

Tvorba egzopolisaharida (EPS) koje stvaraju BMK iznimno je važna u formiranju reoloških i fizikalnih svojstava fermentiranih mlijeka. Također, uneseni proizvodom u humani organizam oni imaju funkciju promotora dobrog zdravlja. Zbog toga su studije temeljene na metaboličkom inženjeringu usmjerene na promjene ekspresijske razine gena kroz zamjenu



Slika 2.11.

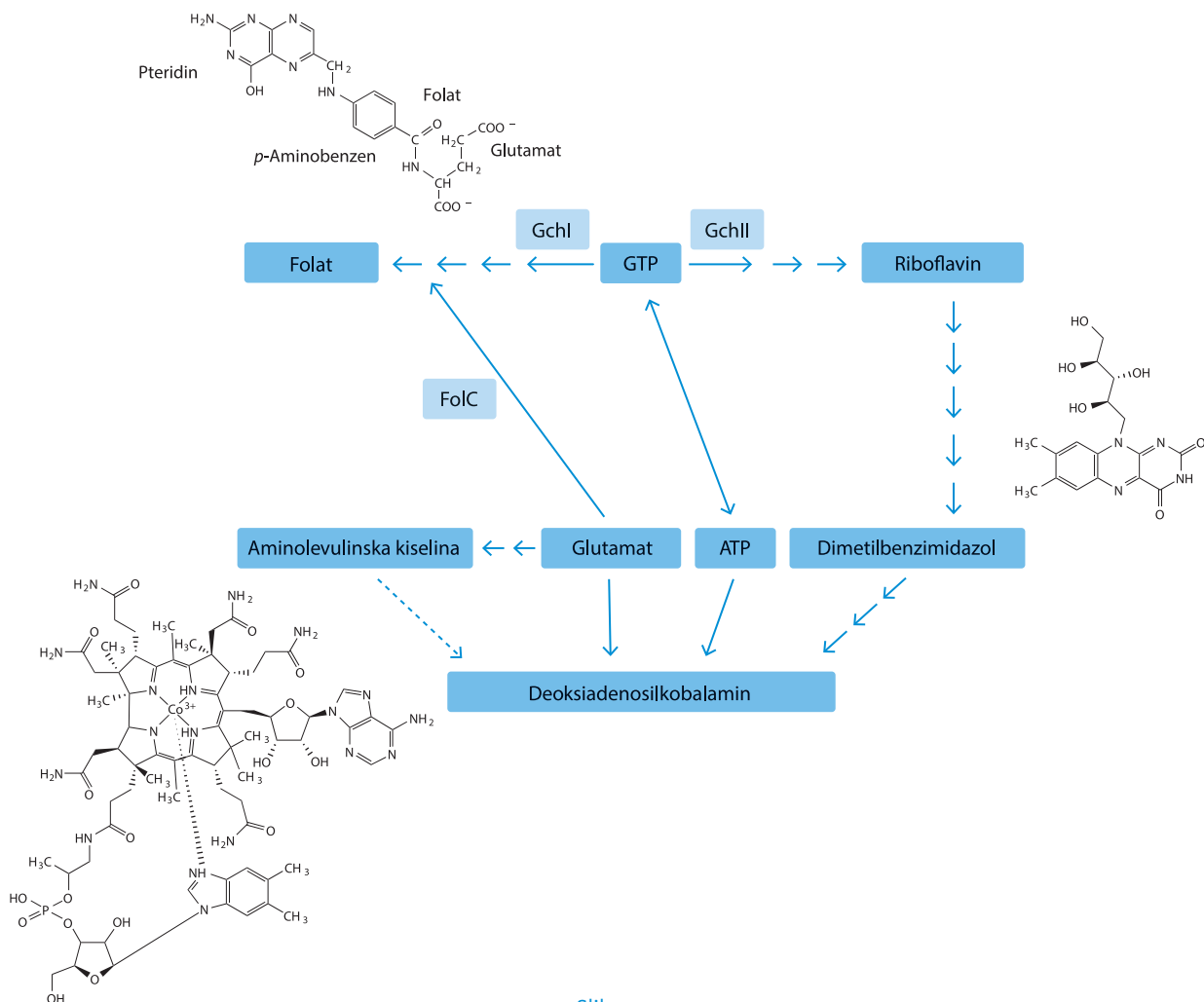
Shema nizin kontroliranog sustava ekspresije gena (NICE) u stanici bakterije *L. lactis*.

Detalji: dva gena *nisK* i *nisR* odgovorna su za dva komponentna regulatorna sustava, proteina NisK i NisR koji kontroliraju biosintezu nizina. Oni aktiviraju promotor P*, što dovodi do ekspresije umetnutoga gena X i biosinteze enzima X. Svijetlo plave elipse predstavljaju enzimske molekule. (Hugenholtz, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)

specifičnih *eps* gena u cilju dobivanja istovremene metaboličke aktivnosti šećera i sposobnosti tvorbe EPS. Konkretno to znači da je metabolizam BMK moguće usmjeriti na tvorbu EPS unaprijed određenog sastava i funkcionalnih svojstava (slika 2.10.).

Sljedeći je relativno jednostavan i dobro opisan mehanizam preusmjerenja metabolizma BMK kontrola sistema nizin ekspresije gena (NICE), koja omogućava strogu kontrolu homologne i heterogene ekspresije gena bakterije *Lactococcus lactis* (slika 2.11.).

Kontrolom NICE sustava, moguće je u bakterijskoj stanici potaknuti povećanu biosintezu B vitamina, folne kiseline (B₉), riboflavina (B₂) i kobalamina (B₁₂). Način *de novo* potaknute biosinteze B vitamina shematski je prikazan na slici 2.12. Značenje mogućnosti bakterijskog povećanja u proizvodu vitamina B₉, B₂ i B₁₂ koji su esencijalni za humanu prehranu,



Slika 2.12.

Shematski prikaz biosinteze vitamina B₉ (folne kiseline), B₂ (riboflavina), B₁₂ [deoksiadenozil (kobalamin)] u stanici bakterije *L. lactis* povezanih multienzimatskim interakcijama.

Detalji: skraćenice, Gchl - GTP ciklohidrolaza I kodiran genom *folE*; Gchll - GTP ciklohidrolaza II kodirana genom *ribA*; FolC - difidrofolat sintetaza kodirana genom *folC*; GTP - je početna prekursorska molekula. Isprekidane strelice označavaju multienzimatske reakcije. (Kleerebezem i Hugenholtz, 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

iznimno je važno. U razvijenim je zemljama deficijencija tih vitamina u organizmu prepoznata kao glavni uzrok različitih vrsta anemija. Osobito su te anemije izražene u adolescenata i osoba starije životne dobi.

U tom kontekstu, biološka tvornica vitamina smještena u samom proizvodu smatra se neusporedivo boljom opcijom od farmaceutskih nadomjestaka.

Dobar je primjer metaboličkog inženjeringa bakterija mliječne kiseline i rekombinacija gena izvršena u stanici bakterije *Lactobacillus reuteri*, kojom je reducirana prirodna rezistentnost te bakterije na vankomicin. U konkretnom slučaju, zamjenom samo jedne aminokiseline u D-Ala-D-Ala ligazi rezistentnost bakterije *L. reuteri* na vankomicin smanjena je za više od 100 puta (znatno ispod klinički relevantne koncentracije). Inače se ta bakterija zbog sposobnosti tvorbe reuterina antimikrobne komponente širokog spektra djelovanja često koristi u proizvodnji probiotičkih mliječnih proizvoda.

2.2.1.1.

—

Plazmidi

Plazmidi su male cirkularne ili znatno rjeđe linearne DNA molekule koje unutar bakterijske stanice mnogih bakterijskih vrsta egzistiraju neovisno o kromosomskoj DNA. Genetički, oni su samoreplikacijski elementi ili neesencijalna jedinica DNA koja autonomno replicira plazmide. Većina ih nosi jedan ili više transpozonskih elemenata koji su važni za: (i) inaktivaciju gena, što dovodi do mutacija, (ii) aktivaciju susjednih gena, (iii) horizontalni prijenos gena uz pomoć replicirajućih elemenata, što neposredno i posredno dovodi do promjena u organizaciji bakterijskog genoma. Zbog toga su plazmidi prema svojoj genetičkoj prirodi nestabilni elementi, što znači da ih stanica izložena bilo kojem obliku stresa ili mutaciji može izgubiti. Strukturu svih plazmida čine prirodni ili kriptični plazmidi koji jedino nose gene potrebne za vlastitu replikaciju i ne uzrokuju vidljivu fenotipsku promjenu bakterijske stanice. Većina plazmida, međutim, u svojoj strukturi može sadržavati gene koji kodiraju funkcije koje bakteriji omogućuju preživljavanje u specifičnom okolišu. Ovo svojstvo plazmida odgovorno je za veliki dio utvrđene fiziološke raznovrsnosti bakterija. Plazmidi uobičajeno sadrže i gene koji kodiraju funkciju horizontalnog prijenosa plazmida u drugu bakterijsku stanicu ili čak drugi organizam.

Kada se bakterijska stanica dijeli, svaka stanica kćeri dobije kopiju kromosomske DNA s kopijom ili

kopijama svih plazmida koji su prisutni u roditeljskoj stanici. Međutim, budući da se plazmid replicira neovisno o kromosomu, bilo koja mutacija ili stres može uzrokovati da stanice kćeri ne dobiju jedan, više ili sve plazmide roditeljske stanice. Posljedično, stanica kći u odnosu na roditeljsku stanicu izgubit će funkciju koja je bila kodirana određenim plazmidom ili plazmidima.

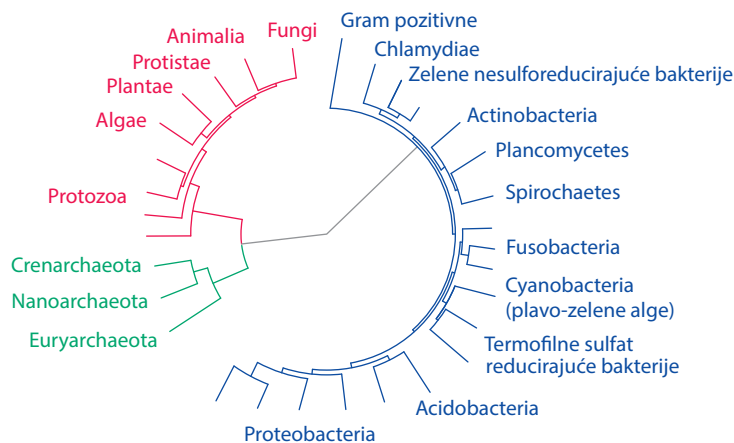
Identifikacija i genetska karakterizacija plazmida bakterija mliječne kiseline (BMK) i bifidobakterija postala je znanstveno interesantnom kada se utvrdilo da su za fermentaciju mlijeka neka od najvažnijih svojstava kodirana plazmidnim DNA genima. Istraživanjima koja su započela 1970. godine, otkriveno je da je gubitak plazmida osobito značajan za proizvodnju fermentiranih mlijeka u kojoj se koriste sojevi vrste *Lactococcus lactis*. Naime, brojne važne reakcije za mliječnu fermentaciju tih bakterijskih sojeva su plazmidno kodirane:

- metabolizam laktoze
- aktivnost proteinaza
- oligopeptidni transport
- mehanizam za rezistentnost na fag
- tvorbu bakteriocina
- rezistentnost na bakteriocin
- tvorbu egzopolisaharida
- metabolizam citrata.

Od tih prvih istraživanja do danas, identificirani su mnogi plazmidi laktokoka koji se veličinom, brojem u bakterijskoj stanici i funkcijom značajno razlikuju. Za više od njih 30 zna se kompletna sekvenca koja ima višestruko praktično značenje u biotehnologiji, a osobito u genetskom inženjeringu. Na temelju poznavanja i usporedbe sekvenci određenih plazmida za genetički inženjering razvijeni su:

- plazmidni vektori za kloniranje i metode za njihovu transformaciju (plazmidi koji se koriste u genetskom inženjeringu zovu se vektori)
- različiti gen ekspresijski vektori
- metodologija za ubacivanje bilo koje mutacije u specifičnu bakterijsku regiju.

Konstrukcijom visoko učinkovitih vektorskih sistema danas je genetskim inženjeringom moguća



Slika 2.13.

Pojednostavljeni prikaz filogenetskog odnosa između bakterijskih koljena (*phylum*) u usporedbi s drugim organizmima. Eukarioti (Eukarya) su označeni crvenom, a arheje (Archaea) zelenom bojom.

introdukcija novog genetskog materijala u bakterijske stanice. Za mljekarsku industriju to znači da se za komercijalnu upotrebu mogu dizajnirati kulture s različitim svojstvima i namjene. Bakterijska stanica *L. lactis* prosječno sadrži između 4 i 7 plazmida čija je veličina od 2 do 80 kb, a svaki od njih u stanici može biti prisutan u mnogo kopija.

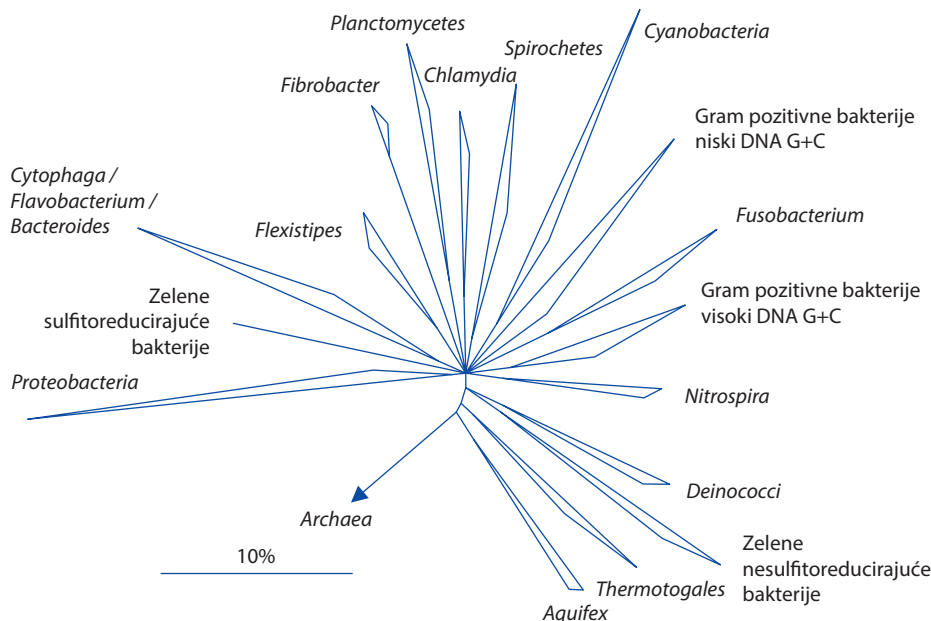
Plazmide od kojih je funkcija nekih poznata a mnogih još uvijek nepoznata u svojim stanicama sadrže i bakterijski sojevi *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Streptococcus thermophilus*. Za laktobacile je utvrđeno da najčešće sadrže jedan ili više različitih plazmida, ali ih je i čak 16 utvrđeno za *L. plantarum*. Njihova veličina varira od 1.2 do 150 kb, a za svega njih nekoliko se zna koje bakterijske funkcije kodiraju. Identificirane su plazmidno kodirane funkcije laktobacila za: (i) metabolizam ugljikohidrata, proteina, aminokiselina i citrata, (ii) tvorbu bakteriocina i (iii) rezistentnost na antibiotike, teške metale i bakteriofage. U tehnološkom smislu, gubitak plazmida laktobacila za proces fermentacije mlijeka značajno je manji u odnosu na gubitak plazmida laktokoka. Laktobacili uz plazmidno kodirani fosfoenolpiruvat (PEP)-ovisni fosfotransferazni (PEP:PTS) sustav za unos laktoze u stanicu imaju i plazmidno nekodirani ATP-ovisni laktoza permeazni sustav. Također, niti plazmidna povezanost s metabolizmom laktoze i proteina u laktobacila nije striktno zadana kao u laktokoka.

Od vrsta bifidobakterija značajnih za mljekarsku industriju, prema dosadašnjim studijama izgleda da od plazmida jedino vrste *B. longum*, *B. infantis* i *B. breve* sadrže kriptične plazmide. Do danas, karakterizirano ih je oko 30, a u usporedbi s kriptičnim plazmidima laktobacila i laktokoka oni su relativno male veličine (≤ 10 kb). Međutim, usprkos ekstenzivnim molekularnim istraživanjima njihova biološka funkcija za bakterijsku stanicu je još uvijek nepoznata.

2.3.

Filogeneza bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija

Filogenetske analize BMK i bifidobakterija, kao uo-stalom i svih bakterija, temelje se na usporedbi visoko konzerviranih molekula koje su prisutne u svim mikroorganizmima. Zbog toga su geni koji kodiraju ribosomalnu RNA (rRNA) i koji sadrže konzervirane i varijabilne regije izabrani za filogenetska proučavanja svih vrsta bakterija. Usporedba sekvenci rRNA trenutno se smatra najboljom i najtočnijom tehnikom za determinaciju stupnja filogenetskog odnosa između bakterija (slika 2.13.).



Slika 2.14.

Filogenetsko stablo podrijetla glavnih linija bakterija sačinjeno na temelju komparativne analize 16S rRNA sekvenci. (Schleifer i sur.,1995., s dopuštenjem Elseviera.)

Usporedbom sekvenci 16S rRNA molekule utvrđeno je da sve gram-pozitivne bakterije kojima pripadaju BMK i bifidobakterije imaju jaku filogenetsku povezanost i pripadaju jednoj od jedanaest glavnih bakterijskih grana na filogenetskom stablu (2.14.).

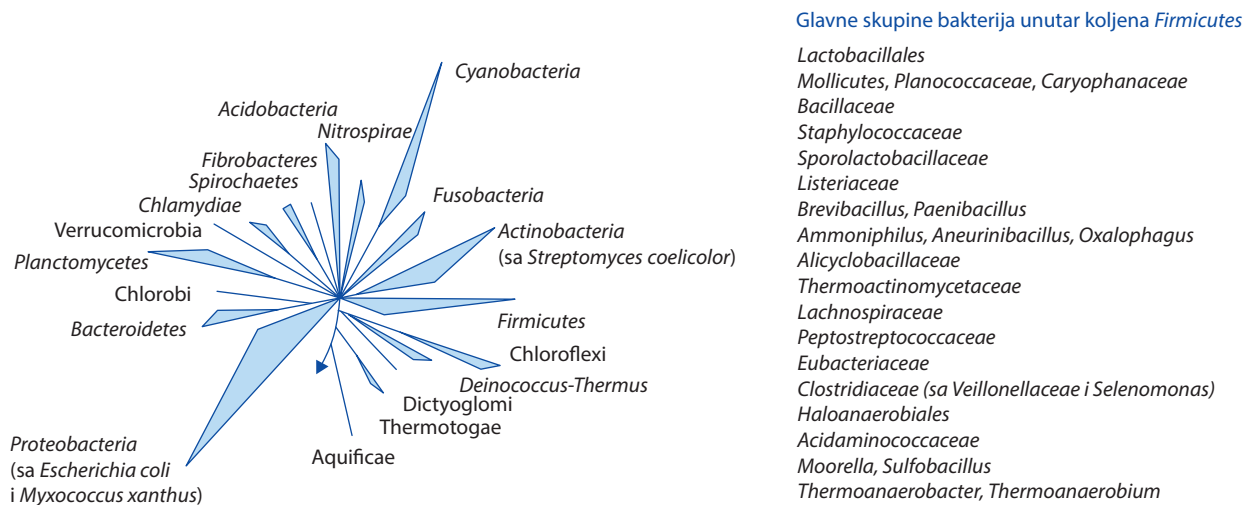
Gram-pozitivne bakterije na temelju mol % udjela gvanina i citozin (G + C) u svojim DNA molekulama podijeljene su u dvije filogenetske grupe ili dva klastera.

S aerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama rodova *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* i anaerobnim *Clostridium*, *Peptococcus* i *Ruminococcus*, filogenetski, BMK pripadaju klostridijalnoj grani gram-pozitivnih bakterija i koljenu *Firmicutes* koje imaju manje od 55 mol % G + C u DNA molekuli. Glavne skupine bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes* prikazuje slika 2.15.

Taksonomsko rangiranje BMK na temelju njihova filogenetskog odnosa do razine roda prikazano je u tablici 2.2.

Međusobna filogenetska povezanost između rodova BMK i rodova ostalih bakterijskih vrsta koje pripadaju klostridijalnoj grani gram pozitivnih bakterija nije jednoznačna. Rod *Lactobacillus* filogenetski je srodan porodici *Leuconostocaceae* koja uključuje rodove *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella*. Rodovi *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* i *Vagococcus* čine koherentnu filogenetsku jedinicu s evidentnim grupiranjem i smatra se da su oni međusobno srodniji u usporedbi s ostalim rodovima BMK. Rod *Enterococcus* je filogenetski više povezan s rodom *Listeria* i vjerojatno s rodom *Bacillus* nego s ostalim rodovima BMK. Filogenetski, u usporedbi s ostalim rodovima gram-pozitivnih bakterija klostridijalne grane, rodovi *Lactococcus* i *Streptococcus* međusobno su genetički najbližiji, premda ta sličnost nije tako jaka kao ona između rodova *Enterococcus* i *Listeria*.

Prema današnjim filogenetskim znanstvenim spoznajama, BMK čine vrlo divergentnu grupu



Slika 2.15.

Filogenetski odnos između bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes* u odnosu na ostale bakterije (lijeva strana slike) i njihove najvažnije skupine bakterija (desna strana slike). (Vollmer, 2012., s dopuštenjem Macmillan Publishers Ltd-a.)

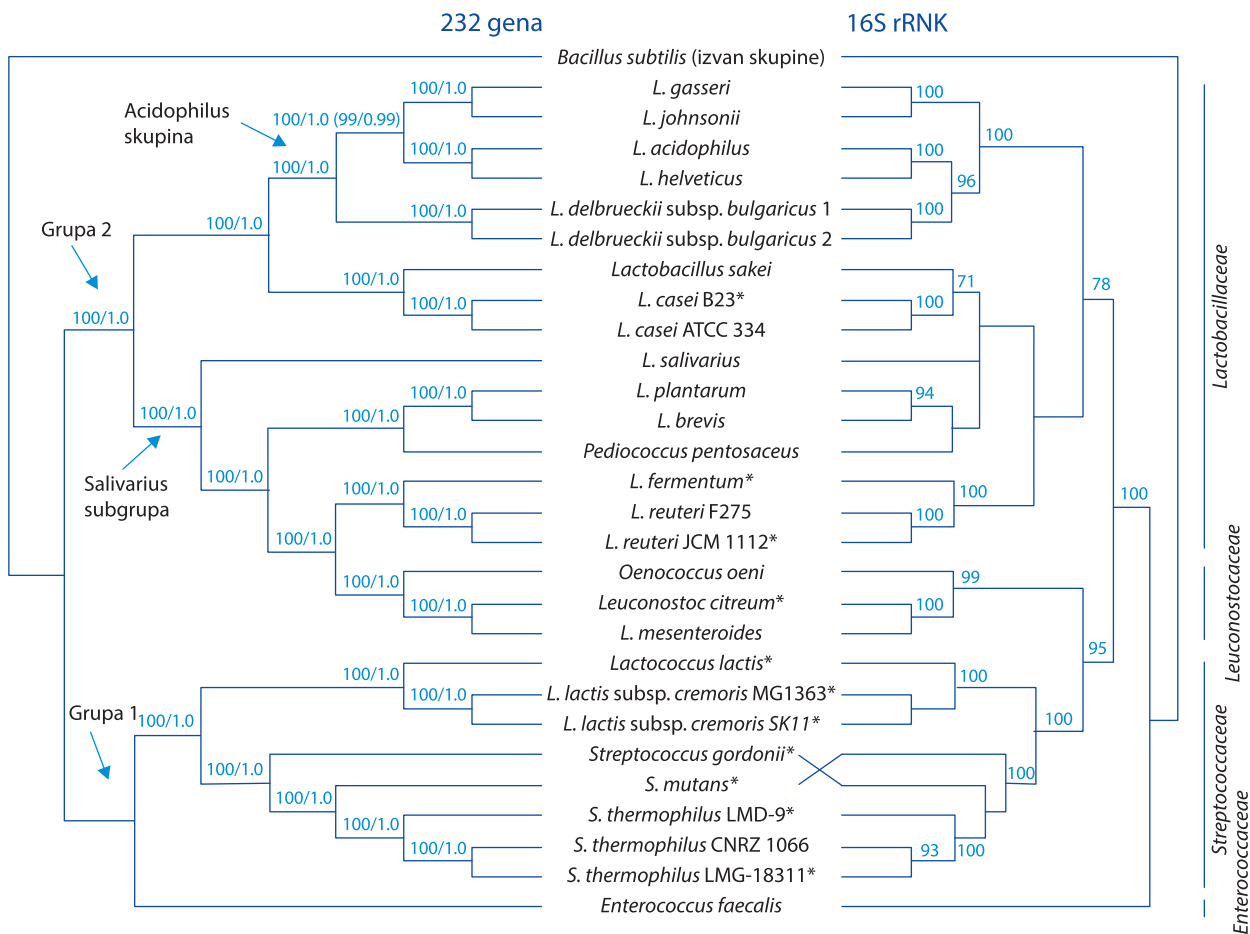
Tablica 2.2.

Filogenetsko taksonomsko rangiranje bakterija mliječne kiseline do razine roda

Domena	Koljeno	Razred	Red	Porodica	Rod
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>
				<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
					<i>Tetragenococcus</i>
					<i>Vagococcus</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
					<i>Pediococcus</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
					<i>Oenococcus</i>
					<i>Weissella</i>
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
					<i>Lactococcus</i>

organizama, ali koja ima dovoljno zajedničkih karakteristika koje ih povezuju. Filogenetska analiza temeljena na 232 gena sekvencionirana iz 28 bakterijskih genoma pokazuje da BMK čine dvije povezane skupine. Jedna skupina uključuje porodice *Enterococcaceae* i *Streptococcaceae*, a druga skupina

porodice *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae* (slika 2.16.). Filogenetski odnosi između tih porodica iskazuju njihovu jaku evolucijsku povezanost. Istodobno, genotipska i fenotipska razlika između bakterijskih vrsta unutar rodova pojedinih porodica je posljedica evolucijskog nezavisnog korištenja različitih gena koji



Slika 2.16.

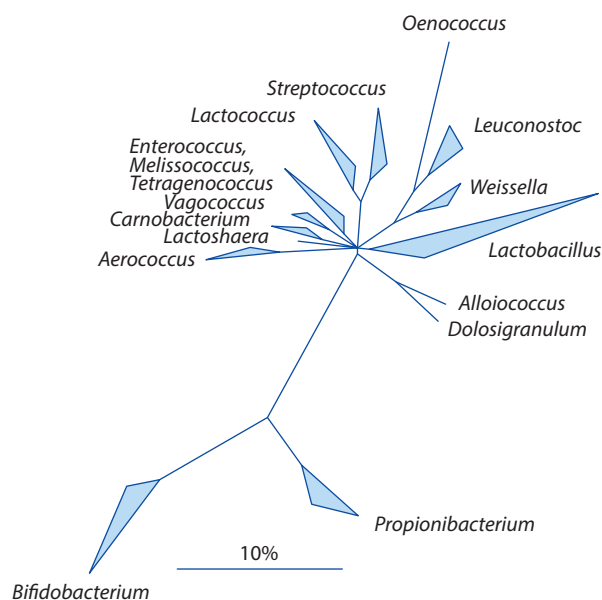
Filogenetsko stablo bakterija mliječne kiseline konstruirano na temelju kombinacije 232 gena i 16S rRNA gena. Detalji: vrste označene * označavaju novoadaptirane vrste. (Zhang i sur., 2011., CC BY 2,0)

su im omogućili preživljavanje i adaptaciju u različitim ekološkim nišama. Između rodova koji taksonomski čine skupinu BMK, glavnim rodovima dogovorno se smatraju četiri roda:

- *Lactobacillus*
- *Streptococcus*
- *Leuconostoc*
- *Enterococcus*.

Bifidobakterije, za razliku od BMK, čine drugu filogenetsku skupinu gram-pozitivnih bakterija koje imaju više od 55 mol % G + C u DNA molekulama i pripadaju bakterijskoj grani *Actinomyces*. Filogenetski odnos između BMK i bifidobakterija prikazan je na slici 2.17.

Taksonomsko rangiranje bifidobakterija na temelju njihova filogenetskog odnosa prikazano je u tablici 2.3.



Slika 2.17.

Filogenetsko stablo skupine gram-pozitivnih bakterija mliječne kiseline s niskim mol % udjelom G + C u DNA i od njih odvojenu skupinu gram-pozitivnih bakterija rodova *Bifidobacterium* i *Propionibacterium* s visokim mol % udjelom G + C u DNA molekulama.

Detalji: filogenetsko stablo predstavlja konsenzusno stablo sačinjeno na temelju komparativne analize bakterijskih 16S rRNA sekvenci. Mjera od 10 % pretpostavlja očekivanu razliku u njihovim gen sekvencama. (Schleifer i sur. 1995., s dopuštanjem Elseviera.)

Tablica 2.3.

Filogenetsko taksonomsko rangiranje bifidobakterija do razine roda

Klasifikacijski rang

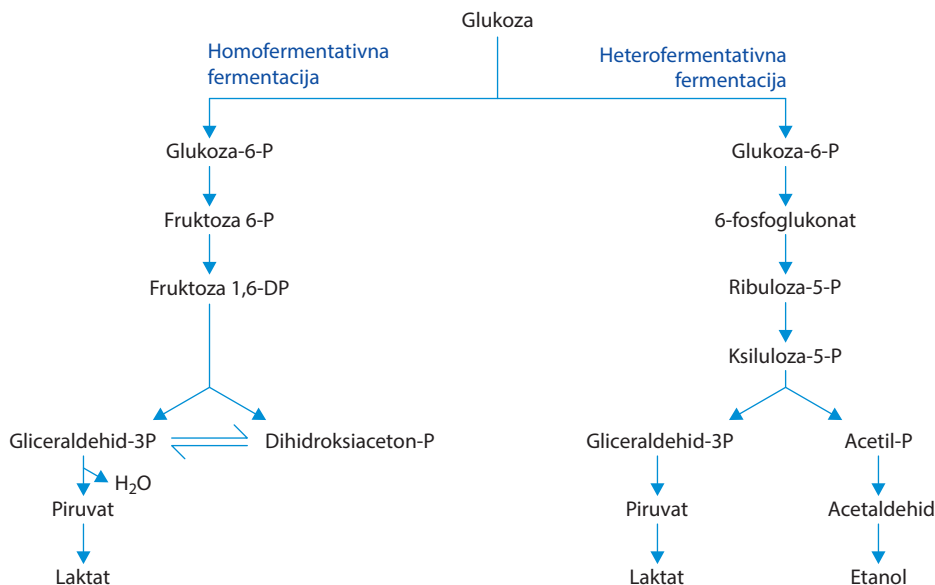
Domena	<i>Bacteria</i>
Koljeno	<i>Actinobacteria</i>
Razred	<i>Actinobacteria</i>
Red	<i>Bifidobacteriales</i>
Porodica	<i>Bifidobacteraceae</i>
Rod	<i>Bifidobacterium</i>

2.3.1.

Opis bakterija mliječne kiseline

Evolucijski, bakterije mliječne kiseline (BMK) pojavile su se na Zemlji među prvim živim organizmima prije tri milijarde godina u periodu prelaska ostalih anaerobnih organizama u aerobne organizme. Zbog toga su se one podjednako dobro adaptirale na anaerobne i aerobne uvjete života na Zemlji. Međutim, evolucijom one nikada nisu stekle sposobnost za biosintezu hemoproteina, ključne komponente citokroma premda posjeduju sve potrebne gene za sintezu respiratornih proteina i nekoliko enzima koji su uključeni u fermentacijskim ciklusima. Posljedično tome, respiratorni metabolizam BMK iskazuju jedino u prisutnosti njegova egzogenog izvora. Nemogućnost sinteze hemoproteina uvjetovala je i nepostojanje enzima poput peroksidaze i katalaze (ključni enzimi u katabolizmu hidroksilnih radikala), što je umanjilo njihovu rezistentnost na toksičnost O₂. Sposobnost intracelularne akumulacije velikih količina magnezija (do 25 mM), selena i cinka koji mogu preuzeti ulogu enzima poput superoksid dezmutaze za katabolizam kisik radikala u stanici, BMK mogu tolerirati kisik. Vrlo često one se zbog te sposobnosti definiraju mikroaerofilnim ili kisik neovisnim organizmima.

Bakterije mliječne kiseline vjerojatno su i najrasprostranjenija skupina bakterija povezana s čovjekom. Prirodno su povezane s mukoznim površinama (usna šupljina, gastrointestinalni i genitalni sustav čovjeka i životinja), prirodna su populacija hrane (mlijeko, meso, vino) i biljaka (voća, povrća i žitarica). Rasprostranjene su posvuda u prirodi gdje je visoka koncentracija ugljikohidrata, razgradljivih produkata proteina, vitamina i malo kisika. Bakterije mliječne kiseline imaju presudnu ulogu u fermentaciji mliječnih proizvoda, mesa, povrća, vina, kave, kakaa i silaže, i izvor su antimikrobnih i probiotičkih bakterijskih sojeva. Osim nekoliko patogenih vrsta roda *Streptococcus*, većina vrsta BMK pripada neškodljivim korisnim bakterijama. Ime - bakterije mliječne kiseline prihvaćeno je početkom 20. stoljeća.



Slika 2.18.

Uopćena shema za primarnu homofermentativnu i heterofermentativnu fermentaciju glukoze bakterija mliječne kiseline. (Caplice i Fitzgerald, 1999., s dopuštenjem Elseviera.)

Jednoznačna definicija za pojam bakterija mliječne kiseline ne postoji. Definicije koje se mogu naći u literaturi više se odnose na opis nekih od njihovih karakteristika koje su točne u točno definiranim kultivacijskim uvjetima. Tako je prihvatljivije i točnije bakterije mliječne kiseline opisati na sljedeći način:

- gram-pozitivne bakterije koje ne tvore spore
- katalaza negativne
- nemaju citokrome
- anaerobne, ali aerobno tolerantne
- izbirljive prema mediju rasta
- kiselo tolerantne
- stvaraju mliječnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata.

Morfološki, BMK su izgledom koki, kokobacili ili bacili. Poput većine drugih bakterija, razmnožavaju se binarnom diobom, što znači, formira se njihova točna replika pojavom stanica kćeri. U optimalnim uvjetima BMK rastu i razmnožavaju se brzo s generacijskim vremenom od 30 do 90 minuta.

Prema krajnjem produktu metabolizma i optimalnoj temperaturi rasta, BMK su svrstane u homofermentativne

i heterofermentativne mezofilne ili termofilne organizme. Homofermentativna skupina BMK iz laktoze (mliječni šećer) stvara 70 - 90 % mliječne kiseline, a heterofermentativna skupina uz mliječnu kiselinu stvara još i octenu kiselinu, CO₂ i etanol. Primarni metabolizam BMK prikazuje slika 2.18., a sekundarni piruvat metabolizam kojim nastaju važni metabolički spojevi okusa slika 2.19. Neovisno da li su prema svom metabolizmu homofermentativni ili heterofermentativni organizmi, mezofilna skupina BMK raste najbolje na temperaturi između 25 i 30 °C, a termofilna preferira rast na temperaturi od 40 do 44 °C.

2.3.1.1.

Rod *Lactobacillus*

Taksonomski, rod *Lactobacillus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Genetski i fiziološki čini ga heterogena skupina bakterija s više od 150 vrsta. Prema broju vrsta unutar skupine BMK rod *Lactobacillus* je najveći

Tablica 2.4.

Organizam/skupina	Filogenetska skupina	G + C skupina	Mliječna kiselina izomer (i)	Rast 15/45 °C
Genetičke i fiziološke karakteristike nekih od bakterijskih vrsta roda <i>Lactobacillus</i> značajnih za fermentaciju laktoze mlijeka				
Obligatno homofermentativna				
<i>L. acidophilus</i>	A	34 – 37	DL	-/+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	A	49 – 51	D(-)	-/+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	A	49 – 51	D(-)	-/+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	A	49 – 51	D(-)	-/+
<i>L. gasserii</i>	A	33 – 35	DL	-/+
<i>L. helveticus</i>	A	38 – 40	DL	-/+
<i>L. johnsonii</i>	A	33 – 35	DL	+/+
<i>L. kefiranofaciens</i>	A	34 – 35	D(L)	-/-
Fakultativno heterofermentativna				
<i>L. casei</i>	B	45 – 47	L/DL	+/d
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	B	45 – 47	L/DL ^d	+/d
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	B	45 – 47	L(+)	+/+
<i>L. rhamnosus</i>	B	45 – 47	L(+)	+/+
<i>L. plantarum</i>	B	44 – 46	DL	+/+
Obligatno heterofermentativna				
<i>L. brevis</i>	B	44 – 47	DL	+/+
<i>L. fermentum</i>	B	52 – 54	DL	-/+
<i>L. reuteri</i>	B	40 – 42	DL	-/+
<i>L. kefir</i>	B	41 – 42	DL	+/+
<i>L. viridescens</i>	C	41 – 44	DI	+/+

A skupina – vrste koje pripadaju *L. delbrueckii* grupi; B skupina – vrste koje pripadaju *L. casei*–*Pediococcus* grupi; C skupina – vrste koje pripadaju *Leuconostoc* grupi; d – određeni sojevi (prilagođeno prema Barinovu i sur., 2011.)

fermentirati heksoze do gotovo isključivo mliječne kiseline Embden-Meyerhof- Parnasovim putem. Kako im nedostaje enzim fosfoketolaza, nemaju sposobnost fermentacije pentoza ili glukonata. Drugu skupinu čine fakultativno heterofermentativni laktobacili koji također razgrađuju heksoze do mliječne kiseline Embden-Meyerhof-Parnasovim putem. Međutim, ta skupina bakterija ima enzime fosfoketolazu i aldolazu te one dodatno imaju sposobnost razgradnje pentoza i vrlo često glukonata. Obligatni heterofermentativni laktobacili čine treću skupinu koja heksoze razgrađuje fosfoketolaznim ili pentoza-fosfatnim putem do mliječne kiseline, etanola ili octene kiseline i CO₂. Pentoze ti mikroorganizmi razgrađuju istim fosfoketolaznim putem kao i skupina fakultativno heterofermentativnih laktobacila.

Od bakterija prve fiziološke skupine laktobacila, u sastavu mikrobnih kultura najčešće se koriste bakterije: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i *L. helveticus*. Te bakterijske vrste u usporedbi

s vrstama BMK iz drugih dviju skupina mogu rasti na višim temperaturama (> 45 °C). U odnosu na sve ostale bakterije mliječne kiseline te su bakterijske vrste najtolerantnije na kiseli medij. Za početan rast one zahtijevaju pH-vrijednost sredine između 5,5 i 6,2, a fermentacijom laktoze pH-mlijeka snižavaju na vrijednost nižu od 4.

Bakterija *Lactobacillus acidophilus*, iako ne spada u tradicionalne bakterije mliječne kiseline iz sastava kultura, ubraja se u prvu fiziološku skupinu bakterija. Naime, *L. acidophilus* se koristi u mljekarskoj industriji zbog probiotičkog djelovanja određenih sojeva na zdravlje ljudi.

U monokulturi laktobacili sporo rastu u mlijeku, zbog toga se najčešće koriste u kombinaciji sa *S. thermophilus* u formi mješovite kulture. Za proizvodnju fermentiranih mlijeka najvažnije genetičke i fiziološke karakteristike nekih *Lactobacillus* spp. u odnosu na način hidrolize laktoze prikazuje tablica 2.4.

2.3.1.2.

Rod *Lactococcus*

Taksonomski, rod *Lactococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Streptococcaceae*. Čine ga do sada sedam opisanih vrsta: *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. fujiensis* i *L. chungangensis*. Za mljekarsku industriju jedino značenje ima vrsta *Lactococcus lactis*. U usporedbi s drugim vrstama BMK, *L. lactis* ima svoja dva genotipa (*L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*) i tri industrijski značajna fenotipa (*lactis*, *cremoris* i *diacetylactis*). Drugim riječima, bakterijski sojevi koji su prema genotipu *L. lactis* subsp. *lactis* pokazuju fenotipske karakteristike *L. lactis* subsp. *cremoris* podvrste i obrnuto. Na temelju sekvence 16S rRNA gena te dvije podvrste razlikuju se prema 9 - 10 parova baza u V1 regiji, ali ne i na temelju sekvence 16S-23S rRNA regije. Usporedbom DNA sekvenci određenih gena te se dvije podvrste razlikuju između 20 i 30 %. Laktokoki (prije N grupa streptokoka) čine glavninu mezofilnih organizama koji se koriste za stvaranje mliječne kiseline u mliječnim fermentacijama.

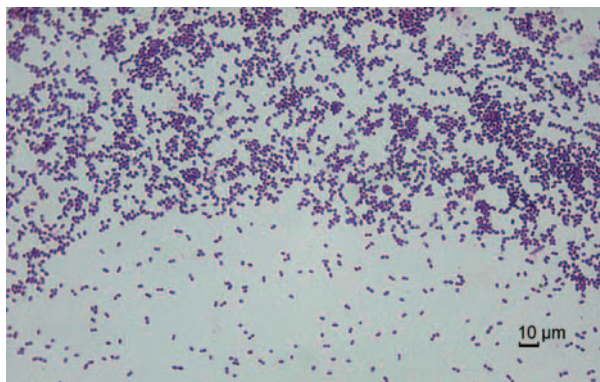
Prirodno su stanište laktokoka zelene biljke, međutim, prirodni izvor *L. lactis* subsp. *cremoris* nije još potvrđen i predmetom je brojnih kontroverzi. Klasične metode za identifikaciju temelje se uglavnom na morfološkim biokemijskim i fiziološkim karakteristikama. Za točnu i potpuniju diskriminaciju *L. lactis* podvrsta i varijeteta koristi se identifikacija na molekularnoj razini.

2.3.1.3.

Rod *Enterococcus*

Taksonomski, rod *Enterococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Enterococcaceae*. Rod *Enterococcus* ne smatra se osobito značajnim u prehrambenoj industriji. Određeni sojevi vrsta *E. faecium*, *E. faecalis* koriste se u svojstvu dodatka kulturi u proizvodnji nekih sireva i komercijalno kao probiotici u prevenciji i liječenju intestinalnih tegoba u ljudi.

Inače, obje bakterijske vrste prirodni su stanovnici humanoga intestinalnog trakta: *E. faecalis* (90 - 95 %), a *E. faecium* (5 - 10 %).



Slika 2.21.

Morfološki izgled bakterije *Enterococcus faecalis* ispod optičkog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (CC BY-SA 3,0.)

Prema taksonomskoj klasifikaciji bakterija, enterokoki pripadaju gram-pozitivnim bakterijama s niskim mol % udjelom G + C u DNA molekuli. Filogenetski, najsirodniji su im rodovi *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* i *Aerococcus*. Znatno manje srodni enterokokima su rodovi *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus*. Prema dostupnim podatcima, rod *Enterococcus* sadržava više od 40 vrsta.

Enteroki pokazuju višu proteolitičku aktivnost od ostalih BMK. Također, imaju sposobnost razgradnje mliječne masti esterazama, a citratnim metabolizmom tvore aromatične spojeve poput diacetila, acetoina i acetaldehida. Njihova rezistentnost na djelovanje humanih antibiotika i posjedovanje virulentnih faktora daje nekim sojevima enterokoka status "nesigurnih" bakterija za sastav mikrobnih kultura. Stjecanje antibiotske rezistencije i mehanizmi njezina širenja temeljito su istraženi i objašnjeni. Istovremeno, činjenice vezane za virulentne faktore i patogenost tih bakterijskih vrsta još su uvijek nedovoljno poznate.

Morfološki, enterokoki se često pojavljuju u formi diplokoka u parovima ili kratkim lancima (slika 2.21.) i

na temelju samo morfoloških karakteristika teško ih je razlikovati od streptokoka. Fakultativno su anaerobni i katalaza negativni organizmi. Sve vrste enterokoka pokazuju prirodnu otpornost na toplinu (preživljavaju zagrijavanje medija na ~ 60 °C/30 min), isušivanje i dezinfekcijska sredstva. Rastu na temperaturama između 10 i 45 °C i u mediju pH-vrijednosti između 4,0 i 9,6, i podnose relativno visoke koncentracije soli (6,5 %), hidroliziraju eskulin u prisutnosti 40 % žučnih soli.

2.3.1.4.

—

Rod *Streptococcus*

Taksonomski, rod *Streptococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Streptococcaceae*. Između vrsta koje pripadaju ovom rodu, jedino se *Streptococcus thermophilus* koristi u mljekarskoj industriji. U tom smislu, bakterija *S. thermophilus* nezamjenjiv je organizam u kulturama za jogurt i određenim vrstama sireva.

Genetički je bakterija *S. thermophilus* slična oralnom streptokoku (*Streptococcus salivarius*), ali nije ista i čini zasebnu vrstu. Od ostalih streptokoka i laktokoka bakterija *S. thermophilus* razlikuje se boljom rezistentnošću na temperaturu, sposobnošću rasta i razmnožavanja na 52 °C, fermentaciji limitiranog broja ugljikohidrata i slabom proteolitičkom aktivnosti. Zbog toga su u sastavu kultura za većinu mliječnih proizvoda gdje se koriste više temperature fermentacije (> 40 °C) uz *S. thermophilus* prisutne i druge bakterije *Lactobacillus* spp.

2.3.1.5.

—

Rod *Leuconostoc*

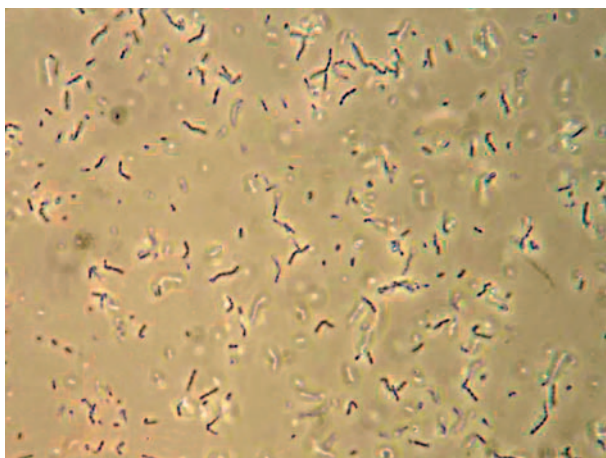
Taksonomski, rod *Leuconostoc* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Leuconostocaceae* i čini ga do sada 15 opisanih vrsta. Filogenetski je rod *Leuconostoc* srodan rodovima *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Mnoga zajednička genetička obilježja dijeli s heterofermentativnim laktobacilima, ali ne

fermentira arginin. Na temelju morfoloških svojstava rod *Leuconostoc* blisko je srodan sa streptokokima, koji su se prije prema Orla-Jensenu nazivali betakoki. Zbog te morfološke sličnosti, rod *Leuconostoc*, za razliku od laktobacila, pripada skupini mezofilnih heterofermentativnih koka.

Bakterije *Leuconostoc* spp. iz glukoze stvaraju D (-) laktat, za razliku od laktokoka koji iz glukoze stvaraju L (+) i heterofermentativnih laktobacila koji stvaraju DL laktat. Prema današnjim spoznajama, rod *Leuconostoc* taksonomski čine osam različitih vrsta, koje su izolirane iz biljaka, mesa, povrća i fermentiranih mliječnih proizvoda.

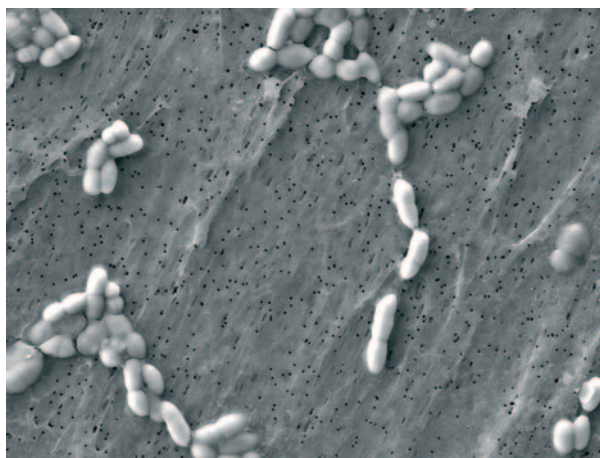
Leuconostoc spp. su mezofilne (~ 25 °C), gram-pozitivne bakterije koje imaju manje od 55 mol % G + C u svojim DNA molekulama. One su nepokretne, fakultativno anaerobne, katalaza negativne, vankomicin rezistentne. Neki bakterijski sojevi vrsta ovog roda imaju sposobnost tvorbe egzopolisaharida (EPS). Morfološki izgled leukonostoka ovisno u mediju u kojem rastu je varijabilan tako se bakterijske stanice mogu pojavljivati u obliku bacila ili tvoriti nakupine. Ipak, najčešće se pojavljuju u paru u formi koka ili tvore kratke lance (slika 2.22.). Za svoj rast i razmnožavanje zahtijevaju kompleksan medij koji sadrži vitamine B kompleksa, minerale, osobito Mg i Mn, i aminokiseline - aspartansku, glutaminsku, valin, leucin, izoleucin, histidin, metionin, triptofan, arginin i cistein. Vrste roda *Leuconostoc* nemaju funkcionalne citokrome te im nedostaju i određeni enzimi Krebsova ciklusa. Zbog toga one potrebnu energiju za svoj rast i razmnožavanje u mediju mogu dobiti jedino fermentacijom šećera, ali pritom uz mliječnu kiselinu uvijek nastaju CO₂, etanol ili acetat.

U mlijeku bakterije *Leuconostoc* spp. općenito slabo rastu, zbog toga se u proizvodnji mliječnih proizvoda ne koriste u monokulturi. Najčešće se koriste s laktokokima, premda njihov simbiotski odnos još uvijek nije u potpunosti poznat. Pretpostavlja se da postoji određena fizička povezanost između laktokoka i leukonostok sojeva koji tvore EPS koji su presudni za njihov simbiotski odnos rasta i razmnožavanja u kulturi. U mlijeku bakterije *Leuconostoc* spp. tvore



Slika 2.22.

Morfološki izgled bakterijskih stanica *Leuconostoc* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x. (T. Pogačić, darovana slika.)



Slika 2.23.

Morfološki izgled bakterije *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). (Chr. Hansen, darovana slika.)

D (-) mliječnu kiselinu, CO₂ i aromatske komponente (etanol, diacetil i octenu kiselinu).

Za mljekarsku industriju, zbog sposobnosti fermentacije citrata, značenje imaju *Lc. lactis* i dvije podvrste *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* (prije poznat pod imenom *Lc. cremoris* ili *Lc. citrovorum*) i *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Bakterije dviju podvrsta međusobno se razlikuju prema sposobnosti fermentacije različitih ugljikohidrata. *Lc. lactis* pokazuje veću rezistentnost na temperaturu od ostalih leuconostoka i može preživjeti toplinsku obradu mlijeka na 60 °C/30 minuta. Morfološki izgled bakterije *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* snimljen elektronskim mikroskopom prikazuje slika 2.23.

U sastavu kultura za proizvodnju kiselog mlijeka, kefira ili kumisa bakterije *Leuconostoc* spp. obično se ne koriste za tvorbu mliječne kiseline, već zbog sposobnosti tvorbe aromatskih komponenti. Kada su prisutne u mješovitoj kulturi (najčešće s *L. lactis* subsp. *lactis* ili *L. lactis* subsp. *cremoris*) čine 1 - 10 % ukupne mikrobne populacije. Primarna funkcija *Leuconostoc* spp., osobito *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, je tvorba

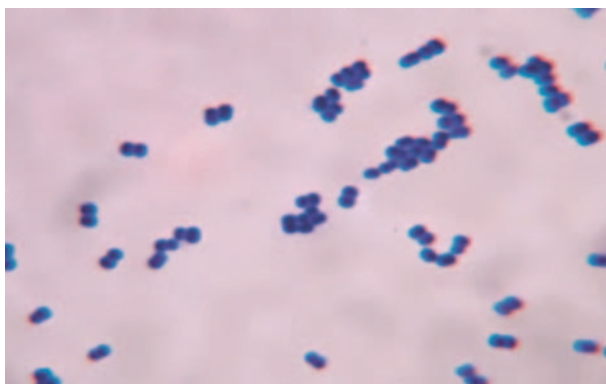
diacetila metabolizmom citrata sadržanog u mlijeku kojim se obogaćuje okus proizvoda. U mješovitim kulturama *Leuconostoc* spp. se koriste i za snižavanje koncentracije acetaldehida njegovim pretvaranjem u diacetil. Naime, visoke koncentracije acetaldehida uzrokuju nezreli ("zeleni") okus onih vrsta fermentiranih mlijeka za čiju se fermentaciju koristi mezofilna mljekarska mikrobna kultura.

Bakterije *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* koriste se i kao dopunska kultura u proizvodnji jogurta ako potrošači favoriziraju okus jogurta po diacetilu.

2.3.1.6.

Rod *Pediococcus*

Taksonomski, rod *Pediococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Bakterije roda *Pediococcus* su homofermentativni organizmi, a gotovo sve vrste iz glukoze stvaraju DL izomer mliječne kiseline. Premda su ekonomski



Slika 2.24.

Morfološki izgled bakterijskih stanica *Pediococcus* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa. (Sukumar i Ghosh, 2013., CC BY-SA 3,0.)

važne za sastav komercijalnih kultura, način njihove fermentacije šećera nije u potpunosti poznat. Nerado za izvor ugljika koriste laktozu i zbog toga relativno slabo rastu u mlijeku. Neke vrste pokazuju iznimnu toleranciju na temperaturu, pH i NaCl. Morfološki su stanice pediokoka okruglog oblika, nikada nisu izdužene, pojedinačne su stanice rijetke, a nikada ne tvore lance već se pojavljuju u parovima ili tetradama (slika 2.24.)

2.3.2.

Opće karakteristike bifidobakterija

Prema svom izvornom staništu (biotopu) do sada opisane vrste bifidobakterija mogu se svrstati u šest različitih ekoloških niša: humani i animalni intestinalni sustav, usna šupljina, hrana, probavni sustav insekata i odvodne vode.

Prema dosadašnjim studijama, bifidobakterije humanog intestinalnog sustava se smatraju jednom od najbrojnijih mikrobnih vrsta u odrasle zdrave osobe.

One u probavnom sustavu imaju funkciju regulacije crijevne mikrobne populacije, te se smatraju promotorima dobrog zdravlja. Međutim, treba istaknuti da nedavno opisana vrsta *B. dentium* Bd1 izolirana iz usne šupljine pokazuje potencijalnu patogenost zbog sposobnosti acidogeneze koja je povezana s demineralizacijom zuba i razvitkom zubnog karijesa.

Zbog svoje anaerobne prirode, bifidobakterije dosta teško rastu, uzgajaju se i čuvaju u raspoloživim medijima za njihov uzgoj. Mlijeko također nije optimalna sredina za njihov rast i razmnožavanje pa je korištenje bifidobakterija u fermentaciji mlijeka ograničeno.

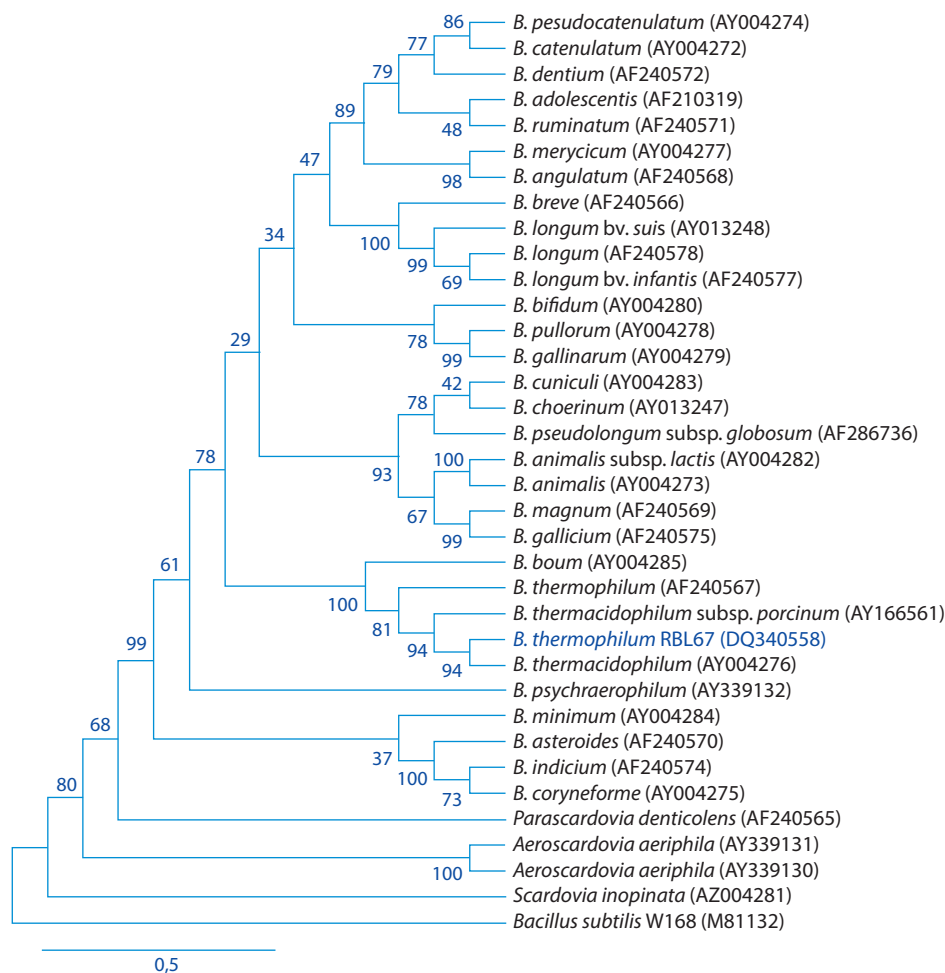
2.3.2.1.

Rod *Bifidobacterium*

Taksonomski, rod *Bifidobacterium* pripada koljeno *Actinobacteria*, redu *Bifidobacteriales* i porodici *Bifidobacteriaceae*. Unutar roda *Bifidobacterium* trenutno je opisano više od 40 bakterijskih vrsta, od kojih su 10 humanog, 17 animalnog podrijetla, dvije vrste izolirane su iz otpadnih voda, a jedna je vrsta izolirana iz fermentiranog mlijeka. Filogenetska razlika između vrsta bifidobakterija utvrđena na temelju 16S rDNA sekvence prikazana je na slici 2.25. Razlike u fenotipskim karakteristikama između *Bifidobacterium* spp. izoliranih iz različitih izvora prikazuje slika 2.26.

Sve bakterijske vrste roda *Bifidobacterium* karakterizira visoki mol % udjel G + C u DNA molekulama, koji varira od 54 do 67 mol %. Osim toga, za rod *Bifidobacterium* karakteristična je naglašena razlika u fiziološkim i biokemijskim svojstvima, uključivo i sastav stanične bakterijske stijenke između vrsta.

Bakterijske vrste roda *Bifidobacterium* saharolitički su organizmi koji razgradnjom šećera stvaraju octenu i mliječnu kiselinu bez oslobađanja CO₂. Tako razgradnjom laktoze isključivo fruktoza-6-fosfatnim putem, koji uključuje aktivnost specifičnog enzima fruktoza-6-P-fosfoketolaze, nastaju tri molekule octene i dvije molekule mliječne kiseline. Enzim fruktoza-6-P fosfoketolaza se koristi i u taksonomskoj identifikaciji roda. U određenoj mjeri većina bakterija



Slika 2.25.

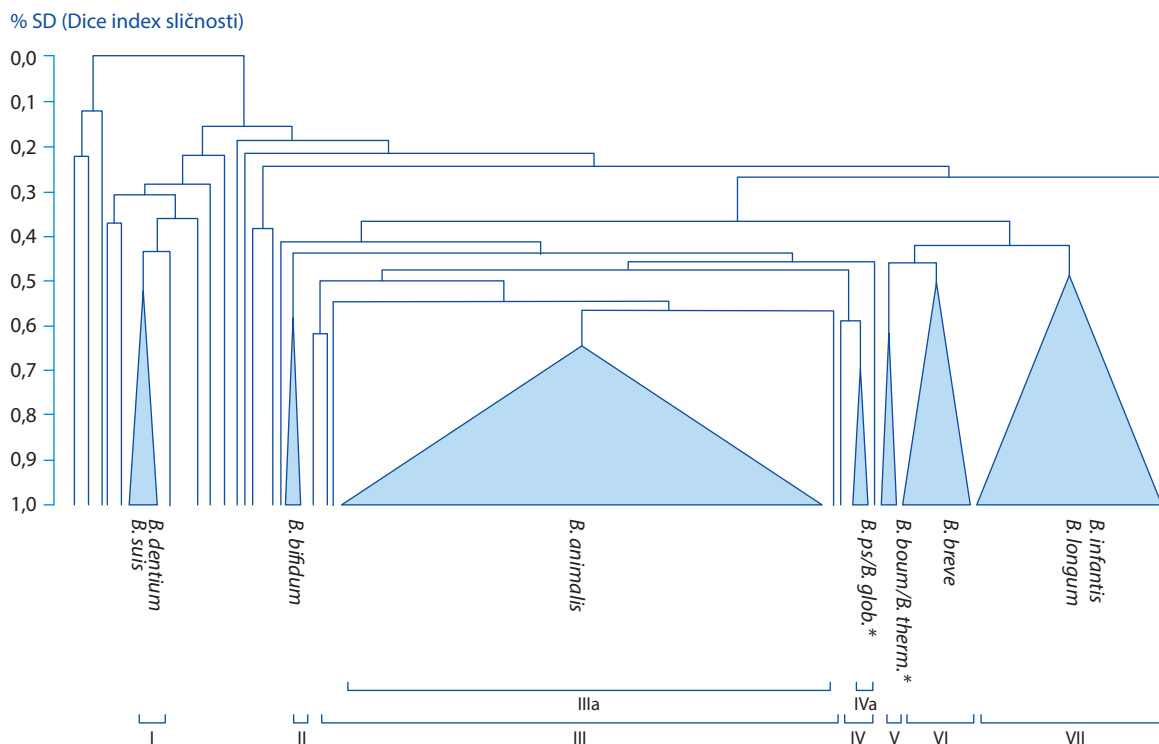
Filogenetsko stablo *Bifidobacterium* spp. temeljeno na 16S rDNA sekvencama. (von Ah i sur., 2007., CC BY 2,0)

Bifidobacterium spp. sposobna je razgrađivati kompleksne ugljikohidrate.

Bifidobakterije su gram-pozitivne, ne tvore spore i ne stvaraju plinove, i katalaza su (osim *B. indicium* i *B. asteroides*) negativne. Prema zahtjevu za kisikom, bifidobakterije su striktno anaerobne, ali određeni sojevi ipak mogu tolerirati određenu koncentraciju kisika bolje od ostalih anaerobnih bakterija. Ovisno o vrsti, bifidobakterije najbolje rastu u temperaturnom rasponu od 36 do 46 °C, ali ne rastu ispod 20 °C

i iznad 46 °C. U odnosu na BMK, slabije podnose kiselu sredinu i mogu rasti jedino u mediju pH \geq 4,6.

Morfološki, bifidobakterije imaju višestruko razgranati štapičasti oblik stanice i pokazuju visok stupanj polimorfizma, ovisno o uvjetima u kojima rastu. Dosta često bakterijska stanica ima oblik slova "Y", ali je zanimljivo da sve stanice iz iste kulture ne moraju imati "Y" morfološki oblik, već mogu biti pojedinačni kratki ravni štapići u lancima ili nakupinama (slika 2.27.)



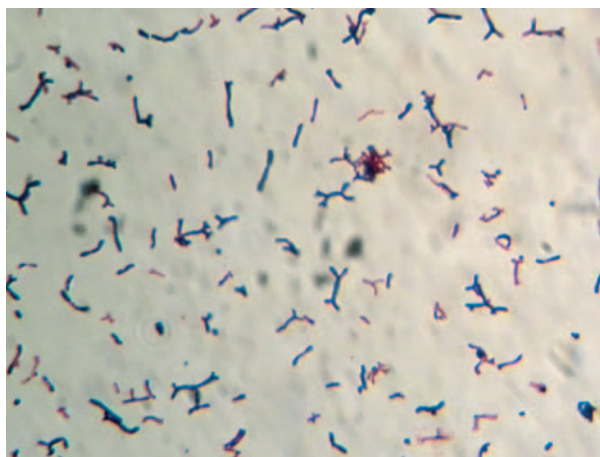
Slika 2.26.

Dendrogram *Bifidobacterium* spp. izveden na temelju 138 fenotipskih karakteristika vrsta roda *Bifidobacterium*. (Klein i sur.,1998., s dopuštenjem Elseviera.)

U mljekarskoj industriji koriste se jedino probiotički sojevi vrsta *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum*. Za rast i preživljavanje tih probiotičkih bakterijskih sojeva u proizvodu nužna je prisutnost bakterija jogurtne kulture (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus*) ili drugih laktobacila. Tako proteolitička aktivnost bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulira rast bifidobakterija

Slika 2.27.

Morfološki izgled bakterijskih stanica *Bifidobacterium* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)



Tablica 2.5.

	Vrsta	L(+) arabinoza	D(+) ksiloza	D(+) manoza	salicin	D(-) manitol	D(-) sorbitol	D(+) melezitosa
Razlikovanje pet vrsta bifidobakterija na temelju fermentacije šećera	<i>B. longum</i>	+	+	-	-	-	-	+
	<i>B. animalis</i>	+	+	-	-	-	-	-
	<i>B. breve</i>	-	-	+	+	+	+	-
	<i>B. infantis</i>	-	-	+	+	-	-	-
	<i>B. bifidum</i>	-	-	-	-	-	-	-

(prilagođeno prema Bonaparteu i Reuteru, 1996.)

proteolizom kazeina do slobodnih aminokiselina i malih peptida, a *S. thermophilus* istovremeno djeluje kao akceptor kisika. Stvaranje vodikovog peroksida u simbiotskim mješovitim kulturama također povoljno utječe na preživljavanje bifidobakterija u proizvodu.

Za konvencionalnu diferencijaciju *Bifidobacterium* spp. koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlije-ka dobrom se pokazala fermentacija određenih šećera (tablica 2.5).

2.3.4.

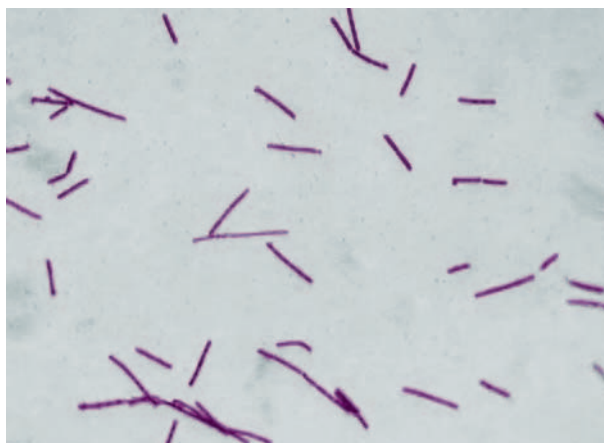
Osobine i svojstva najznačajnijih vrsta BMK i bifidobakterija

2.3.4.1.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

Bakterija *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je gram-pozitivna, katalaza negativna, nepokretna bakterija. Bakterijska stanica ima oblik tankog štapića veličine 0,5 - 0,8 x 2,0 do 9,0 μm sa zaobljenim krajevima koji se pojavljuju pojedinačno ili u formi lanca (najčešće 3 -4 štapića; slika 2.28.). Za bakteriju *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* karakteristična je i stanična tvorba volutinskih zrnaca koja se vide svjetlosnim mikroskopom (slika 2.29.). Volutinska zrnca nisu karakteristična za tek formirane stanice, već su ona vidljiva nakon 20 - 24 sata bakterijskog rasta, a bakterijska stanica postaje izdužena. Morfološki izgled bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* snimljen elektronskim

mikroskopom prikazuje slika 2.30. Optimalna temperatura rasta i razmnožavanja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je između 40 i 45 °C, a ne raste na temperaturama nižim od 20 i višim od 50 °C. Najbolji rast pokazuje u mediju pH- vrijednosti 5,8.



Slika 2.28.

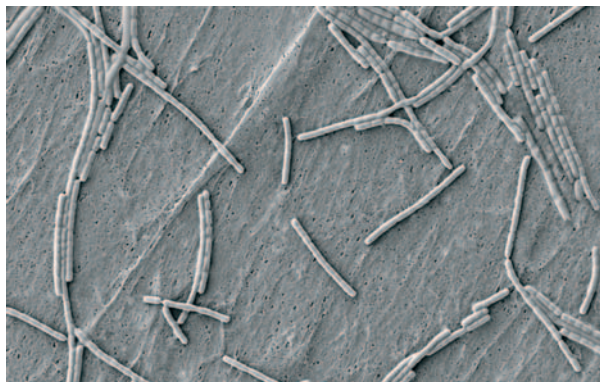
Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)

Bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pripada skupini obligatnih homofermentativnih laktobacila. Fermentira heksoze Embden-Mayerhof-Parnasovim putem u D (-) izomer mliječne kiseline do koncentracije od približno 1,8 %. Bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ne fermentira pentoze i glukonate i ne proizvodi CO₂. Ima enzim β-galaktozidazu i može



Slika 2.29.

Izgled volutinskih zrnaca unutar bakterijske stanice *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.



Slika 2.30.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm . (Chr. Hansen, darovana slika.)

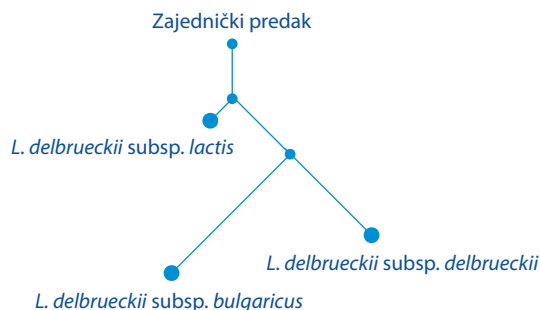
razgraditi laktozu na glukozu i galaktozu. Glukozu fermentira do mliječne kiseline, a galaktoza se nakuplja u supstratu. Neki sojevi *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* imaju sposobnost i hidrolize galaktoze koja se razgrađuje Leloirovim putem.

Svojim proteolitičkim enzimima (peptidazama i dipeptidazama) vezanim na staničnoj stijenci, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* razgrađuju kazein mlijeka do peptida, a peptide do aminokiselina. Za rast ta bakterija treba i neproteinske dušične tvari, te vitamine riboflavin (B_2), pantotensku kiselinu (B_5), niacin (B_3) i kobalamin (B_{12}). Ako ih supstrat ne sadržava u dovoljnoj količini oni postaju njezin ograničavajući čimbenik rasta.

Bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pokazuje i određeni stupanj rezistentnosti prema antibioticima. No, penicilin u mediju u koncentraciji između 0,3 i 0,6 IU mL^{-1} potpuno inhibira njezin rast. Također, ta je bakterija izrazito osjetljiva na enzim lizozim i njezin rast prestaje ako je koncentracija lizozoma u mlijeku između 10 i 20 mg mL^{-1} . Neki sojevi fermentacijom šećera tvore vodikov peroksid a neki imaju sposobnost tvorbe egzopolisaharida.

Vrstu *L. delbrueckii*, osim podvrste *bulgaricus*, čine još dvije podvrste - *delbrueckii* i *lactis*, koje sa subsp. *bulgaricus* dijele visoki stupanj DNA-DNA homologne sličnosti (90 - 100 %). Udjel G + C u njihovim DNA molekulama je od 41 do 51 mol %. Poput *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i podvrste *delbrueckii* i *lactis* su gram-pozitivne, nepokretne, striktno homofermentativne bakterije koje iz šećera tvore D (-) izomer mliječne kiseline. Optimalna im je temperatura rasta i razmnožavanja kao i za podvrstu *bulgaricus* između 40 i 44 °C.

Na temelju varijacije 16S rDNA gena, *lac* operona i njegova lokusa koji je odgovoran za metabolizam laktoze, stanično vezanih proteaza, metabolizma galaktoze i distribucije IS elemenata te tri podvrste genetički se značajno razlikuju (slika 2.31.). Inače, insercijske sekvencije (IS) su pokretni elementi bez samostalne replikacije, koji se neposredno premještaju po genomu. Posljedično različitom genomu te bakterije pokazuju i različita fenotipska svojstva. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* koja kolonizira biljne izvore ne može fermentirati laktozu niti razgraditi kazein, i zbog toga ne može rasti u mlijeku. Podvrste *L. delbrueckii bulgaricus* i *lactis* međusobno se razlikuju u sposobnosti



Slika 2.31.

Shematski prikaz pojednostavljenog evolucijskog stabla triju podvrsta bakterije *Lactobacillus delbrueckii*.

Detalji: različita dužina grana stabla predstavlja razliku u broju gena koji kodiraju sintezu proteina i istovremeni gubitak/dobitak gena kroz evolucijski razvitak. (Prilagođeno prema Germondu i sur., 2003.)

fermentacije ugljikohidrata. Također, za *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* utvrđen je najveći broj mutacija u usporedbi sa zajedničkim pretkom. U proizvodnji fermentiranih mlijeka obje podvrste *bulgaricus* i *lactis* smatraju se značajnim. Za razliku od *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, podvrsta *lactis* ima sposobnost fermentacije većeg broja šećera i nije izgubila gen za hidrolizu galaktoze.

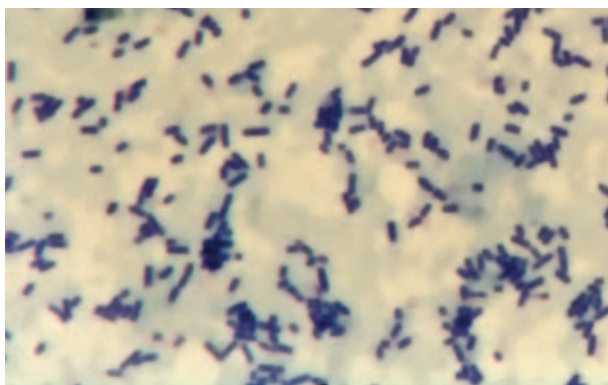
2.3.4.2.

Lactobacillus acidophilus

Bakterija *L. acidophilus* pripada skupini bakterija koje imaju funkciju promotora zdravlja. Na temelju taksonomskih studija *L. acidophilus* čini heterogenu skupinu bakterija od najmanje šest vrsta (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. johnsonii*) sa sličnim metaboličkim i funkcionalnim svojstvima. Morfološki, *L. acidophilus* skupina bakterija su gram-pozitivni, nesporetvorni organizmi, a oblikom su nepokretni štapići zaobljenih krajeva. Prosječna veličina im je 0,6 - 0,9 x 1,5 do 6,0 μm , a pojavljuju se kao pojedinačni štapići, u paru ili u kratkim lancima (slika 2.32. i 2.33.). Specifični protein izoliran iz stanične stijenke, kako se smatra, ima ulogu prihvaćanja bakterije za intestinalnu stijenku crijeva. Omjer G + C u DNA molekulama *L. acidophilus* skupine je od 32 do 37 mol %.

Kako je intestinalni sustav ljudi i životinja prirodno stanište bakterije *L. acidophilus* uvjeti rasta i razmnožavanja u kultivacijskom mediju za većinu sojeva prilično su složeni. Za svoj rast u drugačijem mediju većina sojeva zahtijeva riboflavin (B_2), pantotensku (B_5) i folnu kiselinu (B_9), niacin (B_3), masne kiseline, aminokiseline, peptide, minerale i derivate nukleinskih kiselina. Posljedično tome, bakterija *L. acidophilus* u mlijeku slabo raste, a fermentacija traje znatno duže u usporedbi s BMK kojima intestinalni sustav nije prirodno stanište.

Bakterija *L. acidophilus* ne raste na temperaturi nižoj od 15 °C, a većina sojeva dobro raste na temperaturama između 35 i 45 °C. Optimalna pH-vrijednost medija za brzi rast i razmnožavanje te bakterijske vrste je 5,6 - 6,0, ali dobro raste i u uvjetima pH-sredine 4,5 - 6,5. Rast i razmnožavanje prestaju ako pH-medija dostigne vrijednost između 3,6 i 4,0. Može fermentirati arabinozu, celobiozu, eskulin, galaktozu, laktozu, manozu, ribozu i saharozu. Prema sposobnosti hidrolize laktoze pripada istoj homofermentativnoj skupini s *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Prema starijoj literaturi, *L. acidophilus* hidrolizom laktoze može tvoriti DL izomer mliječne kiseline u konačnoj koncentraciji od 0,3 do 1,9 g 100 g⁻¹. Premda je ta tvrdnja točna, svega je nekoliko sojeva *L. acidophilus* sposobno preživjeti duže od nekoliko dana koncentraciju mliječne kiseline od 1,9 g 100 g⁻¹. Rastom i razmnožavanjem u mlijeku sintetizira folnu kiselinu (B_9), niacin (B_3), tiamin (B_1), riboflavin (B_2), piridoksin (B_6) i vitamin K.



Slika 2.32.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus acidophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.



Slika 2.33.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus acidophilus* La-5 snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 1 μ m. (Chr. Hansen, darovana slika.)

Određeni sojevi *L. acidophilus* sposobni su stvarati bakteriocine, koji prema nekim autorima, imaju inhibitorno djelovanje prema patogenim bakterijama probavnog sustava. Međutim, izolirani i pročišćeni bakteriocini pokazali su inhibitorno djelovanje i prema drugim *Lactobacillus* spp. Ako se ta inhibitorna aktivnost dogodi u probavnom sustavu, što je vjerojatno, pretpostavlja se da određeni sojevi *L. acidophilus* posjeduju i dodatne mehanizme obrane koji im omogućava zadržavanje dominantnosti na površini epitela crijeva domaćina u kompeticiji s patogenim bakterijama.

Određeni sojevi vrste *L. gasseri* i *L. johnsonii* unutar *L. acidophilus* skupine također se ubrajaju u bakterije promotora zdravlja. S bakterijama *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* te vrste pripadaju skupini obligatno homofermentativnih laktobacila.

Slika 2.34.

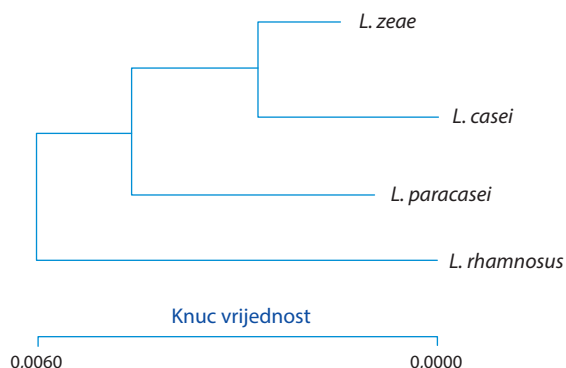
Shematski prikaz filogenetskog odnosa između *Lactobacillus casei* skupina bakterija dobiven na temelju homolognosti i sekvencije 16S rRNA. (Klein i sur., 1998., s dopuštenjem Elseviera.)

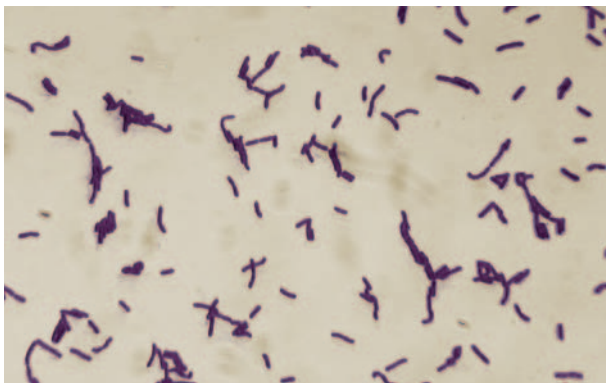
2.3.4.3.

Lactobacillus casei skupina bakterija

Na temelju DNA - DNA homolognosti i sekvence 16S rRNA molekula, fenotipski i genotipski *L. casei* prilično su heterogena skupina bakterija. Tako se smatra da one čine četiri odvojena genetska klastera (slika 2.34.).

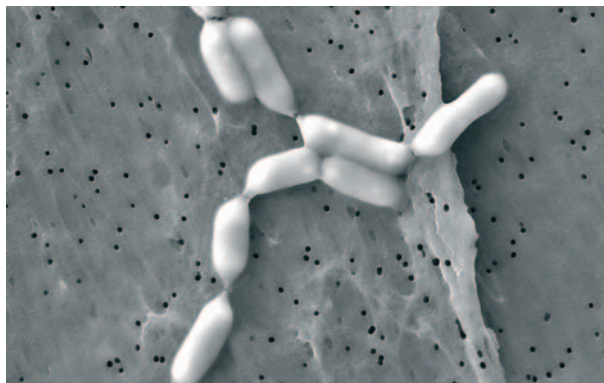
Komercijalno, najvažnije su vrste *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus*





Slika 2.35.

Morfološki izgled stanica *Lactobacillus casei* skupine bakterija ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)



Slika 2.36.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μ m. (Chr. Hansen, darovana slika.)

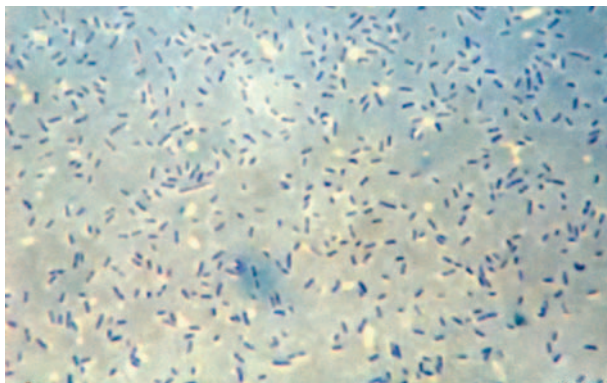
rhamnosus i *Lactobacillus plantarum* čijim se određenim bakterijskim sojevima pripisuje povoljan učinak na humano zdravlje.

Bakterije iz skupine *L. casei* su gram-pozitivni štapići veličine 0,7 - 1,1 x 2,0 - 4,0 μ m koji se pojavljuju pojedinačno, u paru ili tvore lance (slika 2.35.). Za rast u mediju neophodna im je prisutnost riboflavina (B_2), niacina (B_3), te folne (B_9) i pantotenske kiseline (B_5). Sve vrste pripadaju fakultativno heterofermentativnim laktobacilima, koji uz mliječnu kiselinu ako je glukoza u mediju limitirana u manjem omjeru tvore octenu kiselinu, mravlju kiselinu i etanol. Prema zahtjevu za kisikom, te bakterijske vrste fakultativno su anaerobni organizmi. Morfološki izgled bakterije *L. paracasei* subsp. *paracasei* snimljen elektronskim mikroskopom prikazuje slika 2.36.

Od ostalih vrsta unutar skupine, bakterija *L. casei* razlikuje se uglavnom prema nemogućnosti većine sojeva (ali ne svih) fermentacije laktoze i saharoze. Može rasti na 10 °C, ali ne i na temperaturi od 45 °C što joj je zajedničko s *L. paracasei* subsp. *paracasei*, ali je nemogućnost rasta i razmnožavanja na 45 °C razlikuje od *L. rhamnosus*. Sposobnost fermentacije

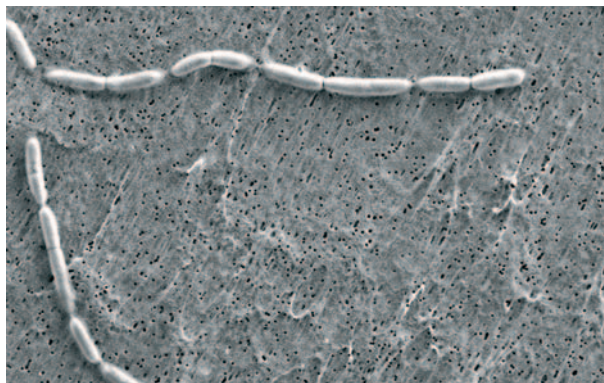
ramnoze uz stvaranje kiseline razlikuje vrstu *L. rhamnosus* od ostalih vrsta unutar skupine. Bakterija *L. rhamnosus* fakultativno je anaerobna bakterija koja u anaerobnim uvjetima tvori L (+) mliječnu kiselinu i etanol. Bakterija *L. paracasei* subsp. *paracasei*, za razliku od ostalih bakterija *L. casei* skupine, fermentira više šećera a neki sojevi zbog enzima racemaze sposobni su konvertirati L (+) izomer mliječne kiseline u D (-) izomer i obratno.

Unutar skupine bakterija *Lactobacillus casei*, bakterija *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 najviše je proučavana probiotička bakterija. Zaštićena je patentom i čuva se u američkoj zbirci sojeva ATCC pod brojem 53103. Osim sposobnosti preživljavanja u mliječnom proizvodu i prolaska kroz želudac (pH ~ 1,5 - 2), taj bakterijski soj ima 10 - 100 puta veću sposobnost prihvaćanja za intestinalne stanice crijeva u usporedbi s probiotičkim sojem *Lactobacillus acidophilus* La-5. Zbog brojnih se znanstveno potvrđenih povoljnih učinaka na ljudsko zdravlje, *L. rhamnosus* ATCC 53103 od 1990. godine intenzivno koristi u mljekarskoj industriji. Prema inicijalima imena američkih znanstvenika Sherwooda Gorbacha i Barryja Goldina, koji su



Slika 2.37.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.



Slika 2.38.

Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus rhamnosus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm . (Chr. Hansen, darovana slika.)

je prvi izolirali iz gastrointestinalnog sustava zdrave osobe, u praksi, taj je bakterijski soj poznatiji pod imenom *Lactobacillus casei* GG (LGG). Otkrićem i primjenom molekularnih metoda, 1997. godine izvršena je reidentifikacija LGG te se od tada službeno vodi pod imenom *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103.

Bakterija *L. rhamnosus* ne fermentira laktozu (ne tvori β -galaktozidazu), ali ima sposobnost fermentacije mnogih drugih šećera. U anaerobnim uvjetima fermentira heksoze do L (+) mliječne kiseline i etanola a često posjeduje sposobnost tvorbe egzopolisaharida u formi sluzi. Zbog nemogućnosti fermentacije laktoze u proizvodnji fermentiranih mlijeka, uz *L. rhamnosus* uvijek se moraju koristiti i druge vrste BMK (najčešće one iz sastava jogurtnih kultura). Suprotno, upravo zbog te osobine *L. rhamnosus* ATCC 53103 je jedini probiotički soj koja se može koristiti i u proizvodnji pastereziranog mlijeka. Međutim, treba istaknuti da su sojevi *L. rhamnosus* u kliničkim slučajevima humane infekcije bakterijama *Lactobacillus* spp. najčešći izolirani uzročnici. Morfološki izgled bakterije *L. rhamnosus* snimljene svjetlosnim mikroskopom prikazuje slika 2.37., a elektronskim mikroskopom slika 2.38.

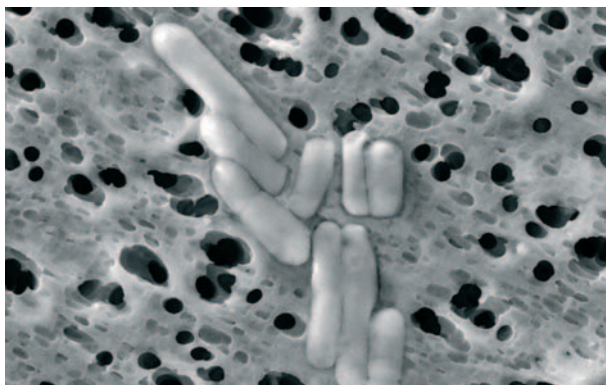
2.3.4.4.

Lactobacillus reuteri

Prirodno stanište bakterije *Lactobacillus reuteri* humani je intestinalni sustav a pripada skupini obligatno heterofermentativnih laktobacila. Genom bakterije *L. reuteri* se sastoji od cirkularnog kromosoma i ne sadrži plazmide, a udjel G + C u DNA molekuli je između 38 i 42 mol %. Također, komparativnom genomskom analizom utvrđeno je da ta bakterija ima jedinstveni klaster od 58 gena za biosintezu vitamina B₁₂ (kobalamin).

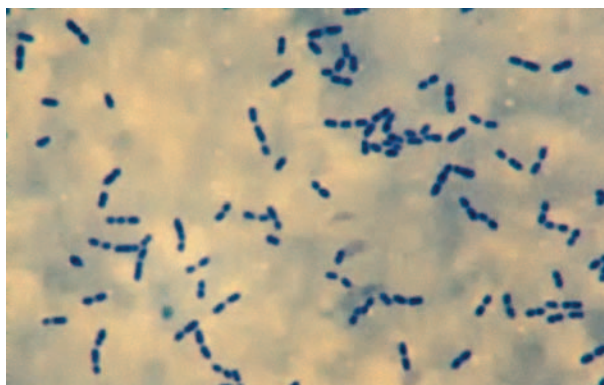
Zbog sposobnosti tvorbe reuterina - antimikrobne komponente širokog spektra djelovanja bakterijski sojevi te vrste često se koriste u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka. Fermentacijom šećera, koristeći glicerol kao akceptor vodika, bakterija *L. reuteri* izlučuje u okoliš u kojem raste antimikrobni spoj - reuterin. Reuterin inhibira rast brojnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta, kvasaca, plijesni i protozoa.

Morfološki, ta se bakterija pojavljuje u formi pojedinačnih štapića, u paru ili u nakupinama vrlo često



Slika 2.39.

Morfološki izgled bakterije *L. reuteri* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm . (Chr. Hansen, darovana slika.)



Slika 2.40.

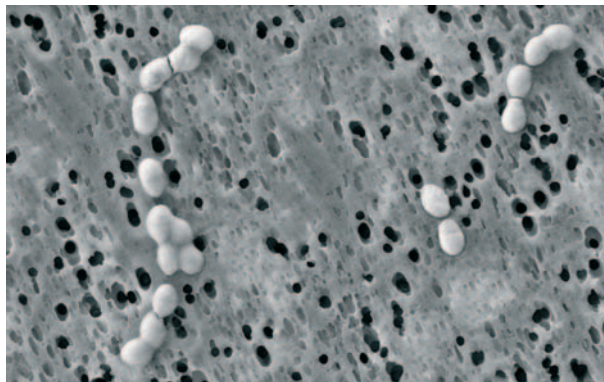
Morfološki izgled bakterije *Streptococcus thermophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.

nepravilnog oblika (slika 2.39.). Ne raste na temperaturi od 15 °C, ali može rasti na temperaturi od 45 °C. Pripada skupini heterofermentativnih organizama BMK. Pokazuje prirodnu rezistentnost prema eritromicinu i nekim drugim antibioticima.

2.3.4.5.

Streptococcus thermophilus

Bakterija *Streptococcus thermophilus* je gram-pozitivna, katalaza negativna, anaerobna, nepokretna bakterija. Stanice imaju sferičan ili ovalan oblik veličine 0,7 - 0,9 μm u promjeru, koje se mogu pojavljivati u paru ali češće tvore duže lance sastavljene od više pojedinačnih stanica (slika 2.40.). Bakterijske stanice iz starih kultura, ili one koje su rasle na čvrstom hranilištu, morfološki mijenjaju svoj tipičan oblik te izgledom sliče kratkim štapićima. Optimalna temperatura rasta i razmnožavanja bakterije *S. thermophilus* je 37 °C, a ne raste na temperaturama nižim od 10 i ne višim od 53 °C. Morfološki izgled bakterije *S. thermophilus* snimljen elektronskim mikroskopom prikazuje slika 2.41.



Slika 2.41.

Morfološki izgled bakterije *Streptococcus thermophilus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm . (Chr. Hansen, darovana slika.)

Bakterija *S. thermophilus* pripada skupini homofermentativnih bakterija mliječne kiseline. Iz laktoze tvori L (+) izomer mliječne kiseline i male količine acetaldehida i diacetila. Laktozu iz mlijeka bakterija u stanicu

unosu djelovanjem enzima laktaza-permeaze, potom se laktoza djelovanjem β -galaktozidaze razgrađuje na glukozu i galaktozu. Glukoza se do mliječne kiseline razgrađuje Embden-Mayerhof-Parnasovim putem, a galaktoza ostaje nerazgrađena za one bakterijske sojeve koji nemaju enzim galaktokinazu. Bakterijski sojevi koji posjeduju taj enzim, galaktozu prvo konvertiraju u galaktozu -1-P, koji se potom konvertira u glukozu -1-P i istim glikolitičkim putem razgrađuje do mliječne kiseline.

Rastom i razmnožavanjem u mlijeku, bakterija *S. thermophilus* iz laktoze tvori mliječnu kiselinu do koncentracije od 0,7 do 0,8 %, a koncentracija mliječne kiseline veća od 1 % inhibira njezin rast i razmnožavanje. Osim laktoze, *S. thermophilus* može fermentirati saharozu, glukozu i fruktozu, a određeni sojevi imaju i sposobnost tvorbe egzopolisaharida.

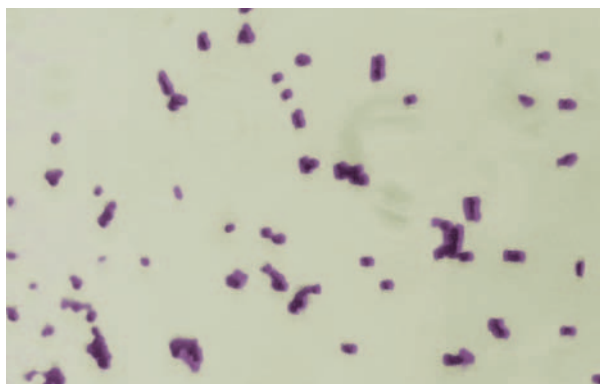
Bakterija *S. thermophilus* slabi je proteolit te nema sposobnost razgradnje kazeina mlijeka do slobodnih aminokiselina. Zbog toga je rast ove bakterije u mlijeku uvjetovan simbiotskim rastom s *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ili nekom drugom vrstom laktobacila koji kazein razgrađuju do malih peptida. Male peptide *S. thermophilus* svojom peptidaznom aktivnošću razgrađuje do slobodnih aminokiselina: glutaminske kiseline, histidina, cisteina, metionina, valina ili leucina, nužne za dobar rast u mlijeku.

U usporedbi s bakterijom *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bakterija *S. thermophilus* u znatnijoj je mjeri osjetljivija na inhibitorne tvari u mlijeku, a osobito na antibiotike i bakteriofage. Njezin rast u mlijeku primjerice inhibira koncentracija penicilina već od 0,005 IU mL⁻¹.

2.3.4.6.

Lactococcus lactis

Vrsta *Lactococcus lactis* koristi se u mljekarskoj industriji za proizvodnju fermentiranih mlijeka, gdje se zahtijevaju temperature mezofilne fermentacije. Ima dva genotipa i tri industrijski značajna fenotipa:



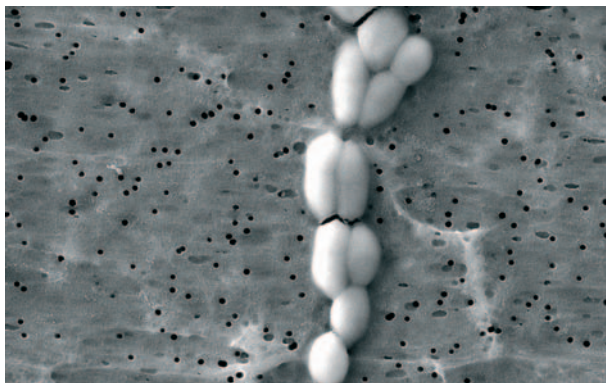
Slika 2.42.

Morfološki izgled bakterije *L. lactis* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)

- *L. lactis* subsp. *lactis*
- *L. lactis* subsp. *cremoris*
- *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*.

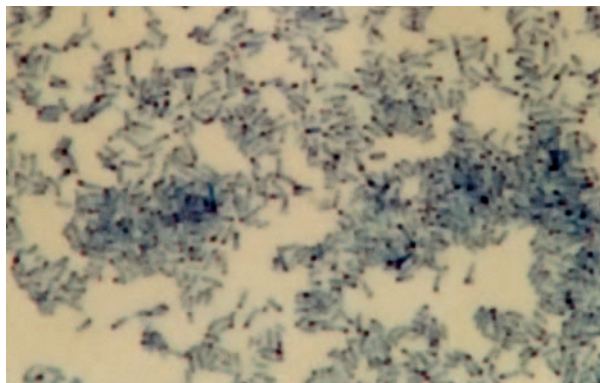
Laktokoki su mikroerofilne gram-pozitivne bakterije u obliku koka često povezanih u lance, premda se mogu naći i u obliku monokoka ili diplokoka (slika 2.42.). Homofermentativni su organizmi, i kada rastu u mlijeku više od 95 % njihova krajnjega metaboličkog produkta je L (+) izomer mliječne kiseline. Rastu na temperaturi od 10 °C, ali ne i na temperaturi od 45 °C. Slabi su proteoliti, ali mogu koristiti proteine mlijeka. *L. lactis* subsp. *lactis* od *L. lactis* subsp. *cremoris* se razlikuje u većoj toleranciji prema višoj temperaturi i prema većim koncentracijama soli. Biovar *diacetyllactis* vrste *L. lactis* ima sposobnost fermentacije citrata u diacetil, CO₂ i druge organske spojeve. Morfološki izgled bakterije *L. lactis* subsp. *lactis* snimljen elektronskim mikroskopom prikazuje slika 2.43.

Određeni sojevi laktokoka imaju sposobnost stvaranja egzopolisaharida pa se ti sojevi uobičajeno najčešće koriste u proizvodnji skandinavskih fermentiranih mlijeka koja karakterizira gusta lagano sluzava tekstura (viili, tätte/tettemjølkk, filmjølkk längmjølkk). Između



Slika 2.43.

Morfološki izgled bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μ m. (Chr. Hansen, darovana slika.)



Slika 2.44.

Morfološki izgled bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* u formi zadebljanih kratkih štapića ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.

laktokoka neki sojevi mogu u fermentiranom mlijeku uzrokovati pogrešku okusa koja se opisuje okusom po sladu, a posljedica je visoka koncentracija acetaldehida stvorena metabolizmom aminokiselina tijekom fermentacije.

2.3.4.7.

Bifidobacterium animalis

Bakteriju *Bifidobacterium animalis*, za koju su prepoznata i dva njezina biovara, iz animalnog fecesa prvi je izolirao japanski znanstvenik Tomotori Mitsuoka 1969. godine. Fenotipski je ona vrlo slična bakteriji *Bifidobacterium longum* i prvotno je nazvana *Bifidobacterium longum* subsp. *animalis*. Na temelju DNA-DNA hibridizacije utvrđeno je da biovari ne pripadaju vrsti *Bifidobacterium longum*. Tako su dva biovara *Bifidobacterium longum* subsp. *animalis* reklasificirana u *Bifidobacterium pseudolongum* i *Bifidobacterium animalis*. Osim toga, vrsta *Bifidobacterium animalis* ima svoje dvije podvrste - *B. animalis* subsp. *animalis* i *B. animalis* subsp. *lactis*, koje je u probiotičkom fermentiranom mlijeku vrlo

teško razlikovati. U praksi se zbog toga vrlo često u deklariranju proizvoda koristi samo *Bifidobacterium lactis* ili *Bifidobacterium animalis*, neovisno o stvarno korištenoj podvrsti.

Morfološki bakterije obje podvrste dolaze u nekoliko različitih oblika, kao kratki, zakrivljeni, zadebljani (slika 2.44.) ili rašljasti Y štapići. Fermentiraju arabinozu, rafinozu, ribozu, laktozu, celobiozu, ksilozu, manozu, fruktozu, galaktozu, saharozu, maltozu i salicin. Optimalna temperatura rasta i razmnožavanja im je između 39 i 41 °C, minimalna 21 °C, a maksimalna 46 °C. Vrijednosti pH-medija u kojem mogu rasti su od 4,5 do 8,5 (optimalno 6,5 - 7,0). Za rast trebaju medij bogat dušikom, mineralima, faktorima rasta, i vitaminima tiaminom (B₁), piridoksinom (B₆), folnom kiselinom (B₉), kobalaminom (B₁₂) i niacinom (B₃).

Bakterija *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* u svojoj DNA molekuli sadrži 61 mol % G + C. Ne raste u prisutnosti kisika ili u atmosferi obogaćenoj CO₂, ali u tekućem hranilištu podnosi i do 10 % kisika. Mlijeko ili sastojci mlijeka nisu pogodni medij za njezin rast i razmnožavanje. Razgradnjom ugljikohidrata u laboratorijskom hranilištu tvori mliječnu i

octenu kiselinu u molarnom omjeru 1 : 3,6. Suprotno, tijekom fermentacije mlijeka u anaerobnim je uvjetima omjer mliječne prema octenoj kiselinu 10 : 1.

—

2.5.

—

Metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija

2.5.1.

—

Metabolizam proteina i lipida

Bakterije mliječne kiseline (BMK) iznimno su izbirljive prema mediju u kojem rastu. Između ostalih građevnih jedinica (proteina, peptida, derivata nukleinskih kiselina i vitamina) potrebnih u sintezi vlastitih staničnih spojeva, u mediju zahtijevaju i veći ili manji broj slobodnih aminokiselina. Kapacitet BMK za vlastitu biosintezu aminokiselina je limitiran tako da njihov optimalan rast i razmnožavanje u određenom mediju ovisi o egzogenom izvoru dušika. Za većinu vrsta BMK izoleucin, leucin, valin, histidin i metionin su esencijalne aminokiseline, koje mlijeko sadrži u koncentraciji nižoj od 1 mg L⁻¹. Koncentracija aminokiselina u mlijeku niža od 1 mg L⁻¹ dostatna je za rast i razmnožavanje samo 25 % stanica od najvećeg u kulturi prisutnog broja bakterija (~ 10¹¹⁻¹² cfu mL⁻¹). Zbog toga su BMK razvile svoj vlastiti metabolički kapacitet razgradnje proteina mlijeka. Prvi su ključni enzim u razgradnji proteina proteinaze (PrpP) smještene na staničnoj stijenci, koje se međusobno razlikuju po broju, lokaciji i specifičnosti unutar sojeva istih i različitih vrsta BMK.

Proteinaze (PrpP) razgrađuju proteine mlijeka do oligopeptida, koje aminopeptidaze dalje razgrađuju do peptida malih molekularnih težina i slobodnih aminokiselina. Ova važna metabolička funkcija utječe

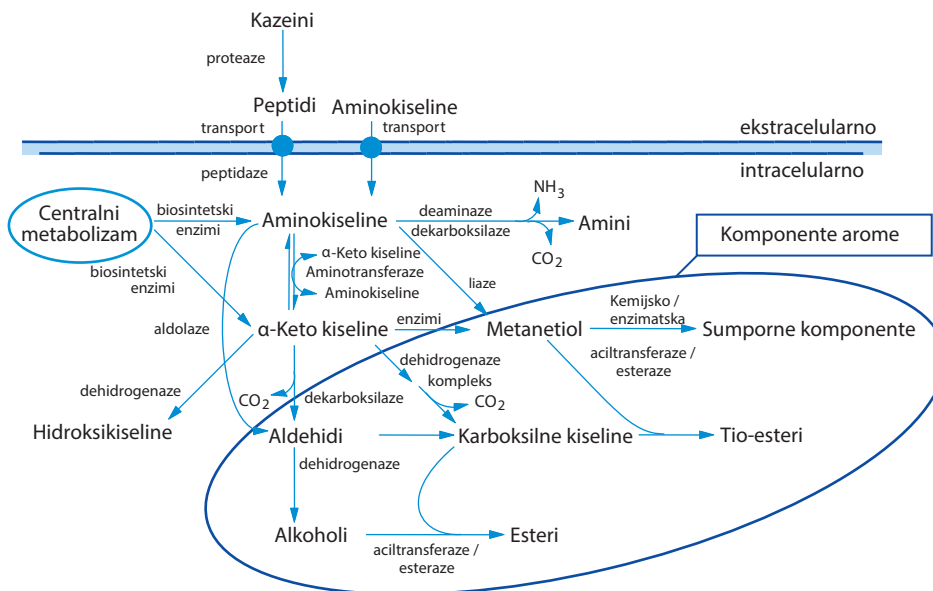
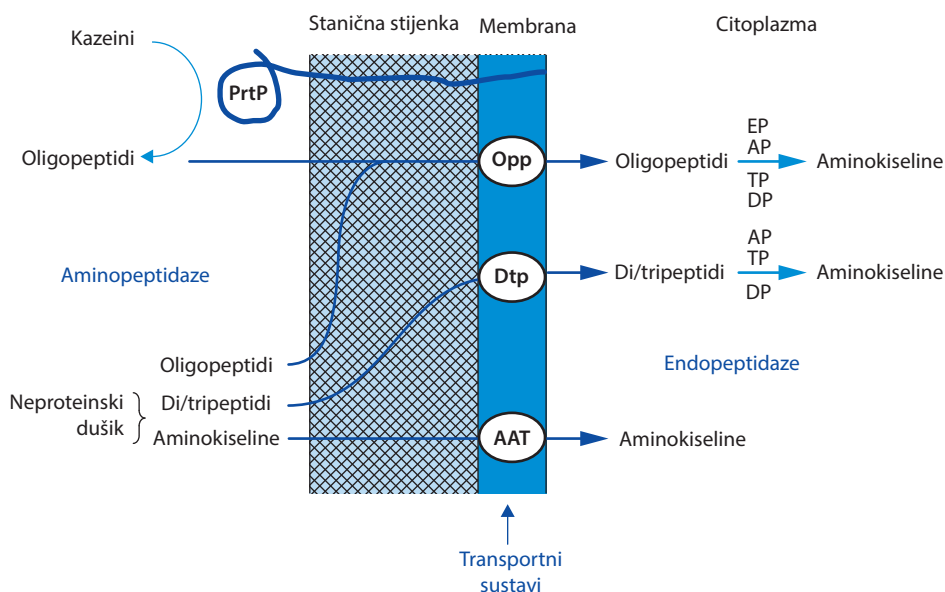
na brz rast i razmnožavanje BMK u mlijeku do visoke gustoće i posljedično njegove koagulacije.

Peptidni sustav najbolje je proučen u laktokoka, premda se smatra da je on vrlo sličan i u ostalih vrsta BMK koje se koriste u sastavu kultura. Za optimalan rast i razmnožavanje u mlijeku laktokoki koriste aktivnost stanično vezane proteinaze (PrpP) odgovorne za početnu razgradnju kazeina do oligopeptida. Za daljnju proteolizu laktokoki koriste aminokiselinski i peptidni transportni sustav, i intracelularne peptidaze. Laktokoki za unos aminokiselina i peptida u stanicu koriste tri različita aminokiselinska sustava, dva dipeptidna i dva tripeptidna transportna sustava, i jedan oligopeptidni permeaza sustav (slika 2.45.). Također, laktokoki koriste i intracelularno locirane peptidaze kojima razgrađuju peptide malih molekularnih težina do aminokiselina potrebnih za vlastiti rast. Osim toga, aminokiseline unutar bakterijske stanice postaju prekursori za tvorbu aromatskih spojeva u fermentacijskom mlijeku (slika 2.46.). U usporedbi s mezofilnim i termofilnim laktokokima, termofilni laktobacili imaju veću proteolitičku sposobnost razgradnje proteina mlijeka.

Općenito, sve vrste BMK koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka imaju limitiranu sposobnost metabolizma lipida mlijeka. Specifične lipolitičke promjene koje se ipak događaju nastaju aktivnošću bakterijskih lipaza. U niskim koncentracijama razgradnjom mliječne masti nastaju alkohol glicerol i slobodne masne kiseline.

Obim lipolitičkih promjena mliječne masti i udjela slobodnih i esterificiranih masnih kiselina u fermentiranom mlijeku ovisi i o vrsti korištenog mlijeka. Tako će povećanje ili smanjenje koncentracije točno određenih masnih kiselina u proizvodu biti različit ako se u proizvodnji fermentiranog mlijeka koristi kravlje, kozje ili ovčje mlijeko. Zanimljivo, te razlike u koncentraciji i vrsti masnih kiselina ne nastaju zbog različite vrste mlijeka, već se pripisuju razlici u ponašanju BMK u različitim vrstama mlijeka.

Lipolitička aktivnost BMK jača je u fermentacijskom mlijeku koje sadrži veći postotak mliječne masti i u slučajevima ako je mlijeko prethodno



Slika 2.46.

Shematski prikaz metabolizma kazeina, peptida i aminokiselina bakterija mliječne kiseline kojim se tijekom fermentacije mlijeka stvaraju aromatski spojevi. (Hugenholtz, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)

homogenizirano. Povećanje ili smanjenje koncentracije slobodnih masnih kiselina u visokoj je korelaciji s koncentracijom stvorene mliječne kiseline. U punomasnom jogurtu proizvedenom korištenjem bakterija *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. acidophilus* uz optimalne uvjete fermentacije utvrđene su sljedeće lipolitičke promjene:

- povećanje zasićenih esterificiranih masnih kiselina i oleinske kiseline
- smanjenje linolne i linolenske masne kiseline
- povećanje slobodnih masnih kiselina
- povećanje stearinske i oleinske kiseline u slobodnoj formi
- monogliceroli potpuno nestaju nakon fermentacije
- promjene kolesterola nisu statistički značajne.

Povećanje razine hlapljivih masnih kiselina (HMK) u fermentiranom mlijeku (izravno utječu na okus) smatra se posljedicom sudjelovanja proteolitičkih enzima, a ne bakterijskih lipaza. Naime, BMK nemaju "prave" esteraze, pa HMK u fermentiranom mlijeku, pretpostavlja se, nastaju oksidativnom deaminacijom i dekarboksilacijom aminokiselina. Također, povećanje koncentracije hlapljivih masnih kiselina u proizvodu u direktnoj je korelaciji s:

- bakterijskim sojem
- vrstom mlijeka
- razinom citrata u mlijeku ($< \text{citrata} < \text{HMK}$)
- temperaturom pasterizacije
- trajanjem i temperaturom inkubacije
- starošću fermentiranog mlijeka.

2.5.2.

—

Metabolizam laktoze

U osnovi, bakterije mliječne kiseline razgrađuju laktozu glikolitičkim Embden-Mayerhof-Parnasovim (EMP) ili fosfoketolaznim putem (PKP). Mliječna kiselina (laktat) krajnji je produkt glikolitičkog, a laktat, acetat, etanol i CO₂ krajnji su produkti fosfoketolaznog

puta razgradnje laktoze. Razlog stvaranja laktata u oba puta i etanola u PKP putu je u bakterijskoj sposobnosti reoksidacije koenzima NADH i NADPH stvorenih u ranijim reakcijama fermentacije.

Na temelju krajnjih razgradnih produkata metabolizma laktoze, BMK i bifidobakterije iz sastava kultura dijele se u dvije osnovne skupine:

- homofermentativne vrste BMK
- heterofermentativne vrste BMK uključivo i vrste bifidobakterija.

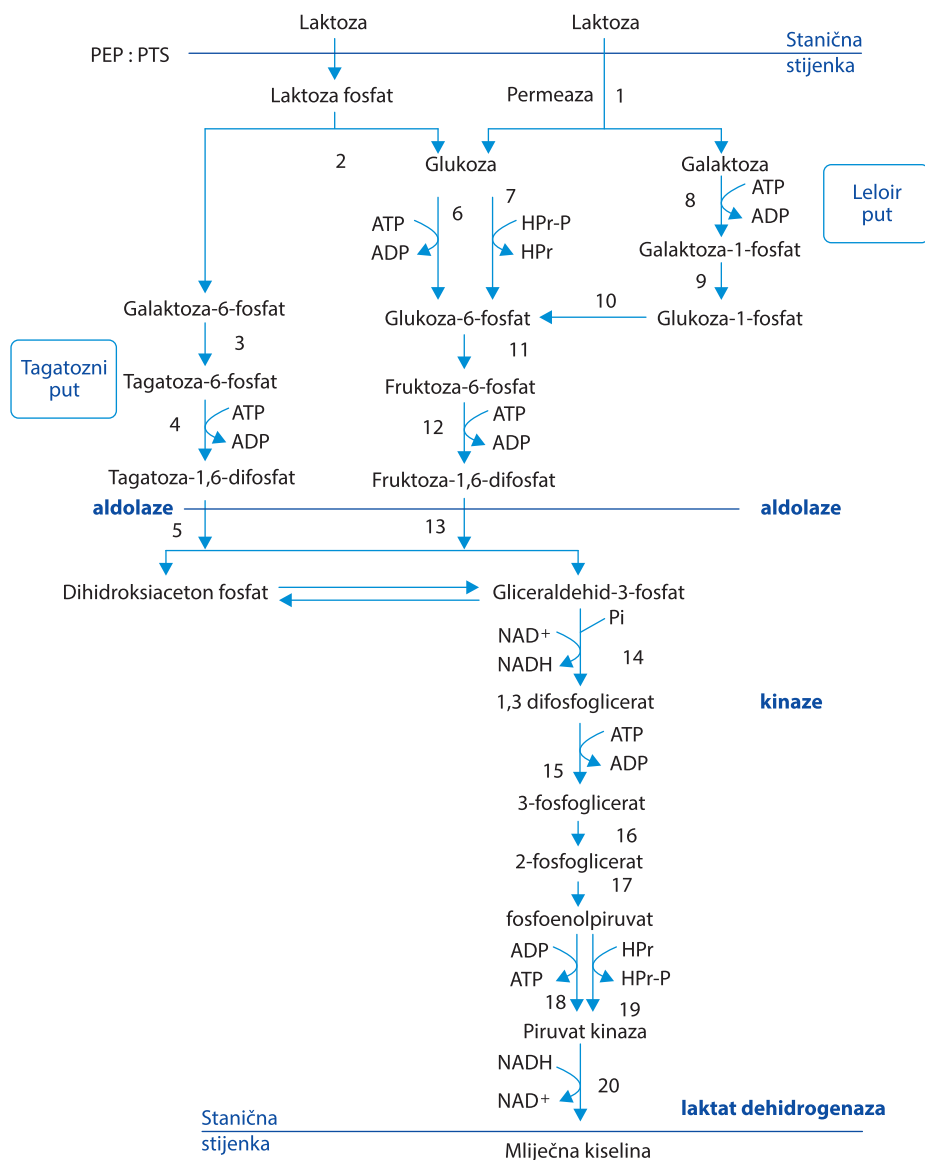
Homofermentativne vrste BMK stvaraju gotovo isključivo mliječnu kiselinu (~ 90 %) kao krajnji produkt metabolizma laktoze. Heterofermentativne vrste BMK uključivo i vrste bifidobakterija iz laktoze uz mliječnu kiselinu (najmanje 50 %) stvaraju i druge komponente, kao što su octena kiselina, CO₂ i etanol. Za razliku od heterofermentativnih vrsta BMK, gdje hidrolizom glukoze nastaju jednake ekvimolarne količine CO₂, laktata i acetata, produkt fermentacije glukoze vrstama bifidobakterija su acetat i laktat (bez CO₂) u molarim odnosima 3 : 2.

Prema optimalnim temperaturama rasta i razmnožavanja mezofilni organizmi BMK iz laktoze stvaraju mliječnu kiselinu na temperaturi 25 - 30 °C, a termofilni na 40 - 46 °C. Koncentracija iz laktoze stvorene mliječne kiseline značajno je viša za termofilnu u odnosu na mezofilnu vrstu fermentacije mlijeka. Bifidobakterije mliječnu i octenu kiselinu najbolje tvore na temperaturi između 39 i 41 °C.

Prije razgradnje u laktat, laktoza iz mlijeka mora najprije biti prevedena u bakterijsku stanicu. Bakterije mliječne kiseline za tu svrhu koriste dva različita transportna sustava:

- ATP - ovisni laktoza permeazni sustav (ATP - permeazni sustav)
- fosfoenolpiruvat (PEP)-ovisni-fosfotransferazni sustav (PEP : PTS).

U pravilu, BMK imaju i jedan i drugi transportni sustav za unos laktoze u stanicu. Međutim, PEP : PTS transportni sustav dominantan je za homofermentativne mezofilne vrste BMK a ATP - permeazni sustav za homofermentativne termofilne i većinu



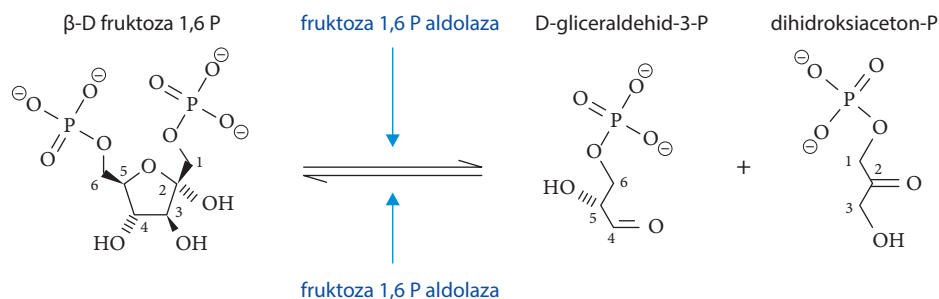
Slika 2.47.

Shematski prikaz glikolitičkog Embden-Mayerhof-Parnasovog (EMP) puta metabolizma laktoze nakon unosa laktoze u bakterijsku stanicu: PEP : PTS mehanizam (lijeva strana) i ATP - permeazni sustavom (desna strana).

Detalji: enzimi, 1 β galaktozidaza, 2 P- β galaktozidaza, 3 galaktoza 6-fosfat izomeraza, 4 tagatoza-6-fosfat kinaza, 5 tagatoza-1,6-difosfat aldolaza, 6 glukokinaza, 7 enzim II, 8 galaktokinaza, 9 glukoza: galaktoza-1-fosfat uridil transferaza uridin difosfat-glukoza epimeraza, 10 fosfoglukomutaza, 11 fosfogluukoza izomeraza, 12 fosfofruktokinaza, 13 fruktoza-1,6-difosfat aldolaza, 14 triozofosfat dehidrogenaza, 15 fosfoglicerokinaza, 16 fosfogliceromutaza, 17 endolaza, 18 piruvat kinaza, 19 enzim I, 20 laktat dehidrogenaza. (Prilagođeno prema Marshallu i Tamimu, 1997., i Vedamuthu, 2006.)

heterofermentativnih BMK. Između vrsta BMK koje se koriste za sastav kultura, laktokoki za transport laktoze u vlastitu stanicu isključivo koriste PEP : PTS sustav, a velika većina ostalih vrste BMK koristi ATP-permeazni sustav. Bifidobakterije, za razliku od BMK, za unos laktoze u stanicu koriste jedino citoplazmat-ske permeaze.

Energija za ATP-permeazni sustav derivira se iz ATP, a laktoza se nepromijenjena unosi u stanicu. Potrebna energija u PEP : PTS sustavu se derivira iz fosfoenol-piruvata (PEP) kompleksnom serijom reakcija uz sudjelovanje dvaju enzima. Visoko energetske fosfat iz PEP prenosi se na laktozu i ona u bakterijsku stanicu



Slika 2.48.

Aldolna reakcija u glikolitičkom ciklusu (EMP) razgradnje glukoze.

ulazi kao laktoza-6-fosfat. U bakterijsku stanicu bifidobakterija laktoza ulazi bez kemijske modifikacije.

U homofermentativnoj fermentaciji za unos laktoze u bakterijsku stanicu početni metabolički enzim određen je vrstom transportnog sustava. Za ATP-permeazni sustav, gdje se u bakterijsku stanicu unosi intaktna laktoza, početnim enzimom je β -D-galaktozidaza. Ona laktozu razgrađuje na glukozu i galaktozu-6-P. Sustavom PEP : PTS unosa laktoze u bakterijsku stanicu, početni je enzim fosfo- β -fosfogalaktozidaza koji hidrolizira laktoza-6-P u glukozu i galaktozu-6-P. Glukoza se dalje metabolizira EMP putem (slika 2.47), a galaktoza Tagatoznim ili Leloirovim putem.

Ključni su enzimi za homofermentativnu razgradnju laktoze (glukoze):

- fruktoza-1,6-difosfat aldolaza - enzim koji razgrađuje fruktozu-1,6-difosfat u gliceralehid -3-P i dihidroksiaceton-P
- piruvat kinaza - enzim koji je esencijalan za formiranje piruvata (gubitak kapaciteta za fosforilaciju)
- laktat dehidrogenaza - enzim koji je odgovoran za formiranje mliječne kiseline iz piruvata.

Izdvojeno, na slici 2.48. prikazana je aldolna reakcija glikolitičkog ciklusa razgradnje glukoze. Aldolaza je ključni enzim u homofermentativnoj razgradnji glukoze, gdje katalizira reverzibilnu aldolnu reakciju razgradnje fruktoza-1,6-difosfata u gliceralehid-3-P i dihidroksiaceton-P.

Mezofilni homofermentativni laktokoki, za razliku od ostalih vrsta BMK, imaju sposobnost istovremenog

katabolizma glukoze i galaktoze. Glukoza se razgrađuje glikolitičkim, a galaktoza-6-P kroz nekoliko tagatoznih derivata (tagatoza je stereozomer fruktoze) do gliceralehid-3-P.

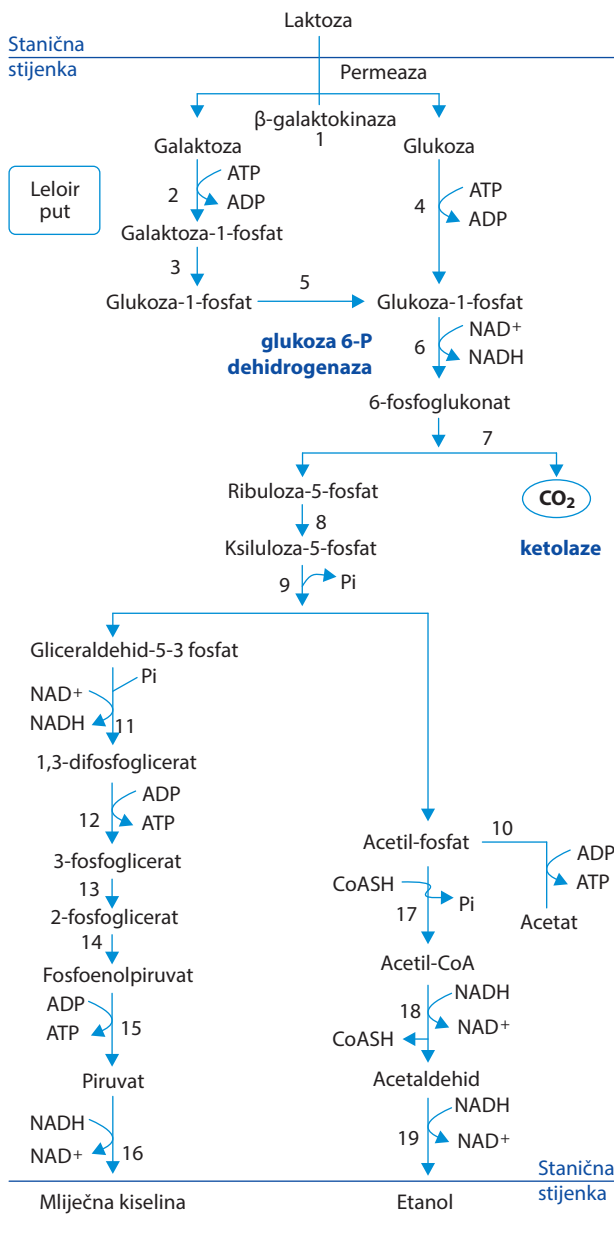
Termofilne homofermentativne vrste BMK razgrađuju laktozu također glikolitičkim putem. Međutim, bakterije poput *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i određenih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, koji nemaju enzim galaktokinazu (prvi enzim Leloirova puta), fermentiraju samo glukozu. Proporcionalno unesenoj koncentraciji laktoze, nerazgrađena se galaktoza izlučuje iz bakterijske stanice.

Teoretski, glikolitičkim putem (EMP) jedna molekula laktoze transformira se u četiri, odnosno dvije molekule mliječne kiseline. Dvije molekule mliječne kiseline nastaju u slučajevima ako fermentaciju laktoze vrše bakterijski sojevi *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i određeni sojevi *L. delbrueckii* subsp. *lactis* koji fermentiraju samo glukozu. U osnovi, homofermentativna glikoliza laktoze može se sažeti:

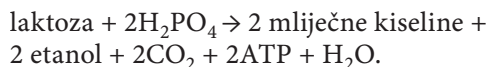
- glukoza \rightarrow 2-trioza-3-P \rightarrow 2 piruvat \rightarrow 2 mliječne kiseline + 2 ATP
- laktoza + 4H₂PO₄ + 4ADP \rightarrow 4 mliječne kiseline + 4ATP + 3 H₂O.

Fosfoketolaznim ili pentoza-fosfatnim putem laktozu u mliječnu kiselinu fermentiraju heterofermentativne vrste BMK, uključivo i *Leuconostoc* spp. Te bakterijske vrste nemaju enzim fruktoza-1,6-difosfat aldolazu i zbog toga laktozu ne mogu fermentirati glikolitičkim putem (slika 2.49.). Ključni su enzimi za heterofermentativnu razgradnju laktoze (glukoze):

- glukoza - 6-P dehidrogenaza - enzim koji omogućava metabolizam glukoze 6-P-glukonatnim putem
- fosfoketolaza - enzim koji omogućava hidrolizu 6-P-glukonata do CO₂ i pentoze -5-P koja se konvertira u glicerinaldehid-3-P.



Teoretski, zbog nedostatka ključnog enzima fruktoza-1,6-difosfat aldolaze, fosfoketolaznim putem iz laktoze nastaje:



Bakterije *Leuconostoc* spp., za razliku od heterofermentativnih BMK, za metabolizam laktoze koriste kombinaciju i fosfoketolaznog i Leloirova puta, gdje se galaktoza prvo Leloirovim putem transformira u glukozu-1-P (slika 2.50.). Prvi su produkti metabolizma laktoze piruvat, CO₂, etanol ili acetat (oksidativni metabolizam). Potom se piruvat djelovanjem D-laktat dehidrogenaze reducira u D-laktat, koji bakterijska stanica djelomično koristi za izgradnju peptidoglikana (građevne jedinice stanične stijenke). Pentozni šećeri koji nastaju fosfoketolaznim putem (ribuloza-5P → ksiluloza-5P) dalje se razgrađuju do glicerinaldehid-3P i acetil-P, ali ne nastaju niti acetaldehid niti etanol. Konverzijom pentozna nastaje jedino octena kiselina. Specifičnost načina heterofermentativne razgradnje laktoze bakterija *Leuconostoc* spp. njegova je genetička karakteristika za istovremeni katabolizam laktoze i citrata prisutnih u mlijeku. Zbog toga se D-laktat formira i iz glukoze i iz citrata, dok se kometabolizmom iz ksiluloze i citrata formira D-laktat i acetat bez etanola. Iz acetil-P koji nastaje iz ksiluloze-5P

Slika 2.49.

Shematski prikaz fosfoketolaznog puta (PKP) metabolizma laktoze heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline nakon unosa laktoze u bakterijsku stanicu ATP-permeaznim mehanizmom.

Detalji: enzimi, 1 β-D-galaktosidaza, 2 galaktokinaza, 3 glukoze: galaktoze-1-fosfat uridil transferaze uridin difosfat-glukoza epimeraza, 4 glukokinaza, 5 fosfoglukomutaza, 6 glukoza 6-fosfat dehidrogenaza, 7 6-fosfoglukonat dehidrogenaza, 8 epimeraza, 9 fosfoketolaza, 10 acetat kinaza, 11 trioze fosfat dehidrogenaza, 12 fosfoglicerokinaza, 13 fosfogliceromutaza, 14 enolaza, 15 piruvat kinaza, 16 laktat dehidrogenaza, 17 fosfoacetil transferaza, 18 acetaldehid dehidrogenaza, 19 etanol dehidrogenaza. (Prilagođeno prema Marshallu i Tamimu, 1997., i Vedamuthu, 2006.)

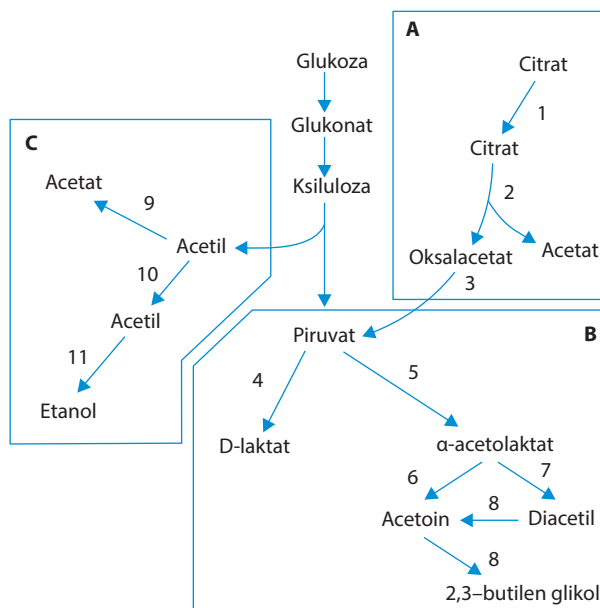
djelovanjem acetat kinaze nastaje acetat uz stvaranje energije (ATP). Istovremeno fosfotransacetilaze stvaraju acetil-CoA koji se koristi za biosintezu ili za reoksidaciju koenzima NADH, uz stvaranje etanola djelovanjem alkoholne dehidrogenaze. Pretpostavljeni kompletni bazični metabolizam *Leuconostoc* spp. prikazan je na slici 2.51.

Galaktozu nastalu hidrolizom laktoze homofermentativne i heterofermentativne vrste BMK do mliječne kiseline mogu razgraditi Tagatoza-6-P ili Leloirovim putem (slika 2.52.).

Prvi je ključni enzim u Tagatoznom putu D-galaktoza-6-fosfat izomeraza, koja prevodi D-galaktozu-6-fosfat u D-tagatozu-6-fosfat. Slijedi fosforilacija koju katalizira enzim D-tagatoza-6-fosfat kinaza i nastaje D-tagatoza-1,6-difosfat, koji se razgrađuje na trioze fosfat (dihidroksiacetone fosfat i gliceraldehid-3-fosfat), uz sudjelovanje enzima D-tagatoza-1,6-difosfat aldolaze. Trioze fosfat se dalje do mliječne kiseline razgrađuju glikolitičkim putem.

Ključni enzim razgradnje galaktoze Leloirovim putem je β -galaktokinaza, koja fosforilira galaktozu u galaktozu 1-fosfat. Galaktoza 1-fosfat uz katalizu epimeraze se konvertira u glukozu 1-fosfat, a posredovanjem fosfoglukozu mutaze u glukozu 6-fosfat, koja se s glukozom do mliječne kiseline metabolizira glikolitičkim putem. Naime, permeazom unesena laktoza u bakterijsku stanicu u većine laktobacila najprije se cijepa posredstvom β -galaktozidaze u glukozu i galaktozu. Tako se Leloirovim putem nakon prevođenja galaktoze u glukozu obje molekule metaboliziraju preko piruvata do mliječne kiseline. Kada bakterijske stanice nemaju sposobnost tvorbe enzima β -galaktokinaze, galaktoza se iz bakterijske stanice izlučuje nemetabolizirana.

U bakterijskom smislu, svrha fermentacije je stvaranje dovoljne količine energije (ATP) koja omogućava rast i razmnožavanje bakterijskih stanica. Stvaranje ATP fermentacijom znatno je manje u odnosu na stvaranje ATP respiracijom. Glikolizom se po molekuli laktoze stvara samo 4 mola ATP, a respiracijom 76. Zbog toga vrste BMK za stvaranje iste količine ATP fermentacijom trebaju visoku koncentraciju laktoze,

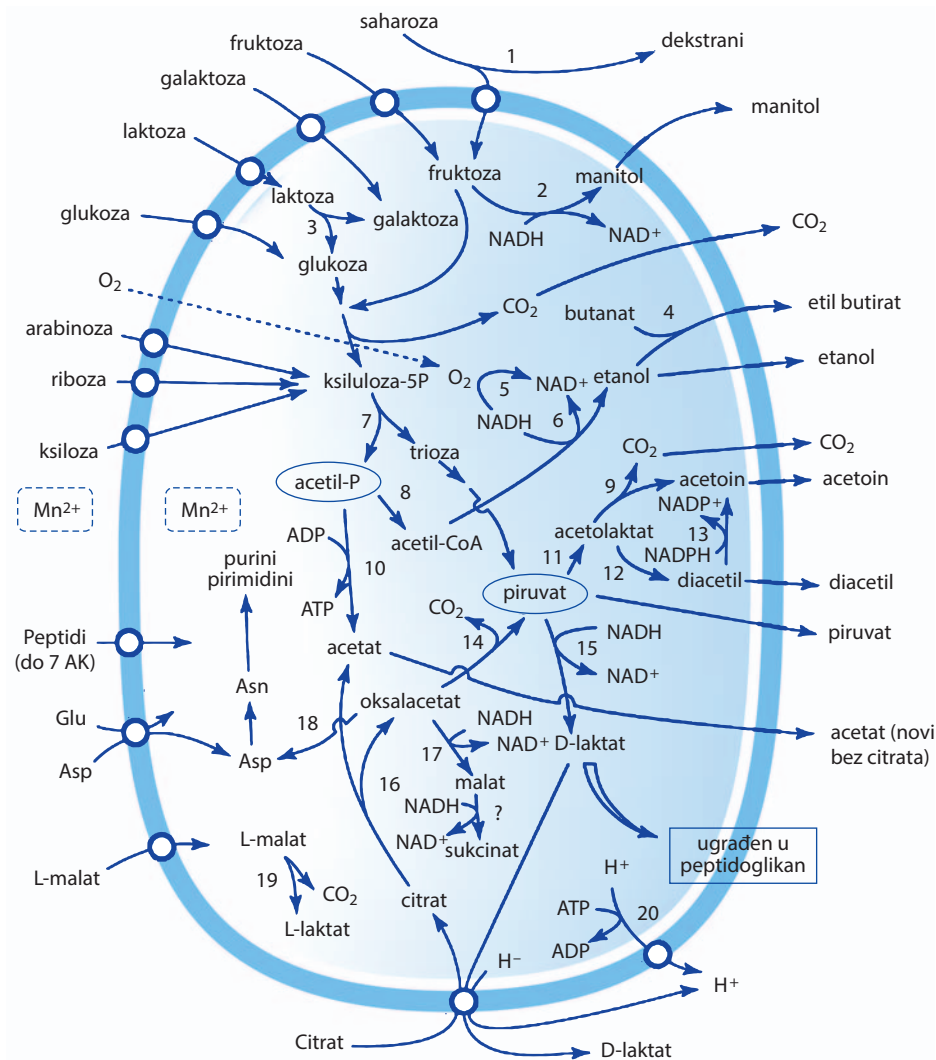


Slika 2.50.

Schematski prikaz heterofermentativne razgradnje laktoze bakterija *Leuconostoc* spp. koja uključuje glukozu-citrat kometabolizam.

Detalji: enzimi, (A): 1 citrat permeaza, 2 citrat liaza, 3 oksalacetat dekarboksilaza; (B): 4 laktat dehidrogenaza, 5 α -acetolaktat sintaza, 6 α -acetolaktat dekarboksilaza, 7 neenzimatska dekarboksilacija, 8 2,3 butilen glikol dehidrogenaza; (C): 9 acetat kinaza, 10 fosfotransacetilaza, 11 alkohol dehidrogenaza (Bourel i sur., 2001., s dopuštanjem časopisa *Le Lait*.)

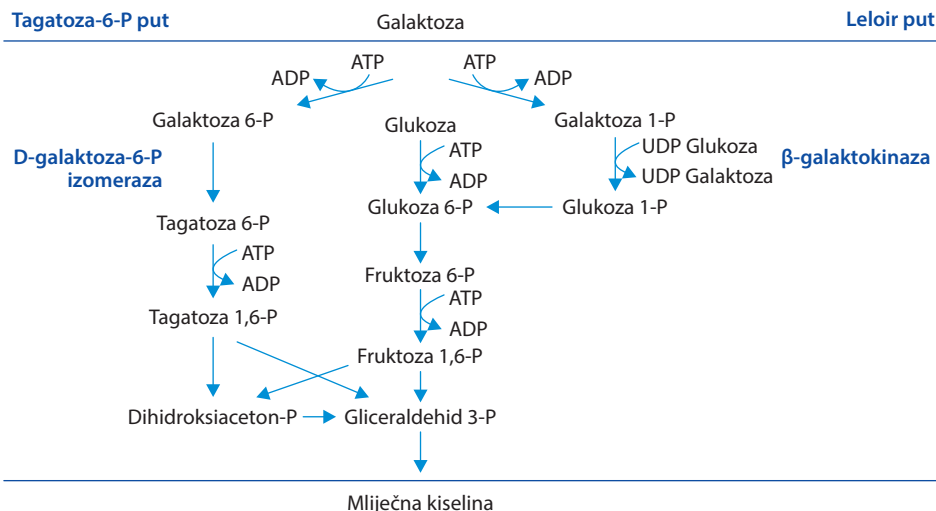
a uzročno-posljedično u mediju nastaje visoka koncentracija mliječne kiseline i nešto niže koncentracije ostalih organskih kiselina. Ako te organske kiseline ne bi bile izlučene iz stanice, acidificirale bi staničnu citoplazmu i izazvale smrt stanice. Bakterije mliječne kiseline imaju dva mehanizma za izlučivanje laktata i protona iz svoje stanice. Jedan uključuje transmembranski reverzibilni enzim $F_0 F_1$ -ATPazu koja je odgovorna za sekreciju protona. Drugim mehanizmom, simultanom reakcijom sekrecije iz stanice se izlučuju laktat, anioni i protoni. Ti su mehanizmi naročito



Slika 2.51.

Shematski prikaz bazičnog metabolizam *Leuconostoc* spp. bakterija.

Detalji: glavni produkti metabolizma označeni su masnim slovima. Enzimi: 1 dekstrasaharaza, 2 manitol-dehidrogenaza, 3 β -galaktozidaza, 4 esteraza, 5 NADH oksidaza, 6 alkohol dehidrogenaza, 7 fosfoketolaza, 8 fosfotransacetilaza, 9 α -acetolaktat dekarboksilaza, 10 acetat kinaza, 11 α -acetolaktat sintaza, 12 neenzimatska formacija, 13 diacetil reduktaza, 14 oksalacetat dekarboksilaza, 15 laktat dehidrogenaza, 16 citrat liaza, 17 malat dehidrogenaza, 18 formiranje aspartata, 19 malolaktik enzim, 20 ATPaza. (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004., s dopuštanjem Elseviera.)



Slika 2.52.

Shematski prikaz metabolizma galaktoze bakterija mliječne kiseline. (Prilagođeno prema Walstri i sur., 1999.)

aktivni ako je eksterna koncentracija laktata niska a interna visoka. Također, tim se reakcijama derivira i energija, budući da se stvara proton-pokretačka sila.

2.5.2.1.

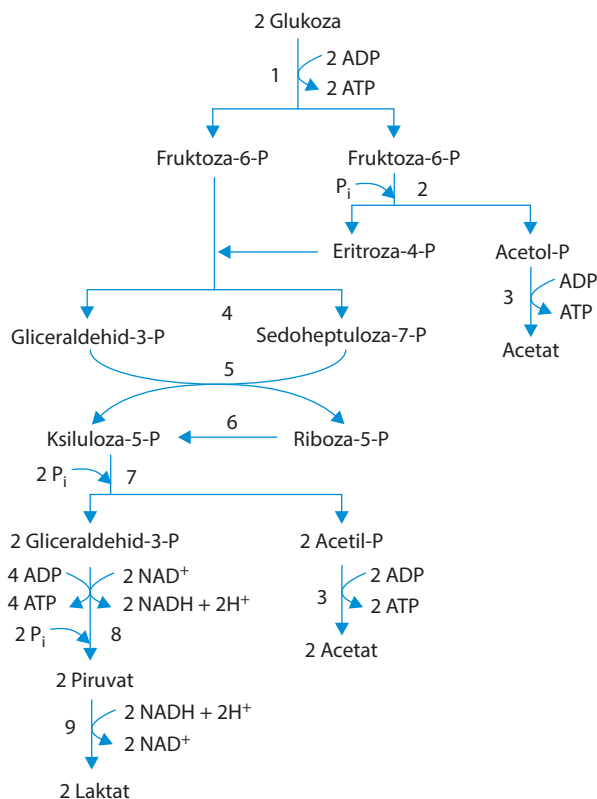
Bifidociklus razgradnje laktoze

Bifidobakterije, za razliku od BMK, za transport laktoze u stanicu koriste jedino citoplazmatske enzime permeaze bez njene kemijske modifikacije. Nefosforilirana laktoza se hidrolizira uz sudjelovanje enzima β-galaktozidaze na nefosforiliranu glukozu i galaktozu. Glukoza se dalje razgrađuje do mliječne kiseline, a galaktoza se nerazgrađena izlučuje iz bakterijske stanice. Međutim, za razliku od heterofermentativnih

Slika 2.53.

Bifidociklus razgradnje glukoze.

Detalji: enzimi, 1 heksokinaza i glukoza 6-P izomeraze, 2 fruktoza-6P-fosfoketolaza, 3 acetat kinaza, 4 transaldolaza, 5 transketolaza, 6 riboza-5P izomeraza i riboza-5 P-3-epimeraza, 7 ksiluloza-5 fosfoketolaza, 8 enzim iz EMP puta, 9 laktat dehidrogenaza. (Prasanna i sur., 2014., s dopuštenjem Elseviera.)



laktobacila, bifidobakterije nemaju enzime fruktoza-1,6-difosfat aldolazu i glukoza-6-P-dehidrogenazu, te se glukoza razgrađuje alternativnim fosfoketolaznim putem (slika 2.53.). U tim je reakcijama ključni enzim fruktoza-6P-fosfoketolaza. Prema tom se enzimu bifidobakterije razlikuju i od bakterija *Leuconostoc* spp., koje glukozu i galaktozu metaboliziraju fosfoketolaznim putem u kojem se galaktoza prvo prevodi u glukozu-6P Leloirovim putem.

Prema krajnjem produktu hidrolize laktoze, bifidobakterije su heterofermentativne vrste bakterija. Za razliku od heterofermentativnih vrsta BMK, gdje hidrolizom glukoze nastaju jednake ekvimolarne količine CO₂, laktata i acetata (koristeći 6-P-glukonat ciklus/*Lactobacillus*), produkt su fermentacije glukoze bifidobakterijama acetat i laktat (bez CO₂) u molarim odnosima 3 : 2 (fruktoza-6-P-ciklus-bifidociklus/*Bifidobacterium*).

2.5.2.1.1.

Mliječna kiselina

Stvaranje mliječne kiseline iz laktoze mlijeka djelovanjem BMK i bifidobakterija najvažnija je fermentacijska reakcija u mljekarskoj industriji. Mliječna kiselina stvara se u temperaturnom rasponu od 10 do 50 °C. Ona je bez mirisa, bezbojna, blago viskozna tekućina, a okus je pikantan, rezak. Stvaranje mliječne kiseline usko je povezano s omjerom rasta i razmnožavanja bakterijskih stanica u mlijeku. Zato je mjerenje koncentracije mliječne kiseline metodom titracije dobar indikator za procjenu rasta i razmnožavanja bakterijskih stanica u mlijeku. Procijenjeni omjer rasta i razmnožavanja BMK tijekom fermentacije vrlo se često iskazuje i postotkom stvorene mliječne kiseline.

Metabolizmom laktoze mlijeka djelovanjem BMK i bifidobakterija stvaraju se isključivo L (+) ili D (-) izomer mliječne kiseline, približno iste količine oba izomera, ili velika količina jednog i mjerljiva količina drugog izomera. Koji će izomer mliječne kiseline nastati fermentacijom laktoze ovisi o prisutnosti enzima specifične NAD⁺ ovisne laktat-dehidrogenaze (nLDH)

i njezinoj aktivnosti. U slučajevima ako se stvaraju oba izomera, bakterijska stanica ima i D-nLDH i L-nLDH enzime, i enzim recemazu koji konvertira L-izomer u D-izomer mliječne kiseline. Aktivaciju recemaze potiče L (+) izomer mliječne kiseline u ranoj fazi rasta i razmnožavanja bakterijske stanice, a D (-) izomer nastaje u njezinoj stacionarnoj fazi rasta. Naime, koncentracija piruvata i pH-sredine djeluju na aktivnost laktat-dehidrogenaze, što je razlog zašto se ta dva izomera mliječne kiseline tvore u različitim fazama bakterijskog rasta. Sposobnost tvorbe L (+) i D (-) izomera mliječne kiseline u mediju imaju svega nekoliko vrsta BMK. Zbog toga je oblik izomera laktata koristan za identifikaciju vrsta BMK u sastavu mikrobnih kultura. Bakterije *Leuconostoc* spp. i *Lactobacillus delbrueckii* tvore jedino D-laktat, a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Streptococcus thermophilus* jedino L-laktat, dok *Lactobacillus helveticus* i *Bifidobacterium* spp. tvore oba izomera.

Glikolitičkim putem (Embden-Mayerhof-Parnasovim putem) laktozu u mliječnu kiselinu fermentiraju vrste rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, i većina *Lactobacillus* i *Pediococcus* vrsta. Kada je glikoliza optimalna, iz laktoze nastaje 90 - 95 % mliječne kiseline i male količine drugih organskih spojeva: diacetil, acetoin, acetaldehid, etanol, octena, maslačna, propionska i mravlja kiselina. Ako je glikoliza zbog bilo kojih razloga nepotpuna, iz laktoze se stvara 70 - 90 % mliječna kiselina. Rast i razmnožavanje nekih sojeva laktokoka u mediju s glukozom ili niskom razinom glukoze uvjetuje osim stvaranja mliječne kiseline i tvorbu drugih spojeva, poput etanola, acetata i acetaldehida. Drugim riječima, u tih su sojeva L-dehidrogenaza (LDH) i piruvat-format liaza (PFL) alosterički enzimi. Tako LDH enzim za svoju aktivnost zahtijeva prisutnost fruktoza-1, 6-P, a istovremeno je aktivnost PFL enzima inhibirana tri-oza-fosfatom. U mediju, kod dovoljnih koncentracija šećera oba su aktivatora u stanici prisutna u visokoj koncentraciji, što favorizira aktivnost LDH enzima i stvaranje laktata. Suprotno, rast u mediju s niskom koncentracijom šećera uzrokuje nisku razinu aktivatora u bakterijskoj stanici, aktivnost LDH je reducirana, a povećava se koncentracija PFL enzima. Zbog toga se

piruvat hidrolizira u etanol i acetat, a samo manjim dijelom u laktat. Anaerobnim rastom i razmnožavanjem aktivnost PFL enzima favorizirana je u odnosu na LDH aktivnost u početnom stvaranju acetyl CoA.

Posljedično, povećanjem koncentracije mliječne kiseline snižava se i pH-vrijednost mlijeka, premda odnos između povećanja koncentracije mliječne kiseline (ili broja bakterijskih stanica) i pH nije linearan. Zbog veće točnosti u odnosu na titracijsku metodu, ali i mogućnosti mjerenja u cijeloj proizvodnoj liniji, pH-vrijednost se gotovo isključivo koristi za procjenu bakterijske aktivnosti tijekom fermentacije mlijeka.

Za tumačenje odnosa između pH, titracijske kiseline i broja bakterija treba istaknuti sljedeće činjenice:

- pH = negativan logaritam množinske koncentracije vodikovih iona (točnije aktiviteta) izražen u molovima po litri:
- $\text{pH} = -\log_{10}(\text{H}^+)$; ako se kiselost otopine poveća za jednu pH-jedinicu, koncentracija H^+ iona poveća se 10 puta
- pK = negativan logaritam konstante ravnoteže disocijacije kiseline K_a ($\text{HA} \leftrightarrow \text{A}^- + \text{H}^+$)
 $\text{pK} = -\log_{10} K$
- disocijacija kiselina - ako se mlijeko zakiseli (ili titrira) s HCl, kiselina je potpuno disociirana na pH-vrijednost od interesa, ali to nije slučaj s mliječnom kiselinom, koja ima pK (stehiometrijska vrijednost) približno 3,9 što implicira da na nižoj pH-vrijednosti od ~ 5,8 ona nije potpuno disociirana, osim toga, laktat se u određenom omjeru povezuje s Ca^{+2} i Mg^{+2} ionima; pomoću jednadžbe: $\log([\text{ion}] / [\text{kiselina}]) = \text{pH} - \text{pK}$ može se izračunati stupanj disocijacije [aprosimativne vrijednosti pK za kiseline u mlijeku: fosforna 2,1, 7,1, 12,4; citratna 3,0, 4,5, 4,9; ugljična 6,3, 10,0; masne kiseline 4,7 ($\text{pH} = -\log \text{H}^+$ iona; primjerice, otopina koja sadrži 10^{-5} mol H^+/L ima pH-5)], puferni kapacitet označava udjel stvorene mliječne kiseline potreban da se snizi pH ovisi o pufernim svojstvima mlijeka, odnosno njegovu sastavu od kojeg su najvažniji proteini i soli; kako je puferni kapacitet mliječne masti praktično = 0, puferni kapacitet

mlijeka korespondira s obranim mlijekom i povećava se njegovom koncentracijom (tipično za fermentirana mlijeka)

- ostale promjene - zbog bakterijskog rasta i razmnožavanja mogu nastati promjene između pH i kiselosti, naime, druge kiseline poput octene ($\text{pK} = 4,7$), ugljične (prva $\text{pK} = 6,3$) citratne (prva $\text{pK} = 3,0$) mogu sniziti pH; proteoliza može povećati puferni kapacitet, a prekomjerna lipoliza povećava kiselost
- broj bakterija i stvorena mliječna kiselina - prvenstveno treba uvažiti činjenicu da se broj bakterija izražava u log vrijednosti, dok je mliječna kiselina proporcionalna stvarnom broju bakterija, tako će u eksponencijalnoj fazi rasta i razmnožavanja bakterija omjer između stvorene mliječne kiseline A (u mol/L) i inkubacijskog vremena (t) biti: $A = cN_0g(2^{t/g}-1)$; gdje je c proporcionalna konstanta (u mol/s), N_0 inicijalan broj bakterija, g generacijsko vrijeme bakterija
- masa (količina) bakterija i broj bakterija - omjer tvorbe mliječne kiseline proporcionalan je bakterijskoj masi, a broj bakterija izražen kao cfu/mL ne mora biti proporcionalan masi bakterija, primjerice, laktokoki ostaju povezani u lance od po desetak stanica, a svaki lanac tvori najmanje jednu koloniju (cfu), iz čega slijedi odnos između mase i cfu može značajno varirati između vrsta ili sojeva, a ovisan je i o raspoloživim uvjetima rasta
- bakterijski metabolizam - znatno se razlikuje ovisno o vrsti i bakterijskom soju, neki sojevi iz laktoze tvore četiri a neki dvije molekule mliječne kiseline, ali su mogući i drukčiji omjeri
- razdvajanje bakterijskog rasta i razmnožavanja i metabolizma - jedino u idealnim i konstantnim uvjetima rasta i razmnožavanja, osobito kada su bakterije u eksponencijalnoj fazi rasta, tvorba mliječne kiseline proporcionalna je bakterijskoj masi, kada se rast uspori ili je zaustavljen udjel mliječne kiseline ipak se povećava jer se enzimatska razgradnja laktoze ne zaustavlja (reakcija se događa približno nakon tri sata); kada su drugi uvjeti rasta i razmnožavanja nepovoljni - niska temperatura,

visoka koncentracija soli ili kombinacija tih uvjeta - tvorba mliječne kiseline obično prestaje

- udjel nedisocirane mliječne kiseline - determinira prestanak bakterijskog rasta i razmnožavanja, odnosno što je pH-vrijednost niža, viša je koncentracija nedisocirane mliječne kiseline; inhibicijski učinak na bakterijski rast ima i koncentracija nedisocirane octene kiseline ili sukcinata
- lag faza - uvjeti za rast bakterija iz sastava kultura u mlijeku mogu biti značajno različiti, prvenstveno zbog načina toplinske obrade mlijeka i prisutnog kisika, što znači da je potrebno određeno vrijeme da se bakterije prilagode novom mediju i započnu tvorbu mliječne kiseline.

Većina vrsta BMK tvori između 1 i 2 % mliječne kiseline, a tako visoka koncentracija inhibira rast mnogih mikroorganizama koji mogu biti prisutni u istom mediju. Međutim, koncentracija mliječne kiseline u fermentiranom mlijeku direktno je ovisna o bakterijskim sojevima iz sastava korištenih kultura i vrsti fermentiranog mlijeka.

2.5.2.1.2.

Octena kiselina

Homofermentativnom fermentacijom laktoze, između slobodnih hlapljivih masnih kiselina koje čine važne komponente okusa, octena kiselina se stvara u najvećoj koncentraciji. Aktivnošću bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta, octena kiselina nastaje iz piruvata. Svojim metabolizmom iz piruvata bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u usporedbi s bakterijom *S. thermophilus* stvara značajno višu koncentraciju octene kiseline.

Bifidobakterije, koje su heterofermentativna skupina organizama, hidrolizom laktoze obvezno uz mliječnu kiselinu stvaraju i octenu kiselinu u omjeru 2 : 3. Octena kiselina u fermentiranom mlijeku uzrokuje "hrapavost" teksture, a veće koncentracije jogurtu daju okus octa koji u potrošača smanjuje njegovu prihvatljivost.

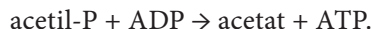
2.5.3.

Metabolizam citrata

Bakterije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i subsp. *lactis*, jedine između bakterija mliječne kiseline imaju sposobnost metabolizma citrata prisutnog u mlijeku. Za razliku od ostalih, te bakterije imaju specifično vezane stanične citrat-permeaze koje im omogućavaju limitirano prevođenje citrata iz mlijeka u vlastitu stanicu. Unutar bakterijske stanice citrat se konvertira u acetat i oksalacetat u reakciji koju katalizira stanična citrat liaza (CL). Stanična liaza predstavlja enzimatski kompleks odgovoran za konverziju citrata u bakterijskoj stanici u C-4 spojeve poput diacetila, acetoina, 2,3-butilen glikola (slika 2.54.). Ti spojevi imaju aromatska svojstva i odgovorni su za specifičan i karakterističan okus i aromu točno određenih vrsta fermentiranih mlijeka. Ključni spoj za tvorbu diacetila je α -acetolaktat. Istovremeno, u sintezi C-4 spojeva ključni enzim je acetolaktat sintaza koji katalizira reakcije koje potiču piruvat molekule generiranju α -acetolaktat. U kemijskom smislu, α -acetolaktat je nestabilan spoj koji se dekarboksilira u acetoin djelovanjem enzima α -acetolaktat dekarboksilaze ili neenzimatskom dekarboksilacijom (u prisutnosti kisika). Acetoin se također može sintetizirati preko diacetila aktivnošću enzima diacetil reduktaze. Isti enzim ima sposobnost acetoin redukcije, te iz acetoina nastaje 2,3-butilendiol, a reverzibilnom reakcijom koju katalizira 2,3-butilendiol dehidrogenaza ponovno nastaje acetoin. Omjer krajnjih produkata citrat metabolizma u mediju ovisan je o oksidoredukcijskom potencijalu bakterijskih stanica.

Kulture s citrat pozitivnim (Cit+) laktokokima i citrat pozitivnim (Cit+) leukonostocima ipak se razlikuju u stvorenim spojevima kometabolizmom citrata i laktoze. Tako Cit+ laktokoki tvore laktat, acetoin i CO₂ na sličan način kako to čine mješoviti sojevi iz sastava mezofilnih kultura. Suprotno, Cit+ *Leuconostoc* spp. ne tvori niti acetoin niti diacetil. Umjesto tih spojeva te bakterije tvore znatnu količinu laktata i acetata. Piruvat je pritom intermedijarni spoj u metabolizmu

i citrata i laktoze koji se konvertira u mliječnu kiselinu. Ta reakcija potiče bakterijsku stanicu leukonostoka da tvori etanol za regeneraciju piridin nukleotida. U zamjenu, acetil-P stvoren iz laktoze one koriste za stvaranje acetata i ATP:



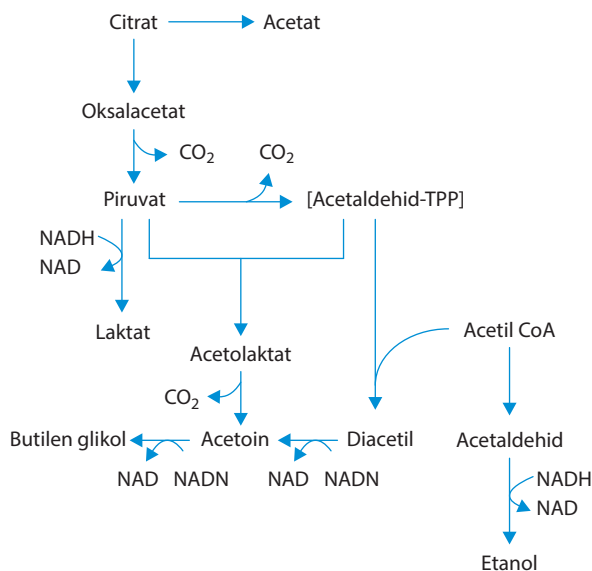
Dodatno, stvoreni ATP omogućava leukonostocima mnogo brži rast. Iz citrata bakterije *Leuconostoc* spp. će stvarati diacetil i acetoin u odsutnosti drugih izvora energije. Tada se citrat proporcionalno konvertira u te komponente kako se pH-vrijednost medija snižava. Ne zna se točno kako bakterije *Leuconostoc* spp. tvore diacetil i acetoin u mješovitim kulturama, ali se pretpostavlja da katabolizam citrata započinje kada se pH-mlijeka snizi na manje od 5,5. Naime, na toj pH-vrijednosti mlijeka bakterije *Leuconostoc* spp. ne mogu metabolički razgrađivati laktozu.

Acetoin je kvantitativno najvažniji produkt metabolizma citrata. Diacetil i CO₂ stvaraju se u malim količinama, ali su ti spojevi odgovorni za miris, okus i teksturu fermentiranih mlijeka. Proces načina formiranja diacetila iz citrata još uvijek je nedovoljno razjašnjen i zato ga je u proizvodnji fermentiranih mlijeka teško kontrolirati. Diacetil je i komponenta okusa jogurta ali postoje kontroverzni rezultati o načinu kako jogurtne bakterije stvaranju diacetil. Koncentracija diacetila u jogurtu je približno 0, 5 ppm.

2.5.4.

Stvaranje acetaldehida

Acetaldehid je jedna od najvažnijih aromatskih komponenti u formiranju okusa jogurta. Sposobni su ga tvoriti određeni sojevi vrsta BMK iz sastava mezofilne kulture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, a iz termofilne kulture, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Količina stvorenog acetaldehida tijekom fermentacije fermentiranog mlijeka može dostignuti koncentraciju i do 40 mg kg⁻¹. Uglavnom, acetaldehid je produkt metabolizma ugljikohidrata (piruvata), te ga bakterije



Slika 2.54.

Metabolizam citrata bakterija *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc* vrsta. (preuzeto od Marshalla i Tamima, 1997.)

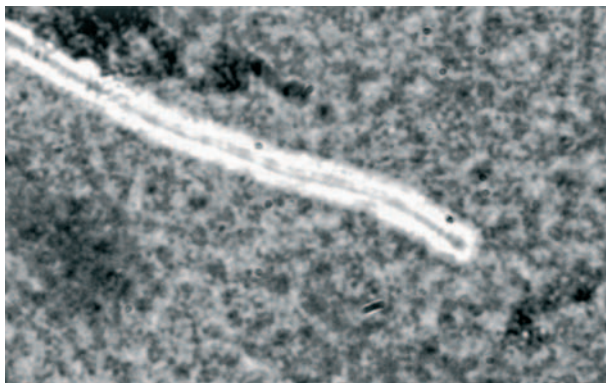
mliječne kiseline fermentacijom tvore brojnim metaboličkim putovima:

- iz glukoze direktno preko piruvata
- iz glukoze preko formiranja piruvata, a potom djelovanjem acetil-koenzima A (acetil CoA)
- iz glukoze preko formiranja D-ksiluloze-5-fosfata, potom razgradnja ide do acetil-P i acetata.

Aromatska komponenta acetaldehid može se tijekom fermentacije jogurta i jogurtu srodnih vrsta stvarati i razgradnjom aminokiseline treonin uz sudjelovanje enzima treonin aldolaze:



Način na koji BMK jogurtne kulture (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) iz ugljikohidrata tvore acetaldehid još nije objašnjen. Zna se da bakterija *S. thermophilus* u odnosu na bakteriju *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* acetaldehid iz glukoze stvara u većim koncentracijama. Kada te bakterije rastu zajedno u kulturi, ukupna koncentracija stvorenog acetaldehida, zbog njihova simbiotskog odnosa,



Slika 2.55.

Mikroskopska slika kapsularnog oblika egzopolisaharida bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Shah, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)



Slika 2.56.

Mikroskopska slika kapsularnog oblika egzopolisaharida bakterije *S. thermophilus*. (Shah, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

značajno je veća u odnosu na pojedinačan rast tih bakterija u kulturi. Suprotno, za bakterije jogurtne kulture mehanizam tvorbe acetaldehida iz aminokiseline treonin je poznat. Konverzija treonina u acetaldehid metaboličkom aktivnošću *S. thermophilus* se smanjuje povećanjem temperature fermentacije na više od 30 °C. Bakterijski sojevi *S. thermophilus* koji imaju sposobnost tvorbe i enzima serin hidroksimetiltransferaze mogu iz treonina formirati acetaldehid čak i na temperaturi od 42 °C. Drugim riječima, enzim serin hidroksimetiltransferaza potiče aktivnost treonin aldolaze svojim indirektnim djelovanjem. Istodobno, konverzija treonina u acetaldehid metaboličkom aktivnošću bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermentacijom mlijeka nije ovisna o temperaturi. Za istu metaboličku aktivnost bakterija jogurtne kulture utvrđene niže koncentracije acetaldehida u kozjem u odnosu na kravlji jogurt posljedica je više razine aminokiseline glicina koja djeluje kao inhibitor enzima treonin aldolaze.

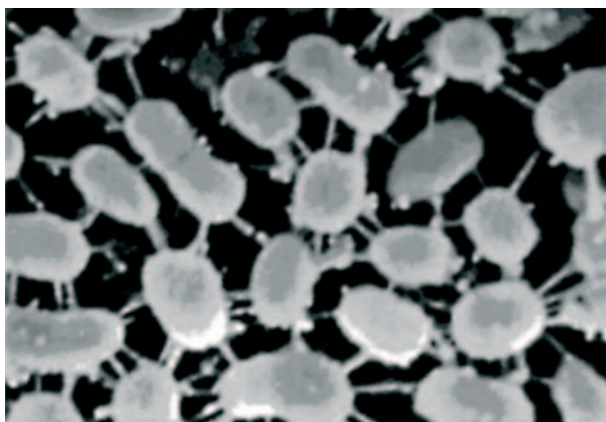
Od vrste *Lactococcus lactis* jedino *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* tvori acetaldehid isključivo metabolizmom ugljikohidrata. Naime, ta bakterija za svoj rast zahtijeva aminokiselinu glicin, a kako nema ključni enzim treonin aldolazu tvorba acetaldehida smatra se njezinom fiziološkom funkcijom.

Za većinu fermentiranih mlijeka pripremljenih mezofilnom kulturom, omjer između diacetila i acetaldehida presudan je za formiranje karakterističnog okusa. Optimalnim omjerom diacetil : acetaldehid, u kiselom mlijeku, smatra se 4 : 1. Suprotno, koncentracija tih spojeva u omjeru 3 : 1 uzrokuje pogrešku okusa kiselog mlijeka koja se opisuje okusom po jogurtu. Da bi se smanjila mogućnost te pogreške, neki proizvođači u mješovitim kulturama koriste i sojeve *Leuconostoc* spp. Njihova je funkcija redukcija koncentracije od ostalih bakterijskih vrsta stvorenog acetaldehida u etanol. Koncentracije etanola nastale konverzijom acetaldehida u proizvodu su zanemarive u smislu njegovog negativnog utjecaja na okus.

2.5.5.

Stvaranje egzopolisaharida

Određeni sojevi vrsta BMK i bifidobakterija sposobni su tvoriti egzopolisaharide (EPS), dugolančane polimere velike molekularne mase. EPS može obavijati bakterijsku stanicu poput kapsule i tada se naziva glikokaliks, ili može biti difuzno izlučen u medij u obliku sluzi (slika 2.55. i 2.56.). Vrlo je teško razlikovati te



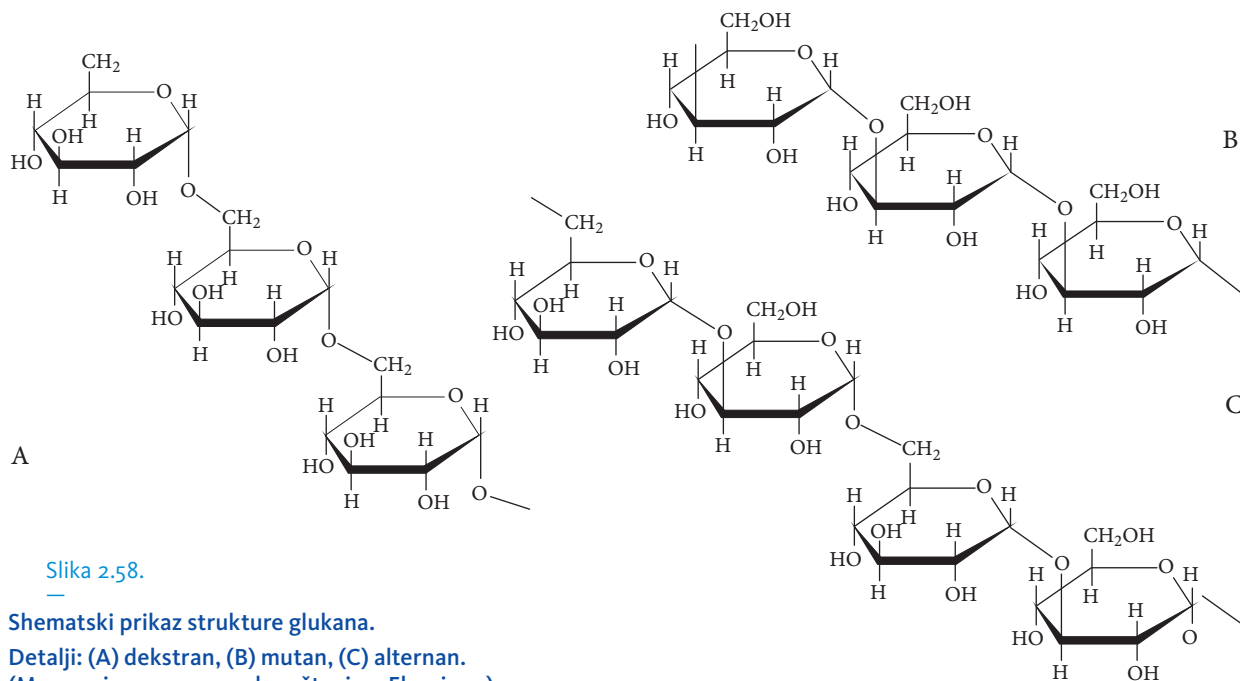
Slika 2.57.

Prihvatanje bakterija *Leuconostoc* spp. na površinu kalupa za sir. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). (Devoyod i Poullain, 1988., s dopuštenjem časopisa *Le Lait*.)

dvije forme EPS, te se u literaturi za EPS najčešće koriste opisni nazivi poput sluzavi, ljepljivi, kapsularni ili mikrobnj polisaharidi. Tako je termin egzopolisaharidi (EPS) generalni naziv za sve forme bakterijskih egzopolisaharida.

Za bakterijsku stanicu, primarna funkcija EPS zaštita je stanice od isušivanja, infekcije bakteriofaga (bakterijski virus), djelovanja antibiotika, dezinficijensa i drugih sličnih štetnih agensa koji stanicu mogu oštetiti ili uništiti. Druga uloga te ekstracelularne strukture bakterijske stanice je funkcionalna u smislu sposobnosti prihvaćanja bakterije za određenu površinu. Nakon adhezije na čvrstu površinu bakterije mogu formirati svoj zaštitni mikroprostor u formi biofilma. Za ilustraciju, na slici 2.57. prikazan je način formiranja biofilma bakterija *Leuconostoc* spp. na površini kalupa za sir.

Kemijski, EPS su organski spojevi građeni od različitih šećera, acetiliranih aminošećera i glukonske kiseline, koji nastaju polimerizacijom u citoplazmi bakterijske

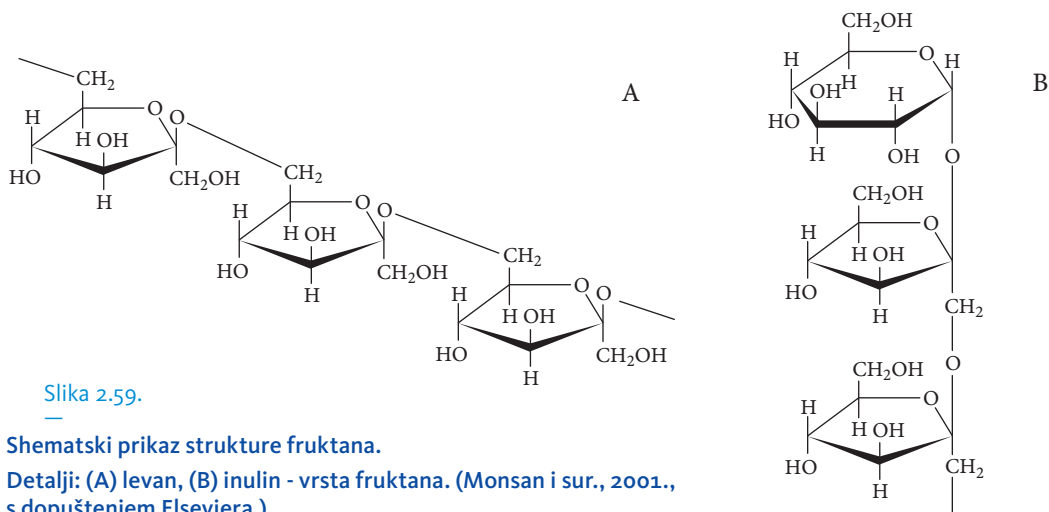


Slika 2.58.

Shematski prikaz strukture glukana.

Detalji: (A) dekstran, (B) mutan, (C) alternan.

(Monsan i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 2.59.

Shematski prikaz strukture fruktana.

Detalji: (A) levan, (B) inulin - vrsta fruktana. (Monsan i sur., 2001., s dopuštanjem Elseviera.)

stanice. Ovisno o bakterijskom soju koji ih tvori i raspoloživom šećeru u mediju EPS mogu prema svom sastavu biti homopolisaharidi ili heteropolisaharidi.

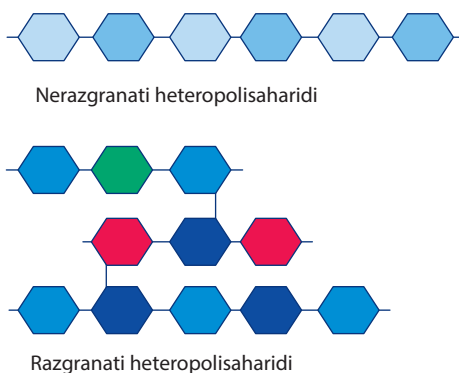
- Homopolisaharidi se sastoje od samo jednog šećera D-glukoze ili D-fruktoze i čine tri podskupine:
- α-D-glukani, koji se sastoje od α-1-6/1-3 vezanih glukoznih rezidua koje se granaju na poziciji 3 (dekstran, mutan, alteran), stvaraju ih određeni sojevi *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*
- β-D-glukani koji se sastoje od β-2-1 vezanih glukoznih rezidua, stvaraju ih određeni sojevi *Pediococcus* spp. i *Streptococcus* spp.
- β-D-fruktani koji se sastoje od β-2-6 vezane D-fruktoze koja se grana u β-2-1 poziciji (levan i inulin), stvaraju ih određeni sojevi *Streptococcus* spp.

Polimerni homopolisaharidni spojevi glukani (slika 2.58.) i fruktani (slika 2.59.) sintetiziraju se ekstracelularnim transglikolazama, a kao glicerol donator služe saharoza ili maltoza. Šećeri se međusobno povezuju α-glikozidnim vezama i β-glikozidnim vezama. Osim u sintezi homopolisaharida velikih molekularnih težina, aktivnošću transglikolazama sintetiziraju se i

homopolisaharidi malih molekularnih težina poput oligosaharida.

Heteropolisaharidi u različitim omjerima građeni su od tri do šest šećera (slika 2.60.). Šećeri D-galaktoza, D-glukoza ili D-ramnoza gotovo su uvijek prisutni u heteropolisaharidima. Istovremeno, za neke bakterijske sojeve u sastavu heteropolisaharida karakteristični su šećeri D-manoza, N-acetilgalaktozamin, N-acetilglukozamin ili glukuronska kiselina. Heteropolisaharidi nastaju polimerizacijom ponavljajućih šećera u nizu, čiju polimerizaciju kataliziraju specifični membranski enzimi glikoziltransferaze. Enzimi i proteini uključeni u biosintezu i sekreciju EPS povezani su s genetičkom organizacijom bakterijske stanice. U genetičku organizaciju uključeni su specifični *eps* geni i geni uključeni u nukleotidnu biosintezu šećera. Na slici 2.61. shematski je prikazana biosinteza heteropolisaharida koji nastaju konverzijom laktoze, galaktoze i glukoze u bakterijskoj stanici.

U slučajevima ako se sojevi bakterija mliječne kiseline koji imaju sposobnost tvorbe EPS koriste u sastavu kultura, koncentracija stvorenog EPS u fermentiranom mlijeku ovisna je o nizu čimbenika. Prvenstveno ona je određena izvorima ugljika i dušika u mlijeku i uvjetima za bakterijski rast poput temperature, pH i



Slika 2.6o.

Shematski prikaz heteropolisaharida.

Detalji: različita boja predstavlja različite monosaharide.
(CC BY-SA 3,0.)

vremena inkubacije. Zbog toga postoje značajne razlike u tvorbi EPS koje nisu vezane samo uz vrstu BMK, već su one rezultat i stupnja odstupanja od optimalnih uvjeta bakterijskog rasta. Prosječne koncentracije EPS u fermentiranom mlijeku, neovisno o vrsti BMK i uvjetima inkubacije, su između 45 i 350 mg L⁻¹. Međutim, kada bakterija raste u optimalnim uvjetima, koncentracije stvorenog EPS prosječno su između 150 i 600 mg L⁻¹. Pojedinačno, *S. thermophilus* u optimalnim uvjetima može EPS tvoriti u količini između 890 i 1100 mg L⁻¹, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* do 150 mg L⁻¹, a bakterijski soj *L. sakei*-1 i 1400 mg L⁻¹. Ovisno o temperaturi rasta, mezofilne BMK općenito tvore maksimalnu koncentraciju EPS na niskim temperaturama (~ 10 °C), a termofilne BMK na svojim optimalnim temperaturama rasta. Optimalni uvjeti za tvorbu EPS određeni su i bakterijskim sastavom kulture i fazom mikrobnog rasta. Tako je za jogurtnu kulturu (CH 15) maksimalna tvorba EPS na temperaturi od 35 °C a bakterije su u svojoj eksponencijalnoj fazi rasta. Prolongirano vrijeme i visoke temperature fermentacije često su uzrok slabije bakterijske tvorbe EPS, što se pripisuje preusmjeravanju bakterijskog metabolizma na jaču glikolaznu aktivnosti.

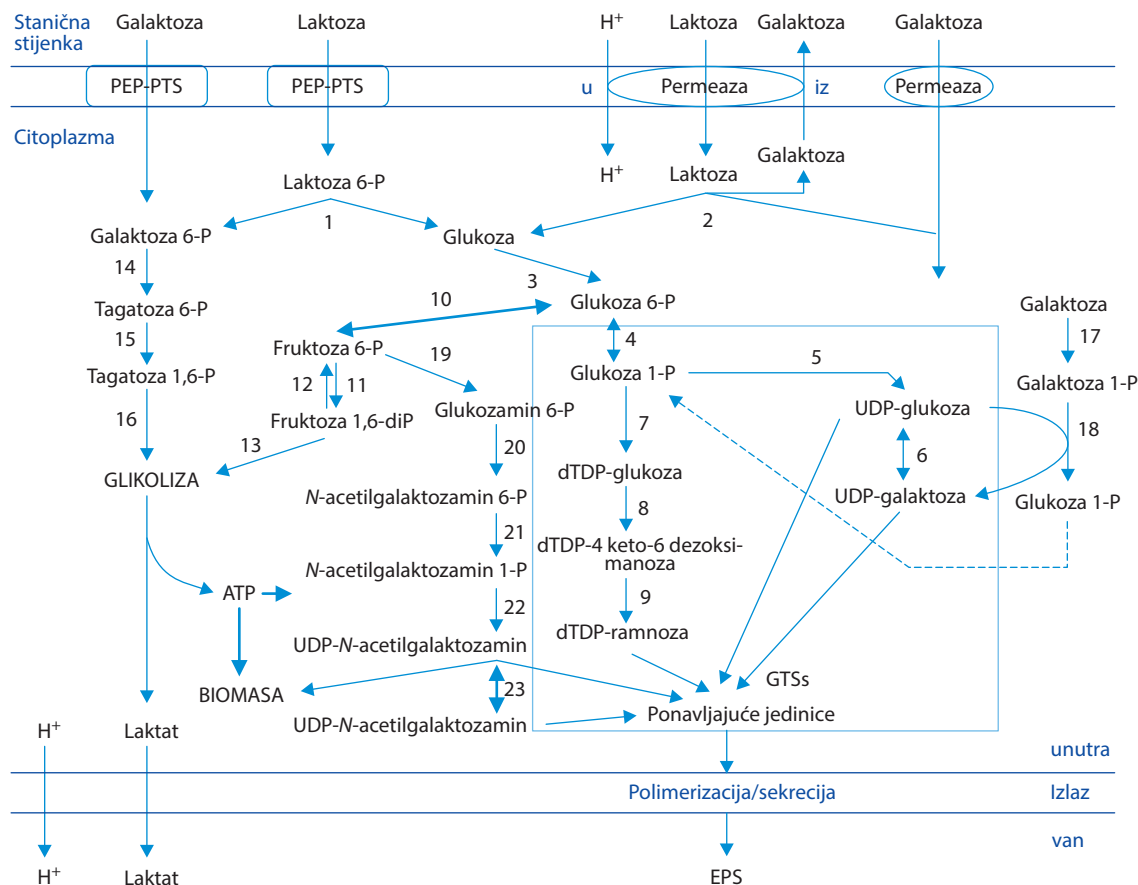
Važno je istaknuti i činjenicu da se koncentracija stvorenog EPS mijenja od dana do dana čak i u istim

uvjetima kultivacije. Za bakteriju *S. thermophilus* u istim uzgojnim uvjetima utvrđena je količina stvorenog EPS ovisno o danu od 45 do 350 mg L⁻¹. S druge strane tvorba EPS za mezofilne vrste BMK isključivo je plazmidno kodirana i predstavlja nestabilno svojstvo. Suprotno, termofilne vrste BMK općenito ne sadrže plazmide za tvorbu EPS, te je njihova tvorba u fermentacijskom mlijeku prilično stabilno svojstvo bez obzira na njihovu stvarno stvorenu koncentraciju.

Na tržištu postoje mnoge mezofilne i termofilne kulture koje u svom sastavu sadrže sojeve vrsta BMK ili bifidobakterija koji imaju sposobnost tvorbe EPS. U praksi, te se kulture često nazivaju - viskozne kulture. Korištenje viskoznih kultura je primarno vezano za proizvodnju kefira i gustih viskoznih skandinavskih kiselih mlijeka (taette, filmjöl, viili). Kultura za viili sastoji se od mezofilnih laktokoka (*L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis*) koji uzrokuju sluzavu teksturu, i laktokoka i *Leuconostoc* spp. koje su odgovorne za njegovu specifičnu aromu. Kefir koji se proizvodi iz kefirnih zrna na tradicionalan način EPS (+) sojevi laktokoka i laktobacila a osobito *L. kefiranofaciens* zaslužni su za formiranje karakterističnog proteinskog matriksa tijekom fermentacije. U tehnologiji proizvodnje ostalih fermentiranih mlijeka svojstvo vrsta BMK i bifidobakterija za stvaranje EPS koristi se za:

- poboljšanje viskoziteta, modifikaciju teksture i konzistencije
- sprječavanje sinereze
- smanjenje mehaničkih oštećenja koja se događaju pumpanjem, miješanjem s voćem i aromama i punjenjem proizvoda
- zamjenu stabilizatora.

Tijekom fermentacije EPS (+) sojevi modificiraju mikrostrukturu gela fermentiranog mlijeka tako da se bakterijske stanice mrežasto prihvaćaju za proteinski matriks. U usporedbi s istom vrstom fermentiranog mlijeka koje ih ne sadrži, proizvod ima veću viskoznost i "sluzaviji" izgled i manju predispoziciju za sinerezu (izdvajanja sirutke). Međutim EPS (+) sojevi koji EPS formiraju u formi kapsule (glikokalijs) tvore manje "sluzavu" teksturu od sojeva koji



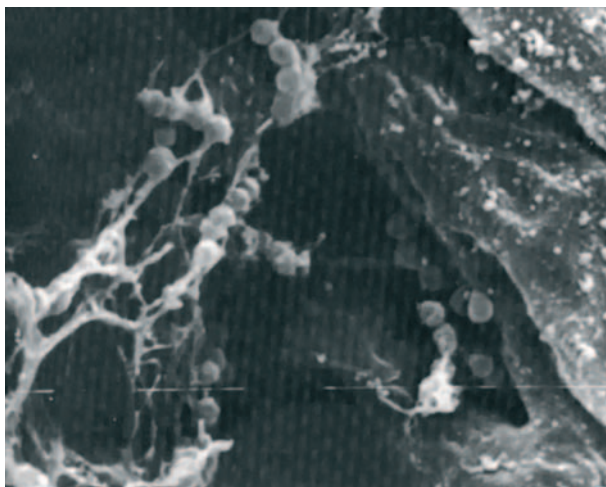
Slika 2.61.

Shematski prikaz biosinteze heteropolisaharida koji nastaju konverzijom laktoze, galaktoze i glukoze u bakterijskoj stanici bakterija mliječne kiseline.

Detalji: enzimi, 1 fosfo- β -galaktozidaza, 2 β -galaktozidaza, 3 glukokinaza, 4 fosfoglukomutaza, 5 Leloirov put, 6 Tagatozni put, 7 UDP-fosforilaza, 8 dTDP-glukoza pirofosforilaza, 9 epimeraza reduktaza, 10 dTDP-glukoza, 4,6 dehidrataza, 11 dTDP-manoza sintetički enzimski sustav, 12 glikoziltransferaza, 13 UDP-glukoza dehidrogenaza, 15 glukozamin-P izomeraza, 16 manozna-6P izomeraza, 17 N-acetilglukozamin-P deacetilaza, 18 fosfomanozamutaza, 19 UDP-N-acetilglukozamin pirofosforilaza, 20 GDP-manoza-4,6 dehidrataza. (De Vuyst i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)

tvore difuznu formu EPS. Za ta fermentirana mlijeka utvrđena je slabija čvrstoća gel-strukture budući da je početna čvrstoća zbog protein-protein interakcija narušena molekulama EPS koje se smještaju između njih. Viskozne kulture, vrlo se često koriste za proizvodnju tekućih i pitkih varijanti jogurta gdje zamjenjuju stabilizator. U proizvodnji tih varijanti jogurta

formirani gel prije hlađenja i punjenja ili dodatka voća se mehanički miješanjem razbija, a ako nisu dodani stabilizatori (~ 0,7 %) to uzrokuje pojačanu sinerezu. Dodatno, pitke varijante jogurta obično imaju i niži udjel suhe tvari posljedica koje su općenito njegova slabija reološka svojstva. Poput stabilizatora korištenje viskozne kulture u proizvodnji tih varijanti



Slika 2.62.

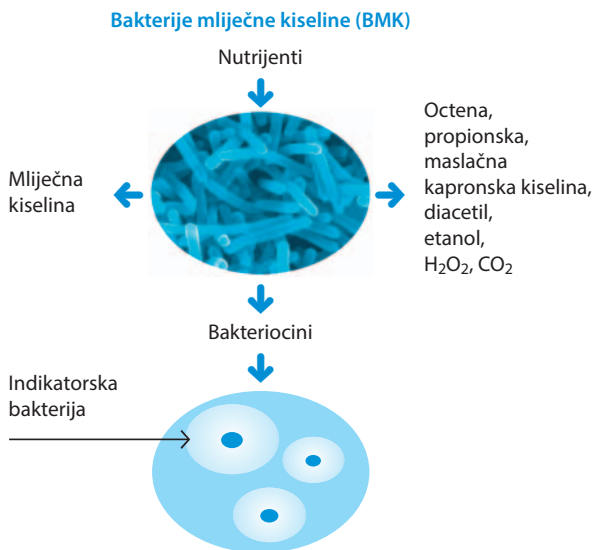
Mikroskopska slika interakcije između EPS (+) sojeva bakterije *S. thermophilus* i proteinske mreže jogurta. (Shah, 2003., s dopuštanjem FIL-IDF-a.)

jogurta u znatnoj mjeri stabilizira njihovu gel-strukturu. Viskozne kulture iz sličnih razloga koriste se i za proizvodnju jogurta s kremastom teksturom i jogurte s niskim udjelom mliječne masti (< 2 %) ili one proizvedene od potpuno obranog mlijeka (< 0,05). Fermentacijom stvoreni EPS daju tim proizvodima punu (gušću) teksturu i viši viskozitet, poboljšavaju glatkoću, omogućavaju željene karakteristike teksture, sprječavaju pucanje gel-strukture i izdvajanje sirutke. Interakciju između bakterijskih stanica i proteinskog matriksa gel-strukture jogurta prikazuje slika 2.62.

2.5.6.

Stvaranje bakteriocina

Bakteriocini su ribosomalno sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koje stvaraju mnoge bakterijske vrste. Za bakterijsku stanicu koja ih tvori imaju prvenstveno zaštitnu funkciju u mediju s drugim



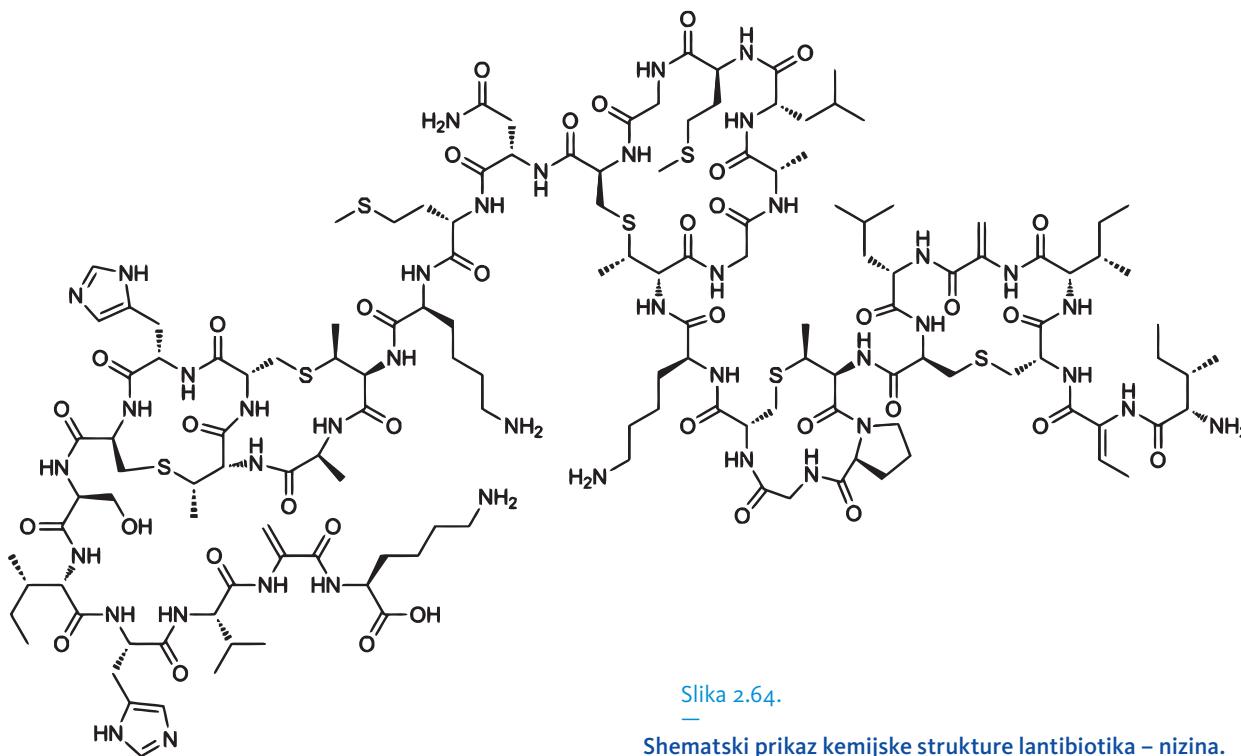
Slika 2.63.

Antimikrobni spojevi bakterija mliječne kiseline.

Detalji: BMK- bakterije mliječne kiseline; bakterijski sojevi koje imaju sposobnost tvorbe bakteriocina identificiraju se procjenom zone inhibicije prema bakteriocin senzitivnoj indikatorskoj bakteriji.

bakterijskim vrstama koje se natječu za isti izvor hranjivih tvari. Zbog toga u većini slučajeva bakteriocini imaju inhibicijsko djelovanje jedino prema blisko srodnim vrstama. Odnosno, smatra se da oni bakterijskoj stanici služe za preživljavanje u kompeticiji s blisko srodnim vrstama unutar specifičnoga ekološkog staništa. Međutim, određeni bakterijski sojevi imaju i sposobnost stvaraju bakteriocina širokog inhibicijskog spektra djelovanja prema različitim mikrobnim vrstama.

Poput mnogih bakterijskih vrsta, bakterije mliječne kiseline (BMK) i bifidobakterije, osim metaboličkih spojeva kao što su organske kiseline, vodikov peroksid, diacetil, acetoin, imaju i sposobnost stvaranja bakteriocina, koji zajedno imaju jako antimikrobno djelovanje prema različitim mikrobnim vrstama. Za ilustraciju, na slici 2.63. prikazani su antimikrobni spojevi koje tvore bakterije mliječne kiseline i način



Slika 2.64.

Schematski prikaz kemijske strukture lantibiotika – nizina.

njihova antimikrobnog djelovanja na određene bakterijske vrste.

Do danas je otkriven i opisan velik broj različitih bakteriocina koje sintetiziraju BMK i bifidobakterije. Prema kemijskoj strukturi, ti bakteriocini svrstani su u tri skupine. Prvu skupinu čine termostabilni lantibiotici (riječ derivirana iz antibiotika koji sadrži *lantio-tin*) kao što su nizin, subtilin ili epidermin. Kemijski, lantibiotici su mali peptidi veličine 5 kDa - 10 kDa (19 - 38 aminokiselinska ostatka) koji sadrže jedan ili oba modificirana aminokiselinska ostatka lantionina. Najpoznatiji lantibiotik koji se u svojstvu sigurnog konzervansa priznatog od FAO/WHO organizacija (engl. *Food and Agriculture Organization/ World Health Organization*) od 1969. godine koristi u prehrambenoj industriji je nizin. U svojstvu biokonzervansa nizin kojem je dodijeljena oznaka E234 je uključen i na europsku listu dopuštenih prehrambenih aditiva. Tako

se, između ostalog, nizin od 1988. godine uspješno koristi u proizvodnji sireva, mliječnih deserta i napitaka, i u proizvodnji konzerviranog povrća. Nizin ima širok spektar inhibicijskog djelovanja prema mnogobrojnim gram-pozitivnim bakterijama uzročnicima kvarenja, uključivo i nekim sporotvornim vrstama, određenim vrstama patogenih bakterija, ali i mnogim vrstama BMK. Tvore ga određeni sojevi *L. lactis* subsp. *lactis*, a sastavljen je od 34 aminokiselinska ostatka (slika 2.64.). Drugu skupinu bakteriocina čini heterogena skupina malih termostabilnih peptida (< 10 kDa). Prema svojoj kemijskoj strukturi i posljedično tome bakteriocidnom djelovanju prema drugim bakterijskim vrstama, oni su dalje podijeljeni u tri podskupine (II A, II B i II C). U podskupinu II A pripadaju antilisterijalni - pediocin bakteriocini: pediocin, enterocin i sakacin. Sposobne su ih tvoriti mnoge vrste BMK, primjerice *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp.,

Lactobacillus spp. i *E. faecium*. Ti bakteriocini imaju posebno jaki antibakterijski učinak na vrste unutar roda *Listeria* i nešto slabije baktericidno djelovanje na *C. perfringens*, *C. botulinum*, *S. aureus*. Istodobno oni ne pokazuju antagonizam prema bakterijama vrsta *Lactococcus* i *Leuconostoc*. Podskupinu II B čine dva peptida, plantaricin i laktacin F koji imaju simultano baktericidno djelovanje koje uključuje slabljenje potencijala membrane i smanjenje intercelularne koncentracije ATP prema određenim bakterijskim vrstama. Treću podskupinu (II C) čine bakteriocini koji imaju kovalentnu vezu između C i N terminalnog završetka peptidnog lanca i zbog toga imaju cikličnu strukturu. Predstavnici te skupine su enterocin AS-48, cirkularin A i reutericiklin. Oni su veliki termolabilni peptidi (> 30 kDa) koje u usporedbi s ostalim bakteriocinima karakterizira drugačiji mehanizam baktericidnog djelovanja. Njihov N - terminalni kraj peptidnog lanca je homologan bilo kojoj endopeptidazi uključenoj u sintezu bakterijske stanične stijenke a C-terminalnim krajem prepoznaju ciljanu bakterijsku stanicu. Zbog toga se njihovo baktericidno djelovanje prema određenim bakterijskim vrstama manifestira lizom bakterijske stanice.

Otkriće i opis bakteriocina koje stvaraju vrste BMK i bifidobakterije omogućilo je razvitak i proizvodnju zaštitnih ili protektivnih kultura. One se u posljednjih nekoliko godina u svojstvu biokonzervansa uspješno koriste u proizvodnji različitih mliječnih proizvoda. Funkcija je tih kultura zaustavljanje rasta i razmnožavanja bakterija uzročnika kvarenja i patogenih bakterija uz istovremeno zadržavanje nepromijenjenih prirodnih svojstava proizvoda. Fiziološki, kako se pretpostavlja, ti bakteriocini potencijalno mogu u visokoj koncentraciji biti prisutni i u određenim dijelovima crijeva čovjeka i imati nespecifično probiotičko djelovanje. Studije *in vitro* potvrdile su da stvaranje bakteriocina aktivnošću bakterija iz sastava protektivnih kultura može pridonijeti probiotičkoj funkcionalnosti intestinalnih vrsta BMK i bifidobakterija. Tako se pretpostavlja da selektivni nespecifični spektar inhibicijskog djelovanja bakteriocina, omogućava moduliranje gastrointestinalne mikrobne populacije, osobito preko inhibicije rasta i razmnožavanja intestinalnih patogenih bakterija. Osim toga, stvaranje bakteriocina može pridonijeti i potencijalnim antikancerogenim svojstvima intestinalnih bakterija, uzevši u obzir da neke od njih iskazuju inhibitornu aktivnost prema promijenjenim humanim stanicama.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija

3 Mikrobne kulture

- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Mikrobne kulture

Uvod

Posljednjih desetak godina mikrobne kulture koje se koriste u proizvodnji fermentirane hrane direktno su ili indirektno definirane različitim EU propisima. Prva autorizirana lista s dokumentiranim opisom mikroorganizama koji se smiju koristiti u sastavu kultura objavljena je 2002. godine (EC Dokument no. 178/2002). Dokument je sastavljen na temelju dogovora Međunarodne mljekarske federacije [engl. *International Dairy Federation (IDF)*] i europskoga službenog tijela *European Food and Feed Cultures Association (EFSA)*. Također, od 2007. godine EFSA je utemeljila tijelo *Qualified Presumption of Safety (QPS)*, koje procjenjuje sigurnost korištenja mikroorganizma prije njegove komercijalne upotrebe na tržištu. Sistem QPS kontrole temelji se na usklađivanju činjenica u procjeni sigurnosti mikroorganizama između različitih EFSA znanstvenih arbitražnih vijeća. Procjena mikrobne vrste koju obavlja QPS prvenstveno se temelji na kvalifikaciji njezinih specifičnih karakteristika, poput odsutnosti prenosive antibiotik rezistencije, odsutnosti toksičke aktivnosti, ili odsutnosti površinski aktivnih tvari. Odabrane vrste mikroorganizama QPS predlaže EFSA-i na službenu potvrdu o sigurnosti njihove upotrebe. Inače, QPS je tijelo nadležno za hranu i prehrambene aditive, prehrambene enzime i proizvode za zaštitu bilja. Istovremeno, sigurnost

određene mikrobne vrste provjerava se regularnim sustavom znanstvenih kriterija koje prihvaća organizacija *Microbial Food Cultures (MFC)*.

Trenutno su s kompletno potrebnom dokumentacijom za sigurno korištenje u proizvodnji fermentirane hrane na popisu EFSE 82 bakterijske vrste i 31 vrsta kvasaca i plijesni. Radni popis MFC sadrži 195 bakterijskih i 69 vrsta kvasaca i plijesni koje nakon službeno provedene procedure potencijalno mogu dobiti dopuštenje od EFSE za komercijalno korištenje u proizvodnji fermentirane hrane.

Uspješna proizvodnja kultura sastavljenih od mikrobnih vrsta odobrenih od EFSE direktno je povezana s korištenom procesnom tehnologijom proizvođača kultura. Međutim, o izboru kulture, načinu pripreme, pohrane i načinu njezine aplikacije u mlijeko odlučuje svaki pojedinačni proizvođač.

U ovom poglavlju knjige za standardizaciju proizvodnje i postizanje željene kvalitete fermentiranog mlijeka detaljno su opisane osobine i svojstva mezofilne, termofilne, probiotičke i funkcionalne kulture koje se komercijalno koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Ovo poglavlje knjige sadrži i opis potrebne kontrole i načine sprječavanja bakteriofagne infekcije kultura.



3.1.

—

Definicija

Mljekarska mikrobna kultura, ili jednostavno kultura, definira se kao medij koji sadrži specifične neškodljive aktivne mikroorganizme (bakterije, kvasce, plijesni) koji se inokuliraju u mlijeko radi proizvodnje točno određenoga fermentiranoga mliječnog proizvoda. U kontroliranim uvjetima ti mikroorganizmi osiguravaju fermentiranim mliječnim proizvodima karakteristična svojstva poput kiselosti (pH), okusa, arome i konzistencije. Metabolizam mikrobnih vrsta u sastavu kultura mora osigurati mikrobiološki siguran proizvod s točno određenim organoleptičkim i strukturnim svojstvima na učinkovit i ponovljiv način.

3.2.

—

Sastav kultura

Kulture za proizvodnju fermentiranih mlijeka najčešće čine sojevi vrsta bakterija mliječne kiseline (BMK): *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp. i bakterijski sojevi *Bifidobacterium* spp. U proizvodnji fermentiranih mlijeka, osim "klasičnih" BMK, za sastav kultura koriste se i bakterijski sojevi vrsta *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*, koji na humani organizam imaju probiotičko djelovanje. Rjeđe kultura za proizvodnju fermentiranih mlijeka sadrži kvasce ili plijesni. U formi kultura koje se komercijalno koriste dostupni su jedino kvasci *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Kluyveromyces* spp. i *Debaromyces* spp. i plijesan *Geotrichum candidum*. Sadrži li kultura samo jednu mikrobnu vrstu naziva se monokultura, a ona sastavljena od dviju ili više različitih mikrobnih vrsta naziva se mješovita kultura. Prema optimalnoj temperaturi rasta i razmnožavanja mikrobnih vrsta u sastavu kulture, dijele se u dvije osnovne skupine:

- mezofilne kulture
- termofilne kulture.

Bakterijski sojevi vrsta BMK i bifidobakterija u sastavu kultura za proizvodnju fermentiranih mlijeka najčešće se odabiru prema sljedećim svojstvima:

- brzini i omjeru rasta i razmnožavanja u mlijeku
- sposobnosti stvaranja mliječne kiseline, aromatskih spojeva ili CO₂
- sposobnosti poboljšanja viskoznosti
- sposobnosti rasta i razmnožavanja s drugim bakterijskim sojevima u kulturi
- otpornosti na bakteriofage
- sposobnosti preživljavanja tijekom pripreme kultura, konzerviranja, pohrane i distribucije proizvoda.

3.3.

—

Vrste kultura

Vrsta i oblik kulture koja se koristi u proizvodnji fermentiranog mlijeka u konačnici određuje njegovu ukupnu kvalitetu, osobine i organoleptička svojstva. Neovisno o sastavu mikrobnih vrsta koje sadrže, one pripadaju skupini tradicionalnih ili skupini definiranih (selekcioniranih) kultura. Za proizvodnju određene vrste fermentiranih mlijeka kulture jedne i druge skupine imaju važno specifično i praktično značenje.

Tradicionalne za razliku od definiranih kultura sastoje se od nepotpuno opisanih bakterijskih vrsta a mogu biti prirodne ili mješovite kulture. Prirodne-tradicionalne kulture klasificiraju se na temelju vrste medija u kojem se pripremaju (mlijeko, sirutka, sirutka sa sirilom). Ili se one, prema temperaturi inkubacije, klasificiraju u termofilne (40 - 52 °C) ili mezofilne (25 - 30 °C) prirodne-tradicionalne kulture. Zajedničke su karakteristike prirodnih-tradicionalnih kultura:

- sastav kultura je varijabilan i slabo definiran
- moraju se pripremati svaki dan (u mljekari)
- prisutan je antagonizam između bakterijskih sojeva
- mogu biti neosjetljive na bakteriofage ili ih proizvoditi.

Tradicionalne mješovite kulture slično kao i prirodne-tradicionalne kulture sastavljene su od nedefiniranih bakterijskih sojeva različitih vrsta BMK.

Od prirodnih-tradicionalnih kultura razlikuju se prema načinu pripreme kulture koja nije određena specifičnim medijem. Priređuju se dnevno u mlijekama bez posebne pažnje na bakteriofagnu infekciju. Poput prirodnih - tradicionalnih kultura prema optimalnoj temperaturi inkubacije potrebnoj za bakterijsku kultivaciju one mogu biti mezofilne (~ 28 °C) ili termofilne kulture (~ 42 °C). Tradicionalna mješovita mezofilna kultura u proizvodnji fermentiranih mlijeka još se uvijek u velikom postotku koristi u zapadnoj i istočnoj Europi, a osobito u Skandinaviji i Nizozemskoj. Potrebno svakodnevno precjepeljivanje kulture može u određenim okolnostima promijeniti njen mikrobnii sastav, a posljedično tome i osobine fermentiranog mlijeka. Na sreću, napretkom tehnologije danas je omogućena znatno bolja i učinkovitija kontrola tradicionalnih mješovitih kultura. Zato su njezina proizvodna svojstva u odnosu na prijašnja vremena znatno poboljšana. Kultura se uglavnom sastoji od sojeva vrsta *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc*. Posljednjih godina, zbog svoje kompleksnosti, mješovite tradicionalne kulture postale su predmetom brojnih znanstvenih istraživanja.

Za razliku od tradicionalnih mješovitih mezofilnih kultura, u proizvodnji fermentiranih mlijeka tradicionalne - mješovite termofilne kulture manje se koriste. Njihovo korištenje prvenstveno ima značenje u proizvodnji bugarskog kiselog mlijeka.

Definirane ili selekcionirane kulture sadrže jedan ili više identificiranih i opisanih bakterijskih sojeva, najčešće vrsta bakterija mliječne kiseline ili bifidobakterija sa specifičnim, ali poznatim svojstvima. Osobine i svojstva selekcioniranih kultura koja su temeljena na točno definiranim karakteristikama određenih bakterijskih sojeva čine ih nezamjenjivim u modernoj proizvodnji fermentiranih mlijeka. Drugim riječima, uspjeh fermentacije mlijeka ultimativno određuju genetski stabilni bakterijski sojevi vrsta BMK i bifidobakterija koji na učinkovit i ponovljiv način osiguravaju tvorbu: (i) točno određene koncentracije mliječne kiseline, (ii) karakterističnih spojeva okusa i mirisa, (iii) spojeva za povećanje funkcionalnih svojstava proizvoda i (iv) pokazuju rezistentnost na

bakteriofag infekciju. U praksi se za definiranu kulturu često koristi i naziv - specifična poželjna svojstvena kultura, budući da označava svojstva koja su specifična za točno određenu vrstu fermentiranog mlijeka. Poželjna svojstva definirane kulture postižu se selekcijom točno određenih bakterijskih sojeva temeljenoj na specifičnim ili po potrebi nespecifičnim kriterijima. Specifični su selekcijski kriteriji za izbor bakterijskih sojeva:

- omjer stvaranja mliječne kiseline
- kapacitet za tvorbu polisaharida
- limitirana proteoliza
- sposobnost stvaranja aromatskih komponenti.

Nespecifični kriteriji za izbor bakterijskih sojeva u sastav definirane kulture uključuju i bakterijsku sposobnost tvorbe spojeva koji mogu povećati nutritivnu ili fiziološku vrijednost proizvoda.

Strategija za dobivanje stabilne definirane kulture sa željenim svojstvima primarno uključuje korištenje molekularno-genetičkih metoda za opis karakteristika određenih bakterijskih sojeva. U karakterizaciji sojeva bakterijskih vrsta BMK i bifidobakterija molekularno-genetičke metode počele su se koristiti posljednjih dvadesetak godina, ali su ostvareni rezultati zapanjujući. Upravo zbog tih ostvarenih rezultata danas je bez svake sumnje moguće u odnosu na prijašnje vrijeme bolje i uspješnije sastaviti kulturu s poželjnim definiranim svojstvima. Međutim, važno je istaknuti da selekcija sojeva od mikrobiologa osim znanja iz područja molekularne mikrobiologije zahtijeva i specifična znanja iz područja bakteriologije, a osobito onog o načinu ponašanja pojedinačnih bakterijskih vrsta u zajednici s drugim bakterijskim vrstama. Tako kombinacija sojeva iz mješovite kulture laktokoka može u vrijeme rasta i razmnožavanja u mlijeku pokazati različitu interakciju čiji učinak varira od znatne stimulacije do inhibicije. Ili drugi primjer, u mješovitim kulturama bakterijski soj koji je izraziti tvorac bakteriocina može postati dominantnim sojem i negativno utjecati na mikrobnii ravnotežu u kulturi. Drugim riječima, neželjena izrazita dominantnost samo jednog soja u definiranoj kulturi može spriječiti

dobivanje proizvoda sa željenim tipičnim svojstvima. Zbog toga, svaka mješovita kultura koja se koristi u mliječnoj fermentaciji mora prethodno biti testirana na kompatibilnost zajedničkog rasta i razmnožavanja sojeva u određenom simbiotskom odnosu.

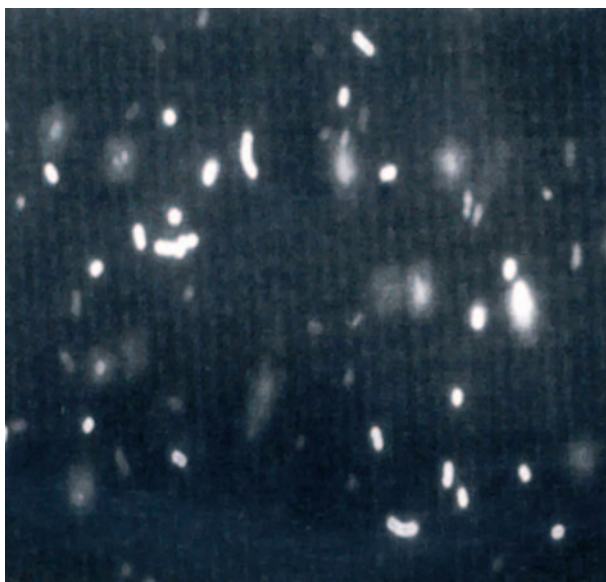
Uspjeh svake mliječne fermentacije primarno je određen omjerom i brzinom stvaranja mliječne kiseline u mlijeku. U selekciji sojeva za sastav definiranih ili selekcioniranih kultura biraju se jedino oni sojevi koji mliječnu kiselinu stvaraju brzo i u dovoljnoj koncentraciji. Brzim sojevima u mezofilnim kulturama smatraju se oni koji za 16 ili manje sati mogu koagulirati obrano mlijeko. Sporim se sojevima smatraju oni kojima je za koagulaciju obranog mlijeka potrebno više od 16 sati. Važno je istaknuti i činjenicu da su u mezofilnoj kulturi sastavljenoj od laktokoka, spori sojevi prirodna spontana posljedica dužeg korištenja kulture. Vrlo brzo nakon početka korištenja u kulturi se pojavljuje najmanje 2 % sporih sojeva *L. lactis* subsp. *cremoris* što je aproksimativno 10.000 puta više od 1 u 10⁶ spontanih mutacija. Tako nakon otprilike 100 precepljivanja proteinaza negativne (Prt-) varijante čine u kulturi 90 - 98 % ukupne populacije, a acidifikacija mlijeka je izrazito spora. Proteinaza pozitivni sojevi (Prt+) laktokoka esencijalni su za proteolitičku razgradnju proteina mlijeka koja je u uskoj korelaciji s njihovom sposobnošću stvaranja mliječne kiseline. Pojava (Prt-) sojeva u kulturi objašnjava se spontanim gubitkom plazmida koji kodira proteolizu. Odnosno, pretpostavlja se da bakterijska stanica odbacuje plazmid kada joj više nije potreban. Osim toga, važno je istaknuti da je istovremeno selekcija sojeva na točno određene osobine smanjila broj raspoloživih sojeva koji čine sastav mezofilne kulture. Zbog toga je za uspješnu fermentaciju potrebna česta rotacija bakterijskih sojeva u kulturi otežana.

Mješovite kulture koje se sastoje od različitih vrsta BMK ili bifidobakterija izražavaju između ostalog i populacijsku dinamiku, koja također uvjetuje promjene u sastavu kulture. Neke od interakcija između različitih bakterijskih vrsta u kulturi brzo se događaju. Stvaranje nizina (bakteriocin) više od jednog soja u kulturi posljedično dovodi do značajnih promjena

u mikrobnoj populaciji. Ako su drugi sojevi iz sastava kulture osjetljivi na nizin, bakterijski soj tvorac nizina postaje dominantan. Sadrži li on poželjne osobine, ništa se nepoželjno neće dogoditi u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Suprotno, ako isti bakterijski soj svojim metabolizmom stvara gorke peptide, takva kultura postaje neprihvatljiva za korištenje. Također, kada je omjer tvorbe diacetila i acetaldehida u mješovitoj mezofilnoj kulturi za kiselo mlijeko niži od 4 : 1, kulturu treba izostaviti iz proizvodnje budući da će proizvod imati izražen okus po jogurtu.

Agglutinacija koja nastaje kao posljedica interakcije bakterija iz sastava kultura i aglutinina (lactenin-1 aglutin masne globule, lactenin-2 laktoperoksidaze, lactenin-3 prirodni imunoglobulin) mlijeka također negativno utječe na kvalitetu fermentiranih mlijeka. Posljedica te interakcije je nepoželjno formiranje dugih bakterijskih lanaca i nakupina koje su uzrok sporog stvaranja mliječne kiseline i inhibitornog djelovanja na bakterijske proteaze. Bakterijski sojevi Prt- u odnosu na Prt+ sojeve češće stvaraju duge lance, a sojevi rezistentni na aglutinaciju javljaju se u parovima i kraćim lancima i imaju jače izraženu proteolitičku aktivnost. Općenito, između podvrsta i biovara vrste *L. lactis* najmanju tendenciju aglutinaciji (takozvani teški koagulum) imaju biovar *diacetyllactis* sojevi, slijede subsp. *cremoris* sojevi, a najčešća je u subsp. *lactis* sojeva. Za izbjegavanje pogrešaka teksture fermentiranih mlijeka uzrokovane aglutinacijom, važno je između bakterijskih sojeva za sastav kulture izabrati one s manjom tendencijom nakupljanja.

Infekcija kulture bakteriofagima (fag) usporava fermentaciju i sigurno je najozbiljniji problem mliječne fermentacije. Analize bakteriofag neosjetljivih sojeva dovele su do otkrića i karakterizacije velikog broja genetskih sustava koji omogućavaju najbolju rezistentnost bakterijskih sojeva na fag infekciju. Dobrim načinom, pokazala se tehnika transfer konjugacije fag rezistentnih plazmida uzetih od sojeva fag neosjetljivih laktokoka. Smatra se da je najmanje djelomična inhibicija adsorpcije odgovorna za fag rezistentni fenotip. Na slici 3.1. prikazana je razlika između fag osjetljivih i fag neosjetljivih sojeva *Lactococcus lactis* inficiranih fluorescentno označenim bakteriofagom.



Slika 3.1.

L. lactis osjetljivi sojevi na fag infekciju (fluorescentna zona) i sojevi neosjetljivi na fag infekciju (bez fluorescentne zone). (Janzen i sur., 2003., s dopuštenjem FIL- IDF-a.)

Problem u selekciji sojeva poželjnih osobina unutar određenih vrsta BMK je u činjenici da su neka od najvažnijih tehnoloških svojstava, metabolizam laktoze, proteina, citrata i fag rezistentnost plazmidno kodirana. Istovremeno, ta su svojstva od iznimne ekonomske važnosti za mljekarsku industriju. Zbog toga ne iznenađuju brojna znanstvena istraživanja usmjerena prema molekularno genetičkim metodama koje mogu osigurati proizvodnju sojeva sa stabilnim osobinama. Genetičkom manipulacijom tako se nastoji inaktivirati neželjene bakterijske gene uz istovremenu stimulaciju ekspresije gena koji su odgovorni za željeni tijek izabrane fermentacije mlijeka.

Selekcionirana kultura s predvidivim svojstvima u izabranim fermentacijama prije svog komercijalnog korištenja, mora uz zdravstvene kriterije (ne smije pokazivati patogenu ili toksičnu aktivnost) udovoljiti i sljedećim tehnološkim kriterijima:

- imati dobru prilagodbu na različite proizvodne uvjete
- imati dobru sposobnost dominacije s kompetitivnom mikrobnom populacijom
- imati sposobnost brzog stvaranje mliječne kiseline u proizvodnom spremniku
- imati svojstvo za minimalno stvaranje kiseline u vrijeme pohrane i transporta
- imati sposobnost osiguranja preživljavanja organizama u proizvodu do vremena održivosti proizvoda na policama
- imati sposobnost osiguravanja tipičnog okusa, mirisa i teksture za točno određeno fermentirano mlijeko do vremena održivosti proizvoda na policama
- imati oblik koji se lagano može čuvati u proizvodnom okruženju.

Definirane kulture komercijalno proizvode renomirani proizvođači mikrobnih kultura. Obično se te kulture sastoje od jednog (monokultura), dvaju ili više različitih bakterijskih sojeva (mješovita kultura) određenih mikrobnih vrsta. Informacija o karakteristikama kulture dostupna je svim kupcima a točan mikrobnii sastav i omjer zastupljenosti pojedinih sojeva u kulturi proizvođačka je tajna. Prednost je tih kultura za proizvođače fermentiranih mlijeka u sljedećem:

- svaki bakterijski soj je proizveden u optimalnim kultivacijskim uvjetima (nutrijenti, kisik, pH, oksidoredukcijski potencijal, temperatura), i u načelu ne sadrži aditive za poboljšanje bakterijskog rasta i razmnožavanja koji se unose u mlijeko
- mogućnosti istovremenog miješanja različitih bakterijskih sojeva
- mogućnosti dodavanja probiotičkih sojeva u jogurt i druga fermentirana mlijeka
- mogućnosti unošenja mezofilne mikrobne populacije u jogurt radi modifikacije karakteristika proizvoda
- mogućnosti dodavanja samo bakterije *S. thermophilus* uz mezofilnu kulturu za povećanje viskoznosti proizvoda
- smanjenja mogućnosti bakteriofagne infekcije.

3.3.1.

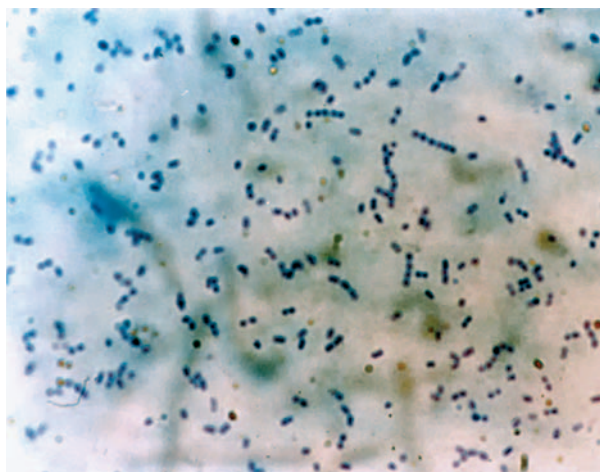
Mezofilna kultura

Selekcionirane i točno definirane mezofilne kulture koriste se u proizvodnji kiselog mlijeka, mlaćenice, većine skandinavskih fermentiranih mlijeka i kiselim mlijeku srodnih proizvoda. Odnosno one su prikladne za proizvodnju onih fermentiranih mlijeka gdje se koriste srednje temperature fermentacije (~ 20 - 30 °C). U najvećem broju slučajeva mezofilne kulture sastavljene su od kombinacija bakterijskih vrsta koje tvore kiseline i onih koje tvore aromatske spojeve. Bakterijske vrste sadržane u mezofilnim kulturama čine sljedeće bakterije mliječne kiseline:

- *L. lactis* subsp. *lactis*
- *L. lactis* subsp. *cremoris*
- *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Lc. lactis*
- *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris*
- *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Mliječnu kiselinu u većoj ili manjoj koncentraciji tvore svi bakterijski sojevi vrsta sadržanih u mezofilnoj kulturi. Aromatske spojeve (diacetil, acetaldehid, acetoin, 2,3-butilendiol, CO₂) u većim koncentracijama tvore jedino sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. Dogovorno, prema bakterijskoj sposobnosti fermentacije citrata, mezofilna kultura označava se slovima "O", "L", "D" ili "LD":

- "O" kultura sadrži *L. lactis* subsp. *cremoris* i Cit - negativne sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* koji nemaju sposobnost fermentacije citrata
- "L" kultura sadrži Cit - negativne sojeve *L. lactis* subsp. *lactis*, i Cit+ sojeve *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* i Cit+ sojeve *Lc. lactis* koji imaju sposobnost fermentacije citrata
- "D" kultura uz *L. lactis* subsp. *cremoris* i Cit - negativne sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* sadrži i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* sojeve koji imaju sposobnost fermentacije citrata



Slika 3.2

Karakterističan izgled mezofilne mješovite kulture sastavljene od bakterijskih sojeva *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.

- "LD" kultura uz *L. lactis* subsp. *cremoris* ili *L. lactis* subsp. *lactis* sojeve sadrži i sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i Cit+ sojeve *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* koji imaju sposobnost fermentacije citrata.

Uspjeh fermentacije u proizvodnji fermentiranih mlijeka gdje se koristi mezofilna kultura primarno je određen omjerom između sojeva koji stvaraju mliječnu kiselinu i takozvanih aromatskih sojeva. Puna aroma primjerice kiselog mlijeka po diacetilu (2 - 5 mg/kg) postiže se kada kultura u svom sastavu sadrži približno 20 % "aromatskih bakterija". Istovremeno poželjni omjer između aromatskih komponenti diacetila i acetaldehid u kiselim mlijeku je od 4 : 1 do 8 : 1. Suprotno, kada omjer između sojeva koji stvaraju mliječnu kiselinu i aromatskih sojeva nije izbalansiran koncentracije aromatskih komponenti se mijenjaju. Tako kiselo mlijeko može sadržavati ili prenisku

Tablica 3.1.

**Tehnološke karakteristike
L. lactis podvrsta i biovara**

 (prilagođeno prema
Dellagliju i sur., 1992.)

Podvrsta/biovar	Tehnološke karakteristike	Reakcija
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,5 – 0,7 %
	Izomer mliječne kiseline	L (+)
	Proteolitička aktivnost	+
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (male konc., acetaldehid, aceton, diacetil)
	Tvorba plina	–
	Tvorba EPS	+ (određeni sojevi)
	Tvorba alkohola	± (etanol)
	Tvorba H ₂ O ₂	+
	Tvorba vitamina	nepoznato
	Optimalna temperatura rasta	28 – 31 °C
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,5 – 0,7 %
	Izomer mliječne kiseline	L (+)
	Proteolitička aktivnost	+
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (male konc., acetaldehid, aceton, diacetil)
	Tvorba plina	–
	Tvorba EPS	+ (određeni sojevi)
	Tvorba alkohola	± (etanol u tragovima)
	Tvorba H ₂ O ₂	+
	Tvorba vitamina	nepoznato
	Optimalna temperatura rasta	22 °C
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,3 – 0,6 %
	Izomer mliječne kiseline	L (+)
	Proteolitička aktivnost	+
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (visoke konc., acetaldehid, acetoin, aceton, diacetil)
	Tvorba plina	+ (CO ₂)
	Tvorba EPS	±
	Tvorba alkohola	+ (etanol)
	Tvorba H ₂ O ₂	+
	Tvorba vitamina	nepoznato
	Optimalna temperatura rasta	28 °C

koncentraciju acetila i imati neizražen okus ili previsoku koncentraciju acetaldehida (> 1 mg/kg) i imati okus po jogurtu. U praksi se za veću koncentraciju diacetila u proizvodu preporučuje dodati citrat u mlijeko, ili u kulturi zamijeniti sojeve *Leuconostoc* spp.

sa sojevima *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. U slučajevima ako je koncentracija acetaldehida previsoka preporučuje se u kulturi zamijeniti sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* sa sojevima *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris*.

Tablica 3.2.

**Tehnološke karakteristike
Leuconostoc vrsta i
podvrsta**

(prilagođeno prema
Dellagliu i sur., 1992.)

Vrsta/podvrsta

Tehnološke karakteristike

Reakcija

<i>Lc. lactis</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,2 – 0,4 %
	Izomer mliječne kiseline	D (-)
	Tvorba octene kiseline	±
	Proteolitička aktivnost	± (slaba)
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)
	Tvorba aromatskih spojeva	± (niske konc. acetoin, diacetil)
	Tvorba plina	-
	Tvorba EPS	-
	Tvorba alkohola	± (etanol)
	Tvorba H ₂ O ₂	± (slaba)
	Tvorba vitamina	nepoznato
	Optimalna temperatura rasta	20 – 25 °C
	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Tvorba mliječne kiseline
Izomer mliječne kiseline		D (-)
Tvorba octene kiseline		-
Proteolitička aktivnost		± (slaba)
Lipolitička aktivnost		± (slaba)
Tvorba aromatskih spojeva		+ (acetoin, diacetil)
Tvorba plina		± (CO ₂)
Tvorba EPS		-
Tvorba alkohola		± (etanol)
Tvorba H ₂ O ₂		± (u tragovima)
Tvorba vitamina		nepoznato
Optimalna temperatura rasta		20 – 25 °C
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>		Tvorba mliječne kiseline
	Izomer mliječne kiseline	D (-)
	Tvorba octene kiseline	+
	Proteolitička aktivnost	± (slaba)
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (acetoin, diacetil)
	Tvorba plina	± (CO ₂)
	Tvorba EPS	-
	Tvorba alkohola	± (etanol)
	Tvorba H ₂ O ₂	± (u tragovima)
	Tvorba vitamina	nepoznato
	Optimalna temperatura rasta	20 – 25 °C

Tehnološke karakteristike laktokoka koje se koriste za sastav mezofilne kulture prikazane su u tablici 3.1. Karakterističan mikroskopski izgled mješovite mezofilne kulture laktokoka prikazan je na slici 3.2.

Tehnološke karakteristike bakterija *Leuconostoc* spp. koje se koriste za sastav mezofilnih kultura prikazane su u tablici 3.2.

3.3.2.

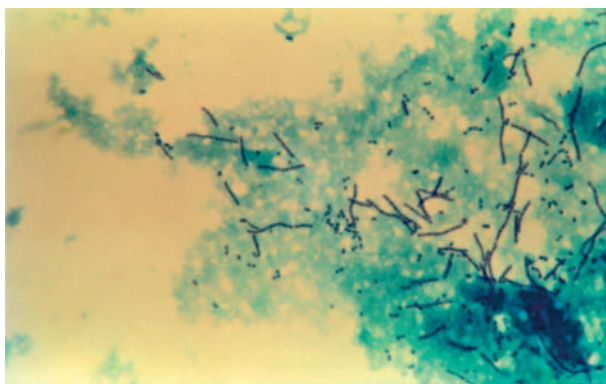
Termofilna kultura

Definirane ili selekcionirane termofilne kulture koriste se za proizvodnju jogurta i jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka koja zahtijevaju temperature fermentacije između 35 i 45 °C. U tom smislu, postoji klasična jogurtna kultura i kultura koja uz jednu ili obje bakterijske vrste jogurtne kulture sadrži jednu ili više drugih vrsta BMK ili bifidobakterija. Sve bakterijske vrste sadržane u kulturi (osim *L. rhamnosus*) iz laktoze tvore mliječnu kiselinu, i u većim ili manjim koncentracijama aromatske komponente, acetaldehid, acetoin, aceton i diacetil.

Klasična jogurtna kultura sastoji se jedino od sojeva homofermentativnih laktobacila i streptokoka: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus*. Rastom i razmnožavanjem u mlijeku *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulira rast *S. thermophilus* oslobađanjem aminokiselina (histidin, leucin, lizin, cistin, valin i dr.) iz proteina, dok *S. thermophilus* stimulira rast *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stvaranjem CO₂ iz laktoze, spojeva sličnih mravljoj kiselini i spojeva iz uree sadržanih u mlijeku. Tehnološke karakteristike bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koje se koriste u sastavu klasične termofilne jogurtne kulture prikazane su u tablici 3.3.

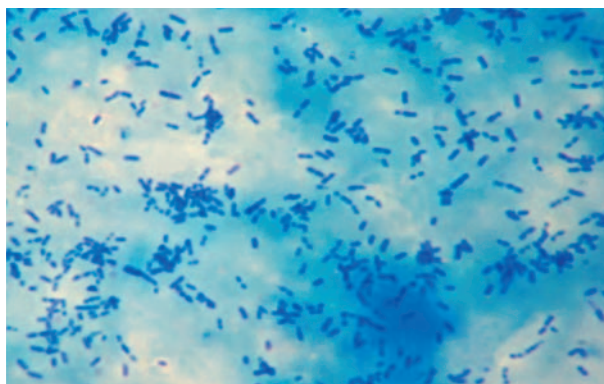
Tablica 3.3.

	Bakterijska vrsta/ podvrsta	Tehnološke karakteristike	Reakcija
<p>Tehnološke karakteristike bakterija <i>S. thermophilus</i> i <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></p> <p>(prilagođeno prema Dellagliu i sur., 1992.)</p>	<i>S. thermophilus</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,7 – 0,8%
		Izomer mliječne kiseline	L (+)
Proteolitička aktivnost		+ (slaba)	
Lipolitička aktivnost		+ (slaba)	
Tvorba aromatskih spojeva		+ (acetaldehid, acetoin, acetoin, diacetil)	
Tvorba plina		–	
Tvorba EPS		±	
Tvorba alkohola		± (etanol u tragovima)	
Tvorba H ₂ O ₂		±	
Tvorba vitamina		+ (B ₆ , B ₁₂)	
		Optimalna temperatura rasta	37 °C
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Tvorba mliječne kiseline	do 1,8 %
		Izomer mliječne kiseline	D (-)
		Proteolitička aktivnost	+ (slobodne aminokiseline)
		Lipolitička aktivnost	± (slaba)
		Tvorba aromatskih spojeva	+ (acetaldehid, acetoin, diacetil)
		Tvorba plina	–
		Tvorba EPS	+ (određeni sojevi)
		Tvorba alkohola	+ (etanol u tragovima)
		Tvorba H ₂ O ₂	+
		Tvorba vitamina	+ (B ₆ , B ₁₂)
		Optimalna temperatura rasta	40 – 45 °C



Slika 3.3.

Karakterističan izgled termofilne jogurtne kulture sastavljene od bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.



Slika 3.4.

Mikroskopski izgled termofilne kulture koja sadrži bakterije *S. thermophilus* i *L. acidophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.

Karakterističan mikroskopski izgled klasične kulture za jogurt prikazan je na slici 3.3.

U slučajevima proizvodnje jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka, kultura osim klasičnih vrsta jogurtne kulture dodatno sadrži i druge bakterijske vrste u različitim kombinacijama. Neke od mogućih kombinacija različitih vrsta BMK i bifidobakterija u sastavu termofilnih kultura za proizvodnju jogurtu srodnih fermentirana mlijeka prikazane su u tablici 3.4.

Tehnološke karakteristike nekih od mikrobnih vrsta koje se koriste u sastavu termofilne kulture u proizvodnji jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka prikazane su u tablici 3.5. i tablici 3.6. Za ilustraciju, mikroskopski izgled kulture koja sadrži bakterije *S. thermophilus* i *L. acidophilus* prikazan je na slici 3.4.

Mliječnu kiselinu vrste BMK iz sastava termofilnih kultura stvaraju brže i u višoj koncentraciji (do ~ 1,5 %) od vrsta BMK mezofilne kulture (~ do 1 %). Bifidobakterije prema sposobnosti tvorbe i koncentraciji mliječne kiseline u mlijeku (~ do 1 %), slične su mezofilnim vrstama BMK.

Tablica 3.4.

Moguće kombinacije bakterijskih vrsta u termofilnoj kulturi

Kombinacija	Bakterijske vrste
1	<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i>
2	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i>
3	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. rhamnosus</i>
4	<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>
5	<i>S. thermophilus</i> <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>
6	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>B. animalis</i> <i>S. thermophilus</i>
7	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>B. longum</i> ili <i>infantis</i> , <i>breve</i> , <i>bifidum</i>
8	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>B. lactis</i>

Tablica 3.5.

	Bakterijska vrsta/ podvrsta	Tehnološke karakteristike	Reakcija
Tehnološke karakteristike bakterija <i>L. acidophilus</i> i <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)	<i>L. acidophilus</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,6 – 0,9 %
		Izomer mliječne kiseline	DL
Proteolitička aktivnost		+ (slaba)	
Lipolitička aktivnost		+ (slaba)	
Tvorba aromatskih spojeva		±/+ slaba (acetaldehid)	
Tvorba plina		–	
Tvorba EPS		± (slaba)	
Tvorba alkohola		± (etanol u tragovima)	
Tvorba H ₂ O ₂		+	
Tvorba vitamina		nepoznata	
Optimalna temperatura rasta	37 °C		
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Tvorba mliječne kiseline	1,2 – 1,5 %	
	Izomer mliječne kiseline	L (+)	
	Proteolitička aktivnost	±	
	Lipolitička aktivnost	± (slaba)	
	Tvorba aromatskih spojeva	slaba	
	Tvorba plina	–	
	Tvorba EPS	slaba	
	Tvorba alkohola	± (etanol u tragovima)	
	Tvorba H ₂ O ₂	+	
	Tvorba vitamina	nepoznata	
Optimalna temperatura rasta	37 °C		

3.3.3.

Probiotička kultura

Termin probiotička kultura koristi se kada je kultura sastavljena od probiotičkih bakterijskih sojeva ili rjeđe kvasaca koji pozitivno djeluju na domaćina poboljšanjem ravnoteže prirodne mikrobne populacije u probavnom sustavu. Za sastav probiotičke kulture najčešće se koriste probiotički sojevi vrsta *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium* izolirani iz humanog intestinalnog sustava. Od kvasaca koji imaju probiotičko djelovanje uglavnom se za sastav probiotičkih kultura koriste kvasci roda *Saccharomyces*. Probiotička bakterijska kultura poput ostalih vrsta kulture može sadržavati sojeve samo jedne

vrste ili sojeve različitih bakterijskih vrsta. Za njihov dijetetski i terapijski učinak na ljudski organizam najvažnija je njihova karakteristika sposobnosti neoštećenog prolaska kroz želudac (pH ~ 1,5 - 2) domaćina. Većina probiotičkih sojeva a osobito vrsta skupine *Lactobacillus acidophilus* i vrsta *Bifidobacterium* u mlijeku vrlo sporo rastu i stvaraju malu koncentraciju mliječne kiseline. Koagulacija mlijeka djelovanjem monokulture tih bakterija događa se za približno 18 - 28 sati. Zbog toga se u proizvodnji fermentiranih mlijeka uz probiotičku najčešće koristi i jogurtna kultura. Probiotička kultura dostupna je na tržištu jedino u DVS/DVI obliku (vidi poglavlje 3.4.4).

Tablica 3.6.

	Bakterijska vrsta	Tehnološke karakteristike	Reakcija
Tehnološke karakteristike bakterija <i>Bifidobacterium</i> spp. (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)	<i>B. bifidum</i>	Tvorba mliječne kiseline	0,7 – 0,9 %
		Izomer mliječne kiseline	L (+)
		Ostale organske kiseline	octena; niske konc. mravlje i jantarne
		Proteolitička aktivnost	± (slobodne aminokiseline)
		Lipolitička aktivnost	nepoznato
	<i>B. longum</i>	Tvorba aromatskih spojeva	+ (acetaldehid, aceton, acetoin, diacetil)
		Tvorba plina	–
		Tvorba EPS	±
		Tvorba alkohola	+ (etanol u tragovima)
		Tvorba H ₂ O ₂	–
	<i>B. breve</i>	Tvorba vitamina	+ (B ₆ , B ₁₂ , folna kiselina)
		Tvorba mliječne kiseline	0,5 – 0,9 %
		Izomer mliječne kiseline	L (+)
		Ostale organske kiseline	octena; niske konc. mravlje i jantarne
		Proteolitička aktivnost	+ (slobodne aminokiseline)
<i>B. infantis</i>	Lipolitička aktivnost	nepoznata	
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (acetaldehid, aceton, acetoin, diacetil)	
	Tvorba plina	–	
	Tvorba EPS	±	
	Tvorba alkohola	+ (etanol u tragovima)	
<i>B. breve</i>	Tvorba H ₂ O ₂	–	
	Tvorba vitamina	+ (B ₆ , B ₁₂ , folna kiselina)	
	Tvorba mliječne kiseline	0,4 – 0,8 %	
	Izomer mliječne kiseline	L (+)	
	Ostale organske kiseline	octena; niske konc. mravlje i jantarne	
<i>B. infantis</i>	Proteolitička aktivnost	+ (slobodne aminokiseline)	
	Lipolitička aktivnost	nepoznata	
	Tvorba aromatskih spojeva	+ (acetaldehid, aceton, acetoin, diacetil)	
	Tvorba plina	–	
	Tvorba EPS	±	
<i>B. infantis</i>	Tvorba alkohola	± (etanol u tragovima)	
	Tvorba H ₂ O ₂	–	
	Tvorba vitamina	+ (B ₆ , B ₁₂ , folna kiselina)	

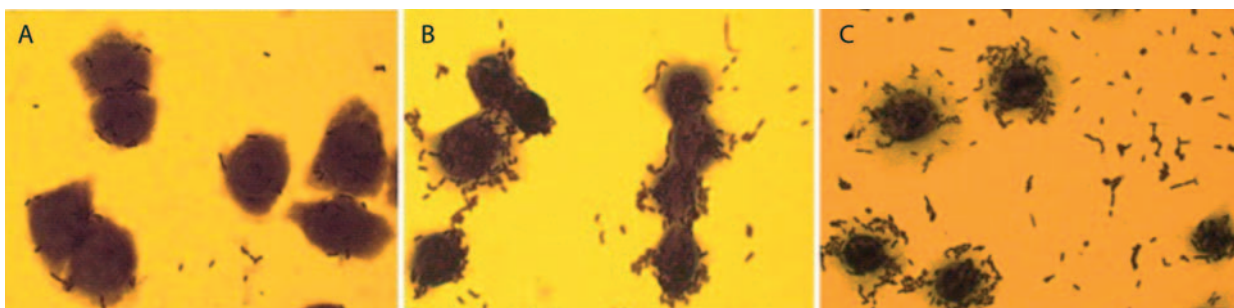
Funkcionalna kultura

Pojam funkcionalna kultura označava kulturu s najmanje jednim inherentnim funkcionalnim svojstvom koje može pridonijeti sigurnosti hrane ili povoljno utjecati na jednu ili više organoleptičkih, tehnoloških, nutritivnih ili zdravstvenih osobina fermentiranih mlijeka. Implementacijom selekcioniranih sojeva u formi kultura ili kokultura u fermentacijski proces mogu se postići željena specifična svojstva za proizvod, uz istovremeno potpuno očuvanje njegove prirodne i zdravstvene vrijednosti. Inherentno funkcionalno svojstvo vrsta BMK ili bifidobakterija odnosi se prvenstveno na sposobnost određenih bakterijskih sojeva stvaranju antimikrobnih supstancija, šećernih polimera, sladila, aromatskih spojeva, korisnih enzima, nutraceutika i spojeva promotora zdravlja. U širem smislu, probiotički bakterijski sojevi zbog povoljnog utjecaja na humano zdravlje također predstavljaju funkcionalnu kulturu. Međutim, kada se govori o funkcionalnoj kulturi u užem smislu misli se na kulturu koja može zamijeniti kemijske dodatke hrani svojim prirodnim spojevima, uz istovremeno za potrošača zadržanu atraktivnost proizvoda. Osim toga, funkcionalnu kulturu karakterizira i mogućnost šire primjene i veće fleksibilnosti u korištenju. Tako antimikrobna aktivnost BMK može zamijeniti kemijske dodatke poput nitrita, sulfita, propionske kiseline, sorbitola i benzojeve kiseline koji se koriste u sprječavanju mikrobne kontaminacije hrane.

Za funkcionalnu kulturu interesantni antimikrobni spojevi koje tvore BMK i bifidobakterije su: organske kiseline (mliječna, octena, mravlja, maslačna, kapronska), ugljični dioksid, vodikov peroksid, diacetil, etanol, bakteriocini, reuterin i reutericiklin. Mliječna kiselina snižava pH-vrijednost i tako sprječava rast nepoželjnih bakterija. Diacetil, kako se pretpostavlja, nepovoljno djeluje na gram-negativne, ali ne i na gram-pozitivne patogene bakterije. Antimikrobni proteini ili bakteriocini djeluju antagonistički na gram-pozitivne patogene bakterije i djelomično na gram-negativne bakterije uzročnike kvarenja. Bakteriocini BMK i

bifidobakterija mogu zaustaviti i rast određenih sojeva vrsta BMK iz sastava kultura koji tvore strani okus u fermentiranim mliječnim proizvodima.

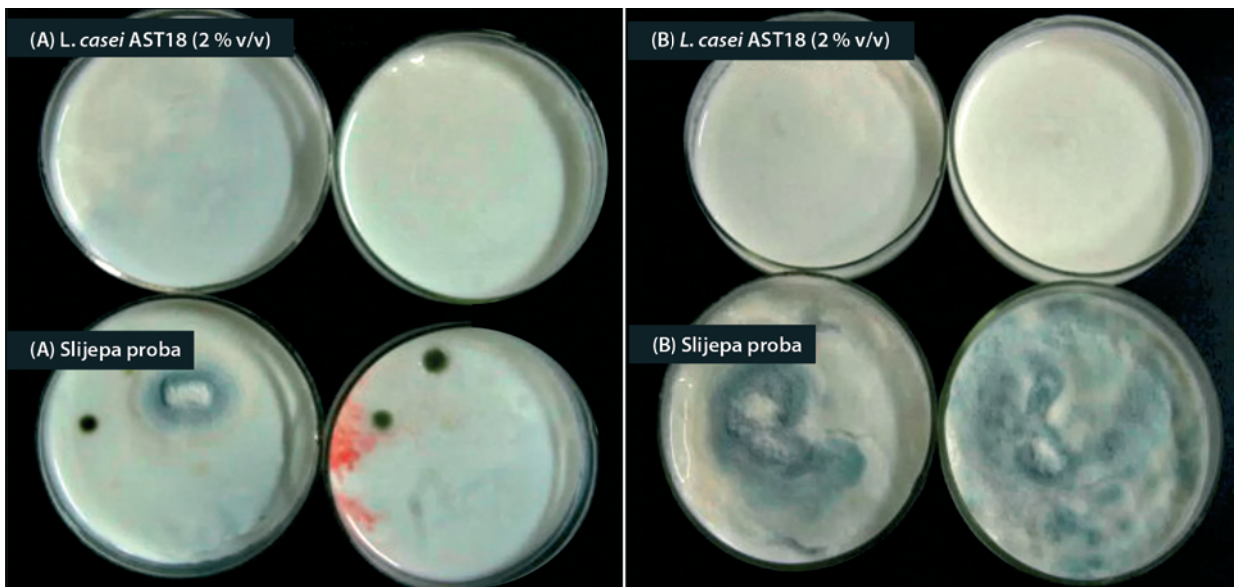
U proizvodnji fermentiranih mlijeka interesantne su i funkcionalne kulture sastavljene od bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost tvorbe antimikrobnih spojeva i nakon završene fermentacije. Njihovo korištenje u kontroli specifičnih patogenih bakterija poput *Listeria* spp. ili enteroinvazivnih sojeva *E. coli* (EIEC) je značajno. Osim toga, ti bakterijski sojevi osim antiinfektivnih svojstava prema patogenim bakterijama pokazuju i dobru sposobnost preživljavanja u uvjetima intestinalnoga probavnog sustava. Za ilustraciju, na slici 3.5. prikazana je sposobnost adhezije protektivnih bakterijskih sojeva na stanicu enteroinvazivne bakterije *E. coli* (EIEC). U konkretnom slučaju, sojevi bakterija *L. plantarum* (CCFM 233 i CCFM 231) pokazali su ne samo značajnu inhibiciju rasta i razmnožavanja bakterije *E. coli* (EICE), već i visok stupanj adhezije i dobru toleranciju na niski pH i visoku koncentraciju žučnih soli u humanom probavnom sustavu. Te vrste funkcionalnih kultura interesantne su i u kontroli uzročnika kvarenja fermentiranih mlijeka. Na slici 3.6. prikazana je antifungalna učinkovitost bakterijskog soja *L. casei* AST18 u sprječavanju rasta i razmnožavanja plijesni i kvasaca u jogurtu tijekom pohrane. U konkretnom slučaju, jogurt je proizveden komercijalnom kulturom za jogurt (YF-L822), te mu je dodana bioprotektivna kultura (*L. casei* AST18) u količini od 2 % (v/v). Uzorci jogurta nakon 6 i 10 dana pohrane kontaminirani su plijesni *Penicillium* sp. (60 - 80 spora) i kvascima. Na temelju rezultata, protektivni soj *L. casei* AST18 u jogurtu je potpuno inhibirao rast plijesni tijekom 25 dana njegove pohrane na temperaturi od 4 °C. Istodobno, dodatak bioprotektivne kulture nije utjecao na omjer stvaranja mliječne kiseline i promjene pH, viskoznost, kapacitet vezanja vode u jogurtu, i na signifikantno smanjenje broja bakterija iz sastava jogurtne kulture.



Slika 3.5.

Sposobnost adhezije određenih protektivnih bakterijskih sojeva vrsta bakterija mliječne kiseline na bakterijsku stanicu enteroinvazivne *E. coli* (EIEC).

Detalji: (A) adhezijska sposobnost soja *L. rhamnosus* (53103), (B) adhezijska sposobnost soja *L. plantarum* (CCFM 233), (C) adhezijska sposobnost soja *L. plantarum* (CCFM 231). Slika je dobivena svjetlosnim mikroskopom, povećanje 1000 x. (Liu i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 3.6.

Inhibitorno djelovanje funkcionalne kulture (*L. casei* AST18; 2 % v/v) na rast kvasaca (a) i plijesni (b) u jogurtu. Za usporedbu, prikazani su uzorci jogurta proizvedeni jedino uz dodatak jogurtne kulture. (Li i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

U proizvodnji fermentiranih mlijeka, za poboljšanje teksture i okusa proizvoda u ustima najčešće se koriste obrani mliječni prah ili sirutka u prahu, i dodatci poput želatine, škroba, pektina, guara, alginata ili mikrobnih polisaharida ksantana i gelana. Neki biljni polisaharidi te ksantan i gelan mogu se zbog poboljšanja reoloških svojstava proizvoda dodatno kemijski modificirati. Obrani mliječni prah i sirutku u prahu potrošači ne smatraju neprirodnima, ali oni za proizvođača predstavljaju trošak. Dodatke modificiranih molekula u fermentirana mlijeka potrošači doživljavaju neprirodnima, a osim toga njihova je upotreba u nekoliko europskih zemalja zabranjena. Zbog toga, prirodno svojstvo vrsta BMK za stvaranjem egzopolisaharida u proizvodnji fermentiranih mlijeka ima veliko značenje u poboljšanju reoloških svojstava proizvoda.

Homofermentativne vrste BMK, radi stvaranja energije i postizanja oksidoredukcijske ravnoteže, hidroliziraju laktozu preko piruvata u mliječnu kiselinu. Preko piruvata u istoj biokemijskoj reakciji deriviraju se i drugi metaboliti poput acetata, etanola, diacetila i acetaldehida. Tako BMK stvaraju hlapljive spojeve koji pridonose karakterističnom okusu pojedinačnih vrsta fermentiranih mlijeka. Uz optimalne uvjete fermentacije direktnom modifikacijom njihove oksidoredukcijske ravnoteže mogu se izmijeniti bakterijske biokemijske reakcije u smjeru stvaranja većih koncentracija određenih hlapljivih spojeva. Dobar je primjer veća tvorba diacetila u proizvodnji mlaćenice

dobivene modifikacijom piruvat katabolizma bakterije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Također, metaboličkom modifikacijom bakterije *S. thermophilus*, uz optimalne uvjete fermentacije, postiže se veće stvaranje acetaldehida u proizvodnji jogurta. Alternativno, uvođenjem nove enzimatske aktivnosti u stanicama BMK može se potaknuti stvaranje novih metabolita ovisno o vrsti dodanog šećera. Tako se u stanicama bakterije *L. lactis* uspjela inicirati tvorba veće koncentracije enzima alanin-dehidrogenaze koji je omogućio bakterijsku homofermentativnu stereospecifičnu tvorbu L-alanina iz piruvata. U prehrambenoj industriji L-alanin se već koristi u svojstvu prirodnog sladila.

Za proizvodnju manje kiselog jogurta dobrim se pokazala upotreba kultura koje sadrže laktoza-negativne sojeve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. U proizvodnji jogurta laktoza se bakterijama jogurtne kulture hidrolizira u mliječnu kiselinu sve dok se ne dostigne konačna pH-vrijednost od približno 4,2 - 4,5. Tijekom pohrane, u određenim slučajevima pH se može sniziti na vrijednost nižu od 4,0 što je uzrok nepoželjne postacidifikacije i gorakog okusa proizvoda. Pojava se može ublažiti kombiniranim korištenjem kulture koja uz laktoza - pozitivne sojeve *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sadrži i laktoza - negativne sojeve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Posljedično tome omogućena je proizvodnja manje kiselog jogurta, a postacidifikacija je zanemariva.

3.4.

Oblik kulture

Kulture koje se koriste u mljekarskoj industriji mogu biti različitog oblika neovisno o tome jesu li po svojoj prirodi (namjeni) mezofilne ili termofilne. Međutim, svojstva kultura koja određuju kvalitetu fermentiranog mlijeka definirana su i njezinim oblikom. Razlikujemo sljedeće oblike kultura:

- tekuće
- nekoncentrirane - zamrznute - osušene
- koncentrirane - zamrznute - osušene
- zamrznute - koncentrirane
- zamrznute - koncentrirane - osušene u lagano topljivom obliku (DVI/DVS).

3.4.1.

Tekuća kultura

Tekuće kulture (slika 3.7.) za proizvodnju fermentiranih mlijeka u tehnološki suvremeno opremljenim mljekarama danas se uglavnom više ne koriste. Korištenje tekuće kulture, zbog njezinih određenih prednosti pred ostalim oblicima kultura, zadržano je u proizvodnji specifičnih mliječnih proizvoda u mljekarama manjih preradbenih kapaciteta. Laboratorijska kultura tekuće kulture najčešće se priprema iz rekonstituiranoga obranog mlijeka u prahu (OMP). Međutim, radi poboljšanja svojstva stabilnosti kulture postoje i drugi načini pripreme tekuće kulture. U mlijeko rekonstituirano iz OMP u određenim koncentracijama tako se mogu dodati ekstrakt kvasca, dekstroza/laktoza, Ca-karbonat, lecitin, Na-citrat, Na-askorbat ili K-fosfat. Poboļjšani kultivacijski uvjeti omogućuju da se tekuće kulture u uvjetima hladionika mogu čuvati i do tri mjeseca. Iz laboratorijske kulture priprema se matična tekuća kultura.



Slika 3.7.

Laboratorijska tekuća kultura.

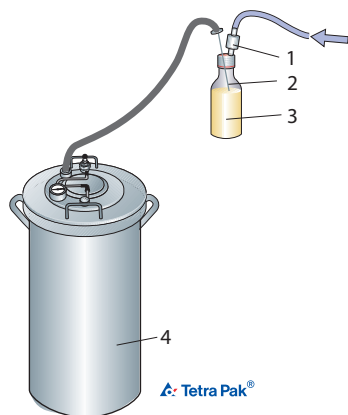
Aktivnost tekuće kulture određena je temperaturom hlađenja, razinom kiselosti na kraju fermentacije i trajanjem pohrane. Pravodobno hlađenje osobito je bitno za kontrolu metaboličke aktivnosti bakterija iz sastava tekuće kulture.

Prednosti tekuće kulture:

- za proizvodnju specifičnog proizvoda
- kada postoji dostupan izvor
- kada su potrebne male količine kulture.

Nedostatci tekuće kulture:

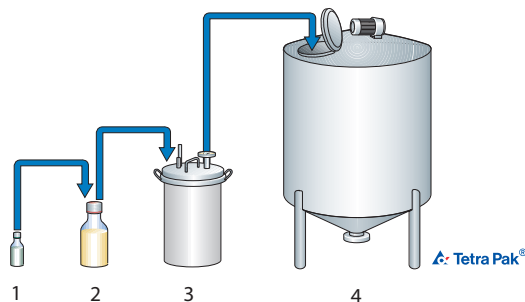
- laboratorijska kultura - nabavlja se jedanput tjedno
- postupak pripreme - skup, vremenski zahtjevan, zahtijeva stručan kadar
- lagana kontaminacija - zbog brojnih inokulacija.



Slika 3.8.

Shematski prikaz aseptičkog načina pripreme radne ili međukulture iz matične tekuće kulture.

Detalji: 1 sterilni filtar, 2 aseptička igla (pipeta), 3 matična kultura, 4 radna ili međukultura. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)



Slika 3.9.

Shematski prikaz postupka pripreme tehničke kulture iz tekuće kulture.

Detalji: 1 laboratorijska kultura, 2 matična kultura, 3 radna ili međukultura, 4 tehnička kultura. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Postupak inokulacije tekuće kulture u mlijeko obuhvaća nekoliko sljedećih tehnoloških postupaka:

laboratorijska kultura (10^8 organizama/mL)

↓ 1 %

matična kultura (100 mL)

↓ 1 - 2 %

radna ili međukultura (3 - 5 boca/5 litara)

↓ 1 - 2 %

tehnička 500 - 1000 L

↓

procesni spremnik (10000 L).

Shematski prikaz aseptičkog načina prijenosa matične tekuće kulture u spremnik za radnu ili međukulturu prikazuje slika 3.8. Postupak pripreme tehničke kulture iz laboratorijske tekuće kulture shematski je prikazan slikom 3.9.

Osim tekuće, za pripremu matične kulture, kao alternativa, može se koristiti zamrznuta osušena

nekoncentrirana kultura koja se nekoliko mjeseci može čuvati na temperaturi od 25 °C. Prednost je zamrznutih osušenih kultura, u odnosu na tekuće, osiguranje ujednačene kvalitete proizvoda kroz duže razdoblje. Nedostatci ove kulture isti su kao i za tekuće kulture. U praksi, zbog očuvanja mikrobne ravnoteže u mješovitoj kulturi preporučuje se koristiti pojedinačno zamrznute bakterijske sojeve. Postupak inokulacije zamrznute osušene nekoncentrirane kulture u mlijeko je sljedeći:

zamrznuta osušena kultura (10^8 - 10^9 organizama/mL)

↓

matična (100 mL)

↓ 1 - 2 %

radna kultura (2 - 4 boca/5 L)

↓ 1 - 2 %

tehnička kultura (500 - 1000 L)

↓

procesni spremnik (10000 L)

3.4.2.

Koncentrirana - zamrznuta kultura

Koncentrirana - zamrznuta kultura uvedena je u mljekarsku industriju 1960. godine. Izabrani bakterijski sojevi koncentriraju se na razinu 10^{10} - 10^{11} organizama mL^{-1} , a potom se kultura zamrzava na temperaturi od -196 °C u tekućem dušiku i čuva na temperaturi od -45 °C u suhom ledu. Koncentrirane - zamrznute kulture za koje je potrebna priprema tehničke kulture poznate su pod imenom REDI-SET kulture, a one koje se direktno inokuliraju u mlijeko pod imenom DVS kulture. Izgled teksture koncentrirane - zamrznute kulture pohranjene u suhom ledu na -45 °C prikazan je na slici 3.10.

Zamrzavanje i odmrzavanje kritične su točke za uspješno korištenje tog oblika kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Na stupanj oštećenja bakterijskih stanica i njihovo preživljavanje u kulturi osobito su osjetljive bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. acidophilus*. Zbog toga se ovaj oblik kulture u proizvodnji prvenstveno klasičnog jogurta ne preporučuje. Koncentrirana - zamrznuta kultura je najčešće pakirana u aluminijskim posudama sa zavojitim čepom, ili u propilenskim ampulama u količini od 70 mL (preporučena količina za inokulaciju 1000 L mlijeka). Faze postupka pripreme kulture za inokulaciju u mlijeko su sljedeće:

- zamrznuta kultura brzo se premješta u vodenu kupelj zagrijanu na 20 °C
- slijedi inkubacija na temperaturu mezofilne ili termofilne fermentacije
- fermentacija se prekida hlađenjem, a kultura premješta u hladnjak
- slijedi priprema međukulture i priprema kulture za procesni spremnik.

U praksi je za koncentriranu - zamrznutu kulturu uobičajeno korištenje dvaju spremnika za pripremu procesne ili međukulture. Jedan sadrži gotovu pripremljenu kulturu koja se koristi tog dana, a u drugom se priprema kultura za sljedeći dan. Spremnici za kulturu



Slika 3.10.

Izgled koncentrirane - zamrznute jogurtne kulture (pohranjene u suhom ledu na temperaturi od -45 °C).

moraju osigurati potpunu aseptičnost. Shematski prikaz aseptičkog transfera međukulture u procesni spremnik prikazan je na slici 3.11.

Koncentrirana - zamrznuta kultura može se i direktno dodati u procesni spremnik, a postupak inokulacije je sljedeći:

laboratorijska kultura 10^{10} - $10^{11}/\text{mL}$ (70 mL)



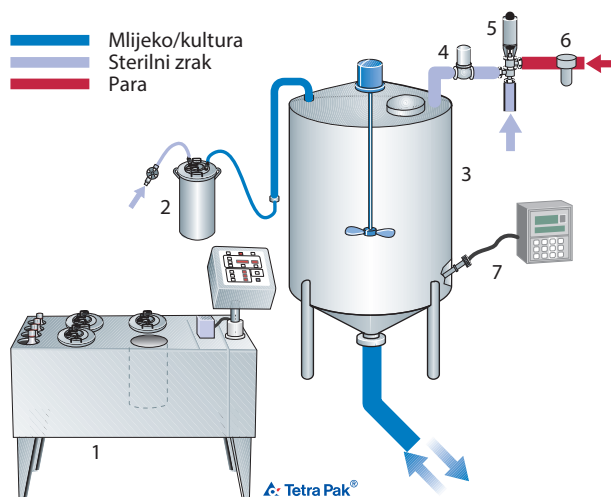
inkubacija u hipokloritnoj vodenoj otopini (100 - $200 \mu\text{g g}^{-1}$) na 20 °C/10 min



proizvodni spremnik (1000 L)

Prednosti koncentriranih - zamrznutih kultura su sljedeće:

- lagana za upotrebu
- lakše planiranje proizvodnje/5 dana
- dobra aktivnost kulture
- smanjena mogućnost kontaminacije.



Slika 3.11.

Shematski prikaz aseptičkog transfera koncentrirane - zamrznute kulture u procesni spremnik.

Detalji: 1 inkubator, 2 spremnik za međukulturu, 3 procesni spremnik, 4 filtar, 5 ventil za zrak, 6 ventil za paru, 7 jedinica za mjerenje pH. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Istovremeno, nedostaci koncentriranih - zamrznutih kultura su:

- osiguranje niskih temperatura tijekom transporta i pohrane
- promjene temperature - slabljenje aktivnosti kulture
- selekciju sojeva obavlja proizvođač
- određene dobre tradicionalne kulture nije moguće koncentrirati - zamrznuti.

Koncentrirana - zamrznuta REDI-SET kultura pohranjuje se na temperaturi od $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vijek trajanja kulture u tim uvjetima pohrane približno je 12 mjeseci. Vijek trajanja koncentrirane - zamrznute DVS kulture približno je 24 mjeseca u uvjetima pohrane na temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.3.

Koncentrirana - zamrznuta - osušena kultura

Koncentrirana - zamrznuta - osušena kultura kao alternativa koncentriranoj zamrznutoj kulturi u mljekarsku je industriju uvedena 1970. godine pod nazivom REDI-SET osušena kultura. Metoda isušivanja temelji se na isušivanju pripremljene kulture sprejsistemom ili isušivanjem u vakuumu. Sušenje pripremljene kulture na temperaturi $75 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ osigurava dobro konzerviranje bakterijskih vrsta bez oštećenja bakterijskih stanica. Također, tom metodom pripreme kulture moguće je osigurati potreban omjer između pojedinih vrsta u kulturi. Omjer bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u jogurtnoj kulturi primjerice od 40 : 60 pogodan je za korištenje u proizvodnji jogurta izražene kiselosti. U kulturi pripremljen omjer između tih bakterijskih vrsta od 60 : 40 pogodan je za proizvodnju jogurta blago izražene kiselosti. Postupak pripreme koncentrirane - zamrznute - osušene kulture za inokulaciju u mlijeko isti je kao i za koncentriranu - zamrznutu kulturu i zahtjeva pripremu međukulture.

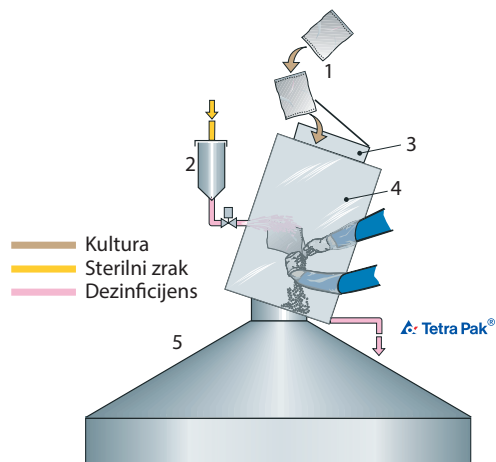
Prednosti kulture:

- nije potrebno osiguranje niskih temperatura u transportu i tijekom pohrane.

Nedostaci kulture:

- iznimno duga lag faza.

Rehidracija koncentrirane - zamrznute - osušene kulture provodi se na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i potrebna su najmanje dva uzastopna precjepljivanja (subkulture) kako bi se dobila aktivna tekuća kultura. U slučajevima kada se koncentrirana - zamrznuta - osušena kultura direktno naciepljuje u mlijeko bez pripreme međukulture, lag faza za početak aktivnosti kulture znatno se produžuje. Osim REDI-SET koncentrirane - zamrznute - osušene kulture za proizvodnju fermentiranih mlijeka koriste se i koncentrirane - zamrznute - osušene kulture poznate pod imenom DVI kulture za direktnu inokulaciju u mlijeko.



Slika 3.12.

Aseptički način inokulacije koncentrirane - zamrznute ili koncentrirane - zamrznute - osušene kulture direktno u fermentacijski spremnik ili u spremnik za pripremu tehničke kulture.

Detalji: 1 pakirana kultura, 2 spremnik za dezinficijens, 3 kontrolno staklo, 4 inokulacijski spremnik, 5 inkubacijski spremnik. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Jednako kao i za koncentriranu - zamrznutu REDI-SET, koncentrirane - zamrznute - osušene REDI-SET kulture pohranjuju se na temperaturi od -45°C , a vijek trajanja kulture je 12 mjeseci. Vijek trajanja koncentrirane - zamrznute - osušene DVS kulture približno je 24 mjeseca u uvjetima pohrane na temperaturi od -18°C .

Način aseptičke inokulacije koncentriranih kultura direktno u mlijeko ili u spremnik za pripremu tehničke kulture prikazan je na slici 3.12. Sustav aseptičke inokulacije kulture u mlijeko najčešće je direktno povezan s fermentacijskim spremnikom.

3.4.4.

Kulture za direktnu inokulaciju

U posljednjih 20 godina dogodile su se znatne promjene u načinu kultivacije kultura koje se koriste u mljekarskoj industriji. Tako se danas u modernoj tehnologiji proizvodnje fermentiranih mlijeka uglavnom koriste koncentrirane - zamrznute - osušene kulture za direktno nacjepljivanje u mlijeko. Liofilizirana ili zamrznuta - koncentrirana kultura u lako topljivom obliku proizvodi se tako da se kultura isušuje u zamrznutom stanju. Ova metoda konzerviranja kulture u usporedbi s ostalim metodama isušivanja (sprej ili vakuum isušivanje) osigurava veći postotak preživljavanja bakterijskih vrsta u sastavu kulture.

Za proizvođače, prednosti su korištenja tako pripremljene kulture:

- jednostavno korištenje
- dobar aktivitet kulture
- smanjen udjel ljudskog rada
- jednostavnija organizacija proizvodnog ciklusa
- olakšana kontrola fag infekcije.

Osim za klasičan jogurt, za koji se uglavnom još uvijek koristi inokulacija mlijeka tehničkom kulturom, mljekarska industrija za većinu ostalih fermentiranih mlijeka od 1982. godine koristi "gotovu kulturu" (engl. *Redy Set*). Naime, EUROzyme kompanija (Francuska) prva je tržištu ponudila DVI (engl. *Direct-to-Vat Inoculation*) ili DVS (engl. *Direct-to-Vat Set*) kulture za direktno nacjepljivanje u mlijeko. Kulture se na tržište isporučuju u liofiliziranom obliku u atmosferi dušika, u alupakiranju. Sadrže 10^{11-12} cfu g^{-1} i mogu se pohraniti na $4^{\circ}\text{C}/12$ mjeseci. Tim je kulturama danas moguće direktno inokulirati i do 4000 L mlijeka. Proizvođači kultura, ovisno o njezinu sastavu i vrsti, navode količinu inokuluma (izraženo u UI jedinicama) potrebnu za proizvodnju određenog proizvoda. Tekstura DVI/DVS kultura je praškasta (slika 3.13.) ili granulirana (slika 3.14.).



Slika 3.13.

Izgled DVI/DVS monokulture (*Lactobacillus acidophilus*).



Slika 3.14.

Izgled DVI/DVS monokulture (*Bifidobacterium bifidum*).

Komercijalne kulture za proizvodnju kefir tako-
đer su na tržištu dostupne u formi kultura za direktnu
inokulaciju (DVI/DVD). Pripadaju posebnoj skupi-
ni mezofilnih kultura, budući da osim BMK sadrže
i kvasce. Na tržištu postoje tri vrste kefirnih kultura
- one koje u svom sastavu sadrže samo bakterije bez
kvasaca, one koje sadrže samo kvasce, ili one koje
istovremeno sadrže i bakterije i kvasce.

Prednosti liofiliziranih DVS ili DVI kultura:

- nije potrebno osiguranje niskih temperatura u transportu i tijekom pohrane
- lako topljiva forma
- stabilnije u odnosu na druge koncentrirane kulture.

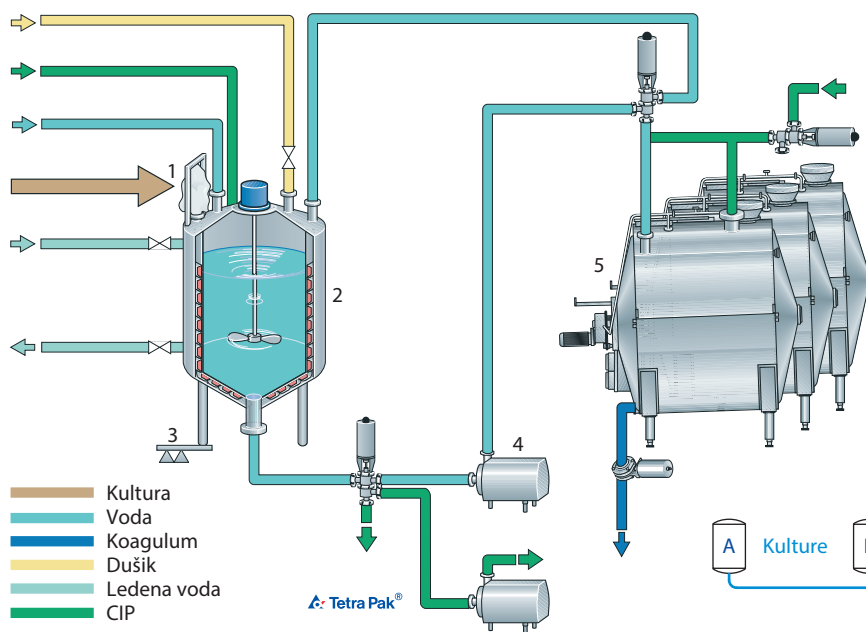
Nedostaci liofiliziranih DVS ili DVI kultura:

- dugačka lag faza/30 - 60 min
- optimalna temperatura rehidracije za mezofilne i termofilne kulture vrste BMK je 20 °C
- odstupanje od preporučene količine inokuluma i temperature inkubacije može znatnije utjecati na omjer pojedinih sojeva iz kulture i posljedično tome na kvalitetu proizvoda.

Automatski inokulacijski sustav (AISY) za inoku-
laciju koncentriranih DVS kultura (zamrznuti ili osu-
šeni oblik) u procesni spremnik prikazan je slikom

3.15. Sustav AISY za inokulaciju DVS kultura razvi-
jen je u suradnji dviju korporacija - Chr. Hansen A/S
(Danska) i Tetra Pak (Švedska) 1990. godine i zaštićen
patentom. Automatski inokulacijski sustav objedinjuje
sljedeće faze inokulacije: odmrzavanje ili rehidraciju,
doziranje i miješanje kulture sve do fermentacijskih
spremnika. Princip rada AISY sustava:

- koncentrirana - zamrznuta DVS kultura premje-
sti se iz zamrzivača (≤ -45 °C) u puferni spremnik
koji sadrži ohlađenu steriliziranu vodu ili mlije-
ko (14 - 18 °C), gdje se smjesa kulture i vode (mlije-
jeka) [primjerice, 10 kg zamrznute kulture i 90 L
vode (10 g 100 g⁻¹ kg)] miješa miješalicom uz sporu
brzinu vrtnje 20 minuta prije doziranja u fermen-
tacijski spremnik
- koncentrirana - zamrznuta - osušena DVS kultu-
ra rehidrira se na 20 °C u steriliziranom mlijeku
ili vodi, a daljnji postupci pripreme prije doziranja
kulture u fermentacijski spremnik isti su kao i za
koncentriranu - zamrznutu DVS kulturu
- vršni dio pufernog spremnika ispire se dušikom
radi sprječavanja formiranja pjene i gubitka mik-
robne aktivnosti
- u puferni spremnik može se ugraditi aktivan uglje-
ni filter radi uklanjanja klora iz vode ako je njego-
va koncentracija veća od 5 µg g⁻¹



Slika 3.15.

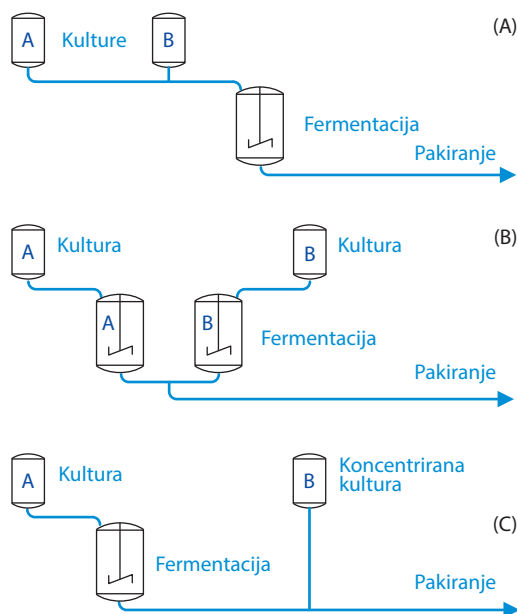
Shematski prikaz aseptičke inokulacije koncentrirane DVS (zamrznute ili zamrznute – osušene) kulture AISY sustavom.

Detalji: 1 kultura u originalnom pakiranju, 2 puferni spremnik za miješanje, 3 ponder stanica, 4 pumpa za punjenje, 5 fermentacijski spremnik. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

— aktivnost otopljene ili rehidrirane kulture ohlađena na 10 - 12 °C može se zadržati istom unutar idućih 6 sati prije doziranja. U slučajevima ako je potrebna pohrana kulture duža od 6 sati, prije doziranja u fermentacijski spremnik pripremljenu kulturu treba ohladiti na temperaturu od približno 5 °C.

Kultivacija i inokulacija kultura u mlijeko, ako se uz standardnu kulturu u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste i probiotičke kulture, može biti organizirana na tri načina: (i) odvojenom kultivacijom kultura, (ii) odvojenom fermentacijom mlijeka ili (iii) dodavanjem koncentrirane probiotičke kulture nakon fermentacije. Shematski prikaz mogućih načina proizvodnje fermentiranih mlijeka, gdje se uz standardnu kulturu koriste i kulture sastavljene od probiotičkih bakterijskih sojeva vrsta bakterija mliječne kiseline ili bifidobakterija, objedinjen je na slici 3.16.

Navedene tehnološke postupke u proizvodnji fermentiranih mlijeka preporučuje se koristiti u slučajevima ako se uvjeti rasta i razmnožavanja bakterijskih vrsta iz sastava kultura značajno razlikuju. Primjerice, u proizvodnji fermentiranih mlijeka, gdje se koristi



Slika 3.16.

Shematski prikaz proizvodnje fermentiranih mlijeka koja se proizvode korištenjem standardne i probiotičke kulture.

Detalji: (A) odvojena kultivacija kultura, (B) odvojena fermentacija mlijeka prije miješanja da se dobije finalni proizvod, (C) dodatak koncentrirane kulture s probiotičkim bakterijskim sojevima nakon završene fermentacije mlijeka. (Driessen i Loones, 1992., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

kultura sastavljena od mezofilnih organizama *L. lactis* (subsp. *lactis*, subsp. *cremoris* i biovar *diacetylactis*) i dodatka mješovite kulture sastavljene od sojeva termofilnih vrsta *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. u različitom omjeru. Također, te tehnološke postupke preporučuje se koristiti i u svim onim slučajevima gdje se u proizvodnji fermentiranih mlijeka koristi standardna termofilna kultura uz dodatak probiotičke kulture koja sadrži probiotičke bakterijske sojeve koji izrazito sporo rastu u mlijeku. Odvojenom kultivacijom kultura ili dodatkom probiotičke kulture nakon fermentacije postiže se znatno kraće vrijeme fermentacije (~ 3,5 sata), a prisutnost probiotičkih sojeva iz sastava dodane kulture u proizvodu na kraju njegova vijeka održivosti je najmanje 10^7 cfu mL⁻¹.

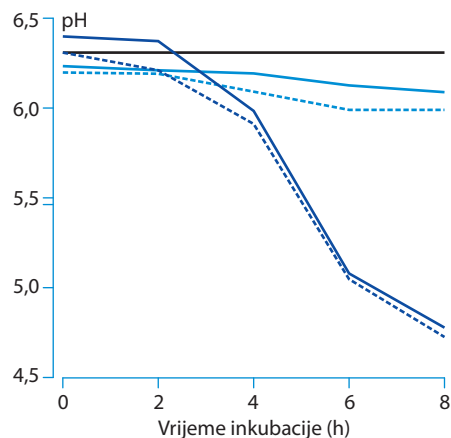
3.5.

Uloga kulture

Ulogu kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka moguće je opisati na različite načine, ali je općeprihvaćeno da se ona definira na temelju karakteristika gotovog proizvoda. U tom je smislu uloga kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka sljedeća:

- produženje vijeka održivosti proizvoda na policama
- poboljšanje svojstava sigurne konzumacije
- poboljšanje reoloških svojstava (primjerice viskoznosti, čvrstoće gela)
- poboljšanje dijetetskih ili funkcionalnih ili terapeutskih svojstava.

U užem smislu, uloga kulture u proizvodnji fermentiranih mlijeka zapravo se odnosi na njezinu sposobnost acidifikacije mlijeka, tvorbu okusa (arome) i oblikovanja teksture proizvoda. Drugim riječima, stvoreni produkti u fermentiranom mlijeku rezultat su biokemijskih oksidacijsko-redukcijskih reakcija razgradnje organskih spojeva uz oslobađanje energije, koje kataliziraju mikrobnim enzimima iz sastava kulture.



Slika 3.17.

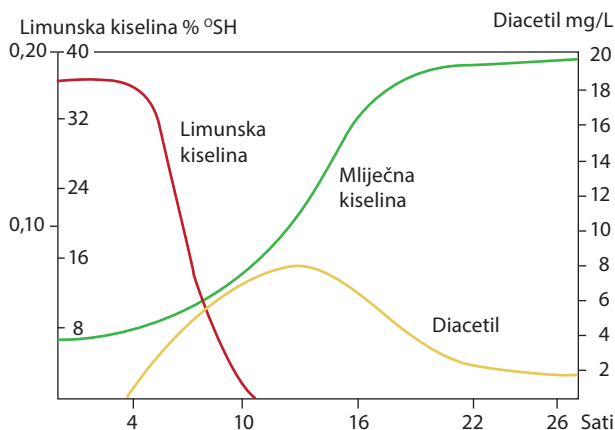
Omjer stvaranja mliječne kiseline kao funkcije pH-vrijednosti pojedinačnih bakterijskih sojeva vrsta bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija.

Detalji: (----) *L. acidophilus* M247Mu1, (—) *L. acidophilus* M247Mu5, (····) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LY58, (—) *S. thermophilus* SY 60, (—) *B. bifidum* 431. (Marshall i Tamime, 1997., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)


Novonastali spojevi služe mikrobnj stanci kao primarni elektron-donori i krajnji elektron-akceptori za vlastiti metabolizam. Fermentacijom nastali metabolički produkti ostaju u proizvodu do vremena njegove održivosti. Za ilustraciju, na slici 3.17. prikazana je acidifikacijska sposobnost pojedinačnih bakterijskih sojeva vrsta BMK i bifidobakterija koji se koriste za sastav termofilnih kultura. U proizvodnji fermentiranih mlijeka brzina stvaranja mliječne kiseline fermentacijom laktoze smatra se najvažnijim bakterijskim svojstvom. Brzo stvaranje mliječne kiseline u fermentacijskom mlijeku zaustavlja rast nepoželjnih mikroorganizama što je presudno za razvitak poželjne teksture i okusa finalnog proizvoda. U tom smislu, za dobivanje stabilnog proizvoda u izboru sojeva koji će se koristiti u proizvodnji određene vrste fermentiranog mlijeka, omjer i kombinacija sojeva u kulturi

prvenstveno se trebaju temeljiti na njihovoj acidifikacijskoj sposobnosti. U tablici 3.7. prikazani su neki od bakterijskih sojeva vrsta BMK i bifidobakterija koje se komercijalno koriste u sastavu mezofilnih i termofilnih kultura.

Bakterijska sposobnost tvorbe spojeva okusa u uskoj je korelaciji s tvorbom mliječne kiseline, količinom inokuluma i temperaturom fermentacije. Tako aktivna mezofilna kultura u početku fermentacije pokazuje slabu acidifikacijsku aktivnost i istovremeno nesigifikantnu tvorbu diacetila metabolizmom citrata prisutnog u mlijeku. Odmicanjem fermentacijskog ciklusa tvorba mliječne kiseline i diacetila se povećava. Suprotno, ako je tvorba mliječne kiseline usporena reducira se i tvorba diacetila. Za primjer korelacije između bakterijske tvorbe mliječne kiseline i aromatskog spoja diacetila na slici 3.18. prikazana je aktivnost mezofilne LD kulture (*L. lactis* subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris*) na 20 °C uz 1 % inokuluma.



Slika 3.18.

Tvorba mliječne kiseline i diacetila u obranom mlijeku na 20 °C uz 1 % inokuluma mezofilne LD kulture (*L. lactis* subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris*). (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Pak.) 

Tablica 3.7.

Mogući bakterijski sojevi vrsta bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija u sastavu komercijalnih kultura

Rod	Vrsta/podvrsta/biovar	Soj
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IL1403, LW1444, LW 1512, ATTC7962, NCDO895, BA 2, C10
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	LW1509, LW1515, MG1363, NCDO712, GL17, SK11, IL1403,
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	CNRZ157, LW1807, LW3081, LW3087, DRC1.DRC2, DRC3, D
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	ATCC8293, NCDO523
	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSMZ20346, DGCC8
	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	NCDO 529
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	LMD9, LMG18311, CNRZ1066, SY102, SY60
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCCBAA365, ATCC11842, LY03, LY58, Lb12
	<i>L. acidophilus</i>	La-145, LA-1/LA5.Lafti L10, NCFN
	<i>L. rhamnosus</i>	ATCC53103, LBA, LBC80, LB21, HN001
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	LBC81, LBC82, CRL431,
	<i>L. acidophilus</i> <i>johnsonii</i>	La1 NCC533
	<i>L. casei</i>	Shirota, ATCC334, BL23
	<i>L. reuteri</i>	SD2112, MM2
	<i>B. longum</i>	BB536, SBT-2928, UCC35624, NCC2705, DJ010A
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidus</i>	Bb-11
	<i>B. animalis</i>	Bb-12, B-420, BL, Lafti B94

(prilagođeno prema Klaenhammeru i sur., 2005, Kellyju i sur., 2010.)

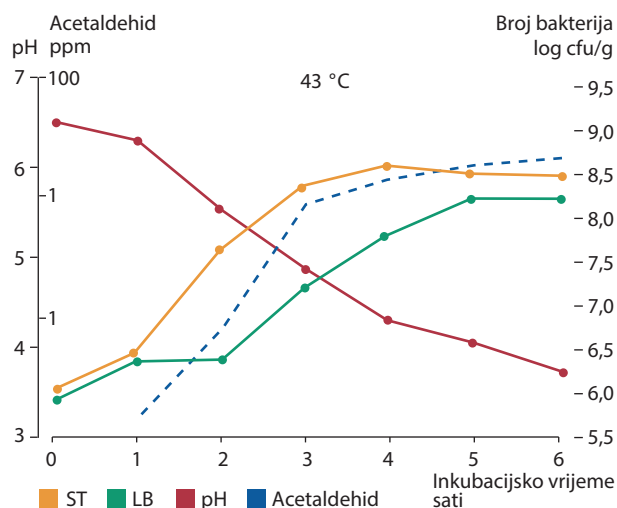
Tablica 3.8.

Odnos između titracijske kiseline (SH) i pH-vrijednosti tijekom fermentacije mlijeka

SH	6,4 – 7,4	8,4	9,6	10,4	12,4	14,8	16,4	18,8	20,0
pH	6,65	6,35	6,22	6,10	5,90	5,74	5,59	5,4	5,35

(preuzeto od Vujičića, 1985.)

Važnost temperature inkubacije i količine inokuluma za acidifikaciju mlijeka i tvorbu aromatskog spoja acetaldehida tijekom fermentacije prikazana je na primjeru jogurtne kulture (slika 3.19.).



Slika 3.19.

Tvorba mliječne kiseline i acetaldehida tijekom fermentacije mlijeka na 43 °C uz dodatak klasične jogurtne kulture (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Detalji: žuta krivulja - *S. thermophilus* (ST), zelena krivulja - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB), crvena krivulja - pH, plava krivulja - acetaldehid. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Pak.)

U većini europskih zemalja promjene u acidifikaciji mlijeka najčešće se izražavaju titracijskom kiselošću koja se izražava u °SH metodom po Soxhlet-Henkelu ili u gramima mliječne kiseline u 100 mL mlijeka. Stupanj kislosti po Soxhlet-Henkelu predstavlja broj mL 0,25M NaOH utrošene za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenolftalein. Kislost u °SH može se s određenom točnošću preračunati u postotak (%) mliječne kiseline dijeljenjem s brojem 44,4. Titracijska i aktivna kislost (pH) mlijeka nisu iste vrijednosti, odnosno titracijska se kislost može povećati u određenom stupnju bez promjene pH-vrijednosti (promjene pH-vrijednosti mlijeka određene su njegovim pufernim kapacitetom). Zbog toga se u procesu fermentacije za početak i prekidanje fermentacije mora obvezno koristiti mjerenje pH vrijednosti fermentacijskog mlijeka. Premda između povećanja titracijske kislosti i snižavanja pH-vrijednosti mlijeka tijekom fermentacije postoji relativno visoka povezanost. Za ilustraciju u tablici 3.8 pokazan je primjer usporedbe °SH i pH vrijednosti u proizvodnji jogurta od kravljeg mlijeka.

U kontekstu promjena sastojaka mlijeka koje se događaju fermentacijom važno je istaknuti i sljedeće: (i) u usporedbi s ishodišnim mlijekom prosječna se koncentracija niacina (B_3) i folne kiseline (B_9) znatnije povećava a (ii) udjel vitamina kobalamina (B_{12}), tiamina (B_1), riboflavina (B_2) i pantotenske kiseline (B_5) zbog vlastitih metaboličkih potreba bakterija nažalost se smanjuje.

3.6.

Čimbenici koji utječu na aktivnost kultura

3.6.1.

Mlijeko kao medij

Bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije sposobne su rasti u mlijeku premda mlijeko za njihov rast i razmnožavanje nije optimalna sredina. Zbog toga i dnevne varijacije u sastavu mlijeka mogu biti uzrok modifikacija u njihovim fiziološkim reakcijama. Osim osnovnih sastojaka mlijeka, za rast i razmnožavanje tih bakterija u mlijeku iznimno su važne njegove koncentracije vitamina i neproteinskog dušika. Laktokoki za svoj rast u mlijeku zahtijevaju niacin (B₃), pantotensku kiselinu (B₅), piridoksin (B₆) i biotin (B₇). Termofilni streptokoki zahtijevaju pantotensku kiselinu (B₅), nitroflavin (B₂), tiamin (B₁), niacin (B₃), biotin (B₇) i piridoksin (B₆). Laktobacili zahtijevaju kalcijev pantotemat, niacin (B₃) i nitroflavin, a *L. lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. acidophilus* dodatno za svoj rast i razmnožavanje još zahtijevaju i kobalamin (B₁₂).

Od ukupne količine dušika, mlijeko sadrži 5 - 70 % neproteinskog dušika. Konstitutivne molekule te frakcije dušika imaju važnu ulogu kao hrana BMK i bifidobakterijama, budući da ih organizmi direktno unose u vlastitu stanicu. Koncentracija frakcija neproteinskog dušika (sadrže manje od osam aminokiselina) obično je preniska za zadovoljenje hranidbenih bakterijskih potreba. Također, koncentracija slobodnih aminokiselina (uključivo i esencijalnu aminokiselinu - metionin) je preniska za dobar rast i razmnožavanje tih bakterija u mlijeku. Posljedično, za sposobnost rasta i razmnožavanja u mlijeku BMK i bifidobakterije evolucijom su razvile svoj vlastiti proteolitički sustav.

3.6.2.

Inhibitorne tvari mlijeka

Prirodno prisutne inhibitorne tvari u mlijeku koje nepovoljno utječu na rast i razmnožavanje bakterija iz sastava kultura su: aglutinini, otopljeni kisik, slobodne masne kiseline, laktoperoksidazni sustav, lizozim, laktoferin i bakteriocini. Inhibitorno na njihov rast i razmnožavanje u mlijeku djeluju i egzogeni čimbenici, poput sezonske varijacije sastava mlijeka, uzročnici mastitisa, ostatci sanitarnih sredstava, pesticida, herbicida i antibiotika.

Sustavnom kontrolom kvalitete sirovog mlijeka, toplinskom obradom mlijeka i dobrom proizvođačkom praksom, u znatnijoj se mjeri mogu ublažiti negativni učinci inhibitornih tvari mlijeka na aktivnost bakterija iz sastava kultura.

3.6.2.1.

Ostatci antibiotika

Ostatci antibiotika koji se najučestalije koriste u liječenju mastitisa muznih životinja najčešća su grupa egzogenih inhibitornih tvari prisutnih u mlijeku koje zaustavljaju ili sporavaju bakterijsku aktivnost kultura.

Razina ostatka antibiotika koja inhibira djelovanje kultura nije ista za sve vrste i sojeve BMK bifidobakterija. Bakterijske vrste iz sastava mezofilnih kultura tako su manje osjetljive na penicilin i spiramicin, a više na streptomycin i kloramfenikol u odnosu na bakterijske vrste termofilne kulture. Istovremeno, malo je informacija o koncentraciji ostatka antibiotika koja inhibira rast *Leuconostoc* spp. i *Bifidobacterium* spp. U fermentacijskom mlijeku učinak čak i vrlo niskih koncentracija ostatka antibiotika odražava se u sporijem ili potpunoj nemogućnosti stvaranja mliječne kiseline i komponenti koje sudjeluju u razvitku arome.

Ostatci antibiotika u mlijeku direktno utječu i na zdravlje ljudi. Simptomi bolesti ili poremećaja u

organizmu manifestiraju se kroz alergijske reakcije, intestinalne tegobe i rezistentnost djelovanja antibiotika na bakterije uzročnike drugih bolesti.

3.6.3.

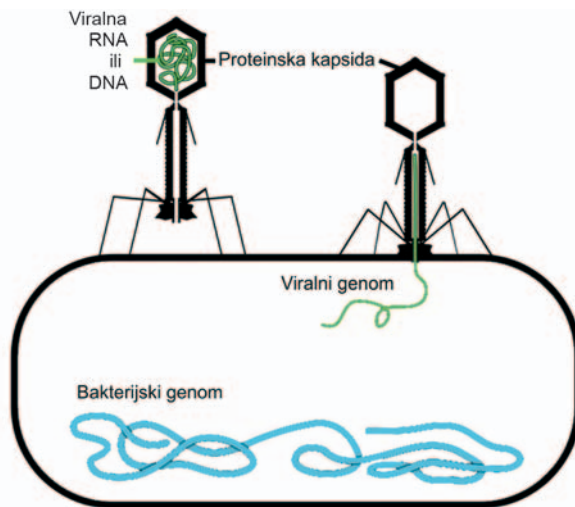
Bakteriofagi

Bakteriofagi su bakterijski virusi čiji ciklus razmnožavanja najčešće završava lizom bakterijske stanice i oslobađanjem tisuća novih viriona spremnih za infekciju sljedeće bakterijske stanice u mediju. Shematski prikaz načina infekcije bakterijske stanice bakteriofagom prikazan je na slici 3.20. Danas se smatra da su bakteriofagi, kojih je između 10^{30} i 10^{32} , najrašireniji biološki entitet na Zemlji i deset su puta brojniji od bakterija.

Svi biotehnoški procesi koje bakterije koriste za proizvodnju određenih molekula ili za proizvodnju bilo kojeg proizvoda izloženi su potencijalnoj opasnosti od bakteriofagne ili skraćeno fag-infekcije. Problemi uzrokovani bakteriofagima prisutni su u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj, industriji stočne hrane i proizvodnji pesticida. Međutim, mljekarska industrija je ona u kojoj su problemi uzrokovani bakteriofagima najčešći i najizraženiji.

U mljekarskoj industriji infekcija kultura bakteriofagima, koja se manifestira atipičnom fermentacijom, uzrok je znatnog ekonomskog gubitka. Prvi negativni učinci bakteriofaga u mljekarskoj industriji zabilježeni su već sredinom 30-ih godina 20. stoljeća. Neovisno o stupnju sanitacije, rotacije kultura i stalnom nastojanju da se razviju bakteriofag rezistentni bakterijski sojevi, fag-infekcija kultura u mljekarskoj industriji ostala je do danas glavni i ekonomski najvažniji čimbenik spore ili nekompletne fermentacije. Za te čimbenice odgovorne su tri glavne karakteristike faga:

- ubikvitarnost i kratak latentni period
- rezistentnost na toplinsku obradu mlijeka
- bakterijska soj-specifičnost.



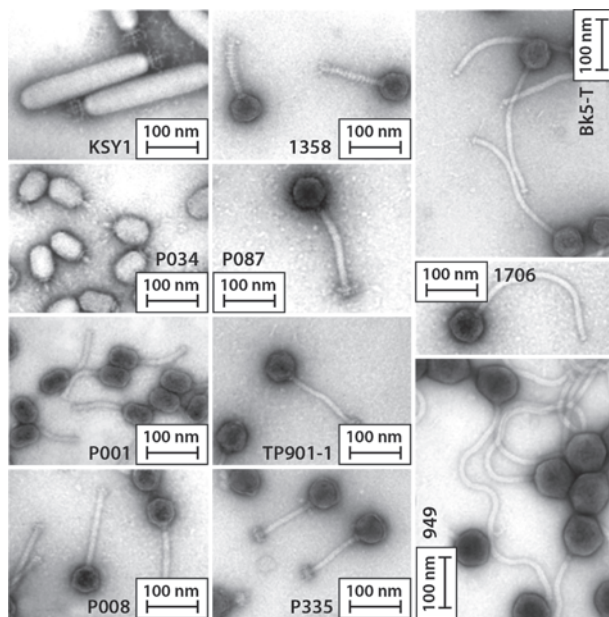
Slika 3.20.

Shematski prikaz načina infekcije bakterijske stanice bakteriofagom. (CC BY 2,5.)

U proizvodnji fermentiranih mlijeka zbog toga su izvori infekcije bakteriofagima:

- sirovo mlijeko
- toplinski obrađeno mlijeko
- svi ingredijenti, retentat ili permeat
- kultura sama za sebe
- zrak i sve dodirne površine u mljekari.

U sirovom mlijeku bakteriofagi su prisutni u relativno niskom titru (između 10^2 i 10^3 pfu mL^{-1} ; pfu - broj virulentnih faga), ali predstavljaju permanentan izvor infekcije u mljekarskom pogonu. Bakteriofagi se lako šire u mediju poput mlijeka, dovoljno je svega nekoliko fag-osjetljivih stanica BMK da se njihov broj u danom okruženju višestruko poveća. Zbog toga je sirovo mlijeko bez svake sumnje najveći izvor virulentnih bakteriofaga koji inficiraju BMK. Osim toga, njihova prisutnost u sirovom mlijeku određena je i uvjetima pohrane mlijeka na farmi i u mljekari, i načinima prikupljanja mlijeka i postupcima s mlijekom



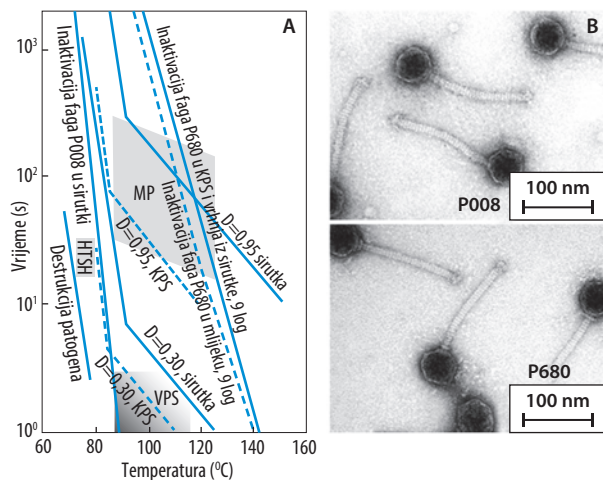
Slika 3.21.

Različit morfološki izgled infektivnih bakteriofaga *Lactococcus lactis* snimljen transmissijskim elektronskim mikroskopom (TEM).

Detalji: za usporedbu veličine bakteriofaga, na donjoj slici uz bakteriofag oznake Poo8 prikazana je i veličina proteina sirutke. (Atamer i sur., 2013., CC BY 3,0.)

u samoj mljekari. Sirovo mlijeko koje se prikuplja s različitih farmi nije samo izvor velikog broja, već je i izvor velike biološke raznovrsnosti faga. Procjenjuje se da je između 9 i 37 % mlijeka koje se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka kontaminirano termorezistentnim streptokokalnim i laktokokalnim fagima. Njihov titar u toplinski obrađenom mlijeku može biti i do 10^9 pfu mL⁻¹.

Obrano mlijeko u prahu ili bilo koji drugi mliječni ingredijenti koji se koriste za obogaćivanje suhe tvari mlijeka, a osobito retentat ili permeat (produkti membranske tehnologije ugušćivanja mlijeka), značajan su izvor kontaminacije kulture bakteriofagima. Nakon



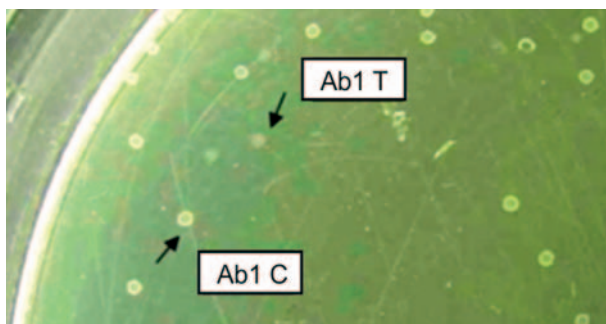
Slika 3.22.

(A) Temperaturno-vremenska krivulja toplinske obrade koncentrata proteina sirutke (5,3 % proteina) i obranoga mliječnog praha koja pokazuje potrebno vrijeme za 9-log inaktivaciju *Lactococcus lactis* faga P680 (termostabilan) i Poo8 (termolabilan), (B) morfološki izgled faga Poo8 i P680.

Detalji: MP proces za dobivanje mikroproteina, vrhnja obogaćenog proteinima sirutke, HTSH (pasterizacija) mlijeka, D stupanj denaturacije β -laktoglobulina, KPS koncentrat proteina sirutke. Morfološka slika faga dobivena je transmissijskim elektronskim mikroskopom (TEM). (Atamer i sur., 2013., CC BY 3,0.)

koncentriranja ili sušenja ingredijenata, fagi ostaju u ingredijentu i indirektno kontaminiraju mlijeko kojem se dodaju. Na slici 3.21. prikazan je morfološki izgled različitih vrsta termostabilnih bakteriofaga izoliranih iz koncentrata sirutke specifičnih za bakteriju *L. lactis*. Veličinom, oni su veći (promjer glave 50 - 75 nm, dužina repa 120 - 140 nm) od glavnih proteina sirutke (3 - 6 nm).

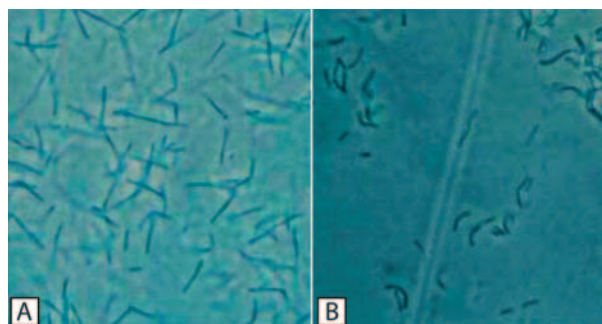
Za ilustraciju termostabilnosti laktokokalnih bakteriofaga, slika 3.22. pokazuje krivulju inaktivacije (vrijeme potrebno da se postigne inaktivacija faga od 99 %) za relativno termolabilan fag P008 i termostabilan fag P680 ovisno o mediju (mlijeko, sirutka,



Slika 3.23.

Morfološke varijante fag-rezistentnih sojeva *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab1.

Detalji: soj Ab1 C (okrugle neprozirne kolonije), soj Ab1 T (prozirne grube kolonije) na MRS agaru. (Suárez i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)



Slika 3.24.

Stanična morfologija sojeva Ab1 T i Ab1 C dobivenih iz fag-rezistentnog soja *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab1.

Detalji: (A) soj Ab1 T, (B) soj Ab1 C. Slika je dobivena svjetlosnim mikroskopom, povećanje 1000 x. (Suárez i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)

produkti sirutke). Na slici su, za usporedbu, prikazani i temperaturno-vremenski uvjeti koji se koriste u proizvodnji mikroproteina sirutke, pasteriziranog mlijeka, obranog mlijeka i vrhnja obogaćenog proteinima sirutke. Inaktivacija faga P008 od 99 % postiže se temperaturno-vremenskom kombinacijom od 70 °C/20 min ili 90 °C/1 s. Suprotno, za inaktivaciju faga P680 od 99 % potrebna je temperaturno-vremenska kombinacija od 100 °C/20 min ili 140 °C/2 s. Te temperaturno-vremenske kombinacije u proizvodnji mlijeka nisu prihvatljive, te se temperaturna eliminacija faga ne može koristiti kao strategija za njihovu kontrolu. Također, iz prikazanih podataka je vidljivo da temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade mlijeka obogaćenog mliječnim ingredientima (primjerice proteinima sirutke) koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka ne mogu kompletno inaktivirati termorezistentne bakteriofage.

Kultura sama za sebe izvor je bakteriofagne infekcije u slučajevima ako sadrži bakteriofage ugrađene u bakterijski kromosom koji se zbog toga permanentno repliciraju s bakterijskim genomom. Višestruko precjeppljivanje kulture u mlijeko (subkulture) može biti uzrok i zamjene inherentnog s novim virulentnim

mutant-fagom. Osim toga, na tržištu ne postoji niti jedna komercijalno dostupna kultura potpuno neosjetljiva na sve vrste bakteriofaga. Podjednako je i u slučajevima kada se na tržištu pojavi kultura koja pokazuje priličnu fag-rezistentnost. Obično nakon određenog perioda upotrebe kultura će biti pozitivna na fag-infekciju. Kontaminaciji bakteriofagima jednako su podložne i mezofilne i termofilne kulture. Dodatni je problem s fag-rezistentnim sojevima u činjenici da njihove stanice kćeri u tehnološkim karakteristikama često nisu jednako dobre kao roditeljske stanice. One čak u usporedbi s roditeljskom stanicom pokazuju i drukčije morfološke oblike. Za ilustraciju kompleksnosti problema fag-infekcije, na slici 3.23. prikazan je različit morfološki izgled sojeva (označenih oznakom Ab1C i Ab1T) dobivenih iz komercijalno fag-rezistentnog soja *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Ab1T) koji su vizualizirani na MRS agaru. Također, mikroskopska slika istih sojeva jasno pokazuje dvije varijante morfološke strukture bakterijskih stanica (slika 3.24.). Bakterijski soj Ab1C pojavljuje se u lancima kratkih zakrivljenih štapića, a soj Ab1T u savršeno dugačkim štapićima. Tehnološki, u konkretnom slučaju, fag-rezistentan soj Ab1T pokazao je slabiju acidifikacijsku aktivnost



Slika 3.25.

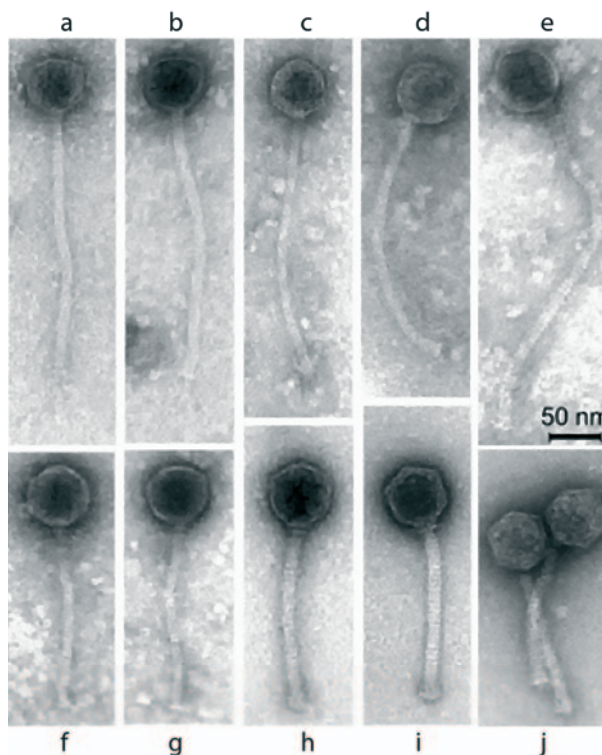
Streptococcus thermophilus fag (ALQ 13) koji formira rozete (mala slika). Slika je dobivena Philips EM 300 elektronskim mikroskopom; bar = 100 nm. (Quiberoni i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

u mlijeku (0,67 - 0,84 % mliječne kiseline) u usporedbi s roditeljskom stanicom (1,26 % mliječne kiseline). Osim toga, pokazao je i sporiju sposobnost tvorbe mliječne kiseline, ali i slabiju proteolitičku aktivnost.

Do danas su najbolje proučeni i dokumentirani *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* fagi. Za ilustraciju, na slici 3.25. prikazan je karakterističan izgled bakteriofaga koji inficira bakteriju *S. thermophilus*. Svi fagi koji inficiraju bakteriju *S. thermophilus* pripadaju fag porodici *Siphoviridea* koju karakteriziraju izometrijska kapsida i dugački nekontraktibilni "rep".

Za bakterije *Lactobacillus* spp. broj opisanih faga je manji zbog izuzetno kompleksnih fizioloških procesa karakterističnih za te vrste. Ipak, na znanstvenoj razini, u identifikaciji i taksonomiji bakteriofaga laktobacila

postignut je zaista velik napredak. Istovremeno, posljednjih godina podatci pokazuju povećanje fag- infekcije za specifične probiotičke sojeve, osobito vrsta *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* i *L. plantarum*. Na slici 3.26. prikazan je izgled izrazito termorezistentnih vrsta specifičnih bakteriofaga koji inficiraju bakterije iz sastava kultura: *S. thermophilus* (fag, 031-D, CGL-3, CGL-4, WPC-1), *L. casei* subsp.



Slika 3.26.

Morfološka slika termorezistentnih bakteriofaga koji inficiraju bakterije mliječne kiseline sadržane u sastavu kultura.

Detalji: *S. thermophilus* CGL-3 (a), CGL-4 (b), WPC-1 (c), 031-D (d); *L. casei* subsp. *casei* J-1 (e); *L. paracasei* subsp. *paracasei* C₁2 (f), MLC-A₃R (g); *L. lactis* subsp. *lactis* Poo8 (h), P680 (i), P1532 (j). Slika je dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). (Capra i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

casei (fag, J-1), *L. paracasei* subsp. *paracasei* (fag, MLC-A3R, C₁2) i *L. lactis* subsp. *lactis* (fag, P1532, P680, P008). Identifikacijom sojeva i vrsta specifičnih bakteriofaga omogućeno je stvaranje bakterijskih sojeva rezistentnih na bakteriofagnu infekciju. Međutim, prvenstveno zbog brojnosti bakteriofaga i bakterijskih sojeva unutar iste vrste BMK, problem infekcije kulture bakteriofagima je smanjen ali ne i riješen.

Zrak i sve površine koje dolaze u dodir s mlijekom mogu širiti fag-infekciju u proizvodnim pogonima mljekara. Kako fag za svoje širenje treba bakteriju domaćina, njegovi izvori bit će prvenstveno mjesta koja uvjetima odgovaraju rastu i razmnožavanju BMK. Zbog toga su uobičajeni izvori bakteriofaga ventili, procijepi i "mrtvi kutovi" procesnih linija. Bakterijski biofilm na procesnim površinama predstavlja također ozbiljan izvor bakteriofagne infekcije. Dezinfekcija zraka aerosolizacijom i radnih površina tekućim dezinficijensima zbog sposobnost faga vezanju za čestice manje od 2,0 μm nije u potpunosti učinkovita. Zbog toga se procjenjuje da zrak u mljekarskom pogonu sadrži i do 10⁸ pfu/m³ zraka.

U kojoj će mjeri fag-infekcija usporiti fermentaciju ili je potpuno zaustaviti i uzrokovati ostale nepoželjne posljedice ovisi o vremenu kada, i načinu kako će se ona dogoditi. Bakteriofagna infekcija na početku fermentacije uzrokovat će spori razvitak kiseline ili će koagulacija mlijeka potpuno izostati. U ovom konkretnom slučaju, rezidualna laktoza može postati supstrat za rast i metaboličku aktivnost bakterija uzročnika kvarenja koje će negativno utjecati na ukupnu kvalitetu proizvoda. Uzročno-posljedično mogu se stvoriti i optimalni uvjeti za rast i razmnožavanje patogenih bakterija s ozbiljnim konzekvencijama ugroze ljudskog zdravlja.

Selekcija kultura rezistentnih na fag-infekciju pokazala se donekle učinkovitom za mješovite kulture. U mješovitim kulturama za željenu fermentaciju proizvoda obično su iz sastava kulture odgovorni jedan ili dva dominantna bakterijska soja. Tako se fermentacija mlijeka i nakon fag-infekcije dominantnog soja može nastaviti, jer stvaranje mliječne kiseline može preuzeti

fag-rezistentan bakterijski soj. Međutim, ukupna kvaliteta i hranjiva vrijednost proizvoda bit će umanjene.

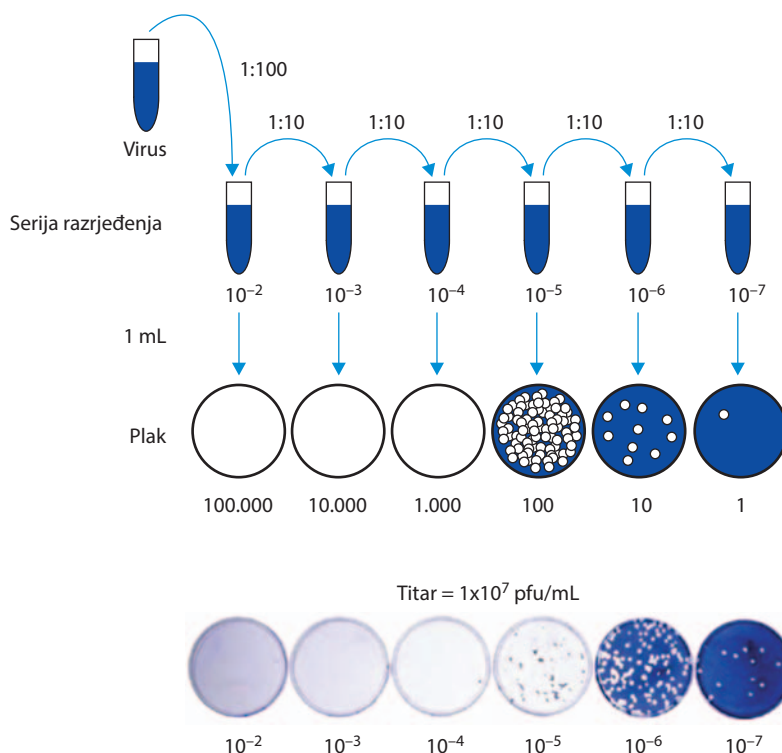
3.6.3.1.

Otkrivanje i kontrola

Prisutnost bakteriofaga u mljekarskim pogonima neizbježna je zbog njihovih inherentnih svojstava. Otkrivanje i sprječavanje širenja bakteriofaga zbog toga su elementarni dio svakog dobro organiziranoga proizvodnog procesa. U proizvodnom pogonu ili kulturi za otkrivanje bakteriofaga u principu se koriste dvije vrste metoda - direktne ili indirektne. Direktne su metode koje se koriste za otkrivanje faga: lančana reakcija polimerazom ili PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*), ELISA (imunoadsorpcijski enzimski test) i testovi temeljeni na metodi protočne citometrije. Kako je riječ o vrlo kompleksnim metodama, one nisu pogodne za rutinske svakodnevne analize u mljekari.

Standardne indirektne mikrobiološke metode, poput plak-testa, spot-testova ili testova aktiviteta, u mljekarskoj industriji smatraju se zlatnim standardom za utvrđivanje prisutnosti faga. Prednosti su tih mikrobioloških testova u sposobnosti diskriminacije između fag i nefag inhibitora testiranog uzorka. Uvjetno, njihovi nedostaci su potreba za senzitivnim bakterijskim sojem i relativno dugo vrijeme za dobivanje rezultata.

Plak analiza omogućava detekciju i utvrđivanje broja faga u analiziranom uzorku kulture. U slučaju kontaminacije, na temelju dobivenih rezultata moguća je relativno brza rotacija kulture ili pojačana sanitacija proizvodnog pogona. Plak-analiza dobra je i za sistemsku higijensku kontrolu "kritičnih" mjesta u pogonu ili postrojenju. Za tu svrhu koristi se polučvrsti agar koji podržava bakterijski rast i razmnožavanje, a metoda inokulacije uzorka je vrlo slična metodi utvrđivanja ukupnog broja bakterija u mlijeku. Nakon inokulacije, analiziranom se uzorku doda 5 - 20 μL fag-razrjeđenja i slijedi inkubacija od 24 - 48 sati. Fagom inficirani uzorak formira vidljiv plak (jasne mrlje) na hranilištu koji je rezultat destrukcije bakterijske stanice. Broj tih mrlja je broj infektivnog



Slika 3.27.

Shematski prikaz izvođenja plak-testa i načina brojanja faga u analiziranom uzorku. (CC BY –SA 3,0.)

faga (viralni titar) koji se izražava u pfu mL^{-1} . Stvoreni plak znači: (i) testirani uzorak sadrži fag, (ii) fag je virulentan za bakterijski soj i (iii) bakterijska stanica je osjetljiva na fag. Shematski prikaz izvođenja plak-testa prikazan je na slici 3.27.

Za internu kontrolu fag-infekcije u mljekarskoj industriji koristi se i standardni test – praktična fag kontrola (engl. *Practical Phage Control*, IDF-Bulletin 263, 1991.). Suspektni uzorak u standardnim test staklenim epruvetama zagrijava se na temperaturu od $90\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ Temperaturno-vremenska kombinacija provedenog testa trebala bi biti dovoljna za inaktivaciju bakteriofaga prisutnih u uzorku bez učinka na druge moguće inhibitore kulture, poput rezidua antibiotika ili u manjoj mjeri rezidua dezinficijensa.

Međutim, zbog moguće kontaminacije kulture izrazito termostabilnim bakteriofagima preporučuje se suspektne uzorke zagrijavati na temperaturi od $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, ali umjesto 15 minuta produžiti vrijeme zagrijavanja suspektnih uzoraka na 45 minuta.

U mljekarskom je pogonu za utvrđivanje fag-infekcije praktično koristiti i jednostavan test utvrđivanja acidifikacijske aktivnosti kulture koja je u dnevnoj primjeni. Jedan uzorak kulture, inokulira se filtriranim uzorkom brisa površine procesnog postrojenja, a drugi uzorak filtriranim i steriliziranim uzorkom istog brisa. Ako se pH u kulturi povisi za 0,2 jedinice u usporedbi s kulturom inokuliranom sterilnim inokulatom, znači da je u proizvodnom pogonu kontaminacija bakteriofaga visoka. U tom je slučaju potrebna

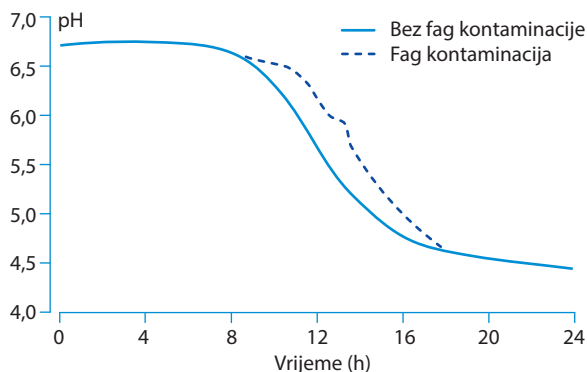
rotacija kulture i dezinfekcija kontaktnih površina koncentriranim aktivnim sredstvom.

Umjesto mjerenja pH-vrijednosti, za suspektne kulture može se koristiti i bromkrezol ljubičasti indikator ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Analiza za mezofilnu kulturu traje približno šest, a za termofilnu približno četiri sata. Indikator iz ljubičaste prelazi u žutu boju kada se pH- vrijednost snizi na manje od 5,4. Istovremeno, ako indikator iz uzorka kulture s nesteriliziranim filtratom postane zelen ili ostane ljubičast, znači da je fag-infekcija prisutna i da u proizvodnji fermentiranog mlijeka već ima negativan učinak na fermentaciju.

Način utvrđivanja fag-infekcije može se temeljiti i na permanentnom mjerenju pH-vrijednosti fermentacije mlijeka koja se provodi u fermentacijskim spremnicima. Mjerenja se moraju provoditi u kratkim vremenskim razmacima i bilježiti na grafikonu. Atipična krivulja, koja nije povezana s promjenama temperature fermentacije, čak i u onim slučajevima ako fermentacijski proces nije sporiji, kontaminacija bakteriofagima je vjerojatna (slika 3.28.). Međutim, treba istaknuti da ovom metodom utvrđena sporija fermentacija može biti uzrokovana i drugim inhibitorima, poput rezidua antibiotika, deterdženata ili sanitacijskih sredstava.

Kontrole rizika od fag-infekcije temelje se na razvitku i implementaciji različitih procedura specifičnih za uvjete proizvodnje u pojedinačnim mljekarama. Ipak, kontrola fag-infekcije u svakoj mljekari, neovisno o specifičnostima, treba osigurati:

- dnevno utvrđivanje prisutnosti faga
- nemogućnost križanja putova unutar proizvodnog pogona
- malu različitost dnevne proizvodnje proizvoda
- rotaciju kultura
- korištenje antifag medija za pripremu subkultura
- provođenje aseptičke inokulacije kultura
- korištenje pozitivnog tlaka u fermentacijskim spremnicima gdje je to moguće
- korištenje sterilizacije parom u proizvodnim linijama gdje je to moguće, osobito kada je kontaminacija fagima visoka

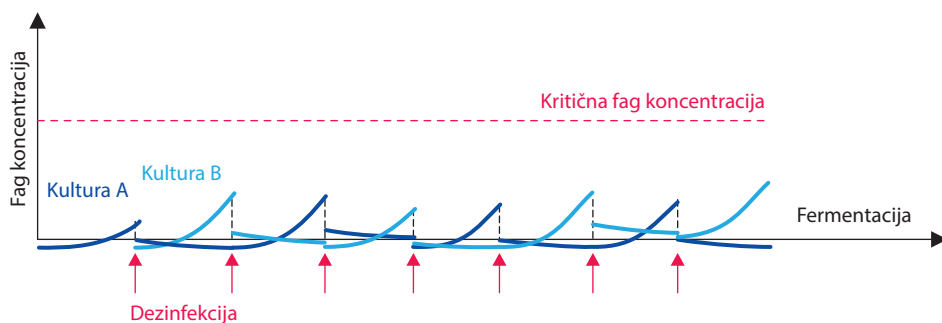


Slika 3.28.

Izgled krivulje acidifikacije mlijeka inokuliranog mješovitom kulturom u prisutnosti virulentnih bakteriofaga. (Szczepankowska i sur., 2013., CC BY 3,0.)

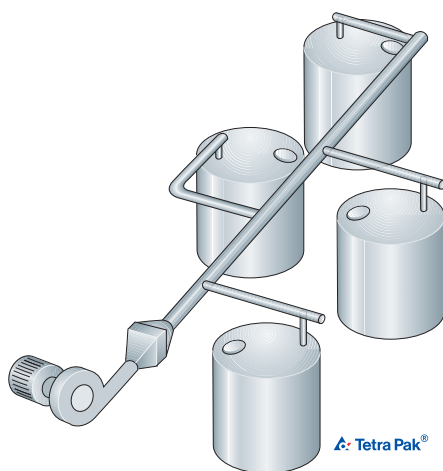
- proizvodnu fermentacijsku zonu odvojenu od pakiranja
- korištenje HEPA filtracije zraka i pozitivnog tlaka u proizvodnim pogonima
- odvojene zone pohrane sirovog mlijeka, vode i drugih sirovina od proizvodnog pogona
- redovito čišćenje i dezinfekciju proizvodnih linija, podova, zidova i odvoda odmah nakon završenog procesa proizvodnje
- mogućnost kompletne redezinfekcije proizvodne linije nakon dužeg vremena nekoristenja
- redovitu dezinfekciju mjernog pribora nakon svake upotrebe (pH-metar elektrode, toplomjere i sl.)
- korištenje dezinfekcijskih barijera prilikom svakog ulaženja i izlaženja iz proizvodnog pogona.

Jedna je od dobrih strategija u sprječavanju širenja bakteriofaga i kooperacija između proizvođača kultura i korisnika u izradi zajedničkog plana rotacije kultura. Zajednički plan osigurava: (i) bolje i učinkovitije praćenje moguće kontaminacije i sigurnog perioda između rotacija kultura i (ii) plana čišćenja i dezinfekcije prilagođen specifičnim uvjetima svake pojedinačne mljekare. Dizajn mogućeg načina rotacije mješovitih kultura prikazan je na slici 3.29.



Slika 3.29.

Shematski prikaz primjera plana rotacije kulture i dezinfekcije u slučajevima bakteriofagne kontaminacije. (Szczepankowska i sur., 2013., CC BY 3,0.)



Slika 3.30.

Sistem za filtraciju zraka kroz apsolutni filtar za proizvodni prostor i proizvodno postrojenje. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Sistem za filtraciju zraka kroz apsolutni ili HEPA filtar (slika 3.30.) može biti instaliran za čišćenje zraka u procesnom prostoru, procesnim spremnicima, u mikrobiološkim laboratorijima i drugim za proizvodnju važnim prostorima u mljekari. Apsolutni filtar ima sposobnost zaustavljanja svih čestica većih od $0,3 \mu\text{m}$ i zbog toga i većina bakterija, kvasaca i plijesni ne mogu ući u proizvodno okruženje. Protočnost zraka u apsolutnim je filtrima približno $0,5 \text{ m/s}$, a pozitivan tlak u spremniku približno $0,05 - 0,1 \text{ bar}$ ($< 0,001 \text{ MPa}$). Prikazani sistem filtriranja zraka (slika 3.30.) služi za filtriranje zraka u četiri spremnika, ali je bolja opcija da svaki spremnik ima svoj vlastiti sistem za filtraciju zraka. Ugradnja apsolutnih filtara u proizvodni prostor poboljšava sigurnost u proizvodnji i smanjuje rizik od reinfekcije. Međutim, u proizvodnji fermentiranih mlijeka najkritičnija su mjesta za mikrobnu reinfekciju ili fag infekciju punilice za dodatak voća i pakiranje. Zbog toga je iznimno važno da se tijekom tih tehnoloških operacija provode stroge higijenske mjere.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka**
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka

Uvod

Tehnologija proizvodnje svih fermentiranih mlijeka u osnovi je gotovo istovjetna. Osobito je ta tvrdnja točna u slučajevima ako je tehnološki proces proizvodnje fermentiranih mlijeka temeljen isključivo na mliječnoj fermentaciji. Zbog toga se sva fermentirana mlijeka razlikuju prvenstveno prema detaljima vezanima za proizvođača, a manje za sam proizvod. Razlike postoje i između iste vrste fermentiranog mlijeka različitih proizvođača, ali su one najvećim dijelom uvjetovane karakteristikama korištene kulture, a manje su tehnološke prirode.

U tehnološkom smislu, za istu vrstu proizvoda razlikujemo fermentirana mlijeka s čvrstom teksturom ili fermentirana mlijeka s polutekućom ili tekućom teksturom. Čvrstu teksturu imaju i koncentrirana fermentirana mlijeka poput labneha (Libanon, arapske zemlje).

Proizvodnja fermentiranih mlijeka započinje obogaćivanjem ili standardizacijom mlijeka na poželjan udjel suhe tvari bez masti (Sbm), omjer kazein : proteini sirutke i udjel mliječne masti. Pojam obogaćivanje mlijeka podrazumijeva i dodatak tvari za poboljšanje fizikalnih i reoloških svojstava proizvoda poput boja, stabilizatora ili enzima. Mlijeko se ali rjeđe može obogatiti i dodatkom vitamina ili minerala, i tvarima koje se smatraju promotorima bakterijskog rasta. Ponekad se mlijeko za proizvodnju fermentiranih mlijeka obogaćuje i dodatcima poput fitosterola (obično derivatima soje) ili omega 3,6 masnim kiselinama. Ono se može obogatiti i dodatcima koji se smatraju promotorima humanog zdravlja, glukozaminom, laktoferinom, vitaminima B kompleksa ili mineralima poput

Ca, Mg, Zn, Fe i Se. Obogaćivanje suhe tvari mlijeka zbog bolje teksture proizvoda tehnološki je poželjna operacija, ali treba istaknuti da se u nekim zemljama fermentirana mlijeka proizvode i bez prethodnog postupka obogaćivanja Sbm mlijeka. Važno je istaknuti i činjenicu da obogaćivanje Sbm mlijeka ni u jednoj zemlji nije regulirano zakonskom legislativom.

U tehnologiji proizvodnje fermentiranih mlijeka najčešće se mlijeko homogenizira, nakon čega slijedi njegova toplinska obrada. Toplinski obrađeno mlijeko potom se ovisno o vrsti fermentiranog mlijeka hladi na temperaturu 20 - 45 °C i inokulira mikrobnom kulturom. Nakon inokulacije slijedi fermentacija - biokemijsko-fizikalno-kemijski-proces koji uvjetuje acidifikaciju mlijeka i promjenu strukture ishodišnog mlijeka. Slijedi završno hlađenje proizvoda na 2 - 4 °C i pohrana pakiranog proizvoda do potrošnje na istim temperaturama.

Mlijeko je integralni dio fermentiranih mlijeka, ali njegovom preradom u fermentirano mlijeko povećava se nutritivna ili hranjiva vrijednost njegovih prirodnih sastojaka. Osim toga, biokemijskim procesima djelovanjem bakterija iz sastava kultura nastaju određeni spojevi koje imaju pozitivne fiziološke učinke na humani organizam.

U cilju cjelovitog razumijevanja tehnologije proizvodnje fermentiranih mlijeka, u ovom poglavlju knjige uz osnovne tehnološke principe i procese proizvodnje opisane su i karakteristike mlijeka važne za ukupnu kvalitetu fermentiranih mlijeka.



4.1.

—
Mlijeko

Kvalitetu sirovog mlijeka određuju tri odvojene ali međusobno nedjeljive kvalitete: kemijska, fizikalna i higijenska. Fizikalna i kemijska kvaliteta mlijeka određene su genetičkom predispozicijom jedinke, pasminom, vrstom životinje, hranidbom i menadžmentom.

Tablica 4.1.

—
Prosječan kemijski sastav kravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka

Vrsta mlijeka	Voda (%)	Sbm* (%)	Mliječna mast (%)	Protein (%)	Kazein (%)	Albumin/globulin (%)	Neproteinski N (%)	Pepeo (%)
Kravlje	86,6	9,0	4,1	3,2	2,6	0,6	0,2	0,7
Kozje	88,7	8,9	3,8	3,4	2,4	0,6	0,4	0,8
Ovčje	81,0	12,0	7,9	6,2	4,2	1,0	0,8	0,9

*Sbm - suha tvar bez masti (prema Posatiu i Orru, 1976., Anifantakis i sur., 1980., Jennessu, 1980., Heanlainu i Cacceseu, 1984.)

Higijenska kvaliteta mlijeka mijenja ih u pozitivnom ili negativnom smislu i u trenutku prerade određuje njegova kemijska, fizikalna i tehnološka svojstva. Za proizvodnju fermentiranih mlijeka, kao uostalom i za proizvodnju svih mliječnih proizvoda, kvaliteta sirovog mlijeka odgovorna je za organoleptičku, kemijsku i mikrobiološku kvalitetu finalnog proizvoda.

Kemijski sastav i fizikalna svojstva mlijeka čine temelj za sve tehnološke procese koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka. U tom smislu, za uspješnu proizvodnju fermentiranih mlijeka presudan je izbor visokokvalitetnoga sirovog mlijeka koje istovremeno prirodno ima i poželjna tehnološka (pre-radbena) svojstva.

4.1.1.

—
Kemijski sastav

Kemijski je mlijeko kompleksna fiziološka tekućina u kojoj se nalazi više od 100.000 zasebnih molekula i kemijskih spojeva, čija je koncentracija ovisna o vrsti mlijeka. Uobičajeno se termin kemijski sastav mlijeka

odnosi na njegove komercijalno najvažnije sastojke: mliječnu mast, protein, laktozu i pepeo. Vrlo često, sastav mlijeka u praksi se izražava i udjelom suhe tvari bez masti (Sbm), ili udjelom suhe tvari (ST). Suhu tvar bez masti koja se opisuje i kao suha tvar plazme čine udjeli proteina, laktoze i pepela u mlijeku. Suha tvar mlijeka, osim suhe tvari plazme, sadrži i mliječnu mast. Prosječan kemijski sastav kravljega, kozjeg i ovčjeg mlijeka prikazan je u tablici 4.1.

Udjel pepela nije potpuni ekvivalent koncentraciji soli u mlijeku budući da neke od soli, poput klorida i organskih soli, postupkom određivanja pepela u mlijeku (koriste se visoke temperature) ispare ili se potpuno ili djelomično razore.

Osim razlika u sastavu mlijeka uvjetovanih pasminom i vrstom muzne životinje, na glavne sastojke mlijeka značajno utječu i čimbenici poput:

- individualnosti životinje
- redoslijeda i perioda laktacije
- intervala između mužnji
- količine mlijeka
- načina hranidbe
- temperaturnih uvjeta vanjske sredine
- godišnjeg doba
- zdravstvenog statusa životinje.

Za prosječan sastav skupnog mlijeka koje se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka negenetski čimbenici nemaju veće značenje. Ipak, zanimljiv je sezonski utjecaj variranja udjela proteina i minerala u mlijeku, čije promjene direktno utječu na viskoznost i strukturu

fermentiranih mlijeka. U nekim je geografskim područjima udjel proteina i minerala u mlijeku najniži u kasno proljeće i u ranim ljetnim mjesecima. Zbog toga je u takvim slučajevima za poboljšanje viskoznosti gotovog proizvoda poželjno suhu tvar bez masti (Sbm) u mlijeku obogatiti 0,25 - 0,50 %. Sezonske varijacije udjela proteina na viskoznost proizvoda nemaju utjecaj na voćne jogurte ili druga fermentirana mlijeka u čijoj se proizvodnji koriste stabilizatori poput modifikiranog škroba ili želatine.

4.1.1.1.

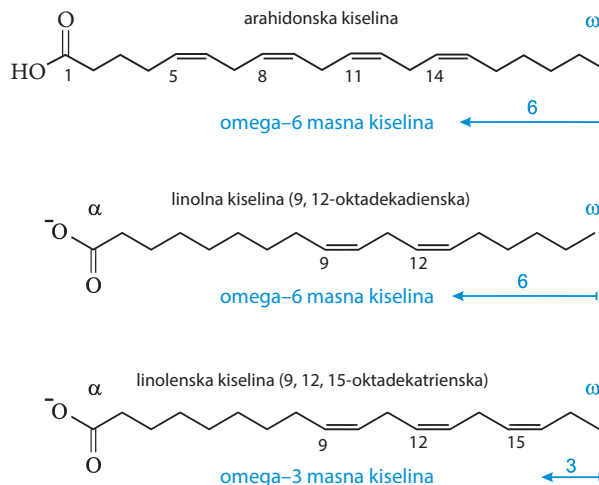
Voda

Voda u mlijeku je fiziološka tekućina u kojoj su sve komponente mlijeka (ukupna suha tvar) otopljene ili suspendirane. Udjel vode u kravljem mlijeku različitih pasmina varira između 85,4 i 87,7 %. Mali udjel vode ($\leq 2\%$) u mlijeku čini vezana (hidratizirana) voda u sastavu laktoze, soli i proteina.

4.1.1.2.

Mliječna mast

Mliječna se mast zbog svoje hranjive vrijednosti, fizikalnih i senzornih svojstava važnih za sve mliječne proizvode smatra najvažnijom komponentom mlijeka. Premda bez nekog određenog vlastita okusa, mliječna mast mliječnim proizvodima daje bogat okus i glatkoću strukture. Ona je izvor energije i vitamina topljivih u mastima (A, D, E i K) i esencijalnih masnih kiselina. Arahidonska kiselina (omega-6), koja ima četiri dvostruka veza, nalazi se u mliječnoj masti u tragovima, a njezin je prekursor linolna kiselina. Od omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, u mliječnoj masti zastupljene su u tragovima α -linolenska kiselina (ALA; $C_{18:3}$) i njezini produkti, eikosapentaenska kiselina (EPA; $C_{20:3}$), i dokosaheksaenska kiselina (DHA; $C_{22:3}$) u znatnijoj koncentraciji. Kemijska struktura najznačajnijih polinezasićenih masnih kiselina sadržanih u mliječnoj masti prikazana je slikom 4.1.



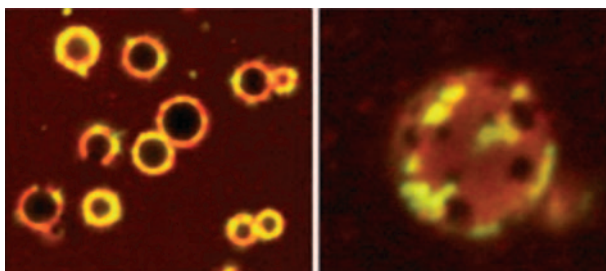
Slika 4.1.

Kemijska struktura arahidonske kiseline (C_{20:4}; ω-6), linolne kiseline (C_{18:2}; ω-6) i linolenske kiseline (C_{18:3}; ω-3). (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=omega-3+masne+kiseline>.)

Ovisno o pasmini i vrsti, udjel mliječne masti u kravljem mlijeku prosječno je između 3,4 i 5,1 %, u ovčjem ~ 7,9, a u kozjem ~ 3,8 %. Varijacije u udjelu mliječne masti u mlijeku svake mliječne pasmine ovise o individualnim karakteristikama životinje, periodu i redoslijedu laktacije, hranidbi, okolišnim uvjetima i načinu mužnje. Skupno kravlje mlijeko koje se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka sadrži između 3,5 i 3,8 % mliječne masti.

U svježe pomuzenom mlijeku mliječna mast je disperzirana u mikroskopskoj globularnoj emulziji mliječne plazme. Masne čestice okruglastog su oblika, obavijene biološkom membranom i nazivaju se masnim globulama ili globulama mliječne masti (slika 4.2.).

Prosječna je veličina masnih globula kravljeg mlijeka 4,5 μm. U mlijeku su one najčešće prisutne u tri veličine: manje od 2 μm, srednje 3 - 5 μm i velike 8 - 15 μm (slika 4.3.). Prosječna je veličina masnih globula ovčjeg približno 5 μm, a kozjeg mlijeka $\leq 3,0$ μm



Slika 4.2.

Izgled globula mliječne masti obavijenih membranom. (Lopez, 2011., s dopuštenjem Elseviera.)

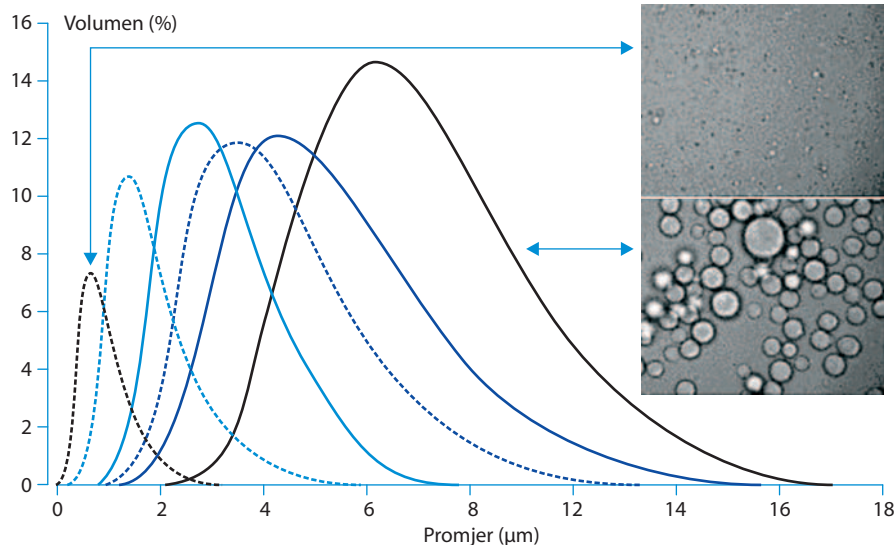
(65 % masnih globula manje je od 3 μm). Globule mliječne masti približno sadrže 99 % svih lipida prisutnih u mlijeku.

Podatak o veličini globula mliječne masti u mlijeku važan je za proces homogenizacije i za omjer pojave aglutinacije ili izdvajanja mliječne masti na površinu mlijeka. Homogenizacijom mlijeka promjer masnih globula se ujednačava i smanjuje na veličinu 0,5 - 1,0 μm , a njezina je učinkovitost bolja kada su masne globule u mlijeku većeg promjera. Aglutinacija je pojava

koja uzrokuje nakupljanje mliječnih globula u ohlađenom mlijeku i njezino relativno brzo izdvajanje na površinu mlijeka. U ohlađenom je mlijeku aglutinin [kompleksni spoj krioglobulina (dominantno imunoglobulina M) i lipoproteina] nakon precipitacije na masne globule uzrok sljedećih međusobno povezanih nespecifičnih fizikalno-kemijskih reakcija:

- "prekrivene" masne globule nakupljaju se u velike čestice
- velike čestice brzo rastu
- velike čestice zahvaćaju male čestice masnih globula i ubrzavaju flokulaciju masnih globula prema površini mlijeka
- brzo formiranje masnog sloja (vrhnja) na površini mlijeka neovisno o veličini spremnika za mlijeko.

Miješanje ohlađenog mlijeka usporava aglutinaciju, a homogenizacijom, termizacijom i toplinskom obradom mlijeka aglutinin se inaktivira. Toplinskom obradom mlijeka reakcija inaktivacije aglutinina paralelna je s denaturacijom imunoglobulina. U praksi, premda rijetko, homogenizacijom se aglutinin ne inaktivira u potpunosti, te se u većoj ili manjoj mjeri tijekom hladne pohrane proizvoda nakupljaju masne globule. Nepoželjno nakupljanje mliječne masti u proizvodu



Slika 4.3.

Veličina i distribucija globula mliječne masti u kravljem mlijeku. (Michalski i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

dogada se osobito u slučajevima ako se sirovo mlijeko razdvoji na vrhnje i obrano mlijeko, te se potom provodi njihova zasebna homogenizacija. Aglutinin se ne inaktivira homogenizacijom obranog mlijeka. Uključivanje klarifikacije (pročišćavanja) mlijeka u tehnološki proces nakon koje slijedi homogenizacija može pogodovati aglutinaciji. Homogenizacijom u tom slučaju neće biti obuhvaćene klarifikacijom nastale masne globule male veličine, budući da se one izdvajaju u liniju obranog mlijeka.

U proizvodnji fermentiranih mlijeka homogenizacijom, osim ujednačavanja i smanjenja veličine masnih globula poboljšavaju se i reološka svojstva mlijeka. Povezivanje masti i proteina u mlijeku posljedično je uzrok poželjnog povećanja viskoziteta mlijeka. Osim toga, u homogeniziranom mlijeku masne su globule djelomično agregirane s kazeinskim micelama, te one zbog toga postaju dio kazeinske mreže koja se formira fermentacijom mlijeka.

Globula mliječne masti sastavljena je od saturiranih lipida mlijeka u obliku triacilglicerola (estera masnih kiselina i alkohola glicerola). Od ukupnih lipida mlijeka triacilgliceroli čine ~ 98 %. Ostatak lipida u mlijeku čine minorni udjeli diacilglicerola, monoacilglicerola, slobodnih masnih kiselina, fosfolipida, kolesterola i polarnih lipida (tablica 4.2.).

Sintezom u mliječnoj žlijezdi i sekrecijom u mlijeko na fiziološkim temperaturama (36 - 39 °C) triacilgliceroli (TAG) unutar masne globule su tekući. Snižavanjem temperature mlijeka tekući lipidi prelaze u čvrsto stanje nakon čega formiraju kristale. Sposobnost kristalizacije triacilglicerola unutar masne globule u tehnološkom smislu proizvodnje fermentiranih mlijeka važna je za:

- fizikalnu stabilnost mliječne masti prema oštećenju membrane masne globule
- reološka svojstva konzistencije proizvoda
- osjećaj okusa u ustima.

Svojstva kristalizacije i topljenja mliječne masti prvenstveno su određena sastavom i molekularnom težinom (470 - 890 g/mol) masnih kiselina te polimorfizmom triacilglicerola. Za kravlje mlijeko, kristalizacija

Tablica 4.2.

Sastav mliječne masti/lipida u kravljem mlijeku

Masne frakcije	g/L	% u mliječnoj masti (w/w)
Triacilgliceroli	30,70	95,80
Diacilgliceroli	0,72	2,30
Monoacilgliceroli	0,03	0,08
Slobodne masne kiseline	0,09	0,28
Fosfolipidi	0,36	1,11
Kolesterol	0,15	0,46
Kolesterol esteri	0,006	0,02
Karotenoidi i vit. A	–	0,002

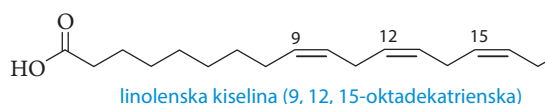
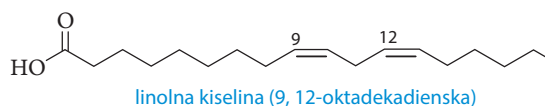
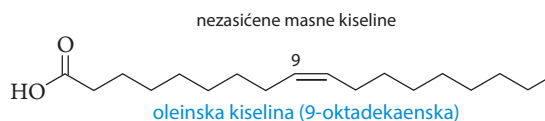
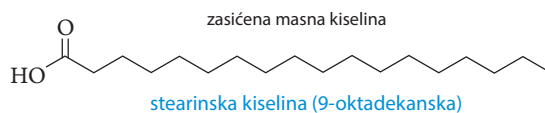
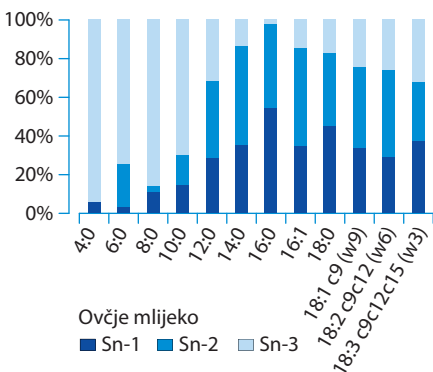
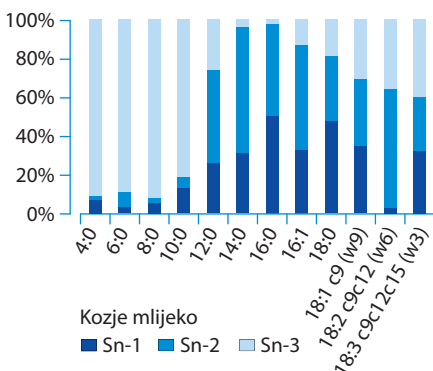
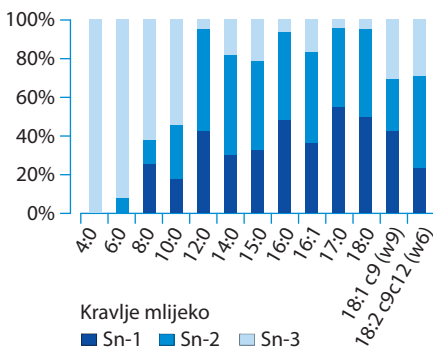
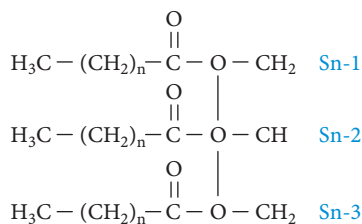
(prilagođeno prema Chandanu, 2006., i Walstri i sur., 1999.)

mliječne masti može se istovremeno događati na temperaturama od -40 do 40 °C. Zbog toga je udjel čvrstih masti unutar masne globule kravljeg mlijeka između 50 i 70 % nakon njegove pohrane od 48 sati na temperaturi od 4 °C, a tek 3 - 5 % na temperaturi od 37 °C.

Pozicija pojedinačnih masnih kiselina u molekularnoj strukturi triacilglicerola nije slučajna. U molekuli glicerola poziciju sn-1 i sn-2 uglavnom popunjavaju miristinska (C_{14:0}), palmitinska (C_{16:0}), stearinska (C_{18:0}), ili oleinska kiselina (C_{18:1}). Pozicija sn-3 u molekuli glicerola uglavnom sadrži maslačnu (C_{4:0}), kapronsku (C_{6:0}) ili oleinsku kiselinu (C_{18:1}). Osim nutritivne važnosti, stereospecifična struktura triacilglicerola je značajna za kemijska, fizikalna, tehnološka i funkcionalna svojstva mliječne masti. Intramolekularna struktura triacilglicerola (TAG) masne globule i relativan udjel masnih kiselina (mol %) esterificiranih na poziciji sn-1, sn-2 i sn-3 u mlijeku različitih vrsta muznih životinja prikazan je na slici 4.4.

Funkcionalna svojstva mliječne masti određena su sastavom masnih kiselina kojih je u mlijeku opisano više od 400. Od ukupno opisanih, u strukturi triacilglicerola mliječne masti prisutno je samo 12 masnih kiselina u koncentraciji većoj od 1 %. Istovremeno za čovjeka biološki važne kratkolančane masne kiseline (C₄-C₈) čine približno 7 - 8 %. Prema kemijskoj strukturi masnih kiselina, triacilgliceroli sadrže 62 % zasićenih, 29 % monozasićenih i 4 % polinezasićenih

Intermolekularna struktura TAG



Slika 4.5.

Strukturni izgled zasićenih, monozasićenih i polinezasićenih masnih kiselina sadržanih u globuli mliječne masti. (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=masna+kiselina>.)

masnih kiselina (slika 4.5.). Izvor masnih kiselina mlijeka je krvna plazma ili se one sintetiziraju u mliječnoj žlijezdi.

Poput varijacija u udjelu mliječne masti u mlijeku, postoje i razlike u sastavu masnih kiselina sadržanih u triacilglicerolima između različitih i unutar istih vrsta muznih životinja. Te su razlike određene prvenstveno genetskim čimbenicima, periodom i redosljedom laktacije i u znatnoj mjeri hranidbom. Prosječne udjele najzastupljenijih masnih kiselina u kravljem, kozjem i ovcjem mlijeku prikazuje tablica 4.3.

Slika 4.4.

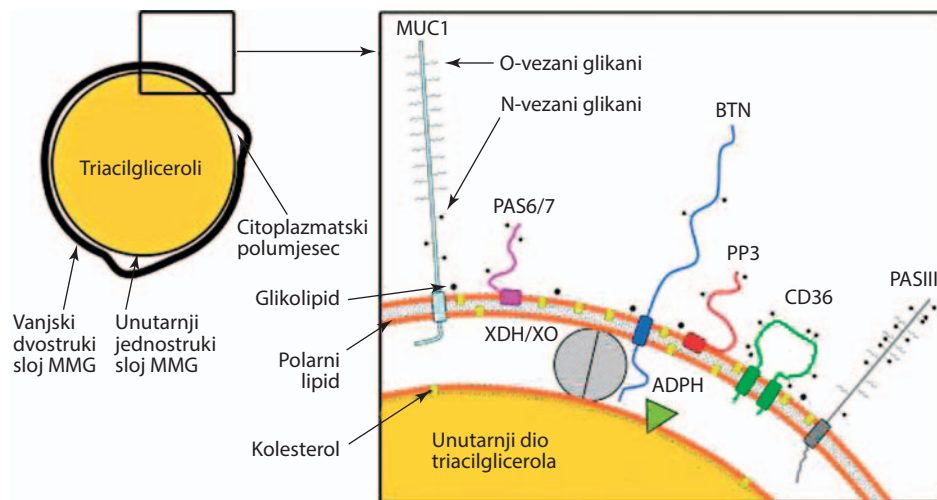
Unutarnja struktura triacilglicerola (TAG) kravljega, kozjega i ovcjeg mlijeka s obzirom na postotak esterificiranih (mol %) masnih kiselina u Sn-1, Sn-2 i Sn-3 poziciji. (Prilagođeno prema Lopez, 2011.)

Tablica 4.3.

Udjel najzastupljenijih masnih kiselina u mliječnoj masti mlijeka

(prema Chandanu, 2006.; Parku i sur., 2007.; Lopez, 2011.; Barlowska i sur., 2011.)

Masne kiseline	Naziv	Kravlje (%)	Kozje (%)	Ovčje (%)
C _{4:0}	Maslačna	3,8	2,9	3,5
C _{6:0}	Kaprionska	2,4	3,4	2,9
C _{8:0}	Kaprilna	1,4	2,7	2,6
C _{10:0}	Kaprijska	3,5	9,9	7,8
C _{12:0}	Laurinska	4,6	5,0	4,3
C _{14:0}	Miristinska	12,8	9,8	10,4
C _{14:1}	Miristolenska	1,6	0,18	0,3
ISO-C _{15:0}	–	1,1	0,3	0,1
C _{16:0} (razgranata)	–	0,3	0,24	0,2
C _{16:0}	Palmitinska	43,7	28,2	25,9
C _{16:1}	Palmolenska	2,6	1,6	1,0
C _{17:0}	–	0,3	0,72	0,6
C _{18:0} (razgranata)	–	0,3	0,15	0,5
C _{18:0}	Stearinska	11,3	8,9	9,6
C _{18:1}	Oleinska	27,4	19,3	21,1
C _{18:2}	Linolna	1,5	3,2	3,2
C _{18:3}	Linolenska	0,6	0,4	0,8



Slika 4.6.

Shematski prikaz strukture globule mliječne masti i njezine membrane s detaljnim prikazom glavnih proteina koji su smješteni u membrani.

Detalji: dvostruki sloj polarnih lipida smješten je na unutarnjem jednostrukom sloju polarnih lipida. Membranski specifični proteini raspoređeni su asimetrično uzduž membrane. Adipofilin (ADPH) koji ima vrlo visoki afinitet prema triacilglicerolima smješten je na unutarnjem jednostrukom sloju polarnih lipida, ksantin dehidrogenaza/oksidaza (XDH/XO) smještena je između dvaju slojeva polarnih lipida i usko povezana s butirofilinom (BTN), koji je transmembranski protein vanjskog sloja i ADPH, a zajedno oni stabiliziraju MMG, Mucin 1 (MUC1) protein koji je visoko glikoliziran, BTN i proteaze peptonske frakcije (CD36 i PASIII) smještene na vanjskom sloju. Proteini PAS 6/7 (poznati pod imenom laktaderhini) i PP3 labavo su vezani za vanjsku stranu MMG. Fosfolipidi, fosfatidilkolin (PC) i sfingomijelin (SM) i glikolipidi, cerebrozidi i gangliozidi uglavnom su smješteni na vanjskoj strani MMG, dok su minorni lipidi fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilinozitol (PI) i fosfatidilserin (PS) uglavnom koncentrirani na unutarnjoj strani membrane. (Affolter i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

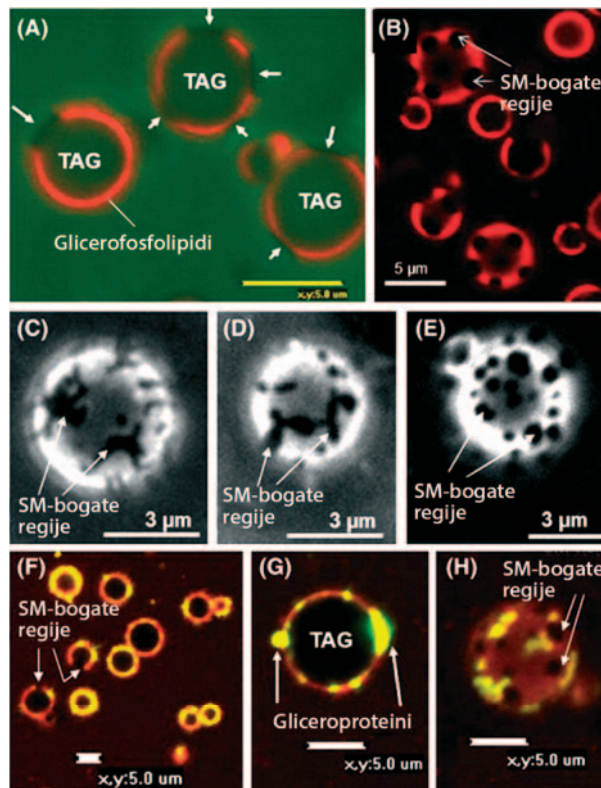
Masna globula u prirodnom mlijeku je obavijena vrlo tankom biološkom membranom (5 - 10 nm) i čini 2 - 6 % masne globule. Membrana masne globule (MMG) predstavlja jedinstveni biofiziološki koloidni sustav u prirodi. Jedinstvenost se toga koloidnog sustava ogleda u brojnosti bioaktivnih molekula, poput polarnih lipida, proteina, glikoproteina, kolesterola i enzima. Od ukupnih bioaktivnih molekula polarni lipidi i proteini zajedno čine više od 90 % MMG. Shematski prikaz masne globule i njezine membrane s detaljnim prikazom glavnih proteina MMG prikazuje slika 4.6.

Poput svih bioloških membrana, i polarni lipidi MMG po svom su kemijskom sastavu: (i) glicerofosfolipidi gdje je glicerol esterificiran s dvjema masnim kiselinama na poziciji sn-1 i sn-2, a fosfatna skupina s različitim organskim spojevima poput etanolamina, holina, serina i inozitola sadržana je u sn-3 poziciji, te (ii) sfingolipidi, uglavnom sfingomijelin sastavljen od dugolančane sfingoidne baze u kojoj su aminogrupe povezane s masnim kiselinama i koji je esterificiran fosforilholinskom grupom.

Glicerofosfolipidi i sfingolipidi su amfifilne molekule koje u svojoj strukturi sadrže hidrofobne i hidrofilne regije. U usporedbi s triacilglicerolima sadržanim u unutrašnjosti masne globule, polarni lipidi MMG sadrže veći udjel nezasićenih masnih kiselina, osobito esencijalnih. Tako sfingolipidi sadrže veće udjele linolne ($C_{18:2}$) i arahidonske ($C_{20:4}$) ili omega - 6 masne kiseline, i linolenske ($C_{18:3}$) ili omega - 3 masne kiseline. Glicerofosfolipidi bogati su nezasićenim masnim kiselinama: oleinskom ($C_{18:1}$) ili omega - 9 masnom kiselinom, linolnom ($C_{18:2}$) ili omega - 6 masnom kiselinom, i linolenskom ($C_{18:3}$) ili omega - 3 masnom kiselinom. Zbog znatno višeg udjela nezasićenih masnih kiselina u MMG u odnosu na ostale lipide mlijeka, MMG je podložnija oksidativnim promjenama koje se nužno događaju homogenizacijom.

Proteini čine 25 - 60 % mase MMG i sadrže 1 - 2 % ukupnih proteina mlijeka koji se prirodno ne mogu naći u obranoj fazi mlijeka. U obranu fazu mlijeka ti proteini dopijevaju oštećenjem masne globule ili homogenizacijom. Ukupno je u MMG identificirano oko 40 različitih proteina s molekularnom masom od 15.000 do 240.000 Da, od kojih su mnogi glikoproteini.

Treba istaknuti i da se sastav i struktura MMG razlikuju između masnih globula istih i različitih vrsta mlijeka. Na slici 4.7. prikazana je heterogenost sastava i strukture MMG koja obavija globulu mliječne masti.



Slika 4.7.

Heterogenost sastava i strukture membrane masne globule (MMG).

Detalji: glicerofosfolipidi u membrani masne globule, SM-regije bogate sfingomijelinom. (A) Heterogenost MMG koja okružuje triacilglicerole (TAG) u unutarnjem dijelu masne globule, (glicerofosfolipidi u MMG označeni su crvenom bojom). Strelice označavaju sfingomijelinom (SM) bogate regije (B-E). Lateralno izdvajanje SM regija različitih veličina i oblika (crna boja) koji su raspršeni u tekućem matriksu glicerofosfolipida F-H (crvena ili bijela boja). Heterogena distribucija glikoproteina u obliku umetka u matriksu (zeleno) i SM bogate regija u MMG. (A, B, F-H) masna globula kravljeg mlijeka; (C-E) masna globula majčinog mlijeka. (Lopez, 2011., s dopuštenjem Elseviera.)

Osim polarnih lipida i proteina, na MMG su vezani i važni minerali mlijeka poput bakra i željeza. Tako membrana masne globule od ukupne koncentracije tih elemenata u mlijeku sadrži između 5 i 25 % bakra i 30 - 60 % željeza. Ostali elementi povezani s MMG su kobalt, kalcij, natrij, kalij, magnezij, mangan, molibden i cink. Na membranu masne globule vezani su i vitamini topljivi u mastima (A, D, E i K), te karotenoidi.

Zbog jedinstvenog sastava bioaktivnih molekula sadržanih u MMG uz hranjivu vrijednost njena primarna funkcija za mladunče je zaštitna. U tehnološkom smislu, MMG u sirovom mlijeku osigurava stabilnost masnih globula tako da sprječava izdvajanje tekućih masnih kiselina iz globule. Membrana masne globule sprječava i oksidativnu razgradnju masti koja bi se dogodila djelovanjem prirodno prisutnih lipaza mlijeka. Međutim, okolišni čimbenici, poput hranidbe muznih životinja, bakteriološke kontaminacije ili tehnološki postupci s mlijekom nakon mužnje, značajno mijenjaju sastav i strukturu MMG.

Hlađenje i hladna pohrana mlijeka uvjetuju oslobađanje polarnih lipida, osobito fosfolipida i sfingomijelina u obranu fazu mlijeka do 15 %. Homogenizacija uvjetuje oštećenje MMG i adsorpciju proteina uglavnom

kazeina na površinu masne globule. Toplinska obrada mlijeka ireverzibilno mijenja MMG tako da se denaturirani proteini sirutke inkorporiraju u membranu, a istovremeno se denaturiraju proteini sadržani u MMG.

U kvalitativnom smislu može se konstatirati da su tehnološka, nutritivna i funkcionalna svojstva svih mliječnih proizvoda usko povezana s karakteristikama nativnih globula mliječne masti. Također, većina tehnoloških operacija u preradi mlijeka značajno mijenja nativnu strukturu mliječne masti. U kojoj se mjeri tehnološkom obradom mlijeka istovremeno mijenjaju i biološka svojstva mliječne masti na to pitanje još uvijek znanstveno nije odgovoreno.

4.1.1.3.

Proteini

Mlijeko sadrži približno 3,3 % proteina koji se mogu podijeliti u dvije odvojene skupine. Jednoj skupini proteina pripadaju kazeini (~ 80 %) koji se acidifikacijom mlijeka (pH-4,6/20 °C) precipitiraju iz otopine. Proteini koji ostaju topljivi u tim uvjetima reakcije su skupina proteina sirutke ili proteina seruma. Proteini obiju skupina prema svojoj kemijskoj strukturi pripadaju heterogenim proteinima. Prosječna zastupljenost pojedinačnih vrsta proteina u odnosu na ukupni udjel proteina u mlijeku prikazana je u tablici 4.4.

Tablica 4.4.

Udjeli pojedinačnih proteina u kravljem mlijeku

Proteini	g/L	% od ukupnih proteina
Ukupni protein	33	100
Ukupni kazein	26	79,5
α_{s1} -kazein	10	30,6
α_{s2} -kazein	2,6	8,0
β -kazein	9,3	28,4
κ -kazein	3,3	10,1
Ukupni proteini sirutke	6,3	19,3
α -laktalbumin	1,2	3,7
β -laktoglobulin	3,2	9,8
Serum albumin	0,4	1,2
Imunoglobulini	0,7	2,1
Proteoze/peptoni	0,8	2,4

(preuzeto od Spreera,1998., i Chandana, 2006.)

4.1.1.3.1.

Kazein

Glavni protein mlijeka je kazein, koji čini između 76 i 83 % udjela ukupnih proteina. U mlijeku 95 % nativnog kazeina egzistira u formi heterogenih koloidnih čestica koje se nazivaju kazeinske micelle. Približno, sastoje se od 93 % proteina a ostatak od 7 % čine uglavnom ioni kalcija, fosfata, magnezija i citrata koji se zajedničkim imenom nazivaju koloidni kalcijev fosfat (KCP). Kazeinske micelle formiraju se unutar sekrecijskih stanica mliječne žlijezde i nakon sekrecije oblikom i veličinom gotovo da se i

ne mijenjaju. Veličina kazeinskih micela u kravljem je mlijeku između 80 i 600 nm.

Kazeinska micela sastoji se od četiriju različitih proteina: α_{s1} -kazein (α_{s1} -CN), α_{s2} -kazein (α_{s2} -CN), β -kazein (β -CN) i κ -kazein (κ -CN), koji se često nazivaju i kazeinske frakcije. Kemijski su svi kazeini fosfoproteini gdje je fosfatna skupina esterificirana na serinski ostatak u proteinskom lancu. Fosfatna skupina veže kalcij, što je važna činjenica za stabilnost strukture kazeinske micelle. Vežanje kalcija za proteine kazeina proporcionalno je udjelu fosfata u njihovoj strukturi te se oni prema toj svojoj specifičnosti međusobno razlikuju prema osjetljivosti na kalcij u mediju kako slijedi:

- α_{s1} -kazein i α_{s2} -kazein, iz otopine se precipitiraju kada je koncentracija Ca^{+2} između 3 i 8 mM
- β -kazein, iz otopine se precipitira kada je koncentracija Ca^{+2} između 8 i 15 mM, ali ostaje u otopini pri koncentraciji Ca^{+2} od 400 mM na temperaturi od 1 °C
- κ -kazein, jedina je kazeinska frakcija koja je neosjetljiva na Ca^{+2} , stabilizira $\alpha_{s1,2}$ - i β -kazeine od precipitacije u prisutnosti Ca^{+2} iona.

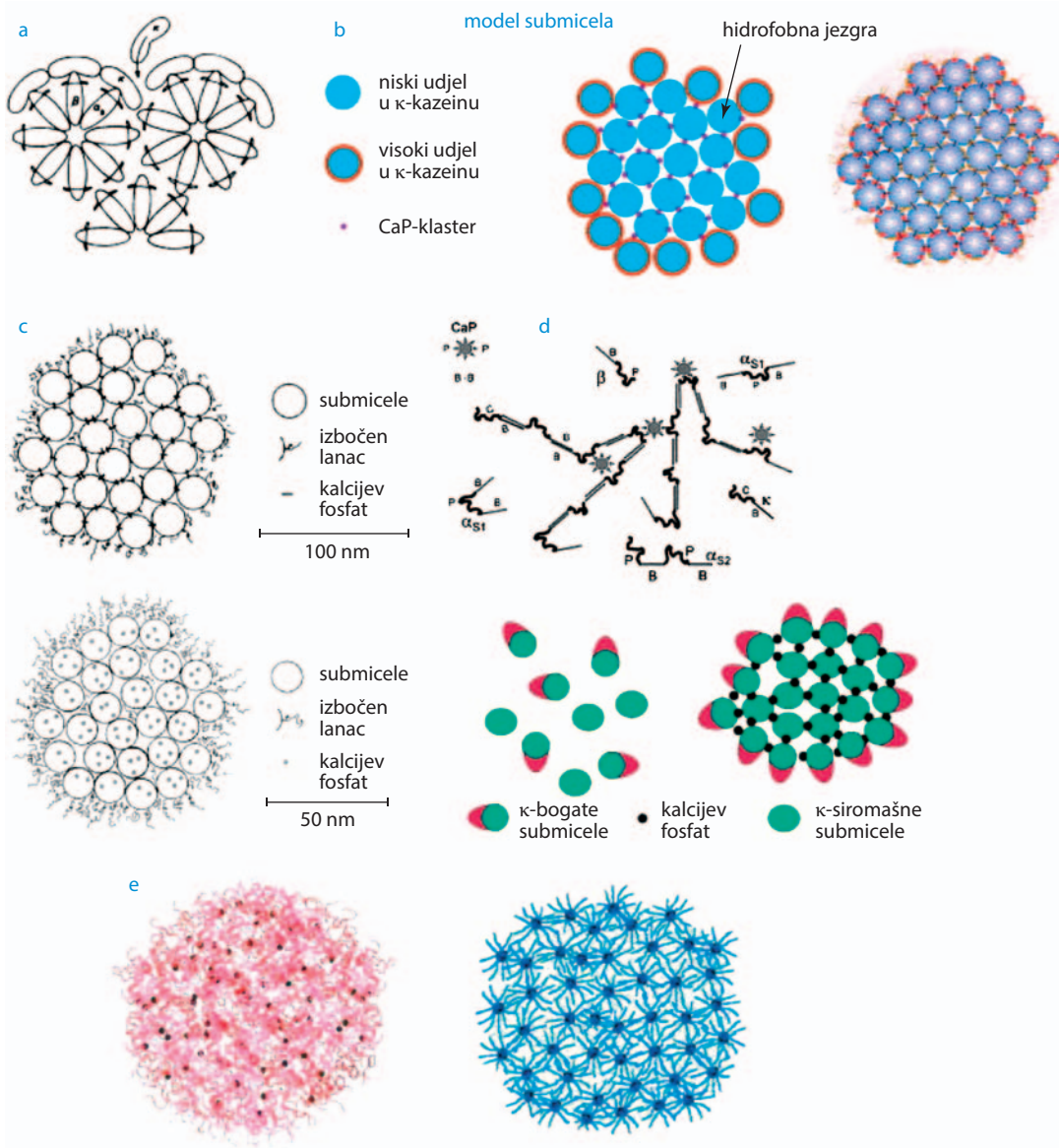
Primarna je struktura svih četiriju kazeina opisana, ali ne i njegova kompletna struktura. Razlog nedefiniranosti njegove kompletne strukture vjerojatno je u činjenici da kazein u usporedbi s tipičnim globularnim proteinima ima jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva. Hidrofobne rezidue nisu ravnomjerno raspoređene uzduž polipeptidnog lanca kazeina. Tri hidrofobne regije ima α_{s1} -kazein (1 - 44, 90 - 113, i 132 - 199), a α_{s2} -kazein dvije (90 - 120 i 105 - 207), dok hidrofobne regije čine dvije trećine β -kazeinske molekule. Osim toga, mnoge od rezidua kazeina, osobito fosfoserinske, prelaze u klustere radi stabilizacije površinskog naboja. Specifičnost je rezidua kazeina i u različitosti naboja unutar iste kazeinske molekule. Sekvenca 41 - 80 u α_{s1} -kazeinu sadrži 8 fosfatnih rezidua ali samo jedna ima negativan naboj od - 21 na pH-6,6. Istodobno ostatak molekule α_{s1} -kazeina nema površinski naboj.

Grupiranje sličnih rezidua i visoka razina rezidua prolina (aminokiselina) i njihova neravnomjerna

raspodjela unutar polipeptidnog lanca utječu na sekundarnu i tercijarnu strukturu kazeina. Zbog toga je struktura kazeina relativno otvorena i u velikoj mjeri nije uređena. Sva četiri kazeina imaju različita odvojena hidrofobna i hidrofilna područja, te su hidrofobne rezidue u znatnoj mjeri izložene vodenoj fazi okoliša. Posljedica je takve strukture mogućnost hidrofobnih područja da međusobno ulaze u reakcije i formiraju polimere. U otopini na temperaturi od 40 °C, β -kazein egzistira kao monomer približne molekularne mase od 25.000 Da. Povišenjem temperature na 85 °C, β -kazein monomeri polimeriziraju u dugački lanac sličan zavojnici, sastavljen od 20 jedinica čiji je stupanj asocijacije ovisan o koncentraciji proteina.

Nakupljanje kazeina povezano je sa sposobnošću α_{s1} -, α_{s2} - i β -kazeina vezanja znatnih količina iona metala, osobito iona Ca^{+2} . U normalnim okolnostima α_{s1} -kazein može vezati do 10 mol Ca^{+2} /mol proteina. Suprotno, κ -kazein koji ima samo jednu fosfoserinsku skupinu može vezati samo 2 mol Ca^{+2} /mol proteina. Zato κ -kazein povezan s α_{s1} - ili β -kazeinom u prisutnosti Ca^{+2} iona stabilizira oba kazeina i tako sprječava njihovu precipitaciju. Ta sposobnost asocijacije vodi do oblikovanja stabilnih koloidnih čestica koje su slične prirodnoj kazeinskoj miceli mlijeka.

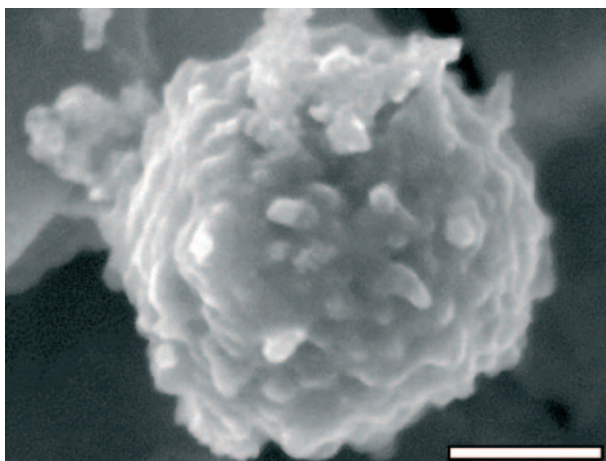
Usprkos značenju kazeina u mljekarskoj i prehrambenoj industriji općenito, i sustavnim istraživanjima koja se provode već više od 40 godina, o kazeinu se ne zna mnogo. Na temelju dosadašnjih rezultata istraživanja u znanosti još uvijek ne postoje jedinstveni odgovori i tumačenja: (i) što je zapravo kazeinska micela, (ii) kako se formira, (iii) koja je njezina točna struktura i (iv) kako se ona kemijski ponaša. Opće je prihvaćeno stajalište da kazeinska micela egzistira zbog elektrostatskih i hidrofobnih interakcija između kazeinskih molekula. Dvije ili više hidrofobnih regija različitih molekula (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN) formiraju povezanu skupinu. Rast tih polimera inhibiran je protein negativnim nabijenim reziduama, čije odbijanje uzrokuje interakciju slobodne energije. Neutralizacijom fosfoserinskih skupina inkorporacijom u KCP se umanjuje ta slobodna energija i stvara se druga vrsta poveznih mostova. Između kazeina, κ -kazein koji sadrži samo jednu fosfoserinsku skupinu ograničava obje reakcije



Slika 4.8.

Pretpostavljeni modeli istraživanja izgleda strukture kazeinske micelle u posljednjih 50-ak godina.

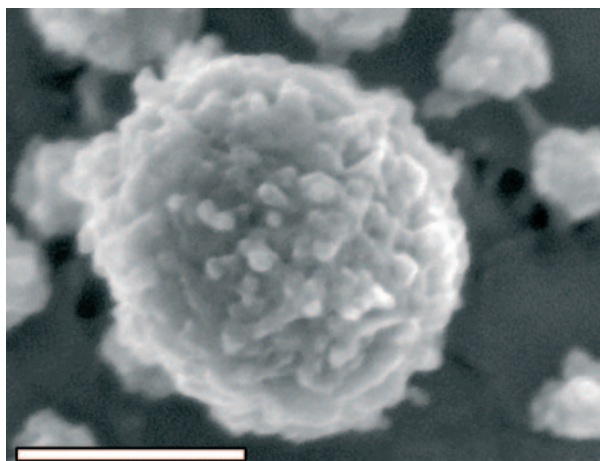
Detalji: (a) 1958. godine pretpostavljeni model (Waugh, D. F.); (b) 1982. godine pretpostavljeni model (Schmith, D. G.); (c) 1978. i 1999. godine pretpostavljeni model (Walstra, P.). Između pretpostavljenih modela izgleda kazeinske micelle (a, b, c) uočavaju se različiti omjer i pozicija koloidnog kalcijevog fosfata (KCP); (d) pretpostavljeni model dvostrukog povezivanja iz 2003. godine i interpretacija Schmithova modela iz 2005. godine (Horn, D. S.); (e) pretpostavljeni nanoklaster model iz 1999. (Holt, C.) i iz 2003. godine (De Kruif, C. G. i Holt, C.). (de Kruif i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.9.

Mikroskopska struktura površine pojedinačne kazeinske micelle.

Slika je dobivena elektronskim mikroskopom - Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM); bar = 100 nm. (Dagleish i sur., 2004.s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.10.

Mikroskopska struktura površine kazeinske micelle i njene pridružene proteinske strukture.

Detalji: male pridružene strukture koje čine prsten oko glavne micelle vjerojatno predstavljaju njezine disocirane dijelove. Slika je dobivena elektronskim mikroskopom -Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM); bar = 200 nm. (Dagleish i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

tih polimera. Prema svim dosad predloženim modelima, većina molekula κ -kazeina prisutna je na površini kazeinske micelle. Hidrofilni C terminalni kraj κ -kazeina, kako se pretpostavlja, pruža se 5 - 10 nm od površine u okolišnu otopinu dajući miceli izgled sličan vlasi kose. Visoko nabijena hidrofilna fleksibilna "kosa" sprječava približavanje i interakciju hidrofobnih regija kazeinskih molekula. Tek odcjepljenjem hidrofилnog dijela κ -kazeina (makropeptid), kazeinske micelle se mogu nakupljati međusobnom interakcijom. Pretpostavljeni modeli istraživanja izgleda strukture kazeinske micelle provedenih u posljednjih 50-ak godina prikazani su slikom 4.8.

Nanoklaster model izgleda kazeinske micelle (slika 4.8.,c) pretpostavlja homogeni matriks kazeina u kojem su nanoklasteri KCP raspršeni u vrlo male čestice (~ 2 nm) na prosječnoj udaljenosti od 18,6 nm. Prihvaćen za površinu nanoklastera, KCP se nalazi

u centru fosforilacije (3 - 5 susjednih fosforiliranih aminokiselinskih ostataka) kazeina. Kosa ("repovi") kazeina znatno su veći od nanoklastera KCP i zbog toga se udružuju u kazeinski matriks koji se može vidjeti kao polimerna mreža, čija gustoća varira unutar 2 nm. Asocijacija u polimernu mrežu izvedena je na temelju slabih interakcija [skupno imena za hidrofobne interakcije, ionsko povezivanje, elektrostatička privlačenja i druge čimbenika (bez jakih kalcij-fosfat interakcija)], što omogućava samopovezivanje kazeina u stabilnu kazeinsku micelu. Istodobno svojom konstantnom funkcijom κ -kazein limitira proces samo povezivanja ostalih kazeina, što osigurava stabilnu formu nativnih kazeinskih micela u mlijeku.

Neovisno o dosad korištenim brojnim tehnikama elektronske mikroskopije, složena građa kazeina nije omogućila potpuno točan i detaljan opis strukture površine micelle. Proučavanjem vanjske površine

kazeinske micelle jednom od vrsta elektronskog mikroskopa (engl. *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) utvrđena su sljedeća odstupanja od sferičnog modela kazeinske micelle:

- površina kazeinske micelle ima kompleksniju strukturu od dosad pretpostavljenoga sferičnog modela koji ima čvrstu površinu pokrivenu relativno kratkom "kosom" i znatno je veća od dosad pretpostavljene
- površina kazeinske micelle sastoji se od cjevčica, najvjerojatnije, kazeina promjera od približno 20 nm čiji krajevi "vire" iz unutarnje strukture micelle
- površina kazeinske micelle nije pokrivena, već se pretpostavlja da je κ -kazein smješten na krajevima cjevčica koje čine micelu, ali je ipak dovoljno zaštićena od uskog približavanja drugih velikih čestica, poput drugih micela
- površina kazeinske micelle sadrži prazne prostore između svojih podstrukture koje su raspoložive za pristup pojedinačnih proteinskih molekula ili čak malih nakupina proteina.

Podatci o mikroskopskoj strukturi površine kazeinske micelle od velike su važnosti za objašnjenje nekih od njezinih karakteristika i same reaktivnosti molekule. Iz mikroskopskog prikaza kazeinske micelle (slike 4.9. i 4.10.) jasno se prepoznaje da κ -kazein zapravo predstavlja završetak na cjevčicama kazeina. Zbog toga njegov udjel u mlijeku niti nije dovoljan da pokrije cijelu površinu kazeinske micelle. Makropeptidi κ -kazeina dostupni su za reakciju s proteazama ili reakciju vezivanja proteina sirutke tek nakon njihove denaturacije izazvane temperaturom toplinske obrade mlijeka. Obje navedene reakcije događaju se bez prethodnog prolaženja kroz homogeni sloj "kose" do senzitivnog mjesta vezanja na κ -kazein molekuli.

4.1.1.3.2.

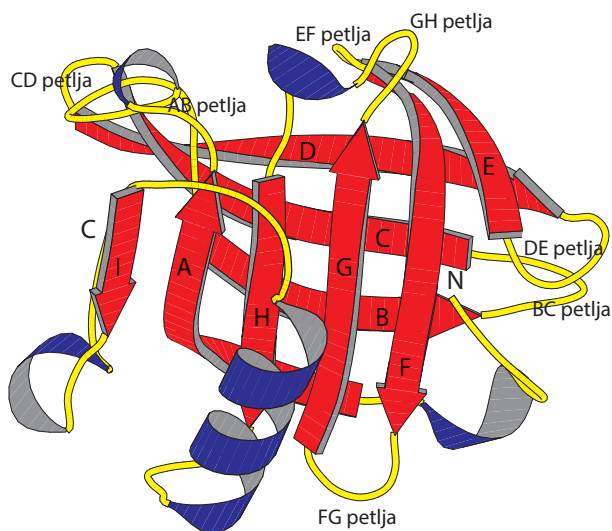
Proteini sirutke

Proteine sirutke čine α -laktalbumini, β -laktoglobulini, serum albumini, imunoglobulini i proteoza-peptoni. Premda se u literaturi gotovo uvijek svrstavaju u

skupinu proteina sirutke, za imunoglobuline, serum albumine, i proteoza-peptone nije dokazano da se dodatkom kimoza iz mlijeka izlučuju sirutkom. Od ukupnih proteina sirutke u mlijeku, imunoglobulini čine 1,9 - 3,3 %, serum albumini 0,7 - 1,3 %, a proteoza-peptoni 2 - 6 %. U mlijeku su u malim količinama prisutni i topljivi proteini β -mikroglobulin, laktoferin i transferin (oba proteina u svojoj strukturi sadrže Fe), feritin i kalmodulin (protein koji se vezuje za kalcij), te skupina acilglikoproteina.

Od ukupnih proteina sirutke, s približno 50 % udjela najzastupljeniji je topljivi protein mlijeka β -laktoglobulin (β -Lg), koji pokazuje ekstremnu stabilnost prema kiselinama. Poznato je osam genetskih varijanti β -Lg - A, B, C, D, E, F, G i D, koje iskazuju različita svojstva topljivosti, konformacije, tiolne reaktivacije i termalne agregacije. U kravljem su mlijeku najučestalije genetske varijante A i B s gotovo istom frekvencijom, a međusobno se one razlikuju prema aminokiselinama u polipeptidnom lancu na poziciji 64 (aspargin/glicin) i 118 (valin/alanin). Prirodno u mlijeku β -Lg egzistira kao dimer dviju podjedinica, a molekularna težina β -Lg je 18.350 Da. Svaki monomer sadrži 162 aminokiseline, ima dva interna disulfidna veza i jednu slobodnu tiolnu skupinu (cistein), koja ima veliko značenje za promjene koje se događaju zagrijavanjem mlijeka. Disulfidne interne reakcije koje su povezane s cistein 106 i 119 reziduama važne su u temperaturom induciranoj denaturaciji proteina. Također, β -laktoglobulin ima sposobnost brojnih konformacijskih promjena induciranih promjenama pH-vrijednosti sredine. Za neke od tih konformacija β -laktoglobulina potvrđeno je funkcionalno značenje za humani organizam. Model strukture jedne podjedinice β -laktoglobulina dobiven rendgenskom kristalografijom prikazan je na slici 4.11.

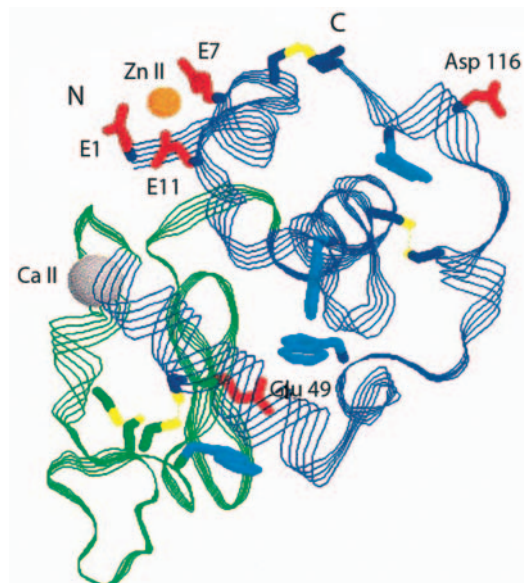
Od ukupnih proteina sirutke u mlijeku α -laktalbumin (α -La) čini približno 20 %, a do danas su potvrđene njegove tri genetske varijante. On je globularni protein molekularne težine 14.200 Da, izgrađen od 123 aminokiselinska ostatka, a struktura mu je stabilizirana s četiri interna disulfidna veza. Nativni je α -La većim dijelom izgrađen od α -uvojnice, a manjim od β -naboranih slojeva međusobno odvojenih dubokim



Slika 4.11.

Prostorna struktura jedne podjedinice β -laktoglobulina.

Detalji: iz prostorne strukture raspoznaje se nabrana β -struktura povezana odsječima α -uzvojnica i petlje, koje povezuju β -strukturu. Područja uvojne strukture označena slovima (A-I) sastoje se od devet β -naboranih slojeva (označeno crvenom bojom) i petlji koja ih povezuje (označeno žutom bojom). Nabrana β -struktura s vanjske strane sadržava trostruku α -uzvojnica (označeno plavom bojom), koja se naslanja na 1/9 β -naboranog sloja; N i C su terminalni krajevi uzvojne strukture. (Brownlow i sur., 1997., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.12.

Prostorna struktura α -laktalbumina.

Detalji: u prostornoj strukturi α -laktalbumina α -uvojnica molekule označena je plavom bojom; β -naborani slojevi molekule zelenom bojom; rezidue tripsina označene su plavom bojom, a S-S mostovi žutom; rezidue koje sudjeluju u koordinaciji Zn^{+2} iona označene su crvenom bojom. (Permyakov i Berliner, 2000., s dopuštenjem Elseviera.)

rascjepom. U isto vrijeme oni se drže zajedno pomoću cistein mosta između rezidua 73 i 91 uz formiranje Ca^{+2} petlje. Prostornu strukturu α -laktalbumina prikazuje slika 4.12.

Tehnološki je najinteresantnija karakteristika α -La njegova sposobnost vezanja metalnih kationa. Molekula α -La u svojoj strukturi na mjestu vezanja Ca^{+2} iona ima sposobnost i čvrstog vezanja Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^+ i K^+ , te ima nekoliko odvojenih mjesta za čvrsto vezanje Zn^{+2} iona. Vezivanjem kationa na molekulu proteina povećava se njegova termostabilnost. Zbog tih je svojstava α -laktalbumin na temperature toplinske obrade mlijeka najotporniji protein sirutke.

Snižavanjem pH-vrijednosti mlijeka na manje od 5 α -La gubi kalcijeve i cinkove ione i postaje skloniji toplinskoj denaturaciji.

U fiziološkom smislu α -laktalbumin ima nekoliko značajnih funkcija. Prije svega α -La je regulatorna podjedinica enzimskog kompleksa laktoza sintetaze, gdje katalizira završnu fazu biosinteze laktoze u mliječnoj žlijezdi. Osim toga, α -laktalbumin veže se za enzimatski sustav enzima galaktozil transferazu (**GT**), koji je u različitim sekrecijskim stanicama mliječne žlijezde uključen u metabolizam proteina. U tim reakcijama α -laktalbumin sudjeluje u premještanju galaktozil skupa s UDP-galaktoze (uridin-difosfat galaktoza) na

glikoproteine koji sadrže N-acetilglukozamine. Tako se modulira djelovanje enzima GT kojim se povećava njegov afinitet i specifičnost prema glukozi:



Opisana reakcija događa se u Golgijevom aparatu uz prisutnost Mn^{+2} iona.

Zbog jedinstvene sposobnosti snažnog vezanja Ca^{+2} iona, α -laktalbumin se vrlo često koristi i kao model u različitim znanstvenim studijama. Tako se smatra da je α -laktalbumin vrlo prikladan model za proučavanje: (i) učinka kalcija na interakcije proteina s proteinima, (ii) aktivnosti stanične membrane i (iii) organskih komponenti malih molekularnih težina koje često imaju fiziološko značenje. Također, na temelju rezultata provedenih istraživanja velika je vjerojatnost da α -laktalbumin ima brojne važne biološke funkcije u humanom organizmu.

4.1.1.3.3.

—

Albumini seruma

Albumini seruma mlijeka, prema svojoj kemijskoj strukturi, identični su serum albuminima krvi. U mlijeku, u odnosu na ukupne proteine sirutke, albumini seruma su zastupljeni s približno 5 %. Ti se proteini sintetiziraju u jetrima, a u mlijeko ulaze preko sekrecijskih stanica mliječne žlijezde. Sastoji se od jedne tiolne skupine i 17 disulfidnih veza koje albuminu seruma daju formu složene petlje (omče). Albumini seruma, čini se, imaju funkciju prenošenja malih molekula kao što su masne kiseline, ali njihova specifična funkcija još uvijek nije otkrivena.

4.1.1.3.4.

—

Imunoglobulini

Imunoglobulini su sintetizirana antitijela nastala kao odgovor na stimulaciju makromolekularnoga stranog antigena. Od ukupnih proteina sirutke udjel

imunoglobulina u mlijeku čini do 10 %. Oni su također polimeri dviju vrsta polipeptidnog lanca koji se međusobno razlikuju prema svojoj molekularnoj težini. U kravljem su mlijeku poznate četiri vrste imunoglobulina: IgM, IgA, IgE i IgG.

4.1.1.3.5.

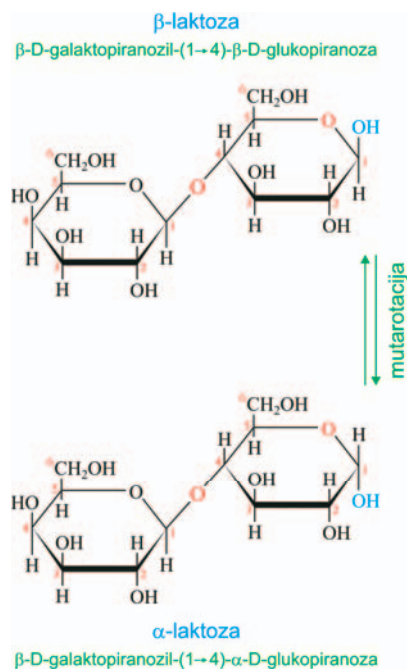
—

Laktoza

Laktoza ili mliječni šećer glavni je disaharid mlijeka sastavljen od dvaju heksoznih šećera: D-glukoze i D-galaktoze (β -galaktozil-1,4-glukoza). Molarna masa laktoze je 342,3 g/mol. U određenoj ravnoteži laktoza je u mlijeku prisutna u dva izomerna oblika (α -laktoza i β -laktoza). Međusobno se ti izomeri razlikuju prema položaju H^+ i OH^- skupine na prvom C-atomu glukozidnog dijela laktoze. Konfiguracija na prvom C-atomu glukozidnog dijela laktoze nije stabilna i dolazi do mutarotacije iz α -izomer u β -izomer i obrnuto (slika 4.13.).

Općenito, na mutarotaciju laktoze u otopini utječu: temperatura, pH-vrijednost, prisutnost drugih ugljikohidrata, i prisutne soli. U mlijeku na temperaturi od 20 °C laktoza je prisutna kao α -izomer s približno 37,3 %, a kao β -izomer s približno 62,7 %. Promjenom temperature njihov međusobni omjer u mlijeku se mijenja. Tako je mutarotacija laktoze spora reakcija na niskim temperaturama, porastom temperature za 10 °C raste 2,8 puta, a postaje intenzivnom reakcijom na temperaturi od oko 75 °C. Intenzitet mutarotacije laktoze najmanji je kada je pH-medija 5,0, a snižavanjem ili porastom pH reakcija mutarotacije laktoze se pojačava.

Laktoza je od njezinih sastavnih šećera glukoze i galaktoze manje slatka, zbog čega mlijeko nema izražen sladak okus. U odnosu na ostale sastojke mlijeka, laktoza u regulaciji osmotskog tlaka u vimenu i utjecaju na vrijednost točke ledišta i točke ključanja mlijeka ima najveći udjel (~ 50 %). U odnosu na mnoge druge šećere laktoza je relativno slabo topljiva u vodi. Međutim, veličina udjela jedne ili druge forme (α -izomera i β -izomera) i stupnja topljivosti primarno ovisi o temperaturi medija. Tako je topljivost α -laktoze



Slika 4.13.

Mutarotacija laktoze u mlijeku.

(Generalić, 2013., http://glossary.periodni.com/preuzimanje_slike.php?name=laktoza.png&source=laktoza.)

na temperaturi od 20 °C približno 7,5 g, a β -laktoze približno 48 g u 100 mL vode. Osim toga, u odnosu na β -laktozu kristali α -laktoze tvrdi su i imaju oblik prizme ili piramide. Veličina kristala α -laktoze između 10 i 16 μ m može biti uzrok pjeskovite (zrnate, grube) teksture fermentiranog mlijeka. Kristalizacija laktoze može biti i uzrok grudičavosti mliječnog praha, osobito ako je prah izložen vlazi iz zraka (između ostalog mliječni se prah koristi za obogaćivanje Sbm mlijeka). Poput drugih reducirajućih šećera laktoza može ući u reakcije sa slobodnim aminoskupinama proteina mlijeka koje uvjetuju pojavu spojeva Maillardovih reakcija u proizvodu.

Laktoza je lako probavljiva čak i za dojenče, što dokazuje majčino mlijeko koje sadržava puno više laktoze (6 - 7 %) u odnosu na kravlje, ovčje i kozje

mlijeko. Za mljekarsku je industriju od velike važnosti hidroliza laktoze djelovanjem mikroorganizmima koja se događa u procesu fermentacije mlijeka. Fermentacijom približno 23 - 30 % laktoze prelazi u mliječnu kiselinu (50 - 95 %), što čini temelj za proizvodnju svih fermentiranih mliječnih proizvoda. U kravljem mlijeku prosječan je udjel laktoze 4,7 %, u ovčjem 4,90 %, a u kozjem 4,10 %.

4.1.1.3.6.

Minerali i vitamini

U mlijeku su mineralni sastav, njihov pojavni oblik, koncentracija i kemijske interakcije gotovo jednako kompleksni kao i sustav proteina mlijeka. Minerali mlijeka uglavnom se sastoje od soli klorida, fosfata, citrata, sulfata i bikarbonata Na, K, Ca i Mg. Kloridi, fosfati, Na i K-bikarbonati topljive su soli, te su one u mlijeku prisutne gotovo potpuno u ionskom obliku. Druge soli, prvenstveno soli kalcija i fosfati, znatno su manje topljive (pH ~ 6,6). U mlijeku te su soli djelomično prisutne u topljivoj a djelomično u koloidnoj formi koja je blisko povezana s kazeinskim micelama.

Natrij, kalij i kloridni ion glavni su monovalentni ioni mlijeka koji s laktozom reguliraju ukupnu ionsku stabilnost mlijeka. U biološkom smislu to znači da oni izjednačavaju osmotski tlak između krvi i intracelularne tekućine u vimenu. Zbog toga je koncentracija klorida u mlijeku najniža u vrhu laktacije, a postupno se ona povećava prema kraju laktacijskog ciklusa. Varijacije u koncentracijama ukupnog kalcija i fosfata u mlijeku su manje značajne budući da su one povezane s udjelom ukupnog proteina u mlijeku. Suprotno, koncentracija citrata kao izvora energije povezanog s ciklusom sinteze masnih kiselina u mlijeku je određena hranidbom životinja. Prirodno, citrat u mlijeku u potpunosti je derivat sinteze u mliječnoj žlijezdi i usko je u svojstvu izvora energije povezan s ciklusom *de novo* sinteze masnih kiselina. Kada je unosom hrane suspregnuta *de novo* sinteza masnih kiselina (obično zimi), koncentracija se citrata u mlijeku značajno povećava. Izlaskom muznih životinja na pašu (gdje je u hrani dostupnost masnih kiselina niska) stimulira se

Tablica 4.5.

	Makroelement	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko	Ovčje mlijeko
Koncentracija makroelemenata u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (mg 100 g ⁻¹)	Kalcij	107–133	106–192	136–200
	Fosfor	63–102	92–148	80–145
	Magnezij	9–16	10–21	8–19
	Kalij	144–178	135–235	174–190
	Natrij	40–58	34–50	29–31
	Klorid	90–106	100–198	71–92

(prema: Jennessu, 1980., Parku i Chukwu, 1988., 1989., Coniju i sur., 1999., Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2012.)

Tablica 4.6.

	Mikroelement	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko	Ovčje mlijeko
Koncentracija mikroelemenata u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (µg 100 g ⁻¹ ; sumpor (mg 100 g ⁻¹); –* nema podatka)	Sumpor	32	28	29
	Željezo	30–40	36–75	62–100
	Bakar	2–30	11	11–88
	Mangan	1,3–4,0	5,5	5,3
	Cink	74–145	242	415
	Jod	2,0–6,0	2,1–11	2,0
	Selen	1,3–1,7	0,7	0,9
	Flour	11–21	–*	–*
	Kobalt	50–130	270	360
	Nikal	0,4–6,0	0,3–19	5,4
	Molibden	2,4–6,0	–*	–*
	Bor	19–95	–*	–*
	Brom	154–293	411–503	–*
	Krom	1,0–4,0	0,5–15	0,32
Nitrati	20–1240	–*	–*	
Aluminij	46	15	51	

(prema: Jennessu, 1980., Parku i Chukwu, 1988., 1989., Coniju i sur., 1999., Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2012.)

de novo sinteza masnih kiselina i koncentracija citrata se snižava. Koncentracija citrata u mlijeku važna je i sama po sebi jer predstavlja izvrstan pufer za kalcijeve i vodikove ione. U mlijeku, koje ima gotovo neutralnu pH-vrijednost, citrat s Ca⁺² ionima formira čvrst kompleks. Tako se u mlijeku jedna trećina Ca nalazi u citratnoj formi, a istodobno je smanjena reaktivnost obaju iona. Osim te primarne funkcije u očuvanju ekvilibrijskog ili najmanje pseudo-ekvilibrijskog statusa mlijeka, sezonske promjene koncentracije citrata uvjetovane hranidbom uzrok su promjena koncentracije topljive ili koloidne forme kalcijeva fosfata. Podjela kalcijeva fosfata u mlijeku na otopljeni i koloidni status bitno utječe na preradbena svojstva mlijeka. Primjerice, toplinska obrada mlijeka mijenja osjetljivost proteina i mineralnu ravnotežu. Zbog

toga na temperaturi višoj od 65 °C denaturirani proteini sirutke formiraju kompleks s kazeinom tako da se najvećim dijelom β-laktoglobulin veže za κ-kazein. Istodobno visoka temperatura toplinske obrade mlijeka uvjetuje i precipitaciju kalcijeva fosfata na proteinski kompleks i na taj se način smanjuje reaktivnost kalcijevih iona u topljivoj fazi. Te su interakcije važne za povećanje stabilnosti fermentiranih mlijeka. Velik broj minerala, poput Zn, Fe, Mn, u mlijeku je prisutan u tragovima. Koncentracija makroelemenata u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku prikazana je u tablici 4.5., a koncentracija mikroelemenata za iste vrste mlijeka u tablici 4.6.

Koncentracija vitamina u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku, slično koncentraciji minerala nije jednaka. Kozje i ovčje mlijeko sadrže značajno višu

Tablica 4.7.

	Vitaminski topljivi u masti	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko	Ovčje mlijeko
Koncentracija vitamina topljivih u mastima i vodi u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (u 100 g)	A Retinol (mg)	0,04	0,04	0,08
	B β -karoten (mg)	0,02	0,00	–*
	D D (μ g)	0,08	0,06	0,18
	E Tokoferol (mg)	0,11	0,04	0,11
	Vitaminski topljivi u vodi	Kravlje mlijeko	Kozje mlijeko	Ovčje mlijeko
–* nema podataka; (prilagođeno prema Raynal–Ljutovcu i sur., 2008.)	B ₁ Tiamin (mg)	0,04	0,05	0,08
	B ₂ Riboflavin (mg)	0,17	0,14	0,35
	B ₃ Niacin (mg)	0,09	0,20	0,42
	B ₅ Pantotenska kiselina (mg)	0,34	0,31	0,41
	B ₆ Piridoksin (mg)	0,04	0,05	0,08
	B ₇ Biotin (μ g)	2,00	2,00	–*
	B ₉ Folna kiselina (μ g)	5,30	1,00	5,00
	B ₁₂ Kobalamin (μ g)	0,35	0,06	0,71
	C Askorbinska kiselina (mg)	1,00	1,30	5,00

koncentraciju vitamina A od kravljeg, budući da se gotovo kompletan β -karoten konvertira u vitamin A. Istodobno je koncentracija vitamina B skupine u kozjem i kravljem mlijeku rezultat sinteze u buragu i u znatnoj mjeri ovisi o hranidbi životinja. U usporedbi s kravljim, kozje mlijeko sadrži značajno nižu koncentraciju vitamina B₁₂ (kobalamina) i B₉ (folne kiseline). Koncentracija vitamina B₁₂ u kravljem je pet puta viša u usporedbi s kozjim mlijekom, ali i kravlje i kozje mlijeko oskudni su vitaminima B₆ (piridoksin), C i D. Ovčje mlijeko u usporedbi s kravljim i kozjim mlijekom uglavnom sadrži više koncentracije svih vitamina. Ipak, treba istaknuti da su podatci o vitaminskom sastavu ovčjeg mlijeka slabo istraženi. Koncentracija vitamina u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku prikazana je u tablici 4.7.

4.1.1.3.7.

Kolesterol

Udjel kolesterola u mlijeku značajno je određen vrstom muzne životinje, pasminom i udjelom mliječne masti, te periodom laktacije. Prirodno, zbog fiziološke funkcije koju ima za mladunče koncentracija je kolesterola u kolostrumu relativno visoka (570 - 1950 mg/100 g masti). Koncentracija kolesterola u mlijeku

brzo se snižava do uobičajene razine kada započinje prava laktacija. Općenito, koncentracija kolesterola je najniža na početku laktacije, i progresivno se povećava sredinom i prema kraju laktacije a proporcionalna je udjelu masti u mlijeku. Mlijeko s 3,20 % mliječne masti sadrži oko 10 mg kolesterola u 100 mL mlijeka, a snižavanjem udjela mliječne masti u mlijeku se smanjuje i koncentracija kolesterola. Tako je koncentracija kolesterola jednaka koncentraciji rezidualnog kolesterola u obranom mlijeku ako je udjel mliječne masti u mlijeku smanjen za 80 %. U proizvodnji fermentiranih mlijeka to znači da će razina kolesterola u finalnom proizvodu biti proporcionalna sadržanom udjelu mliječne masti u ishodišnom mlijeku.

4.1.1.3.8.

Fosfolipidi i sfingolipidi

Fosfolipidi i sfingolipidi mlijeka pripadaju skupini polarnih lipida, a njihov je udjel u kravljem mlijeku između 9,4 i 35,5 mg 100 g⁻¹ mlijeka. Polarni lipidi su uglavnom (~60 %) sastavni dio membrane masne globule, dok ih se ostatak nalazi u obranoj mliječnoj fazi mlijeka. Fosfolipidi su derivati mliječne masti u kojima je jedna masna kiselina zamijenjena fosfatnom skupinom (PO₄⁻) i jednom od nekoliko molekula koje

Tablica 4.8.

	Otopina	Veličina čestica (nm)	Vrsta čestice
Fizikalni status, vrsta i veličina čestica raspoređenih u mlijeku	Koloidna emulzija	2000–6000	Masne globule
	Koloidna suspenzija	>200	Kazein–kalcijev fosfat
	Koloidna otopina	1–200	Proteini sirutke
	Prava otopina	< 1	Laktoza, soli i druge tvari

(prilagođeno prema Chandenu, 2006.)

sadrže dušik, te pokazuju amfifilna svojstva. Sfingolipidi u svojoj strukturi sadrže ceramidnu jezgru koja je sastavljena od sfingozina kao nosača u kome je masna kiselina kovalentnom vezom povezana sa amidom. Poput fosfolipida i sfingolipidi pokazuju amfifilna svojstva. Odnosno, oba ova lipida u svojoj strukturi sadrže hidrofilne i hidrofobne regije koje su tehnološki značajne za stabilizaciju emulzije i pjene u preradi mlijeka. Osim toga ti polarni lipidi i njihovi derivati su bioaktivne komponente mlijeka za koje se smatra da osim fiziološke funkcije za humani organizam imaju i bakteriostatska svojstva.

4.1.2.

Fizikalna svojstva

U fizikalnom smislu mlijeko je neprozirna, bijela heterogena tekućina u kojoj su različiti sastojci povezani u multidisperzivan sustav u formi emulzije, koloidne suspenzije, koloidne otopine i prave otopine. Multidisperzivni sustav mlijeka čini dobro definiranu ravnotežu između njegovih različitih sastojaka.

Lipidi su u mlijeku prisutni u koloidnoj emulziji (ulje-u-vodi) u obliku mikroskopskih globula promjera između 0,1 i 22 μm . Kazeinske micelle u mlijeku su prisutne u koloidnoj suspenziji, a proteini sirutke u koloidnoj otopini. Laktoza, vitamini, kiseline, enzimi i neke anorganske soli prisutni su u pravoj otopini. Ovisno o veličini čestica otopljene tvari tablica 4.8. prikazuje njihove relativne odnose u mlijeku.

Određeni tehnološki postupci prerade mlijeka u fermentirana mlijeka imaju tendenciju promjene

fizikalne ravnoteže koja u mlijeku postoji između koloidne disperzije i soli, a oni su sljedeći:

- dodatak polivalentnih ioniziranih soli
- udjel S_{bm}
- promjene pH
- temperature toplinske obrade mlijeka.

Svaki pojedinačno i svi čimbenici zajedno destabiliziraju prirodan koloidni sustav mlijeka i tako utječu na njegove preradbene osobine. U tehnologiji proizvodnje fermentiranih mlijeka, kako odmiče fermentacija, koloidni kalcijev fosfat progresivno se konvertira u svoju ionsku formu snižavanjem pH-mlijeka od 6,6 do manje od 4,6. U tim novonastalim uvjetima kazein i promijenjeni proteini sirutke koaguliraju u izoelektričkoj točki na pH-4,6, te se formira gel-struktura fermentiranih mlijeka.

Za uspješno provođenje tehnoloških procesa određeni termini vezani na fizikalnu strukturu mlijeka moraju biti razumljivi svim tehnolozima. Zbog toga je u daljnjem tekstu ukratko opisano značenje pojedinih termina koji se često koriste za opis fizikalnih svojstava mlijeka.

Mliječna plazma je tekući dio mlijeka bez mliječne masti i gotovo je istovjetna s terminom obranog mlijeka. Mliječni serum je mliječna plazma bez mliječne masti i kazeina. Uklanjanjem kazeinskih micela iz obranog mlijeka djelovanjem enzima (renina ili kimosina) zaostaje tekućina koja se naziva sirutka. Ona se razlikuje od mliječnog seruma jer sadrži određene polipeptide, a prvenstveno makropeptide nastale enzimatskim cijepanjem kazeina.

U fizikalnom smislu, disperzni sustav označava smjesu tvari u kojima su čestice jedne tvari dispergirane (raspršene, raspodijeljene) u drugoj tvari. Disperzni

sustavi mogu biti u bilo kojem agregatnom stanju. Na temelju veličine čestica dispergirane tvari, disperzni sustavi se dijele na suspenzije, koloidne sustave ili koloidne i prave otopine. Suspenzije su disperzni sustavi s najgrubljim (najvećim) česticama. Čvrsta tvar iz tekućih suspenzija se može odijeliti filtracijom ili taloženjem. Koloidni sustavi su disperzni sustavi s nešto manjim česticama, a čvrsta tvar iz tekuće koloidne otopine se ne može odijeliti filtracijom. U koloidnim sustavima čestice su još uvijek dovoljno velike da se mogu smatrati zasebnom fazom, ali se kinetički ponašaju kao molekule. Koloidni sustavi se dalje mogu podijeliti prema agregatnom stanju u dispergirane tvari i disperzivna sredstva. U koloidne sustave spadaju pjena (plinovito u tekućem; upjenjeni jogurt), emulzija (tekuće u tekućem; globule mliječne masti u mlijeku), gel (tekuće u čvrstom; jogurt), sol (čvrsto u tekućem; škrob u vodi).

4.1.2.1.

—

Kiselost mlijeka

Svježe pomuzeno mlijeko pokazuje određeni stupanj kiselosti koja je posljedica prisutnosti kazeina, kiselih fosfata, citrata i plinova u mlijeku. Ta kiselost naziva se prirodna ili prividna kiselost i ima pH-vrijednost ~ 6,6 - 6,8. Ovisno o količini bezmasne suhe tvari mlijeka (Sbm), prirodna kiselost mlijeka izmjerena metodom titracije prema Soxhlet-Henkelu je između 6,5 i 10 °SH. Kiselosti mlijeka veća od prirodne posljedica je mikrobne razgradnje laktoze mlijeka u mliječnu kiselinu i naziva se naknadna ili stečena kiselost. Stečena kiselost obično se izražava kao postotak mliječne kiseline. Zbroj prirodne i naknadne kiselosti predstavlja ukupnu kiselost mlijeka.

4.1.2.2.

—

Puferni kapacitet

Mlijeko prirodno sadrži niz pufernih sustava, ali za njegovu stabilnost i dobar puferni kapacitet ključni su topljivi fosfati, koloidni kalcijev fosfat, citrati,

bikarbonati, kazein i proteini sirutke. Kazeini u formiranju pufernog kapaciteta mlijeka prosječno sudjeluju s 35 %, proteini sirutke s 5 %, topljive soli s 40 %, a koloidni kalcijev fosfat s 20 %. Izražava se brojem molova baze ili kiseline koji je potreban da se pH vrijednost mlijeka promijeni za jedinicu. Posljedično spojevima koji čine puferni sustav, promjene pH vrijednosti mlijeka nisu iste za jednaku količinu mlijeku dodane kiseline ili baze. Tako će se vrijednost pH-mlijeka veća od 6,6 brže povećati ako se mlijeku dodaju baze u odnosu na kiseline. Ili drugim riječima, puferni je kapacitet mlijeka oko dvaput veći prema kiselinama u odnosu na baze. Prema kiselinama puferni kapacitet mlijeka je između 2,4 i 2,6, a prema bazama između 1,2 i 1,4 mL molarne otopine kiseline, odnosno baze na 100 mL mlijeka.

Puferni se kapacitet mlijeka može odrediti za svaku pH-vrijednost grafičkim mjerenjem nagiba tangente tako da se odredi omjer dB/dpH u definiranom pH-području. Omjer dB/dpH izražava odnos između dodane kiseline ili baze B i promjene pH-vrijednosti:

$$\frac{dB}{dpH} = \frac{V_{B,K} \cdot N_{B,K}}{V_{uzorka} \cdot dpH}$$

gdje je:

$V_{B,K}$ – volumen dodane baze ili kiseline;

$N_{B,K}$ – normalitet baze ili kiseline;

V_{uzorka} – volumen uzorka;

dpH - promjena pH vrijednosti.

Matematički, puferni kapacitet može se izračunati i na sljedeći način:

$$\frac{dB}{dpH} = \frac{2,3 cKa \cdot a_{H^+}}{(Ka + a_{H^+})^2}$$

gdje je:

c – ukupna molarna koncentracija (disociranih i nedisociranih kiselih ili bazičnih grupa);

a_{H^+} – H^+ aktivitet;

Ka – konstanta disocijacije.

Omjer dB/dpH može se ucrtati na graf nasuprot pH-vrijednosti, čime se mogu definirati različite karakteristike kao što su:

- puferni kapacitet na definiranoj pH-vrijednosti ili u definiranom pH-području (0,1 - 0,25 - 0,5 ili 1 pH-jedinicu)
- pH gdje je puferni kapacitet maksimalan; za kiselobaznu grupu, tada pH-vrijednost korespondira s njegovom pK vrijednošću
- površina ispod krivulje u definiranom pH-području; za kiselobaznu grupu, površina je proporcionalna njihovoj koncentraciji.

Kvalitativno i kvantitativno mlijeko različitih vrsta i pasmina životinja se razlikuje a posljedično tim razlikama puferni kapacitet mlijeka nije isti. U proizvodnji jogurta, činjenica da različite vrste mlijeka imaju različit puferni kapacitet znači da će se snižavanje pH-mlijeka na 4,6 postići za ~ 2 sata i 45 minuta za kozje mlijeko, za ~ 3 sata i 15 minuta za kravlje mlijeko i za ~ 5 sati i 30 minuta za ovčje mlijeko. Uzrok brže promjene pH-vrijednosti kozjeg mlijeka je u činjenici da kozje mlijeko sadrži značajno manji udjel kazeina i da je β -kazein (glavni kazein oblikovanja gel-strukture) slabo fosforiliran. Acidifikacija ovčjeg mlijeka u usporedbi s kozjim i kravljim najsporija je zbog visokog udjela kazeina i otopljenog CO_2 .

Određeni tehnološki postupci i različiti dodatci mlijeku u većoj ili manjoj mjeri mijenjaju prirodan puferni kapacitet mlijeka. Temperature toplinske obrade mlijeka niže od 100 °C/10 minuta induciraju lagano povećanje pufernog kapaciteta s pH-5,3 na pH-5,0. Pojava se uglavnom može pripisati promjenama u strukturi i sastavu micelnog kalcijevog fosfata i kazein defosforilacije s oslobađanjem anorganskog fosfata i prisutnosti uree u mlijeku. Ultrafiltracija i mikrofiltracija proporcionalno udjelu proteina povećavaju puferni kapacitet mlijeka zbog djelomične eliminacije komponenti sadržanih u vodenoj fazi mlijeka. Homogenizacija uz visoki tlak (> 250 MPa) i dodatak mliječnog praha dobivenog sprej-sustavom umanjuju puferni kapacitet mlijeka, te se on pomiče na pH-5,2 - 5,4. Uzrok slabijega pufernog kapaciteta mlijeka obrađenog visokotlačnom homogenizacijom

su fizikalno-kemijske promjene micelarne strukture kazeina. Negativne promjene pufernog kapaciteta dodatkom mliječnog praha mlijeku pripisuju se interakcijama povezivanja kazeina i β -laktoglobulina izazvanim visokom temperaturom sušenja mlijeka.

Uz prirodne sastojke mlijeka i primijenjene tehnološke postupke najviši je puferni kapacitet primjerice za jogurt na pH-3,6 i između pH-5 i 6. Usporavanje acidifikacije mlijeka fermentacijom uvjetovano je razgradnjom uree u mlijeku koja se djelovanjem bakterijske ureaze razgrađuje na CO_2 i NH_3 . Jednako kao i kod toplinske obrade mlijeka, stvaranje CO_2 iz uree (u acidobaznoj ravnoteži s karbonatima i bikarbonatima) uzrokuje povećanje pufernog kapaciteta na približno pH-6,5 i posljedično tome smanjenje omjera acidifikacije mlijeka. S druge strane, supstitucija dijela obranog mlijeka u prahu s koncentratima proteina sirutke povećava puferni kapacitet mlijeka na pH-4, a istodobno smanjuje njegov puferni kapacitet između pH-5 i 6. Ova je modifikacija pufernog kapaciteta posljedica razlike u najvišem pufernom kapacitetu između koncentrata proteina sirutke (oko pH-4) i obranoga mliječnog praha (između pH-5 i 6).

4.1.3.

Izbor mlijeka

Proizvodnja fermentiranih mlijeka započinje izborom sirovog mlijeka, točnom standardizacijom udjela suhe tvari bez masti (Sbm) i mliječne masti, nakon koje slijedi prerada pripremljenog mlijeka. Sirovine koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka su sirovo mlijeko, obrano mlijeko, vrhnje, kondenzirano mlijeko, i obrano mlijeko u prahu. Svaka od njih mora biti besprijekorne bakteriološke kvalitete radi osiguranja najboljeg razvitka okusa i arome fermentiranih mlijeka.

Sirovo mlijeko koje se koristiti u proizvodnji fermentiranih mlijeka mora sadržavati mali broj: ukupnih bakterija (**UBB**), koliformnih bakterija (**KB**), kvasaca i plijesni. Neovisno o činjenici da te mikroorganizme

uništava temperatura toplinske obrade mlijeka, njihova prisutnost u značajnom broju je indikacija nečistih uvjeta proizvodnje mlijeka. Zbog toga u proizvodnji fermentiranih mlijeka utvrđivanje UBB i KB u sirovom mlijeku moraju biti obvezni testovi. Ukupan broj bakterija u sirovom ohlađenom mlijeku veći od 100.000 cfu mL⁻¹ može značiti da one pripadaju psihrotrofnim bakterijama. Kako su te bakterije sposobne stvarati hidrolitičke termostabilne proteolitičke enzime, razgradnja proteina započinje u sirovom i nastavlja se u toplinski obrađenom mlijeku. Rezultat proteolize proteina mlijeka spora je fermentacija, slaba konzistencija i strani okus fermentiranog mlijeka. Modificirana brza metoda za dokazivanje psihrotrofnih bakterija u sirovom je mlijeku inkubacija uzorka na standardnom hranilištu za utvrđivanje UBB, na temperaturi 21 °C/25 h.

Također, ako je mlijeko u dodiru s nečistim površinama velika je vjerojatnost da je kontaminirano termorezistentnim bakterijama. Te bakterije preživljavaju toplinsku obradu mlijeka, pa njegovom fermentacijom postaju kompetitivna populacija bakterija iz sastava kultura. Posljedično tome fermentacija je znatno usporena a konzistencija proizvoda je atipična. Formiranje ružičastih kolonija na standardnom hranilištu za utvrđivanje UBB može biti dobra rutinska indikacija procjene broja termorezistentnih bakterija u mlijeku. Standardnom metodom broj termorezistentnih bakterija u mlijeku utvrđuje se inkubacijom

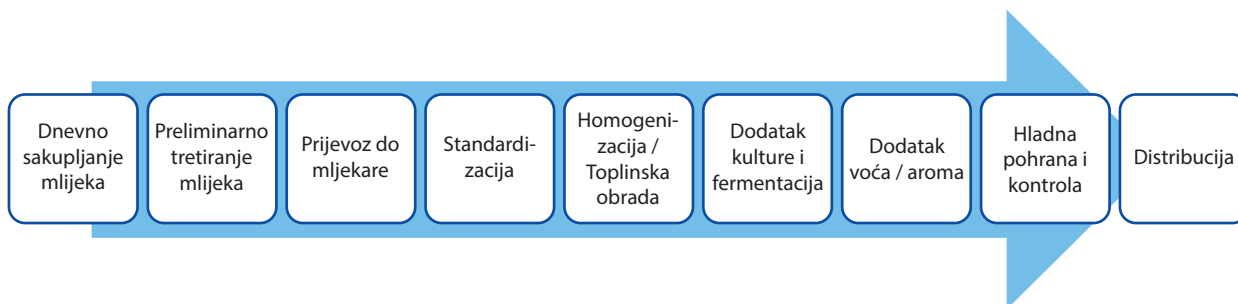
inokuliranoga općeg hranilišta na temperaturi 40 - 45 °C/48 sati.

Ostatci antibiotika, dezinfekcijskih i sanitacijskih sredstava u mlijeku znatno mogu inhibirati aktivnost kulture. Klorni preparati poput hipoklorita ili jodoforma, ako su u mlijeku prisutni u koncentraciji između 6 i 10 mg L⁻¹ djelomično mogu inhibirati aktivnost kulture. Tako, kvartarne amonijeve soli inhibiraju bakterije mliječne kiseline (ovisno o soju) već kod koncentracije 0,1 - 1,0 mg L⁻¹ mlijeka. Zbog toga kvartarne amonijeve soli kao sanitacijsko sredstvo u proizvodnji fermentiranih mlijeka treba izbjegavati.

4.2.

Osnovni tehnološki principi proizvodnje

Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka uključuje jednu ili više procesnih operacija u kombinaciji. Shematski, na slici 4.14. prikazan je opći hodogram proizvodnje za sva fermentirana mlijeka od faze sakupljanja sirovog mlijeka do finalnog proizvoda.



Slika 4.14.

Shematski prikaz općeg hodograma u proizvodnji fermentiranih mlijeka od faze sakupljanja sirovog mlijeka do gotovog proizvoda. (Kopanos, 2011., s dopuštenjem Elseviera.)

Neovisno o vrsti fermentiranog mlijeka, procesne operacije u tehnologiji proizvodnje fermentiranih mlijeka obuhvaćaju sljedeće tehničko-tehnološke postupke:

- pumpanje ili prijenos tekućina
- prijenos topline (hlađenje i zagrijavanje)
- miješanje ingredijenata
- separaciju (standardizacija mliječne masti)
- mikrobnog formiranje gel-strukture.

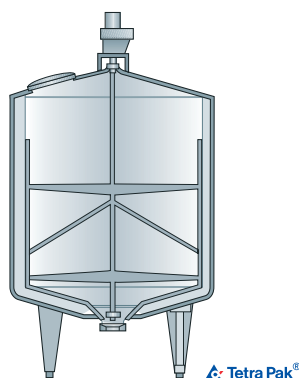
Tehnički i tehnološki svaka pojedina faza proizvodnje značajno utječe na fizikalne, reološke i organoleptičke karakteristike finalnog proizvoda. Također, svaka pojedina faza proizvodnje ima značajan utjecaj na strukturnu i organoleptičku stabilnost fermentiranog mlijeka unutar njegova komercijalnog vijeka održivosti. Tako su za tekuća fermentirana mlijeka homogena tekstura i kremasta konzistencija zadani parametri koji se mogu postići jedino ispravnom primjenom procesnih uvjeta i optimalizacijom komponenti u procesnom sustavu. Analizom mehaničkog utjecaja na strukturu proizvoda, utvrđen je značajni utjecaj sljedećih čimbenika:

- brzina rotacije miješalica u fermentacijskim spremnicima
- dizajn pumpi koje se koriste za prebacivanje fermentiranog mlijeka
- koljenasti spojevi, ventili i uski prolazni otvori
- statičke ili dinamičke miješalice u proizvodnoj liniji
- površina izmjenjivača topline
- brzina hlađenja.

Uzimajući u obzir svu kompleksnost procesnog sustava u dizajnu postrojenja za proizvodnju fermentiranih mlijeka, osim korektne pozicije pojedinih procesnih jedinica, presudno je u prebacivanju koaguluma nakon miješanja koristiti prednosti gravitacijske sile. Važno je limitirati upotrebu mehaničkih pumpi, koljenastih spojeva, uskih prolaza u cijevima koje se koriste za prebacivanje fermentiranog mlijeka, i smanjiti razdaljinu između fermentacijskih spremnika i punilice. Nedostatci i pogreške u dizajnu postrojenja uvijek uzrokuju manje ili veće negativne promjene

u strukturi finalnog proizvoda. Pogreške strukture fermentiranog mlijeka nastale zbog pogrešaka u dizajnu proizvodnog postrojenja ne mogu se ispraviti jednostavnom modifikacijom procesnih parametara ili promjenom vrste korištenih ingredijenata ili sirovina. Drugim riječima, prije odluke o proizvodnji bilo koje vrste fermentiranog mlijeka procesno postrojenje treba biti dobro dizajnirano. Potom slijedi utvrđivanje protokola proizvodnje određenog proizvoda, tako da se uzimaju u obzir svi procesni parametri i njihove korelacije. Za tu svrhu najbolje je koristiti fleksibilno eksperimentalno pilot-postrojenje koje nakon testiranja rezultata omogućava direktnu proizvodnju određenog proizvoda u industrijskim uvjetima.

Za organoleptičku kvalitetu tekućih varijanti fermentiranih mlijeka najosjetljivije su faze proizvodnje postupci koji slijede nakon završene fermentacije. U osnovi oni obuhvaćaju miješanje, pumpanje, hlađenje, uglađivanje, dodavanje i pripremu voća, punjenje i završno hlađenje. Svaka od tih faza nužno uzrokuje smanjenje viskoziteta proizvoda, ali njihovom optimalizacijom gubitak viskoziteta proizvoda u znatnoj se mjeri može poboljšati. U proizvodnji tekućih varijanti fermentiranih mlijeka osobito je važno optimizirati: (i) vrijeme kada započeti s miješanjem čvrsto formirane gel-strukture i (ii) način hlađenja da se izbjegnu postacidifikacija, terminalni šok i nejednolično hlađenje proizvoda. Drugim riječima, hlađenje mora biti dovoljno brzo da se izbjegne postacidifikacija, a miješanje ne smije biti prebrzo da se izbjegne nepravilna kontrakcija proteinskog matriksa. Također, što je formirani gel hlađenjem duže vrijeme izložen visokim temperaturama, izraženija su navedena odstupanja od idealne kvalitete proizvoda. U tom smislu, preporučuje se formirani gel razbijati miješanjem unutar 5 minuta snagom od 15 do 20 rpm. Potom odmah započeti s njegovim hlađenjem uz miješanje snagom od 3 do 5 rpm sljedećih 5 minuta, u kojem proizvod postiže temperaturu od 30 do 35 °C. Temperatura tekućeg hladila u plaštu hladionika mora biti približno 12 °C, a mora ostati konstantna do godine dana unutar temperaturnog raspona od ± 2 °C.



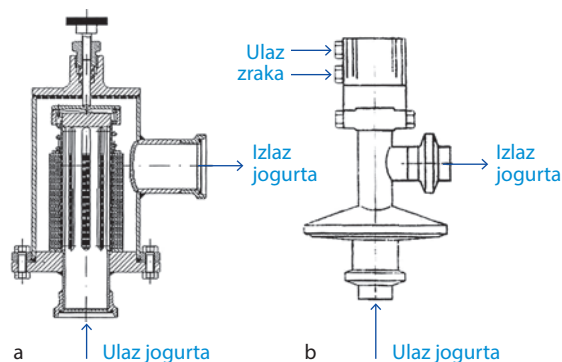
Slika 4.15.

Shematski prikaz koničnog fermentacijskog spremnika. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Druga je opcija da se nakon razbijanja gel-strukture u fermentacijskom tanku proizvod više ne miješa (zbog gubitka viskoziteta), već ostavi da se slobodno slegne na dno koničnog oblika fermentacijskog spremnika (slika 4.15.).

Za procesnu operaciju ujednačavanja glatkoće proizvoda potreban tlak određuje se na temelju udjela proteina i mliječne masti i karakteristika gel-strukture na završetku fermentacije. Za tu svrhu, potrebni tlak se regulira posebno dizajniranim ventilima. Primjer mehaničkoga i pneumatskog sistema za postizanje glatkoće teksture fermentiranih mlijeka prikazan je na slici 4.16.

Brzina protoka fermentiranog mlijeka od fermentacijskog spremnika do linije pakiranja određena je kapacitetom uglađivala. Uglađivalo ovisno o promjeru cijevi u sistemu određuje izbor pumpe. Pumpe prevelikog kapaciteta u neadekvatnom sistemu potiskivat će fermentirano mlijeko isprekidanom brzinom. Suprotno, pumpe premalog kapaciteta protoka zbog prevelike mase fermentiranog mlijeka povisit će rotacijsku brzinu. U smislu smanjenja mehaničkog stresa i posljedično tome oštećenja strukture proizvoda, rotacijska brzina pumpi od približno 60 rpm do maksimalno 100 rpm smatra se najboljom opcijom. Izborom



Slika 4.16.

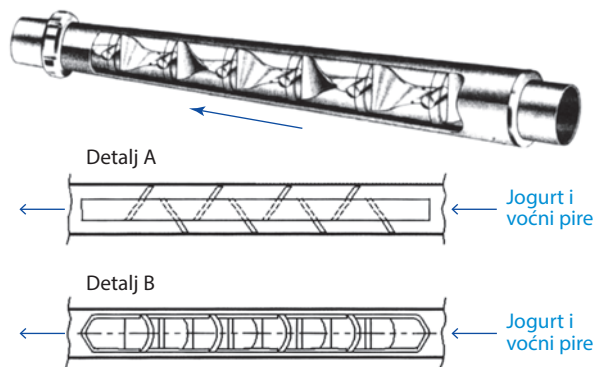
Mehaničko uglađivalo (a) i pneumatsko uglađivalo (b). (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

optimalno dizajnirane pumpe postiže se i poželjna brzina protoka fermentiranog mlijeka (maksimalno 0,4 - 0,5 m/sekundi) kroz sistem cijevi do linije punjenja.

Za poželjna reološka svojstva voćnih varijanti fermentiranih mlijeka ključni su način miješanja voća s proizvodom i vrsta dozatora na miješalici. Voćne varijante jogurta ne hlade se prije punjenja u ambalažu na liniji punjenja, zbog toga u trenutku punjenja temperatura proizvoda treba biti ~ 20 °C. Također, za različite pripravke voća preporučuje se koristiti različito dizajnirane miješalice. U pripremi fermentiranih mlijeka s dodatkom voćnog pirea za postizanje dobre homogenosti treba koristiti statičku miješalicu (slika 4.17.).

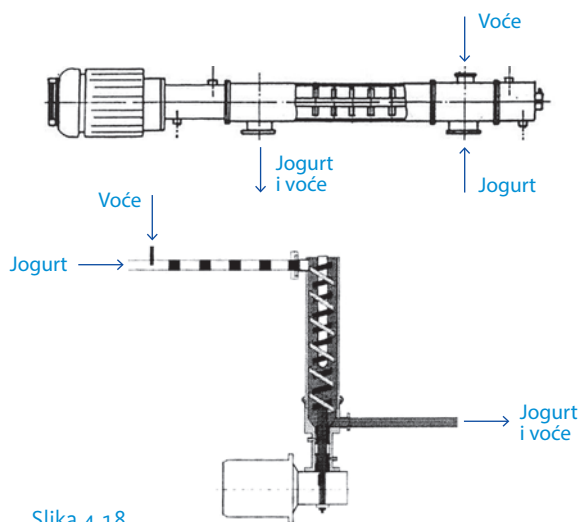
Za voćne varijante fermentiranih mlijeka pripremljene s dodatkom komadića voća poželjno je koristiti dinamičke modele miješalice čija rotacijska brzina miješanja ne prelazi 100 rpm. Dva preporučena modela miješalice prikazuje slika 4.18.

Sistemi za doziranje količine proizvoda trebaju biti dizajnirani tako da imaju nisku razinu mehaničkog stresa, zanemariv učinak na razdvajanje mase proizvoda i da ne uzrokuju turbulenciju i inkorporaciju zraka u trenutku punjenja. Zanimljiv je podatak da gubitci zbog tih mehaničkih fenomena za isti proizvod



Slika 4.17.

Shematski prikaz statičkih modela miješalica za jogurte pripremljene s dodatkom voćnog pirea. (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)



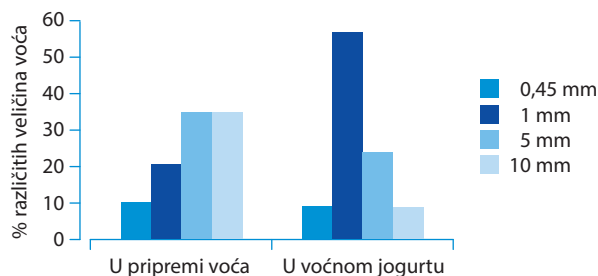
Slika 4.18.

Shematski prikaz dinamičkih modela miješalica. (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

punjen na različitim linijama mogu uzrokovati gubitak viskoziteta proizvoda između 20 i 30 %. Također, za smanjenje gubitka viskoziteta tijekom punjenja proizvoda posebna pažnja mora se posvetiti veličini

mlaznica na punilici. Slika 4.19. na primjeru jogurta pokazuje kako neodgovarajuća punilica usitnjava voće na manje komadiće od poželjnih i kako ima snažan mehanički učinak na pripremu voća i kvalitetu voćnog jogurta.

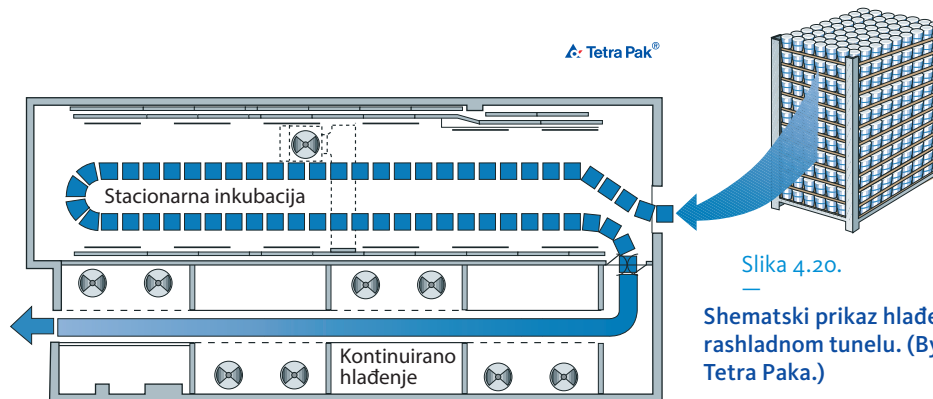
Nakon pakiranja, za čvrstoću fermentiranog mlijeka ključna je faza kontrola hlađenja. Postupak hlađenja u načelu se provodi u dvije povezane faze. Prva faza obuhvaća transport finalnog proizvoda složenog na palete u tunel s automatskim strujanjem hladnog zraka (8 °C), gdje se kroz 90 minuta postiže jednaka temperatura u svim proizvodima složenima na palete. Temperatura proizvoda koji ulaze u tunel s hladnim zrakom je između 25 i 30 °C, a izlazna temperaturu između 10 i 15°C. Druga faza hlađenja mora se sastojati od sporog statičkog hlađenja proizvoda na temperaturi od 4 °C najmanje 24 h (ili bolje 48 h). Ova faza hlađenja neophodna je za korektno formiranje gel-strukture čija je posljedica značajno povećanje viskoziteta (fiziikalna i biološka fermentacija) i stabilnosti



Slika 4.19.

Učinak punilice na veličinu komadića voća tijekom pripreme voća i u voćnom jogurtu. (Silfverberg, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

proizvoda do njegova predviđenog vremena održivosti. Slika 4.20. pokazuje princip kontinuiranog i stacionarnog hlađenja fermentiranog mlijeka organiziranog u rashladnom tunelu.



Slika 4.20.

Shematski prikaz hladjenja fermentiranih mlijeka u rashladnom tunelu. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

4.3.

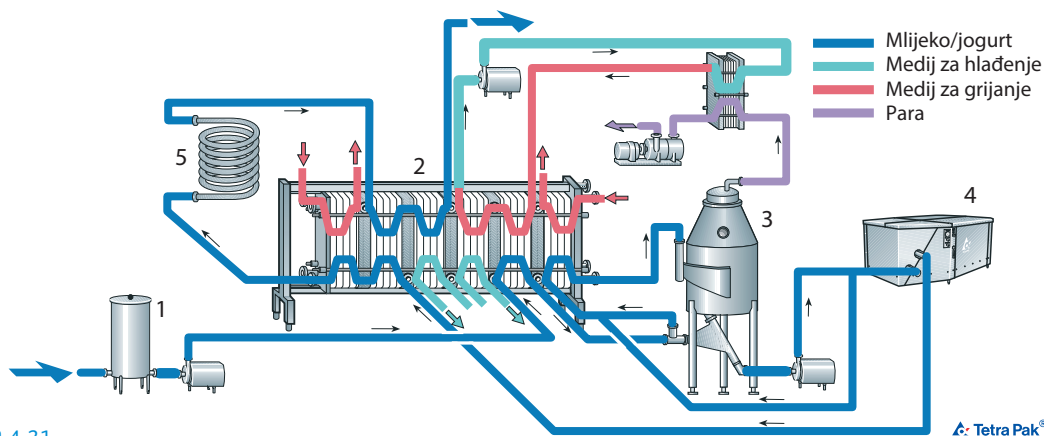
Tehnološki procesi

Glavni su tehnološki procesi u proizvodnji svih vrsta fermentiranih mlijeka:

- priprema mlijeka
- homogenizacija

- toplinska obrada
- fermentacija
- hladjenje
- pakiranje proizvoda.

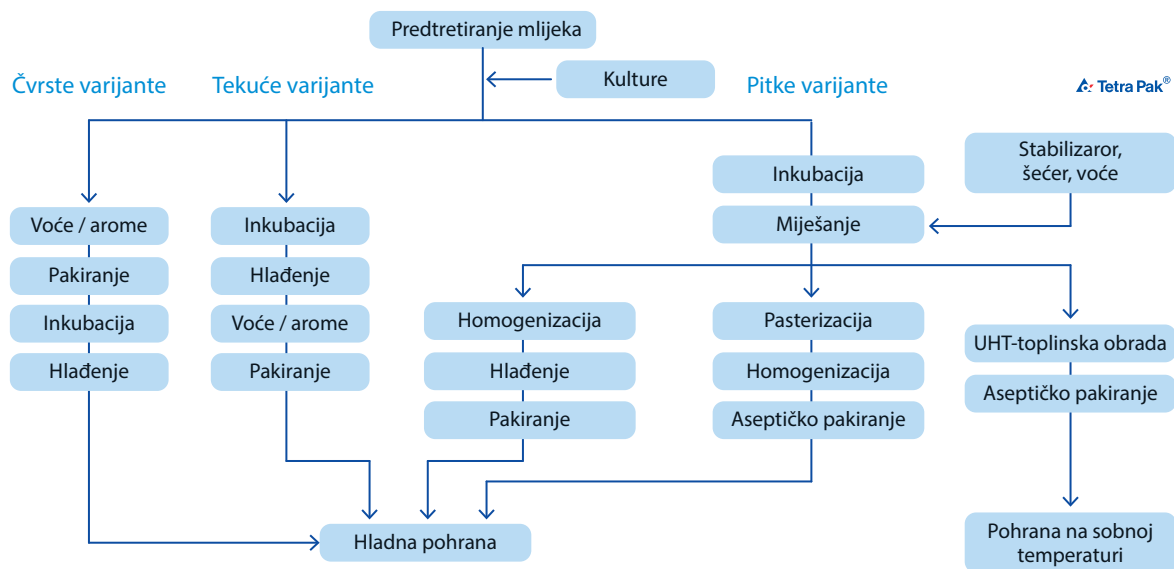
Priprema mlijeka, homogenizacija i toplinska obrada u proizvodnji fermentiranih mlijeka su inicijalni tehnološki procesi, a zajedničkim imenom nazivaju se predtretanom mlijeka. Shematski prikaz procesne linije za predtretanje mlijeka prikazuje slika 4.21.



Slika 4.21.

Shematski prikaz linije za predtretanje sirovog mlijeka u proizvodnji fermentiranih mlijeka.

Detalji: 1 balansni spremnik, 2 pločasti izmjenjivač topline (pasterizator), 3 evaporator, 4 homogenizator, 5 zadržavač topline. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)



Slika 4.22.

Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji čvrstih, tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka s dodatkom i bez dodatka voća ili aroma. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Osnovne tehnološke operacije u proizvodnji čvrstih, tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka s dodatkom i bez dodatka voća/aroma shematski su objedinjeni slikom 4.22.

4.3.1.

Priprema mlijeka

U proizvodnji se fermentiranih mlijeka pojam priprema mlijeka primarno odnosi na modifikaciju njegova prirodnog udjela suhe tvari bez masti (**Sbm**) i mliječne masti. Postupak modifikacije podrazumijeva obogaćivanje Sbm i standardizaciju mliječne masti. Faza pripreme mlijeka podrazumijeva i dodatak ostalih dopuštenih ingredijenata, poput stabilizatora,

umjetnih aroma, boja, zaslađivala, vitamina, minerala i konzervansa. Na slici 4.23. prikazan je aseptički dozator koji služi za doziranje termolabilnih dodataka poput laktoze, boja, aroma, prebiotika, omega-3 masnih kiselina ili vitamina.

Tehnološki postupci klarifikacija i deaeracija sirovog mlijeka, ako se provode, također spadaju u fazu pripreme mlijeka. U slučajevima ako su uključene u fazu pripreme mlijeka provode se prije postupka obogaćivanja Sbm i standardizacije mliječne masti. Kada se Sbm mlijeka obogaćuje osušenim mliječnim ingredijentima poput obranoga mliječnog praha, deaeracija se provodi nakon pasterizacije. Miješanje obranog mlijeka u prahu s mlijekom uvijek u određenoj mjeri uzrokuje inkorporaciju zraka koji poslije utječe na oscilacije reoloških svojstava proizvoda (čvrstoću, viskozitet, sinerezu). Deaeracija obogaćenog mlijeka provodi se u vakuumu na temperaturi 70 - 75 °C uz



▲ Tetra Pak®

Slika 4.23.

Aseptički dozator ugrađen u proizvodnu liniju za doziranje dopuštenih termolabilnih dodataka mlijeku. (S dopuštanjem Tetra Paka.)

tlak niži od 1 MPa (~ 0,7 - 0,8 bara). U tim slučajevima deaeracija:

- uklanja nepoželjne komponente okusa ako su one prisutne u mlijeku
- poboljšava viskoznost i stabilnost gel-strukture tijekom i nakon završene fermentacije.

4.3.1.1.

Obogaćivanje suhe tvari i standardizacija mliječne masti

U proizvodnji fermentiranih mlijeka pojam obogaćivanje i standardizacija mlijeka odnosi se na tipizaciju mlijeka na određeni udjel suhe tvari bez masti (Sbm) i mliječne masti. Obogaćivanje Sbm mlijeka provodi se prvenstveno zbog povećanja čvrstoće i viskoznosti gel - strukture i udjela proteina u gotovom proizvodu. Nakon obogaćivanja suha tvar (ST) mlijeka (uključivo i udjel mliječne masti) je između 9 % za obrano mlijeko i više od 20 % za koncentrirane varijante fermentiranih mlijeka. Ipak, za većinu vrsta

fermentiranih mlijeka suha tvar je nakon obogaćivanja između 12,5 i 16 % (~ 14 %), a obogaćeno mlijeko sadrži ~ 4 - 5 % proteina.

Standardizacija mlijeka podrazumijeva tipizaciju mliječne masti mlijeka na željeni udjel mliječne masti u gotovom proizvodu. Uobičajen je udjel mliječne masti u niskokaloričnim varijantama 0,1 - 2 %, a u punomasnim varijantama fermentiranih mlijeka on je između 3,2 i 5 %. Iznimka je grčka varijanta jogurta koja može sadržavati i više od 10 % mliječne masti.

U većini se slučajeva standardizacijom i obogaćivanjem mlijeka u proizvodnji fermentiranih mlijeka značajno smanjuje udjel masti (30 - 40 %), a povećava se udjel laktoze (~ 6 - 7 %) i proteina (~ 4 - 5 %). Zbog toga, specifična gustoća mlijeka je veća i na temperaturi od 20 °C obično je između 1030 i 1040 g.

4.3.1.1.1.

Obogaćivanje suhe tvari

U svrhu poboljšanja prvenstveno svojstva gel-strukture fermentiranih mlijeka prirodna suha tvar bez masti (Sbm) mlijeka se na umjetan način povećava najčešće za 1 - 3 %. Veće povećanje Sbm (3 - 4 %) preporučuje se za fermentirana mlijeka nižeg udjela mliječne masti (< 0,5 i 0,5 - 2 %) čija je gel-struktura u odnosu na proizvode s udjelom mliječne masti većim od 2,5 % znatno mekša.

U mljekarskoj se industriji obogaćivanje Sbm u mlijeku postiže korištenjem membranskih tehnologija ili dodatkom tekućih ili osušenih mliječnih ingredijenata (aditiva). U osnovi, ti se ingredijenti dijele na kazeinske [obrano mlijeko u prahu (OMP), koncentri proteina mlijeka (KPM), Na-kazeinat, Ca-kazeinat] i pripravke sirutke [izolati proteina sirutke (IPS), koncentri proteina sirutke (KPS), hidrolizati proteina sirutke (HPS) mikroproteini sirutke (MPS)]. Svojstva svakog od tih ingredijenata su drukčija, a za obogaćivanje Sbm ili poboljšanja drugih karakteristika mlijeka oni se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji. Obogaćenje Sbm mlijeka tekućim ili osušenim mliječnim ingredijentima povećava titracijsku

kiselost mlijeka kao posljedicu povećanja njegova prirodna pufernog kapaciteta. U proizvodnji fermentiranih mlijeka to znači da povećana titracijska kiselost mlijeka skraćuje vrijeme potrebno za formiranje gelstrukture proizvoda. Također, obogaćivanjem Sbm u mlijeku stvaraju se povoljniji uvjeti za kinetiku rasta bakterija iz sastava kultura. Na slici 4.24. prikazana su dva moderna sustava za miješanje tekućih i osušenih mliječnih ali i drugih ingredijenata. Svojim dizajnom oni ne limitiraju korištenje drugih novih dodataka koji se učestalo pojavljuju na tržištu. Smještanjem u proizvodnu liniju oba sustava omogućavaju brzo i precizno miješanje mlijeka i dodanih ingredijenata prema zadanom omjeru željnih dodataka.



Slika 4.24.

Sustavi za dodavanje različitih ingredijenata mlijeku.
(S dopuštenjem Tetra Paka.)

Tehnički se u proizvodnji fermentiranih mlijeka za obogaćivanje Sbm mlijeka najčešće koristi postupak toplinske evaporacije u vakuumu (EV) ili jedna od membranskih tehnika, ultrafiltracija (UF) i reverzna osmoza (RO). Tim se tehnološkim postupcima djelomično uklanja voda iz mlijeka, a posljedica je istodobno povećanje udjela mliječne masti i Sbm u mlijeku. Općenito, membranska se tehnologija temelji na korištenju različitih membranskih sustava kojima je zajedničko razdvajanje ulazne sirovine na retentat, ili dio ulazne sirovine koja ne prolazi membranu i permeat, ili dio ulazne sirovine koja prolazi membranu.

U mljekarskoj industriji membranske separacijske tehnike koje se koriste za različite svrhe su sljedeće:

- reverzna osmoza (RO) - za dehidraciju: sirutke, UF permeata i kondenzata
- ultrafiltracija (UF) - za koncentriranje proteina u mlijeku i sirutki i za standardizaciju proteina u mlijeku potrebnog za primjerice proizvodnju jogurta ili sira
- nanofiltracija (NF) - za djelomičnu desalinizaciju sirutke, pročišćavanje UF permeata ili retentata
- mikrofiltracija (MF) - za redukciju bakterija u obranom mlijeku, sirutki i salamuri, ali i za uklanjanje masti iz sirutke namijenjene za pripremu koncentrata proteina sirutke (KPS), te za odvajanje proteina mlijeka.

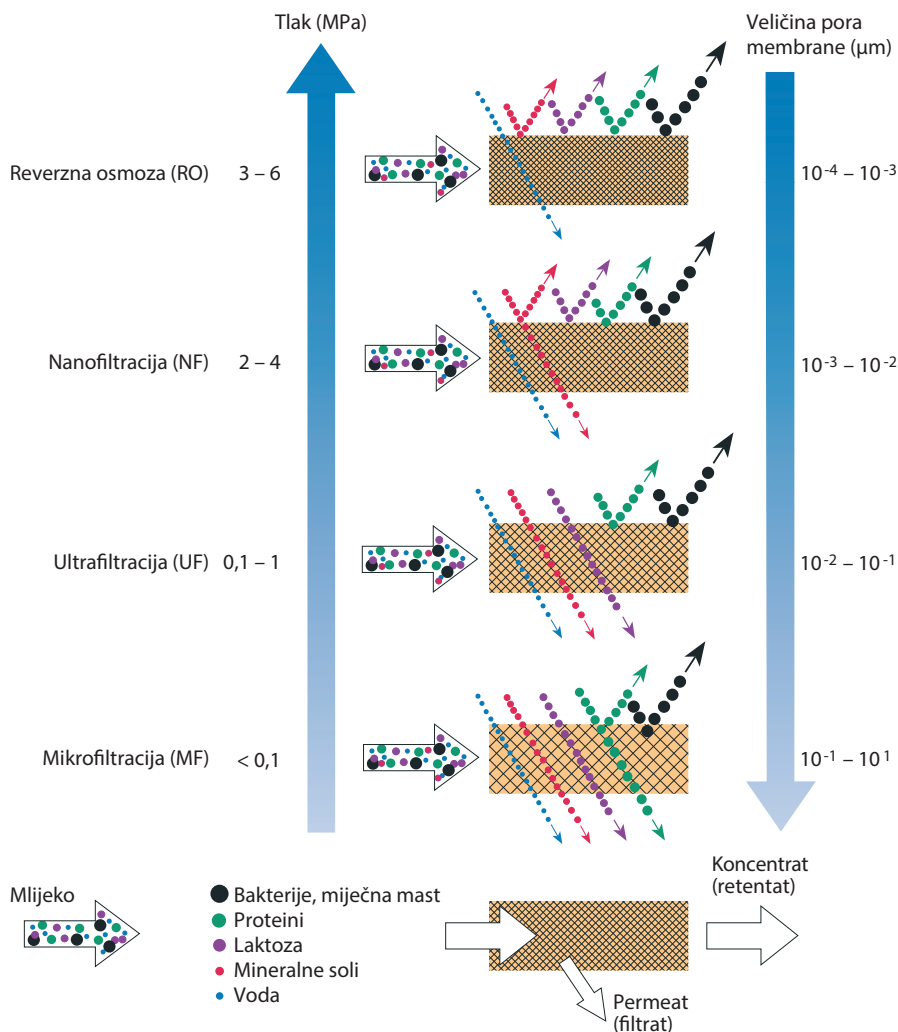
Temeljni principi odvajanja pojedinačnih sastojaka iz mlijeka membranskim tehnikama prikazani su na slici 4.25.

4.3.1.1.1.1.

Evaporacija

Evaporacijom se voda iz mlijeka uklanja u vakuumu (radi što manjeg uznemiravanja mlijeka) na temperaturi između 70 i 90 °C. Cirkularni evaporator kakav je prikazan na slici 4.26. u proizvodnji fermentiranih mlijeka koristi se u slučajevima ako je potreban niski stupanj koncentriranja mlijeka (1,1 - 1,25 puta ili od 13 % suhe tvari mlijeka na 14,5 - 16,25 %). Zagrijano mlijeko u vakuumski prostor evaporatora ulazi tangencijalno velikom brzinom i formira tanak film koji vrtložno kruži oko stjenke evaporatora. Potreban dio vode iz mlijeka ispari se parom koja se iz radnog prostora evaporatora uklanja pomoću pripadajućeg mu kondenzatora.

U praksi gdje za to postoje uvjeti, mlijeko prije evaporacije (koja može biti organizirana i tako da mlijeko prolazi kroz dvije ili više evaporacijskih jedinica) prolazi kroz balansni spremnik u pasterizator, gdje se zagrijava na potrebnu temperaturu. Prolaskom mlijeka kroz dvije ili više evaporatorskih jedinica koje su povezane u seriju, omogućeno je da svaka druga serija uz



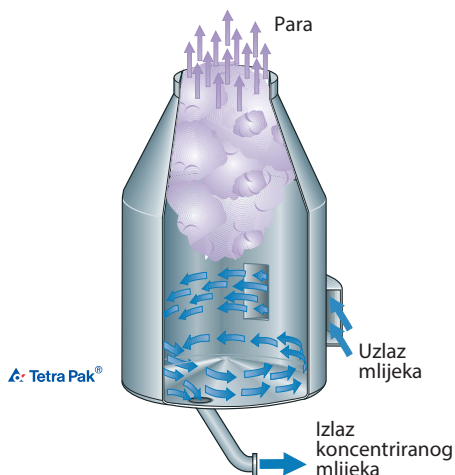
Tetra Pak®

Slika 4.25.

Shematski prikaz temeljnih principa membranskih tehnika za odvajanje sastojaka mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

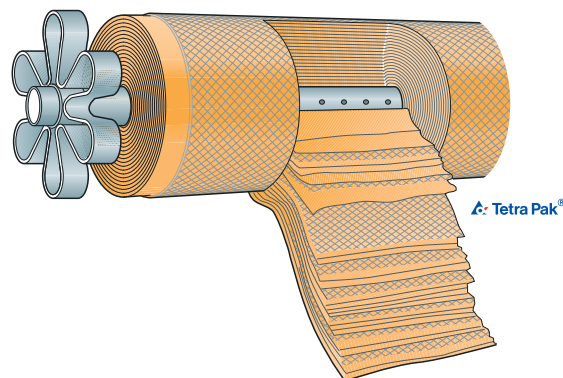
nižu temperaturu može raditi pod većim vakuumom u odnosu na prvu. Prolaskom kroz prvu evaporatorsku jedinicu temperatura mlijeka je primjerice 60 °C, a u drugoj zbog višeg tlaka 50 °C. Prolaskom kroz evaporatorske jedinice voda isparava, a koncentrirano se mlijeko u formi tankog filma iz pare izdvaja u ciklonu.

U sustavima gdje su dvije evaporatorske jedinice povezane s termokompresorom potrebno je približno 0,25 kg pare za evaporaciju 1 kg vode. Najveća koncentracija koja se postiže evaporacijom u vakuumu je ~ 48 % za obrano i ~ 52 % za punomasno mlijeko.



Slika 4.26.

Shematski prikaz načina uklanjanja dijela vode iz mlijeka sustavom za evaporaciju mlijeka u vakuumu. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)



Slika 4.27.

Konfiguracija polimerne membrane spiralnog namotaja povezane s antikompresijskom jedinicom. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

4.3.1.1.1.2.

Ultrafiltracija i reverzna osmoza

Premda na tržištu postoje različite vrste membrana za separaciju sastojaka mlijeka, u proizvodnji fermentiranih mlijeka najčešće se koriste polimerne membrane spiralnog namotaja za reverznu osmozu, a membrane s mikrovlaknima za ultrafiltraciju. Polimerne membrane spiralnog namotaja bitno se razlikuju od drugih membrana koje se koriste za filtraciju mlijeka pa ih je vrijedno detaljnije opisati.

Membranu spiralnog namotaja čine jedna ili više membrana, pri čemu se svaka membrana sastoji od dvaju slojeva koji su međusobno odvojeni poroznim permeat provodljivim polimerom. Taj se specifični polimer naziva međurazdvajajućim permeat kanalom koji potpuno slobodno prolazi permeat. Dva su sloja membrana s permeat kanalom između hermetički zatvorena na oba kraja ali tako da jedan kraj tvori spiralni namotaj. Otvoreni kraj membrane povezan je s perforiranom cijevi za sakupljanje permeata. Plastična svojstva mrežasto dizajniranoga polimernog materijala istodobno imaju i funkciju kanala za protok ulaznog mlijeka kroz sustav svake

membrane. Također, zbog svojstva plastičnosti ulazni prostori membrana imaju funkciju generatora turbulencije, što membranu čini čistom uz relativno nisku frekvenciju. Polimerne membrane spiralnog namotaja opremljene su antikompresorskom jedinicom smještenom između ulaznih krajeva membranskih elemenata radi sprječavanja usporjenja protoka mlijeka između slojeva membrana. Konfiguraciju polimerne membrane spiralnog namotaja s međurazdvajajućim permeat kanalom i povezanu s antikompresorskom jedinicom prikazuje slika 4.27.

Kapacitet prolaska sirovine kroz membranu naziva se omjer protoka i označava jedinicu volumena koja prolazi kroz jedinicu površine membrane u jedinici vremena. Kapacitet prolaska sirovine kroz membranu izražava se brojem litra/m² površine membrane/sat. Stupanj koncentracije izražava se koeficijentom koncentracije (CF) na temelju izračuna volumena retentata u odnosu na volumen ulazne sirovine. Smanjenje volumena ulazne sirovine za 50 % znači da je volumen retentata jednak CF vrijednosti 2.

4.3.1.1.1.2.1.

—
Reverzna osmoza

Obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka reverznom osmozom (RO) temelji se na visokotlačnom membranskom postupku izdvajanja vode iz mlijeka koji se provodi uz jačinu tlaka od 3 do 4 MPa. Tehnički je postupak RO dizajniran tako da se jedino energijom pumpe istodobno uklanja voda, a ostali se sastojci mlijeka koncentriraju. Omjer protoka mlijeka kroz membranu tehnikom RO može biti reda veličine 6 - 10 litara na 1 m² h⁻¹.

Reverzna osmoza može se koristiti i kao potpora toplinskoj evaporaciji mlijeka u vakuumu, ili je u potpunosti zamijeniti. U usporedbi s EV prednost je postupka RO u smanjenju hidrauličkog opterećenja, što implicira veće povećanje količine suhe tvari u jedinici vremena (h). Toplinska evaporacija u vakuumu dizajnirana je tako da se određena količina vode iz mlijeka uklanja uz hidrauličko opterećenje. Suprotno, za istu količinu uklonjene vode iz mlijeka tehnika RO, koja za tu namjenu koristi jedino energiju pumpe, ima bolju protočnost. Zbog toga se reverznom osmozom u jedinici vremena postiže veće povećanje Sbm mlijeka.

4.3.1.1.1.2.2.

—
Ultrafiltracija

Obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka membranskom filtracijom ili ultrafiltracijom (UF) selektivni je frakcijski sustav membranske tehnologije u kojem se koristi tlak snage do 1MPa, uz zadržavanje čestica mlijeka molekularne težine između 1000 i 1,000.000. U retentatu postupkom UF djelomično ili potpuno ostaju proteini, mliječna mast i bakterije. Negativna je strana UF u povezivanju i čestica većih molekularnih težina koje su se istaložile na sekundarnoj membrani. Zbog toga se obogaćivanje Sbm mlijeka postupkom UF prvenstveno preporučuje za obrano mlijeko. Zadržavanjem koeficijenta koncentracije (CF) blizu 2, UF se može koristiti i za punomasno mlijeko.

Prednost je separacije komponenti mlijeka UF u usporedbi sa separacijom tehnikom RO u činjenici da

njezine membrane u potpunosti zadržavaju prolazak proteina, dok istodobno laktoza i pepeo kroz membrane prelaze u permeat podsustavom dijafiltracije. U procesu dijafiltracije u retentat se dodaje voda koja razrjeđuje udjele laktoze i pepela. Ti razrijeđeni sastojci ponovno prolaze kroz membrane i dobiva se retentat s nižim koncentracijama laktoze i pepela. Istodobno, proteini s djelomično uklonjenim udjelima laktoze i pepela progresivno se koncentriraju.

Ultrafiltracija mlijeka provodi se na temperaturama između 50 i 55 °C, dok se ne postigne faktor koncentracije mlijeka od 1,4. Zbog većeg stupnja koncentracije, mlijeko pokazuje dobra acidifikacijska svojstva usprkos smanjenom udjelu laktoze. Dvostruka UF koristi se i za specifična fermentirana mlijeka koja sadrže izrazito nisku razinu laktoze. Ultrafiltracija se kao tehnološki postupak pokazala dobrom i u proizvodnji koncentriranih fermentiranih mlijeka, primjerice grčke varijante jogurta.

4.3.1.1.1.2.3.

—
Obrano mlijeko u prahu

Dodatak obranog mlijeka u prahu (OMP) u proizvodnji fermentiranih mlijeka alternativan je način obogaćivanja suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka. Prednosti obogaćivanja mlijeka OMP:

- prihvatljiv je način obogaćivanja Sbm mlijeka za mliječare manjeg kapaciteta
- niži su početni troškovi u odnosu na EV, UF i RO
- šećeri ili stabilizatori mogu se istodobno dodati u mlijeko ako se proizvode voćne varijante.

Obrano mlijeko u prahu suhi je mliječni ingredient koji pripada skupini kazeinskih pripravaka. Priprema se od koncentriranoga obranog mlijeka dobivenog evaporacijom u vakuumu koje se potom homogenizira i suši raspršivanjem u uvjetima visoke temperature i visokog tlaka. Opisanim se postupkom oblikuju fine male jednolične čestice mliječnog praha (~ 50 - 150 μm). Pripremljen za korištenje OMP sadrži: 34,0 - 37,0 % proteina, 49,5 - 52,0 % laktoze, 0,6 - 1,25 % mliječne masti i 0,2 - 8,6 % pepela. Za proizvodnju

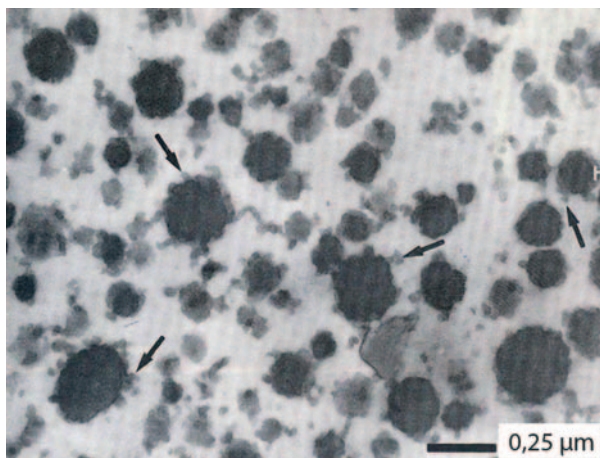


Slika 4.28.

Izgled strukture obranoga mliječnog praha.

fermentiranih mlijeka najvažnije je svojstvo obranog mlijeka u prahu njegova topljivost. Najvišu topljivost (100 %) ima instant obrano mlijeko u prahu, nešto nižu (98 - 99,9 %) obrano mlijeko proizvedeno raspršivanjem, a najnižu (80 - 85 %) ono koje je proizvedeno sušenjem na valjcima. Za ilustraciju, na slici 4.28. prikazan je izgled obranoga mliječnog praha dobiven sprej sistemom sušenja.

Obrani mliječni prah prije dodavanja mlijeku najprije se otopi u mlijeku zagrijanom na 40 °C u omjeru 1 : 5 uz konstantno brzo miješanje da se osigura potpuna i brza inkorporacija mliječnog praha u mlijeko. Potom se ta mješavina dodaje mlijeku koje će se koristiti za proizvodnju određenoga fermentiranog



Slika 4.29.

Mikrostruktura toplinski obrađenog mlijeka (90 °C/5 min) obogaćenog obranim mliječnim prahom do 14 % (w/w) ukupne suhe tvari.

Detalji: mrlje i niti (označeni strelicom) predstavljaju proteinske agregate nastale interakcijom denaturiranih proteina sirutke i κ -kazeina koji okružuju kazeinsku micelu. Slika je dobivena transmisivjskim elektronskim mikroskopom (TEM); bar = 0,25 µm. (Tamime i sur., 1996., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

mlijeka. U proizvodnji se primjerice jogurta, OMP za obogaćivanje suhe tvari mlijeka koristi najčešće u količini između 1 i 3 % koja mijenja udjele proteina, laktoze i pepela u Sbm. Ovisno o količini OMP koji je dodan mlijeku promjene udjela suhe tvari bez masti i proteina prikazuje tablica 4.9, a izgled njegove mikrostrukture prikazuje slika 4.29.

Tablica 4.9.

	Dodatak obranog mlijeka u prahu (%)	Suha tvar bez masti u mlijeku (%)	Povećanje suhe tvari bez masti (%)	Proteini u mlijeku (%)	Povećanje proteina (%)
Utjecaj dodatka obranog mlijeka u prahu na povećanje udjela suhe tvari bez masti i proteina u mlijeku	0	8,50	–	3,50	–
	1	9,42	0,9	3,80	0,3
	2	10,34	1,84	4,10	0,6
	3	11,26	2,70	4,40	0,9

(prilagođeno prema Rašiću i Kurmanu, 1978.)

U odnosu na obogaćivanje Sbm mlijeka postupkom ultrafiltracije, primjerice čvrsti jogurt proizveden dodatkom OMP ima manju predispoziciju za sinerezu i bolja organoleptička svojstva. Uz prednosti, obogaćivanje mlijeka s OMP u manjoj ili većoj mjeri je povezano s inkorporacijom određenog postotka zraka u mlijeko koji poslije fermentacijom mlijeka može biti uzrok nepoželjnih promjena u kvaliteti formiranoga gela. U proizvodni proces za eliminaciju zraka preporučuje se uključiti deaeracija mlijeka u vakuumu na temperaturi 70 - 75 °C uz tlak od < 0,1 MPa (0,7 - 0,8 bara).

4.3.1.1.1.2.4.

Koncentrati proteina mlijeka

Dodatak koncentrata proteina mlijeka (KPM) za obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka u proizvodnji fermentiranih mlijeka jedna je od alternativnih zamjena za dodatak obranog mliječnog praha (OMP). Koncentrati proteina mlijeka dobivaju se istim načinom kao i OMP, ali se mlijeko koncentrira na 40 - 85 % udjela proteina (kazein i laktalbumin). Povećanjem udjela proteina proporcionalno se snižava udjel laktoze u mlijeku. U osušenom obliku KPM s nižim udjelom proteina (40,0 - 43,0 %) sadrži: 45 - 47 % laktoze, 0,5 - 1,5 % mliječne masti i 7,0 - 8,0 % pepela. Koncentrati proteina mlijeka s visokim udjelom proteina (79,0 - 85 %) sadrže: 4,0 - 6,0 % laktoze, 1,0 - 2,0 % mliječne masti i 7,0 - 8,0 % pepela. Izgled osušenog oblika koncentrata proteina mlijeka prikazuje slika 4.30.



Slika 4.30.

Izgled strukture osušenog koncentrata proteina mlijeka.



Slika 4.31.

Izgled kazeina u prahu (a) Na-kazeinat, (b) Ca-kazeinat.

4.3.1.1.1.2.5.

Kazein u prahu

Kazein u prahu za obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka se u proizvodnji fermentiranih mlijeka najčešće dodaje u obliku Na-kazeinata ili Ca-kazeinata praha (slika 4.31.) u količini do 2 %.

Nedostatak stabilne sekundarne i tercijarne strukture čine kazein stabilnim na toplinsku denaturaciju

a molekula zadržava svoju površinsku aktivnosti. Aktivna površina kazeina ulazi u reakcije s drugim sastojcima mlijeka te on poprima dobra pjenasta i emulgacijska svojstva poželjna u proizvodnji jogurta ili jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka. Obogaćivanjem Sbm mlijeka dodatkom kazeina u prahu postiže se



Slika 4.32.

Izgled konzistencije čvrstog jogurta dodatkom kazeina u prahu > 2 %.

bolji učinak na konzistenciju proizvoda u usporedbi s proteinima sirutke. Tako čvrsti jogurt proizveden s dodatkom Na-kazeinata ima veću viskoznost, ali pokazuje i veću sinerezu u usporedbi s jogurtom kojem je dodan OMP ili koncentrat proteina sirutke. Manji utjecaj na povećanje sinereze jogurta od Na-kazeinata ima dodatak Ca-kazeinata, te se on za proizvodnju čvrstog jogurta smatra pogodnijim izborom. Kazein u prahu dobar je izbor i za obogaćivanje Sbm mlijeka u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka. Izbor kazeina za obogaćivanje Sbm mlijeka osobito je opravdan u slučajevima ako se uz probiotičke bakterijske sojeve koriste jedino sojevi *S. thermophilus* vrste iz jogurtne kulture.

Količina kazeina u prahu veća od 2 % uzrokuje nepoželjno i nekontrolirano zgušnjavanje fermentacijskog mlijeka čija je posljedica atipična gel-struktura finalnog proizvoda. Za ilustraciju nepoželjnog i nekontroliranog zgrušavanja fermentacijskog mlijeka dodatkom prevelikih količina kazeina u prahu na slici 4.32. prikazan je ne karakterističan izgled konzistencije za čvrsti jogurt.

4.3.1.1.1.2.6.

Sirutka u prahu

Osušeni pripravci sirutke osim za svrhu obogaćivanja suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka, u proizvodnji fermentiranih mlijeka prvenstveno se koriste za: (i) standardizaciju omjera kazein : proteini sirutke u mlijeku i (ii) kao zamjena za mliječnu mast. Za višestruku namjenu u proizvodnji fermentiranih mlijeka najčešće se koriste sljedeći osušeni sirutkini pripravci:

- koncentrirani proteini sirutke (KPS)
- izolati proteina sirutke (IPS)
- hidrolizati proteina sirutke (HPS)
- mikroproteini sirutke (MPS).

Osim prema različitim svojstvima, ti se pripravci sirutke međusobno razlikuju i prema udjelu proteina. Tako KPS sadrže ~ 35 - 85 % proteina sirutke, HPS ~ 85 %, a IPS i MPS najčešće > 95 %. Slika 4.33. prikazuje izgled različitih pripravaka proteina sirutke u prahu.

Koncentrati proteina sirutke (KPS) dobivaju se iz sirutke uglavnom kombinacijom različitih membranskih postupaka: ultrafiltracije (UF), diafiltracije (DF), mikrofiltracije (MF) ili reverznom osmozom (RO). Često su u pripremu KPS uključeni i postupci njezine demineralizacije metodama ionske izmjene ili elektrodijalize. Koncentrati proteina sirutke sastoje se od β -laktoglobulina (9,8 %), α -laktalbumina (3,7 %), albumina krvnog seruma (1,2 %), imunoglobulina (2,1 %) i proteoza i peptona (2,4 %). Svi ti proteini sadržani u KPS stabilni su na utjecaj kiselina i enzima, te zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnoga gruša. Zbog svojstava poput topljivosti, sposobnosti vezanja vode, stvaranja gela i emulgiranja, koncentrati proteina sirutke osobito su pogodni za primjenu u proizvodnji jogurta. Osim što služe za obogaćivanje Sbm mlijeka, koncentrati proteina sirutke dodani u mlijeko ponašaju se poput hidrokoloidnih čestica. Zbog toga se KPS često koriste u proizvodnji tekućeg jogurta, gdje zamjenjuju hidroksikoloidnu funkciju stabilizatora. Za poboljšanje viskoznosti i okusa te smanjenja sinereze, KPS se u proizvodnji tekućeg jogurta dodaju u količini 1 - 2 %. Iznimno se



Slika 4.33.

Izgled strukture osušenih pripravaka sirutke.

Detalji: (a) izolati proteina sirutke [IPS (bijela boja)], (b) koncentrat proteina sirutke [KPS (krem boja)], (c) mikroproteini sirutke (MPS).

KPS u količini od 3 % koriste u proizvodnji jogurta od kozjeg mlijeka, čija je konzistencija u usporedbi s jogurtom od kravljeg mlijeka znatno nježnija. Dodatak KPS u količini većoj od 2 % daje brašnast okus tekućem jogurtu, a za poboljšanje viskoznosti i smanjenje sinereze čvrstog jogurta koncentrat proteina sirutke nisu prikladni.

Izolati proteina sirutke (IPS) u prahu dobivaju se intenzivnom dijafiltracijom, nakon koje slijedi membranska filtracija i sprej-sušenje. Hidrolizati proteina sirutke (HPS) dobivaju se tretiranjem sirutke u kiselim uvjetima i primjenom visokih temperatura toplinske obrade radi izolacije proteina. Mikroproteini sirutke (MPS) dobivaju se iz koncentrata proteina sirutke koji prolaze kroz specijalno dizajnirani tehnološki postupak sušenja. Nakon sušenja čestice mikroproteina sirutke ujednačene su veličine s prosječnim promjerom od 1 μm . Procesom mikroproteinizacije proteini sirutke kompletno su denaturirani te im je u potpunosti smanjena sposobnost agregiranja. Zbog toga se oni smatraju vrlo prikladnim dodatkom za fermentirana mlijeka s niskim udjelom mliječne masti ($\leq 2\%$), ali istodobno i za poboljšanje okusa njihovih punomasnih varijanti ($> 2\%$ mliječne masti). Svojom mikrostrukturom i veličinom, MPS se ponašaju slično emulgatorskim uljnim česticama, pa je osjećaj proizvoda u ustima pun neovisno o njegovu udjelu mliječne masti. Također, zbog istog svojstva MPS proizvodu daju

kremast izgled i neprozirnost bez negativnog utjecaja na mliječnu mast.

U proizvodnji fermentiranih mlijeka prednosti dodatka jednog ili kombinacije pripravaka proteina sirutke općenito su sljedeće:

- niža cijena u usporedbi s OMP
- poboljšava se tekstura proizvoda povećanjem viskoznosti i čvrstoće gel-strukture
- smanjuje se predispozicija za sinerezu
- standardizira se omjer kazein : proteini sirutke, što pomaže u postizanju stalne kvalitete finalnog proizvoda
- zamjenjuju se nemliječni dodatci
- dobar su izbor zamjene za mliječnu mast
- poboljšava se okus u usporedbi s nemliječnim dodatcima
- poboljšava se nutritivna vrijednost proizvoda.

Obogaćivanje Sbm mlijeka proteinima sirutke u količini $\sim 1 - 2\%$ koristi se u slučajevima kada se u potpunosti želi spriječiti izdvajanje sirutke na površinu proizvoda. Dodatkom proteina sirutke mlijeku povećava se udjel proteina sirutke u odnosu na kazein od $\sim 0,7$ na $2,0 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Poslije se fermentacijom mlijeka zbog povoljnijeg omjera između različitih proteina mlijeka povećava čvrstoća gel-strukture, a posljedično tome sinereza gotovo izostaje. Tako je u

produktivni tekućeg jogurta sirutka u prahu pogodniji dodatak od obranog mlijeka u prahu jer značajno utječe na poboljšanje konzistencije (homogena, kremasta), a sinereza je značajno manje izražena. Za potpuni učinak dodatka proteina sirutke u poboljšanju kvalitete gel-strukture tekućih varijanti fermentiranih mlijeka toplinska obrada mlijeka mora biti viša od 90 °C i trajati 8 - 10 minuta. Navedeni temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade mlijeka osiguravaju visok stupanj denaturacije ukupnih proteina sirutke u mlijeku (90 - 95 %) koji se lagano mogu vezati na molekule kazeina.

U slučajevima ako se proteini sirutke koriste u svojstvu zamjene za mliječnu mast u proizvodnji fermentiranih mlijeka s udjelom mliječne masti ≤ 2 %, omjer proteina sirutke prema kazeinu mora biti veći. Naime, da bi ti proizvodi imali svojstva teksture slična onima njihovih punomasnih varijanti uz karakteristična organoleptička svojstva (kiselost, aromatičnost, reskost), u mlijeku omjer kazein : proteini sirutke treba biti 60 : 40. Također, tim se omjerom proteina postiže manje izražena granuliranost konzistencije i pojava žute boje u proizvodu.

4.3.1.1.2.

Standardizacija udjela mliječne masti

Udjel mliječne masti u fermentiranom mlijeku može biti manji od 0,1 pa sve do više od 10 % za grčku varijantu jogurta. Zbog toga se željeni udjel mliječne masti u proizvodu postiže:

- potpunim obiranjem mlijeka
- miješanjem punomasnog s obranim mlijekom
- dodatkom vrhnja punomasnom ili obranom mlijeku
- tehnološkom operacijom koja može kombinirati neke od navedenih metoda (npr. korištenjem centrifuga za standardizaciju).

Princip obiranja i standardizacije udjela mliječne masti u mlijeku korištenjem centrifugalne sile prikazuje slika 4.34. Proces obiranja izražava se Stoksovim zakonom (*Stokes Law*), koji se može jednostavno izraziti formulom:

$$R = r^2 \cdot F$$

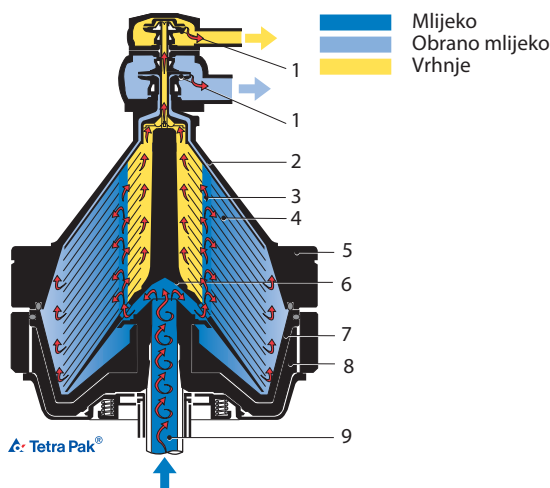
gdje je:

R – omjer obiranja;

r – radijus masne kuglice

F – upotrijebljena sila.

U mljekarama velikog kapaciteta prerade za standardizaciju udjela mliječne masti u mlijeku koriste se automatski kontinuirani sustavi kapaciteta 7000 - 60000 L/s smješteni u proizvodnu liniju. Ti sustavi djeluju sa separatorom tako da se željeni udjel masti u mlijeku postiže korištenjem posebno dizajniranih ventila na separatoru koji mogu kontrolirati protok vrhnja i obranog mlijeka. U automatskim kontinuiranim sustavima proces standardizacije mliječne masti provodi se na temperaturi između 55 i 65 °C. Željeni udjel masti u mlijeku automatski se utvrđuje mjerenjem njegove gustoće pomoću ugrađenih transmitera.



Slika 4.34.

Schematski prikaz obiranja mliječne masti iz mlijeka djelovanjem centrifugalne sile.

Detalji: 1 izlazna pumpa, 2 pokrov bubnja, 3 otvori za razdvajanje, 4 diskovi, 5 prsten za zatvaranje, 6 razvodnik, 7 sporedni donji otvori, 8 tijelo bubnja, 9 vretenasti otvor. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Pak.)



Slika 4.35.

Sustav za standardizaciju mlijeka u proizvodnoj liniji. Detalji: linija za pasterizaciju, linija za miješanje vrhnja i obranog mlijeka i standardizacija mliječnih komponenti mlijeka direktno nakon separacije. (S dopuštenjem Tetra Paka.)



Slika 4.36.

Izdvojeni prikaz standardizacijske jedinice koja služi za kontinuirani proces standardizacije udjela mliječne masti, suhe tvari bez masti i proteina u mlijeku. (S dopuštenjem Tetra Paka.)

Kontinuirani sustavi za standardizaciju mliječne masti u mlijeku vrlo su efikasni, ali zahtijevaju visoku točnost kalibracije mjerača protoka i standardizirane uvjete same operacije. Za ilustraciju, slika 4.35. prikazuje tehničko rješenje za smještanje standardizacijske jedinice koja služi za kontinuirani proces standardizacije udjela mliječne masti, Sbm i proteina u mlijeku u proizvodnu liniju. Standardizacijska jedinica prikazana je kao detalj na slici 4.36.

4.3.1.1.3.

Ostali dodatci

Osim ingredijenata poput obranog mlijeka ili sirutke u prahu, za poboljšanje kvalitete fermentiranih mlijeka koriste se i različiti drugi legislativom dopušteni dodatci. Općenito se prema prihvaćenim standardima dodatci koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka dijele na aditive, aditivima slične tvari i ostale

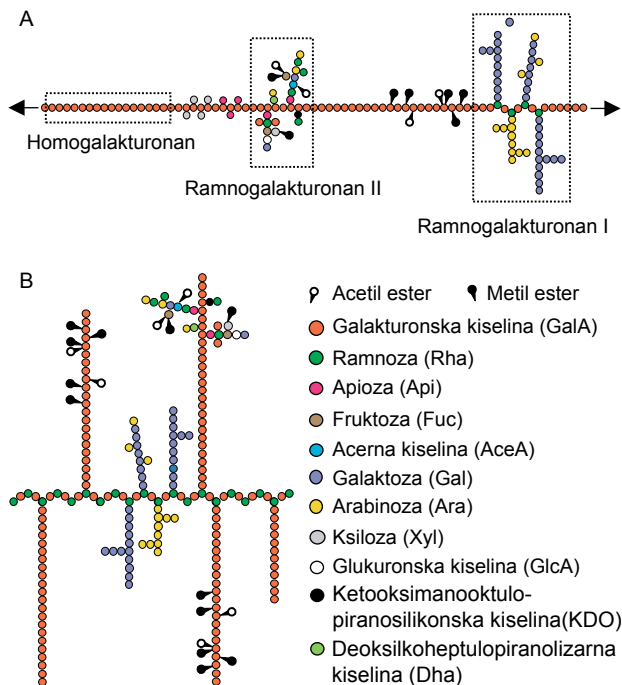
neškodljive tvari. Prema prihvaćenoj definiciji aditivi su tvari točno poznatoga kemijskog sastava koji se ne konzumiraju kao hrana niti su karakterističan sastojak hrane bez obzira na svoju prehrambenu vrijednost, a dodaju se hrani u svrhu poboljšanja njezinih tehnoloških i senzorskih svojstava. Od aditiva, u proizvodnji fermentiranih mlijeka uz tekuće ili osušene mliječne ingredijente koriste se prirodni šećeri, umjetna sladila, boje, emulgatori, stabilizatori, i određene vrste ugušćivača koji se dodaju u mlijeko. Tvarima sličnim aditivima smatraju se različite vrste prirodnih i umjetnih aroma. Ostale neškodljive tvari čini skupina dopuštenih dodataka poput kazeina, inulina ili vitamina. U proizvodnji voćnih varijanti kao dodatak se koriste i voće ili voćni pripravci koji čine posebnu skupinu dodataka. Dopušteni dodatci i njihove količine koji se smiju koristiti u proizvodnji fermentiranih mlijeka određeni su Codex standardom za fermentirana mlijeka (Codex Stan. 243 - 2003.) i Pravilnikom o prehranbenim aditivima (NN 062/2011.).

4.3.1.1.3.1.

Stabilizatori

Stabilizatori su tvari koje se zbog svoje prirodne sposobnosti vezanja vode najčešće koriste u proizvodnji tekućih, pitkih i voćnih varijanti fermentiranih mlijeka. Poboljšavaju kinetičku stabilnost tih proizvoda tako da direktno utječu na reološka svojstva teksture a indirektno smanjuju predispoziciju gel-strukture za izdvajanjem sirutke. Osim toga, stabilizatori maskiraju prekomjernu kiselost i poboljšavaju učinak dodanih boja i aroma proizvodu. Za te namjene najčešće se koriste prirodni polisaharidi poput pektina, želatine, karagenana, ksantana guma i modificiranog škroba. U proizvodnji je fermentiranih mlijeka dopušteno i korištenje modificiranih stabilizatora poput raznih derivata celuloze i sintetskih stabilizatora poput derivata polivinila i polietilena. Na temelju praktičnih iskustava stečenih u posljednjih nekoliko godina između dopuštenih stabilizatora, pektini su se za korištenje u proizvodnji fermentiranih mlijeka pokazali najprihvatljivijim stabilizatorima. Dodatak pektina u proizvodnji tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka pomaže u formiranju čvršće proteinske mreže tako da utječe na kinetiku acidifikacije mlijeka. Zbog toga se preporučuje odabrati sporiju fermentaciju mlijeka koja omogućava homogeniju distribucije pektina unutar proteinske mreže i njegovo potpunije povezivanje s micelama kazeina.

Pektini su skupina visokomolekularnih oligosaharida ili polisaharida koje prirodno sadrže brojne vrste biljaka, voća i povrća. Za biljne pektine karakteristično je da imaju mnoge zajedničke karakteristike, premda se prema svojoj strukturalnoj građi znatno razlikuju. Osnovna je struktura molekule svih pektina izgrađena od "glatke" i "hrapave" regije. "Glatku" regiju čini galakturonska kiselina koja je negativno nabijena, a "hrapavu" esterificirana galakturonska kiselina i razgranati lanci šećera (ramnoza, apioza, fruktoza, arabinoza, ksiluloza, galaktoza). Svi biljni pektini u svojoj molekuli sadrže najmanje 65 % galakturonske kiseline. Dvije osnovne pretpostavljene strukture svih pektina prikazane su slikom 4.37.

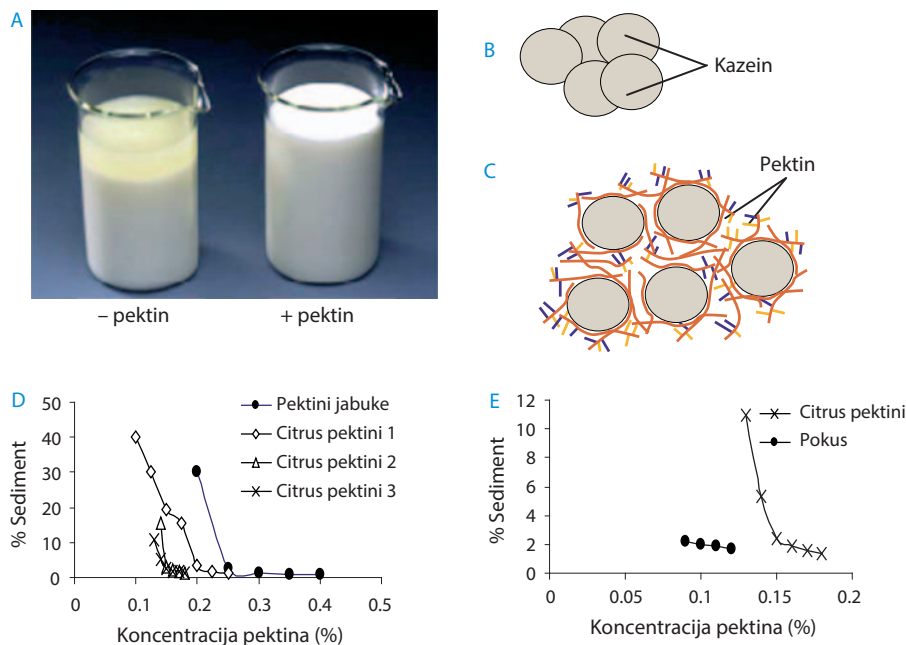


Slika 4.37.

Shematski prikaz osnovne strukture pektina.

Detalji: (A) opće prihvaćena struktura (B) novo pretpostavljena struktura pektina. (Willats i sur., 2006., s dopuštanjem Elseviera.)

U funkciji stabilizatora za poboljšanje viskoznosti tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka često se koriste specifično dizajnirani pektini. Najčešće se za tu svrhu koriste metoksil pektini [engl. *low methoxyl pectins* (LMP)] koji imaju < 50 % karboksilnih grupa u svojoj strukturi, ili modificirani metoksil pektini [engl. *low methoxyl amidated pectins* (LMA)] koji u svojoj strukturi imaju između 15 i 20 % karboksilnih grupa. Obje se vrste tih pektina prije svoje modifikacije ekstrahiraju prvenstveno iz kore citrusa i jabuka. Točan mehanizam djelovanja pektina kao stabilizatora još uvijek nije u potpunosti poznat.



Slika 4.38.

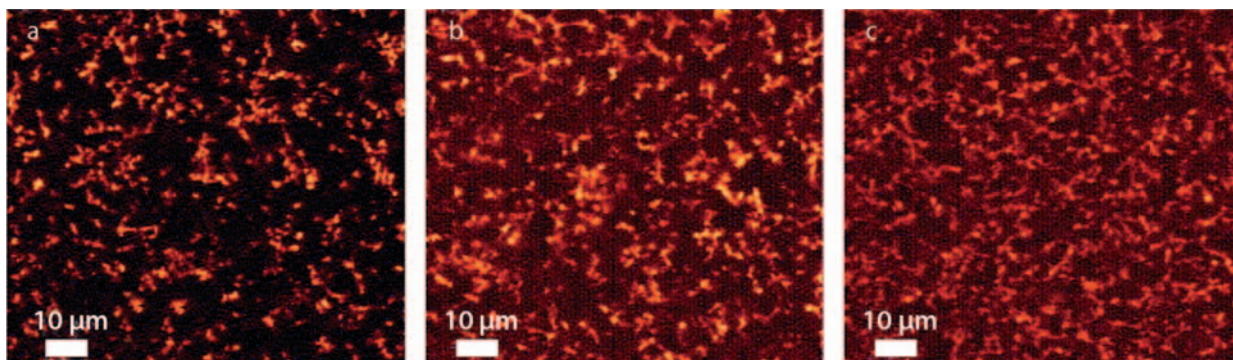
Utjecaj pektina na stabilizaciju gel-strukture fermentiranih mlijeka.

Detalji: (A) fermentirano mlijeko bez dodatka pektina (lijevi dio slike) i fermentirano mlijeko s dodatkom pektina (desni dio slike), (B) shematski prikaz povezivanja kazeina bez dodatka pektina, (C) shematski prikaz povezivanja kazeina i pektina; (D i E) postotak sedimentacije tekućeg jogurta ovisno o dodanoj koncentraciji i vrsti pektina (jabuka i citrus). (Willats i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)

Zna se da oni u fermentiranom mlijeku stabiliziraju sedimentaciju proteina mlijeka elektrostatskim vezanjem galakturonske kiseline za kazein. Naime, sedimentacija suhe tvari fermentiranog mlijeka prirodan je proces koji se zbog acidifikacije ("teški koagulum") javlja približno sedam dana nakon završene fermentacije. Dodatkom pektina mlijeku negativno nabijena galakturonska kiselina ("glatka" regija) ima sposobnost vezanja s pozitivno nabijenim kazeinom a istodobno metil-esterificirana galakturonska kiselina ("hrapava" regija) pektina sprječava agregiranje kazeinskih čestica i sedimentaciju. Shematski prikaz načina povezivanja pektina za kazein i njegov utjecaj na stabilizaciju gel-strukture tekućeg jogurta kao

funkcije vrste i koncentracije pektina objedinjuje slika 4.38. (A, B, C, D, E). U konkretnom slučaju, najbolja svojstva za stabilizaciju gel-strukture tekućeg jogurta pokazao je pektin na slici označen brojem 3. Izgled mikrostrukture tekućeg jogurta uz dodatak različitih koncentracija LMA-pektina prikazan je na slici 4.39.

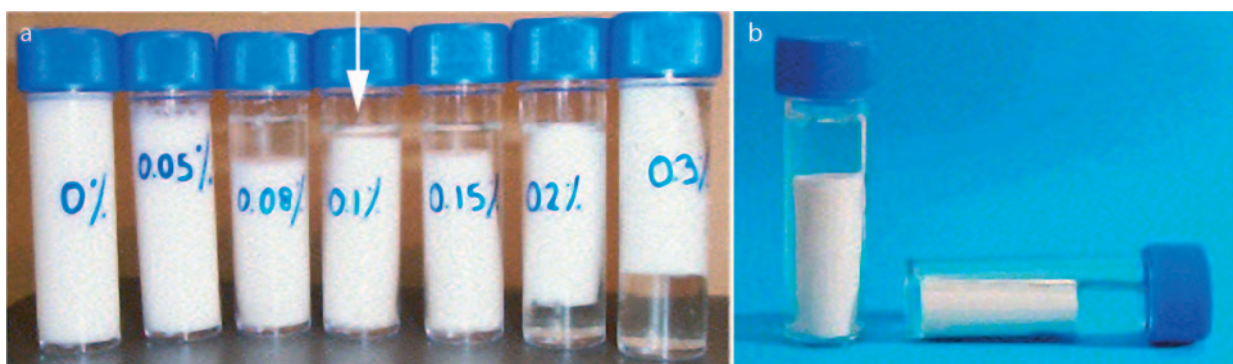
U usporedbi s jogurtnim gelom formiranim bez dodatka pektina dodatak LMA-pektina mlijeku u proizvodnji jogurta u koncentraciji višoj od 0,1 % uzrok je: (i) više otvorene mikrostrukture gela, (ii) slabije povezanosti proteinske mreže i (iii) većih pora unutar proteinske mreže (slika 4.39). Posljedično tome reološke su karakteristike gel-strukture tekućeg jogurta slabije, a sinereza je jače izražena. Odnosno, dodane



Slika 4.39.

Mikrostruktura jogurtnog gela s različito dodanim koncentracijama LMA-pektina.

Detalji: (a) bez dodatka LMA-pektina, (b) s dodatkom 0,005 % LMA-pektina, (c) s dodatkom 0,1 % LMA-pektina. Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim elektronskim mikroskopom (CSEM); bar = 10 µm. (Matia-Merino i Sing, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.40.

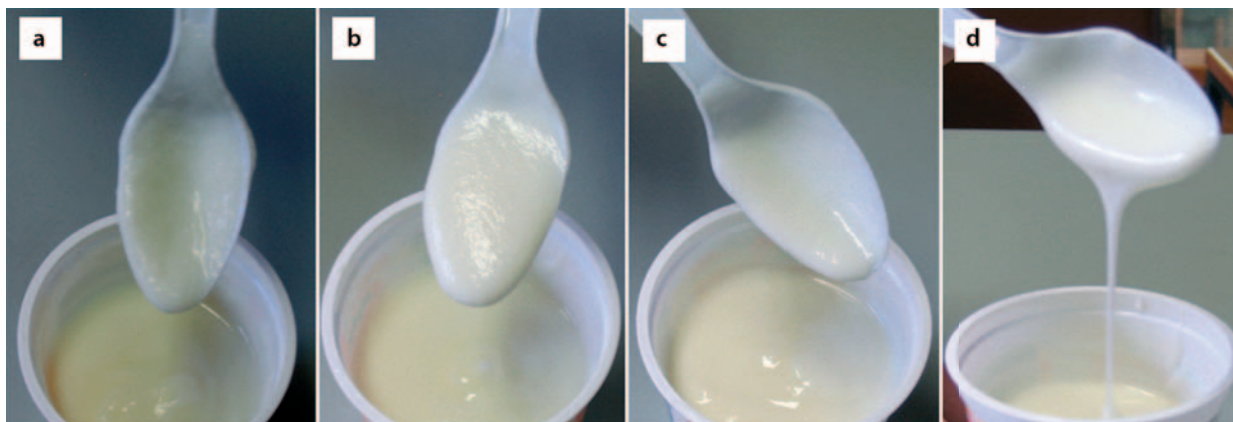
Izgled formiranoga jogurtnog gela uz dodatak različitih koncentracija LMA-pektina nakon inkubacije od 24 sata.

Detalji: (a) u 4 % w/v kiselinom induciranoj otopini s LMA - pektinom (0-0,3 % w/v); (b) detalj ekstenzivne sinereze; bijela strelica označava početak skupljanja gela i oslobađanja sirutke. (Matia-Merino i Sing, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

koncentracije pektina više od 0,1 % izazivaju "plutanje" koaguluma u vodenoj fazi (slika 4.40.), što indicira njegovu manju gustoću koja je najvjerojatnije posljedica povećanja koncentracije pektina u serumu formirane gel-strukture. Istodobno, u serum-fazi formiranoga gela nepoželjno se povećavaju viskozitet i gustoća. Zbog toga se za poželjna reološka svojstva tekućih i

pitkih varijanti fermentiranih mlijeka preporučuje koncentracija dodanog pektina (w/v) ne veća od 0,1 %.

Za poboljšanje viskoznosti i smanjenja sinereze u proizvodnji tekućih i pitkih varijanti jogurta s niskim udjelom masti (≤ 1 %) dobrim se pokazalo istodobno korištenje izolata proteina sirutke (IPS) i LMA ili LMP-pektina bez prethodnog uobičajenoga toplinskog



Slika 4.41.

Izgled konzistencije tekućeg jogurta proizvedenog s dodatkom izolata proteina sirutke (IPS) i pektina.

Detalji: (a) toplinski neobrađen IPS-pektin kompleks, (b) toplinski obrađen IPS-pektin kompleksa, (c) komercijalni pektin, (d) kompleks IPS-pektin. (S dopuštanjem M-C. Gentès, 2007.)

tretiranja IPS-pektinskog kompleksa (90 °C/2 min). Pozitivan učinak na fizikalna i reološka svojstva tekućeg jogurta postiže se i odvojenim korištenjem IPS i pektina bez njihova prethodnoga toplinskog tretiranja. U tom je slučaju iznimno važno standardizirati omjer kazein : proteini sirutkine na približno 70 : 30, a ukupan protein u mlijeku ne smije biti manji od 4 %. Dobra reološka svojstva jogurta postižu se i kombinacijom IPS od 2 % (w/v) i 0,1 % pektina (w/v) u kompleksu ili istom kombinacijom tih komponenti izvan kompleksa. Razlike u izgledu konzistencije tekućeg jogurta korištenjem prethodno toplinski tretiranih i toplinski netretiranih ISP i pektina ili ISP-pektin kompleksa prikazane su na slici 4.41.

Dodatak dopuštenih stabilizatora koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka nije propisan važećom legislativom te se količinski koriste prema načelima dobre proizvođačke prakse. Količina bilo koje vrste stabilizatora koja se dodaje mlijeku za poboljšanje kinetičke stabilnosti formirane gel-strukture fermentiranog mlijeka prvenstveno je određena: (i) očekivanim učinkom na fizikalna i kemijska svojstva

finalnog proizvoda i (ii) udjelom suhe tvari u mlijeku. U načelu, što je veći udjel suhe tvari u mlijeku potrebno je dodati manju količinu stabilizatora. Na temelju znanstvenih istraživanja i stručnih iskustava, preporučene su koncentracije najčešće korištenih stabilizatora u proizvodnji jogurta prikazane u tablici 4.10.

Prisutnost stabilizatora u fermentiranom mlijeku, zbog općenito malih koncentracija koje se dodaju u mlijeko, nije uvijek jednostavno dokazati promatranjem uzorka pod mikroskopom. Ipak je neke od njih poput modificiranog škroba pregledom uzorka pod mikroskopom lakše uočiti. U slučajevima ako se modificirani škrob koristi kao nadomjestak za mliječnu mast u proizvodnji čvrstog jogurta sa ≤ 1 % mliječne masti, mogući način njegova povezivanja u strukturi gela prikazan je slikom 4.42.

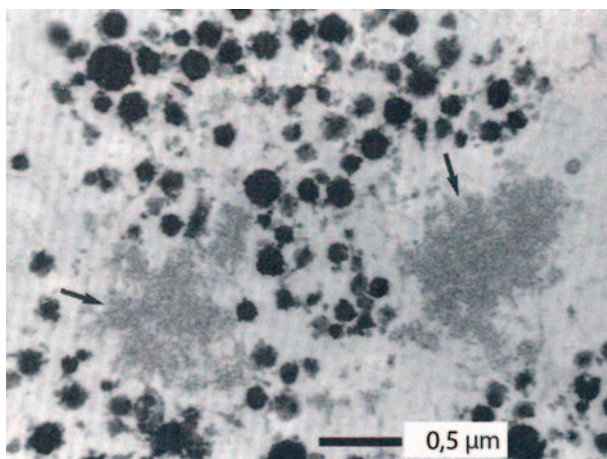
Veće količine stabilizatora od preporučenih uzrok su neprirodnog okusa i želatini slične konzistencije fermentiranih mlijeka. Ovisno o svojstvu topljivosti, ali obvezno prije homogenizacije, stabilizatori se dodaju u hladno ili toplo mlijeko. Vrsta stabilizatora uvjetuje

Tablica 4.10.

Preporučene količine stabilizatora koji se najčešće koriste u proizvodnji jogurta

Vrsta stabilizatora	Konzentracija (%)
Pektin	0,01 – 0,10
Želatina	0,25 – 0,80
Ksantan	≤ 0,01
Karagenan	≤ 0,03
Modificirani škrob	0,02 – 0,70
Škrob	1,00 – 2,00

(prilagođeno prema Özeru, 2010.)



Slika 4.42.

Mikrostruktura jogurta nakon obogaćivanja mlijeka dodatkom škroba.

Detalji: strelicom su označeni klasteri neotopljenog škroba između kazeinskih micela. Slika je dobivena transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM); bar = 0,5 μm. (Tamime i sur., 1996., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

i promjenu standardnih temperatura inkubacije za određene vrste fermentiranih mlijeka. Primjerice, ako se u proizvodnji jogurta koristi modificirani škrob (≤ 1 %), temperatura inkubacije umjesto 40 - 43 °C treba biti između 35 i 36 °C.

4.3.1.1.3.2.

Sladila, boje, arome, emulgatori i konzervansi

U proizvodnji aromatiziranih i voćnih varijanti fermentiranih mlijeka za povećanje njihove prihvatljivosti za potrošača, koriste se različite vrste konzervansa, sladila, boja i aroma. Konzervansi poput nizina, Na, K i Ca sorbata, benzoične kiseline ili Na, K i Ca benzoata isključivo se koriste za prevenciju rasta kvasaca i plijesni. Ovisno o vrsti, konzervansi se dodaju u mlijeko u količini, primjerice, do 500 mg/kg nizina, do 300 mg/kg benzoične kiseline i do 1000 mg/kg sorbinske kiseline.

Od sladila, prvenstveno radi ublažavanja kiselog okusa, najčešće se koriste saharoza, fruktoza, fruktooligosaharidi, sorbitol, manitol, aspartam, laktitol, ksilitol, ciklambat, sukraloza i saharin. Za istu svrhu u proizvodnji fermentiranih mlijeka mogu koristiti i druga prirodna i sintetska sladila. Umjetna su sladila za razliku od prirodnih šećera puno slađa, tako je u odnosu na saharozu ciklambat 30 - 80 puta slađi, aspartam 133 - 200, saharin 240 - 350, a sukraloza je 400 - 800 puta slađa. Za povećanje slatkoće okusa proizvoda sorbitol se dodaje u količini od približno 7,0 g/100 g, a optimalna koncentracija aspartama kao sladila je 0,1 - 0,75 g/100 g. Aspartam se u svojstvu sladila preporučuje i za fermentirana mlijeka s udjelom masti nižim od 2 % i za voćne varijante s voćem na dnu proizvoda. Saharozu se dodaje u količini do 10 %, fruktozu do 3 %, a fruktooligosaharidi do 7 %. Za većinu ostalih pojedinačnih sladila količina se određuje na temelju iskustva dobre proizvođačke prakse. U proizvodnji fermentiranih mlijeka za povećanje slatkoće okusa voćnih i aromatiziranih fermentiranih mlijeka osim pojedinačnih mogu se koristiti i sladila u obliku smjese. Smjese sladila poput saharina (0,007 g/100 g) i ksilitola (4 g/100 g), te ksilitola (8 g/100 g), fruktoze (7 g/100 g) i ciklamata (0,07 g/100 g) pokazale su se dobrim izborom. Više koncentracije sladila od navedenih, u načelu, povećavaju ukupnu suhu tvar mlijeka, što uzrokuje smanjenje aktivnosti vode (a_w), i dolazi do povećanja osmotskog tlaka. Snižena razina raspoložive vode i povećan osmotski

tlak u fermentacijskom mlijeku smanjuju metaboličku aktivnost bakterija iz sastava kulture a fermentacija se usporava ili potpuno zaustavlja. Posljedično, fiziikalna i reološka svojstva proizvoda su nakon završene fermentacije značajno slabija.

Prirodni šećeri za povećanje slatkoće fermentiranog mlijeka mogu se dodati mlijeku prije ili nakon toplinske obrade, ali ih bolje mlijeku dodati prije toplinske obrade. Za razliku od prirodnih, funkcija je umjetnih sladila i stabiliziranje proizvoda tijekom pohrane. Zbog toga se ona u načelu za čvrste voćne varijante fermentiranih mlijeka dodaju u fermentacijsko mlijeko prije fermentacije, a za tekuće varijante neposredno prije pakiranja.

Dodatak boja i aroma u proizvodnji fermentiranih mlijeka ima svrhu poboljšanja izgleda i arome voćnih i aromatiziranih varijanti fermentiranih mlijeka. Za tu je namjenu dopušteno korištenje prirodnih boja poput karotena, betanina (crvena repa) i kurkumina, ili sintetskih boja poput briljant plave, crvene ili crne. Boje se dodaju u pripremljeno voće ili direktno u proizvod. Arome pripadaju skupini aditivima sličnih tvari, a mogu poput boja biti biljnog ili sintetskog podrijetla. U proizvodnji voćnih i aromatiziranih fermentiranih mlijeka arome se dodaju prvenstveno zbog poboljšanja voćnog okusa proizvoda u ustima. Od brojnih dostupnih aroma na tržištu, u proizvodnji fermentiranih mlijeka najčešće se koriste prirodne ili umjetne arome vanilije, jagode, borovnice, maline, banane i ananasa. Za čvrste varijante fermentiranih mlijeka ekstrakti aroma dodaju se prije fermentacije, a za tekuće nakon završene fermentacije tijekom miješanja (razbijanja) formiranoga gela. Količine aroma koje se dodaju mlijeku određuju se prema načelima dobre proizvođačke prakse.

Korištenje emulgatora kao dodatka dopušteno je jedino za aromatizirane varijante fermentiranih mlijeka. Od emulgatora se koriste različite vrste polioksilenskih, poliglicerolskih, sterolskih i sorbitolskih preparata. Ovisno o vrsti, emulgatori se u mlijeko dodaju u količini 3 - 10 g/kg.

4.3.1.1.3.3.

Prebiotici

Prebiotici su nerazgradljivi sastojci hrane (uglavnom polisaharidi i oligosaharidi) čija prirodna strukturna građa ima potencijal za poboljšanje zdravlja domaćina selektivnom stimulacijom rasta poželjnih mikroorganizama u probavnom sustavu. Osim za poboljšanje nutritivne i zdravstvene vrijednosti, prebiotici se u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste i za sljedeće svrhe ili namjene:

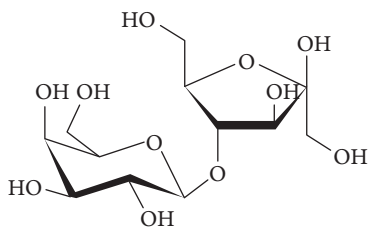
- poboljšanja teksture proizvoda
- poboljšanje rasta i preživljavanja probiotičkih bakterija u proizvodu (osobito *Bifidobacterium* spp.)
- u svojstvu zamjene za mliječnu mast u niskokaloričnim proizvodima.

Najčešće za te namjene prije toplinske obrade u mlijeko se dodaje jedan od sljedećih prebiotika:

- laktuloza
- inulini
- fruktooligosaharidi
- galaktooligosaharidi
- soja-oligosaharidi
- laktosukroza
- izomaltooligosaharidi
- glukooligosaharidi
- ksilooligosaharidi.

Laktuloza je sintetski disaharid sastavljen od galaktoze β 1-4 fruktoze (slika 4.43.). U proizvodnji fermentiranih mlijeka koristi se u svojstvu prebiotika koji stimuliraju rast probiotičkih bakterija u humanom intestinalnom sustavu. Zbog toga se laktuloza smatra značajnim prebiotikom u kontroli zdravlja.

Inulini su oligosaharidi izgrađeni od glukoze α 1 - 2 [fruktoze 1 - 2] n gdje je $n > 10$ (slika 4.44.). Vrlo često oni se koriste kao zamjena za mliječnu mast za niskokalorične varijante fermentiranih mlijeka. Svojstva inulina temelje se na sposobnosti vezanja vode i poboljšanja teksture u smislu njezine čvrstoće, gustoće i prozračnosti. Upravo ta svojstva inulina posljedično

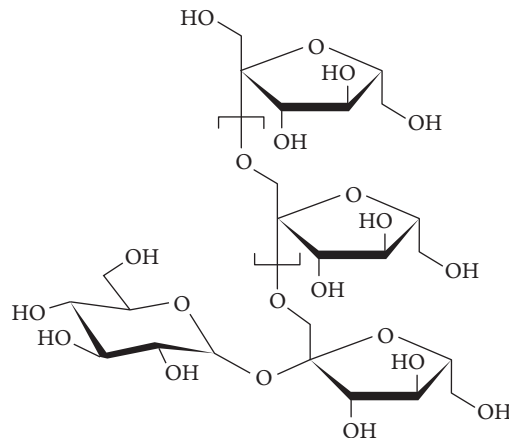


Slika 4.43.

Shematski prikaz strukturne građe laktuloze.

simuliraju masni okus u ustima sličan onom u punomasnom proizvodu. U svojstvu zamjene za mliječnu mast, inulini se u mlijeko dodaju u količini 1 - 3 %. Istodobno te količine dodanog inulina nemaju negativan utjecaj na okus, boju i veću predispoziciju proizvoda za sinerezu. U svojstvu prebiotika i simbiotika inulini se u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste za poboljšanje čvrstoće probiotičkih fermentiranih mlijeka.

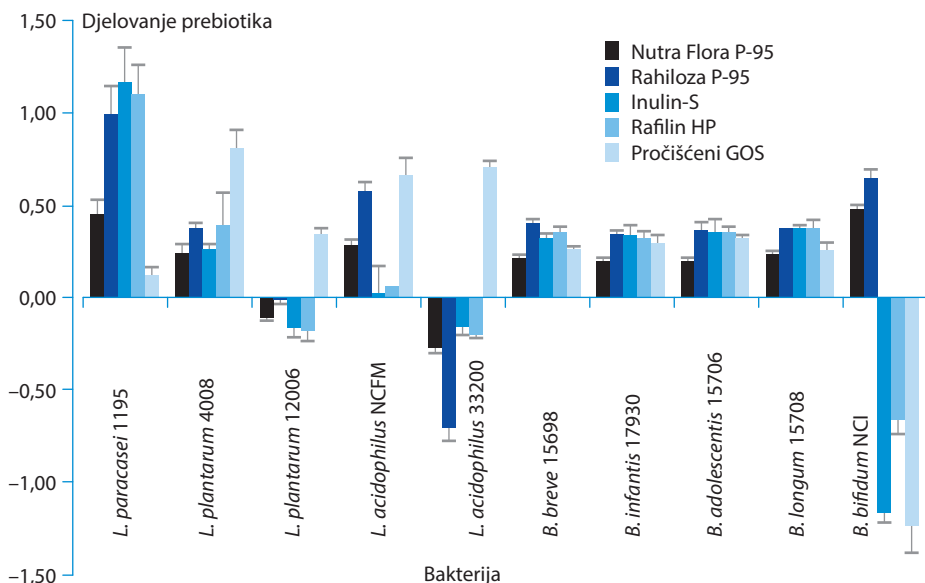
Inulinu su strukturno slični fruktooligosaharidi manje molekularne težine poznati pod skraćenicom **FOS**. Najčešće se FOS koriste u proizvodnji probiotičkih



Slika 4.44.

Shematski prikaz strukturne građe inulina.

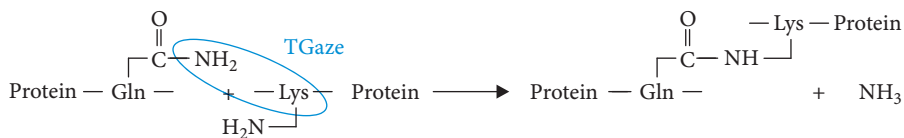
fermentiranih mlijeka koja sadrže bifidobakterije. Bifidobakterije mogu FOS koristiti za svoj rast i dugo preživljavanje u fermentiranom mlijeku, budući da imaju sposobnost tvorbe enzima β -fruktofuranozidaze koji ih razgrađuje.



Slika 4.45.

Utjecaj različitih vrsta komercijalno dostupnih prebiotika na preživljavanje različitih probiotičkih bakterijskih sojeva.

Detalji: prebiotički utjecaj na rast i preživljavanje probiotičkih sojeva temeljen na mjerenu promjena biomase bakterijskih stanica (log cfu mL⁻¹) u o h i nakon 24 h rasta laktobacila i bifidobakterija u mediju s 1 % prebiotika u usporedbi s njihovim rastom u mediju s 1 % glukoze (os x). (Huebner i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.46.

Transglutaminazom (TGaza) inducirano povezivanje proteina u mlijeku. (Kulozik, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)

Galaktooligosaharidi, soja-oligosaharidi, laktosukroza, izomalto-oligosaharidi, glukooligosaharidi i ksilooligosaharidi u svojstvu prebiotika koji povoljno utječu na humani gastrointestinalni sustav koriste se u proizvodnji probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka. Na slici 4.45. prikazan je utjecaj komercijalno dostupnih prebiotika na rast i preživljavanje probiotičkih bakterijskih sojeva u proizvodnji simbiotičkih fermentiranih mlijeka.

Prema slici 4.45. jasno se uočava da svi prebiotici koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka nemaju isti učinak na rast i preživljavanje probiotičkih bakterijskih sojeva. Drugim riječima, dodatak inulina ili galaktooligosaharida (pročišćeni GOS) uopće neće utjecati na rast i preživljavanje soja *B. bifidum* NCI (-1,24), ali ta tvrdnja možda neće biti istinita za neki drugi soj *B. bifidum*. U tom smislu, u proizvodnji simbiotičkih fermentiranih mlijeka prilikom izbora prebiotika uvijek treba uzeti u obzir i specifičnosti korištenih probiotičkih bakterijskih sojeva.

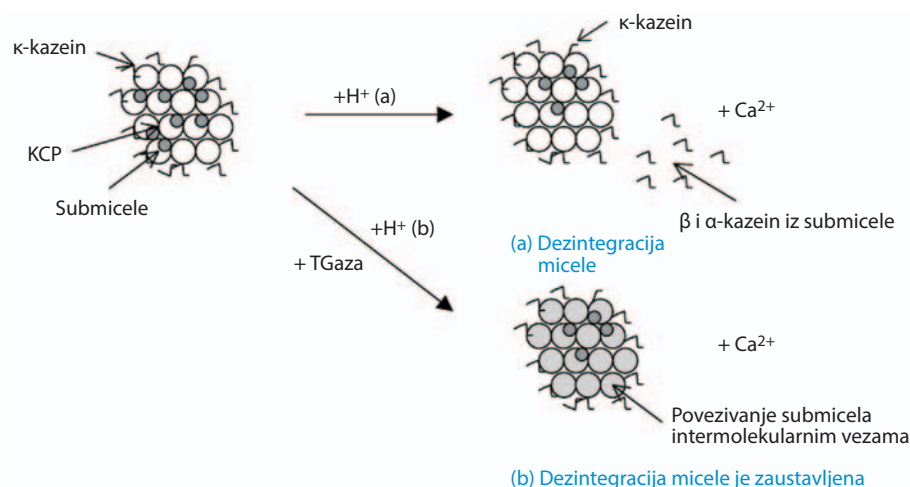
4.3.1.1.3.4.

Transglutaminaza

U proizvodnji fermentiranih mlijeka, za bolje povezivanje proteina u gel-strukturi može se koristiti enzim mikrobnog podrijetla (*Streptovorticillium* spp.) transglutaminaza (TGaza). Za razliku od transglutaminaze izolirane iz tkiva sisavaca, mikroba transglutaminaza za prijenos acilnih skupina ne zahtijeva prisutnost Ca^{+2} iona u mediju i temperaturno je neovisna o zagrijavanju mlijeka. Upravo zbog tih svojih prirodnih svojstava, u proizvodnji fermentiranih mlijeka TGaza je iznimno pogodna.

Mikrobna TGaza katalizira acil-transfer reakcije između γ -karboksiamidne skupine aminokiselinskih ostataka glutamina kao donora acilne skupine i primarnih amina kao akceptora. U slučaju ako je akceptor acilne skupine lizinski ostatak TGaza formira intramolekularne i intermolekularne ϵ - γ glutamil-lizin izopeptidne veze. Na slici 4.46. prikazan je način katalitičke reakcije između TGaze i glutaminskog ostatka gdje se oslobađa amonijak, a potom kombinirane reakcije TGaze s aminoskupinama rezidua lizina drugog proteina. Nakon završenih kemijskih reakcija enzim se ponovno oslobađa i može sudjelovati u novim acil-transfer reakcijama. Kazein je između proteina mlijeka zbog svog aminokiselinskog sastava u peptidnom lancu koji uključuje glutaminsku kiselinu i lizin za TGazu povoljniji supstrat.

U proizvodnji fermentiranih mlijeka TGaza se koristi za povećanje čvrstoće čvrstih i viskoznosti tekućih varijanti. Fizički u usporedbi s klasičnom acidifikacijom mlijeka gdje se gel-struktura formira s relativno slabim fizičkim interakcijama, gel-struktura je korištenjem TGaze puno čvršća. Pretpostavljeni način povezivanja TGaze s kazeinskim micelama acidifikacijom mlijeka prikazan je na slici 4.47. Transglutaminaza se snižavanjem pH-fermentacijskog mlijeka povezuje intramolekularnim i intermolekularnim kovalentnim vezama za vanjsku i unutarnju površinu kazeinske micelle. Zbog toga TGaza tijekom acidifikacije mlijeka sprječava dezagregaciju β -kazeina i α -kazeina iz kazeinske micelle. Posljedično toj reakciji kazeinske micelle u fermentacijskom mlijeku velikim dijelom ostaju integrirane. Istodobno, djelovanjem TGaze je limitirana i topljivost koloidnog kalcijevog fosfata (KCP) koji snižavanjem pH-vrijednosti fermentacijskog mlijeka uvjetuje dezintegraciju kazeina (vidi



Slika 4.47.

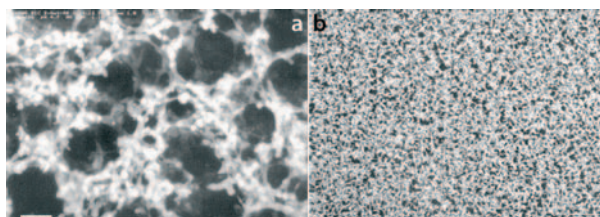
Shematski prikaz pretpostavljenog načina oblikovanja gel-strukture fermentiranih mlijeka dodatkom transglutaminaze (TGaza). Detalji: KCP- koloidni kalcijev fosfat. (Schorsch i sur., 2000., s dopuštenjem Elseviera.)

poslije, acidifikacija). Također, hlađenjem proizvoda TGaza sprječava djelomičnu topljivost β -kazeina nakon završetka precipitacije kazeina u izoelektričnoj točki ($\sim 4,6$ pH).

Formirana gel-struktura fermentiranog mlijeka djelovanjem TGaze u usporedbi s gel-strukturom formiranom klasičnom acidifikacijom mlijeka ima sljedeće kvalitativne prednosti:

- znatno je čvršća
- ima bolja viskoelastična svojstva
- uzrokuje kremastu teksturu
- ne pokazuje sinerezu niti nakon dugog vremena pohrane
- postacidifikacija proizvoda je pohranom od tri tjedna manja ($4 - 6$ °C).

U usporedbi s klasičnom acidifikacijom, TGaza smanjuje trajanje fermentacije mlijeka (~ 30 min) i permeabilnost gel-strukture fermentiranog mlijeka. Posljedično tome, u usporedbi s mikrostrukturom fermentiranog mlijeka proizvedenog bez dodatka TGaze (slika 4.48. a), mikrostruktura fermentiranog

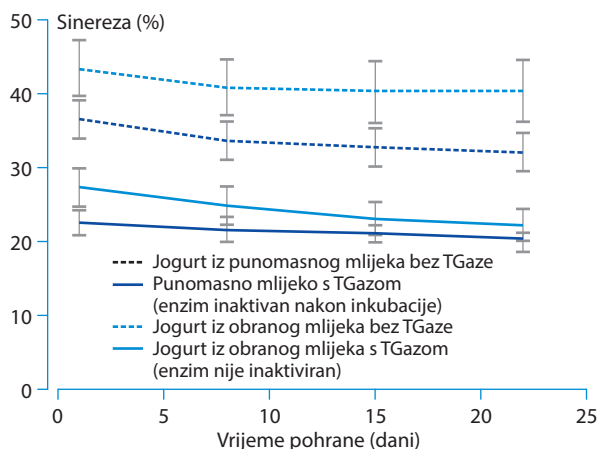


Slika 4.48.

Mikrostruktura disperzije kazeinskih micela u gel-strukturi čvrstog jogurta inducirana mliječnom kiselinom (a) bez transglutaminaze i (b) sa transglutaminazom (1 % w/w). Slika je dobivena konfokalnim skenirajućim laser-elektronskim mikroskopom (CSLM); bar = 25 μ m. (Schorsch i sur. 2000., s dopuštenjem Elseviera.)

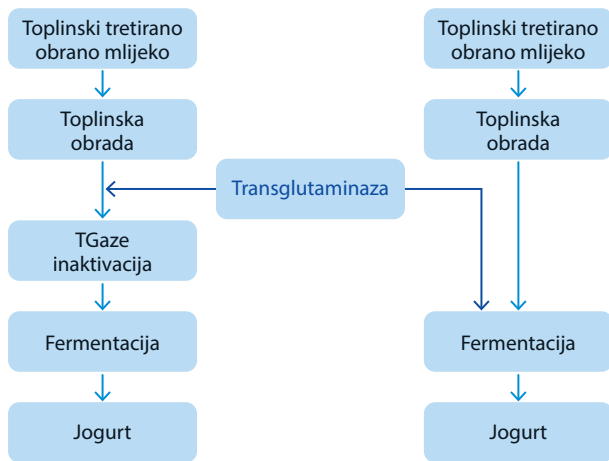
mlijeka s dodatkom TGaze je gušća i bolje povezana (slika 4.48. b).

Prema mikrostrukturom (slika 4.48.), čvršća struktura čvrstog jogurta u usporedbi s jogurtom proizvedenim bez dodatka TGaze posljedica je smanjene veličine pora i pravilnije raspoređene proteinske mreže



Slika 4.49.

Sinereza čvrstog jogurta (%) proizvedenog od punomasnog i obranog mlijeka s dodatkom i bez dodatka transglutaminaze. (Lorenzen i sur., 2002., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)



Slika 4.50.

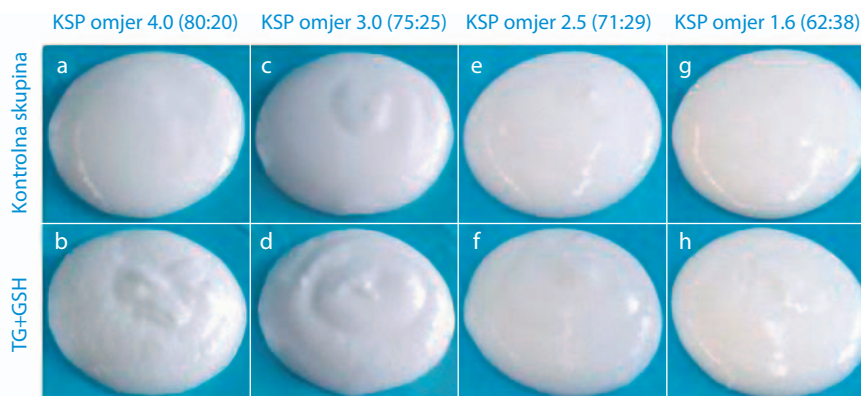
Shema načina dodavanja transglutaminaze u proizvodnji jogurta. (S dopuštenjem U. Kulozika, 2007.)

unutar proizvoda. Posljedično manjoj permeabilnosti gel-strukture jogurta i sinereza je manje izražena (slika 4.49).

Transglutaminaza se u količini od ~ 0,1 - 1,0 % može dodati u mlijeko na dva načina - simultano s kulturom ili predinkubacijom mlijeka s dodatkom TGaze prije fermentacije (slika 4.50.). U proizvodnji tekućeg jogurta trajanje fermentacije na temperaturi od 42 °C s dodatkom TGaze simultano s kulturom približno je tri sata. U tom se slučaju TGaza postupno inaktivira nakon završene fermentacije. Predinkubacija mlijeka s dodatkom TGaze prije fermentacije zahtijeva nešto duže vrijeme, budući da postupak osim inkubacije uključuje i prethodnu inaktivaciju enzima. Priprema TGaze predinkubacijom ima prednost pred njenim simultanim dodavanjem u održavanju konstantne pH- vrijednosti mlijeka tijekom povezivanja enzima s kazeinskim micelama. Zbog toga je moguće organizirati različite uvjete fermentacije mlijeka. Predinkubacija se može organizirati na niskim temperaturama duže vrijeme (10 °C/12 - 24 h), ili u kontinuiranom procesu proizvodnje na višim temperaturama kraće vrijeme (50 - 60 °C/10 - 20 min). U većini slučajeva nakon predinkubacije mlijeka s TGazom slijedi toplinska inaktivacija enzima (uobičajeno na temperaturi od 80 °C/1 - 15 min).

Za pozitivan učinak TGaze na gel-strukturu, osim ukupne količine proteina iznimno je važan i omjer kazein : proteini sirutke u mlijeku. Za ilustraciju te tvrdnje na slici 4.51. prikazan je izgled tekture tekućeg jogurta proizvedenog od mlijeka s ukupno 4,4 % proteina i različitog omjera kazein : proteini sirutke (ovdje označeni KSP) s dodatkom TGaze i glutationa (ovdje označeni TG+GSH). U konkretnom pokusu, enzimatskim pripravak TGaze s glutationom priređen je predinkubacijom i inaktiviran i s kulturom dodan fermentacijskom mlijeku.

Iz prikaza makrostrukture tekućeg jogurta kontrolne skupine (slika 4.51.; a, c, e, g) može se uočiti da omjer kazein:proteini sirutke nije utjecao na njenu vidljivu promjenu. Suprotno, dodatak TGaze i glutationa (TG + GSH) u mlijeko s prirodnim omjerom



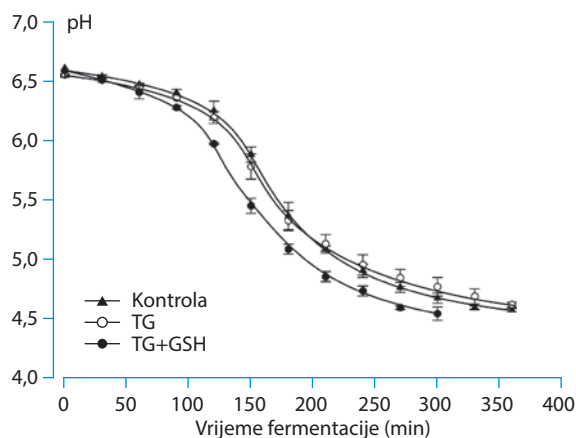
Slika 4.51.

Izgled teksture tekućeg jogurta proizvedenog s različitim omjerom kazein : proteini sirutke (KSP) i dodatkom transglutaminaze nakon 6 tjedana pohrane na 4 °C.

Detalji: TG+GSH skupina jogurta proizvedena s pripravkom transglutaminaze i glutaciona, kontrolna skupina jogurta proizvedena bez pripravka transglutaminaze i glutaciona. Slike a, c, e, g prikazuju gel-strukturu kontrolne skupine jogurta, slike b, d, f, h prikazuju gel-strukturu TG+GSH skupine jogurta. (Bönisch i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

kazein : proteini sirutke (80 : 20) uzrokuje lagano grublju teksturu jogurta (slika 4.51. b). Suprotno, smanjenjem omjera kazein : proteini sirutke u mlijeku, osobito ako je on ~ 70 : 30, izgled jogurtne strukture je gladak i sjajan (slika 4.51.; f). U tom kontekstu, korištenje transglutaminaze i izbor načina njezine pripreme u proizvodnji fermentiranih mlijeka uvjetuju potrebnu standardizaciju ishodišnog mlijeka na udjel ukupnih proteina i omjer kazein : proteini sirutke. Važno je istaknuti i da istodobno korištenje TGaze i GSH u usporedbi s djelovanjem samog enzima skraćuje vrijeme fermentacije za 30 - 60 minuta u usporedbi s enzimatski netretiranim jogurtima (slika 4.52.).

Korištenje TGaze u proizvodnji fermentiranih probiotičkih mlijeka može se kombinirati i s dodatkom inulina mlijeku. Dodatak TGaze mlijeku poboljšava izgled, konzistenciju i daje intenzivniju bijelu boju proizvodu. Dodatak inulina osigurava veći stupanj preživljavanja probiotičkih bakterijskih sojeva ($\sim 10^7$ cfu mL⁻¹) unutar pohrane proizvoda od 28 dana. Također, organoleptičke analize pokazuju da se TGaza u proizvodnji fermentiranih mlijeka može koristiti i kao zamjena za mliječnu mast.



Slika 4.52.

Promjene pH-vrijednosti i trajanje fermentacije tekućeg jogurta ovisno o vrsti enzimatskog pripravka transglutaminaze.

Detalji: TG-transglutaminaza, TG+GSH transglutaminaza i glutation, (○) jogurt priređen s transglutaminazom, (●) jogurt priređen s transglutaminazom i glutationom, (▲) jogurt priređen bez dodanog enzima (kontrolna skupina). Jogurti su priređeni od mlijeka s 4,4 % proteina. (Bönisch i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

4.3.1.1.3.5.

Voćni dodatci

U proizvodnji voćnih varijanti fermentiranih mlijeka, kao dodatak se koriste voće ili voćni pripravci koji čine posebnu skupinu dopuštenih dodataka. Prvenstveno, svrha je korištenja voća u proizvodnji fermentiranih mlijeka povećanje njihove senzorne prihvatljivosti u potrošača. Dodatak različitih vrsta voća ili njegovih mješavina najčešće se koristi u proizvodnji jogurta, a rijetko u ostalim vrstama fermentiranih mlijeka. Ipak, u proizvodnji mlaćenice, prvenstveno radi poboljšanja okusa, voće je gotovo obvezni dodatak. U posljednje vrijeme voće se kao dodatak koristi i u proizvodnji kefira. Za proizvodnju jogurta voće se može koristiti u svježem stanju, ali se ipak najčešće koristi prerađeno voće. Prerađeno voće je obično konzervirano šećernim sirupom ili aditivima (boje, stabilizatori), zamrznuto, u formi voćne pulpe ili voćnog sirupa. Aroma voća konzerviranog šećernim sirupom intenzivnija je od ostalih voćnih dodataka pa ponekad, nažalost, služi i za prekrivanje nepoželjnog okusa jogurta. Zamrznuto voće koje je prije zamrzavanja podvrgnuto preradi u uvjetima osmotskog tlaka u šećernoj otopini i dehidraciji, zadržava svoju prirodnu aromu, boju i hidrofилna svojstva. Suprotno, dodatak šećera nakon zamrzavanja znatno mijenja svojstva voća poželjna za proizvodnju jogurta. U usporedbi s priređenim voćem, intenzitet boje i arome voćne pulpe je slabiji, te se uobičajeno fermentiranom mlijeku još dodaju boje ili arome.

Vrsta voća ili voćnih pulpi kao dodatka jogurtu određuje se prema vlastitim spoznajama o njegovoj popularnosti u potrošača. Između marelice, breskve, višnje, ananasa i jagode koji se najčešće koriste kao dodatak jogurtu, u Hrvatskoj potrošači najviše preferiraju voćni jogurt od jagode. Prosječno, voćni jogurt sadrži 10 - 20 % voća. U proizvodnji čvrstog jogurta voćni dodatci dodaju se u prodajnu ambalažu prije fermentacije mlijeka, a u proizvodnji tekućeg jogurta nakon završene fermentacije mlijeka. Najčešće korištene vrste voća i voćne kombinacije za proizvodnju voćnih varijanti jogurta prikazuje tablica 4.11.

Tablica 4.11.

Najčešće korištene vrste voća i voćne kombinacije u proizvodnji jogurta

Pojedinačna vrsta voća	Voćne kombinacije
Marelica	Šumsko voće
Breskva	Kruška i jabuka
Vinogradarska breskva	Malina i kupina
Jabuka	Ananas i kokos
Kruška	Višnje i trešnje
Jagoda	Kombinacije tropskog voća
Višnja	Jagoda i borovnica
Ananas	Ananas i citrusi
Šljiva	Višnja i ananas
Smokva	Marelica i breskva

4.3.1.2.

Klarifikacija

U proizvodnji fermentiranih mlijeka faza pripreme mlijeka, ako je to potrebno, može uključivati i postupak klarifikacije sirovog mlijeka. Centrifugalnom silom, klarifikacijom se iz sirovog mlijeka uklanjaju strane čestice i bakterije. Učinkovitost klarifikacije u uklanjanju bakterija nešto je manja od baktofugacije,



Slika 4.53.

Nova generacija klarifikatora koja se može koristiti za pročišćavanje mlijeka kao i za hladnu i toplu separaciju sastojaka mlijeka. (S dopuštenjem Tetra Paka.)

ali svejedno dovoljno učinkovita za poboljšanje bakteriološke kvalitete mlijeka. Nova generacija klarifikatora (slika 4.53.) u usporedbi sa starijim generacijama klarifikatora osim bolje učinkovitosti separacije omogućava i fleksibilnost u namjeni. Tako se ti klarifikatori mogu koristiti za klarifikaciju, ali i hladnu i toplu separaciju sastojaka mlijeka. U slučajevima kada je klarifikacija uključena u pripremnu fazu, provodi se prije obogaćivanja ili standardizacije mlijeka.

4.3.1.3.

Deaeracija

Za razliku od klarifikacije, u proizvodnji fermentiranih mlijeka deaeracija mlijeka preporučena je operacija. Hladna pohrana sirovog mlijeka, koja je uobičajena u današnjim uvjetima proizvodnje mlijeka, uvjetuje zasićenje mlijeka kisikom. U zatvorenim sustavima za toplinsku obradu mlijeka kisik se iz mlijeka ne može izlučiti pa poslije fermentacijom mlijeka usporava rast bakterija iz sastava kultura. Usporavanje bakterijskog rasta kisikom povezano je s početnom (inicijalnom) fazom njihova rasta u mlijeku. Zbog prisutnog kisika u mlijeku, bakterije mliječne kiseline prije početka acidifikacije najprije moraju za njegovo uklanjanje utrošiti vlastitu metaboličku energiju. Posljedično tome početak acidifikacije mlijeka korištenjem mezofilne kulture pomiče se za približno 1 sat i 30 minuta, a korištenjem termofilne kulture, ovisno o temperaturi inkubacije, za približno 45 min do 3 sata. Odgođeni početak acidifikacije posljedica je produžetka lag-faze za početak intenzivnoga bakterijskog rasta i razmnožavanja. Također, u slučajevima korištenja mezofilne kulture, zbog kisika u mlijeku dolazi do disbalansa između stvaranja mliječne kiseline i aromatskih spojeva. Negativan učinak otopljenog kisika u mlijeku osobito je izražen u proizvodnji fermentiranih mlijeka gdje se uz bakterije jogurtne kulture koriste i probiotički bakterijski sojevi. Većina probiotičkih bakterijskih sojeva su anaerobne ili mikroaerofilne prirode, zbog toga u kombinaciji s bakterijama iz jogurtne kulture u mlijeku s povećanom koncentracijom otopljenog kisika izrazito slabo rastu.

Deaeracija mlijeka provodi se u vakuumu uz tlak niži od 1 MPa na temperaturi 70 - 75 °C. U slučajevima obogaćivanja suhe tvari bez masti (Sbm) mlijeka evaporacijom, deaeracija je simultana i kao samostalna tehnološka operacija nije potrebna.

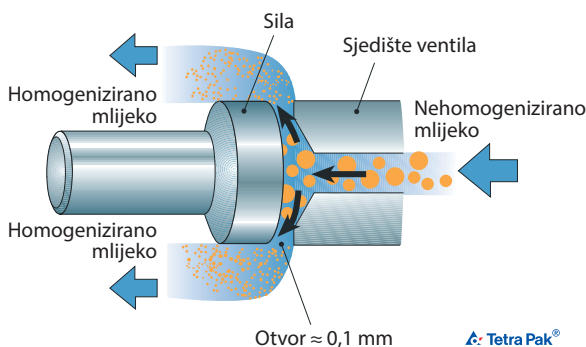
4.3.1.4.

Homogenizacija

Tehnološka operacija homogenizacije u proizvodnji fermentiranih mlijeka se provodi nakon što je mlijeko standardizirano na željene udjele mliječne masti, Sbm ili drugih dopuštenih dodataka (sastojaka) koji su dio proizvoda. Postupkom homogenizacije veličina masne globule reducira se na < 1 - 2 μm u promjeru (slika 4.54.), čime se rizik od ponovnog povezivanja masnih globula smanjuje na zanemarivu razinu. Zbog smanjenja veličine, masne globule se fermentacijom mlijeka ravnomjerno raspoređuju u proteinsku mrežu koja čini gel-strukturu fermentiranog mlijeka.

Homogenizacijom se osigurava i potpuna otopljenost dodanih sastojaka potrebnih za obogaćivanje ili stabilizaciju mlijeka (mlijeko u prahu, šećeri, stabilizatori). Dodatno, homogenizacijom se dio proteina mlijeka veže za površinu masne globule, čime se povećava broj strukturno vezanih komponenti u mlijeku. Novonastale strukturne komponente mlijeka poslije pogoduju stvaranju bolje konzistencije/viskoznosti proizvoda i osiguravaju veću stabilnost gel-strukture na sinerezu (izdvajanje sirutke). Homogenizacijom mlijeka dolazi i do oštećenja membrana masnih globula posljedica kojih je oslobađanje prirodnih lipaza koje oksidiraju mliječnu mast. Da bi se spriječile neželjene lipolitičke promjene mliječne masti koje su poslije uzrok užegnuta okusa proizvoda, mlijeko u što kraćem vremenu nakon homogenizacije treba pasteurizirati.

U proizvodnji fermentiranih mlijeka, homogenizacija mlijeka najčešće se provodi na temperaturama između 55 i 65 °C uz tlak 10 - 25 MPa (100 - 250 bara). Najniža je učinkovita temperatura homogenizacije 35 °C, a najniži je učinkoviti tlak homogenizacije ~ 3 - 4 MPa. Tlak homogenizacije proporcionalan je udjelu



Slika 4.54.

Shematski prikaz principa homogenizacije mlijeka.

Detalji: mlijeko se pod tlakom protiskuje kroz uske otvore ventila, gdje zbog brzine i tlaka dolazi do deformacije masnih globula. Nakon prolaska kroz uski otvor ventila nastaje vrtložno gibanje mlijeka, gdje se formiraju ujednačene globule mliječne masti približnog promjera 1 - 2 µm koje su poslije sadržane u homogeniziranom mlijeku. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)



Slika 4.55.

Nova generacija homogenizatora kapaciteta 55 - 52.000 L/h s mogućnošću namještanja tlaka do 63 MPa. (S dopuštenjem Tetra Paka.)

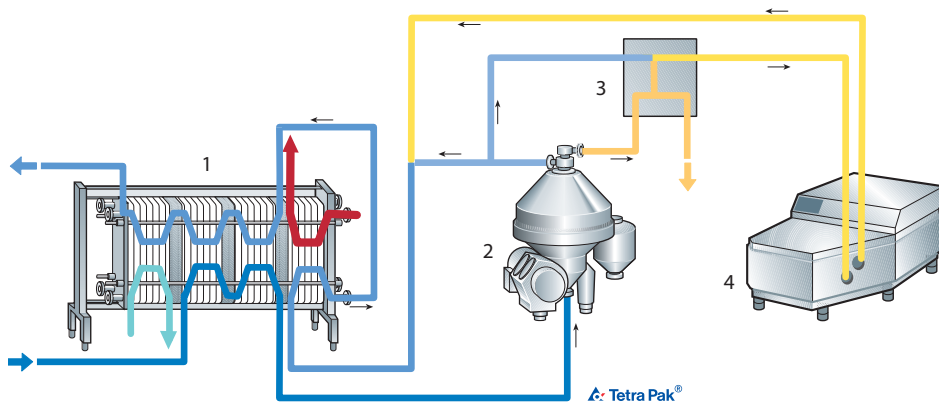
suhe tvari mlijeka (ST) i vrsti fermentiranog mlijeka. Mlijeko za proizvodnju kefiru homogenizira se uz tlak 10 - 20 MPa, za ymer 18 - 23 MPa, a za jogurt 20 - 25 MPa. Niže temperature i niži tlak homogenizacije (~ 55/10 MPa) preporučuju se za tekuća fermentirana

mlijeka ako se u proizvodnji koristi stabilizator na bazi škroba. Za ilustraciju kako izgledaju suvremeni homogenizatori na slici 4.55. je prikazan homogenizator s 8 različitih modela za homogenizaciju, i to za bilo koji potreban kapacitet od 55 - 52.000 L/h s mogućnošću namještanja tlaka do 63 MPa.

Homogenizator se u proizvodnoj liniji najčešće smješta nakon prve regenerativne sekcije pasterizatora i prije završne kompletne pasterizacije mlijeka (slika 4.56.). Tako dizajnirana linija osigurava najbolji učinak homogenizacije budući da je tada mliječna mast u mlijeku tekuća.

Homogenizaciju se mlijeka za proizvodnju fermentiranih mlijeka može obavljati jednofaznim ili dvofaznim homogenizatorima. Moderna mljekarska postrojenja radi postizanja optimalne učinkovitosti najčešće koriste dvofazne homogenizatore za homogenizaciju mlijeka. Dvofaznom se homogenizacijom mlijeka postiže: (i) osiguranje konstantnoga i kontroliranog tlaka prve faze, što poboljšava učinak homogenizacije i (ii) sprječava nakupljanje masnih globula koje se mogu pojaviti odmah nakon prve faze homogenizacije. Izgled masnih globula nakon jednofazne i dvofazne homogenizacije mlijeka prikazan je na slici 4.57.

Prednosti dvofazne homogenizacije mlijeka u usporedbi s jednofaznom bez svake su sumnje značajne, ali se ona u proizvodnji fermentiranih mlijeka ne može jednoobrazno primijeniti. Za poboljšanje konzistencije i viskoznosti i smanjenja sinereze, mlijeko koje sadrži između 11 i 13 % suhe tvari (ST) preporučuje se: (i) homogenizirati jednofaznom homogenizacijom uz visoki tlak (~ 23 - 28 MPa) ili (ii) homogenizirati dvofaznom homogenizacijom uz najprije viši (~ 23 - 28 MPa) a potom niži tlak (~ 6 MPa). Mlijeko koje sadrži visok udjel ST ili stabilizator preporučuje se homogenizirati uz niži tlak (~ 6 - 17 MPa). Učinak je homogenizacije na poboljšanje reoloških svojstava proizvoda manje značajan ako je udjel ST ili stabilizatora u mlijeku visok pa je korištenje nižeg tlaka tehnološki opravdano. Također, ako se kao stabilizator koristi modificirani škrob koji nije stabilan na smicanje, tlak homogenizacije treba biti prilično nizak (~ 3 - 4 MPa) i provodi se jednofaznom homogenizacijom.

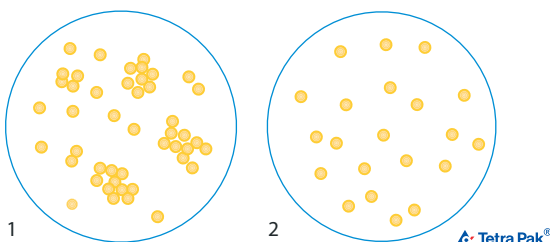


- Sirovo mlijeko, 4 % mliječne masti
- Vrhnje, 35 % mliječne masti
- Obrano mlijeko, 0,05 % mliječne masti
- Vrhnje, 10 % mliječne masti
- Standardizirano mlijeko, 3 % mliječne masti
- Medij za hlađenje
- Medij za zagrijavanje

Slika 4.56.

Shematski prikaz načina povezivanja homogenizatora u proizvodnu liniju fermentiranih mlijeka.

Detalji: 1 izmjenjivač topline (pasterizator), 2 centrifugalni separator, 3 automatska jedinica za standardizaciju mliječne masti, 4 homogenizator. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)



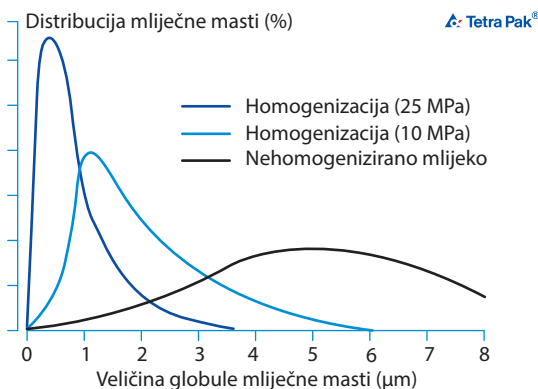
Slika 4.57.

Shematski prikaz izgleda globula mliječne masti u mlijeku nakon homogenizacije.

Detalji: 1 jednofazna homogenizacija, 2 dvofazna homogenizacija. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Za usporedbu, na slici 4.58. prikazana je distribucija i veličina masnih globula nakon homogenizacije uz korištenje tlaka od 10 i 25 MPa (100 - 250 bara).

Osim veličine i distribucije masnih globula uvjetovanih tlakom, homogenizacijom mlijeka dolazi i do kvalitativnih fizikalno-kemijskih promjena u sastavu i organizaciji membrane *novo* formiranih masnih globula. Homogenizacijom izazvane fizikalno-kemijske promjene globula mliječne masti poslije tijekom fermentacije imaju pozitivan fizikalni učinak na

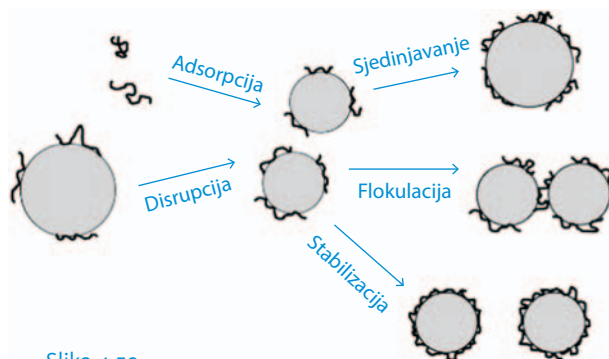


Slika 4.58.

Krivulja distribucije veličine masnih globula u mlijeku homogeniziranom uz tlak od 10 i 25 MPa.

Detalji: krivulja se znatno pomiče ulijevo kada se koristi viši tlak homogenizacije. Za usporedbu, na slici je prikazana i distribucijska krivulja veličine masnih globula u nativnom mlijeku. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

gel-strukturu fermentiranog mlijeka. Tvrdnja nije potpuno točna za homogenizaciju mlijeka s udjelom masti između 0,1 i 2,0 %. Zbog nižeg udjela mliječne masti smanjuje se fizički kapacitet gel-strukture za vezanje vode, a posljedično povećava se njegova predispozicija



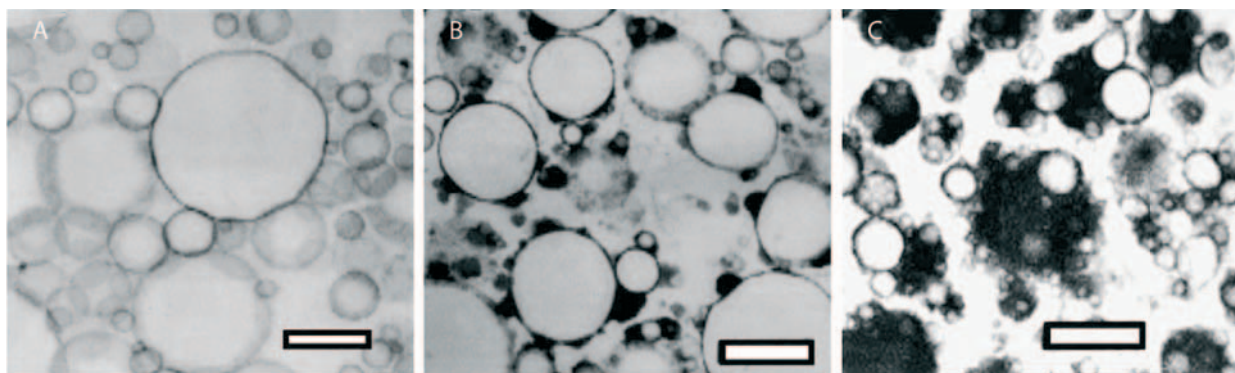
Slika 4.59.

Shematski prikaz glavnih fizikalno-kemijskih reakcija uključenih u stvaranje emulzije. (Raikos, 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

za sinerezu. Unutar kazeinskog matriksa, zbog nižeg udjela mliječne masti u mlijeku ostaje veći broj praznih prostora posljedica koje je slabija čvrstoća gel-strukture podložnija sinerezi.

Homogenizacija mlijeka uobičajeno se provodi prije toplinske obrade, ali se obrano mlijeko može

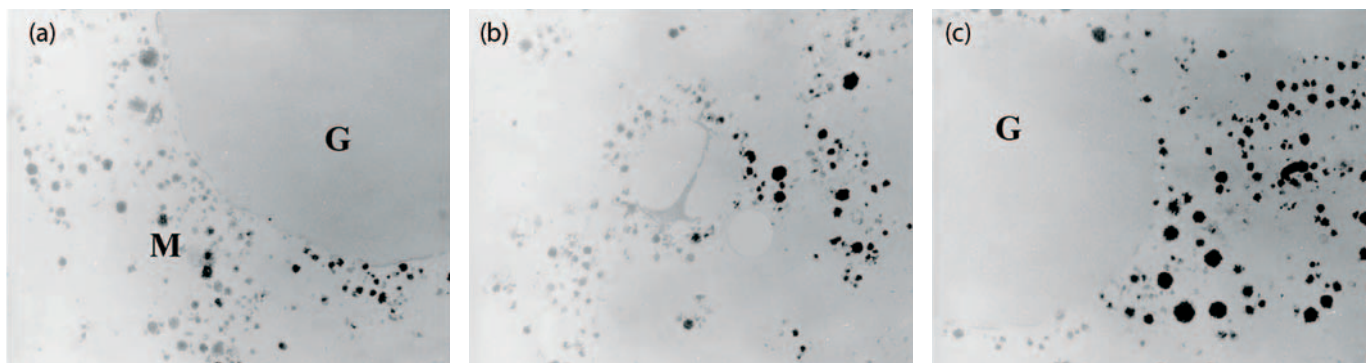
homogenizirati i nakon toplinske obrade. Istraživanja pokazuju da je u tim slučajevima zbog većeg stupnja denaturacije β -laktoglobulina u obranom mlijeku proteoliza fermentacijskog mlijeka izraženija, a konzistencija gotovog proizvoda bolja. Postupak homogenizacije u proizvodnji fermentiranih mlijeka omogućava i potpunu otopljenost svih dopuštenih dodataka koji se dodaju u mlijeko. U proizvodnji fermentiranih mlijeka, kao dodatak se vrlo često koriste proteini mlijeka koji su između ostalog i izvrsni prirodni emulgatori. U tom je smislu homogenizacija osnovna tehnološka operacija u formiranju emulzije gdje se masne globule i proteini deformiraju i destabiliziraju djelovanjem mehaničke sile. Istodobno u mlijeku nastaje emulzifikacija između globula mliječne masti i proteina budući da proteini imaju sposobnost vrlo brze adsorpcije na novonastalu masnu globulu ($2 - 3 \text{ mg/m}^2$). Zbog te homogenizacijom izazvane reakcije na površini masne globule se formira gust proteinski emulgacijski sloj ($\sim 10 \text{ nm}$) koji se sastoji od kazeina i proteina sirutke. Steričkim i elektrostatskim mehanizmima emulgacijski proteinski sloj sprječava sjedinjavanje ili flokulaciju/precipitaciju novoformiranih čestica (slika 4.59). Ako je udjel proteina u mlijeku nizak ($< 3 \%$), ne može se u



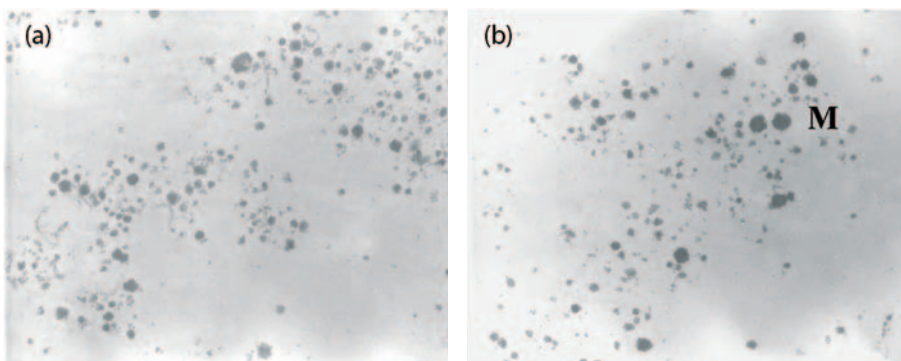
Slika 4.60.

Mikrostruktura emulzija sojinog ulja i mlijeka formirana dodatkom Na-kazeinata.

Detalji: (A) emulzija sojinog ulja stabilizirana dodatkom Na-kazeinata gdje je površina pokrivena jednim slojem proteina, (B) velike globule mliječne masti nakon homogenizacije pokazuju povezanost i raspršenost kazeinskih čestica (tamne nakupine) na granici emulzije ulja u vodi, (C) male čestice mlijeka nakon homogenizacije pokazuju visok udjel nakupina proteina i masnih globula malih veličina na granici emulzije ulja u vodi (A, B: bar = 300 nm; C: bar = 200 nm). Slika je dobivena transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM). (Dalgleish, 2006., s dopuštenjem Elseviera.)



Detalji: (a) sirovo mlijeko, (b) sirovo homogenizirano mlijeko, (c) toplinski obrađeno mlijeko, (d) homogenizirano i nakon toga toplinski obrađeno mlijeko, (e) toplinski obrađeno i potom homogenizirano mlijeko. M = kazeinska micela, G = globula mliječne masti. Slika je dobivena transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM); bar = 0,6 μm . (García-Risco i sur., 2002., s dopuštenjem Elseviera.)



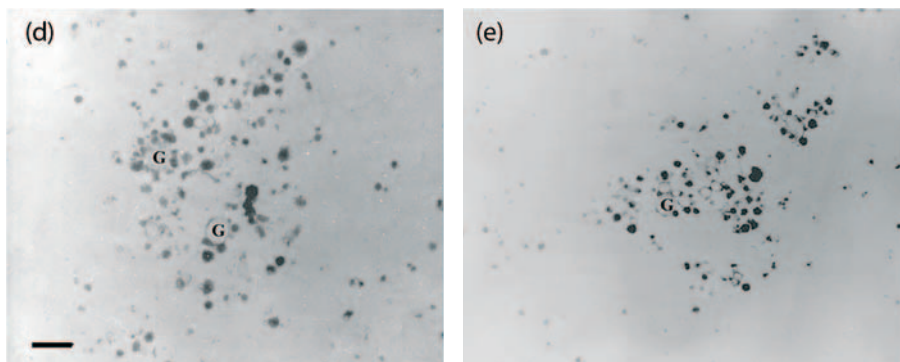
Slika 4.62.

Mikrostruktura obranog mlijeka (~ 0,5 % m.m) određena tehnološkim procesima obrade mlijeka.

potpunosti formirati membrana novonastale masne globule i dolazi do flokulacije ili sjedinjavanja čestica. Suprotno, kada je količina proteina u mlijeku dostatna, proteini mlijeka a osobito kazein zbog svoga visokog udjela hidrofobnih rezidua i otvorene strukture prelaze iz vodene na granicu masne faze mlijeka i nastaje emulzija ulja u vodi. Za ilustraciju te tvrdnje slika 4.60. na primjeru dodatka Na-kazeinata mlijeku i sojinom ulju pokazuje mikroskopski izgled nastalih emulzija nakon homogenizacije.

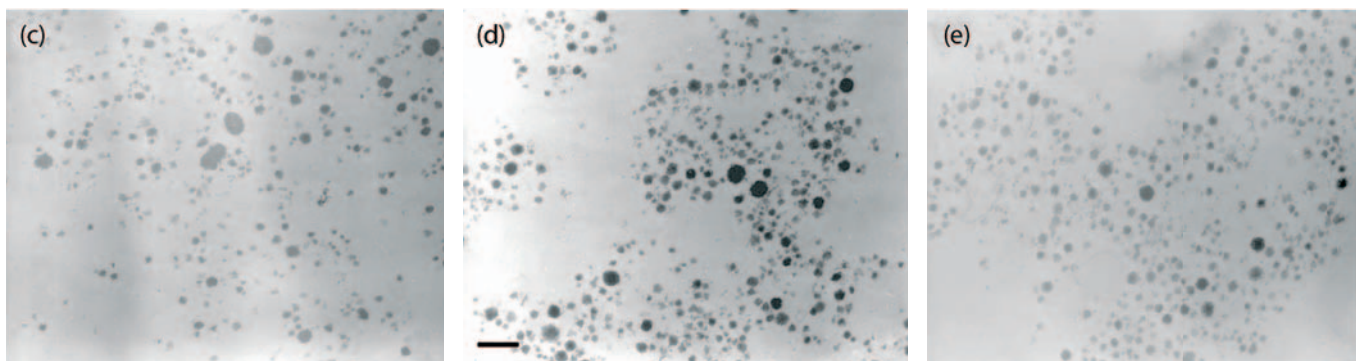
Zbog homogenizacijom izazvanih emulzifikacijskih reakcija viskozitet se mlijeka povećava. Drugim riječima, te reakcije učinkovito povećavaju broj strukturno vezanih komponenti, a nativne membrane masnih globula više ne ulaze u interakciju s proteinima na

isti način kao prije homogenizacije posljedica kojih je promjena viskoziteta. Dodatno, tlak homogenizacije ~ 20 MPa neovisno o tome homogenizira li se obrano ili punomasno mlijeko povećava koncentraciju micelnog β -laktoglobulina (β -Lg) u mlijeku. Povećanje koncentracije β -Lg u mlijeku za proizvodnju fermentiranih mlijeka znači veći stupanj poželjne proteolize i bolju teksturu proizvoda. Ipak, važno je istaknuti da je djelomična denaturacija proteina sirutke uzrokovana homogenizacijom veća u obranom u usporedbi s punomasnim mlijekom. Primjer učinka homogenizacije na veličinu globula mliječne masti i proteina u mikrostrukturi punomasnog mlijeka (~ 3,8 % mliječne masti) prikazuje slika 4.61., a u mikrostrukturi obranog mlijeka (~ 0,5 % mliječne masti) slika 4.62.



Slika 4.61.

Mikrostruktura punomasnog mlijeka (~ 3,8 % m.m) određena tehnološkim procesima obrade mlijeka.



Detalji: (a) sirovo mlijeko, (b) sirovo homogenizirano mlijeko, (c) toplinski obrađeno mlijeko, (d) homogenizirano i nakon toga toplinski obrađeno mlijeko, (e) toplinski obrađeno i potom homogenizirano mlijeko. M = kazeinska micela. Slika je dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM); bar = 0,6 μm . (García-Risco i sur., 2002., s dopuštenjem Elseviera.)

Prema mikrostrukturi različito tretiranog punomasnoga i obranog mlijeka (slika 4.61. i slika 4.62.), jasno se vidi smanjenje veličine masnih globula u punomasnom mlijeku [slika 4.62. (b)]. Toplinska obrada sama po sebi ne utječe na veličinu globula mliječne masti ali povećava broj većih globula, što je uzrok njihove šire distribucije unutar mikrostrukture mlijeka [slika 4.61. (c) i slika 4.62. (c)]. Homogenizacija punomasnoga i obranog mlijeka prije toplinske obrade mlijeka jasno pokazuje i tendenciju smanjenja prosječne

veličine kazeinskih micela [slika 4.61. (d) i slika 4.62. (d)]. Mikrostruktura mlijeka najprije toplinski obrađenog a potom homogeniziranog pokazuje i značajno manju veličinu masnih globula i micela kazeina [slika 4.61. (e) i slika 4.62. (e)]. Homogenizacija obranog mlijeka nakon toplinske obrade zbog većeg stupnja denaturacija β -laktoglobulina i κ -kazeina ima pozitivan učinak na iniciranje jače proteolize u mlijeku. Suprotno, homogenizacija punomasnog mlijeka nakon toplinske obrade pokazuje značajno manju proteolitičku

predispoziciju mlijeka za proteolizu. Vjerojatan je razlog slabije predispozicije punomasnog mlijeka za proteolizu njegova prirodna sposobnost oblikovanja većeg udjela β -Lg- κ -kazeinskog kompleksa.

Ukratko, kada se toplinska obrada mlijeka provodi prije homogenizacije u mlijeku nastaju sljedeće promjene: (i) proteini sirutke se denaturiraju i ulaze u interakcije s nativnim proteinima membrane masne globule (MMG) i micelarnim kazeinima a osobito sa κ -kazeinom i (ii) kompleks kazein-proteini sirutke se adsorbira na površinu masne globule. Suprotno, u slučajevima kada se homogenizacija mlijeka provodi prije toplinske obrade reakcije u mlijeku su sljedeće: (i) poluintaktna micela kazeina ili fragmenti kazeina pokrivaju masnu globulu, a (ii) denaturirani proteini sirutke se povezuju s proteinima MMG i adsorbiraju kazeine preko disulfidnih mostova. Promjene u strukturi MMG koje su ovisne o redosljedu primijenjenih tehnoloških operacija ne utječu na kasnije izdvajanje masti u proizvodu. U tom smislu, za bolju teksturu i okus proizvoda homogenizacija obranog mlijeka nakon toplinske obrade u proizvodnji fermentiranih mlijeka može biti učinkovitija.

4.3.1.4.1.

Fizikalno-kemijske promjene mliječne masti i proteina

Homogenizacijom mlijeka prvenstveno se istodobno postiže ujednačavanje i smanjuje veličina masnih globula na približno 1 - 2 μ m. Zbog iznimno male veličine masnih globula, izdvajanje mliječne masti na površinu fermentacijskog mlijeka poslije više nije moguće. Postupkom klasične homogenizacije postižu se i druge fizikalno-kemijske promjene mliječne masti i proteina mlijeka važne za proizvodnju fermentiranih mlijeka. Učinak homogenizacije na fizikalno-kemijske promjene mliječne masti ogleda se u sljedećim kvalitativnim promjenama:

- povećanju viskoziteta mlijeka - zbog smanjenja veličine masnih globula povećava se adsorpcija masti na kazeinsku micelu što povećava ukupan volumen mlijeka

- povećanju aktivnosti ksantin oksidaze - zbog pucaanja membrane masne globule koja sadrži više od polovice tog enzima u mlijeku
- povećanju fosfolipida - zbog fizikalnih reakcija više membranskih sastojaka masnih globula prelazi u obranu fazu mlijeka
- smanjenju pojave oksidiranog okusa - zbog migracije fosfolipida u obranu fazu mlijeka i njihova povezivanja sa sulfhidrilnim skupinama proteina nastaju spojevi koji imaju antioksidativno djelovanje.

Istodobno, učinak homogenizacije na fizikalno-kemijske promjene proteina mlijeka ogleda se u sljedećim kvalitativnim promjenama:

- smanjenju stabilnosti proteina - zbog djelomične denaturacije proteina i promjene mineralne ravnoteže te posljedično tome uzrokovanih interakcija između novonastalih protein-protein molekula
- smanjenju količine kazeina u obranoj fazi - zbog djelomične migracije kazeina iz obrane faze mlijeka za formiranje membrane oko novonastalih malih masnih globula
- smanjenju aglutinacije mliječne masti - zbog adsorpcije kazeinskih micela i submicela na masne globule (smanjenje nakupljanja masnih globula).

Fizikalno-kemijske promjene mliječne masti i proteina mlijeka uzrokovane homogenizacijom poslije za kvalitetu fermentiranih mlijeka imaju sljedeće značenje:

- ravnomjernu raspodjelu globule mliječne masti u kazeinskom matriksu
- konzistencija i stabilnost formirane gel-strukture su poboljšani
- viskoznost tekućih i čvrstoća čvrstih varijanti se povećava
- okus proizvoda je puni zbog većeg broja masnih globula ravnomjerno raspoređenih u kazeinskom matriksu
- zbog povećanja hidrofилности (sposobnosti vezanja vode) uvjetovanih novonastalim izmijenjenim proteinskim membranama masnih globula i drugim protein-protein interakcijama predispozicija proizvoda za sinerezu je smanjena

- zbog povećanog broja masnih globula refleksija svjetlosti se povećava pa je proizvod intenzivno bijele boje
- zbog strukturnih promjena masti i proteina u odnosu na njihovu nativnu strukturu i lakše dostupnosti fosfolipida i termostabilnih bioaktivnih komponenti sadržanih u MMG probavljivost proizvoda je povećana.

4.3.1.4.2.

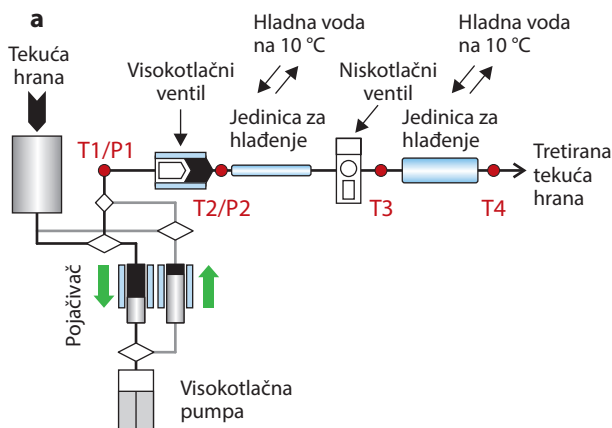
Visokotlačna homogenizacija

Općenito, u prehrambenoj industriji upotreba visokotlačne homogenizacije [engl. *High Pressure Homogenization* (HPH)], koja se još naziva i dinamična visokotlačna homogenizacija, proizašla je iz ideje: (i) da se visokim tlakom može postići hladna pasteurizacija (10 - 50 °C) i (ii) istodobno poboljšati svojstva teksture hrane. Osim u industriji hrane, HPH se koristi i u kozmetičkoj te farmaceutskoj industriji. Ovisno o nominalnoj jačini tlaka, za visokotlačnu homogenizaciju obično se koriste dva izraza: HPH (150 - 200 MPa) i ultravisokotlačna homogenizacija [engl. *Ultra High Pressure Homogenization* (UHPH, 350 -400 MPa)]. Izraz visokotlačna homogenizacija (HPH) u praksi se ravnopravno koristi i za homogenizaciju koja se provodi uz tlak 50 - 1000 MPa.

Visokotlačna homogenizacija temelji se na istim principima klasične homogenizacije, ali su homogenizatori opremljeni: (i) određenom vrstom klipnih

pumpi i (ii) visokotlačnim HP-ventilima (prva faza), te niskotlačnim LP ventilima (druga faza). Procesne karakteristike visokotlačnih homogenizatora određene su dizajnom ventila i fizikalno-kemijskim karakteristikama fluida (gustoća, viskozitet, tečenje). Tako se LP-ventili mogu ali i ne moraju koristiti za HPH homogenizaciju, ovisno o učinku HP-ventila na veličinu promjena čestica koje se uobičajeno postižu jednofaznom standardnom homogenizacijom.

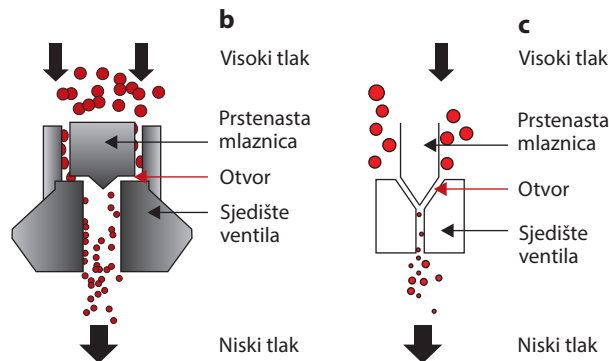
Za korištenje izometrijskog ili dinamičnog HP-procesa može se reći da su fluidi u oba slučaja izloženi visokom tlaku. U slučaju izometrijskog HP-procesa, primjenjuje se ravnomjerni tlak koji se odmah prenosi kroz cijeli fluid pomoću tlačnoga transmisijskog medija koji je obično voda sadržana u hrani. Tlak inducira određenu kompresiju fluida (12 % smanjuje se volumen vode uz tlak od 400 MPa). Uz tlak koji

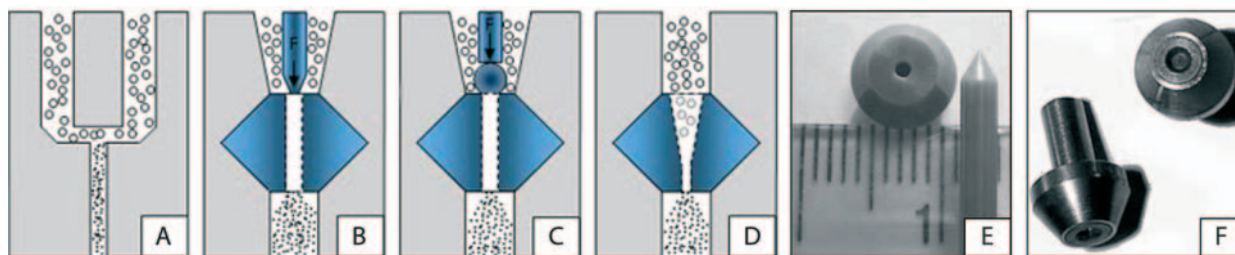


Slika 4.63.

Shematski prikaz principa rada visokotlačne homogenizacije (HPH) s dvostrukim pojačivačima.

Detalji: (a) T_{in} ulazna temperatura fluida u balansnom spremniku, T_1/P_1 kontrola temperatura i tlaka smještena na ulaznom ventilu, T_2/P_2 kontrola temperature i tlaka smještena na izlaznom ventilu, T_3 i T_4 kontrola temperature nakon prve i druge rashladne jedinice, (b) shematski prikaz principa rada HPH s oštrim kutom dizajniranih HP-ventila proizvođača *Stansed Fluid Power*, (c) shematski prikaz principa rada HPH s Y-oblikom HP-ventila. (Dumay i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)





Slika 4.64.

Princip rada i dizajn ventila za visokotlačnu homogenizaciju.

Detalji: (A) mikrofluidni, (B) keramička mlaznica, (C) kuglična keramička mlaznica, (D) dijamantna, safirna ili gumena mlaznica, (E) izgled dijamantne mlaznice, (F) izgled keramičke mlaznice. (<http://web.utk.edu/~fede/high%20pressure%20homogenization.html>)

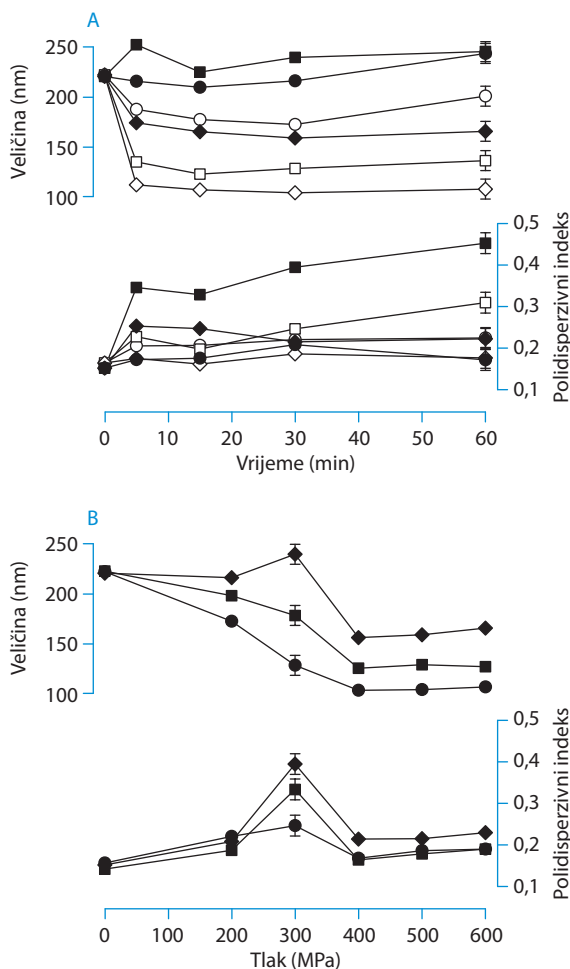
se koristi u industriji hrane izometrijski HPH proces nema nepoželjan učinak smicanja niti ne utječe na kompresiju kovalentnih veza u biološkim molekulama fluida. Razlog je činjenica da je visokom tlaku procesni fluid izložen u tlačnom pojačivaču koji ga potiskuje kroz vrlo uzak otvor ventila od svega nekoliko mikrometara (μm) nekoliko sekundi. Sam proces tlačenja intenzivira sljedeće reakcije: (i) mehaničku silu i prolongiranje sile u laminarnom fluidu na ulaznom ventilu i u međurazmacima unutar ventila, (ii) turbulenciju, kavitaciju i kompresiju čvrste površine kroz izlazni međurazmak ventila. Za ilustraciju je na slici 4.63. shematski prikazan princip rada visokotlačnih homogenizatora.

Obično je kapacitet visokotlačnih homogenizatora za industrijsku primjenu 350 - 400 L/h, a mogućnost je aplikacije tlaka 600 - 700 MPa. Vrijeme izloženosti fluida visokom tlaku je najčešće 5 - 30 minuta u uvjetima sobne, niske ili umjerene temperature. Homogenizatore koje su razvili renomirani proizvođači opreme (APV, Avestin, Niro i Stansted Fluid Power), umjesto visokotlačnih ventila imaju ugrađene igličaste ventile, ili prstenaste mlaznice, ili klipne nepovratne ventile. Neovisno o izvedbi, ti su ventili napravljeni ili od neabrazivne keramike ili od dijamanta, safira te gume. Na slici 4.64. prikazan je princip rada i dizajn visokotlačnih ventila koji se najčešće koriste u industriji hrane.

Neovisno o vrsti izvedbe visokotlačnih ventila u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, HPH osigurava sljedeće promjene fluida:

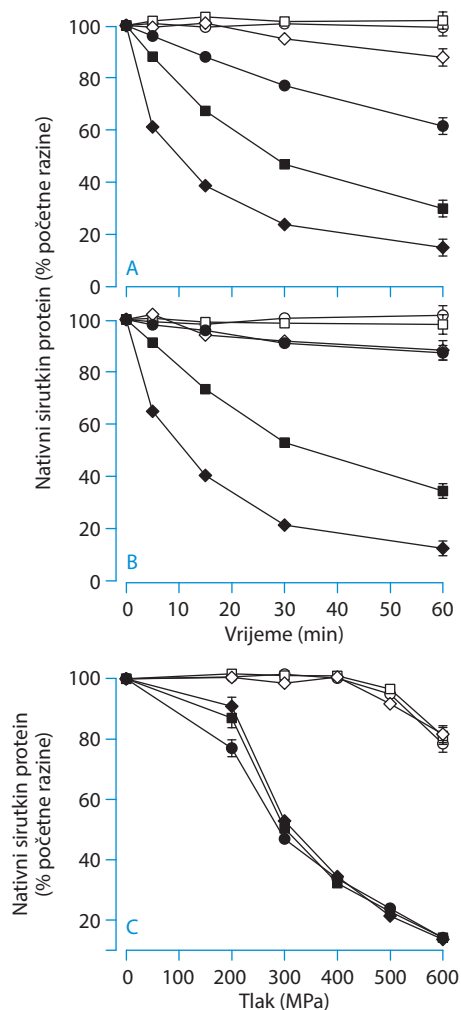
- fragmentaciju čestica u disperziji ili emulziji
- stvaranje glatke i stabilne emulzije
- modifikaciju viskoznih svojstava fluida uzrokovanu smanjenjem veličine pojedinačnih čestica
- olakšanu ekstrakciju metabolita
- inaktivaciju prisutnih mikroorganizama, te nativnih i mikrobnih enzima s najmanje jednakom efikasnošću kao pasterizacija.

U mljekarskoj industriji, kao alternativa klasičnoj homogenizaciji ($\sim 10 - 20 \text{ MPa}$) posljednjih deset godina visokotlačna homogenizacija koristi se za različite namjene. U netretiranom obranom mlijeku prosječna veličina kazeinske micelle, neovisno o udjelu suhe tvari (10, 15 ili 20 %) je $\sim 220 \text{ nm}$. Unutar prvih pet minuta izloženosti mlijeka visokom tlaku kazeinske micelle se dezintegriju na kazeinske čestice znatno manjeg promjera. Progresivno povećanju tlaka (400 MPa) primjenom HPH homogenizacije, veličina kazeinske micelle smanjuje se na veličinu 100 - 160 nm ili za $\sim 45 - 75 \%$ od njene izvorne veličine. Osim toga, HPH uzrokuje disocijaciju koloidnog kalcijevog fosfata (KCP) slabljenjem jačine hidrofobnih veza unutar kazeinske micelle. Posljedično tome smanjuje se zamućenost mlijeka (izražena kroz polidisperzni indeks),



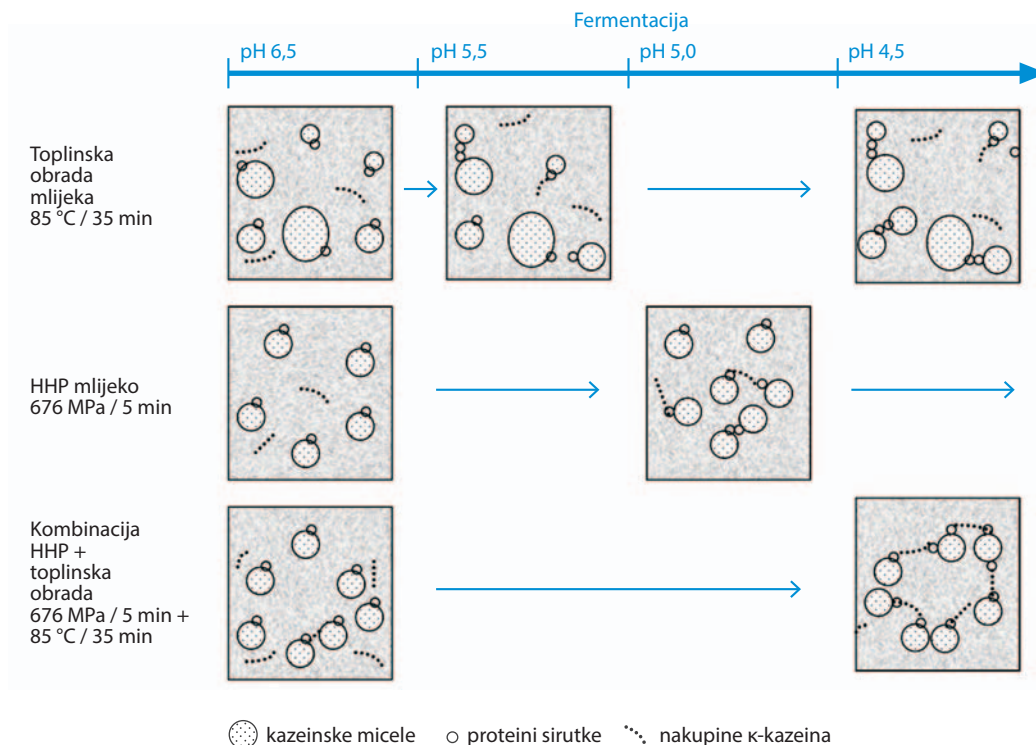
Slika 4.65.

(A) promjene veličine kazeinske micelle u obranom mlijeku sa 10 % ST (otvoreni simboli) i 20 % ST mlijeka (ispunjeni simboli) nakon HPH od: 200 MPa (○, ●), 300 MPa (□, ■), 500 MPa (◇, ◆) i polidisperzni indeks. (B) promjene veličine kazeinske micelle u obranom mlijeku s 10 % (●), 15 % (■), i 20 % ST (◆), nakon 30 min izloženosti mlijeka visokom tlaku i polidisperzni indeks. (Anema, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.66.

Denaturacija β -Lg (ispunjeni simboli) i α -La (otvoreni simboli), (A) mlijeko s 10 % ST i (B) mlijeko s 20 % ST nakon HPH/o - 60 min od 200 MPa (●, ○), 300 MPa (■, □) i 500 MPa (◆, ◇). (C) denaturacija β -Lg (ispunjeni simboli) i α -La (otvoreni simboli) u obranom mlijeku s 10 % ST (●, ○), 15 % ST (■, □), 20 % ST (◆, ◇) nakon 30 min izloženosti visokom tlaku. (Anema, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.67.

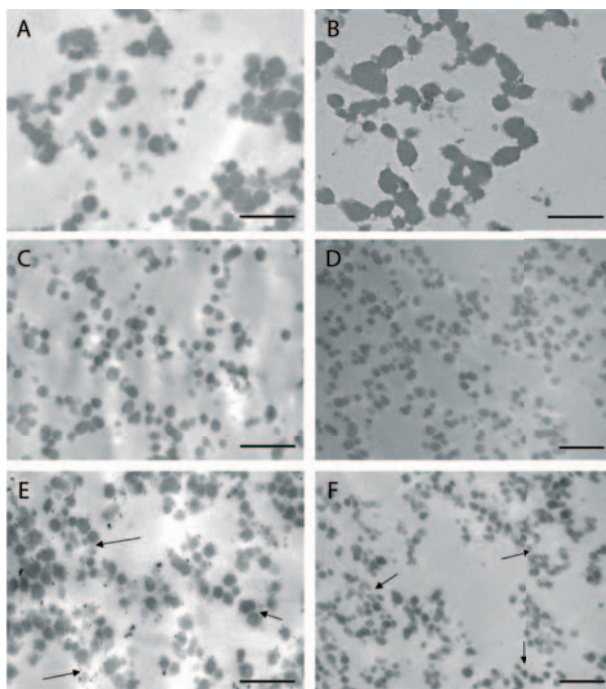
Shematski prikaz utjecaja temperature, visokotlačne homogenizacije (HPH) i kombiniranog utjecaja HPH i toplinske obrade mlijeka na formiranje proteinske mreže tijekom fermentacije. (Penna i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

te se povećava njegova viskoznost. Visokotlačna homogenizacija uzrokuje i denaturaciju proteina sirutke. Za denaturaciju β -laktoglobulina (β -Lg) dovoljno je korištenje tlaka 50 - 200 MPa, a za potpunu denaturaciju α -laktalbumina (α -La) potreban je tlak viši od 400 MPa. Utjecaj HPH na promjene veličine kazeinskih micela i denaturaciju proteina sirutke u obranom mlijeku prikazan je na slici 4.65. i slici 4.66. Također, već uz tlak 50 - 150 HPH znatno utječe na specifična emulgacijska svojstva proteina mlijeka stvaranjem stabilne emulzije ulja u vodi.

Visokotlačna se homogenizacija kao alternativa klasičnoj homogenizaciji u proizvodnji fermentiranih mlijeka koristi i za poboljšanje fizikalnih i reoloških svojstava proizvoda. U usporedbi s klasičnim postupkom tretiranja mlijeka na slici 4.67. shematski je prikazan

kombinirani utjecaj HPH i toplinske obrade mlijeka na način oblikovanja proteinske mreže fermentacijom mlijeka. Za iste postupke tretiranja mlijeka slika 4.68. prikazuje mikrostrukturu jogurta proizvedenog s dvjema različitim komercijalnim kulturama (YO MIX 236 i DPL ABY 611).

Prema mikrostrukturi jogurta (slika 4.68.) proizvedenog s dvjema različitim komercijalnim kulturama, jasno se vidi gušća i homogenija distribucija kazeinskih micela korištenjem HPH i kombiniranog korištenja HPH i toplinske obrade mlijeka. U konkretnom primjeru a neovisno o vrsti korištene kulture, manje kazeinske čestice i njihova homogenija distribucija unutar proteinske mreže osiguravaju poboljšanje svojstva formiranoga gela za kapacitet vezanja vode u proizvodu.



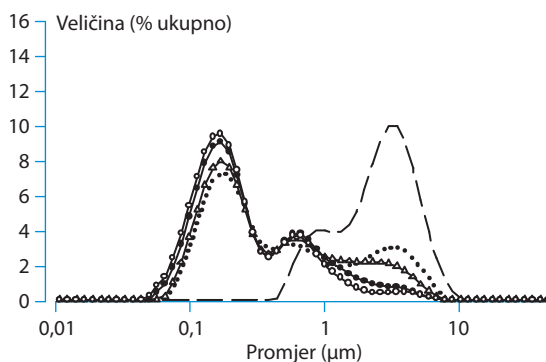
Slika 4.68.

Mikrostruktura jogurta proizvedenog s komercijalnim kulturama YO MIX 236 (A, C, E) i DPL ABY 611 (B, D i E) korištenjem različitih postupaka obrade mlijeka.

Detalji: (A i B) toplinska obrada, (C i D) visokotlačna homogenizacija (HPH), (E i F) kombinacije HPH i toplinske obrade (strelice unutar slika E i F pokazuju nastale veće kazeinske micelle povezane u klustere i njihovu međusobnu bolju povezanost. Na svim pojedinačnim slikama proteinska mreža je u formi tamnosivih nakupina, a pore ili prazni prostori unutar mreže su bijeli. Slika je dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEP); bar = 1000 μm . (Penna i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

Učinak HPH na globule mliječne masti ogleda se u znatnom smanjenju njihove veličine i distribucije u mlijeku. Prema visini korištenog tlaka homogenizacije, na slici 4.69. prikazana je veličina i distribucija globula mliječne masti u mlijeku. Od ukupno prisutnih masnih globula u mlijeku tlak HPH 200 - 300 MPa uzrokuje za njih 60 - 70 % smanjenje veličine na prosječni promjer od ~ 0,4 μm .

U usporedbi s klasičnom homogenizacijom, strukturne promjene kazeinskih micela i masnih globula uzrokovane djelovanjem visokog tlaka omogućavaju između novostvorenih čestica bolje protein-protein i mast-protein interakcije. Poslije te tlakom uvjetovane reakcije poboljšavaju acidifikacijska svojstva mlijeka i osiguravaju formiranje stabilnije proteinske mreže. Posljedično tome proteinska mreža formirane gel-strukture fermentiranog mlijeka ima bolja retencijska svojstva za zadržavanje sirutke. Istodobno HPH nema negativan utjecaj na kvalitativne karakteristike fermentiranog mlijeka poput okusa, arome, koncentraciju vitamina i ostalih nutrijenata.

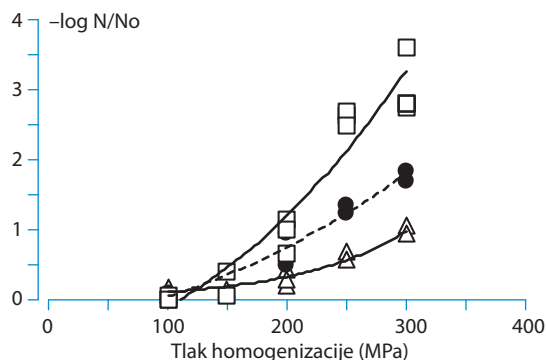


Slika 4.69.

Veličina i distribucija masnih globula u mlijeku uvjetovana tlakom homogenizacije.

Detalji: u uvjetima ulazne temperature (T_1) od 4 °C (—) 0,1 MPa (kontrola), (- -) 100 MPa, (Δ) 200 MPa, (\bullet) 250 MPa; Izlazna temperatura mlijeka T_2 ovisno o tlaku bila je za: 100 MPa (- -) ~ 30 °C, 200 MPa (Δ) ~ 46 °C, 250 MPa (\bullet) ~ 55 °C, 300 MPa (\circ) ~ 65 °C. (Thiebaut i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

Visokotlačna homogenizacija uz korištenje tlaka od ≥ 200 MPa značajno utječe i na smanjenje ukupnog broja bakterija i broja patogenih bakterija u mlijeku za najmanje 1 log jedinicu. Tako se HPH pokazala dobrom tehnološkom operacijom i za poboljšanje bakteriološke kvalitete sirovog mlijeka koje se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Slika 4.70. pokazuje omjer inaktivacije ukupnog broja bakterija u



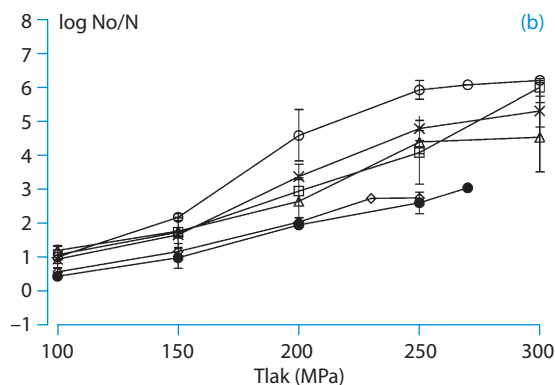
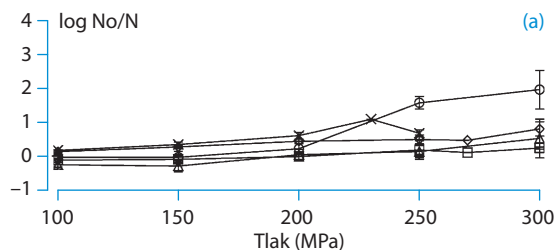
Slika 4.70.

Omjer inaktivacije ukupnog broja bakterija kao funkcije korištenog tlaka visokotlačne homogenizacije i ulazne temperature mlijeka.

Detalji: ulazna temperatura mlijeka 4 °C (Δ), ulazna temperatura mlijeka 14 °C (\bullet), ulazna temperatura mlijeka 24 °C (\square). Početan ukupni broj bakterija u mlijeku prije visokotlačne homogenizacije $1 - 70 \times 10^4$ cfu/mL. (Thiebaut i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

mlijeku korištenjem triju različitih temperatura ulaznog mlijeka (4, 14 i 24 °C) uz tlak homogenizacije od 200, 250 i 300 MPa. Kombinacija tlaka homogenizacije od 300 MPa i ulazna temperatura mlijeka od 24 °C mogu smanjiti ukupan broj bakterija u mlijeku za više od 3 log jedinice. Tlak homogenizacije od 300 MPa može učinkovito inaktivirati i većinu gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija prisutnih u sirovom mlijeku za najmanje 1 log jedinicu. Kao primjer, na slici 4.71. prikazana je inaktivacija gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija korištenjem HPH uz ulaznu temperaturu mlijeka od 25 °C. Osobito se HPH pokazala učinkovitom u inaktivaciji bakterija *Y. enterocolitica* i *S. aureus*. S obzirom na činjenicu da sirovo mlijeko u stvarnosti gotovo nikada ne sadrži tako visoku koncentraciju pojedinačnih bakterijskih vrsta (koja je korištena u navedenim pokusima) smatra se da se HTP može uspješno koristiti kao alternativa pasterizaciji.

Visokotlačna homogenizacija može se koristiti u proizvodnji fermentiranih mlijeka i za poboljšanje fizikalnih i reoloških svojstava proizvoda bez obogaćivanja suhe tvari (ST) mlijeka i toplinske obrade

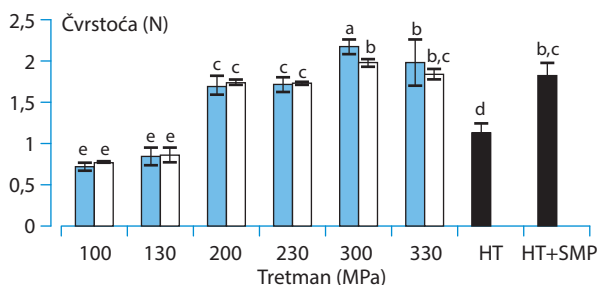


Slika 4.71.

Inaktivacija gram-pozitivnih (a) i gram-negativnih bakterija kao funkcije korištenog tlaka visokotlačne homogenizacije i ulazne temperature mlijeka od 25 °C.

Detalji: gram-pozitivne bakterije *E. faecalis* (\diamond), *S. aureus* (\square), *L. plantarum* (Δ), *L. innocua* (\times), *L. dextranicum* (\circ). Gram-negativne bakterije *S. typhimurium* (\bullet), *S. flexneri* (\times), *E. coli* MG1655 (Δ), *E. coli* LMM 1010 (\square), *Y. enterocolitica* (\diamond), *P. fluorescens* (\circ). Početna koncentracija pojedinačnih bakterijskih vrsta u mlijeku prije visokotlačne homogenizacije 10^8 cfu/mL. (Wuytack i sur. 2002., s dopuštenjem Elseviera.)

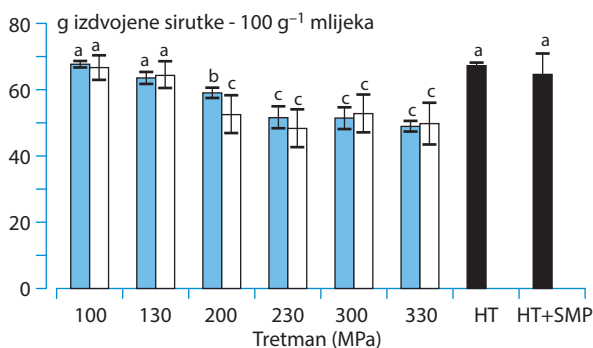
mlijeka. U tom se slučaju, da se izbjegne termalni učinak, koristi ulazna temperatura mlijeka ne viša od 30 °C a izlazna ne viša od 40 °C, a tlak homogenizacije je između 200 i 300 MPa. Za objašnjenje učinka HPH na karakteristike teksture i predispoziciju proizvoda na sinerezu za primjer je uzet jogurt. U usporedbi sa standardnim postupkom proizvodnje jogurta (toplinska obrada mlijeka 90 °C/5 min; homogenizacija na 15 MPa; obogaćivanje suhe tvari s 3 % obranog



Slika 4.72.

Vrijednosti čvrstoće teksture čvrstog jogurta kao funkcije jačine sile tlaka visokotlačne homogenizacije i temperature.

Detalji: plavi stupci temperatura 30 °C, bijeli stupci temperatura 40 °C, crni stupci toplinski obrađeno mlijeko, HT = homogenizacija (15 MPa), pasterizacija 90 °C/90 s, HT+SMP = homogenizacija (15 MPa), pasterizacija 90°/90 s + 3% obranog mlijeka u prahu. Različita slova označavaju signifikantnu razliku ($p < 0,005$). (Serra i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.73.

Kapacitet vezanja vode (% w/w) čvrstog jogurta kao funkcije jačine sile tlaka visokotlačne homogenizacije i temperature.

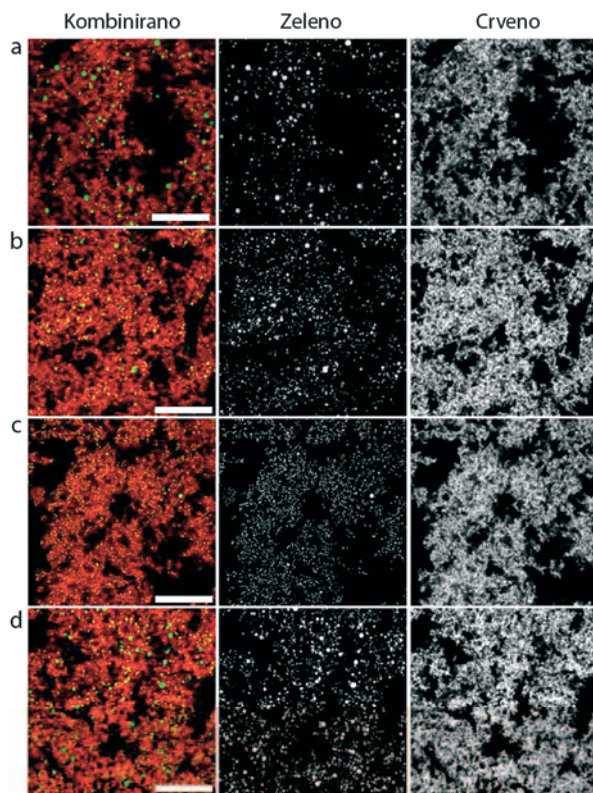
Detalji: plavi stupci temperatura 30 °C, bijeli stupci temperatura 40 °C, crni stupci toplinski obrađeno mlijeko, HT = homogenizacija (15 MPa), pasterizacija 90°/90 s, HT+SMP = homogenizacija (15 MPa), pasterizacija 90°/90 s + 3% obranog mlijeka u prahu. Različita slova označavaju signifikantnu razliku ($p < 0,005$). (Serra i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

mlijeka), jogurt proizveden HPH homogenizacijom ima: (i) čvršću teksturu (slika 4.72.) i (ii) veći kapacitet vezanja vode (slika 4.73.). U konkretnom primjeru čvrstoća jogurta mjerena je penetracijskim testom korištenjem instrumenta za analizu teksture uz konstantnu brzinu 2 mm s⁻¹ i izražena silom penetracije N . Kapacitet vezanja vode izmjeren je korištenjem centrifugalne sile (5000 x g /20 min na 20 °C) i izražen u gramima izlučene sirutke po gramu proizvoda.

Poboljšanja reoloških karakteristika jogurta korištenjem visokotlačne homogenizacije su uvjetovana: (i) smanjenjem veličine i povećanjem broja kazeinskih micela, (ii) disocijacijom kazeinskih micela, (iii) denaturacijom proteina sirutke, prvenstveno β -laktoglobulina i (iv) modifikacijom masnih globula. Djelovanjem visokog tlaka izazvane modifikacije proteina i masti uvjetuju i izmijenjeni način njihova međusobnog povezivanja. Odnosno, nastaju protein-protein-mast interakcije između sada manjih čestica koje formiraju stabilnu gel-strukturu s boljim kapacitetom vezanja vode i čvršćom teksturom.

Visokotlačna u usporedbi s klasičnom homogenizacijom ima znatne prednosti i u poboljšanju fizikalnih i reoloških svojstva niskokaloričnih tekućih varijanti fermentiranih mlijeka. Osobito je ona učinkovita ako se za visokotlačnu homogenizaciju koristi mikrofluidni procesor. Tehnologija mikrofluidnog procesora može dostići tlak koji je ~ 10 - 15 puta veći od tlaka standardnih homogenizatora. Posebnost mikrofluidnog procesora pred ostalim visokotlačnim homogenizatorima je u mogućnosti korištenja i znatno nižeg tlaka (25 - 150 MPa) s jednakom učinkovitosti na strukturalna i senzorna svojstva niskokaloričnih tekućih varijanti fermentiranih mlijeka.

Visokim tlakom uzrokovane protein-protein i mast-protein interakcije povećavaju čvrstoću formirane proteinske mreže ~ 170 - 195 %, a viskozitet ~ 98 - 103 %. Zbog toga je i okus niskokaloričnog jogurta kremast a poželjna svojstva teksture slična su ili čak bolja od punomasnog jogurta proizvedenog standardnim postupkom homogenizacije. Za ilustraciju utjecaja HPH na kvalitetu formirane proteinske mreže na slici 4.74. prikazana je distribucija masnih globula i



Slika 4.74.

Mikrostruktura proteinske mreže tekućeg jogurta pripremljenog standardnim tehnološkim postupkom i uz korištenje visokotlačne homogenizacije i standardne toplinske obrade.

Detalji: (a) mlijeko sa 1,5 % mliječne masti homogenizirano dvofaznom homogenizacijom uz tlak 20/5 MPa, (b) mlijeko sa 1,5 % mliječne masti homogenizirano visokotlačnom homogenizacijom uz tlak 25 MPa, (c) mlijeko sa 1,5 % mliječne masti homogenizirano visokotlačnom homogenizacijom uz tlak 50 MPa, (d) mlijeko s 3,5 % mliječne masti homogenizirano dvofaznom homogenizacijom uz tlak 20/5 MPa (kontrolna skupina). Mliječna mast (zeleno boja), protein (crvena boja), pore unutar matriksa oznaka - kombinirano. Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM); bar = 25µm. (Ciron i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)

proteina unutar proteinske mreže u tekućem niskokaloričnom jogurtu (1,5 % mliječne masti) nakon dva tjedna pohrane. Jogurt je proizveden kombinacijom HPH homogenizacije s mikrofluidnim procesorom (25 i 50 MPa) i toplinske obrade mlijeka na 95 °C/2 min. Za usporedbu učinka HPH, kontrolna skupina jogurta sa 1,5 i 3,5 % mliječne masti prije toplinske obrade homogenizirana je klasičnom dvofaznom homogenizacijom (20/5 MPa).

Usporedbom formirane proteinske mreže između tekućeg jogurta sa 1,5 % (HPH) i 3,5 % mliječne masti (klasična homogenizacija) na slici 4.74. jasno se vidi različita distribucija i veličina masnih globula mliječne masti. Korištenjem visokotlačne homogenizacije globule mliječne masti postaju izrazito male i podjednako se brzo povezuju s kazeinskim micelama i proteinima sirutke, te mliječna mast postaje integralni dio proteinske mreže koji popunjava pore proteinskog matriksa (slika 4.74.; 2a i 2c). Posljedično tome tekući jogurt ima bolji viskozitet, kremastu teksturu i okus sličan punomasnom jogurtu.

Općenito se izdvajanje sirutke (sinereza) na površni fermentiranih mlijeka smatra ozbiljnom tehnološkom pogreškom teksture proizvoda. Zbog toga se za smanjenje sinereze i poboljšanje teksture proizvoda suha tvar mlijeka u standardnom postupku proizvodnje obogaćuje ili se za tu namjenu koriste stabilizatori. Kako se fermentirana mlijeka prvenstveno konzumiraju kao zdrava hrana, upotreba osobito stabilizatora nije za potrošače poželjna činjenica. U tom smislu, za poboljšanje fizikalnih i reoloških svojstava proizvoda HPH kao alternativa standardnom tehnološkom procesu pokazala se dobrom opcijom. Razlozi za nepotrebnu modifikaciju mlijeka, koja je gotovo nužna za većinu fermentiranih mlijeka proizvedenih klasičnim postupcima, je u činjenici da se korištenjem HPH ona provodi uz znatno viši tlak (~ 50 - 300 MPa). Prednosti korištenja visokog tlaka u pripremi mlijeka za proizvodnju fermentiranih mlijeka :

- postiže se vrlo fina i stabilna emulzija u kojoj su globule mliječne masti veličine manje od 0,3 - 0,4 µm

- dolazi do disocijacije kazeinskih frakcija iz kazeinske micelle a veličina se kazeinske micelle od početne (~ 220 nm) smanjuje za 45 - 75 %
- postiže se značajna denaturacija β -laktoglobulina
- značajno se smanjuje broj mikroorganizama i dolazi do inaktivacije nativnih enzima čak i u uvjetima homogenizacije na nižim temperaturama (40 - 50 °C)
- dolazi do modifikacije reoloških ili koagulacijskih svojstava mlijeka.

4.3.1.5.

Toplinska obrada mlijeka

Specifičnost fermentiranih mlijeka u odnosu na druge fermentirane mliječne proizvode zahtijeva više temperature toplinske obrade i duže vrijeme zadržavanja mlijeka na tim temperaturama. Temperaturno-vremenske kombinacije toplinske obrade mlijeka u proizvodnji fermentiranih mlijeka nisu propisane već su one uglavnom uvjetovane vrstom i sastavom mlijeka. Tako se za proizvodnju fermentiranih mlijeka s udjelom suhe tvari (ST) 9,5 - 12 % koristi kombinacija viših temperatura toplinske obrade s dužim vremenom zadržavanja mlijeka na tim temperaturama. Suprotno, za fermentirana mlijeka s udjelom suhe tvari ≥ 14 % koriste se niže temperature toplinske obrade uz kraće vrijeme zadržavanja mlijeka na tim temperaturama. Za sam proces toplinske obrade mlijeka uobičajeno se koriste dva sustava:

- HTSH sustav (engl. *High Temperature/Short Holding*) koji uključuje prolazak mlijeka kroz izmjenjivač topline (sekcije pasterizatora) s cijevima dovoljnog kapaciteta da mlijeko zadrži na željenoj temperaturi 90 - 95 °C najmanje 10 - 5 minuta
- LTH sustav (engl. *Low Temperature Holding*) koji uključuje zagrijavanje i zadržavanje mlijeka u procesnom spremniku na temperaturi 80 - 85 °C/30 - 20 min.

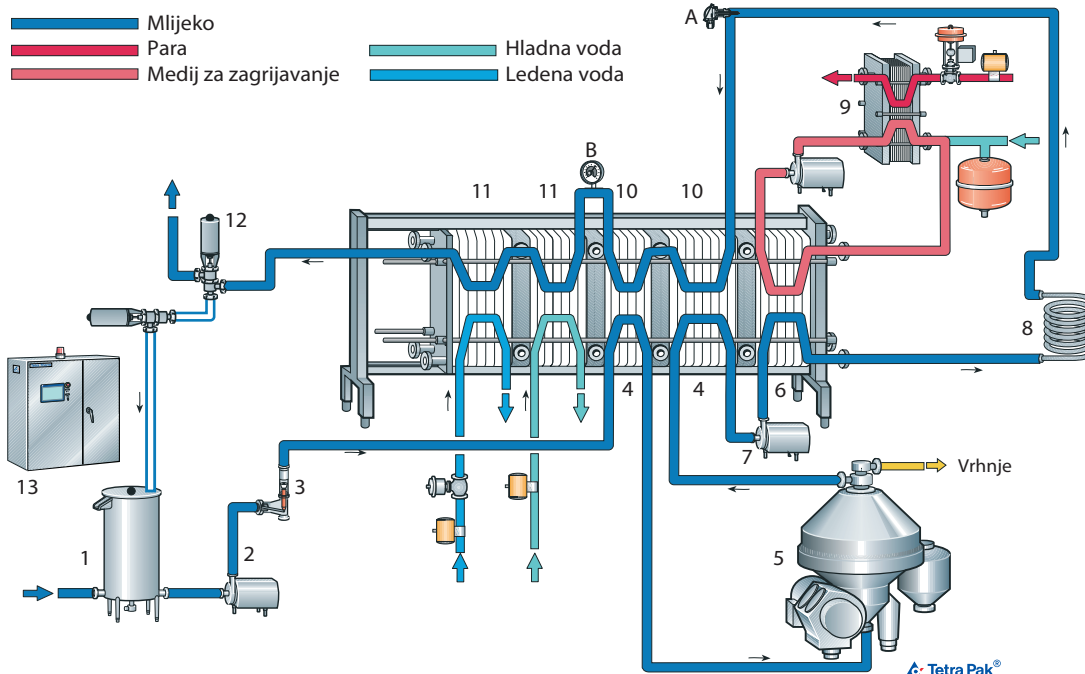
U proizvodnji fermentiranih mlijeka od tih dvaju sustava za toplinsku obradu mlijeka najčešće se koristi HTSH sustav pasterizacije. Pasterizatori ili pločasti

izmjenjivači topline sastoje se od tankih čeličnih ploča povezanih u okvir. Svaki okvir može sadržavati nekoliko setova ili sekcija u kojima se provode tehnološke operacije predzagrijavanja, završnog zagrijavanja i hlađenja mlijeka. Same ploče dizajnirane su na način koji omogućava optimalan prijenos energije. Mlijeko ulazi i izlazi kroz kanal na jednoj strani i zagrijava se ili hladi na suprotnoj strani ploče. Uobičajeno, pasterizatori imaju sekciju regeneracije gdje se koristi toplo ili hladno mlijeko za zagrijavanje ili hlađenje nadolazećeg mlijeka, čime se štede voda i energija. Regeneracijska učinkovitost kod dobro dizajniranih pločastih izmjenjivača topline može biti i do 95 %.

Završno zagrijavanje mlijeka obično se provodi u eksternoj sekciji pasterizatora koja se sastoji od spiralnih ili cik-cak cijevi. Dužina i protok kroz cijevi osiguravaju potrebno vrijeme zadržavanja mlijeka na istoj temperaturi. Kompletna linija za pasterizaciju mlijeka koja se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka shematski je prikazana na slici 4.75.

Korištenjem visokih temperatura toplinske obrade (obično 90 - 95/10 - 5 min ili 80 - 85/30 - 20 min) postižu se potrebni standardi za: (i) zdravstveno-mikrobiološku kvalitetu i (ii) poboljšavaju se preradbena (tehnološka) svojstva mlijeka. Zdravstveno-mikrobiološka kvaliteta mlijeka osigurana je uništavanjem svih vegetativnih stanica patogenih bakterija i velikim dijelom svih drugih bakterija prisutnih u sirovom mlijeku. Istodobno, tehnološka svojstva mlijeka nužna za proces fermentacije ostvarena su kroz sljedeća poboljšanja mlijeka kao medija:

- smanjenjem koncentracije otopljenog kisika, dušika i CO₂ što pogoduje rastu bakterija iz sastava kultura
- povećanjem udjela slobodnih aminokiselina djelomičnom razgradnjom proteina sirutke koje poboljšavaju aktivitet kultura
- snižavanjem oksidoredukcijskog potencijala što pogoduje kinetici rasta bakterija iz sastava kultura
- inaktivacijom prirodnih i bakterijskih enzima što poboljšava uvjete sredine za rast bakterija iz sastava kultura



Slika 4.75.

Shematski prikaz kompletne linije za pasteurizaciju mlijeka.

Detalji: 1 balansni spremnik, 2 protočna crpka, 3 kontrola protoka, 4 sekcija regeneracije - predgrijavanja, 5 centrifugalni klarifikator, 6 sekcija pasteurizacije, 7 protočna crpka, 8 cijevni zadržavač topline, 9 sustav zagrijavanja tople vode parom, 10 sekcija regeneracije - hlađenja, 11 sekcija hlađenja vodom, 12 protočni razdjelni ventil, 13 kontrolna ploča. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)

- redukcijom mikrobne populacije sirovog mlijeka smanjuje se mogućnost kompeticije drugih bakterija s bakterijama mliječne kiseline i bifidobakterijama za isti supstrat
- promjenama strukture nativnih kazeina i proteina sirutke koje posljedično povećavaju viskozitet mlijeka
- snižavanjem pH-vrijednosti što ubrzava formiranje gel-strukture proizvoda
- povećanjem koncentracije organskih kiselina, formiranje laktona, ketona i drugih hlapljivih supstancija koje sudjeluju u formiranju okusa
- redistribucijom Ca, P i Mg unutar njihova koloidnog i topljivog oblika, što je bitno za formiranje novostvorenih proteinskih kompleksa.

U proizvodnji fermentiranih mlijeka može se koristiti i UHT toplinska obrada (engl. *Ultra High Temperature*) sterilizacijom mlijeka na temperaturi 135 - 140 °C/2 - 20 sekundi. U mikrobiološkom smislu sterilizacija mlijeka ima prednost pred drugim sustavima toplinske obrade, budući da se tim toplinskim postupkom uništavaju svi vegetativni oblici prisutnih bakterija kao i većina sporotvornih bakterija. S druge strane fermentirana mlijeka proizvedena od steriliziranog mlijeka imaju slabiju viskoznost i čvrstoću gel-strukture, ali je istodobno predispozicija gel-strukture za sinerezu manja. U određenoj mjeri slabija tekstura proizvoda kao posljedica uzrokovana visokim temperaturama sterilizacije može se poboljšati povećanjem udjela Sbm u ishodišnom mlijeku.

4.3.1.5.1.

Fizikalno-kemijske promjene sastojaka mlijeka

Produženo zagrijavanje mlijeka na visokim temperaturama uzrokuje točno određene poželjne fizikalno-kemijske promjene pojedinih sastojaka mlijeka. Prvenstveno, one su povezane s fizikalno-kemijskim promjenama mliječne masti, proteina i neznatnim promjenama laktoze i mineralnih soli mlijeka. Indirektna posljedica promjena strukture tih sastojaka je za proizvodnju fermentiranih mlijeka poželjno povećanje viskoziteta i pufernog kapaciteta mlijeka. Osim visine temperature toplinske obrade mlijeka, na stupanj fizikalno-kemijskih promjena pojedinačnih sastojaka i njihovog potencijala za međusobnu interakciju u toplinski obrađenom mlijeku i sljedeći čimbenici:

- pH-vrijednost
- koncentracija topljivog kalcija i fosfata
- udjel suhe tvari
- udjel ukupnog proteina
- protein-modificirane komponente
- omjer kazein : proteini sirutke
- udjel laktoze i udjel drugih šećera u mlijeku
- vrsta toplinske obrade (indirektno ili direktno zagrijavanje).

Tako primjerice, niže pH-vrijednosti mlijeka od 6, 7 uvjetuju da se većina agregata proteina sirutke nalazi na površini kazeinskih micela. Kada mlijeko ima idealnu pH- vrijednost od 6,7 većina je agregata proteina sirutke u topljivoj formi prisutna u mliječnom serumu. Vrijednosti pH mlijeka više od 6,7 uzrokuju da je toplinom inducirani protein- κ -kazeinski kompleks poslije podložniji disocijaciji s površine kazeinske micelle. Udjeli topljivih proteinskih kompleksa u toplinski obrađenom mlijeku imaju značajnu praktičnu važnost budući da su usko povezani s agregacijom kazeinskih micela tijekom fermentacije. Ili drugi primjer, indirektno zagrijavanje u usporedbi s direktnim zagrijavanjem mlijeka osigurava veći stupanj denaturacije proteina sirutke i pospješuje njihovo bolje poželjno povezivanje s kazeinskim micelama.

4.3.1.5.1.1.

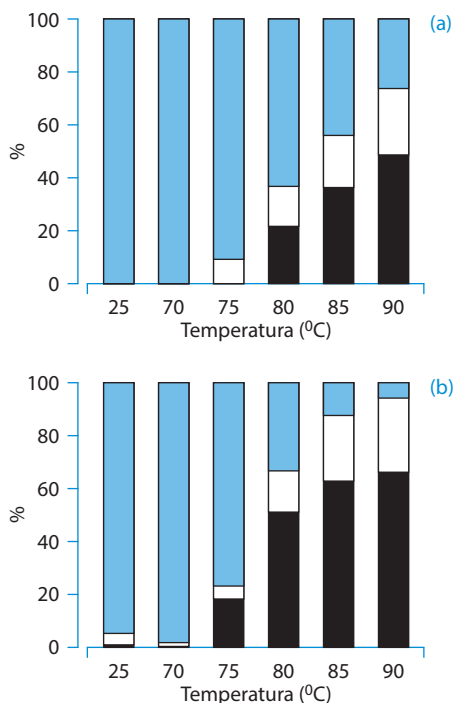
Fizikalno-kemijske promjene mliječne masti

Zagrijavanje mlijeka u temperaturno-vremenskim uvjetima toplinske obrade mlijeka (80 - 85 °C/30 - 20 min; 90 - 95 °C/10 - 5 min) uzrokuje denaturaciju proteina sadržanih u membrani masne globule. Posljedica koje je i aktivacija tiolnih skupina (-SH) u molekuli te započinju tiolno-disulfidne interne reakcije između različitih membranskih proteina i proteina sirutke. Kako se na tim temperaturama istodobno denaturiraju i proteini sirutke [α -laktalbumin (α -La) i β -laktoglobulin (β -Lg)] oba proteina sirutke intermolekularnim disulfidnim vezama (-S-S-) mogu se vezati za površinu masne globule. Ovakav način povezivanja denaturiranih proteina sirutke s proteinima membrane masne globule događa se jedino u slučajevima kada se mlijeko prije toplinske obrade prethodno homogenizira. U mlijeku homogenizirane globule mliječne masti, ponašaju se kao velike kazeinske micelle i participiraju u bilo kojoj reakciji vezanoj za kazein. Suprotno, u slučajevima kada se mlijeko homogenizira nakon toplinske obrade novoformirani proteinski kompleks samo se adsorbira na novonastalu membranu globule mliječne masti bez ulaska u interakcije s proteinima membrane masne globule.

4.3.1.5.1.2.

Fizikalno-kemijske promjene proteina

Temperature toplinske obrade mlijeka koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka u većem ili manjem obimu mijenjaju nativnu strukturu proteina mlijeka. Klasičan LHT sustav toplinske obrade mlijeka uzrokuje denaturaciju proteina sirutke veću od 80 %, a HTSH do 95 %. Odnosno, nakon toplinske obrade mlijeka na temperaturi od 90 °C, od ukupnih proteina sirutke denaturira se više od 95 % β -laktoglobulina (β -Lg) i oko 80 % α -laktalbumin (α -La). Od toga se postotka približno 65 % denaturiranog β -Lg i 50 % α -La veže na kazeinsku micelu. Istodobno u serumu mlijeka ostaje približno 25 % denaturiranih proteina



Slika 4.76.

Postotak denaturacije α -laktalbumina i β -laktoglobulina ovisno o temperaturi zagrijavanja mlijeka.

Detalji: (a) α -laktalbumin, (b) β -laktoglobulin, % topljivih agregata proteina sirutke (bijeli stupci) i % udjeli povezanih denaturiranih proteina sirutke s kazeinskim micelama (crni stupci) nakon 10 minuta zagrijavanja mlijeka na temperaturama 70 - 90 °C. Za usporedbu prvi plavi stupac na slici (a) i (b) predstavlja sirovo mlijeko čija je temperatura 25 °C. (Vasbinder i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

sirotke u formi topljivih agregata, gdje oni mogu formirati nakupine s drugim proteinima sirotke ili s κ -kazeinom seruma (slika 4.76.). U kontekstu osjetljivosti proteina sirotke na zagrijavanje mlijeka redosljed je sljedeći: < imunoglobulini > serum albumin > β -laktoglobulin > α -laktalbumin.

Denaturacija globularnih proteina sirotke događa se zbog povećanja kinetičke energije koja uzrokuje vibracije molekula, a posljedica kojih je kidanje

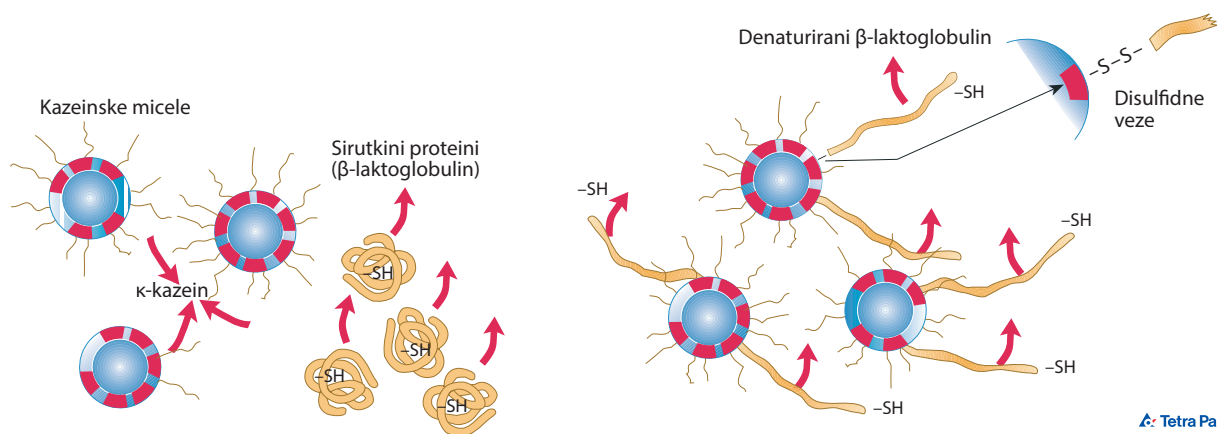
vodikovih veza i nepolarnih hidrofobnih interakcija između molekula a reakcije su ireverzibilne prirode. Rezultat je tih promjena na razini molekula stvorena mogućnost povezivanja denaturiranog β -Lg i α -La za κ -kazein (κ -CN) u proteinski kompleks. Novostvoreni proteinski kompleks tijekom fermentacije poboljšava svojstva konzistencije čvrstih ili viskoznosti tekućih varijanti fermentiranih mlijeka. Denaturirani proteini sirotke omogućavaju početak oblikovanja gel-strukture na višoj pH-vrijednosti (5,3) u odnosu na toplinski netretirano mlijeko (pH-5,0). Posljedica početka oblikovanja gel-strukture na višoj pH-vrijednosti je skraćivanje vremena potrebnog za njezin završetak. Osim toga, međusobno povezivanje proteinskih komponenti u mrežu (matriks) poboljšano je a posljedično tome raste i kapacitet gel-strukture za zadržavanje vode. Većim kapacitetom zadržavanja vode postižu se glatka konzistencija gel-strukture, dobra viskoznost i stabilnost proizvoda na izdvajanje sirotke.

Proteini sirotke počinju se denaturirati već na temperaturi od ~ 65 °C tako da dolazi do postupnog odmotavanja njihove globularne strukture. Strana polipeptidnog lanca, koja je inače skrivena u globularnoj strukturi molekule, postaje otvorena i može ulaziti u interakcije s drugim proteinskim molekulama. Tako denaturirani proteini sirotke ulaze u reakcije povezivanja: (i) s kazeinskim micelama preko disulfidnih veza (-S-S-), (ii) međusobnim agregiranjem preko tiol-disulfidnih veza (-SH) hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama (slika 4.77.).

Nakon toplinske obrade mlijeka, prema opće prihvaćenim predloženim modelima tri su moguća načina povezivanja denaturiranih proteina sirotke s micelama kazeina:

- asocijacijom monomernog β -laktoglobulina
- asocijacijom agregiranog β -laktoglobulina
- asocijacijom agregata β -laktoglobulina / α -laktalbumina.

Kompleksi između κ -kazeina i proteina sirotke formiraju se tako da se na jednu molekulu κ -kazeina vežu tri molekule proteina sirotke. Nastale agregacije β -Lg mogu izlaziti s površine novonastalih kazeinskih micela i osigurati steričke efekte za daljnje



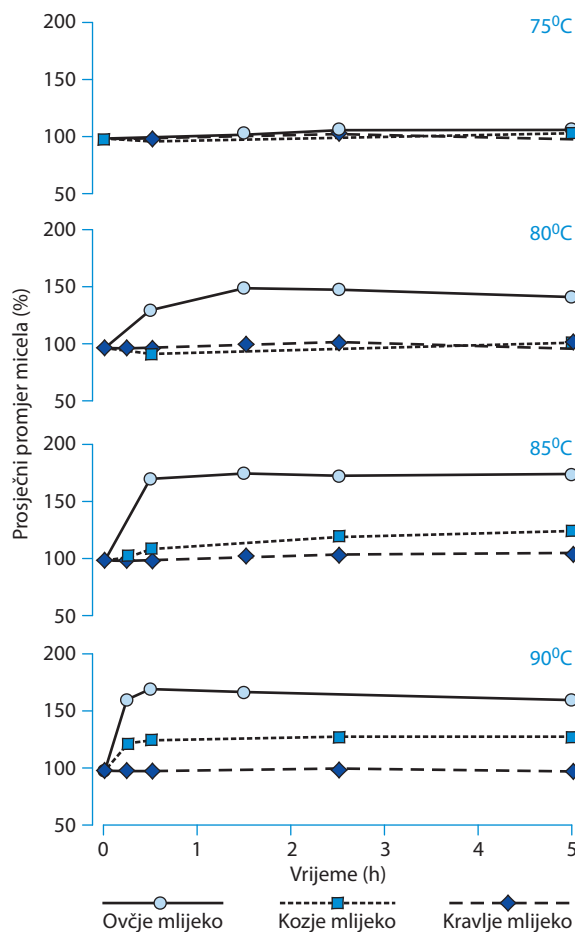
Slika 4.77.

Shematski prikaz povezivanja denaturiranih proteina sirutke s micelama kazeina. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

povezivanje denaturiranih molekula β -Lg. Povezane proteinske molekule imaju reaktivne sulfhidrilne skupine (-SH) smještene prema unutrašnjosti agregacija i više se disulfidnim vezama ne mogu spajati s micelnim κ -CN. Nasuprot tome molekule razmotanog monomernog β -Lg mogu lagano proći kroz kosi sličnoj strukturi κ -kazeina i povezati se sa SH skupinama proteina. Novonastali proteinski kompleksi imaju ulogu sprječavanja prekomjernog povezivanja denaturiranih proteina sirutke s kazeinskim molekulama ili njihova daljnega međusobnog povezivanja. Smatra se da i proteini kazeina α_{s2} -CN ili β -CN koji ne mogu formirati disulfidne veze ipak ulaze u interakciju s denaturiranim proteinima sirutke, kojih je također uloga inhibicija prekomjernih agregacija proteina sirutke ili drugih globularnih proteina. Produljeno vrijeme zagrijavanja mlijeka na nižim temperaturama ili njegovo sporo zagrijavanje na višim temperaturama pozitivno utječe na formiranje monomernog β -Lg. Na visokim temperaturama zagrijavanja mlijeka u kratkom vremenu svi se proteini sirutke počnu razmatati, što omogućava samoagregaciju monomernog β -laktoglobulina i manju efikasnost njegove asocijacije s kazeinskim micelama.

Kinetika denaturacije proteina sirutke i specifične reakcije koje se događaju zagrijavanjem mlijeka kemijski su prilično kompleksni procesi, a velikim su dijelom određeni i vrstom mlijeka koje se toplinski obrađuje. Tako je stupanj denaturacije proteina sirutke ovčjeg mlijeka na temperaturama 80 - 85 °C/5 min u odnosu na kravlje i kozje manji. Suprotno, na temperaturi od 90 °C/5 min stupanj denaturacije proteina sirutke ovčjeg mlijeka u odnosu na kravlje i kozje mlijeko je veći (slika 4.78.).

Razlika u kinetici denaturacije proteina sirutke, inducirane visokim temperaturama, ovisno o vrsti mlijeka može se objasniti omjerom između udjela β -Lg i α -La u kazeinskoj miceli. U kravljem je mlijeku omjer između udjela β -Lg i α -La u kazeinskoj miceli 3,5 : 1, u ovčjem 5,7 : 1, a u kozjem mlijeku je 2,5 : 1. Kinetika denaturacije proteina sirutke ovčjega i kozjeg mlijeka na jednakim temperaturama toplinske obrade je brža u odnosu na kravlje mlijeko. Uzrok brže denaturacije tih proteina sirutke je u činjenici da ovčje i kozje mlijeko u kazeinskoj miceli količinski sadrže više β -Lg i α -La. Također, β -Lg ovčjeg mlijeka manje je otporan na denaturaciju toplinom od β -Lg kravljega



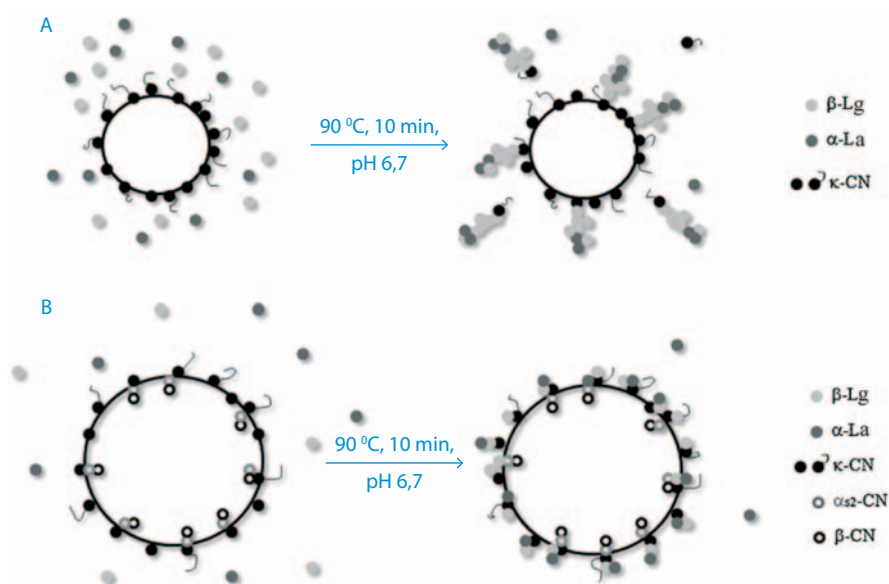
Slika 4.78.

Stupanj denaturacije proteina sirutke kravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka nakon toplinske obrade mlijeka na različitim temperaturama. (Raynal i Remeuf, 1998., s dopuštenjem Elseviera.)

i kozjeg mlijeka. Pretpostavljeni model načina interakcija između micela kazeina i denaturiranih proteina sirutke između kravljega i kozjeg mlijeka nakon toplinske obrade na temperaturi 90 °C/10 min prikazan je na slici 4.79.

Prema predloženom modelu (slika 4.79.), jasno je vidljiva razlika u načinu interakcije između micela kazeina i denaturiranih proteina sirutke između kravljega i kozjeg mlijeka. U kravljem je mlijeku nakon toplinske obrade (90 °C/10 min) β -Lg gotovo u potpunosti denaturiran, a α -La oko 70 %. Oba denaturirana proteina sirutke u kravljem mlijeku formiraju proteini sirutke - κ -kazein kompleks najvećim dijelom na površini kazeinske micelle u formi velikih agregata. U toj reakciji povezivanja proteina sirutke s kazeinskom micelom u proteinski kompleks je uključeno samo oko 30 % κ -kazeina. Najvjerojatniji je razlog relativno niskog udjela κ -CN u novostvorenom proteinskom kompleksu posljedica prisutnosti hidrofilnih fosfatnih i karbonatnih struktura u sloju "kose" κ -CN. Čini se da te hidrofilne regije κ -CN cistein reziduama smanjuju njihovu veću mogućnost povezivanja s denaturiranim proteinima. U kozjem je mlijeku nakon toplinske obrade (90 °C/10 min) više od 95 % ukupnih proteina sirutke denaturirano i u visokom se postotku vežu za κ -CN, ali i za druga dva kazeina. Posljedično, te reakcije uvjetuju njihovu ravnomjernu distribuciju na površinu kazeinske micelle. Reakcije denaturiranih proteina sirutke s β -CN vjerojatno su hidrofobne, budući da taj kazein nema cistin rezidue, dok su one s α_{s2} -CN vjerojatno kovalentne i hidrofobne prirode. Prisutnost svih triju kazeina u novostvorenom proteinskom kompleksu omogućava bolju povezanost između kazeinskih micela i novostvorenoga micelarnoga proteinskog kompleksa. U kozjem mlijeku nakon takvog međusobnog povezivanja proteina više nema topljivih proteinskih kompleksa. Utvrđene razlike u denaturaciji proteina sirutke i formiranju proteinskog kompleksa između kravljega i kozjeg mlijeka osobito su važne za tehnološko-funkcionalna svojstva tih vrsta mlijeka.

Usprkos činjenici relativno dobrog poznavanja načina denaturacije proteina sirutke toplinom, još se uvijek ne zna mogu li se one opisati kinetikom prvog, između prvoga i drugoga, ili drugog reda. Zbog toga je dogovorno prihvaćeno da se reakcija denaturacije proteina sirutke predstavlja nelinearnim Arrheniusovim dijagramom. Očekivana je energija aktivacije početka



Slika 4.79.

Shematski prikaz interakcija između micela kazeina i denaturiranih proteina sirutke u kravljem i kozjem mlijeku nakon toplinske obrade mlijeka

Detalji: (A) kravlje mlijeko, (B) kozje mlijeko. Kravlje i kozje mlijeko (pH- 6,71) toplinski je obrađeno na temperaturi od 90 °C/10 min (Pescic i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)

denaturacije na temperaturama nižim od 90 °C 260 - 280 kJ/mol za β -laktoglobulin i 270 - 280 kJ/mol za α -laktalbumin. Na temperaturama višim od 90 °C energija aktivacije početka denaturacije je niža, odnosno, ona je za β -laktoglobulin 54 - 60 kJ/mol, a za α -laktalbumin 55 - 70 kJ/mol.

U praksi, za utvrđivanje stupnja denaturacije proteina sirutke uzrokovane toplinskom obradom mlijeka koriste se različite metode. Neke od njih temelje se na mjerenjima gubitka topljivosti na pH-4,6, reaktivnosti tiolnih skupina, elektroforetskog profila, ili antigen-ske aktivnosti mlijeka. Također, kontrolom temperaturno-vremenskih uvjeta toplinske obrade mlijeka, udjela proteina i pH-vrijednosti mlijeka značajnije se može utjecati na: (i) stupanj denaturacije proteina sirutke, (ii) njihovo međusobno povezivanje i (iii) njihove interakcije s kazeinom. Posljedično tome tehnološko-funkcionalna svojstva denaturiranih proteina sirutke u proizvodnji fermentiranih mlijeka mogu se znatno poboljšati.

Kazeinske micelle, u usporedbi s proteinima sirutke, prilično su stabilne na zagrijavanje mlijeka na

temperature 80 - 85 °C/30 - 20 min ili 90 - 95 °C/10 - 5 min. Ipak, neovisno o termostabilnoj prirodi kazeina visoka temperatura uzrokuje: (i) reorganizaciju kazeinskih proteina unutar micelarne strukture (ii) promjenu njihovog zeta-potencijala i (iii) povećanje veličine i hidratacijskog kapaciteta micelle. Unutarnja reorganizacija kazeinskih proteina događa se preko niza povezanih reakcija agregacije i disocijacije njegovih molekula. Na početku tih reakcija, ovisno o raspoloživoj koncentraciji ionskog kalcija u mlijeku, micelle kazeina u određenom se omjeru međusobno povezuju. Daljnjim zagrijavanjem mlijeka dolazi do razdvajanja kazeinskih micela i odvajanja i otapanja κ -kazeina. Zbog tih reakcija nastaje veći broj manjih proteinskih čestica koje se počinju međusobno povezivati. Istodobno, zbog temperaturom izazvane promjene globularne strukture proteina sirutke dolazi do razmatanja njihovih molekula, najviše β -Lg i povezivanja s κ -kazeinom. Također, te reakcije su uzrok precipitacije fosfata pa se unutar proteinskih molekula stvaraju nestabilna hidrofobna područja koja disociranim micelama omogućavaju da se približe, agregiraju i veličinom povećaju. Tako se veličina kazeinske micelle

u kozjem mlijeku poveća ~ 25 %, a u ovčjem ~ 75 %. Objašnjenje većeg povećanja veličine kazeinskih micela u ovčjem u odnosu na kozje mlijeko je u činjenici da te micelle sadrže više minerala, udjel β -kazeina je viši, a stupanj hidratiziranosti micelle manji.

4.3.1.5.1.3.

Fizikalno-kemijske promjene laktoze

U proizvodnji fermentiranih mlijeka vremensko-temperaturni uvjeti toplinske obrade mlijeka nemaju značajniji utjecaj na promjenu strukture molekule laktoze. Događa se jedino zanemariva reakcija izomerizacije jednog dijela molekula laktoze prisutne u mlijeku. Drugim riječima, laktoza u zanemarivom postotku izomerizacijom može prijeći u laktulozu ili epilaktozu. Laktuloza nastaje izomerizacijom glukoze u fruktozu, a epilaktoza izomerizacijom glukoze u manozu. U toplinski obrađenom mlijeku laktuloza je prisutna u koncentraciji od svega 0,2 %, a epilaktoza tek u tragovima. Laktuloza je za humani organizam nerazgradljivi sastojak mlijeka te joj se pripisuje prebiotički učinak. Također, u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka laktuloza ima funkciju faktora rasta za probiotičke bakterijske sojeve.

4.3.1.5.1.4.

Fizikalno-kemijske promjene mineralnih soli

Mineralne soli u sirovom mlijeku egzistiraju u određenoj ravnoteži između topljive i koloidne faze mlijeka. Vremensko-temperaturni uvjeti toplinske obrade mlijeka (80 - 85 °C/30 - 20 min ili 90 - 95 °C /10 - 5 min) uzrok su njihove drukčije raspodjele u toplinski obrađenom mlijeku. Visoke temperature toplinske obrada mlijeka induciraju prijelaz kalcija i fosfata iz topljive u koloidnu formu. Naknadno hlađenjem mlijeka neke od prirodnih soli ili toplinom precipitirani kalcijev fosfat mogu ponovno prijeći u svoj topljivi oblik, osobito ako je temperatura zagrijavanja mlijeka bila niža od 85 °C. Međutim, nakon zagrijavanja mlijeka na višim temperaturama precipitacija određenih vrsta soli ireverzibilna je reakcija.

4.3.2.

Fermentacija mlijeka

Fermentacija mlijeka je biološki proces gdje se biokemijskim i fizikalno-kemijskim reakcijama oblikuje gel-struktura proizvoda sa željenim svojstvima mirisa, okusa/arome i teksture koji su karakteristični za svaku pojedinačnu vrstu fermentiranog mlijeka. Za tu se svrhu koriste specijalno dizajnirani inkubatori ili fermentacijski spremnici. U praksi se zbog toga proces fermentacije vrlo često naziva i inkubacijom.

4.3.2.1.

Tehnološko-tehnički uvjeti

Fermentacija mlijeka započinje inokulacijom toplinski obrađenog i na temperaturu inkubacije ohlađenog mlijeka mikrobnom kulturom. Ovisno o vrsti fermentiranog mlijeka, temperatura inokulacije je između 20 °C i 46 °C. U praksi je iz praktičnih razloga poželjno da temperatura mlijeka prije inokulacije bude 1 - 2 °C viša od zadane željene temperature inkubacije.

Način inokulacije kulture u mlijeko određen je njezinim fizičkim statusom (tekuća, koncentrirana - zamrznuta, liofilizirana, itd.). Tekuća kultura se prije inokulacije u pripremljeno mlijeko mora kroz nekoliko precjepeljivanja najprije pripremiti kao tehnička kultura. Potom se pumpama u količini 1 - 3 % prebacuje u pripremljeno mlijeko. Za inokulaciju kultura u mlijeko ostalih njenih fizičkih oblika na tržištu postoje različito dizajnirani sustavi koji osiguravaju potpuno aseptičku inokulaciju kulture u mlijeko. Nakon inokulacije kulture, u mlijeku započinju postupni procesi fermentacije određeni dvjema fazama. Prva faza fermentacije ili predfermentacija je acidifikacijski proces bez vidljivih strukturnih promjena mlijeka, a pH-vrijednost mlijeka se snižava na 5,2 - 5,0. Postupno se progresivnim snižavanjem pH-vrijednosti mlijeka na < 5 počinje formirati gel-struktura određenog

fermentiranog mlijeka. Oblikovanje gel-strukture fermentiranog mlijeka završava u izoelektričkoj točki kazeina (pH-4,6), a gel-struktura postiže svoju najveću čvrstoću. Nakon toga formirana gel-struktura uzrok je povećanja njegove viskoznosti, čija se vrijednost može procijeniti objektivnim mjerenjima. Proces oblikovanja gel-strukture i povećanje njegove viskoznosti čini drugu fazu fermentacije koja se naziva pravom ili glavnom fermentacijom.

Fermentacija ovisno o vrsti fermentiranog mlijeka traje od ~ 2,5 do ~ 25 sati. Istodobno, uobičajene su temperature inkubacije za sva fermentirana mlijeka između 20 i 30 °C ako se koristi mezofilna kultura, ili su one između 37 i 46 °C ako se koristi termofilna kultura. U tom je kontekstu vrijeme trajanja fermentacije za neke od najpoznatijih vrsta fermentiranih mlijeka sljedeće:

- klasičan čvrsti jogurt 2,5 - 3 sata/42 - 45 °C
- slabije kiseli jogurt 6 - 9 sati/< 40 °C
- kefir ~ 20 sati/23 °C i nekoliko sati na temperaturi nižoj od 7 °C
- acidofil 18 - 24 sata/37 °C
- AB kulturu 7 - 8 sati/37 - 39 °C
- kiselo mlijeko 10-18 sati/30-22-24 °C.

U proizvodnoj liniji fermentacija ili inkubacija može biti organizirana na sljedeće načine:

- u prodajnoj ambalaži za čvrsta fermentirana mlijeka
- u fermentacijskim spremnicima za tekuća i pitka fermentirana mlijeka
- polukontinuiranom fermentacijom za čvrsta, tekuća i pitka fermentirana mlijeka
- kontinuiranom fermentacijom za uglavnom tekuća i pitka fermentirana mlijeka.

Fermentacija u prodajnoj ambalaži se provodi tako da se inokulirano mlijeko puni u ambalažu i smješta u komore gdje se u kontroliranim uvjetima odvija proces fermentacije. Na fizikalna svojstva gel-strukture (čvrstoću i viskoznost) fermentacija u prodajnoj ambalaži ima iznimno povoljan utjecaj. Fermentacija u prodajnoj ambalaži istodobno objedinjuje procese predfermentacije i prave fermentacije. Negativna je

strana tako organiziranog načina fermentacije mlijeka u visokom potrošku energije za zagrijavanje i hlađenje komora. Punjenje komora obično je ručno, što se također smatra negativnom stranom takvog načina organiziranja fermentacije.

Fermentacija u fermentacijskim spremnicima znači da se kompletan proces fermentacije mlijeka odvija u fermentacijskim spremnicima. Nakon završetka fermentacije čvrsto formirana gel-struktura miješanjem se razbija i hladi (primjerice za jogurt na temperaturu od 30 °C) u sekciji pločastog pasterizatora te se puni u prodajnu ambalažu. Nakon punjenja gel-struktura fermentiranog mlijeka se ponovno učvršćuje ali se viskoznost u odnosu na njenu vrijednost prije miješanja snižava.

Polukontinuirana fermentacija znači da se proces fermentacije sastoji od dviju faza - predfermentacije i fermentacije od kojih je faza predfermentacije kontinuirani proces. Kontinuiranost procesa predfermentacije osigurava se tako da se predfermentirano mlijeko (koje je još uvijek tekuće) zamjenjuje uvijek novim neinokuliranim mlijekom zagrijanim na temperaturu inkubacije, te se ono inokulira kulturom. Istovremeno fermentacijsko mlijeko kome je završila faza predfermentacije prebacuje se u drugi spremnik ili se puni u ambalažu gdje započinje i završava druga faza fermentacije.

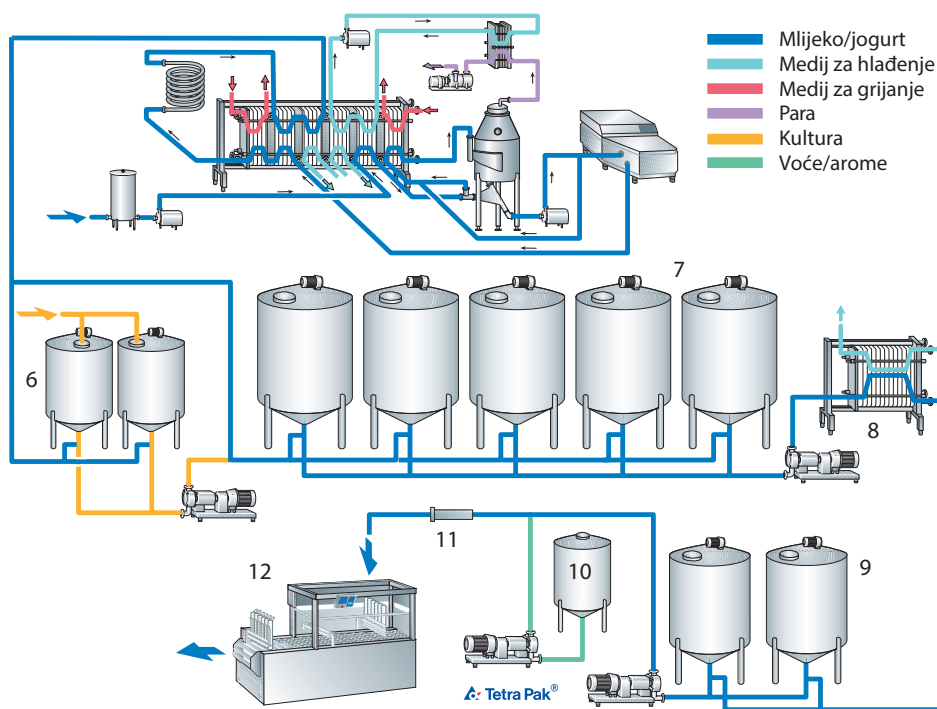
Predfermentacija mlijeka se provodi na optimalnim temperaturama rasta i razmnožavanja određenih mikrobnih vrsta u sastavu kulture a definirana je pH-vrijednostima mlijeka 5,4 - 5,7. Zbog tih fermentacijskih uvjeta faza predfermentacije mlijeka osigurava dobar rast bakterija iz sastava kulture. Slijedi druga faza ili faza stvarne ili prave fermentacije, u kojoj se stvara dovoljna koncentracija mliječne kiseline koja koagulira mlijeko. U spremniku se pH-vrijednost fermentacijskog mlijeka održava konstantnom. Kontinuirana predfermentacija koristi se za proizvodnju čvrstih, tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka. U proizvodnji čvrstih varijanti kontinuirana predfermentacija odvija se u spremnicima, a prava fermentacija u prodajnoj ambalaži obično na višim temperaturama fermentacije. Suprotno, za tekuće i pitke varijante fermentiranih

mlijeka nakon predfermentacije u istim se fermentacijskim spremnicima nastavlja faza fermentacije, ali obično na nižim temperaturama. Niže temperature fermentacije za tekuće i pitke varijante fermentiranih mlijeka poželjne su zbog postizanja glatke teksture proizvoda, budući da na kraju fermentacijske faze slijedi miješanje čvrsto formirane gel-strukture. Potreban kapacitet za kontinuiranu predfermentaciju mlijeka može se odrediti definiranjem parametara poput kiselosti (pH), temperature i veličine spremnika.

Sustav polukontinuirane fermentacije nije prikladan ako se u proizvodnji fermentiranih mlijeka koristi mješovita mezofilna kultura. Mješovite kulture u svom sustavu u većini slučajeva sadrže "brze" bakterijske sojeve tvorce mliječne kiseline i "spore" bakterijske sojeve tvorce aromatskih komponenti. Zbog toga mješovita mezofilna kultura može ostati stabilnom jedino u uvjetima ako je za svaku bakterijsku

vrstu osiguran neovisan rast. Polukontinuirani sustav fermentacije kojim te uvjete nije moguće osigurati postaje uzrok odstupanja od željnog omjera bakterijskih vrsta u sastavu kulture i posljedično tome slabije ukupne kvalitete proizvoda.

Kontinuirana fermentacija podrazumijeva potpuno automatizirani proces koji zahtijeva specijalno dizajnirane fermentacijske spremnike u kojima se gel-struktura formira na principu protočne tehnologije. Ovaj način organiziranja fermentacije mlijeka pogodan je za proizvodnju tekućih i pitkih fermentiranih mlijeka u mljekarama velikog preradbenog kapaciteta. Za ilustraciju tehničko-tehnoloških uvjeta kontinuirane fermentacije, na slici 4.80. prikazana je kompletna linija za proizvodnju tekućega voćnog jogurta. Iz navedenog primjera jasno se vidi tehničko rješenje za inokulaciju kulture i kontinuiranu fermentaciju.



Slika 4.80.

Shematski prikaz tehničko-tehnoloških uvjeta kontinuirane fermentacije u proizvodnji tekućega voćnog jogurta.

Detalji: 6 spremnici za kulturu, 7 spremnici za fermentaciju, 8 pločasto hladilo, 9 puferski spremnik, 10 spremnik za voće/arome, 11 miješalica, 12 pakiranje. Gornji dio slike prikazuje liniju za predtretiranje mlijeka (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Pak.)

4.3.2.2.

Oblikovanje gel-strukture

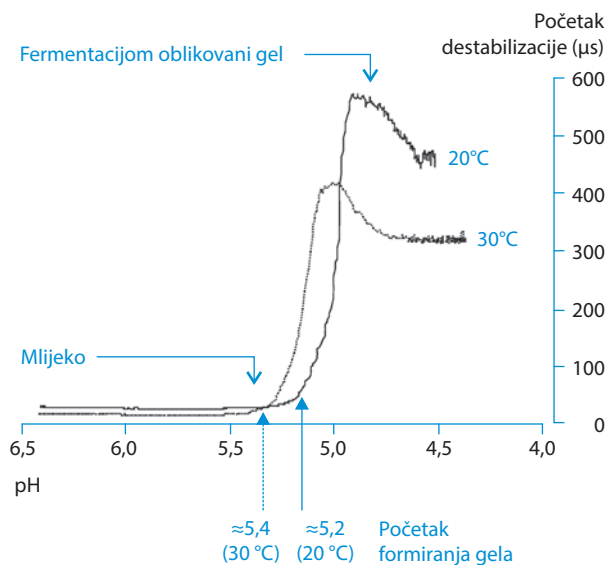
Oblikovanje gel-strukture fermentiranog mlijeka znači da se unutar druge faze fermentacije (prave ili glavne fermentacije) stvara željena tekstura proizvoda biokemijskim i fizikalno-kemijskim reakcijama. Posljedično učinku tih reakcija, nakon završetka fermentacije fizikalna struktura fermentiranog mlijeka postaje vidljivom. Istodobno, nizom biokemijskih reakcija formiraju se spojevi mirisa, okusa i arome koji su karakteristični za svaku pojedinačnu vrstu fermentiranog mlijeka.

4.3.2.2.1.

Fizikalno-kemijski i biokemijski procesi

Formiranje gel-strukture fermentiranog mlijeka koje je određeno fizikalno-kemijskim i biokemijskim reakcijama započinje odmah nakon inokulacije kulture u mlijeko. Prva reakcija kojom započinje postupno oblikovanje gel-strukture je biokemijska razgradnja laktoze u mliječnu kiselinu. Stvaranje mliječne kiseline razgradnjom laktoze događa se unutar bakterijske stanice djelovanjem enzima β -galaktozidaze, gdje se ona razgrađuje na glukozu i galaktozu. Posljedično osobinama bakterijskih sojeva iz kulture konverzija laktoze u mliječnu kiselinu može daljnjim biokemijskim reakcijama teći samo razgradnjom glukoze ili istodobnom razgradnjom glukoze i galaktoze. Fermentacijom mlijeka nastaje između 0,7 i 1,5 % mliječne kiseline koja je ključna za acidifikaciju mlijeka i dužinu trajanja fermentacije. U ovom kontekstu treba istaknuti da je vrijeme trajanja fermentacije usko povezano i sa sljedećim proizvodnim čimbenicima:

- vrstom mlijeka
- vrstom i načinom obogaćivanja mlijeka
- omjerom kazein : proteini sirutke
- vrstom, sastavom i karakteristikama kulture
- temperaturom inkubacije
- vrstom fermentiranog mlijeka.



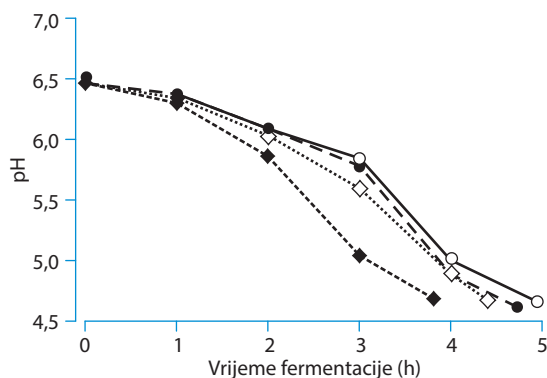
Slika 4.81.

Tijek fermentacije i početak oblikovanja gel-strukture fermentiranog mlijeka na temperaturi inkubacije od 20 i 30 °C korištenjem mezofilne kulture.

Detalji: mezofilna kultura sastavljena od sojeva bakterije *L. lactis* subsp. *cremoris* koji imaju sposobnost tvorbe EPS. Nakon inokulacije, povećanje agregacije kazeina mjereno je metodom difuzne valne spektrometrije i izraženo kroz vrijeme početka destabilizacije kazeina (μ s) kao funkcije pH-vrijednosti. (Ruas - Mediedo i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

Za ilustraciju, na slikama 4.81., 4.82. i 4.83. prikazane su karakteristične krivulje acidifikacije mlijeka kao funkcije: (i) vrste kulture i temperature inkubacije, (ii) vrste proizvoda, vrste kulture i omjera kazein : proteini sirutke u mlijeku i (iii) vrste kulture i vrste mlijeka.

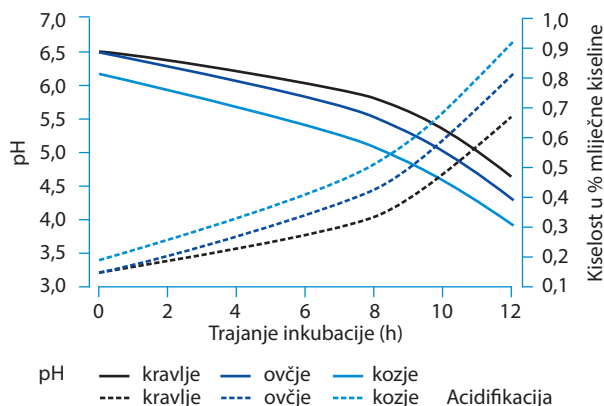
Biokemijskim reakcijama stvorena mliječna kiselina inducira snižavanje pH-vrijednosti mlijeka, a uzročno-posljedično dolazi do fizikalno-kemijskih reakcija koje uzrokuju destabilizaciju kazeinskih micela. Prirodno negativan površinski naboj kazeinskih micela u nativnom mlijeku (~ pH-6,7) postupno se acidifikacijom reducira do neutralnog u izoelektričnoj točki kazeina



Slika 4.82.

Dužina trajanja i promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije mlijeka u proizvodnji jogurta proizvedenog od mlijeka s različitim omjerom kazein : proteini sirutke.

Detalji: (○) omjer kazein : proteini sirutke 4 : 1, (●) omjer kazein : proteini sirutke 3 : 1, (◊) kazein : proteini sirutke 2 : 1 (◆) kazein : proteini sirutke 1 : 1. Temperatura inkubacije 42 °C/klasična termofilna jogurtna kultura (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 4.83.

Promjene pH-vrijednosti i stvorene koncentracije mliječne kiseline (%) tijekom 12 sati fermentacije probiotičkog fermentiranog mlijeka proizvedenog od kopravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka.

Detalji: temperatura inkubacije 37 °C/monokultura *L. acidophilus*. (Drakoularakou i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

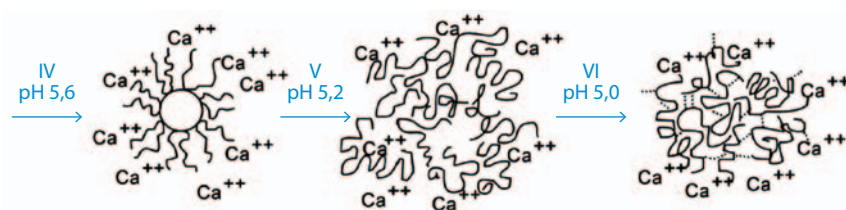
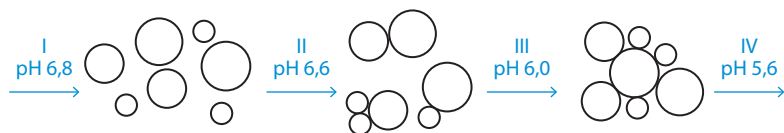
(pH-4,6). Promjena naboja omogućava fizičko nakupljanje micela kazeina i njihovo kemijsko povezivanje hidrofobnim i elektrostatskim vezama (slika 4.84.).

Za kemijsko povezivanje kazeinskih micela fermentacijom mlijeka ključnu ulogu ima netopljivi ili koloidni kalcijev fosfat (KCP). U nativnom mlijeku KCP sadržan u strukturi kazeinske micelle osigurava njezinu stabilnost neutralizacijom kemijske veze između negativno nabijenih fosfoserinskih ostataka κ -kazeina. Shematski prikaz organizacijske strukture pojedinačnih kazeina, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN i κ -CN povezanih s KCP unutar nativne kazeinske micelle prikazuje slika 4.85.

Acidifikacijom mlijeka (pH \leq 6) koloidni kalcijev fosfat (KCP) postupno prelazi u topljivi micelarni kalcijev fosfat. Brzina i omjer topljivosti KCP sadržanog u kazeinskoj miceli uvjetovani su koncentracijom stvorene mliječne kiseline u mlijeku. Početna destabilizacija kazeinskih micela nastaje kada stvorena

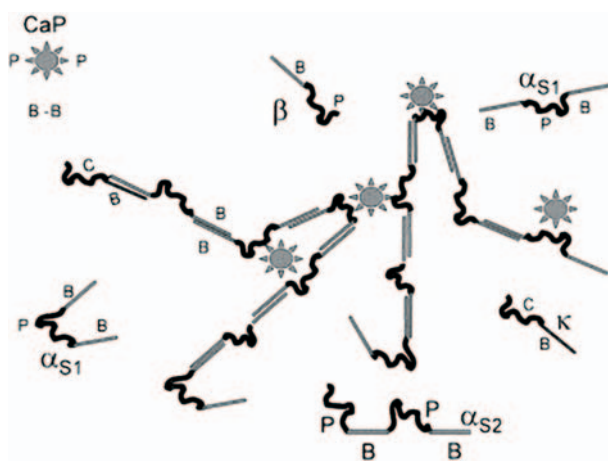
mliječna kiselina snizi početnu pH vrijednost toplinski obrađenog mlijeka (~ 6,7) na pH vrijednost 5,2 - 5,3. Nakon početne destabilizacije kazeinskih micela započinje njihova precipitacija. Kompletna precipitacija novostvorene proteinske strukture završava u izoelektričnoj točki kazeina (pH - 4,6), a KCP više nije vezan na kazein. Oslobođeni kalcij uglavnom se veže za mliječnu kiselinu i nastaje Ca-laktat.

U prvoj fazi fermentacije (pH - 6,6 - 5,3) prosječna veličina kazeinskih micela u fermentacijskom mlijeku se ne mijenja i veličinom je ista onoj u ishodišnom mlijeku. Povećanjem kislosti mlijeka (pH - 5,3 - 4,6 ili niže) veličina kazeinskih čestica, zbog fizikalno-kemijskih reakcija destabilizacije i nakupljanja (agregacije), u drugoj se fazi fermentacije povećava. Proces agregiranja u kojem se veličina kazeinskih čestica povećava ima direktan učinak na čvrstoću i permeabilnost teksture finalnog proizvoda. Slika 4.86. pokazuje četiri



Slika 4.84.

Shematski prikazan način oblikovanja gel-strukture fermentiranog mlijeka induciranog mliječnom kiselinom. (S dopuštanjem U. Kulozik, 2007.)

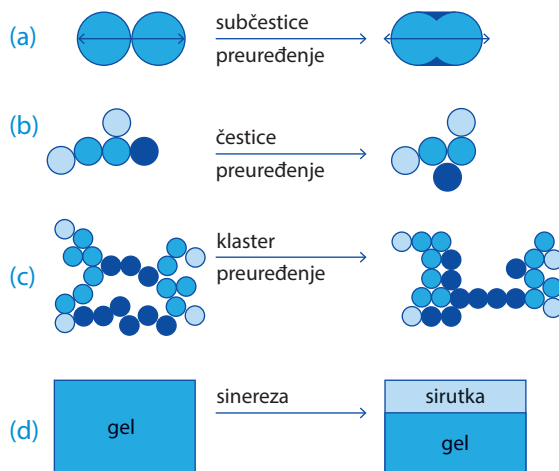


Slika 4.85.

Shematski prikaz unutarnje organizacije kazeinske micelle. Detalji: (B) hidrofobne regije α_{S1} , α_{S2} , β i κ -kazeina (P) hidrofilne regije s fosfoserinskim klasterom, (C) hidrofilne regije κ -kazeina. Koloidni kalcijev fosfat (CaP) unutar kazeinskih molekula označen je zvjezdastim krugom. (Horn, 2003., s dopuštanjem Elseviera.)

različite vrste preuređenja strukture kazeinskog gela koje se mogu razlikovati tijekom acidifikacije mlijeka.

Zbog četiriju različitih vrsta preuređenja strukture kazeinskog gela koje se događaju fermentacijom



Slika 4.86.

Shematski prikaz preuređenja strukture kazeinskog gela tijekom fermentacije.

Detalji: (a) na razini molekule ili subčestice što dovodi do njihova međusobnog spajanja, (b) na razini agregiranih čestica što dovodi do njihova preuređivanja unutar čestica, (c) čestice se povezuju hidrofobnim i elektrostatskim vezama, (d) makroskopska struktura gela koja uvjetuje spontanu sinerezu. (Mellema i sur., 2002., s dopuštanjem Elseviera.)

mlijeka, fizikalno-kemijsko formiranje svojstva gel-strukture opisuje se višestupanjskim procesima:

- inicijalnom lag-fazom niske viskoznosti
- fazom brzih promjena viskoziteta koja je ovisna o brzini bakterijskog rasta i početku oblikovanja gel-strukture
- fazom visokokonstantne viskoznosti (gotovo završeno formiranje gel-strukture)
- fazom spontane sinereze.

Drugim riječima, fizikalno-kemijske faze oblikovanja gel-strukture fermentiranog mlijeka odgovorne su za poželjnu ili nepoželjnu teksturu proizvoda nakon završene fermentacije. Naime, formirana gel-struktura predstavlja fizički izgled ili teksturu fermentiranog mlijeka koju određuju njegova reološka svojstva poput mikrostrukture, permeabilnosti i predispozicije za sinerezu. Zajedno ta reološka svojstva opisuju stanje elastičnosti, čvrstoće ili lomljivosti, i kohezijsku povezanost gel-strukture. Odnosno, određuju osobine presudne za ukupnu kvalitetu svake pojedinačne vrste fermentiranog mlijeka. S druge strane, na kinetiku fizikalnog oblikovanja gel-strukture, osim znatnog utjecaja bakterija iz sastava kultura, imaju i drugi čimbenici, od kojih su najvažniji:

- udjel suhe tvari u mlijeku
- udjel proteina u mlijeku
- omjer kazein : proteini sirutke u mlijeku
- udjel i vrsta dodanih ingredijenata
- tehnološki uvjeti homogenizacije
- temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade mlijeka
- koncentracija inokuluma i uvjeti inkubacije
- korištenje mehaničke sile tijekom razbijanja inicijalno formirane gel-strukture (za tekuće i pitke varijante)
- temperature hlađenja proizvoda.

Temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade mlijeka prije fermentacije utječu na kinetiku oblikovanja gel-strukture stupnjem nastalih promjena u strukturi proteina mlijeka. Uobičajeni temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade mlijeka (80 - 85 °C/30 - 20 min ili 90 - 95 °C/10 - 5 min) uzrokuju gotovo potpunu denaturaciju proteina sirutke. Posljedica denaturacije proteina sirutke je formiranje novih proteinskih

kompleksa koje čine proteini sirutke i kazeini. Zbog toga su koagulirani proteini u fermentiranom mlijeku koprecipitat kazeina i denaturiranih proteina sirutke. U tom slučaju fizikalno formiranje gel-strukture (zbog više izoelektrične točke β -laktoglobulina) započinje na višoj pH-vrijednosti ($\sim 5,3$), a KCP unutar kazeinskih micela nije potpuno otopljen. Topljivost KCP unutar kazeinskih micela postupno se nastavlja čak i nakon početno stvorene kazeinske mreže. Istodobno proteoza-peptonska frakcija, neproteinske dušične frakcije (aminokiseline, kreatin, kreatinin, urea i druge otopljene tvari) ostaju nekoagulirane u serumu.

Novonastali proteinski kompleksi (α -La - β -Lg; α -La - β -Lg + κ -CN) uzrok su povećanja veličine kazeinskih micela ("bubrenja proteina") i stvaranja matriksa (mreže) s poboljšanim hidrofilnim svojstvima (veća sposobnost vezanja vode). Denaturirani proteini sirutke vezani disulfidnim vezama (-S-S-) s κ -kazeinom inhibiraju nakupljanje kazeina u mlijeku te nakon fermentacije nastaje povezana ali rastresita trodimenzionalna mreža proteina koja otežava sinerezu (izdvajanje sirutke). Istodobno, povezivanjem denaturiranih proteina sirutke s κ -CN povećava se stabilnost i viskoznost gel-strukture fermentiranog mlijeka.

Suprotno, fizikalno-kemijska svojstva gel-strukture spontano zakiseljenog ili toplinski obrađenog mlijeka standardnom pasterizacijom (72 °C/15 s) potpuno su drukčija. Koagulirani proteini su precipitirani samo kazeina, a proteini sirutke i ostale otopljene komponente mlijeka dio su seruma mlijeka. Zbog toga početak koagulacije mlijeka započinje na nižoj pH-vrijednosti ≤ 5 a KCP je potpuno otopljen. Gubitak KCP slabi stvorenu kazeinsku mrežu a posljedica može biti izdvajanje sirutke na površini gela.

U formiranju fizikalne gel-strukture koncentracija inokuluma i uvjeti inkubacije određuju čvrstoću strukture na temelju svojstva topljivosti KCP. Za objašnjenje značenja koncentracije kulture i uvjeta inkubacije izabrana su dva primjera. Prvi primjer, gel-struktura koji se formira na istoj temperaturi inkubacije uz korištenje niže koncentracije inokuluma (0,5 mL 100 mL⁻¹) ima nježniju strukturu u odnosu na gel-strukturu korištenjem viših koncentracija

inokuluma (4 mL 100 mL⁻¹). Objašnjenje za nježniju gel-strukturu je sporija acidifikacija mlijeka kojom se vjerojatno u ranoj fazi oblikovanja gela osigurava više vremena netopljivom KCP za njegov postupni prelazak u topljivi KCP. Drugi primjer, u proizvodnji jogurta niske temperature inkubacije (38 °C) uvjetuju sporiju acidifikaciju ali je gel čvršći i stabilniji u odnosu na previsoku temperaturu inkubacije (45 °C). Bolja svojstva gela pripisuju se većoj sposobnosti "bubrenja" molekula proteina na nižim temperaturama inkubacije i zbog toga jačoj interakciji između kazeinskih čestica.

Sukladno korištenim tehnološko-tehničkim procesima prije fermentacije koji u većoj ili manjoj mjeri određuju teksturu svakoga fermentiranog mlijeka, od presudne je važnosti određivanje optimalnih uvjeta fermentacije. Za tu svrhu najčešće se kao dobar indikator kvalitete oblikovanja gela utvrđuje početak i brzina oblikovanja gela. Mjerenja se provode pomoću reometra malih amplituda oscilacije ($\leq 0,1$ Hz) koja ne narušavaju nježnu gel-strukturu koji se formira (vidi detalje u poglavlju reologija). Izmjerene reološke vrijednosti na reometru matematički su definirane sljedećom jednadžbom brzine stvaranja gela (k):

$$k = 2303 / t \log (G_{\infty} - G_{t1} / G_{\infty} - G_{t2})$$

gdje je:

G - čvrstoća gel-strukture (kompleksni modul)

G_{∞} - čvrstoća gel-strukture na kraju inkubacije

G_{t1} - čvrstoća gel-strukture na početku inkubacije

G_{t2} - čvrstoća gel-strukture u fazi najviše konstantne viskoznosti

t - vrijeme

kompleksni modul $G = (G'^2 + iG''^2)^{1/2}$

G' - modul pohrane ili elastičnost gela

G'' - modul gubitka ili viskoznost gela.

Temperature inkubacije (20 - 46 °C) i vrsta korištene kulture [EPS (+) ili EPS (-)] znatno utječu na formiranje svojstva elastičnosti (G') i viskoznosti (G'') gel-strukture, ali i na brzinu snižavanja pH u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Ipak, treba istaknuti da svi EPS (+) sojevi unutar iste vrste ili podvrste na različitim temperaturama inkubacije ne pokazuju isti

učinak na određena reološka svojstva. Istodobno za bakterijske sojeve vrsta BMK koji to svojstvo nemaju, utjecaj na fizikalna svojstva prvenstveno je određen razinom stvorene mliječne kiseline i proteolitičkom aktivnošću bakterijskih sojeva.

4.3.2.3.

Tvorba aromatskih spojeva

Posljedica je biokemijskih reakcija koje se događaju fermentacijom mlijeka uz stvorenu mliječnu kiselinu i formiranje aromatskih spojeva okusa i mirisa proizvoda. Zbog toga su okus/aroma i miris svakoga pojedinačnoga fermentiranog mlijeka određeni ravnotežom između acidifikacijom stvorene mliječne kiseline i aromatskih tvari. Stvorena mliječna kiselina u užem smislu fermentiranom mlijeku osigurava blago kiseli, rezak okus. U širem smislu ona inhibira rast mnogih mikrobnih uzročnika kvarenja, kao i nekih patogenih bakterija. Aromatski se spojevi u usporedbi s mliječnom kiselinom stvaraju u vrlo malim koncentracijama, ali su često jedini odgovorni za jedinstvene karakteristike okusa, arome i mirisa svake vrste fermentiranog mlijeka.

Za okus kiselog mlijeka i kiselom mlijeku srodnih fermentiranih mlijeka sličan maslacu odgovoran je aromatski spoj diacetil. Kemijski je organska molekula diacetil zapravo diketon koji nastaje fermentacijom citrata prisutnog u mlijeku. Bakterije mliječne kiseline *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. imaju sposobnost metabolizma citrata u acetat, CO₂ i reducirane C4 derivate (diacetil, acetoin, acetaldehid, 2,3-butilen-glikol). Citrat pozitivni (Cit+) laktokoki metabolizmom citrata vrlo često u fermentacijskom mlijeku mogu akumulirati prilično visoke koncentracije acetaldehida. Posljedično tome kiselo mlijeko i kiselom mlijeku srodna fermentirana mlijeka imaju nepoželjan okus/aromu koji se opisuju okusom po jogurtu. Bakterije *Leuconostoc* spp. uz tvorbu acetila imaju i sposobnost konverzije acetaldehida u etanol. Korištenjem kombinacije tih aromatskih bakterija u sastavu mezofilnih kultura osigurava se željeni okus kiselom mlijeku i kiselom

mlijeku srodnih fermentiranih bez promjene ostalih karakteristika. U percepciji okusa tih proizvoda važnu ulogu za punoću okusa ima i CO₂ stvoren metaboličkom aktivnošću bakterijskih vrsta iz sastava mezofilnih kultura. Za potpuno formiranje aromatskih spojeva korištenjem mezofilne kulture fermentacija mlijeka na temperaturi između 20 i 30 °C mora trajati najmanje 10-12 sati.

Karakterističan okus jogurta i jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka posljedica je fermentacijom mlijeka stvorenog acetaldehida, diacetila, acetoina, acetona i 2,3-butilen-glikola. Od tih se aromatskih komponenti acetaldehid stvara u znatno većoj koncentraciji te se smatra osnovnom aromatskom komponentom tih proizvoda. Visoke temperature toplinske obrade mlijeka i povećanje udjela suhe tvari u mlijeku tijekom fermentacije pogoduju bakterijskom stvaranju acetaldehida.

Koncentracija acetaldehida u proizvodu primarno je određena razinom stvorene mliječne kiseline. Formiranje acetaldehida u fermentacijskom mlijeku započinje na pH-5 i brzo se povećava do pH-vrijednosti mlijeka 4,4-4,3. Nakon toga je povećanje koncentracije acetaldehida minimalno, a na pH-vrijednosti fermentacijskog mlijeka od ~ 4 potpuno prestaje. U slučajevima kada se fermentacija klasičnog jogurta provodi na temperaturi od 42 °C, formiranje acetaldehida završeno je unutar tri sata trajanja fermentacije.

Acetaldehid nastaje uglavnom konverzijom amino-kiseline treonin reakcijom koja je katalizirana bakterijskom treonin aldolazom ili u metabolizmu laktoze. Bakterija *S. thermophilus* u odnosu na bakteriju *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stvara vrlo malu količinu acetaldehida (0,5 - 10 ppm) koja nema praktično značenje za aromu jogurta. Laktobacili, poput *L. acidophilus* koji posjeduju enzim alkohol dehidrogenazu konvertiraju acetaldehid u etanol. Stvoreni etanol nema praktično značenje za okus, ali istodobno probiotički jogurt proizveden korištenjem kulture sastavljenu od vrsta *S. thermophilus* i *L. acidophilus* nema karakteristični okus jogurta.

Aromatski spojevi acetoin i diacetil stvaraju se u malim koncentracijama (~ 0,90 ppm), ali u znatnoj

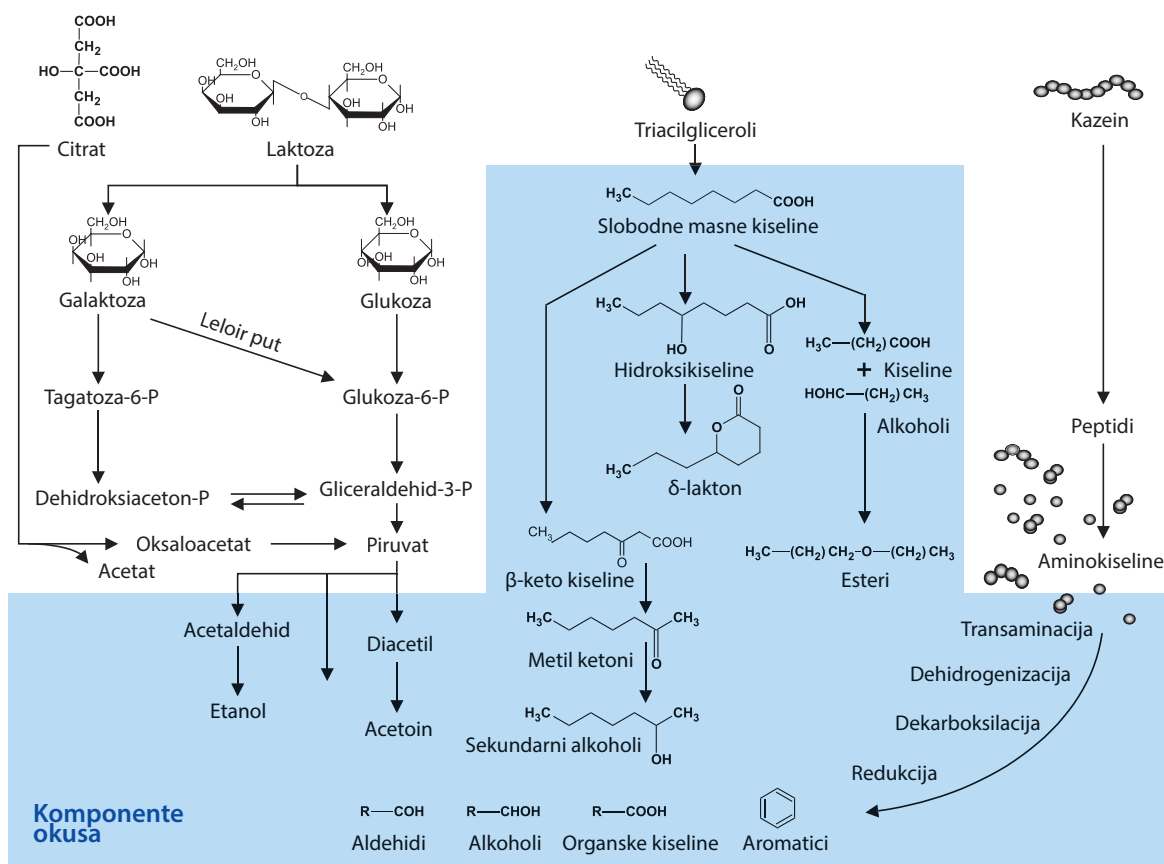
mjeri pridonose ugodnom okusu jogurta i jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka.

Na uravnoteženost okusa jogurta i jogurtu srodnih fermentiranih mlijeka djeluju i hlapljive masne kiseline, koje se tijekom fermentacije značajno povećavaju u usporedbi s njihovim udjelom u mlijeku. Od hlapljivih masnih kiselina u znatnijoj koncentraciji tvore se octena, mravlja, kapronska, kaprilna, maslačna, propionska i izovalerijanska kiselina. Kako su te kiseline prisutne u zaista malim koncentracijama, smatra se, da jedino sudjeluju u uravnoteženju okusa između svih drugih komponenti okusa koje nastaju fermentacijom.

Etilni alkohol i CO₂ koji nastaju fermentacijom karakteristični su spojevi okusa kefirra i kumisa. U sastavu kefirnih zrnaca ili čiste kefirne kulture kvasci iz laktoze u tim proizvodima stvaraju alkohol i CO₂.

Za formiranje karakterističnog okusa skandinavskog fermentiranog mlijeka viilija odgovorna je plijesan *Geotrichum candidum*. Tijekom fermentacije *Geotrichum candidum* raste na površini proizvoda i stvara neproziran, kapi sličan pokrov koji proizvod štiti od kvarenja drugim mikrobnim vrstama. Istodobno, ta plijesan ima i sposobnost metabolizma mliječne masti i proteina te stvaranja spojeva okusa po plijesnima. Upravo zahvaljujući metabolizmu plijesni viili ima slabije izražen kiseli a naglašen okus po plijesnima.

Indirektno, za formiranje karakterističnog okusa fermentiranih mlijeka je važna i proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva iz sastava kultura. Proteolizom oslobođeni mali peptidi i slobodne aminokiseline služe bakterijskim sojevima prvenstveno za dobar rast i razmnožavanje u mlijeku. U tehnološkom smislu, dobar bakterijski rast je jamstvo tvorbe željene koncentracije mliječne kiseline i ostalih aromatskih komponenti koje određuju karakterističan okus i aromu svakoj vrsti fermentiranog mlijeka. Dodatno proteolizom oslobođeni mali peptidi i slobodne aminokiseline postaju prekursori drugih manje specifičnih spojeva arome fermentiranog mlijeka. Zato je važno istaknuti da u formiranju ukupne arome svake pojedinačne vrste fermentiranog mlijeka sudjeluju brojni aromatski spojevi oslobođeni bakterijskim metabolizmom. Za



Slika 4.87.

Biokemijske reakcije koje sudjeluju u formiranju arome fermentiranih mlijeka. Detalji: u plavom su području označeni spojevi s izraženom aromatskom notom. (Marilley i Casey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

ilustraciju, na slici 4.87. prikazan je način oblikovanja aromatskih komponenti iz laktoze, mliječne masti i proteina mlijeka. Iznimna složenost biokemijskih reakcija koje sudjeluju u formiranju arome proizvoda s jedne strane, te činjenice da je aroma uz teksturu za potrošača najvažnije svojstvo, nalažu dobro poznavanje i razumijevanje cjelokupne tehnologije njihove proizvodnje.

Okus/aroma ili idealna ravnoteža između koncentracija mliječne kiseline i aromatskih tvari u fermentiranom mlijeku tehnološki se postižu na sljedeće načine:

- toplinskom obradom mlijeka na temperaturama 80 - 85 °C/30 - 20 min; 90 - 95 °C/10 - 5 min
- tlakom visokotlačne homogenizacije (kada se koristi) između 100 i 300 MPa
- pogodnim izborom (kada se koristi) stabilizatora
- većim udjelom mliječne masti
- izborom prikladne kulture
- ravnotežom između bakterijskih vrsta tijekom fermentacije
- kontroliranim uvjetima fermentacije
- pohranom gotovih proizvoda na temperaturu od 4 do najviše 6 °C.

4.3.2.4.

Hlađenje

U proizvodnji fermentiranih mlijeka treba jasno razlikovati dvije vrste hlađenja. Jedna je vrsta hlađenja isključivo vezana na temperature prekidanja fermentacije a određena je vrstom proizvoda i izabranom tehnologije proizvodnje. Drugu vrstu hlađenja čini završno hlađenje koje je jednako za sve vrste fermentiranih mlijeka.

Svrha hlađenja koje se koristi za prekidanje fermentacije je kontrola koncentracije fermentacijom stvorene mliječne kiseline i očuvanje formirane gel-strukture. Ta je vrsta hlađenja određena brzinom, početkom i završetkom hlađenja. Drugim riječima, tom se vrstom hlađenja primarno zaustavlja daljnja acidifikacija fermentacijskog mlijeka, a vrijeme početka i završetka hlađenja odgovorno je za sprječavanje postacidifikacijskog učinka. Općenito, za početak hlađenja primjerice jogurta preporučuje se trenutak kada je koncentracija mliječne kiseline između 0,7 i 1,0 g 100 g⁻¹ a mora započeti i završiti unutar uskog pH-intervala (4,7 - 4,5). Dobro odabranim optimalnim početkom i završetkom hlađenja osigurava se poželjna koncentracija mliječne kiseline u gotovom proizvodu (0,7 - 1,4 g 100 g⁻¹). Treba istaknuti i činjenicu da pH-vrijednost početka i završetka hlađenja nije fiksna vrijednost finalnog proizvoda, već je ona uvjetovana tehnološkim čimbenicima poput:

- temperature inkubacije
- intenziteta acidifikacije
- tehničkih mogućnosti hlađenja
- vrstom fermentiranog mlijeka (klasični, voćni, aromatizirani)
- poželjnim okusom (kisel, aromatični).

Osim tih čimbenika, u gotovom proizvodu željenu pH-vrijednost proizvođač može odrediti i na temelju iskustva. Primjerice, kod koje pH-vrijednosti proizvod pokazuje najmanju sinerezu (izdvajanje sirutke).

Vrijeme i brzina hlađenja kojom se prekida fermentacija presudni su i za oblikovanje željene teksture

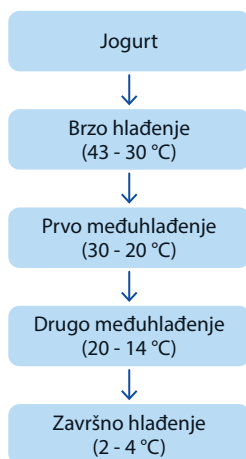
proizvoda. Zbog te uz okus najvažnije karakteristike proizvoda, hlađenje fermentacijskog mlijeka ne smije biti niti presporo niti prebrzo. Presporo je hlađenje uzrok prekomjerne acidifikacije ili diskoloracije voća u voćnim varijantama fermentiranog mlijeka. Prebrzo je hlađenje uzrok jačih kontrakcija gel-strukture od poželjnih i sinereza je izraženija. Posljedica je prebrzog hlađenja i formiranje nepoželjnog kondenzata na površini proizvoda.

Vrijeme trajanja hlađenja proizvoda kao i početka njegova hlađenja određeno je tehničkom opremljenošću pogona i količinom fermentacijskog mlijeka koje se hladi. Kompletno hlađenje jogurta od 200 g završit će za približno 5 sati, a hlađenje mase fermentiranog mlijeka od 4000 L u fermentacijskim spremnicima trajat će uz miješanje više od 24 sata. U praksi, hlađenje fermentacijskog mlijeka najčešće se organizira na dva načina:

- brzim hlađenjem u jednoj fazi
- postupnim hlađenjem u dvije faze.

Brzim hlađenjem u jednoj fazi temperatura fermentacije (20 - 45 °C) direktno se snizi na temperaturu nižu od 10 °C. Temperature niže od 10 °C značajno usporavaju metaboličku aktivnost bakterija iz sastava kultura. Indirektno, brzo hlađenje sprječava naknadna acidifikacija proizvoda. Općenito se smatra da je model brzog hlađenja pogodniji za čvrste klasične varijante fermentiranih mlijeka.

Hlađenje organizirano u dvije faze smatra se pogodnijim za hlađenje tekućih, pitkih i voćnih ili aromatiziranih varijanti fermentiranih mlijeka. Postupnim se hlađenjem u prvoj fazi fermentacijsko mlijeko u spremniku lagano miješa dok se ne postigne homogena struktura i temperatura proizvoda ~ 20 °C. Na tim se temperaturama i voćnim varijantama dodaje voće, te se proizvod puni u prodajnu ambalažu i hladi na temperaturi nižoj od 10 °C unutar 10 - 12 sati. Za fermentirana se mlijeka bez voćnih dodataka hlađenje u drugoj fazi najčešće organizira tako da se proizvod u prodajnoj ambalaži prvotno hladi 5 - 6 sati na temperaturi 7 - 10 °C. Potom se temperatura u atmosferi zraka snizi za 1 - 2 °C i na toj se temperaturi proizvod



Slika 4.88.

Kombinirani način organizacije hlađenja jogurta.

još hladi ~ 6 - 8 sati. Prije završnog hlađenja na temperaturi 2 - 4 °C, u modernim je mljekarama hlađenje fermentiranih mlijeka u dvije faze najčešće organizirano u takozvanim rashladnim tunelima. Za kvalitetnu teksturu u proizvodnji tekućih varijanti jogurta različitog udjela mliječne masti s agitacijom formiranog gela preporučuje se započeti hlađenje kod sljedećih pH-vrijednosti:

- pH-4,6 za krem jogurt (10 g 100 g⁻¹ mliječne masti)
- pH-4,4 za punomasni jogurt (3,5 g 100 g⁻¹ mliječne masti)
- pH-4,25 za djelomično obrani jogurt (1,5 g 100 g⁻¹ mliječne masti)
- pH-4,1 za obrani jogurt (~ 0,5 g 100 g⁻¹ mliječne masti).

U praksi, osim tih općih principa hlađenja uspješno se primjenjuju i drugi oblici hlađenja, čak i u slučajevima ako se radi o istoj vrsti fermentiranog mlijeka. Za jogurt se prije završnog hlađenja može odabrati i kombinirana shema hlađenja (slika 4.88.).

Završno hlađenje svih fermentiranih mlijeka provodi se na temperaturi 2 - 4 °C. Na tim se temperaturama

fermentirana mlijeka pohranjuju u mljekari tijekom distribucije i u rashladnim vitrinama trgovina.

4.3.2.5.

Pakiranje

Standardi za kvalitetu materijala koji se koriste kao ambalaža, zbog specifičnih karakteristika fermentiranih mlijeka, vrlo su visoki. Ambalaža u koju se pakiraju fermentirana mlijeka mora potvrditi sljedeće standarde:

- otpornost na okolišne i mehaničke utjecaje
- pogodnost za serijsko punjenje na strojevima za punjenje
- nepropusnost za svjetlo, miris i sl.
- biti slobodna od toksičnih komponenti
- onemogućiti reakcije s proizvodom
- biti ekološki prihvatljiva.

Najčešći materijali koji se koriste za izradu ambalaža u kojima se proizvodi isporučuju na tržište plastični su materijali: polipropilen (PP), polistiren (PS), polietilen tereftalat (PET), polietilen (LDPE), polivinil



Slika 4.89.

Oblici ambalaže za fermentirana mlijeka

klorid (PVC) i noviji polivinil-leden klorid (PVDC) te etilen-vinil alkohol (EVOH). Odnedavno se za ambalažu u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste i biomaterijali poput poliacetala. Ti materijali imaju određene prednosti pred klasičnima u zaštiti proizvoda od promjene boje, tvorbe hidroksiperoksida i u stupnju smanjenja gubitka β -karotena i riboflavina u finalnom proizvodu. S druge strane, poliacetati pokazuju slabiju otpornost na razinu migracije monomera iz materijala u proizvod u odnosu na klasične materijale. Istodobno, razina migracije monomera iz ambalaže u proizvod povezana je sa stupnjem kiselosti i udjelom mliječne masti u proizvodu, relativnom vlagom u okolišu i temperaturom fermentiranog mlijeka u trenutku punjenja. Tako su stiren i etilbenzen u industrijski proizvedenom jogurtu obično prisutni

u koncentraciji 0,08 - 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Koncentracija stirena od $> 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ može biti pokretač nastajanja pogrešaka okusa gotovog proizvoda. Kumin i o-ksilen sljedeći su monomeri koji imaju potencijal migriranja iz materijala ambalaže u proizvod.

Oblikom ambalaža za fermentirana mlijeka treba zadovoljiti sljedeće karakteristike:

- imati privlačan izgled
- imati prepoznatljiv izgled karakterističan za vrstu proizvoda
- veličinom odgovarati namjeni
- biti prilagođena laganom i jednostavnom otvaranju.

Na slici 4.89. prikazani su neki od dobro dizajniranih oblika ambalaže za pakiranje fermentiranih mlijeka.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka

5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka

- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Jogurt i druga fermentirana mlijeka

Uvod

Jogurt, njegove varijante i jogurtu srodne vrste razvili su se u najpopularnija i potrošačima najprihvatljivija fermentirana mlijeka. Karakteriziraju ih blago kiseli okus, dobra probavljivost, različitost okusa, visoka dijetetska vrijednost i stabilnost kvalitete. Od ostalih fermentiranih mlijeka, u prehrani i dijetetici posebno mjesto zauzimaju kiselo mlijeko, mlaćenica, kefir i kumis.

U ovom poglavlju knjige opisane su najvažnije karakteristike jogurta, i jogurtu srodnih vrsta, kiselog mlijeka, mlaćenice, kefira i kumisa. Od posebne skupine fermentiranih mlijeka opisani su skyr, ymer i viili. Također, u ovom su poglavlju knjige detaljno opisane i specifičnosti u tehnologiji proizvodnje različitih varijanti jogurta, kiselog mlijeka, mlaćenice, kefira i kumisa.



5.1.

Jogurt

Jogurt se proizvodi fermentacijom jednog ili više po želji izabranih mliječnih sastojaka (mlijeka, djelomično obranoga i obranog mlijeka, vrhnja) dodatkom karakteristične kulture koju čine dvije bakterijske vrste - *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Napretkom znanosti i tehnologije početno čvrsti prirodni jogurt je tijekom vremena prerastao u mnogobrojne *nove* varijante osnovnog proizvoda. Varijante jogurta koje se mogu naći na tržištu zaista su brojne - standardni (klasični), voćni, aromatizirani, obogaćeni, upjenjeni, osušeni, zamrznuti, jogurt s produženim vijekom održivosti, samo su neki od primjera. Kombinacijom standardne kulture za jogurt s *Bifidobacterium bifidum* dobiva se proizvod biogurt ili biogard koji je karakteriziran dobrom probavljivošću s niskim postacidifikacijskim učinkom i vremenski dugom stabilnošću okusa. Usprkos brojnosti, jogurt, njegove varijante i jogurtu srodne vrste na temelju svojih osnovnih karakteristika mogu se opisati sljedećim načinom:

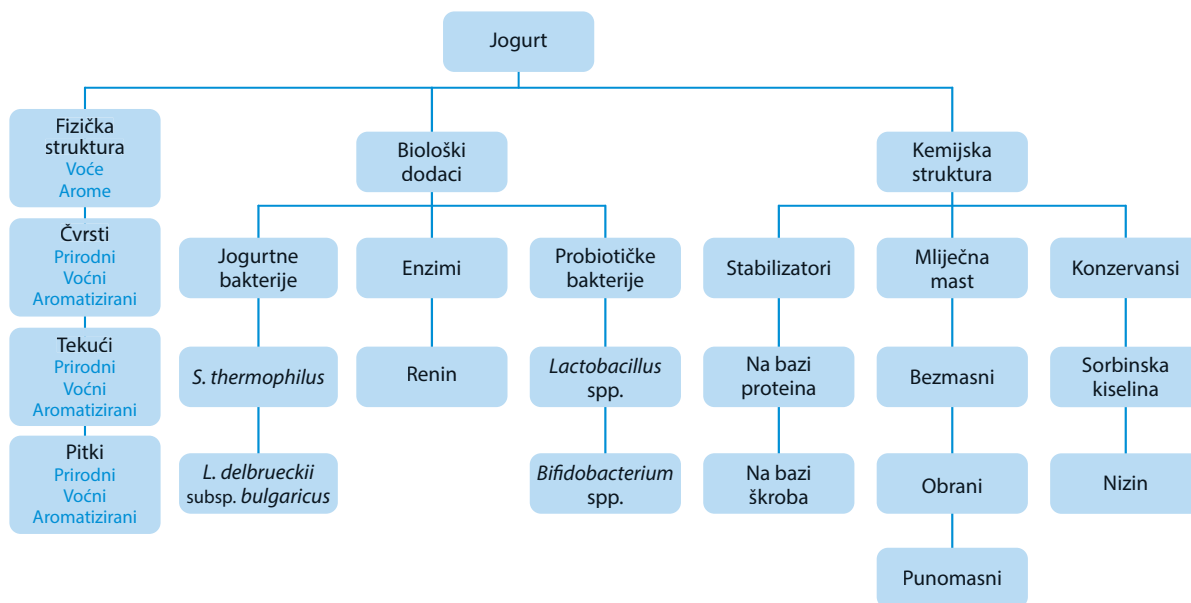
- jogurt i njegove varijante (osim osušenog i zamrznutog jogurta) konzistencijom su polučvrsta fermentirana mlijeka koja se prema fizikalnim svojstvima gel-strukture svrstavaju u čvrsta, tekuća i pitka fermentirana mlijeka; proizvode se od toplinski obrađenog mlijeka korištenjem termofilnih vrsta bakterija mliječne kiseline (**BMK**) ili bifidobakterija čiji je temperaturni optimum rasta između 37 i 42 °C; za povećanje suhe tvari bez masti (**Sbm**) mlijeko se uobičajeno koncentrira ili obogaćuje tekućim ili osušenim mliječnim ingredijentima; nakon završene fermentacije proizvodi se toplinski više ne smiju tretirati
- jogurtu srodne vrste su proizvodi slični jogurtu, ali sadržavaju tvari za obogaćivanje okusa, vezivne tvari; ponekad radi produživanja vijeka održivosti

mogu biti još i naknadno toplinski tretirani ili su na neki drugi način konzervirani nakon završene fermentacije; osim bakterija jogurtne kulture za proizvodnju jogurtu srodnih vrsta kultura može sadržavati i bifidobakterije ali i mezofilne vrste bakterija mliječne kiseline; prema fizikalnim svojstvima gel-strukture se svrstavaju u čvrsta, tekuća i pitka fermentirana mlijeka.

Varijabilnost između fizikalnih karakteristika različitih varijanti jogurta i jogurtu srodnih vrsta dijelom je određena samim tehnološkim postupcima, a dijelom dodanim sastojcima za obogaćivanje mlijeka. Zajedno oni određuju kemijski sastav, teksturu i okus svake pojedinačne varijante jogurta. Glavne razlikovne karakteristike između komercijalnih varijanti jogurta uvjetovane tehnologijom njihove proizvodnje prikazuje slika 5.1.

Vrijeme održivosti standardno proizvedenog jogurta na temperaturi pohrane ≤ 10 °C je najmanje 8-10 dana. U većini slučajeva vijek trajanja jogurta znatno je duži, a najčešće je on između 21 i 28 dana. Najkraće i najduže vrijeme održivosti jogurta na policama primarno određuje broj živih bakterija iz sastava kulture prisutnih u proizvodu. Prema definiciji i važećim propisima o označavanju proizvod koji se prodaje pod imenom jogurt mora na kraju svog vijeka održivosti sadržavati najmanje 10^7 cfu mL⁻¹ živih bakterija iz sastava jogurtne kulture. Probiotički jogurt uz bakterijske vrste jogurtne kulture na kraju vijeka održivosti mora sadržavati najmanje 10^6 cfu mL⁻¹ dodanih probiotičkih bakterijskih sojeva.

Komercijalno, za proizvodnju jogurta uz kravlje koriste se i ovčje, kozje, bivolje, mlijeko jaka, kobilje, mlijeko magarice, devino i mlijeko soba. Kemijskim sastavom i fizikalnim svojstvima te vrste mlijeka se značajno razlikuju i posljedično tome utječu na ukupnu kvalitetu proizvedenog jogurta. Ovčje, bivolje, mlijeko



Slika 5.1.

Shematski prikaz glavnih razlikovnih karakteristika komercijalnih varijanti jogurta. (Prilagođeno prema Tamimu i Robinsonu, 1999., i Chandanu i O'Rellu, 2006.)

jaka i sobovo mlijeko sadrže znatno viši udjel suhe tvari i između 6,5 i 11 % mliječne masti, zbog čega je konzistencija tih jogurta bolja u usporedbi s jogurtom proizvedenim od kravljega, kozjega ili mlijeka magarice.

5.2.

Tehnologija proizvodnje jogurta

Osnovni tehnološki postupci u proizvodnji jogurta ne razlikuju se znatno od tehnoloških postupaka u proizvodnji ostalih vrsta fermentiranih mlijeka. Tehnološke su specifičnosti proizvodnje jogurta određene jedino njihovom fizičkom strukturom (čvrsti, tekući, pitki) i varijantom osnovnog proizvoda. U

tom smislu, osnovni su tehnološki postupci u proizvodnji jogurta:

- priprema mlijeka
- homogenizacija
- toplinska obrada
- fermentacija
- hlađenje
- pakiranje proizvoda.

Priprema mlijeka radi poboljšanja reoloških svojstava jogurta primarno se odnosi na modifikaciju prirodnog udjela suhe tvari bez masti (Sbm) i mliječne masti u mlijeku. Za modifikaciju ili obogaćivanje Sbm mlijeka koriste se membranske tehnologije ili dodatak tekućih ili osušenih mliječnih ingredijenata. Svaki od mliječnih ingredijenata kao dodatak za obogaćivanje

Sbm ili poboljšanja drugih karakteristika mlijeka ima drukčija svojstva. Koriste se pojedinačno ili u kombinaciji, dio su tehnološkog procesa proizvodnje jogurta i nije ih potrebno posebno deklarirati. Od osušenih mliječnih ingredijenata za poboljšanje reoloških svojstava jogurta najčešće se koriste:

- obrano mlijeko u prahu
- koncentracije proteina mlijeka
- Na-kazeinat, Ca-kazeinat
- izolati proteina sirutke
- koncentracije proteina sirutke
- hidrolizati proteina sirutke
- mikroproteini sirutke.

Obogaćivanje bezmasne suhe tvari mlijeka (**Sbm**) mlijeka provodi se prvenstveno zbog povećanja ukupnog udjela proteina i omjera između kazeina i proteina sirutke. Posljedično modifikaciji sastava Sbm poboljšavaju se reološka svojstva gel-strukture jogurta - viskoznost, čvrstoća i kapacitet za vezanje vode. Nakon obogaćivanja ukupna je suha tvar (**ST**) mlijeka (uključivo i udjel mliječne masti) između 9 % za jogurte od obranog mlijeka, a može biti i više od 20 % za njegove koncentrirane varijante. Ipak, uobičajeno je ST mlijeka većine komercijalno proizvedenih jogurta između 12,5 i 16 % (prosječno 14 %), a udjel proteina u proizvodu između 4 i 5 %. Za proizvodnju jogurta obogaćivanje mlijeka podrazumijeva i po potrebi dodatak stabilizatora, prirodnih i umjetnih aroma, boja i sladila, vitamina, minerala i konzervansa.

Standardizacija mlijeka znači tipizaciju mlijeka na željeni udjel mliječne masti u gotovom proizvodu. Za tu se svrhu mlijeko miješa s obranim mlijekom, ili se obranom mlijeku dodaje vrhnje. Nakon standardizacije uobičajen je udjel mliječne masti u bezmasnim varijantama 0,0 - 0,5 %, u niskokaloričnim 0,5 - 2 %, a u punomasnim varijantama jogurta on je između 3,2 i 5 %. Iznimka su grčka varijanta jogurta i većina ostalih koncentriranih jogurta koji mogu sadržavati i više od 10 % mliječne masti.

Obogaćivanjem Sbm i standardizacijom mliječne masti u većini slučajeva u mlijeku se povećavaju udjeli laktoze, proteina, minerala i vitamina a značajno se

manjuje udjel masti (30 - 40 %). Posljedično, specifična gustoća mlijeka se povećava i obično je njezina vrijednost između 1030 i 1040 g/20 °C. Također zbog promijenjenog udjela pojedinačnih sastojaka mlijeka dolazi i do povećanja pufernog kapaciteta mlijeka. Tijekom fermentacije, povećani puferni kapacitet mlijeka osigurava: (i) bržu acidifikaciju mlijeka i (ii) skraćivanje vremena za završetak formiranja gel-strukture jogurta.

Poželjna tehnološka operacija deaeracija mlijeka također spada u fazu pripreme mlijeka. Deaeracija u proizvodnji jogurta, kao i klarifikacija sirovog mlijeka (koju nije poželjno koristiti), provodi se prije postupka obogaćivanja ili standardizacije mlijeka.

Pripremljeno mlijeko se potom najčešće homogenizira jednofaznom ili dvofaznom homogenizacijom obično uz tlak 15 - 30 MPa na temperaturi 50 - 70 °C. Visinu temperature i jačinu tlaka homogenizacije određuje udjel suhe tvari (**ST**) pripremljenog mlijeka ili vrsta dodanog stabilizatora, a varijanta jogurta način homogenizacije. Za poboljšanje konzistencije, viskoznosti i smanjenja predispozicije gel-strukture za sinerezu mlijeko koje sadrži između 11 i 13 % ST homogenizira se jednofaznom homogenizacijom uz visoki tlak (~ 23 - 28 MPa). Ili se ono homogenizira dvofaznom homogenizacijom uz najprije viši a potom niži tlak (~ 23 - 28 MPa/6 MPa). Mlijeko za jogurt koje sadrži visok udjel ST ili stabilizatora homogenizira se uz niži tlak (~ 6 - 7 MPa). Također, ako se kao stabilizator u proizvodnji jogurta koristi modificirani škrob (koji nije stabilan na smicanje) mora se koristiti jednofazna homogenizacija uz nizak tlak ~ 3 - 4 MPa. U tom je smislu najniža učinkovita temperatura homogenizacije koja se koristi u proizvodnji jogurta 35 °C, a najniži učinkoviti tlak ~ 3 - 4 MPa.

Homogenizacijom se poboljšava viskoznost pripremljenog mlijeka budući da se dio kazeina i proteina sirutke tijekom homogenizacije vežu na površinu novonastalih mliječnih globula. Te reakcije učinkovito povećavaju broj strukturno vezanih komponenti u mlijeku, a nativne membrane masnih globula više ne ulaze u interakciju s proteinima na isti način kao prije homogenizacije.

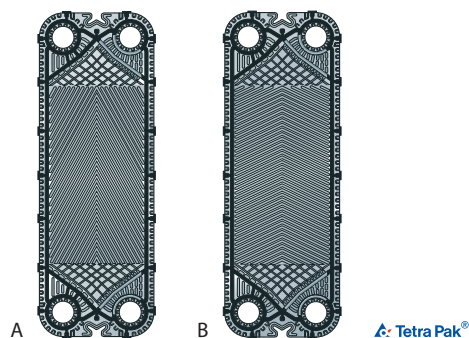
Međutim, treba istaknuti da homogenizacija mlijeka s niskim udjelom mliječne masti (0,1 - 2,0 %) tijekom fermentacije povećava predispoziciju gel-strukture jogurta za sinerezu. Odnosno, smanjuje se kapacitet gel-strukture za vezanje vode uvjetovan nedostatkom dovoljnog broja nativnih lipoproteinskih membrana za *novo* formirane masne globule i zbog toga većeg broja praznih prostora unutar formirane proteinske mreže.

Tehnološka operacija homogenizacije mlijeka osigurava i potpunu otopljenost svih ostalih dopuštenih dodataka koji se koriste za poboljšanje ukupne kvalitete jogurta.

Uobičajeno, homogenizacija mlijeka se provodi prije toplinske obrade, ali se mlijeko može homogenizirati i nakon toplinske obrade. Istraživanja pokazuju da je konzistencija jogurta pripremljenog od obranog mlijeka bolja ako se mlijeko homogenizira nakon toplinske obrade. Tehnološkom operacijom homogenizacije mlijeka postižu se za kvalitetu jogurta sljedeći kvalitativni učinci:

- smanjenje masnih globula na veličinu manju od 1 μm u promjeru (spriječeno izdvajanje mliječne masti na površinu jogurta)
- ravnomjerna raspodjela masnih globula u kazeinskom matriksu
- puni okus
- intenzivno bijela boja
- poboljšanje konzistencije i stabilnost gel-strukture jogurta
- povećanje viskoznosti
- smanjenje permeabilnosti
- smanjenje predispozicije za sinerezu
- poboljšanje probavljivosti.

Toplinskom obradom mlijeka nastaju fizikalno-kemijske promjene proteina koje imaju pozitivan učinak na formiranje gel-strukture jogurta tijekom fermentacije. Optimalne promjene proteina mlijeka postižu se zagrijavanjem mlijeka na temperaturu 90 - 95 °C tijekom 5 - 10 minuta. U tim se temperaturno-vremenskim uvjetima obrade mlijeka denaturira i do 95 % proteina sirutke koji participiraju s agregiranim kazeinom u formiranju proteinske mreže gel-strukture jogurta.

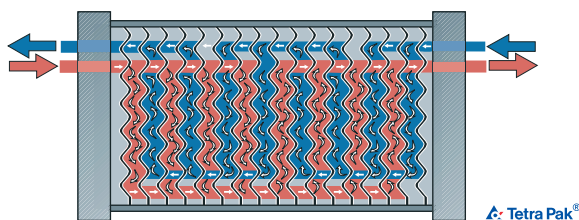


Slika 5.2.

Shematski prikaz valovitog dizajna ploča (A i B) pasterizatora koji omogućava zanemarivu turbulenciju mlijeka uz istodobno optimalan prijenos energije. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Denaturirani proteini sirutke sadržani u proteinskoj mreži povećavaju kapacitet vezanja vode, čime se postiže glatka konzistencija, dobra viskoznost i stabilnost jogurta na izdvajanje sirutke. U proizvodnji jogurta, za toplinsku obradu mlijeka najčešće se koriste pločasti izmjenjivači topline ili pasterizatori. Konstrukcijski pasterizatori se sastoje od tankih čeličnih ploča povezanih u okvir. Svaki okvir sadrži nekoliko setova ili sekcija u kojima se obavljaju tehnološke operacije predzagrijavanja, završnog zagrijavanja i hlađenja mlijeka. Same ploče (slika 5.2.) dizajnirane su na način koji omogućava optimalan prijenos energije uz istodobno minimalnu turbulenciju mlijeka.

Pripremljeno mlijeko tijekom toplinske obrade ulazi i izlazi kroz uzak kanal na jednoj strani i zagrijava se ili hladi na suprotnoj strani ploče (slika 5.3.). Za zagrijavanje ploča koristi se vruća voda, a za hlađenje hladna voda, ledena voda ili propil glikol. Sustav istodobnog zagrijavanja i hlađenja mlijeka u sekciji regeneracije organiziran je najčešće tako da je protok hladnog mlijeka podijeljen u dva, a toplog u četiri paralelna toka. Kanali za hladno mlijeko mijenjaju protok mlijeka preko ploča četiri puta, a kanali za toplo mlijeko mijenjaju protok mlijeka dvaput. Mediji za zagrijavanje ili hlađenje ploča smješteni su na drugom kraju



Slika 5.3.

Shematski prikaz dizajna paralelnog protoka mlijeka i medija za zagrijavanje i hlađenje kroz kanale sekcija zagrijavanja/hlađenje (4 x 2/2 x 4) pasterizatora.

Detalji: kombinacija 4 x 2/2 x 4 označava broj paralelnih protoka i broj mijenjanja protoka mlijeka i medija. Protok toplog mlijeka i medija za zagrijavanje kroz kanale sekcija označen je crvenom a hladnog mlijeka i hladnog medija plavom bojom. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

sekcije, a protok im je isti kao i za mlijeko. Sekcijom regeneracije se štede voda i energija a regeneracijska učinkovitost može biti i do 95 % kod dobro dizajniranih pločastih izmjenjivača topline. Završno zagrijavanje mlijeka obično se provodi u eksternoj sekciji pasterizatora koja se sastoji od spiralnih ili cik-cak cijevi. Dužina i protok cijevi moraju osigurati potrebno vrijeme zadržavanja mlijeka na istoj temperaturi.

Priprema mlijeka, homogenizacija i toplinska obrada inicijalni su tehnološki procesi u proizvodnji jogurta, a zajedničkim se imenom nazivaju predtretmanom mlijeka.

5.2.1.

Jogurtna kultura

5.2.1.1.

Klasična jogurtna kultura

Klasična jogurtna kultura sastoji se od sojeva dviju homofermentativnih vrsta bakterija mliječne kiseline - *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Svojstva klasične jogurtne kulture primarno se

pripisuju sinergističkom odnosu između vrsta, premda u mlijeku svaka od tih vrsta može rasti i samostalno. Sinergistički odnos između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* znači da tijekom fermentacije jogurta jedan organizam stimulira rast drugog organizma i obrnuto. Na početku fermentacije bakterija *S. thermophilus* inicira stvaranje mliječne kiseline i brzo raste do pH vrijednosti mlijeka 5,5. Početne potrebe za izvorom dušika ta bakterijska vrsta namiruje metabolizmom prirodno prisutnih slobodnih aminokiselina (~ 2 %) i dipeptida u mlijeku. Bakterija *S. thermophilus*, u usporedbi s bakterijom *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ima komplementarno višu aktivnost enzima aminopeptidaza i stanično slobodnih i stanično vezanih enzima dipeptidaza. U početnoj fazi fermentacije zbog toga ta bakterijska vrsta svojim bržim rastom i razmnožavanjem stvara u mlijeku povoljne uvjete za rast bakteriji *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Povoljni uvjeti za rast i razmnožavanje obje bakterijske vrste nastaju i zbog u mlijeku smanje koncentracije kisika uz istodobno povećanu koncentraciju CO₂, i stvorenoj mravljoj, pirogrožđanoj i folnoj kiselinu. Izvor CO₂ u toplinski obrađenom mlijeku je urea koja se razgrađuje djelovanjem enzima ureaze bakterije *S. thermophilus*. U prvim satima fermentacije *S. thermophilus* u mlijeku stvara 30 - 50 mg CO₂ kg⁻¹ koji je prekursor biosinteze za bakterije esencijalnih aminokiselina, aspartana, glutamina, arginina i nukleotida. Kako bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* za svoj optimalan rast i razmnožavanje zahtjeva ~ 31 mg CO₂ kg⁻¹ mlijeka, metabolizmom *S. thermophilus* stvorena koncentracija CO₂ za stimulaciju njenog rasta više je od dovoljne. Osim toga, iz uree se aktivnošću ureaze *S. thermophilus* oslobađa i amonijak koji ima ulogu povećanja pufernog kapaciteta mlijeka. Mravlja i folna kiselina važne su bakteriji *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* za biosintezu purina tijekom rasta i razmnožavanja u mlijeku. Dodatno folna je kiselina kao kofaktor uključena i u biosintezu nekih od aminokiselina koje su esencijalne za njezin dobar rast u mlijeku. Naime, za razliku od *S. thermophilus* koja tvori značajnu koncentraciju proteinskog enzima piruvat-formijat liaze, te ima dobru sposobnost izlučivanja folne i mravlje kiseline iz vlastite stanice u mlijeko, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

nema vlastiti enzimski kompleks te ih mora koristiti iz vanjskog izvora. Također zbog nedostatka vlastitog enzimatskog sustava za *de novo* sintezu dugolančanih nezasićenih masnih kiselina u mlijeku ih za njene metaboličke potrebe osigurava *S. thermophilus*.

Obje bakterijske vrste imaju sposobnost tvorbe aminokiseline ornitin i poliamina putrescina, spojeva za koje se pretpostavlja da ih tijekom rasta bakterije međusobno izmjenjuju i tako povećavaju vlastitu rezistentnost na oksidativni stres. Ornitin je uključen u metabolizam uree, a putrescin prevodi *S*-adenozilmetionin u poliamin spermin preko intermedijalnog metabolita poliamina-spermidina. Spermin i spermidin uključeni su u stabilizaciju DNA i DNA bakterijsku replikaciju tijekom njihovog rasta u mlijeku.

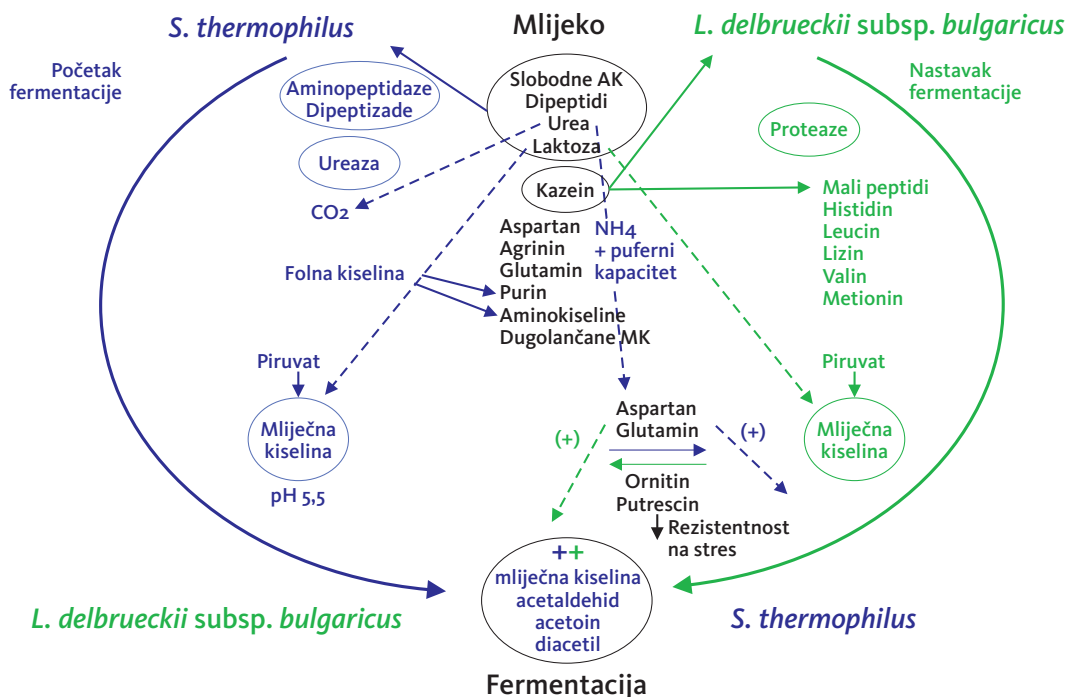
U usporedbi s bakterijom *S. thermophilus*, bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ima komplementarno značajno veću aktivnost stanično vezanih proteolitičkih enzima za razgradnju kazeina. Ona iz kazeina u mlijeku zbog toga stvara male peptide i aminokiseline (histidin, leucin, lizin, cistin, valin i dr.) koji su u nastavku fermentacije mlijeka potrebni za daljnji rast i razmnožavanje bakteriji *S. thermophilus*.

Nakon inokulacije jogurtne kulture u mlijeko zbog vlastite sposobnosti direktnog korištenja prirodno prisutnih aminokiselina, dipeptida, tripeptida i oligopeptida u mlijeku bakterije jogurtne kulture počinju eksponencijalno rasti. Postupno aminokiseline u mlijeku postaju limitirane a bakterijske stanice ulaze u neeksponecijalnu fazu rasta u kojoj se inicira ekstracelularna sinteza proteaza. Nakon te faze bakterijske stanice ponovno ulaze u svoju drugu eksponencijalnu fazu rasta, ali je ona za razliku od prve slabijeg intenziteta. Slabiji je omjer bakterijskog rasta u drugoj eksponencijalnoj fazi vjerojatno posljedica njihova limitiranog kapaciteta za veći unos peptida u vlastitu stanicu. U tom kontekstu, tijekom prve eksponencijalne faze rasta bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u fermentacijskom mlijeku gotovo da i ne raste. U drugoj se fazi rast i razmnožavanje *S. thermophilus* usporava a zbog istodobnog iniciranog stvaranja proteaza započinje eksponencijalni rast *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Stanično vezane proteaze PrtB

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* kataliziraju proteolizu hidrofobnog kazeina u manje peptide koji se postupno različitim peptidnim transportnim sustavima unose u bakterijsku stanicu. U citoplazmi se peptidi dalje razgrađuju do slobodnih aminokiselina djelovanjem nekoliko endopeptidaza i aminopeptidaza, a bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ulazi u svoju treću fazu rasta. U toj fazi, iz kazeina oslobođeni peptidi također služe bakteriji *S. thermophilus* za izvor aminokiselina koje podupiru njezinu drugu eksponencijalnu fazu rasta. Naime, bakterija *S. thermophilus*, osim nekoliko izrazito proteolitičkih sojeva, ne posjeduje ekstracelularne proteaze za razgradnju kazeina. Zbog toga je rast većine sojeva *S. thermophilus* snažno stimuliran rastom u kokulturi s bakterijom *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* uzrokovan njenom ekspresijom PrtB proteaza. Pojednostavljeni način kompleksnog sinergističkog rasta bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u mlijeku shematski je prikazan slikom 5.4.

Različite fiziološke osobine pojedinačnih bakterijskih vrsta jogurtne kulture uzrok su njihove različite brojčane pojavnosti tijekom trajanja fermentacije. U početnoj fazi fermentacije brojčani odnos između *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je 3 - 4 : 1. Posljedično tome tvorba mliječne kiseline u prvoj je fazi fermentacije uglavnom vezana za rast i razmnožavanje bakterije *S. thermophilus* ($\sim 10 \times 10^7-8$ cfu mL⁻¹). Stvorena mliječna kiselina u koncentraciji od 0,6 - 0,8 % snižava pH fermentacijskog mlijeka na ~ 5 i usporava daljnji rast *S. thermophilus* u fermentacijskom mlijeku. Istodobno ta koncentracija mliječne kiseline ne djeluje negativno na rast i razmnožavanje bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. U drugoj fazi fermentacije započinje brži rast i razmnožavanje bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koja je uglavnom u nastavku fermentacije odgovorna za tvorbu mliječne kiseline. Na kraju fermentacijskog procesa obje bakterijske populacije brojčano se izjednačuju u omjeru 1 : 1 ili 2 : 1.

Sinergističkim se rastom tih bakterijskih vrsta stvaraju značajno veće koncentracije mliječne kiseline i aromatskih tvari koje su esencijalne za ukupnu



Slika 5.4.

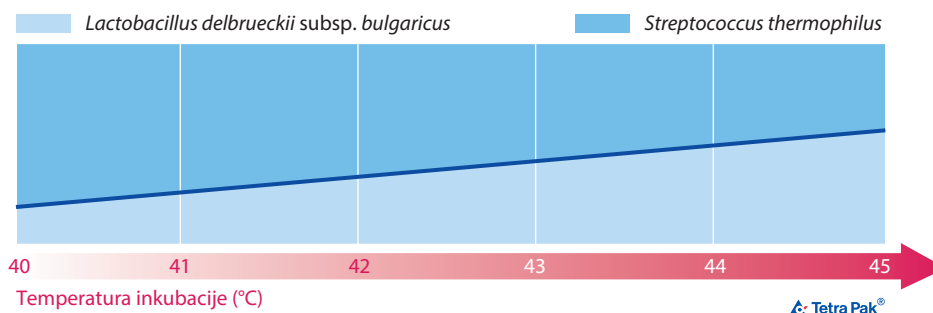
Pojednostavljeni prikaz sinergističkog rasta između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta.

kvalitetu jogurta. Za njihov optimalan sinergistički rast tijekom fermentacije, neovisno o različitim optimalnim temperaturama rasta pojedinačnih vrsta (*S. thermophilus* ~ 37 °C a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ~ 45 °C), preporučuje se koristiti temperaturu inkubacije od ~ 42 °C. Prema iskustvu iz prakse, na tim je temperaturama trajanje inkubacije klasičnog jogurta između 2,5 i 3 sata, a optimalna količina inokuluma jogurtne kulture ~ 2 %. Omjer koka i laktobacila u tim je uvjetima fermentacije 1 : 1 ili 2 : 1. Proizvedeni jogurt sadrži poželjan omjer između L (+) i D (-) izomera mliječne kiseline od 45 - 60 % L (+) : 40 - 55 % D (-) i ima optimalnu kiselost (pH ~ 4,2).

Promjene u temperaturi inkubacije u znatnoj mjeri mijenjaju poželjan omjer između koka i bacila u finalnom proizvodu. Povećanjem temperature inkubacije na više od 42 °C u jogurtu se povećava broj laktobacila, a

na temperaturama nižim od 42 °C prevladavaju streptokoki (slika 5.5.). Posljedično negativnom učinku previsoke ili preniske temperature fermentacije jogurt od poželjne ima previsoku ili prenisku kiselost. Mijenja se i omjer između L (+) i D (-) izomera mliječne kiseline koji je nepovoljniji ako u jogurtu prevladavaju laktobacili koji isključivo tvore D (-) ili ovisno o soju LD izomer mliječne kiseline.

Određeni sojevi obje bakterijske vrste, a osobito *S. thermophilus* imaju sposobnost tvorbe ekstracelularnih polisaharida (EPS). Primarno EPS tijekom fermentacije povećavaju stabilnost gel-strukture a sekundarno utječu na mnoga kvalitativna svojstva jogurta. Za proizvodnju jogurta korištenje EPS (+) ili viskozne jogurtne kultura nije nužno niti obvezno. Međutim zbog brojnih prednosti važnih za poboljšanje kvalitete te se viskozne kulture u proizvodnji jogurta često



Slika 5.5.

Promjene brojčanog omjera između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta kao funkcije utjecaja visine temperature inkubacije. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

koriste. Njene prednosti se manifestiraju u poboljšavanju glatkoće i sjaja teksture, viskozitet je veći, sinereza je manja, a osjećaj okusa proizvoda u ustima puni. Konačne kvalitativne karakteristike jogurta korištenjem EPS (+), treba istaknuti, usko su određene sastavom EPS i načinom njihove povezanosti za bakterijsku stanicu. Tako na kraju fermentacijskog procesa i tijekom pohrane EPS (+) sojevi s kapsularnom ili difuznom formom nemaju isti učinak na reološka i fizikalna svojstva jogurta. Bakterijski sojevi koji tvore kapsularni oblik EPS infiltriraju se unutar pora proteinskog matriksa. Posljedica koje je povećanje sile koja sprječava sinerezu, a gel-struktura čvrstog jogurta je općenito stabilnija i čvršća. Bakterijski sojevi koji stvaraju difuzni oblik EPS oblikuju filamentozne veze između bakterija i proteinskih niti smještenih izvan pora proteinskog matriksa. Filamentozne veze stabiliziraju gel-strukturu jogurta na primijenjeni stres (miješanje ili pakiranje) ali je zbog većih pora u proteinskom matriksu koji nisu popunjeni EPS predispozicija za sinerezu veća.

U proizvodnji tekućeg jogurta, u usporedbi s korištenjem standardne jogurtne kulture, korištenje viskozne jogurtne kulture povećava viskozitet proizvoda. Međutim, ako se viskozitet tekućeg jogurta usporedi s učinkom kulture koja sadrži EPS (+) sojeve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i EPS (-) sojeve *S. thermophilus* on je znatno bolji, a nakon razbijanja formiranog gela viskozitet se brzo obnavlja. Suprotno, korištenje jogurtne kulture koja sadrži jedino EPS (+) sojeve ne dolazi do obnove viskoziteta, a jogurt relativno brzo gubi svoju viskoznost. Zbog toga, u proizvodnji bilo

čvrstoga ili tekućeg jogurta mora se uvažiti činjenica da korištenje kultura koje sadrže EPS (+) bakterijske sojeve vrsta *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* nema uvijek samo pozitivno djelovanje.

Prilikom korištenja viskozne jogurtne kulture za fermentaciju mlijeka preporučuje se koristiti niže temperature inkubacije. Temperature inkubacije između 35 i 37 °C osiguravaju najveću bakterijsku tvorbu EPS, čime se postižu bolja konzistencija (za jogurte s ≤ 2 % masti), povećava viskozitet i smanjuje sinereza jogurta. Acidifikacija mlijeka na tim je temperatura brža, a tvorba acetaldehida, hlapljivih masnih kiselina i tirozina se povećava. Nakon 14 dana pohrane koncentracija EPS značajno se smanjuje, a reološka svojstva jogurta se mijenjaju. Posljednja navedena činjenica ujedno određuje i vijek održivosti tih varijanti jogurta na policama.

5.2.1.2.

Kultura za probiotički jogurt

Određene specifičnosti jogurta mogu biti značajnije promijenjene ako se za njegovu proizvodnju uz jogurtnu koristi i probiotička kultura. Probiotička kultura za proizvodnju jogurta sadrži jedan ili više probiotičkih bakterijskih sojeva koji najčešće pripadaju vrstama: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri* i *Lactobacillus johnsonii*, te vrstama *Bifidobacterium*.

Korištenje probiotičkih kultura u proizvodnji standardnih prirodnih varijanti jogurta često prati nedostatak okusa i arome. Ove negativne organoleptičke karakteristike osobito su izražene korištenjem probiotičkih sojeva *Bifidobacterium* spp. Suprotno, u proizvodnji jogurta blage kiselosti sugerira se korištenje modificirane jogurtne kulture, gdje se *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zamjenjuje drugom *Lactobacillus* vrstom i vrstama bifidobakterija. U praksi, za proizvodnju jogurta blage kiselosti najčešće se koriste kulture sastavljene od *Bifidobacterium bifidum* koja formira L (+) mliječnu kiselinu i *L. acidophilus* koja formira L (+) i D (-) mliječnu kiselinu. U tim slučajevima poželjna blaga kiselost jogurta postiže se nakon 6 - 8 sati fermentacije, a jogurt nosi sljedeće nazive:

- probiotički jogurt
- probiotičko fermentirano mlijeko
- probiotik.

Korištenje imena jogurt u nekim zemljama, važno je istaknuti, rezervirano je isključivo za jogurt proizveden klasičnom jogurtnom kulturom. Ipak, većina zemalja pa i Hrvatska, dopušta označavanje proizvoda imenom jogurt i za fermentirana mlijeka koja uz jogurtnu kulturu sadrže i probiotičku kulturu.

Optimiziranje uvjeta fermentacije u proizvodnji jogurta i razumijevanje čimbenika koji uvjetuju rast bakterija iz sastava kulture najvažniji su kriteriji za ujednačenu i postojanu kvalitetu proizvoda.

5.2.1.3.

Izbor kulture i količina inokuluma

Sastav i omjer bakterijskih sojeva u klasičnoj jogurtnoj kulturi i kulturi za probiotički jogurt presudni su za okus, teksturu i razinu kiselosti u jogurtu. Zbog toga se izbor jogurtne kulture mora temeljiti na sljedećim karakteristikama bakterijskih sojeva vrste *S. thermophilus* i vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*:

- brzini tvorbe mliječne kiseline tijekom fermentacije i pH-stabilnosti tijekom vremena održivosti jogurta
- sposobnosti tvorbe komponenti okusa i arome

- sposobnosti tvorbe egzopolisaharida (EPS)
- sposobnosti proteolize
- rezistentnosti na šećere.

Kulture koje se sastoje od bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost brze tvorbe mliječne kiseline često su uzrok postacidifikacije jogurta tijekom hlađenja i pohrane. One kulture koje sadrže bakterijske sojeve koji imaju sposobnost spore ili srednje brze tvorbe mliječne kiseline pogodne su za proizvode s dužim vijekom održivosti, a pokazuju i veću stabilnost tijekom transporta i pohrane jogurta. Viskozne jogurtne kulture pogodne su za čvrste i tekuće varijante jogurta, jogurte s nižim udjelom suhe tvari i za jogurte koji se proizvode bez stabilizatora. Međutim izbor viskoznih kultura sastavljenih od bakterijskih sojeva koji imaju svojstvo tvorbe previsokih koncentracija egzopolisaharida uzrok su prikrivanja karakterističnog okusa i arome, sluzavog okusa u ustima i ljepljive konzistencije jogurta. Djelomična proteoliza proteina mlijeka tijekom fermentacije ima poželjan učinak na probavljivost i nespecifični poželjan okus i aromu jogurta. Jogurtne kulture koje u svom sastavu sadrže sojeve bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koji imaju sposobnost ekstenzivne proteolize proteina uzrok su atipične konzistencije i gorkog okusa jogurta.

U proizvodnji voćnih ili aromatiziranih varijanti jogurta posebno je važno izabrati kulture sastavljene od bakterijskih sojeva koji pokazuju dobru rezistentnost na dodatak šećera. Osjetljivost bakterijskih sojeva jogurtne kulture na koncentraciju saharoze je između 5 i 12 % a većinu bakterijskih sojeva inhibira koncentracija saharoze 8 - 10 %. Ipak, posebno selekcionirani sojevi u potpunosti mogu zadržati svoju acidifikacijsku aktivnost i kod koncentracija saharoze visokih i do 13 %.

Količina inokuluma jogurtne kulture utječe na omjer bakterijskih vrsta u konačnom proizvodu. Dodatak prevelike količine inokuluma mlijeku može uzrokovati pogreške teksture i arome jogurta. Zbog toga se optimalnom količinom smatra dodatak 1 - 2 % kulture, a u slučajevima ako je koncentracija šećera u jogurtnoj mješavini 10 - 11 % optimalna je količina inokuluma 4 - 5 %.

Tablica 5.1.

Utjecaj količine inokuluma na omjer vrsta *S. thermophilus* (ST) i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) u jogurtu

Inokulum %	Omjer ST : LB
0,5	3 : 1
1,0	1 : 1 (2 : 1)
2,0	1 : 1 (2 : 1)
5,0	2 : 3

(preuzeto od Rašić i Kurmana, 1997., i Chandana i O' Rella, 2006.)

Značenja količine inokuluma na omjer pojedinačnih vrsta u gotovom proizvodu na primjeru za klasičnu jogurtu kulturu prikazuje tablica 5.1.

5.2.2.

Vrijeme i temperatura fermentacije

Uz količinu inokuluma, vrijeme i temperatura fermentacije (inkubacije) jogurta presudni su za njegovu teksturu i svojstva oblikovanoga gela.

Niže temperature inkubacije (32 - 37 °C) koriste se za proizvodnju varijanti jogurta koje sadrže mješavine različitih šećera i dodano voće raspoređeno u cijelom proizvodu. Niže temperature inkubacije osiguravaju poželjnu slabiju tvorbu mliječne kiseline uz manju čvrstoću gel-strukture koja ima slabiju tendenciju za sinerezu i granulaciju tekture. Također, za te varijante jogurta niže temperature inkubacije osiguravaju i znatno niži stupanj naknadne acidifikacije proizvoda tijekom pohrane. Niže temperature inkubacije (35 - 37°C) u proizvodnji jogurta pogodnije su i ako se koriste viskozne kulture.

Više se temperature inkubacije (38 - 45 °C) koriste u proizvodnji standardnih (klasičnih) prirodnih varijanti jogurta. U proizvodnji klasičnog jogurta temperature inkubacije više od 43 °C u određenim slučajevima mogu izazvati prekomjernu sinerezu,

loš okus, granuliranu teksturu i postacidifikaciju. Nepoželjne pogreške jogurta najčešće su uzrokovane visokim koncentracijama mliječne kiseline kao posljedice temperaturom favoriziranoga prekomjernog rasta i razmnožavanja bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Posljedično previsokoj koncentraciji mliječne kiseline proces fermentacije je ubrzan, a koloidni kalcijev fosfat sadržan u strukturi kazeina nije potpuno otopljen. Zbog toga se kazeinske čestice unutar proteinske mreže povezuju slabijim interakcijskim vezama i tvore manje stabilnu gel-strukturu jogurta. Više temperature inkubacije (41 - 42 °C) uobičajene su u proizvodnji jogurta gdje se koristi kultura za direktnu inokulaciju (DVS/DVD) mlijeka. Odnosno, te preporučene temperature inkubacije omogućavaju optimalan bakterijski rast i razmnožavanje i stalan omjer između bakterijskih vrsta tijekom fermentacije, čime se osigurava ujednačena kvaliteta jogurta.

Fermentacija mlijeka u proizvodnji jogurta, kao uostalom i u proizvodnji svih vrsta fermentiranih mlijeka, biološki je proces koji se mora odvijati u strogo kontroliranim uvjetima. Za tu se svrhu u mljekarama koriste specijalno dizajnirani inkubatori ili inkubacijski tuneli i fermentacijski spremnici.

Inkubatori su obično zasebne prostorije koje se sastoje od malih izoliranih prostora podijeljenih u odjeljke. Većina takvih inkubatora dizajnirana je na način koji omogućava cirkulaciju toploga i hladnog zraka u svakom odjeljku. Inkubacijski tuneli podijeljeni su u dvije sekcije - sekciju zagrijavanja i sekciju hlađenja. Jogurt u ambalaži kroz inkubacijski tunel prolazi pomičnom trakom, a brzina prolaska određena je temperaturom inkubacije, količinom i aktivnošću inokuluma. Niže temperature inkubacije (≤ 35 °C) i manja količina inokuluma (~ 1 %) zahtijevaju duže i sporije kretanje pomične trake kroz tunel. Fermentacijski spremnici su specijalno dizajnirani spremnici koji osiguravaju uvjete za kompletnu fermentaciju mlijeka.

Za čvrsti jogurt fermentacija se mlijeka može organizirati na dva načina. Jedan je način da se nakon inokulacije mlijeka kulturom fermentacijsko mlijeko odmah stavlja u ambalažu, a fermentacija se odvija

u inkubatoru. Drugi je način da se predfermentacija mlijeka organizira u spremniku do postizanja pH-vrijednosti mlijeka $\sim 5,7$, a potom se fermentacija jogurta nastavlja u prodajnoj ambalaži u inkubatoru. Uobičajeno, jogurt se najprije stavlja na palete izvan inkubatora, unosi u prostor inkubatora gdje cirkulira topli zrak potreban za tijek fermentacije, a fermentacija se prekida cirkulacijom hladnog zraka. Zasebni se inkubatori obično koriste ako se čvrsti jogurt proizvodi prethodnom predfermentacijom. Suprotno, inkubacijski tuneli, uglavnom su namijenjeni kontinuiranoj fermentaciji čvrstog jogurta.

U proizvodnji tekućega i pitkog jogurta fermentacija mlijeka također može biti organizirana na dva načina: (i) u fermentacijskim spremnicima koji služe kao inkubatori a prekida se hlađenjem u zasebnoj proizvodnoj jedinici i (ii) u višenamjenskim spremnicima koji se koriste u kontinuiranoj proizvodnji.

Ključni su parametri za odabir optimalne temperature i vremena trajanja fermentacije za sve varijante jogurta brzina kojom se postiže željena pH vrijednost proizvoda i osigurava ponovljivost od šarže do šarže. Jednostavnom matematičkom polinomnom jednadžbom drugog reda za to je moguće optimizirati omjer između pojedinačnih sojeva u kulturi. Omjeri različitih bakterijskih sojeva ulazni su podatci u modelu, a vrijeme da se postigne pH-vrijednost jogurta od 4,75 u modelu su izlazni podatci kako slijedi u jednadžbi:

Vrijeme do željenog pH (npr. 4,75) =

$$a_0 + a_1 \times \log(\text{St}) + a_2 [\log(\text{St})]^2 + a_3 \times \log(\text{Lb}) + a_4 [\log(\text{Lb})]^2 + a_5 \times \log(\text{St}) \times \log(\text{Lb})$$

Jednadžba opisuje acidifikacijsku aktivnost bakterijskih sojeva sadržanih u kulturi sastavljenoj od dviju vrsta - *S. thermophilus* (St) i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb). Koeficijenti a (1, 2, 3...) određuju se korištenjem odgovarajućega eksperimentalnoga faktorielnog dizajna. Ako kultura sadrži više od dvije bakterijske vrste, u jednadžbu se dodaju novi članovi. Posljedično, na temelju tih rezultata je moguće: (i) odrediti optimalno vrijeme potrebno za željenu

pH-vrijednost jogurta, (ii) skratiti vrijeme fermentacije i (iii) smanjiti omjer varijacija između proizvodnih šarži za istu varijantu jogurta.

U načelu, ovisi o izabranoj temperaturi inkubacije i sastavu izabrane kulture vremenski je trajanje fermentacije jogurta:

- 2,5 - 4 sata za klasičan jogurt na temperaturi 41 - 43 °C (kultura: *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)
- 8 - 9 sati za probiotički jogurt na temperaturi 32 - 37 °C (kultura: *S. thermophilus* i neki od probiotičkih sojeva primjerice bakterijskih vrsta *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus/longum*).

5.2.2.1.

—

Biokemijske promjene tijekom fermentacije

5.2.2.1.1.

—

Koncentracija mliječne kiseline

Mliječna kiselina stvorena tijekom fermentacije jogurta primarni je produkt biokemijske razgradnje laktoze na glukozu i galaktozu, koja se događa unutar bakterijskih stanica djelovanjem enzima β -galaktozidaze. Enzim β -galaktozidazu sposobne su tvoriti sve bakterijske vrste koje se koriste za sastav kultura u proizvodnji jogurta. Svojim metabolizmom te bakterije od približno 6 % početnog udjela laktoze u pripremljenom mlijeku tijekom fermentacije jogurta fermentiraju približno 30 % laktoze. Usprkos činjenici da značajan dio laktoze ($\sim 4,2$ %) ostaje neiskorišten stvorena koncentracija mliječne kiseline dovoljna je za snižavanje pH vrijednosti mlijeka potrebne za početak i završetak formiranja gel-strukture jogurta. Također, ona je dovoljna za karakteristični kiseli okus jogurta. Ovisno o vrsti korištene kulture koncentracija mliječne kiseline u jogurtu je prosječno između 0,7 - 1,2 g 100 mL⁻¹.

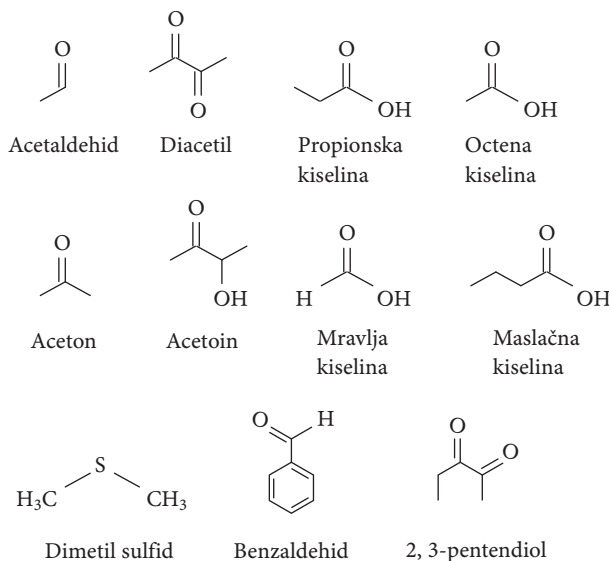
5.2.2.1.2.

Koncentracija aromatskih spojeva

Općenito, percepcija arome bilo koje namirnice pa tako i jogurta kompleksan je fenomen koji uključuje interakciju doživljaja mirisa i okusa proizvoda preko svih čovjekovih osjetilnih čula. Receptorne stanice smještene u ustima odgovorne su za kompleksni osjet okusa hrane, koji se opisuje osnovnim atributima poput slatko, kiselo, slano i gorko. Ti osnovni atributi u opisu okusa hrane dalje se raščlanjuju na osjet nijansiranih osnovnih atributa okusa. Miris hrane također je kompleksan osjet, a nastaje interakcijom hlapljivih komponenti i receptora za njih. Stimulacija osjeta mirisa može biti ortonazalna (direktno preko nosa ako se hrana pomiriši), ili retronazalna (indirektno preko oralne šupljine u trenutku kada se hrana jede). Ukratko, aroma hrane percepcija je istovremenog osjeta mirisa i okusa povezana s idejom cjelovite dobrobiti za organizam.

Upravo je svojstvena aroma jogurta razlog njegove pripadnosti skupini najpoželjnije hrane. Podatak ne čudi, budući da prema današnjim znanstvenim spoznajama jedinstvenu aromu jogurta određenje više od 90 aromatskih spojeva (tablica 5.2.). Aromatski spojevi u najvećoj mjeri nastaju bakterijskim djelovanjem, ali je važno istaknuti da se tijekom fermentacije aromatski spojevi stvaraju i drugim reakcijskim mehanizmima.

Bakterijskim metabolizmom od ukupno nastalih karbonilnih aromatskih spojeva (slika 5.6.) jedino su acetaldehid, aceton, acetoin i diacetil prisutni u relativno višim koncentracijama. Istovremeno, aromatski spojevi propionska, octena, maslačna i mravlja kiselina, dimetil sulfid, benzaldehid i 2,3 pentendiol podjednako značajni za karakterističnu aromu jogurta prisutni su u značajno nižim koncentracijama. Na temelju sadašnjih spoznaja smatra se da je ukupna aroma jogurta, uz mliječnu kiselinu, ipak zapravo određena međusobnom interakcijom svih do sada izoliranih aromatskih komponenti (tablica 5.2) zajedno. Za ilustraciju, u studijskim senzorskim analizama varijante jogurta blage kiselosti dobile su nižu ocjenu, neovisno o koncentraciji acetaldehida, 2,3-butilen glikola i 2,3-pentendiola u proizvodu.



Slika 5.6.

Shematski prikaz strukture glavnih aromatskih spojeva u jogurtu. (Routray i Mishra, 2011., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

Stvaranje aromatskih spojeva u jogurtu primarno je povezano s fermentacijom laktoze, a sekundarno, premda u znatno manjem obimu, metabolizmom proteina i masti. Najvažniji se aromatski spoj jogurta acetaldehid tijekom fermentacije osim iz laktoze formira i iz aminokiseline treonin (slika 5.7.). Kako je prirodna koncentracija treonina u mlijeku vrlo niska, djelovanjem bakterijskog enzima tronin aldolaze potrebna koncentracija treonina za transformaciju u acetaldehid se nadomješta derivacijom iz proteina mlijeka. Aktivnost treonin aldolaze u uskoj je korelaciji s aktivnošću enzima serin hidroksimetil transferaze te interkonverzijom iz treonina nastaju acetaldehid i glicin. Treonin aldolazu imaju obje bakterijske vrste jogurtne kulture, ali se aktivnost enzima bakterije *S. thermophilus* značajno smanjuje povećanjem temperature inkubacije s 30 na 42 °C. Zbog toga *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u jogurtu tvori acetaldehid u znatno višoj koncentraciji u odnosu na *S. thermophilus*.

Tablica 5.2.

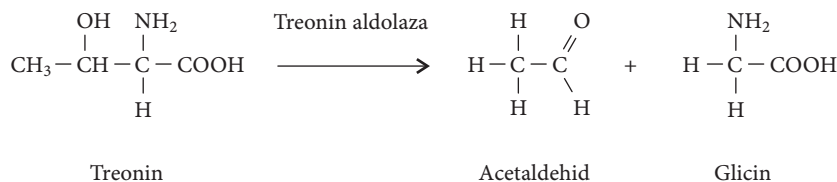
Aromatske komponente jogurta

Br.	Aromatski spoj	Br.	Aromatski spoj	Br.	Aromatski spoj
1.	acetaldehid	34.	2-metiltetrahidrotiofen-3-on	67.	3-oktanon
2.	dimetilsulfid	35.	2-undekanon	68.	2-metil tetrahidrofuran-3-on
3.	metilcikloheksan	36.	2-furanmetanol	69.	trimetilbenzen
4.	propanol	37.	valerijanska kiselina	70.	metilpirazin
5.	2-propanon	38.	kapronska kiselina	71.	oktanal
6.	furan	39.	heptanska kiselina	72.	3-hidroksi-2-butanon
7.	metilacetat	40.	kaprilna kiselina	73.	1-metil-etenilbenzen
8.	2-metilfuran	41.	kaprinska kiselina	74.	3-metil-2-butenol
9.	butanal	42.	Δ -dodekalakton	75.	2-nonanon
10.	etilacetat	43.	1-nonen-3-on	76.	2-hidroksi-3-pentanon
11.	2-butanon	44.	2-metiltetrahidrotiofen-3-on	77.	furfural
12.	metanol	45.	gvajakol	78.	1H-pirol
13.	3-metilbutanal	46.	2-metiltiofen	79.	benzaldehid
14.	diklormetan	47.	2-metil-1-propanil alkohol	80.	2-metilpropanska kiselina
15.	benzen	48.	etilbenzen	81.	maslačna kiselina
16.	2-propanol	49.	maslačna kiselina	82.	3-metil maslačna kiselina
17.	etanol	50.	1,3-dimetilbenzen (1,4?)	83.	2-dodekanon
18.	2-pentanon	51.	3-penten-2-on	84.	benzotiazole
19.	2,3-butadien	52.	1,3-dimetilbenzen (1,3?)	85.	2-pentadekanone
20.	acetonitril	53.	1-metilpirol	86.	nonanska kiselina
21.	kloroform	54.	3-heptanon	87.	γ -dodekalacton
22.	toluen	55.	1-butanol	88.	benzenska kiselina
23.	2-butanol	56.	1-etil-4-metilbenzen	89.	metional
24.	S-metiltioacetat	57.	1-penten-3-ol	90.	(2E)-nonenal
25.	1-propil alkohol	58.	limonen	91.	metil butanoat
26.	2,3-pentadien	59.	1,4-dimetilbenzen (1,2?)	92.	etilheksanoat
27.	dimetildisulfid	60.	2-heptanon	93.	heksilacetat
28.	butilacetat	61.	propilbenzen	94.	diacetil
29.	heksanal	62.	3-metil-2-butenal	95.	aceton
30.	2-heksanon	63.	2-pentilfuran	96.	acetoin
31.	dimetiltrisulfid	64.	pirazin	97.	mravlja kiselina
32.	octena kiselina	65.	etenilbenzen	—	—
33.	propionska kiselina	66.	1-pentanol	—	—

(Routray i Mishra, 2011., s dopuštanjem izdavača John Wiley and Sons)

U kontekstu sadržanih koncentracija acetaldehida (2,0 - 41,0 $\mu\text{g/g}$) u jogurtu, važno je istaknuti nekoliko bitnih činjenica. Jogurt proizveden korištenjem viskozne u usporedbi sa standardnom jogurtnom kulturom sadrži nižu koncentraciju acetalehida. Također, jogurt proizveden od kozjeg mlijeka, zbog većeg udjela glicina koji djeluje kao inhibitor enzima treonin aldolaze,

sadrži niže koncentracije acetaldehida. U proizvodnji bezmasnog jogurta mikroba transglutaminaza dodana u koncentraciji do 0,3 g L⁻¹ indirektno povećava koncentraciju acetaldehida. Njeno se djelovanje manifestira kroz povećanje aktivnosti *S. thermophilus* za tvorbu acetaldehida na temperaturama fermentacije višim od 30 °C.



Slika 5.7.

Shematski prikaz formiranja acetaldehida iz treonina tijekom fermentacije jogurta.

Diacetil, acetoin i aceton smatraju se drugim najvažnijim aromatskim komponentama jogurta koje se stvaraju tijekom fermentacije. Aromatski spoj aceton stvara se u koncentraciji 1,0 - 4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, acetoin 2,2 - 5,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, a diacetil 0,4 - 13 $\mu\text{g g}^{-1}$. Bakterija *S. thermophilus* u odnosu na bakteriju *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stvara značajno veću količinu diacetila na način koji vjerojatno korespondira s mehanizmom bakterija *Leuconostoc* spp. i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. Međutim, za razliku od tih bakterijskih vrsta bakterije jogurtne kulture nemaju sposobnost metabolizma citrata, već se diacetil formira indirektno hidrolizom laktoze a piruvat je njegov prekursor.

Na ukupnu aromu jogurta nedvojbeno utječu nhlapljive karboksilne kiseline (pirogroždana, oksalna, jantarna) i hlapljive karboksilne masne kiseline (mravlja, octena, propionska). One tijekom fermentacije jogurta nastaju oksidativnom deaminacijom i dekarboksilacijom aminokiselina u koncentraciji i od 7,5 mmol L^{-1} . Za stvaranje okusa i arome jogurta, ali u znatno manjem obimu, zaslužni su i tijekom fermentacije nastali spojevi bakterijskog proteolitičkog i lipolitičkog metabolizma. Bakterijskom proteolitičkom razgradnjom proteina mlijeka nastaju aminokiseline i peptidi koji postaju prekursori za formiranje aromatskih spojeva u jogurtu. Proteolitička aktivnost bakterija iz sastava jogurtne kulture, treba istaknuti, može biti i uzrok nastajanju gorkih peptida koji imaju negativni učinak na okus jogurta. Stvaranje gorkih peptida najčešće je posljedica fermentacije jogurta na temperaturama < 30 °C uvjetovanima korištenjem dopunske kulture koja sadrži bakterije *Leuconostoc* spp. Stvaranje gorkih peptida, ali rijetko, može biti povezano i s enzimatskom razgradnjom proteina tijekom duže hladne pohrane jogurta. Najčešće uzročnici stvaranja

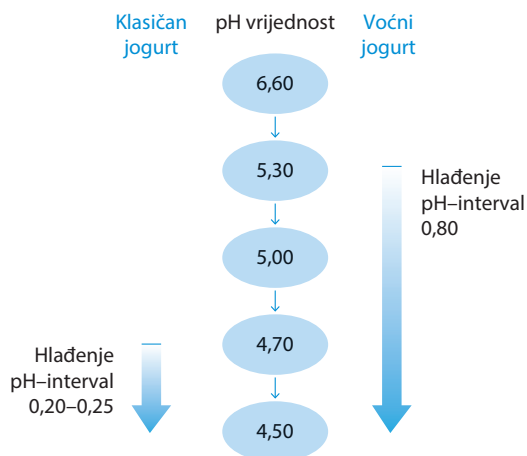
gorkih peptida su sojevi bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koji tijekom hladne pohrane jogurta imaju sposobnost enzimatske razgradnje hidrofobnog dijela kazeinske molekule. Lipolizom oslobođene komponente, osobito one oslobođene iz kratkolančanih masnih kiselina sadržanim u triacilglicerolima masnih globula, pridonose općem dojmu punoće okusu jogurta.

5.2.3.

Hlađenje jogurta

Uz fermentaciju, za ukupnu kvalitetu jogurta osobito je važno odrediti optimalno vrijeme početka i završetka njegova hlađenja. Primarno, hlađenjem se zaustavlja daljnja acidifikacija jogurta, a vrijeme početka i završetka hlađenja odgovorno je za sprječavanje postacidifikacijskog učinka. Općenito, za početak hlađenja jogurta preporučuje se trenutak kada je koncentracija mliječne kiseline između 0,7 i 1,0 g 100 g^{-1} i mora započeti i završiti unutar uskog pH- intervala (slika 5.8.). Dobro odabranim optimalnim početkom i završetkom hlađenja u standardnom jogurtu osigurava se: (i) koncentracija mliječne kiseline od 1,2 do 1,4 g 100 g^{-1} i (ii) neznatna pojava postacidifikacije, koja za čvrsti jogurt nije veća od 0,20 do 0,25 pH, a za voćni i aromatizirani jogurt od 0,80 pH-jedinica.

Za kvalitetu teksture tekućih i pitkih varijanti jogurta, osim početka i završetka hlađenja, posebno je bitna i brzina (ritam) hlađenja. Naglim hlađenjem kontrakcija gel-strukture jogurta je prebrza, posljedica koje je smanjenje njenih hidrofilnih svojstava i pojačana sinereza. Zbog toga ritam hlađenja tekućih i pitkih varijanti jogurta treba organizirati tako da se



Slika 5.8.

pH-interval za početak i završetak hlađenja jogurta. (Preuzeto od Rašića i Kurmana, 1978.)

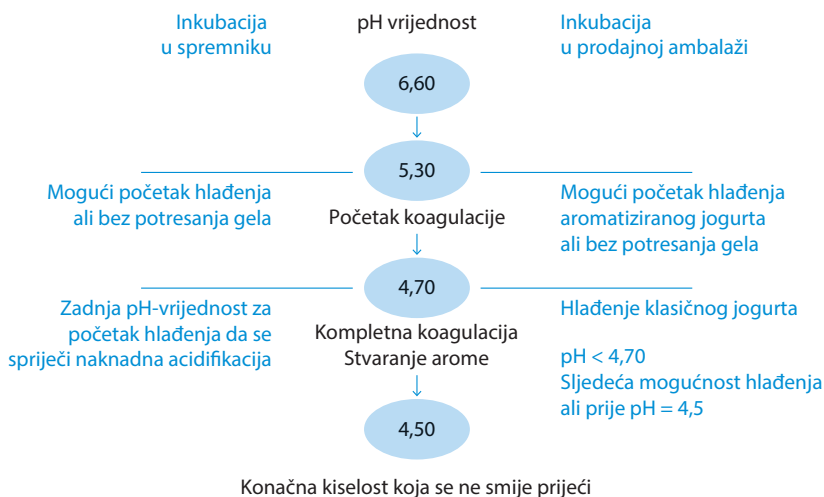
najprije unutar 1 - 1,5 sata ohlade na temperaturu od ~ 20 °C i odmah pakiraju. Na istim temperaturama prije pakiranja umiješa se voće ili arome ako se radi o voćnim ili aromatiziranim varijantama jogurta.

Nakon pakiranja jogurt se završno ohladi na temperaturu od 5 °C. Za ilustraciju, na slici 5.9. prikazan je mogući početak hlađenja tekućega voćnoga i standardnoga čvrstoga ili aromatiziranog jogurta ovisno o pH-vrijednosti i načinu fermentacije.

5.2.4.

Čvrsti jogurt

U počecima kontroliranih uvjeta proizvodnje čvrsti se jogurt na tradicionalan način proizvodio od koncentriranog mlijeka, koje se zagrijavalo na otvorenoj vatri dok se jedna trećina vode nije isparila. Nakon toga mlijeko se hladilo na temperaturu ~ 50 °C i inokuliralo dijelom jogurta od prethodne proizvodnje. Nakon fermentacije jogurt je imao prilično čvrstu gel-strukturu. Osnovni postupci proizvodnje čvrstog jogurta do danas se nisu promijenili osim što se mlijeko koncentrira korištenjem membranskih tehnologija ili dodatkom obično osušenih mliječnih ingredijenata. U slučajevima ako se jogurt proizvodi od



Slika 5.9.

Početak hlađenja tekućeg voćnog i standardnog čvrstoga ili aromatiziranog jogurta kao funkcije pH-vrijednosti i načina inkubacije. (Preuzeto od Rašića i Kurmana, 1978.)



Slika 5.10.

Izgled vanjske i unutarnje
teksture čvrstog jogurta.

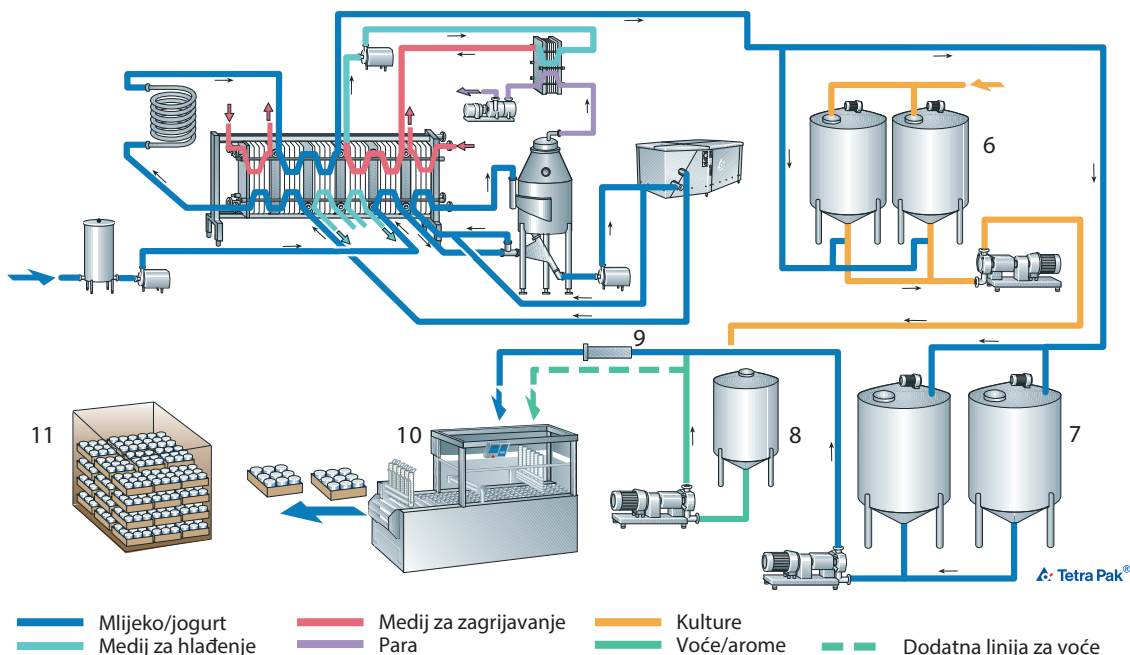
nemodificiranog mlijeka (propisi u nekim zemljama), čvrstoća gel-strukture znatno je manja i podložnija sinerezi a aroma je jogurta slabije izražena.

Prema svojim osnovnim obilježjima gel-strukture, čvrsti jogurt pakiran u čašici mora imati glatku, sjajnu i bez vidljivih tragova izdvojene sirutke gornju površinu. Unutarnja struktura jogurta promatrana na žlicom izvađenom sadržaju iz čašice površinom i homogenošću mora izgledom biti ista gornjoj površini (slika 5.10.).

U kontinuiranoj proizvodnji čvrstog jogurta nakon predtretiranja mlijeka (standardizacija, obogaćivanje, homogenizacija, toplinska obrada) slijede tehnološke operacije inokulacije i predfermentacija mlijeka u međuspremniku (obično dvije u nizu). Nakon završene predfermentacije, fermentacijsko mlijeko se pumpom (s ugrađenom kontrolom protoka) prebacuje u stroj za punjenje (slika 5.11.). Prije samog punjenja, u toj se fazi fermentacijskom mlijeku mogu dodati voće ili arome ili boje. Za tu je namjenu u procesnu liniju obično ugrađena statična miješalica kojom se postižu homogenost i potrebni viskozitet odabranog pripravka. Naime, neposredno prije punjenja voćni je pripravak pohranjen u odvojenom spremniku punilice gdje se više ne miješa, a potrebna količina samo se dozira u fermentacijsko mlijeko. Dobra homogenost i viskozitet voćnog pripravka osiguravaju u proizvodu njegovu

ravnomjernu raspodjelu. Suprotno, ako je viskozitet voćnog pripravka nizak, komadići voća mogu se istaložiti na dno čašice. Napunjene čašice hermetički se zatvaraju i stavljaju na transportne palete kojima se proizvod prebacuje u fermentacijske komore na fermentaciju. Temperatura inkubacije za standardni jogurt je između 41 i 43 °C i traje 2 - 3 sata, a za jogurtu srodne vrste fermentacija se može organizirati na temperaturama 30 - 45 °C i trajati između 6 i ≥10 sati.

Hlađenje čvrstog jogurta treba započeti u trenutku kada je njegova pH vrijednost između 4,5 i 4,7, a unutar 1 - 1,5 sat jogurt se ohladi na potrebnu temperaturu od približno 20 °C. Unutar prva dva sata na tim temperaturama odvijaju se najintenzivnije reakcije važne za stvaranje karakterističnih aromatskih komponenti jogurta, a daljnji je prekomjerni rast kiselosti zaustavljen. Slijedi druga faza hlađenja u kojoj se jogurt završno ohladi na temperaturu od 4 - 6 °C potrebnu za njegovo fizikalno zrenje. Unutar gel-strukture fizikalnim zrenjem hidrofobna svojstva proteinskog matriksa slabe a hidrofilna se povećavaju. Odnosno, događa se takozvano "bubrenje" proteina kojeg je rezultat povećanje površine između kazeinskih čestica i denaturiranih proteina sirutke kojom se postiže čvršća gel struktura jogurta manje osjetljiva na mehaničko rukovanje. Druga faza hlađenja čvrstog jogurta traje približno 24 sata tijekom kojeg dolazi i do reapsorpcije sirutke izdvojene u prvoj fazi hlađenja. Osim tih



Slika 5.11.

Shematski prikaz linije za proizvodnju čvrstog jogurta.

Detalji: 6 spremnici za kulturu, 7 pufer spremnici, 8 spremnik za dodatak aroma, voća, 9 mikser, 10 pakiranje, 11 inkubator. Gornji dio slike: linija za pretretiranje mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

općih principa, hlađenje čvrstog jogurta može biti organizirano i na sljedeće načine:

- brzim hlađenjem na temperaturu nižu od 10 °C
- brzim hlađenjem na temperaturu do 30 °C, nakon kojeg slijedi međuhlađenje na temperaturu do 20 °C, zatim drugo međuhlađenje na temperaturu do 14 °C, i na kraju slijedi završno hlađenje na temperaturu 2 - 4 °C.

Nakon završnog hlađenja pH vrijednost jogurta je prosječno između 4,2 i 4,4.

S ciljem očuvanja najpoželjnije kvalitete distribuciju čvrstog jogurta na tržište poželjno je organizirati unutar 48 sati od njegova punjenja u čašice. Također, tijekom transporta temperatura jogurta u čašici ne smije varirati, a zbog osjetljivosti fizičke strukture gela

mora se izbjegniti svaka mehanička trešnja. U suprotnom, moguće je pucanje gel-strukture i prekomjerno izdvajanje sirutke na površinu jogurta.

5.2.5.

Tekući jogurt

Za razliku od čvrstog jogurta, gel-struktura koja čini teksturu tekućeg jogurta je homogena i gusto viskozna (slika 5.12.).

U kontinuiranoj proizvodnji tekućeg jogurta, nakon pretretiranja mlijeka slijedi fermentacija mlijeka u velikim spremnicima na temperaturama uobičajeno



Slika 5.12.

Izgled vanjske i unutarnje
teksture tekućeg jogurta.

nižim od 40 °C. Fermentacijsko se mlijeko tijekom trajanja fermentacije ne miješa, a fermentacija je gotovo u potpunosti završena prije pakiranja jogurta. U fermentacijskom smislu, zbog nižih temperatura fermentacije način acidifikacije mlijeka za tekući jogurt nije isti onom za čvrsti jogurt. Formiranje gel-strukture čvrstog jogurta započinje na pH - 4,7 nakon čega se čvrstoća gel-strukture brzo povećava da bi svoju konačnu čvrstoću dostignula za približno 20 minuta. U proizvodnji tekućeg jogurta formiranje gel-strukture započinje na istoj pH-vrijednosti, ali je potrebno ~ 4 sata da gel-struktura jogurta postane dovoljno čvrsta za miješanje. Nakon završene fermentacije formirani se čvrsti gel laganim miješanjem razbija (2 - 4 rpm) dok se ne postigne glatka, prilično gusta tekuća struktura jogurta. Istovremeno, miješanjem koje traje 5 - 10 minuta usporava se i aktivnost kulture. Stvaranje je mliječne kiseline usporeno, a opasnost od prekomjerne acidifikacije gotovog proizvoda smanjena. Dodatno, u toj se tehnološkoj fazi formirani gel može podvrgnuti i postupku dobivanja potpuno glatke strukture tekućeg jogurta. Za tu svrhu koristi se analizator teksture gdje topao gel prolazi kroz njegovu finu rešetku na kojoj se iz gela izdvajaju eventualno prisutne sitne nakupine proteina. Potom se jogurt laganim pumpanjem (monopumpom) prebacuje na pločasti ili cjevasti (tubularni) hladionik, gdje se ovisno o varijanti tekućeg jogurta hladi na temperaturu 20 - 30 °C. Svrha je prve faze hlađenja tekućeg jogurta sprječavanje stvaranja prekomjerne kiselosti, a traje približno 30 minuta. Ohlađeni jogurt potom se pohranjuje u međuspremnik iz kojeg se pumpama prebacuje u

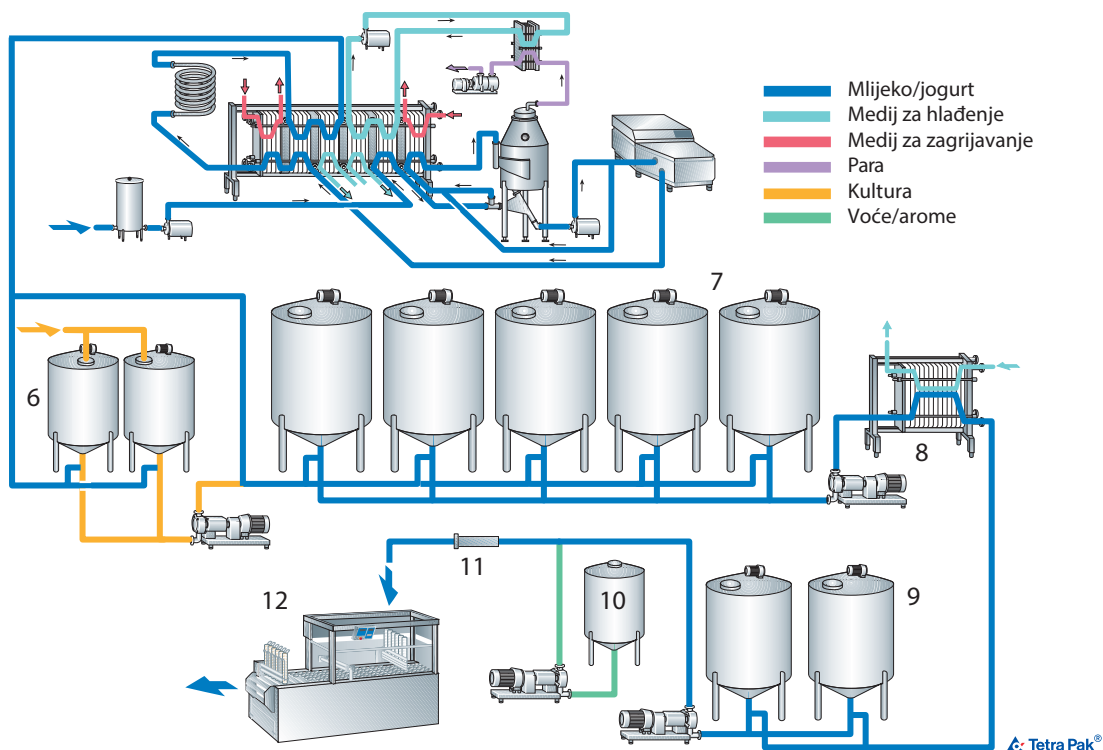
stroj za punjenje. Neposredno prije punjenja za voćne i aromatizirane varijante tekućeg jogurta ohlađene na temperaturu ~20 °C dodaju se voće ili voćne arome. Potom se jogurt u prodajnoj ambalaži hladi 10 - 12 sati na temperaturi < 10 °C. U tom periodu hlađenja uz povećanje viskoziteta završava potpuno formiranje teksture. Završno hlađenje tekućeg jogurta provodi se na temperaturi 2 - 4 °C.

Često, posljedica nižih temperatura fermentacije tekućeg jogurta je niža koncentracija poželjnih aromatskih tvari u jogurtu. Za poboljšanje arome tekućeg jogurta zbog toga se preporučuje prethodna priprema jogurtne kulture u smislu temperature inkubacije i vremena trajanja fermentacijskog procesa na način njene pripreme za čvrsti jogurt. Tako pripremljena kultura poboljšava potreban omjer između koka i štapića, nužan za formiranje aromatskih spojeva jogurta. Proizvodna linija za tekući jogurt prikazana je na slici 5.13.

5.2.6.

Pitki jogurt

Dizajniran s namjerom konzumiranja u svojstvu osvježavajućeg napitaka, pitki jogurt od 2004. godine sve je popularnija varijanta jogurta na tržištu. Zbog toga se pitki jogurt gotovo uvijek proizvodi s dodatkom voća ili voćnih pasti ili voćnih aroma. Postotak voća u pitkom jogurtu je najčešće između 8 i 15 %,



Slika 5.13.

Shematski prikaz linije za proizvodnju tekućeg jogurta.

Detalji: 6 spremnici za kulturu, 7 fermentacijski spremnici, 8 pločasto hladilo, 9 puferni spremnik, 10 spremnik za voće ili arome pakiranja, 11 mikser, 12 punjenje i pakiranje. Gornji dio slike: linija za predtretiranje mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

premda voće u jogurt može biti dodano i u znatno višem postotku (30 - 49 %). Tipičan komercijalni pitki jogurt sadrži 8,0 - 9,5 % Sbm, < 2 % mliječne masti a pitki zaslađeni jogurt dodatno sadrži i 8 - 12 % šećera. Također, u većini je slučajeva za niskokalorične varijante pitkih jogurta šećer u potpunosti zamijenjen intenzivnim prirodnim ili umjetnim sladilima. Gel-struktura pitkog jogurta prema svojstvu homogenosti i glatkoće slična je tekućem jogurtu, ali je manje viskozna (slika 5.14.).

Uz varijante koje se proizvode jogurtnom kulturom, često se u proizvodnji pitkog jogurta koristi i probiotička kultura. Također, često se pitki jogurt dodatno

još obogaćuje prebiotcima, vitaminima i mineralima. Tako se u proizvodnji pitkog jogurta uz jogurtnu kulturu obično kombinira probiotička kultura koja najčešće sadrži probiotičke sojeve bakterijskih vrsta *L. casei*, *L. reuteri* i *Bifidobacterium*. Od prebiotika se najčešće koriste fruktooligosaharidi ili inulin.

Slično kao i za ostale varijante jogurta, tehnološki postupak proizvodnje pitkog jogurta u osnovi je gotovo isti (slika 5.15.). Pripremljeno mlijeko (Sbm, šećer, minerali, vitamini, prebiotici, stabilizator) se homogenizira i toplinski obrađuje na temperaturi od 85 °C/30 min ili češće na 95 °C/10 min. Toplinskom obradom mlijeka osiguravaju se povoljni uvjeti za



Slika 5.14.

Izgled teksture pitkog jogurta.

rast bakterija iz sastava kulture i fizikalno-kemijski preduvjeti za kasnije formiranje poželjne viskoznosti gotovog proizvoda. Nakon toplinske obrade mlijeko se ohladi na temperaturu 39 - 41 °C i inokulira s 1 - 2 % jogurtne kulture ili probiotičkom kulturom. Fermentacija se prekida hlađenjem kada pH fermentacijskog mlijeka dostigne vrijednost 4,3 - 4,4. Formirana gel-struktura jogurta potom se razbija miješanjem na

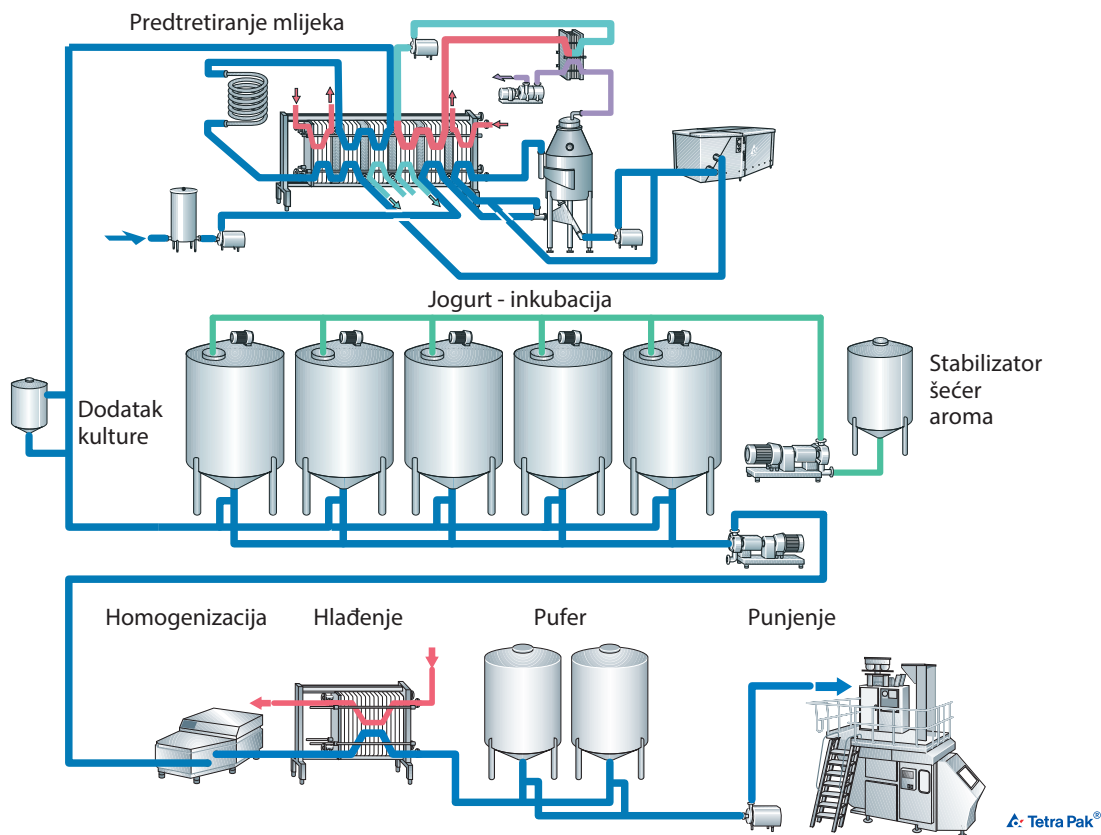
temperaturi 18 - 19 °C. Slijedi tehnološki postupak dodavanja pasterizirane otopine stabilizatora u pripremljeno fermentacijsko mlijeko i jednofazna hladna homogenizacija (~ 6 MPa). Za stabilizaciju teksture pitkog jogurta koristi se mješavina stabilizatora u količini 0,01 - 0,5 % koji sprječavaju nakupljanje i izdvajanje agregiranih proteina na površinu i osiguravaju zadržavanje poželjne viskoznosti. Za tu svrhu vrlo dobra svojstva pružaju metoksil-pektininski stabilizatori. U toj tehnološkoj fazi jogurtu se prema potrebi dodaju voće, voćne paste, voćni sirupi, voćne arome. Svrha naknadne hladne homogenizacije u proizvodnji pitkog jogurta je: (i) oblikovanje malih kazeinskih čestica koje se mogu povezivati sa stabilizatorom, (ii) smanjenje viskoziteta radi postizanja poželjne rjeđe konzistencije i (iii) postizanje homogene strukture osnovnog proizvoda ili dodataka poput voća. Slijedi aseptičko punjenje, najčešće u plastične boce, a ako se prije punjenja koristi filtriranje, preporučuje se prethodno hlađenje jogurtne osnove na temperaturu od 5 °C prolaskom kroz pločasto hladilo.

5.2.7.

Voćne varijante jogurta

Voćne varijante jogurta međusobno se primarno razlikuju prema raspodijeli voća u jogurtu. Poput svojih prirodnih varijanti, voćni jogurti prema svojstvima gel-strukture mogu biti čvrsti, tekući ili pitki voćni jogurti. Često, zbog poboljšanja izgleda i arome dodanog voća, voćni jogurti sadrže dodatke boja, aroma, šećera ili istovremeno sadrže sva tri dodatka. Korištenje svježeg voća zbog velikog rizika od kvarenja u proizvodnji voćnih jogurta je ograničeno. Umjesto svježeg voća, najčešće se koriste voćni pripravci ili voće konzervirano zamrzavanjem. Osnovni su postupci u pripremi voćnog pripravka:

- u jednom procesnom spremniku u vodi, koja čini 50 %, miješa se voće sa 75 % šećera, a za konzervans se uobičajeno koriste kalijev sorbat (~1000 mg kg⁻¹) i Na benzoat (~300 mg kg⁻¹)



Slika 5.15.

Shematski prikaz linije za proizvodnju pitkog jogurta. (Bylund, 1995., s dopuštanjem Tetra Paka.)

- u drugom procesnom spremniku miješa se škrob s preostalim 50 % vode
- mješavina iz drugog spremnika doda se u mješavinu prvog spremnika, nakon čega se voćni pripravak zagrijava na temperaturu 37 - 38 °C/3 min
- voćnom pripravku dodaju se boje i arome nakon čega slijedi toplinska obrada pripravka na temperaturi 88 - 93 °C/3 min
- toplinski obrađen voćni pripravak se aseptički puni i pohranjuje do korištenja.

Prednosti su pripremljenih voćnih pripravaka u odnosu na svježe voće: (i) sigurnost od kontaminacije

kvascima i plijesnima, (ii) mogu se dodati, ako je potrebno, točno određene količine boje voću za ujednačen izgled i (iii) stupanj slatkoće voća može se korigirati dodatkom šećera.

Tehnološki, ako je voće u jogurtu jednolično raspoređeno kroz cijelu masu proizvoda u praksi se najčešće koristi takozvani švicarski ili francuski način proizvodnje, ali i njihove modifikacije.

Švicarska varijanta voćnog jogurta može se opisati kao homogena mješavina voća ili voćnog pripravka ili voćnog sirupa s jogurtom osnovom koji ima blago kiseli okus. Konzistencija je glatka, mekana



Slika 5.16.

Izgled teksture švicarske varijante voćnog jogurta.

ali dovoljno gusta da se jogurt može konzumirati žlicom a gel-struktura je manje izražena (slika 5.16.) Karakteristika te varijante voćnog jogurta je i izostanak postacidifikacije do vremena njegove održivosti.

Za stabiliziranje gel-strukture i više "prirodni izgled" proizvoda u proizvodnji švicarske varijante voćnog jogurta se najčešće koristi kombinacija različitih

stabilizatora. Obično, za tu namjenu koristi se želatina-pektin ili agar-pektin u koncentraciji 0,4 - 1,6 %. Udjel mliječne masti u punomasnim varijantama je $\geq 3,25$, u djelomično obranim ili niskokaloričnim od 0,5 - 2,0 % a u bezmasnim varijantama jogurta je $\leq 0,5$ %. Kombinacija se voća/voćnog pripravka/sirupa dodaje u količini 6 - 35 %, a ravnomjerno je raspoređena kroz cijeli jogurt. Količinu šećera u jogurtu određuje udjel šećera sadržan u voću/voćnim pripravcima. Standardni sastav švicarskog jogurta (bez udjela dodanog voća) prikazan je u tablici 5.3.

Francuska varijanta voćnog jogurta prema načinu raspodjele voća u proizvodu slična je švicarskoj varijanti, ali se od nje razlikuje po znatno rjeđoj konzistenciji (slika 5.17).

Karakteristična slabije viskozna tekstura francuske varijante voćnog jogurta postiže se načinom obogaćivanja Sbm, izborom kulture i vrstama izabranih stabilizatora. Obogaćivanje udjela Sbm se najčešće obavlja jednim od mehaničkih postupaka, evaporacijom, ultrafiltracijom ili reverznom osmozom. Za inokulaciju mlijeka koristi se kultura sastavljena od bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost tvorbe EPS. Za sprječavanje sinereze i poboljšanja reoloških svojstava teksture koriste se prirodni i sintetski stabilizatori ili se za tu namjenu koriste pripravci proteina mlijeka.

U slučajevima raspoređenosti voća na dno ambalaže (slika 5.18.) koristi se jedan od dvaju mogućih tehnoloških postupaka pripreme jogurta. Klasičnim postupkom voće se dodaje u čašice i odmah se ulijeva netom inokulirano mlijeko. Cijeli se proces fermentacije voćnog jogurta odvija u prodajnoj ambalaži. Stabilizatori se u klasičnom načinu pripreme voćnog jogurta s voćem raspoređenim na dno ambalaže u

Tablica 5.3.

	Sastav	Bezmasni jogurt (%)	Niskokalorični jogurt (%)	Punomasni jogurt (%)
Standardni sastav švicarske varijante voćnog jogurta s različitim udjelom mliječne masti	Mliječna mast	$\leq 0,5$	0,5 - 2,0	$\geq 3,25$
	Sbm	11,0 - 12,0	10,5 - 12,0	10,5 - 11,0
	Udjel šećera	0,0 - 6,0	0,0 - 6,0	0,0 - 6,0
	Stabilizator	0,4 - 1,6	0,3 - 1,4	0,3 - 1,2

(prilagođeno prema Chandanu i O'Rellu , 2006.)



Slika 5.17.

Izgled teksture francuske varijante voćnog jogurta.



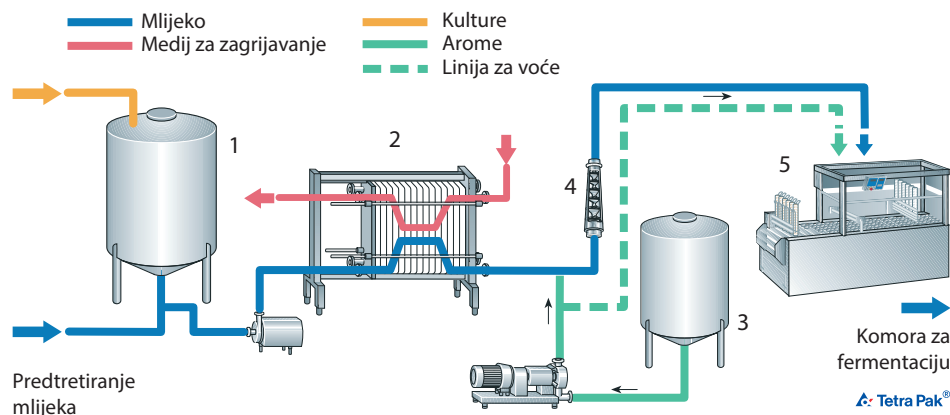
Slika 5.18.

Izgled čvrstog voćnog jogurta uz dodatak arome vanilije s voćem na dnu ambalaže.

principu ne koriste. Ponekad, preferira se dodatak malih količina pektina, agara ili želatine za povećanje stabilnosti gel-strukture jogurta tijekom manipulacije s jogurtom. Fermentacija mlijeka za te voćne varijante čvrstog jogurta koja je fizički organizirana u dvije odvojene faze zahtjeva obvezno korištenje stabilizatora. Oni se u mlijeko dodaju prije njegove homogenizacije. Postupak miješanja jogurtne osnove s voćem uključuje prebacivanje predfermentacijskog mlijeka pumpom u ambalažne čašice u koje je prethodno dodano voće. Nakon toga u prodajnoj ambalaži slijedi završna fermentacija voćnog jogurta. Prosječna količina voća u jogurtu dozirana na dno ambalaže je između 12 i 14 %. Osim na dnu ambalaže, čvrste varijante voćnog

jogurta imaju voće raspoređeno i na vrhu jogurtne osnove. Shematski prikaz načina dodatka voća čvrstom jogurtu prikazana je slikom 5.19.

Visina temperature miješanja voća s jogurtnom osnovom, neovisno o voćnoj varijanti jogurta, smatra se ključnom za dobru kvalitetu teksture finalnog proizvoda. Zbog toga, preporučuje se voće dodati jogurtnoj osnovi ohlađenoj na temperaturu ~ 20 °C. Više temperature miješanja voća s jogurtnom osnovom mogu biti uzrok previše nježne i pjeskovite teksture proizvoda. Također, za kvalitetu teksture tekućih varijanti jogurta treba izabrati brzinu miješanja koja ne može mehanički oštetiti već formiranu gel-strukturu jogurta. Za kvalitetu teksture čvrstoga voćnog jogurta s voćem na dnu



Slika 5.19.

Shematski prikaz dodatka voća čvrstom jogurtu.

Detalji: 1 spremnik za miješanje, 2 pasterizator, 3 spremnik za voće/arome, 4 statička miješalica, 5 punilica. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

ambalaže osobito je važno uskladiti pH i osmotski tlak između voća i jogurtne osnove. Tijekom fermentacije i neznatna razlika između pH vrijednosti i osmotskog tlaka jogurtne osnove i voća može biti uzrok grudaste ili pjeskovite teksture proizvoda.

5.2.8.

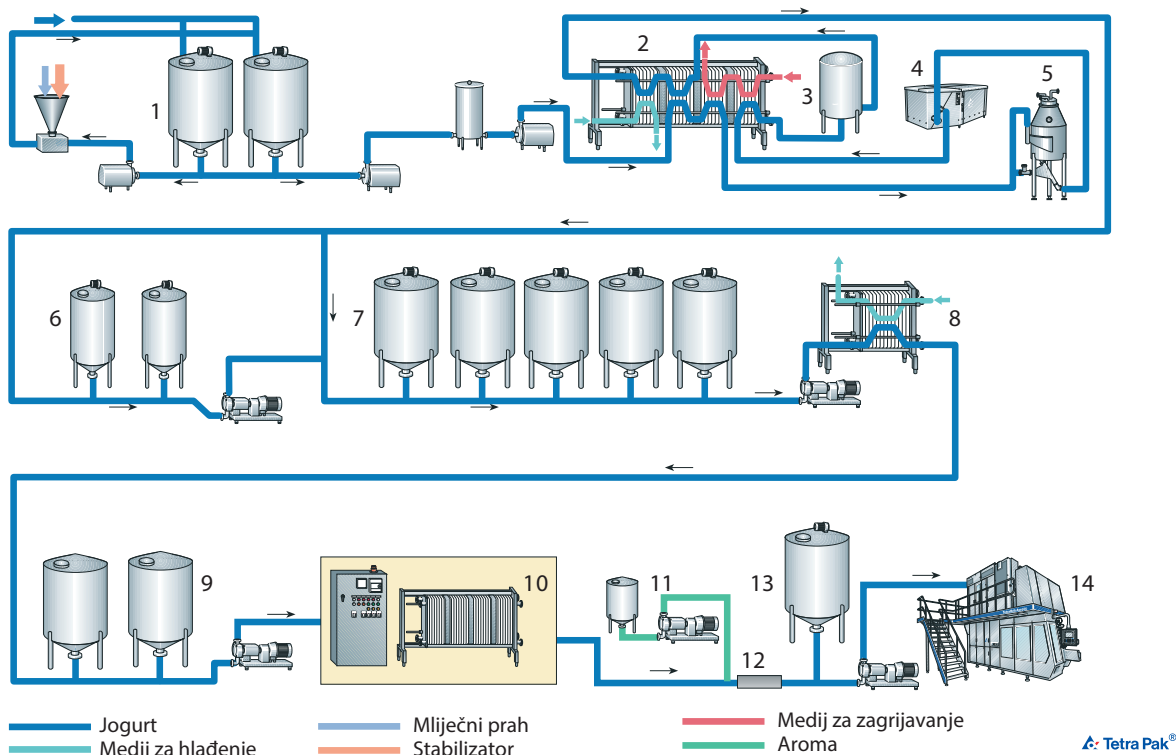
Jogurti s produženim vijekom održivosti

Čvrstom, tekućem i pitkom jogurtu izmijenjenim se tehnološkim operacijama proizvodnje može produžiti vijek održivosti na policama. Za tu namjenu, uobičajena su dva načina:

- proizvodnja i pakiranje u potpuno aseptičkim uvjetima
- druga toplinska obrada gotovog proizvoda prije ili nakon pakiranja.

Nakon proizvodnje jogurta za produženje njegovog vijeka održivosti u potpuno aseptičkim uvjetima provodi se druga toplinska obrada (i) za čvrsti jogurt u prodajnoj ambalaži na temperaturi 60 - 70 °C/30 min, a (ii) za tekući i pitki jogurt zagrijavanjem formiranog gela u proizvodnom spremniku na temperaturi 60 - 70 °C tijekom nekoliko sekundi. U uvjetima aseptičkog punjenja i hladne pohrane vijek je održivosti tih proizvoda do dva mjeseca. Proizvodi li se jogurt koji se može pohraniti na sobnim temperaturama, druga toplinska obrada provodi se na temperaturama 135 - 145 °C tijekom nekoliko sekundi. Tehnološka linija za proizvodnju tekućeg jogurta s produženim vijekom održivosti shematski je prikazan slikom 5.20.

Temperature dvostruke toplinske obrade uzrok su smanjuju viskoziteta i povećanju predispozicije jogurta za sinerezu. Zbog toga je u proizvodnji tih varijanti jogurta neophodno korištenje stabilizatora. Osim toga, nakon druge toplinske obrade bakterije iz sastava jogurtne kulture više nisu prisutne u jogurtu a prema europskoj legislativi ti se proizvodi ne smiju označavati imenom jogurt.



Slika 5.20.

Shematski prikaz kompletne linije za proizvodnju pitkog jogurta s produženim vijekom održivosti.

Detalji: 1 spremnici za miješanje, 2 pasterizator, 3 spremnik za zadržavanje, 4 homogenizator, 5 deaerizator, 6 spremnici za kulturu, 7 fermentacijski spremnici, 8 pločasto hladilo, 9 puferni spremnik, 10 UHT sterilizacija, 11 aseptičko doziranje voća, 12 statična miješalica, 13 aseptički puferni spremnik, 14 aseptička punilica. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

5.2.9.

Koncentrirani jogurt

Koncentrirane (ocijeđene) varijante jogurta proizvode se u mnogim zemljama i nose različita lokalna imena. Konzistencijom i okusom one su vrlo slične pa je tako labneh sinonim za koncentrirani jogurt u zemljama Srednjeg istoka, a grčki jogurt u Europi i SAD-u. Prihvatanje imena grčki jogurt za koncentriranu varijantu jogurta proizašlo je iz uspješnoga

grčkog marketinga koji je od grčkoga standardnoga (neocijeđenog) jogurta stvorio robnu marku.

U svijetu, od koncentriranih jogurta najpoznatiji su skyr (Irska) i ymer (Danska). U Hrvatskoj, takav jogurt je lička basa (slika 5.21.), koju mnogi krivo nazivaju svježim sirom.

Tradicionalnim postupkom koncentrirani se jogurt proizvodio tako da se nakon završene fermentacije jogurt stavljao u sirarske marame i ostavljao cijediti preko noći na temperaturi ~ 4 °C. Posljedično, zbog



Slika 5.21.

Izgled teksture ličke base.

ocijeđene sirutke suha tvar jogurta povećavala se od približno 14 na 21 - 25 %, a udjel masti na 8 - 10 %. Zbog promijenjenoga kemijskog sastava dobiveni proizvod imao je izraženo gusto viskoznu teksturu i kiselost 1,8 - 2,0 % izraženu udjelom mliječne kiseline.

Svojstva industrijski proizvedenoga koncentriranog jogurta vrlo su slična tradicionalno proizvedenom ocijeđenom jogurtu, a za povećanje suhe tvari (ST) u suštini se koriste tri načina:

- poželjan udjel ST (~ 24 %) postiže se koncentriranjem toplog jogurta s niskim udjelom mliječne masti mlaznično-ispusnim separatorom (kvar separatori), a za povećanje udjela mliječne masti

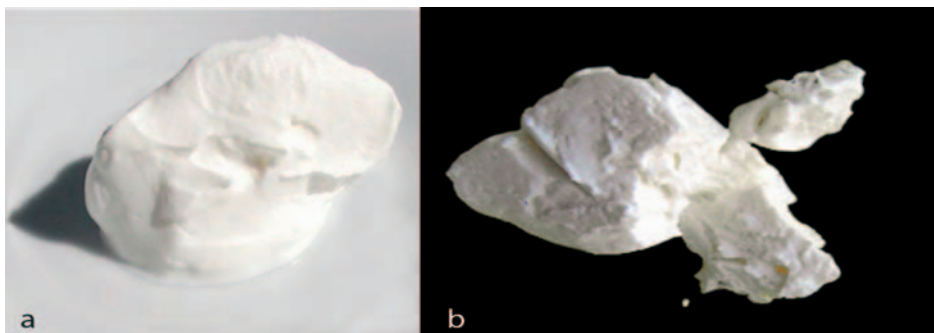
u proizvodu (~ 10 %) naknadno se dodaje pasteurizirano vrhnje

- poželjan udjel ST postiže se membranskom filtracijom, najčešće ultrafiltracijom (UF) punomasnog jogurta (pH-4,6) na temperaturi 30 - 50 °C. U odnosu na korištenje centrifugalnih separatora, UF omogućava zadržavanje većeg udjela proteina u proizvodu
- poželjan udjel ST postiže se procesom predkoncentriranja mlijeka pa nije potrebna centrifugalna separacija.

Koncentrirani klasični grčki jogurt proizvodi se od punomasnog mlijeka dodatno obogaćenog vrhnjem ili uljem maslaca. Zbog iscijeđene sirutke, koja se danas izdvaja mehanički ali još uvijek i tradicionalnim načinom, proizvod sadrži 14 - 21 % suhe tvari (ST) a udjel je mliječne masti 7 - 10 %. Zbog visokih udjela ST i masti, konzistencija grčkog jogurta je gusto kremasta a okus blago kiseli. Za usporedbu slika 5.22. prikazuje izgled grčkog jogurta i labneha.

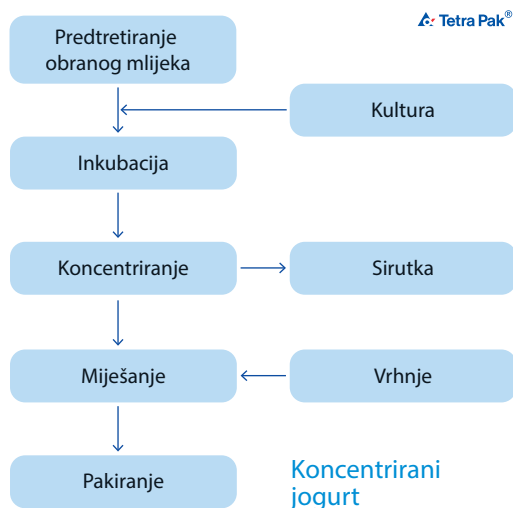
Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji koncentriranog jogurta objedinjuje slika 5.23.

Varijante koncentriranoga grčkog jogurta (ali i drugih koncentriranih jogurta/kiselog mlijeka) proizvode se i bez postupka koncentriranja. Postupak uključuje pripremu rekonstituranoga obranoga ili punomasnog mlijeka u prahu, u koje se po potrebi dodaju mliječna mast u prahu i stabilizatori. Omjer sastojaka dodanih mlijeku kemijski mora odgovarati kemijskom



Slika 5.22.

Izgled teksture koncentriranog jogurta proizvedenog na tradicionalan način (a) grčki jogurt, (b) labneh.



Slika 5.23.

Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji koncentriranog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

sastavu koncentriranog jogurta proizvedenog postupkom cijedenja. Tehnološki, postupak proizvodnje tako proizvedenog jogurta gotovo je identičan proizvodnji tekućeg ili alternativno čvrstog jogurta. Nakon završene fermentacije jogurt se pakira na sobnoj temperaturi i do potrošnje pohranjuje na temperaturu 2 - 4 °C. Slika 5.24. prikazuje izgled teksture industrijski proizvedene varijante grčkog jogurta.



Slika 5.24.

Izgled teksture industrijski proizvedene varijante grčkog jogurta.

Od svih vrsta mlijeka u proizvodnji koncentriranog jogurta najviše se zbog blagog okusa koristi kravlje mlijeko. Naime, okus koncentriranoga ovčjeg i kozjeg jogurta previše je oštar/opor, a dodatno konzistencija koncentriranoga kozjeg jogurta je slabija. Okus ocijeđenog jogurta u usporedbi sa standardnim jogurtom izraženiji je i sadržava veći udjel proteina koji dodatno pridonose glatkoći njegove gusto viskozne teksture.

5.2.9.1.

—
Skyr

Skyr je tradicionalno vrlo popularno fermentirano mlijeko koje se u Irskoj, kako je zabilježeno, proizvodilo još u 10. stoljeću. Originalno se skyr proizvodio od obranoga ovčjeg mlijeka, ali se poslije za njegovu proizvodnju koristilo i kravlje mlijeko. Sve do početka 1990-ih proizvodnja skyra zadržala je u potpunosti tradicionalan način pripreme i obrade fermentacijskog mlijeka. Obrano se mlijeko zagrijavalo na temperaturu 90 - 100 °C ili se jednostavno zakuhalo. Potom se mlijeko ohladilo na temperaturu od 40 °C i inokuliralo s ~ 15 g/L vodom razrijeđenog skyra od prethodne proizvodnje, uz istovremeni dodatak sirila u približnoj količini od 6 mL 100 L⁻¹ mlijeka. Nakon inokulacije mlijeka kulturom uz dodatak sirila slijedila je fermentacija 4,5 - 5,5 sati. Odnosno, fermentacija je trajala tako dugo dok nije postignuta pH-vrijednost fermentacijskog mlijeka od 4,7. Potom se fermentacijsko mlijeko hladilo na 18 - 20 °C i ostavljalo stajati



Slika 5.25.

Izgled teksture industrijski proizvedenog skyra. (CC BY-SA 3,0.)

oko 18 sati ili do pH - 4,2, nakon čega se ono izlivalo u lanene vreće da se iscijedi sirutka. Cijedenje skyra tijekom 6 sati provodilo se na temperaturi 19 - 20 °C, a nakon toga još 18 sati ali na temperaturi 6 - 8 °C. Za proizvodnju 1 kg skyra treba otprilike 5 L mlijeka.

Današnja se tehnologija proizvodnje skyra temelji na visokoj toplinskoj obradi obranog mlijeka (93 °C/2 - 3 minute), nakon koje slijedi hlađenje na ~ 40 - 42 °C i inokulacija kulturom (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* i laktosa fermentativni kvasci) u količini 0,1 - 0,5 %. Zatim se doda sirilo (kimozi) u količini od 0,005 % i dobro izmiješa. Slijedi prva fermentacija tijekom ~ 5 sati, a potom hlađenje na 20 °C i nastavak fermentacije tijekom sljedećih 18 - 20 sati da se omogući rast kvasaca i postigne pH-vrijednost proizvoda od ~ 4,2. Sirutka se iz jogurta uklanja mehanički korištenjem mlaznično-ispusnog separatora (kvar separatori). Istodobno iz sirutka se ultrafiltracijom izdvajaju proteini koji se potom pasteriziraju i u formi denaturiranih proteina dodaju ocijedenom skyru radi povećanja njegove

gustoće. Industrijski proizvedeni skyr (slika 5.25.) sadrži: 82,5 % vode, 17,5 % suhe tvari, 13,3 % proteina, 2,4 % laktoze, 0,8 % minerala, 0,4 % masti i 0,3-0,5 % alkohola. Osim u Irskoj skyr se od 1990. godine proizvodi i u Danskoj.

5.2.10.

Zamrznuti jogurt

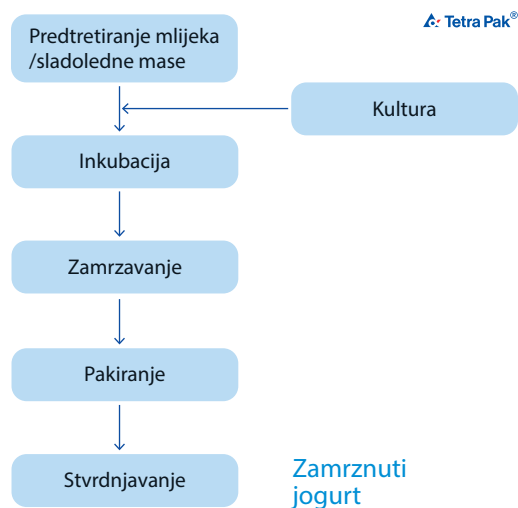
Zamrznuti jogurt proizvodi se tako da se prvo proizvede tekući jogurt koji se miješa s pasteriziranom mješavinom stabilizatora i sladila prije zamrzavanja u zamrzivačima za proizvodnju sladoleda. Također, voće i arome, prema želji, dodaju se jogurtu prije zamrzavanja. Za dobra svojstva zamrzavanja i topljenja udjel suhe tvari (ST) u tekućem jogurtu treba biti 13 - 14 %, a u njegovoj voćnoj varijanti 20 - 25 %. Izgled teksture zamrznutog voćnog jogurta prikazuje slika 5.26.

Zamrzavanje jogurta na temperaturi od -26 do -30 °C provodi se naglo, a jogurt na istim temperatura- ma može biti pohranjen između tri i dvanaest mjeseci.



Slika 5.26.

Izgled teksture zamrznutog voćnog jogurta. (CC BY-SA 3,0.)



Slika 5.27.

Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji zamrznutog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

Prije potrošnje topljenje zamrznutog jogurta provodi se njegovom hladnom pohranom na temperaturi od 5 do 7 °C tijekom 24 - 36 sati. Hranjiva i velikim dijelom organoleptička svojstva tako zamrznutog i otopljenog jogurta se ne mijenjaju. Zbog dodanog stabilizatora koji ima i zaštitnu funkciju preživljavanje bakterija iz sastava jogurtne kulture u zamrznutom je jogurtu najmanje 10^7 cfu mL⁻¹.

U nekim se zemljama, osobito u SAD-u i zemljama engleskoga govornog područja, pod imenom zamrznuti jogurt proizvodi zapravo jogurti sladoled. U načelu, proizvodnja jogurtnog sladoleda organizirana je na jedan od dvaju načina:

- jogurt i sladoled proizvode se odvojeno, a potom se miješaju u različitim omjerima ali najčešće u kombinaciji 30 % jogurt i 70 % sladoled
- inokulacijom sladoledne smjese s jogurtnom kulturom (~ 4 - 6 %) i njezinom fermentacijom prije zamrzavanja (identični proces kao u proizvodnji jogurta) na temperaturi 40 - 43 °C između 6 i 16 sati.

Prema europskoj legislativi, prvim načinom pripremljeni "jogurti sladoled" ne smije u imenu proizvoda sadržavati riječ jogurt ako kombinacija jogurta u odnosu na sladolednu smjesu nije veća od 30 %. U slučajevima da ona prelazi 30 %, tada proizvod u svom nazivu smije sadržavati riječ jogurt ali kao složenicu naziva (kompozitni jogurt ili jogurt na bazi sladoleda). U praksi, za proizvodnju sladoledne smjese inokulirane jogurtom kulturom može se koristiti linija za proizvodnju tekućeg jogurta. Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji zamrznutog jogurta objedinjuje slika 5.27.

5.2.11.

Jogurt u prahu

Jogurt u prahu ili osušeni jogurt prvenstveno je namijenjen potrošačima koji sami za sebe žele pripremiti jogurt. U osušenoj formi jogurt zadržava svoju stabilnost tijekom dugog perioda pohrane, a nakon rehidracije odmah je spreman za konzumaciju. Jogurt u prahu se može koristiti i kao dodatak u proizvodnji različitih vrsta hrane i u konditorskoj industriji.

Ideja proizvodnje osušenog jogurta preuzeta je od pustinjskih nomada koji su proizvedeni jogurta jednostavno sušili na suncu. Osušeni jogurt proizvodili su gotovo svi nomadi od zapadne Azije pa sve do Turkistana, a koristili su ga kao samostalnu namirnicu, kao dodatak kuhanim jelima ili jednostavno kao desert uz čaj.

Komercijalno, jogurt u prahu najčešće se proizvodi sprej-metodom sušenja (premda postoje i drugi načini), koja obuhvaća tri proizvodne faze. U prvoj fazi jogurt se najprije koncentrira na 35 g 100 g⁻¹ suhe tvari i prebacuje u odjeljak postrojenja za sušenje, te slijedi druga proizvodna faza. Ulazna temperatura zraka za sušenje u drugoj je fazi 160 a izlazna 65 °C. Poluosušene čestice jogurta u drugoj fazi padaju na dno odjeljka, gdje se nastavljaju sušiti na podno ugrađenoj fluidnoj sušilici sustava. Završno sušenje i hlađenje obavljaju

se prebacivanjem jogurtne prahe u eksterni odjeljak sustava koji također sadrži ugrađenu podnu fluidnu sušilicu. Tijekom završnog sušenja temperatura proizvoda je približno 55 °C, a izlaznog prahe približno 25 °C. Usporedno, da se postignu najviši prinosi, sprej-metoda sušenja sadrži i sustav ciklotrona kojim je iz zraka moguće izdvojiti preostale fine čestice prahe jogurta. Za postizanje ugodnog okusa, čvrstoće teksture i atraktivnog izgleda nakon rehidracije, u proizvodnji jogurta namijenjenog za sušenje koriste se aditivi poput saharoze ili dekstroze, stabilizatori, i tvari za odvajanje poput Ca-precipitata, organskih kiselina i acidogena. Osim jogurtne kulturom, fermentacija mlijeka može se provesti i drugim kulturama. Primjerice, može se koristiti kultura koja sadrži bakterije *S. thermophilus* i *L. helveticus*, ili jogurtna kultura (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) koja sadrži još i *L. acidophilus*.

Isti postupak sušenja može se primijeniti i na veliku većinu svih ostalih klasičnih fermentiranih mlijeka.

Prosječan kemijski sastav (g 100 g⁻¹) osušenog jogurta proizvedenog od kravljeg mlijeka sadrži: 96 - 98 % suhe tvari, 33 - 35 % proteina, 1 - 4 % masti, 52 - 54 % laktoze i 5,6 - 7,0 % pepela. Udjel vode osušenog jogurta je približno 2 g 100 g⁻¹, pH 4,2 - 4,5, a preživljavanje bakterija iz sastava jogurtne kulture između 10⁴ i 10⁵ cfu g⁻¹.

5.2.12.

Upjenjeni jogurt

Upjenjeni jogurt svoju jedinstvenu kvalitetu zahvaljuje pjenastoj laganoj teksturi koja pruža poseban užitak okusa u ustima. U usporedbi s tekućim jogurtom upjenjeni jogurt sadrži više šećera i stabilizatora, a za razliku od ostalih jogurta sadrži i emulgatore. Mješavina stabilizatora - emulgatora dodaje se mlijeku prije njegove toplinske obrade. Nakon fermentacije, jogurt se upjeni inertnim plinom na niskim temperaturama (< 5 °C) do povećanja volumena od 50 %. Tijekom pjenjenja koristi se jaka turbulencija pri kojoj

nastaju sitni mjehurići zraka koji se disperziraju u vodenoj fazi mješavine zraka i jogurta. Postupkom aeracije koja slijedi veliki mjehurići zraka dezintegriraju sitne mjehuriće, a rezultat je formiranje željene pjenaste strukture jogurta dobre viskoznosti. Nakon završetka postupka, pjenasta struktura proizvoda sastavljena je od masnih globula, mjehurića zraka i vodene faze koja sadrži topljive i netopljive komponente sadržane u pripremljenoj mješavini.

Dodani emulgatori tijekom pjenjenja reduciraju površinsku napetost, čime je olakšano formiranje mjehurića zraka. Istodobno, oko mjehurića zraka stabilizatori oblikuju omotač određene čvrstoće koji povećava njihovu stabilnost, te oni postaju postojani. Od emulgatora, uobičajeno se koriste monoacilgliceroli i diacilgliceroli, a od stabilizatora škrob, želatina, karagen, guar guma i ksantin guma. Korištenjem niskih temperatura tijekom tehnološkog postupka pjenjenja sprječava se naknadno izdvajanje sirutke, ali i kolaps pjenaste strukture u finalnom proizvodu. U cilju dobivanja potpunijega i boljeg okusa, ali i zbog boljih svojstava pjenjenja, upjenjeni se jogurt ne proizvodi od obranog mlijeka.

5.2.13.

Ovčji i kozji jogurt

5.2.13.1.

Ovčji jogurt

Ovčji jogurt, u usporedbi s jogurtom proizvedenim od kravljeg mlijeka, na tržištu je prisutan u znatno manjim količinama. Prvenstveno, razlog zastupljenosti relativno malih količina ovčjeg jogurta na tržištu sezonski je karakter proizvodnje ovčjeg mlijeka. U Europi, proizvodnja ovčjeg jogurta vezana je za sredozemne zemlje, osobito Grčku i Tursku, a proizvodi se u čvrstoj i tekućoj varijanti. Zbog prirodno značajno većeg udjela suhe tvari (~ 14 - 18 %) i proteina

(> 5 %) u usporedbi s kravljim i kozjim mlijekom, u proizvodnji ovčjeg jogurta nije potrebno obogaćivanje bezmasne suhe tvari (Sbm) mlijeka. Ostali su tehnološki postupci u proizvodnji ovčjeg jogurta slični proizvodnji jogurta od kravljeg mlijeka. Međutim, zbog znatno većeg udjela Sbm u ovčjem mlijeku, za toplinsku obradu mlijeka preporučuje se koristiti jedino visoke temperature (90 - 95 °C/10 - 5 min) toplinske obrade. Visoke temperature toplinske obrade poboljšavaju reološka svojstva ovčjeg mlijeka pa se postiže skraćivanje vremena njegove fermentacije na 4 - 5 sati. Također, za poboljšanje reoloških svojstava jogurta poput čvrstoće gel-strukture i smanjenja predispozicije za sinerezu preporučuje se koristiti dvofaznu homogenizaciju (14 MPa/3,5 MPa). U smislu izbora kulture, dobre karakteristike imaju kulture koje sadrže sojeve bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolirane iz grčkog jogurta. Osim tih kultura za proizvodnju ovčjeg jogurta na tržištu su dostupne i kulture drukčijeg sastava koje također imaju povoljan utjecaj na reološka svojstva jogurta. Ovčje mlijeko zbog svog kemijskog sastava i fizikalnih osobina ima i dobra svojstva za proizvodnju probiotičkih ovčjih jogurta.

S obzirom na to da ovčje mlijeko u proizvodnji jogurta nije potrebno obogaćivati, ovčji jogurt se na temelju vlastitih prirodnih hranjivih i funkcionalnih svojstava može svrstati u skupinu funkcionalne hrane. Osim toga, na temelju vlastitih rezultata istraživanja ovčji jogurt s dobrim reološkim svojstvima moguće je proizvesti i korištenjem znatno nižih temperatura toplinske obrade mlijeka (60 °C/5 min). Jogurt proizveden uz nižu temperaturu toplinske obrade u usporedbi s jogurtom proizvedenim standardnom temperaturom toplinske obrade mlijeka (95 °C/5 min) zadržava sve kvalitativne, kvantitativne i funkcionalne karakteristike dobrog jogurta. U konkretnom slučaju, za proizvodnju ovčjeg jogurta korištena je liofilizirana DVS jogurtna kultura (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; LB Bulgaricum BY, Bugarska) i DVS probiotička kultura (*L. rhamnosus* ATCC 53103; Christian Hansen, Danska). Nakon toplinske obrade mlijeko je homogenizirano na temperaturi od 55 °C uz tlak od 15 MPa. Fermentacija jogurta na temperaturi od 43 °C prekinuta je naglim hlađenjem na temperaturu

Tablica 5.4.

Kvalitativne karakteristike ovčjeg jogurta proizvedenog toplinskom obradom mlijeka na temperaturi od 65 °C/5 min i temperaturi od 95 °C/5 min nakon 21 dana pohrane na temperaturi od 4 °C

Kvalitativno svojstvo	60°C/5 min	95°C/5 min
<i>S. thermophilus</i>	7,58*	8,22*
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	7,38*	8,02*
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	7,35*	7,81*
pH	4,3	4,19
Mliječna kiselina (g/100 g)	0,98	1,1
Ukupni proteini (g/100 g)	4,20	4,10
Mliječna mast (g/100 g)	5,32	5,32
Ukupni proteini sirutke (g/100 g)	0,70	0,4
Sinereza (%)	33,83	29,70

* Preživljavanje bakterija (log cfu/g)

od 4 °C, kada je jogurt postigao vrijednost pH ~ 4,6 (~ 5,50 sati). Tablica 5.4. prikazuje usporedne kvalitativne karakteristike ovčjeg jogurta proizvedenog nestandardnom toplinskom obradom (60 °C/5 min) i standardnom toplinskom obradom mlijeka (95 °C/5 min) nakon 21 dana hladne pohrane (4 °C).

Iz rezultata jasno se vidi da niža temperatura toplinske obrade ovčjeg mlijeka nije negativno utjecala na: (i) stupanj preživljavanja bakterija iz sastava korištenih kultura (> 10⁷ cfu mL⁻¹ za vrste iz jogurtne kulture i > 10⁶ cfu mL⁻¹ za probiotički soj *L. rhamnosus* ATCC 53103) i (ii) značajno viši stupanj sinereze, smanjenu koncentraciju mliječne kiseline i povećanje ili smanjenje poželjne pH-vrijednosti jogurta. Istovremeno, vidljivo je da je udjel nedenaturiranih ukupnih proteina sirutke u jogurtu proizvedenom nižom temperaturom toplinske obrade približno 93,0 % (sirovo ovčje mlijeko ~ 0,77 g 100 g⁻¹ proteina sirutke). Na temelju se tih rezultata istraživanja može pretpostaviti da postoji velika vjerojatnost da niže temperature toplinske obrade mlijeka, osim očuvanja hranjive vrijednosti, pogoduju i očuvanju bioaktivnih peptida u jogurtu. Naime, bioaktivni peptidi tijekom fermentacije mlijeka deriviraju se iz kazeina i proteina sirutke. Posljedično nižim temperaturama toplinske obrade mlijeka velika je vjerojatnost da ovčji jogurt sadrži



Slika 5.28.

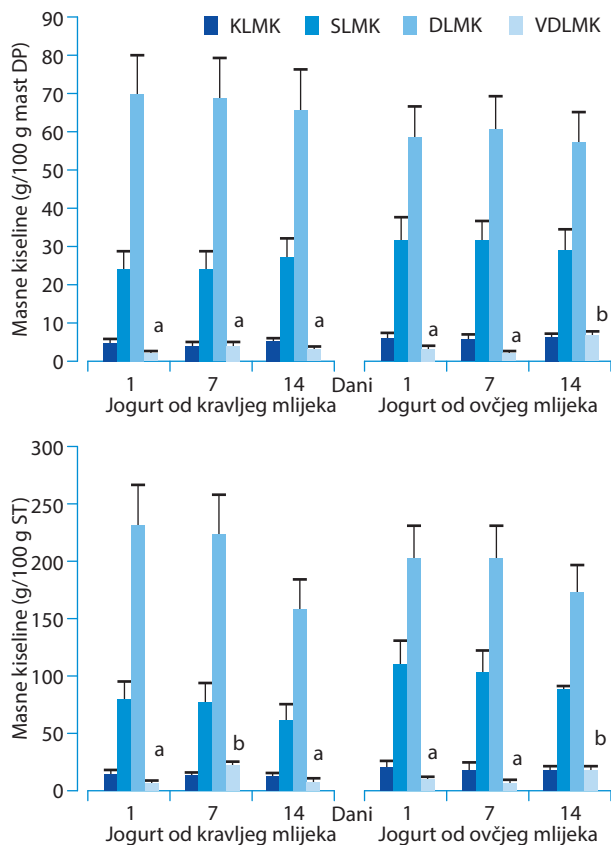
Izgled teksture ovčjeg jogurta proizveden nestandardnom toplinskom obradom mlijeka (65 °C/5 min).

veći udjel bioaktivnih peptida deriviranih iz nepromijenjenih proteina sirutke a osobito α -laktalbumina i β -laktoglobulina. Izgled teksture ovčjeg jogurta proizveden nestandardnom toplinskom obradom mlijeka (65 °C/5 min) prikazan je na slici 5.28.

U nutritivnom i funkcionalnom smislu, u usporedbi s jogurtom proizvedenim od kravljeg mlijeka, ovčji jogurt sadrži i značajno višu koncentraciju slobodnih masnih kiselina:

- konjugiranih linolnih kiselina
- kratkolančanih masnih kiselina
- srednjelančanih masnih kiselina
- dugolančanih masnih kiselina
- vrlo dugolančanih masnih kiselina.

Koncentracija konjugirane linolne kiseline (CLA) osobito omega - 3 masnih kiselina se povećava tijekom pohrane jogurta od 14 dana. Istodobno se u istom razdoblju pohrane jogurta proizvedenog od kravljeg

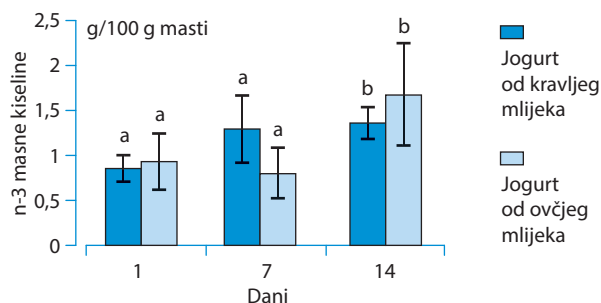


Slika 5.29.

Promjene koncentracija slobodnih masnih kiselina u kravljem i ovčjem jogurtu tijekom pohrane.

Detalji: različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Kratice: KLMK - kratkolančane masne kiseline, SLMK - srednjelančane masne kiseline, DLMK - dugolančane masne kiseline, VDLMK - vrlo dugolančane masne kiseline, DP - dostupna porcija, ST - suha tvar. (Serafeimidou i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

mlijeka koncentracija CLA snižava. Povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina tijekom pohrane ovčjeg jogurta pripisuje se specifičnim svojstvima i osobinama ovčjeg mlijeka. Promjene u koncentraciji slobodnih masnih kiselina tijekom pohrane ovčjeg



Slika 5.30.

Promjene ukupnih omega-3 masnih kiselina u kravljem i ovčjem jogurtu tijekom pohrane.

Detalji: različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Kratice: ALA - α -linolna kiselina, EPA - eikozapentaenska kiselina, DHA - dokozaheksaenska kiselina). (Serafeimidou i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

jogurta prikazuje slika 5.29., a promjene u koncentraciji konjugiranih linolnih kiselina (CLA) slika 5.30. Veća koncentracija slobodnih masnih kiselina u ovčjem jogurtu u usporedbi s kravljim i kozjim jogurtom značajno pridonosi dnevnim hranjivim i funkcionalnim potrebama nužnim za očuvanje dobrog zdravlja čovjekova organizma.

5.2.13.2.

Kozji jogurt

Potvrđene znanstvene činjenice da je kozje mlijeko lakše probavljivo i da sadrži niži udjel alergena u odnosu na kravlje, i da ima dobra nutritivna i terapijska svojstva, u posljednjih su nekoliko godina razlog povećanja proizvodnje i potrošnje kozjeg jogurta. Tehnološki, zbog specifičnog sastava kozjeg mlijeka, poput nižeg udjela kazeina i veće disperzije kazeinskih micela, i vrlo niskog udjela α_{s1} -CN ili njegova potpunog izostanka, nije jednostavno postići dobra reološka svojstva jogurta. U usporedbi s jogurtom

koji se proizvodi od kravljeg ili ovčjeg mlijeka, tekstura kozjeg jogurta obično je slabija (nježnija), gotovo polutekuća, viskoznost je niža, a često izostane i karakteristična aroma jogurta. Viskozitet kozjeg jogurta znatno je niži od kravljeg jogurta i u onim slučajevima ako se kozji jogurt proizvodi dodatkom viskozne EPS (+) jogurtne kulture. Također, kako kozje mlijeko u usporedbi s kravljim i ovčjim mlijekom ima slabiji puferni kapacitet postacidifikacija jogurta tijekom pohrane nije rijetka pojava. Zbog specifičnog sastava kozjeg mlijeka i slabijeg pufernog kapaciteta katabolička aktivnost bakterija iz sastava jogurtne kulture u kozjem je mlijeku znatno jača. Iz laktoze bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tako u kozjem mlijeku stvara veću koncentraciju mliječne kiseline a dodatno ima i jače proteolitičko djelovanje. Pojačana katabolička aktivnost, pretpostavlja se, dovodi do inhibicije kulture, a indirektno ona može biti povezana i s jakim kozjim okusom kao posljedica znatno više koncentracije slobodnih masnih kiselina u kozjem u odnosu na kravlje mlijeko. Istodobno niska koncentracija acetaldehida u kozjem u usporedbi s jogurtom od kravljeg i ovčjeg mlijeka pripisuje se relativno visokoj koncentraciji glicina u kozjem mlijeku. Naime, aminokiselina glicin može inhibirati konverziju aminokiseline treonin u acetaldehid, te izostaje karakteristična aroma jogurta.

Upravo zbog specifičnosti sastava, svojstava i osobina kozjeg mlijeka, u tehnologiji proizvodnje jogurta koriste se različiti načini obogaćivanja suhe tvari, i različite temperature homogenizacije i toplinske obrade mlijeka.

Korištenje membranskih tehnika evaporacije u vakuumu (EV) ili ultrafiltracija (UF) za obogaćivanje bezmasne suhe tvari (Sbm) mlijeka ima povoljniji učinak na reološka svojstva kozjeg jogurta od dodatka mliječnih ingredijenata i stabilizatora. Retentat kozjeg mlijeka dobiven UF može se koristiti i za poboljšanje karakteristika pitkih varijanti kozjeg jogurta. U tom slučaju kozje se mlijeko homogenizira uz tlak od približno 20 MPa i toplinski obradi na temperaturi od 85 °C tijekom 15 - 30 minuta. Ipak, neovisno o izboru načina obogaćivanja suhe tvari za poželjna reološka

svojstva kozjeg jogurta preporučuje se standardizirati suhu tvar (ST) mlijeka na 16 - 18 %. Istodobno potreban je niži stupanj obogaćivanja ST kozjeg mlijeka (12 - 14 %) ako se čvrsti kozji jogurt proizvodi dodatkom transglutaminaze (TGaze).

U slučajevima ako se za proizvodnju kozjeg jogurta koristi viskozna jogurtna kultura EPS (+), preporučuje se toplinsku obradu mlijeka provesti na temperaturi od 90 °C tijekom najmanje 5 min. Također, dobri rezultati reološke kvalitete čvrstoga probiotičkoga kozjeg jogurta proizvedenog s komercijalnom kulturom ABT-2 (*S. thermophilus* ST-20, *L. acidophilus* LA-5 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) postižu se obogaćivanjem kozjeg mlijeka s 3 % koncentrata proteina sirutke (KPS). Glavne prednosti dodatka KPS kozjem mlijeku ogledaju se u: (i) smanjenju trajanja fermentacije od prosječnih 6 na 4 sata, (ii) povećanju udjela proteina, kalcija i magnezija, te posljedično povećanju čvrstoće i viskoznosti gela, i smanjenju sinereze i (iii) nižoj cijeni i dostupnosti. Osim toga, preživljavanje probiotičkih bakterijskih sojeva do vremena održivosti proizvoda na policama veće je u usporedbi s njihovim preživljavanju u jogurtu od kravljeg mlijeka.

Za kozji jogurt najprihvatljivije su njegove pitke varijante, gdje se formirani gel miješanjem razbija i još jedanput uz nizak tlak (~ 3 - 4 MPa) homogenizira. Za poboljšanje okusa jogurta u smislu viših koncentracija acetaldehida, diacetila i acetoina u proizvodu, dobrom se pokazala kombinacija komercijalne kulture koja uz jogurtne bakterije sadrži i sojeve bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

U praksi, za prikriivanje intenzivnoga kozjeg okusa jogurta često se koristi dodatak od 4 % obranoga mliječnog praha, ali se može koristiti i inulin (do 1,5 %). Izgled teksture čvrstoga kozjeg jogurta prikazuje slika 5.31.



Slika 5.31.

Izgled teksture čvrstoga kozjeg jogurta.

Za ostala fermentirana mlijeka koja se proizvode od kozjeg (acidofilno kozje mlijeko, kefir) ili mješavine kozjeg i ostalih vrsta mlijeka (primjerice dahi - indijsko fermentirano mlijeko), trajanje fermentacije ovisi o mikrobnom sastavu dodane kulture.

5.3.

Ostala fermentirana mlijeka

5.3.1.

Kiselomlijeko

Osnovni tehnološki postupci u proizvodnji kiselomlijeka gotovo su isti kao i u proizvodnji jogurta. Jedino se umjesto termofilne u proizvodnji kiselomlijeka za inokulaciju koristi mezofilna kultura. Također, radi poboljšanja konzistencije, mlijeko se u proizvodnji kiselomlijeka preporučuje homogenizirati nakon toplinske obrade. Fizička struktura kiselomlijeka poput jogurta može biti čvrsta ili tekuća.

Nakon tehnološkog postupka predtretiranja, mlijeko se inokulira s 1 - 3 % mezofilne kulture. Kultura za proizvodnju kiselomlijeka najčešće sadrži sojeve bakterija *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, ali može sadržavati i sojeve *Leuconostoc* spp. Od tih bakterijskih vrsta/podvrsta *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* odgovorni su za tvorbu mliječne kiseline, a ostale dvije bakterijske vrste/podvrste tijekom fermentacije uz mliječnu kiselinu metabolizmom citrata mlijeka stvaraju i aromatske spojeve. Zbog tih osobina *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. često nose i praktično ime - **aromatske bakterije**. Od karbonilnih spojeva koji daju karakterističan okus kiselomlijeku najvažniji su diacetil, acetoin, acetaldehid i 2,3-butilen glikol. U najvećoj koncentraciji stvara se aromatski spoj diacetil, koji kiselomlijeku određuje svojstven okus. Zbog toga najmanji omjer diacetil : acetaldehid u kiselomlijeku treba biti 4 : 1, dok se idealnim omjerom smatra omjer diacetil : acetaldehid 8 : 1. Ovisno o temperaturi i dužini inkubacije, omjeri diacetil : acetaldehid 3,2 : 1 ili 4,4 : 1 također se smatraju poželjnima, jer kiselomlijeko ne mijenja značajnije svoj karakterističan okus po diacetilu.

Općenito, za uspjeh fermentacije kiselomlijeka udjel aromatskih bakterija u sastavu kulture ne treba



Slika 5.32.

Izgled teksture kiselomlijeka.

biti veći od 20 %. U praksi je potvrđeno da takav udjel aromatskih bakterija u sastavu kulture osigurava koncentraciju acetila 2 - 5 mg kg⁻¹ i < 1 mg kg⁻¹ acetaldehida. Navedene koncentracije tih aromatskih spojeva smatraju se ključnim preduvjetom za izbalansiranost okusa kiselomlijeka. Koncentracija acetaldehida > 1 mg kg⁻¹ uvjetuje okus proizvoda po jogurtu, a koncentracija acetila < 1,5 mg kg⁻¹ uzrok je izostanka karakterističnog okusa kiselomlijeka.

Za smanjenje previsoke koncentracije acetaldehida u finalnom proizvodu preporučuje se koristiti kulturu koja u svom sastavu umjesto *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* sadrži aromatsku bakteriju *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*. Suprotno, za veću se koncentraciju acetila u finalnom proizvodu preporučuje: (i) mlijeku dodati citrat [prirodna je koncentracija citrata u mlijeku (~ 0,07 - 0,4)] i najniža je zimi, ili (ii) zamjena sojeva *Leuconostoc* spp. u kulturi s *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Tijekom fermentacije kao metabolički produkt metabolizma aromatskih bakterija nastaje i CO₂ koji pridonosi punoći okusa kiselomlijeka.

Fermentacija kiselomlijeka u fermentacijskom spremniku traje ~ 10 - 18 sati na temperaturi od 30 ili 22 - 24 °C, a prekida se kada fermentacijsko mlijeko dostigne pH ~ 4,7. Slijedi postupak miješanja formiranog gela (eventualno homogenizacija) da se postigne konzistencija proizvoda slična vrhnju (slika 5.32.). Nakon miješanja i postizanja homogene strukture

slijedi hlađenje kiselog mlijeka u dvije faze. Najprije se kiselo mlijeko radi razvitka arome u prvoj fazi hladi na 10 °C, a potom u drugoj fazi na 4 - 6 °C. Ohlađeno mlijeko puni se u prodajnu ambalažu.

Za čvrstu varijantu kiselog mlijeka postupak je proizvodnje isti onom za tekuće kiselo mlijeko, osim što proizvod fermentira u proizvodnoj ambalaži, a formirana gel-struktura ostaje nepromijenjena.

Prosječna pH-vrijednost kiselog mlijeka najčešće je 4,65 - 4,7, a koncentracija mliječne kiseline 0,5 - 0,7 %. Ipak, pH-vrijednost kiselog mlijeka kao proizvoda namijenjenog tržištu u znatnoj je mjeri određena: (i) sastavom i količini dodanog inokuluma, (ii) temperaturom i trajanjem inkubacije. Zbog toga pH-vrijednost gotovog proizvoda može biti i niža (4,4 - 4,5).

Nutritivna vrijednost kiselog mlijeka veća je ako se u proizvodnji koristi kultura koja sadrži jedino sojeve podvrsta *Lactococcus lactis*. Naime, bakterije tih podvrsta u proizvodu stvaraju isključivo L (+) izomer mliječne kiseline u visokoj koncentraciji (93 - 100 %). Suprotno, ako se uz podvrste *Lactococcus lactis* u proizvodnji kiselog mlijeka koriste i bakterije *Leuconostoc* spp. proizvod sadrži i D (-) izomer mliječne kiseline i octenu kiselinu.

5.3.2.

Bugarsko kiselo mlijeko

Bugarsko kiselo mlijeko je specifično tradicionalno fermentirano mlijeko koje se proizvodi korištenjem monokulture koja sadrži jedino bakterijsku vrstu *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Zbog toga, u duhu hrvatskog jezika koji pod pojmom kiselo mlijeko podrazumijeva korištenje mezofilne kulture, važno je znati kako nije riječ o istom fermentiranom mlijeku.

Za proizvodnju bugarskoga kiselog mlijeka navodi se nekoliko mogućih tehnoloških postupaka. No, načelno se tehnologija proizvodnje bugarskoga kiselog mlijeka sastoji od:

- pasterizacije kravljega, ovčjega ili kozjeg mlijeka na temperaturi 85 - 95 °C/60 - 30 min



Slika 5.33.

Izgled teksture bugarskoga kiselog mlijeka. (CC BY-SA 3,0.)

- hlađenja mlijeka na 37 - 42 °C i inokulacije s 2 - 5 % kulture
- fermentacije od 5 - 12 sati dok se ne postigne kiselost od 1,4 % mliječne kiseline
- završno hlađenje na temperaturu ≤ 6 °C.

Specifična je karakteristika bugarskoga kiselog mlijeka, koje se proizvodi isključivo u čvrstoj varijanti, oštar kiseli okus i izrazito "teški" koagulum podložan pojačanoj sinerezi. U praksi se za ublažavanje sinereze koristi monokultura koja uz sojeve bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, koji su jaki tvorci mliječne kiseline, sadrži i sojeve iste vrste koji stvaraju umjerenu koncentraciju mliječne kiseline. Izgled teksture bugarskoga kiselog mlijeka priređenog u glinenoj zdjelici prikazuje slika 5.33.

5.3.3.

Mlačenica

Mlačenica ili stepka sporedni je nusproizvod u proizvodnji maslaca, neovisno o tome proizvodi li se maslac od slatkoga ili kiselog vrhnja. Za proizvodnju mlačenice kao zasebnog fermentiranog mlijeka

prvobitna mlaćenica koja se izdvoji od maslenih zrna odmah se mora ohladiti na temperaturu nižu od 8 °C. U skupinu fermentiranih mlijeka mlaćenica se ubraja zbog toga što je gotov proizvod uvijek rezultat fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline.

U Danskoj i Nizozemskoj, koje su najveći proizvođači mlaćenice u Europi, tehnologija proizvodnje ne obuhvaća obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) već se jedino provodi standardizacija mlijeka na udjel mliječne masti < 1 %. Potom se mlaćenica homogenizira uz tlak od 20 MPa, toplinski obradi na 90 °C/20 s - 5 minuta i ohladi na 18 - 20 °C. Na toj se temperaturi mlaćenica inokulira DL kulturom (*L. lactis* subsp. *lactis/cremoris*/biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp.). Inkubacija na temperaturi 19 - 22 °C traje 15 - 20 sati ili dok proizvod ne postigne pH- 4,5 - 4,7. Formirani gel razbija se miješanjem, ohladi na temperaturu 4 - 9 °C i prebacuje na pakiranje.

Ovisno o zemlji i iskustvu mlaćenica se može proizvoditi i drugačijim tehnološkim postupcima. Jedan od mogućih načina proizvodnje mlaćenice je obogaćivanje mlaćenice osušenim mliječnim ingredientima radi povećanja suhe tvari (ST) na 7 - 10 % i standardizacija mliječne masti na 0,3 - 1,0 %. Najčešće, za obogaćivanje ST mlaćenice se koriste proteini u količini do 4 %. Potom se mlaćenica radi poboljšanja konzistencije homogenizira (10 MPa), nakon čega slijedi njezina pasterizacija na 80 - 85 °C tijekom 5 - 15 minuta. Pasterizirana mlaćenica ohladi se na temperaturu od 22 °C i inokulira mezofilnom kulturom u koncentraciji 1 - 3 %, te slijede fermentacija, hlađenje i punjenje. U proizvodnji mlaćenice neke zemlje koriste mezofilnu kulturu koja ne sadrži aromatske bakterije. Kultura se tada dodaje u količini 3 - 4 %, a inkubacija na temperaturi 27 - 32 °C traje 5 - 16 sati ili dok se ne postigne pH-proizvoda 4,4 - 4,5. Prije hlađenja i punjenja proizvod može biti homogeniziran uz niski tlak homogenizacije da se dobije glatka konzistencija bez vidljive granulacije.

Tekstura mlaćenice mora biti tekuća, neviskozna, ali ni rijetka, odnosno takve viskoznosti koja omogućava zadržavanje mlaćenice u ustima dovoljno dugo da se može osjetiti i prepoznati okus. Na slici 5.34. prikazana je tekstura mlaćenice u usporedbi sa



Slika 5.34.

Izgled teksture (viskoznost) mlaćenice (desna strana slike) u usporedbi sa svježim mlijekom (lijeva strana slike). Zbog veće viskoznosti, mlaćenica na stjenci čaše ostavlja gušći trag. (CC BY-SA 3,0)

svježim mlijekom. Okus mlaćenice, ako se ona proizvodi kulturom koja sadržava i aromatske bakterije, određen je koncentracijama aromatskih tvari, osobito diacetilom i acetoinom. Mlaćenica je proizvod koji sadrži relativno visoku koncentraciju fosfolipida (lecitina) koji potječu od oštećenih membrana masnih globula posljedice prethodnog formiranja maslenih zrna. Fosfolipidima se pripisuje visokodijetetski i fiziološki učinak na humani živčani sustav. Prosječna je količina lecitina u mlaćenici 0,14 %.

5.3.4.

Kefir

Kefir pripada skupini tradicionalnih fermentiranih mlijeka koji se već tisućama godina proizvodi i konzumira u područjima od istočne Europe do Mongolije. Premda nema točnih podataka o vremenu kada i gdje se prvi put kefir počeo proizvoditi, smatra se da su dva plemena, Oseti i Karbadini s područja Kavkaza ili Kavkazije, zaslužni za početak njegove

proizvodnje. Ime kefir najvjerojatnije je izvedeno iz turske riječi *kefy* ili *keif*, koja znači sreća, zadovoljstvo. Osim naziva kefir, za isti proizvod koriste se i nazivi: kepyr, kephir, kefer, kiaphur, knapson, kepi i kiipi. U odnosu na ostala fermentirana mlijeka, specifičnost je kefiru u hidrolizi laktoze mlijeka koja se događa istovremenim djelovanjem bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasaca koji su sadržani u formi kefirnih zrna ili komercijalnih kefirnih kultura.

Industrijski, kefir se najviše proizvodi u Rusiji i ostalim zemljama bivšega SSSR-a, potom u Poljskoj, Švedskoj, Mađarskoj, Norveškoj, Finskoj, Njemačkoj, Češkoj, Danskoj i Švicarskoj. Kefir proizvode i Grčka, Austrija i Brazil. U smislu etničkog proizvoda, popularnost kefiru posljednjih godina raste i u SAD-u i Japanu. Prema dostupnim podacima, u Hrvatskoj se kefir u relativno malim količinama proizvodi isključivo dodatkom komercijalne kulture. U proizvodnji kefiru koriste se kravlje, kozje, ovčje ili druge vrste mlijeka.

Neovisno o načinu proizvodnje (tradicionalni/industrijski) i vrsti korištene kulture (kefirna zrna/komercijalna kultura) prema *Codex Alimentarius* standardu (Codex Stan 243 - 2003.), tipična mikrobna populacija kefiru mora sadržavati *L. kefiri* i vrste *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Acetobacter* (pripremljene od kefirnih zrna), ako se za kulturu koriste kefirna zrna još i kvasce koji fermentiraju laktozu (*Kluyveromyces marxianus*) i kvasce koji ne fermentiraju laktozu (*Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces exiguus*). Prema istom standardu, tipičan kefir mora sadržavati najmanje 2,8 % proteina, manje od 10 % mliječne masti, najmanje 0,6 % mliječne kiseline, a postotak alkohola nije određen. Ukupan broj specificiranih mikroorganizama iz sastava kulture mora biti najmanje 10^7 cfu mL⁻¹, a broj kvasaca ne manji od 10^4 cfu mL⁻¹.

5.3.4.1.

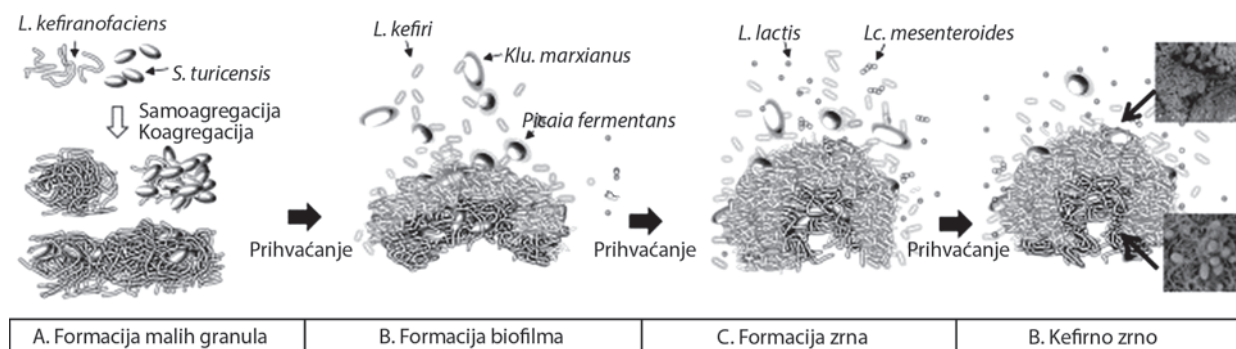
Kefirna zrna

Kefirna zrna predstavljaju jedinstveni živi ekosustav u prirodi gdje je mikrobna populacija povezana s kefirnim zrnom u određenoj formi biofilma. Pretpostavlja se da kefirna zrna sadrže više od 50 različitih vrsta

bakterija (laktokoka, laktobacila, streptokoka, acetobakterija), više od 20 vrsta kvasaca, od kojih neke vrste fermentiraju a neke ne fermentiraju laktozu, a ovisno o podrijetlu više vrsta filamentoznih plijesni (tablica 5.5.). Istovremeno omjer i broj pojedinačnih mikrobnih vrsta unutar kefirnog zrna značajno je određen podrijetlom i načinom njihove kultivacije.

Mehanizam kojim nastaje formacija kefirnog zrna unatoč provedenim brojnim istraživanjima još uvijek nije utvrđen. Zbog toga se na razini današnjeg znanja kefirna zrna mogu razmnožavati jedino iz prethodnih kefirnih zrna. Formiranju kefirnog zrna, pretpostavlja se, prethodila je svojevrsna spontana mikrobna agregacija u biofilm strukturu uz istodobni razvitak specifičnih svojstava njegove vanjske površine tijekom koagregacije između bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Posljedično mikrobnom udruživanju pojedinačne vrste tako su osigurale vlastitu fizičku zaštitu od fermentacijom prekomjerno stvorenih koncentracija kiselina, alkohola i CO₂. Pretpostavljeni model formiranja kefirnog zrna prikazuje slika 5.35.

Osim brojnih mikrobnih vrsta, kefirno zrno sadrži i spužvasto fibrilirano strukturu s retikularnim laminarnim matriksom i vlaknaste nakupine koje se osobito u centru zrna granaju i međusobno povezuju dugim lancima. Fibrilarna struktura izgrađena je od proteina, polisaharida, različitih celularnih elemenata i brojnih drugih još uvijek nedefiniranih organskih spojeva. Polisaharidnu komponentu s približno 25 % težine suhog zrna čini u vodi topljiva supstancija kefiran koju tvori bakterija *Lactobacillus kefiranofaciens* (slika 5.36.). Uz bakteriju *Lactobacillus kefiranofaciens* i većina ostalih bakterija u sastavu kefirnog zrna, pretpostavlja se, sposobna je tvoriti egzopolisaharide (EPS) različitog sastava. Nedavno je iz kefirnog zrna izolirana bakterija *Lactobacillus plantarum*, koja tvori EPS sastavljen od manoze, glukoze i galaktoze u približnom omjeru 1 : 5 : 7. Fizikalne karakteristike tog EPS znatno se razlikuju od ostalih komercijalno dostupnih biljnih polisaharida. Zbog toga se pretpostavlja da taj bakterijski soj bakterije *Lactobacillus plantarum* ima visoki potencijal za korištenje u prehrambenoj industriji.



Slika 5.35.

Pretpostavljeni model formiranja kefirnog zrna. (Wang i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)

Tablica 5.5.

Dominantna mikrobnna populacija izolirana iz kefirnog zrna

<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i> i <i>Leuconostoc</i> spp	Kvasci	Ostali
Homofermentativni	Homofermentativni	Laktoza fermentativni	
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> / <i>Candida kefyr</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Debaryomyces hansenii</i> / <i>Candida famata</i>	<i>Acetobacter rasens</i>
<i>L. kefirifaciens</i>		<i>Dekkera anomala</i> / <i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>L. kefirgranum</i>			<i>Galactomyces geotrichum</i> / <i>Geotrichum candium</i>
Heterofermentativni	Heterofermentativni	Laktoza nefermentativni	
<i>L. kefiri</i>	<i>L. lactis</i> (citrat–pozitivni)	<i>Saccharomyces unisporus</i>	
<i>L. parakefiri</i>	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>	
<i>L. brevis</i>	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>	
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>		<i>Pichia fermentans</i> / <i>Candida firmetaria</i>	
<i>L. fermentum</i>		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Candida friedrichii</i>	
<i>L. fructivorans</i>		<i>Candida humilis</i>	
<i>L. hilgardii</i>		<i>Issatchenkia orientalis</i> / <i>Candida krusei</i>	
		<i>Candida maris</i>	
		<i>Debaryomyces occidentalis</i>	
		<i>Yarrowia lipolytica</i> / <i>Candida lipolytica</i>	

(Ratray i O'Conell, 2011., s dopuštenjem izdavača Eseevier Books)



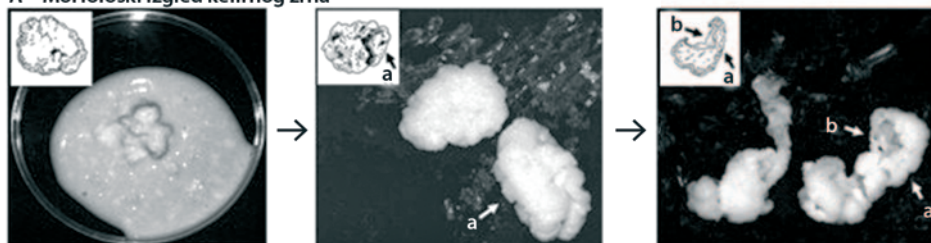
Slika 5.36.

Polisaharidno svojstvo kolonija bakterije *Lactobacillus kefiranofaciens*.

Detalji: na slici se jasno vidi "sluzava" nit koja se štapićem izdiže od površine bakterijske kolonije. (Wang i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)

U svojoj složenoj egzopolisaharidnoj strukturi kefiran sadrži D-glukozu i D-galaktozu u omjeru 1 : 1 i odgovoran je za međusobno povezivanje mikrobnе zajednice unutar kefirnog zrna. Pretpostavlja se da kefiran drži mikrobnу zajednicu u kefirnom zrnu u simbiozi tako da mikrobnа populacija egzistira prema točno određenoj zakonitosti. Laktobacili u formi kratkih lanaca poput *L. kefir*, određene vrste kvasaca poput *Kluyveromyces marxianus* i laktokoki povezani u paru ili lancu uvijek koloniziraju periferni (vanjski) dio kefirnog zrna. Dominantna je mikrobnа vrsta perifernog dijela kefirnog zrna i *Leuconostoc mesenteroides*. Suprotno, laktobacili koji tvore duge lance, poput *L. kefiranofaciens*, bakterije u formi nepravilnih štapića i određene vrste kvasaca poput *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis*, *Pichia fermentans* i *Saccharomyces unisporus* oblikuju odvojene kolonije u unutarnjem spužvastom matriksu koji se umnožava.

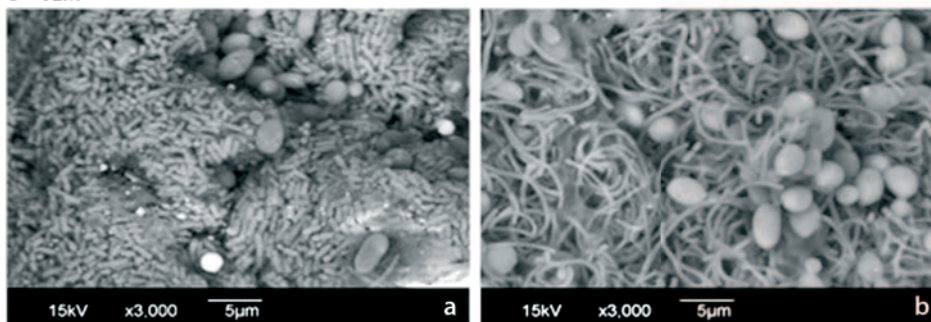
A – Morfološki izgled kefirnog zrna



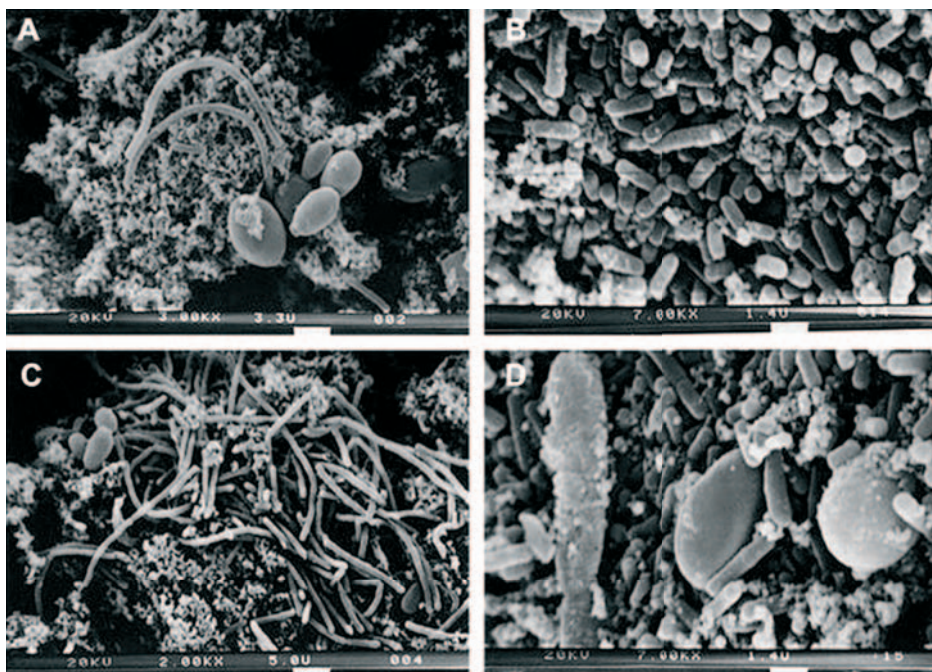
Slika 5.37.

Morfološki izgled i mikrostruktura mikrobnog biofilma kefirnih zrna.

B – SEM



Detalji: (A) morfološki izgled kefirnog zrna, zrna su nepravilnog oblika promjera 10-15 mm a prema strukturi mogu biti otvorena i izdužena u formi biofilma (a, b). Crteži (male sličice unutar većih slika) shematski prikazuju formiranje morfološkog izgleda kefirnih zrna, (B) mikrostruktura biofilma kefirnog zrna snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), bar = 5 μ m, (a) vanjski sloj čine gusto raspoređeni laktobacili, laktokoki i kvasci, (b) unutarnji sloj čine manje gusta populacija laktobacila povezanih u duže lance, laktokoki i gušće raspoređena populacija kvasca. (Wang i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)



Slika 5.38.

Mikrostruktura tibetanskoga kefirnog zrna.

Detalji: (A, C) unutarnja površina kefirnog zrna sadrži fibrilarne strukture, laktobacile povezane u duge lance i laktobacile koji imaju zakrivljeni oblik štapića i kvasce, (B, D) vanjska površina kefirnog zrna sadrži laktobacile u formi kratkih lanaca i kvasce. Temeljeno na PCR – DGGE analizi dominantnu mikrobnu populaciju tibetanskog kefirnog zrna čine bakterije *Pseudomonas* spp., *Lc. mesenteroides*, *L. helveticus*, *L. kefiranofaciens*, *L. lactis*, *L. kefir*, *L. casei* i kvasci *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kazachstania exigua*. (Jianzhong i sur., 2009., s dopuštenjem Elseviera.)

5.3.4.2.

Tehnologija proizvodnje kefira

U tom dijelu kefirnog zrna obitavaju i laktobacili koji imaju sposobnost tvorbe kefirana. Područja između centra i perifernog dijela kefirnog zrna sadrže i bakterije i kvasce, ali se njihov omjer progresivno mijenja ovisno o udaljenosti od centra zrna. Za ilustraciju, morfološki izgled kefirnog zrna i mikrostruktura njegovog biofilma prikazani su na slici 5.37., a sastav mikrobne populacije vanjskog i unutarnjeg dijela tibetanskog kefirnog zrna prikazan je na slici 5.38.

U proizvodnji kefira koriste se različite tehnologije, ali se one u osnovi mogu opisati kao tradicionalni ili industrijski procesi proizvodnje. Tradicionalan način proizvodnje zadržao je direktnu inokulaciju mlijeka kefirnim zrnima (matična kultura), ili se mlijeko inokulira tehničkom kulturom pripremljenom od matične kulture. Suprotno, u proizvodnji kefira pojam industrijski procesi podrazumijeva korištenje komercijalnih uglavnom DVS/DVI kultura.

5.3.4.2.1.

Aktivacija kefirnih zrna

Postupak aktiviranja suhих kefirnih zrna zahtijeva pažljiv i stručan rad u za to predviđenoj i opremljenoj posebnoj prostoriji. Opremljenost prostorije podrazumijeva sterilnost prostora i konstantnu temperaturu 20 - 22 °C i sterilan pribor za rad. U pripremi aktivne kulture, osušena kefirna zrna najprije se stavljaju u sterilnu vodu ohlađenu na 22 °C u omjeru 1 : 20 i ostave 24 sata. Postupak se ponavlja 3 - 4 puta, odnosno tako dugo da kefirna zrna dovoljno nabubre. Prije svakoga novog precjepljivanja zrna se ispiru sterilnom vodom ohlađenom na temperaturu od 22 °C. Također, iz kulture se uklanjaju sva smeđa, sluzava ili prozirna zrna, a nakon zadnjeg precjepljivanja i sva zrna preostala na dnu posude.

Kefirna se zrna do ponovne upotrebe konzerviraju konvencionalnim načinom sušenja na temperaturi od 33 °C ili sušenjem u vakuumu. Osušena kefirna zrna bez gubitka aktivnosti mogu se očuvati godinama. Ponovna reaktivacija kefirnih zrna postiže se njihovom uzastopnom inkubacijom u pasteriziranom ili rekonstituiranom mlijeku. Osušena zrna tijekom



Slika 5.39.

Izgled aktivnih kefirnih zrna nakon višekratne inokulacije u mlijeko. (Zhou i sur., 2009., s dopuštenjem Elseviera.)

inkubacije najprije sporim a poslije bržim rastom ponovno poprimaju mekanu strukturu, te se započinju formirati i nova kefirna zrna. Dobrim načinom konzerviranja kefirnih zrna pokazalo se i njihovo zamrzavanje na temperaturu od -20 °C ili -80 °C. U tom slučaju svoju aktivnost kefirna zrna zadržavaju približno četiri mjeseca do godine dana.

Aktivirana kefirna zrna su bijele do žućkaste boje i elastične konzistencije, promjera 2,0 - 15 mm. Višekratnom pasažom kroz mlijeko kefirna zrna mijenjaju svoju veličinu (0,5 - 3,5 cm), a oblikom i bojom nalik su klasiću karfiola (slika 5.39.).

5.3.4.2.1.1.

Matična kultura

Matična se kultura u proizvodnji kefiru priprema iz aktivnih kefirnih zrna njihovim nacjepljivanjem u najčešće pasterizirano djelomično obrano mlijeko, ili se koristi rekonstituirano obrano mlijeko. Pripremljeno mlijeko najprije se ohladi na temperaturu 22 - 25 °C i inokulira aktivnim kefirnim zrnima u omjeru 1 : 10 - 15. Inkubacija traje 24 sata, a postupak inokulacije zrna u mlijeko (3 - 4 puta, po potrebi uz ispiranje zrna) traje sve dok se ne postigne trajanje fermentacije mlijeka 18 - 20 sati i pH vrijednost fermentacijskog mlijeka 4,3 - 4,4. U tom razdoblju, dnevno povećanje biomase kefirnih zrna je između 5 i 7 %.

Nakon završene fermentacije kefirna se zrna cijedenjem uklanjaju iz mlijeka i direktno kontinuirano inokuliraju u svježe pripremljeno mlijeko. Kontinuiranim nacjepljivanjem kefirnih zrna u 500 mL mlijeka šest puta tjedno biomasa mokrih kefirnih zrna udvostručuje se unutar 7 - 10 dana. Za optimalno povećanje biomase mokrih kefirnih zrna preporučena temperatura inkubacije je 25 °C, a ispiranje zrna samo jedanput tjedno sterilnom ohlađenom vodom. Također, tijekom kultivacije za povećanje biomase može se koristiti triptoza ili ekstrakt kvasca kao dodatak mlijeku, uz obveznu agitaciju tijekom inkubacije.

Za proizvodnju kefiru direktno iz kefirnih zrna, matična kultura koristi se u količini ~ 0,5 - 0,75 kg kefirnih zrna na 10 L toplinski obrađenog mlijeka.

Korištenjem aktivnih kefirnih zrna matične kulture izbjegava se lag-faza mikrobnog rasta u mlijeku. Matična kefirna kultura do ponovne upotrebe pohranjuje se na temperaturu 2 - 4 °C. U slučajevima ako se matična kultura ne koristi duže vrijeme, dolazi do djelomične inaktivacije kefirnih zrna. Zbog toga se postupak precjepplivanja za ponovnu pripremu matične kulture mora ponoviti. Precjepplivanje kefirnih zrna u novo pripremljeno mlijeko ponavlja se svakih 3 - 4 dana, uz obvezno uklanjanje nepoželjnih zrna i ispiranje sterilnom vodom ohlađenom na 22 °C.

5.3.4.2.1.1.1.

Tehnička kultura

Tehnička kultura u proizvodnji kefirna priprema se od matične kefirne kulture. Za tu svrhu koristi se pasteurizirano mlijeko (95 °C/6 - 7 min) ohlađeno na temperaturu 20 - 22 °C koje se inokulira s 1 % matične kulture uz konstantno miješanje približno 10 minuta. Slijedi inkubacija mlijeka na temperaturi 20 - 22 °C tijekom 18 - 19 sati, odnosno dok pH-fermentacijskog mlijeka ne dostigne vrijednost 4,3 - 4,4. Fermentacija se prekida hlađenjem na temperaturu od ~ 10 °C, koje uz konstantno miješanje traje ~ 2,5 sata. Fermentacijsko se mlijeko potom još ostavi hladiti do temperature od 8 °C. Slijedi izdvajanje kefirnih zrna za sljedeću pripremu tehničke kulture. Istovremeno, procijeđeno fermentacijsko mlijeko postaje tehničkom kulturom za inokulaciju novog toplinski obrađenog mlijeka. Tehnička kultura u količini od ~ 3,5 % dodaje se u mlijeko ohlađeno na temperaturu od ~ 23 °C.

5.3.4.2.1.2.

Komercijalna kefirna kultura

Komercijalne kulture za proizvodnju kefirna razvile su se prije dvadesetak godina i na tržištu su prisutne u formi DVI/DVD kultura za direktnu inokulaciju u mlijeko. Kulture sadrže različite mikrobnog vrste termofilnih i mezofilnih bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasce koje su izolirane iz kefirnog zrna.

Sastav komercijalne kefirne kulture najčešće čine sljedeće mikrobnog vrste: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Saccharomyces unisporus*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* zastupljene u različitim omjerima pojedinačnih mikrobnog vrsta.

Na tržište se isporučuju kefirne kulture koje u svom sastavu sadrže samo bakterije bez kvasaca, samo kvasce, ili kulture koje sadrže i bakterije i kvasce.

U usporedbi s kefirom proizvedenim od kefirnih zrna, kefir proizveden komercijalnom kulturom u znatnoj je mjeri izgubio svoju autentičnost. Gubitak autentičnosti najčešće je vezan na relativno mali broj različitih mikrobnog vrsta sadržanih u kulturi. Naime, karakteristična je tekstura kefirna proizvedenog korištenjem kefirnih zrna sjajne površine, viskozna, homogena, ali istovremeno i prozirna (zbog CO₂). Zbog toga se kefir s pravom naziva i mliječnim šampanjcem. Okus je rezak, svjež kiseli s laganom aromom po kvascima. Tekstura kefirna proizvedenog komercijalnom kulturom najčešće je gusta, a okusom i aromom više podsjeća na kiselo mlijeko nego na kefir. Međutim, u Poljskoj proizvode kefir inokulacijom mlijeka vlastitom liofiliziranom kulturom proizvedenom od kefirnih zrna. Matična se kultura priprema tako da se paketić kulture (1 g kefirnih zrna) topi u tri litre mlijeka, a potom iz matične kulture priprema tehnička kultura kojom se inokulira mlijeko. Tako je u usporedbi s tradicionalnim načinom, proizvodnja kefirna pojednostavljena a kontrola kvalitete gotovog proizvoda poboljšana. Od tradicionalnog "modificirani" kefir manje je kiseli i karakterizira ga kremasta konzistencija a njegova autentičnost nije značajnije izmijenjena.

Također, za proizvodnju kefirna u mljekarama manjeg kapaciteta u Poljskoj proizvođačima su dostupne i "kefirne tablete". Jedna do dvije tablete otopi se u čaši mlijeka kojom se inokulira mlijeko. Inkubacija mlijeka na temperaturi 25 - 30 °C traje 18 - 26 sati, ili dok se ne formira koagulum. Tada se to fermentacijsko

mlijeko koristi kao tehnička kultura (4 - 5 žlica/L) za proizvodnju kefira. Nakon inokulacije, fermentacija mlijeka na temperaturi 20 - 22 °C najčešće traje 14 - 18 sati. Nakon fermentacije proizvod se ostavi još 4 sata na sobnoj temperaturi, a potom do potrošnje pohranjuje na temperaturi od 4 °C.

5.3.4.2.2.

Tehnološke operacije

U slučajevima ako se u proizvodnji kefira koristi matična kefirna kultura ili od matične kefirne kulture pripremljena tehnička kultura, procesne su operacije:

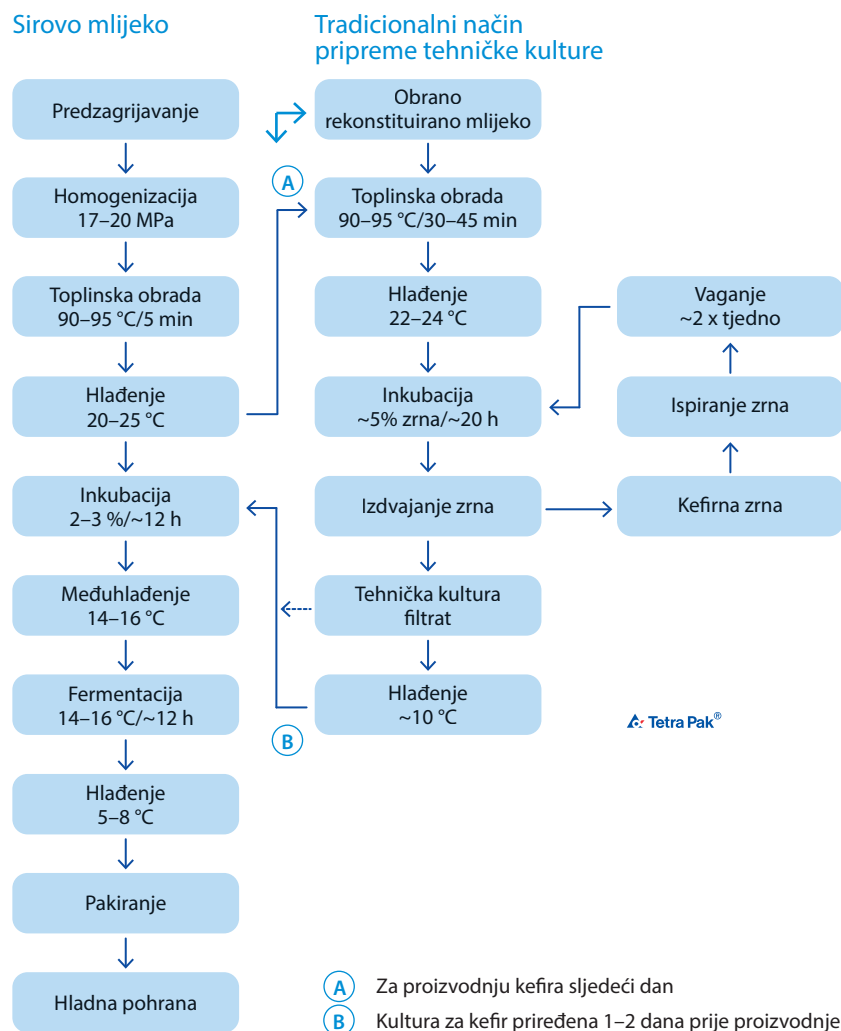
- standardizacija mlijeka na poželjan udjel mliječne masti (obično 3,2 - 3,5 %), a radi bolje konzistencije proizvoda bezmasna suha tvar (Sbm) obogaćuje se u količini 1 - 3 %, najčešće dodatkom obranog mlijeka u prahu
- homogenizacija mlijeka na temperaturi 65 - 70 °C uz tlak 10 - 20 MPa
- toplinska obrada mlijeka na temperaturi 95 °C/5 - 7 minuta
- inokulacija ohlađenog mlijeka na temperaturu od ~ 23 °C s 1 - 2 % tehničke kulture uz intenzivno miješanje tijekom 10 - 15 minuta. Ili se mokra kefirna zrna u količini 2 - 10 % (m/v), ili 5 - 10 cm debljine, rasporede na dno spremnika i na njih dolije mlijeko u količini 30 - 50 puta većoj od količine kefirnih zrna.
- inkubacija tijekom ~ 18 - 24 sata na temperaturi 20 - 25 °C uz miješanje fermentacijskog mlijeka 2 - 3 puta. U slučajevima direktne inokulacije mlijeka kefirnim zrnima zbog miješanja i stvorenog CO₂ kefirna zrna se izdvoje na površinu, a fermentacijsko mlijeko na kraju procesa ima pH ~ 4,3 - 4,7. Kefirna zrna iz fermentacijskog mlijeka odvoje se cijedenjem kroz fino sito, isperu u vodi i ponovno koriste za novu acidifikaciju mlijeka.
- prekidanje fermentacije hlađenjem do temperature od 8 °C uz konstantno miješanje od ~ 2,5 sata.

- hlađenje na temperaturu ~ 5 - 8 °C, punjenje u prodajnu ambalažu i hladno zrenje kefira na istim temperaturama idućih 1 - 3 dana.

Mikrobna populacija kefira tijekom fermentacije se umnožava, ali omjer pojedinačnih vrsta iz sastava kulture uglavnom ostaje nepromijenjen. Zbog toga na kraju fermentacije dobar kefir sadrži približno 10⁹ laktokoka, između 10⁷ i 10⁸ *Leuconostoc* vrsta, 10⁷ - 10⁸ termofilnih laktobacila, 10⁴ - 10⁵ kvasaca i 10⁴ - 10⁵ bakterija octene kiseline. Zbog posebnog omjera između mikrobnih vrsta unutar kefirnog zrna, u prvih 10 sati fermentacije koncentracija mliječne kiseline lagano se povećava. Nakon 10 sati koncentracija mliječne kiseline rapidno se smanjuje i na kraju je fermentacije 0,6 - 0,8 %. Unutar prvih 10 - 15 sati fermentacije u kefiru se oblikuju i aromatski spojevi poput acetaldehida, diacetila i acetoina.

Hladna fermentacija ili zrenje kefira nužni su za tvorbu CO₂ i izoamilnoga i etilnog alkohola, čija koncentracija raste povećavanjem dužine trajanja hladnog zrenja. Osvježavajući kiselo rezak okus uz primjesu okusa po kvascima i lagano pjenasti izgled kefira pripisuje se kombiniranom djelovanju kvasaca i BMK. Puni okus proizvoda u ustima posljedica je stvorenog CO₂. Nakon potpune fermentacije koja uključuje i tri dana hladnog zrenja tipičan kefir ima pH-vrijednost između 4,2 i 4,7, sadrži između 0,8 i 1,2 % mliječne kiseline, 0,12 - 2 % etanola i približno 0,20 % CO₂. Osim tih spojeva, nakon potpune fermentacije kefir sadrži aromatske spojeve poput acetaldehida, diacetila i acetoina, druge organske kiseline poput mravlje, octene ili propionske, i izoamilni alkohol u tragovima. Konačno, mnogobrojne znanstvene studije potvrđuju da sastav kefira osim nutritivne vrijednosti za humani organizam ima i snažno probiotičko djelovanje. Na slici 5.40. shematski su prikazane tehnološke operacije tradicionalnog načina proizvodnje kefira, a njegov standardni kemijski sastav naveden je u tablici 5.6.

Inokulacija toplinski obrađenog a potom ohlađenog mlijeka na temperaturu inokulacije DVI/DVD kulturom u proizvodnji kefira obavlja se direktno. Mlijeko može istovremeno biti inokulirano korištenjem kulture



Slika 5.40.

Shematski prikaz procesnih operacija u proizvodnji kefir. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

koja sadrži BMK i kulturom koja sadrži kvasce. Drugi način inokulacije mlijeka DVI/DVD kulturom može uključivati dvije odvojene fermentacije. Prvo se fermentacija mlijeka provodi kulturom koja sadrži BMK, a potom kada je ona završena u fermentacijsko mlijeko dodaje se kultura kvasaca. Temperatura i trajanje inkubacije ovisni su o mikrobnoj sastavu kulture. U slučajevima ako se u proizvodnji kefir koristi DVI/DVS kultura koja ne sadrži kvasce, fermentacija mlijeka

provodi se jedino na temperaturi između 20 i 25 °C i traje između 12 i 15 sati (pH - 4,4 - 4,5). Naglim hlađenjem na temperature niže od 10 °C fermentacija kefir se prekida, puni u ambalažu i do potrošnje pohranjuje na temperaturi od 4 °C. Za ilustraciju, izgled teksture kefir proizvedenog na industrijski način bez korištenja kvasaca i kefir proizvedenog na tradicionalan način korištenjem kefirnih zrna prikazan je na slici 5.41.

Tablica 5.6.

Kemijski sastav kefira proizvedenog od kravljeg mlijeka (g 100 g⁻¹) tijekom tri dana hladnog zrenja

Sastojak	1. dan	2. dan	3. dan
Voda	87,4	87,4	87,4
Mliječna mast	3,4	3,4	3,4
Laktoza	3,9	3,4	3,00
Pepeo	0,64	0,64	0,64
Alkohol	0,24	0,44	0,72
Mliječna kiselina	0,73	1,08	1,15
CO ₂	0,08	0,12	0,20
Kazein	2,9	2,8	2,7
Globulin	0,14	0,13	0,11
Albumin	0,13	0,12	0,10
Peptidi	0,195	0,386	0,495

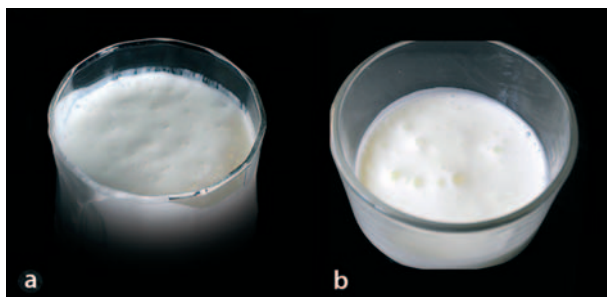
(preuzeto od Robinsona i sur., 2002.)



Slika 5.42.

Izgled teksture kumisa. (CC BY -SA 3,0.)

Detalji: na slici se jasno vidi da kumis ima pitku konzistenciju bez oblikovane gel-strukture karakteristične za sva ostala fermentirana mlijeka.



Slika 5.41..

Izgled teksture kefira proizvedenog tradicionalnim načinom iz kefirnih zrna (a) i komercijalnom kulturom koja ne sadrži kvasce (b).

5.3.5.

Kumis

Kumis poput kefira pripada skupini tradicionalnih fermentiranih mlijeka koje su od kobiljeg mlijeka u dalekoj prošlosti (prvi put ga spominje Herodot u 5. stoljeću pr. Krista) vjerojatno prvi počeli proizvoditi nomadi iz središnje Azije. Zna se i da je kumis u 7.

stoljeću bio osobito popularan proizvod na području današnjeg Kazahtana i Kirgistana, ali pod imenom airag, arrag, chige ili chigo u Mongoliji, Tibetu i zapadnim područjima Kine. Naziv kumis, kako se pretpostavlja, izveden je od imena plemena Kumanes koje je obitavalo na području rijeke Kuma u azijskim stepama, ali može biti i tatarskog podrijetla. Primarno za terapijske svrhe kumis se od kobiljeg mlijeka na tradicionalan način u ograničenim količinama danas proizvodi uglavnom u zemljama bivšeg SSSR-a i nešto u Njemačkoj.

Osnovni je kemijski sastav kumisa: ~ 90 % vode, 2,1 % proteina (od toga 1,2 % kazeina i 0,9 % proteina sirutke), 6,4 % laktoze i 1,8 % masti. Boja kumisa je mliječno sivkasta, konzistencija pitka, pjenasta - bez koagulacije (slika 5.42.) a okus oštro alkoholno-kisel. Nakon završene fermentacije kumis sadrži mliječnu kiselinu ~ 0,5 - 1,1 %, etanol ~ 1,0 - 2,5 % i CO₂.

Slično kefiru, fermentaciju kobiljeg mlijeka u proizvodnji kumisa uzrokuju različite vrste bakterija mliječne kiseline (BMK) i kvasci. Kultura za kumis, za razliku od kulture za kefir, nema strukturu zrna (granula). Mikrobna populacija kumisa visoko je varijabilna i znatno određena područjem podrijetla kumisa. Tako je iz kumisa koji se proizvodi u Kazahstanu izoliran kao dominantan mikroorganizam - kvasac *Saccharomyces unisporus*, koji fermentira galaktozu ali ne i laktozu. Zbog toga je fermentacija mlijeka u odnosu na *Saccharomyces cerevisiae* spora, a uz etilni alkohol se stvaraju glicerol, jantarna i octena kiselina koji mogu biti i uzročnici atipičnog okusa kumisa. Iz kumisa koji se proizvodi u Mongoliji i Kini većina izoliranih laktobacila pripadaju vrsti *L. curvatus* i podvrstama bakterije *L. paracasei* (subsp. *paracasei* i subsp. *tolerans*). Od izoliranih kvasaca dominantne su vrste *Kluveromyces marxianus* subsp. *lactis* i *Candida kefyri*.

Prema današnjim saznanjima mikrobna populacija kulture za kumis, premda nije u potpunosti definirana, može se sastojati od sljedećih bakterijskih vrsta: *L. salivarius*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. acidophilus*. Ovisno o podrijetlu, te su bakterije u kumisu prisutne s različitim udjelom zastupljenosti pojedinih vrsta.

Od laktoza fermentativnih kvasaca, dominantni su: *Sacchromyces cerevisiae*, *Candida kefyri*, *Torula koumiss* i *Kluveromyces marxianus* subsp. *lactis*. Iz kumisa izolirani laktoza nefermentativni kvasci pripadaju vrstama *Sacchromyces cartilaginosus*, *Saccharomyces unisporus* i *Mycoderma* spp.

Tipičan kumis sadrži oko 5×10^7 cfu mL⁻¹ BMK i oko $1,5 \times 10^7$ cfu mL⁻¹ kvasaca.

5-3-5-1.

Tehnologija proizvodnje kumisa

Kumis se za razliku od ostalih fermentiranih mlijeka proizvodi isključivo od kobiljeg mlijeka. U početcima proizvodnje kumisa sirovo kobilje mlijeko stavljalo se u konjsku kožu konzerviranu dimljenjem,

koja je sadržavala mikrobnu populaciju od prijašnje fermentacije mlijeka. Tradicionalnim načinom proizvodnje kumisa danas se umjesto kože za fermentaciju koriste drvene posude. U drvene posude koje sadrže fermentirano mlijeko od prethodnog dana ulije se svježe mlijeko. Slijedi snažno miješanje drvenom miješalicom koja je oblikom slična stapu za proizvodnju maslaca tijekom jednog sata. Miješanjem se ubacuje zrak u fermentacijsko mlijeko radi stvaranja uvjeta za rast kvasaca. Naime, količina alkohola i kvaliteta gotovog proizvoda velikim su dijelom određeni količinom prisutnih kvasaca. Fermentacija na nižim sobnim temperaturama traje nekoliko sati.

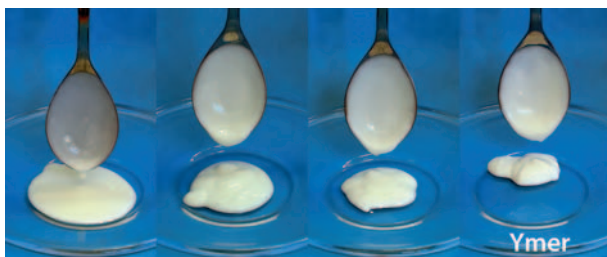
Od 1960. godine razvijena je i komercijalna proizvodnja kumisa u kojoj se *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* i *Torula* spp. u formi tehničke kulture priređuju u kravljem mlijeku. Pripremljenom kulturom inokulira se kobilje mlijeko u količini 3 %, i puni u boce. Slijedi inkubacija na temperaturi 18 - 20 °C tijekom 2 sata. Na kraju se kumis pohranjuje na temperaturu od 5 °C. Temeljeno na tradicionalnim procesima proizvodnje danas se modificirani kumis proizvodi i od obranoga kravljeg mlijeka koje je obogaćeno saharozom (2,5 g 100 g⁻¹). Mliječna se osnova potom toplinski obrađuje na temperaturi od 90 °C/2 - 3 min, hladi na 28 °C, inokulira kulturom za kumis (~ 10 mL 100 mL⁻¹), miješa 15 - 20 min i inkubira na 26 °C tijekom 5 - 6 sati ili dok se ne postigne kiselost od ~ 0,9 g 100 g⁻¹ mliječne kiseline.

5-3-6.

Ymer

Ymer je dansko fermentirano mlijeko čvrste viskozne konzistencije slično koncentriranom jogurtu, a sadrži ~ 12,5 % suhe tvari bez masti (*Sbm*), 6,5 % proteina i 3 % mliječne masti. Tradicionalnim načinom ymer se proizvodi od toplinski obrađenoga obranoga mlijeka korištenjem mezofilne kulture sastavljene od bakterija *L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. Inkubacija ymera na temperaturi

20 - 22 °C traje tako dugo dok se ne postigne kiselost od pH-4,6. Kako je u proizvodnji ymera potrebno djelomično izdvajanje sirutke (~ 50 %) fermentacijsko mlijeko se nakon završene fermentacije postupno zagrijava do temperature od 35 °C. Fermentacijom stvoreni plin CO₂ tijekom zagrijavanja fermentacijskog mlijeka izdvaja gel-strukturu na površinu, a sirutka ostaje ispod njegove površine. Nakon toga sirutka se iscijedi a homogenizirano vrhnje uz snažno miješanje umiješa se u fermentacijsko mlijeko. Slijedi hlađenje i pakiranje ymera.



Slika 5.43.

Izgled teksture ymera u odnosu na teksturu drugih triju vrsta fermentiranih mlijeka proizvedenih mezofilnom kulturom. (CC BY-SA 3,0.)

Suvremena tehnologija proizvodnje ymera uključuje ultrafiltraciju sirovog mlijeka kojom se postiže željeni udjel Sbm i proteina u proizvodu nakon koje se mlijeko homogenizira i toplinski obradi. Inkubacija mlijeka korištenjem mezofile kulture na temperaturi 18 - 20 °C traje 18 - 20 sati do završne kiselosti ymera od pH-4,4 - 4,6. Snažnim miješanjem formirani gel se razbija a proizvod ohladi na temperaturu od 12 °C na kojoj se ostavi 24 sata. Prije punjenja ymer se još jedanput miješa i završno ohladi na temperaturu od 5 °C. Na slici 5.43. prikazana je tekstura industrijski proizvedenog ymera u usporedbi s drugim trima vrstama fermentiranih mlijeka koja se korištenjem mezofilne kulture proizvode u Danskoj.

5.3.7.

Viili

Viili je tradicionalno fermentirano finsko mlijeko koje se razlikuje od svih ostalih fermentiranih mlijeka jer u fermentaciji osim bakterija mliječne kiseline (BMK) sudjeluju i plijesni koje oblikuju baršunasti pokrov na površini proizvoda (slika 5.44.).



Slika 5.44.

Vanjski karakterističan izgled i tekstura tradicionalno proizvedenoga finskoga fermentiranog mlijeka - viilija. (<http://viiliculture.files.wordpress.com/2011/08/viili.jpg>)

Tradicionalnim načinom viili se proizvodi od punomasnoga nehomogeniziranog mlijeka koje se toplinski obrađuje na temperaturi od 95 °C/5 min U mlijeko ohlađeno na 20 °C inokulira se mezofilna kultura koja



Slika 5.45.

Karakterističan izgled villija proizvedenog na industrijski način. (CC BY - SA 3,0.)

sadrži sojeve podvrsta *L. lactis* subsp. *lactis/cremoris/diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextraniticum*, ali i specifične sojeve *L. lactis* subsp. *cremoris* koji imaju sposobnost tvorbe EPS. Inokulirano mlijeko puni se u ambalažne čašice i prebacuje u fermentacijske komore. Fermentacija na temperaturi od 20 °C traje 18 - 20 sati ili dok se ne postigne pH-4,6. Nakon završene fermentacije proizvod se hladi na temperaturu < 6 °C a vijek njegovog trajanja je najmanje 14 dana.

Suvremenom tehnologijom villi se proizvodi i tako mu se dodaje voće na dno ambalaže, a postoje i varijante koje se proizvode uz dodatak probiotičkog soja *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. Također, mlijeko se i homogenizira a iz proizvodnje viilija izostavlja se i dodatak plijesni. Okus industrijski proizvedenog viilija blago je kiseli, aromatičan, konzistencija gusta i lagano "sluzava" ali se može čisto odvojiti žlicom. Odnosno, ako se dio proizvoda iz čašice izdvoji žlicom i premjesti na čvrstu površinu, unutar dvije minute viili zadržava svoj oblik bez gubitka čvrstoće gela i bez izdvajanja sirutke (slika 5.45.).



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka

6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta

- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Fizikalna i reološka svojstva jogurta

Uvod

Fizikalna svojstva jogurta, uključivo nevidljivu (spontanu) sinerezu i vidljivo svojstvo viskoznosti, temeljna su svojstva kvalitete teksture jogurta i njegove senzorne prihvatljivosti kod potrošača. Karakteristike teksture i reološka svojstva jogurta usko su povezana, ali nisu identična pa ih se u procjeni kvalitete proizvoda ne smije izjednačavati. Naime, reološka svojstva jogurta ne obuhvaćaju sve elemente koji čine kompleksnost teksture jogurta.

Razumijevanje samog mehanizma formiranja teksture i utjecaja tehnološkog procesa na kvalitetu gel-strukture predstavlja temelj za formiranje poželjnih

fizikalnih svojstava jogurta. U tom smislu fizikalna svojstva jogurta određena su njegovim reološkim svojstvima: mikrostrukturom, permeabilnošću i sinerezom (predispozicijom gel-strukture za izdvajanjem sirutke).

U ovom poglavlju knjige, osim detaljnijeg opisa fizikalnih i reoloških svojstava jogurta koji je u europskoj proizvodnji fermentiranih mlijeka zastupljen s više od 50 %, za potpunije razumijevanje kompleksnosti formiranja teksture jogurta ukratko su opisani i opći pojmovi iz područja reologije hrane.



6.1.

Fizikalna svojstva jogurta

Na temelju fizikalnih svojstava jogurnog gela, u proizvodnji jogurta razlikuju se tri osnovne varijante - čvrsta, tekuća i pitka. Prema svojstvima gelstrukture tekstura čvrstog, tekućeg i pitkog jogurta je različita. Razlika u teksturi triju osnovnih varijanti jogurta proizlazi iz općeprihvaćene definicije koja glasi: "Svojstva teksture hrane predstavljaju skupinu fizikalnih svojstava koja proizlaze iz strukturnih elemenata hrane koja se mogu osjetiti dodirrom, koja su podložna deformaciji i tečenju ako se primijeni sila, a objektivno se mogu mjeriti kao funkcija mase, vremena i udaljenosti".

Tekstura čvrstog jogurta mora biti glatka, sjajna i bez vidljivo izdvojene sirutke. Kada se žlicom izdvoji koagulum, unutarnja površina čvrstog jogurta mora pokazivati ista svojstva kao i vanjska površina (slika 6.1). Za opis fizikalne strukture čvrstog jogurta uobičajeno se koristi izraz konzistencija čvrstog jogurta.

Za razliku od čvrstog jogurta, tekstura tekućeg jogurta koncentrirana je disperzija zgrušanih čestica



Slika 6.1.

Tekstura ili konzistencija čvrstog jogurta.



Slika 6.2.

Tekstura tekućeg jogurta bez dodatka voća i s dodatkom voća.

u serumu koja mora biti homogena i gusto viskozna (slika 6.2.). Za opis fizikalne strukture tekućeg jogurta uobičajeno se koristi izraz viskozna struktura.

Čvrsti i tekući jogurt pripadaju kremastom obliku jogurta polučvrste strukture. U odnosu na tekući jogurt, konzistencija čvrstog jogurta je čvršća jer se bez značajnijeg mehaničkog uznemiravanja fermentacija odvija u prodajnoj ambalaži. Suprotno, za tekuću varijantu jogurta, čija je fermentacija organizirana u velikim spremnicima, potrebna je daljnja tehnološka

obrada inicijalno čvrsto formiranog gela. Odnosno, tek nakon završene fermentacije inicijalni se gel prije punjenja mehanički razbija miješanjem u tekuću varijantu jogurta. Osim toga, tekući je jogurt vrlo česta osnova za voćne i aromatizirane varijante jogurta pa je tijekom proizvodnje nužno dodatno izložen djelovanju različitih mehaničkih sila. Stajanjem u prodajnoj ambalaži narušena gel-struktura tekućeg jogurta ponovno se obnavlja, ali je njegova tekstura manje čvrsta (slabija) od one originalne prije punjenja. Između karakteristika teksture čvrstoga i tekućeg jogurta, kremasta tekstura najpoželjnije je svojstvo. Međutim, opis karakteristične teksture jogurta objedinjuje i ostala njegova fizikalna i organoleptička svojstva. Zbog toga se kremasta tekstura čvrstog jogurta opisuje i kao svojstvo okusa, budući da je ona istovremeno usko povezana s opisom osjećaja proizvoda u ustima. Tekstura tekućeg jogurta povezana je s relativno visokim viskozitetom, glatkoćom i masnoćom okusa u ustima. Veličina čestica u gel-strukturi jogurta od 100 do 150 μm pruža kremast doživljaj, a one veće od 250 μm osjećaj teške (zbijene) teksture. Gustoća i glatkoća gela u pozitivnoj su korelaciji s kremastom teksturom. Istovremeno, u fizikalnom smislu poželjna tekstura jogurta treba pokazivati svojstvo tečenja, brz oporavak teksture nakon prestanka djelovanja sile i najmanju predispoziciju za izdvajanje sirutke.

Pitki jogurt prvenstveno je namijenjen konzumaciji u svojstvu osvježavajućega zdravog napitka pa se uobičajeno proizvodi u voćnoj ili aromatiziranoj varijanti. Zbog toga je tekstura pitkog jogurta prema svojstvu homogenosti i glatkoće gela slična tekućem jogurtu, ali je manje viskozna (slika 6.3.). Manja viskoznost pitkog jogurta obično je posljedica nižeg udjela S_{bm} (8,0 - 9,5 %) i nižeg udjela mliječne masti, koji je najčešće < 2 %. Također, manja viskoznost posljedica je i korištenja velike brzine miješanja tijekom razbijanja gel-strukture inicijalnog jogurta ili prolaska hladnog jogurta kroz homogenizator.

U formiranju fizikalnih svojstava jogurta ključna je reakcija aglomeracija kazeinskih micela u trodimenzionalnu mrežastu strukturu. Početak acidifikacije mlijeka smatra se kritičnom točkom za formiranje poželjnoga kazeinskog matriksa jogurta, koji je puno



Slika 6.3.

Tekstura pitkog jogurta s dodatkom jagode.

kompleksniji od same precipitacije kazeina u svojoj izoelektričnoj točki (pH - 4,6). Čimbenici poput: (i) vrste dodataka (aditivi, aditivima slične tvari i ostale neškodljive tvari), (ii) udjela ukupne suhe tvari, (iii) vrste i veličine inokuluma, (iv) uvjeta fermentacije, (v) uvjeta toplinske obrade mlijeka i (vi) mehaničke obrade gela, samo su neki od čimbenika koji su usko povezani s fizikalnim svojstvima jogurta. Dodatno, na fizikalnu strukturu u pozitivnom ili negativnom smislu utječu i tvari poput hidrosikoloida ili enzima transglutaminaze, koji se koriste za poboljšanje reoloških svojstava tekućih, pitkih i jogurta s nižim udjelima mliječne masti (< 2 %). Također, jogurti proizvedeni od kozjega ili ovčjeg mlijeka imaju drukčija fizikalna svojstva u usporedbi s jogurtom proizvedenim od kravljeg mlijeka. Kontrolom tih čimbenika svojstva teksture, koja u suštini određuju ukupnu kvalitetu jogurta, mogu biti znatnije poboljšana.

6.2.

Opći principi reologije hrane i reološka svojstva jogurta

Za bolje i potpunije razumijevanje važnosti i značaja reoloških svojstava za procjenu i postizanje željne kvalitete jogurta u nastavku teksta najprije su opisani osnovni pojmovi i principi iz područja reologije hrane.

6.2.1.

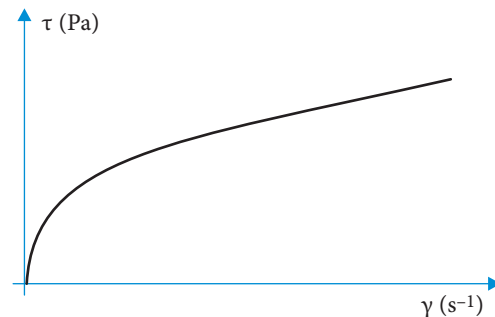
Opći principi reologije hrane

Reologija hrane je znanstvena disciplina reologije koja proučava deformaciju i tečenje krutih i tekućih sastojaka hrane podvrgnutih djelovanju sile. Ona se može definirati i kao proučavanje ponašanja određenih materijala na silom izazvana posmična naprezanja. Reološka svojstva hrane imaju ključnu ulogu u procesnim operacijama poput prijenosa fluidnih tekućina kroz cjevovode ili miješanja, ali i u njezinim kvalitativnim karakteristikama poput određivanja teksture i senzornog osjeta okusa proizvoda u ustima. Važno je istaknuti da se termin reologija primjenjuje i na sve materijale neovisno o tome jesu li oni kruti, tekući ili plinoviti. Zbog toga reološko ponašanje materijala može pomoći u identifikaciji stanja materijala pod bilo kojim zadanim tehnološkim uvjetima.

Učinak korištene sile na posmično naprezanje fluida (obično se smatra tekućina ili plin) stvaranje je brzine smicanja, a grafički se uobičajeno izražava krivuljom tečenja (slika 6.4.) i viskoznom krivuljom (slika 6.5.). Posmično naprezanje materijala ili sila smicanja označava se simbolom τ , dok se brzina smicanja označava simbolom γ i izražava u jedinicama s^{-1} . Tako je prema Newtonovu zakonu:

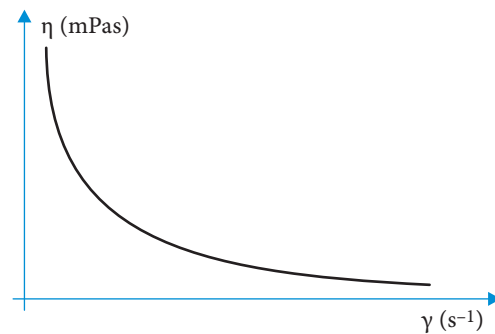
$$\tau = \alpha\gamma \text{ ili } \tau = \mu\gamma$$

gdje je μ konstanta proporcionalnosti poznata pod pojmom viskoznost koja se izražava u paskal jedinicama



Slika 6.4.

Krivulja tečenja fluida. (S dopuštenjem tvrtke Brookfield.)



Slika 6.5.

Viskozna krivulja fluida. (S dopuštenjem tvrtke Brookfield.)

(Pa). Odnosno, viskoznost je svojstvo fluida koje pokazuje rezistentnost na tečenje. Svojstvo tečenja fluida karakterizirano je odnosom između sile smicanja (τ) i brzine smicanja (γ) koji se uobičajeno prikazuje dijagramom ($\gamma - \tau$), gdje se sila smicanja prikazuje na ordinati (os, γ), a brzina smicanja na apscisi (os, x). Dobiveni rezultati mjerenja pomoću viskozimetra ili reometra uvijek čine krivulju tečenja, a funkcija viskoznosti izračunava se na temelju izmjerenih vrijednosti. Urtavanjem viskoznosti preko brzine smicanja (γ) ili sile smicanja (τ) dobiva se funkcija viskoznosti ili viskozna krivulja.

Svojstvo viskoznosti i ponašanje fluida prema sili deformacije ovisi o brojnim eksternim čimbenicima, ali pet ih je najvažnijih:

- svojstvo materijala - viskoznost materijala određena je njegovim fizikalnim i kemijskim svojstvima
- temperatura - temperatura ima najvažniji utjecaj na viskozitet, ona može utjecati na smanjenje viskoziteta određenih fluida i do 10 % ako se temperatura povisi za samo 1 °C
- brzina smicanja - viskoznost većine materijala ovisi o brzini smicanja
- vrijeme - viskoznost ovisi o prijašnjim promjenama oblika strukture ili oblika deformacije materijala
- tlak - ako se primijeni visoki tlak, viskoznost materijala može se povećati budući da se čestice mogu organizirati u mnogo čvršću strukturu, gdje su moguće veće interakcije.

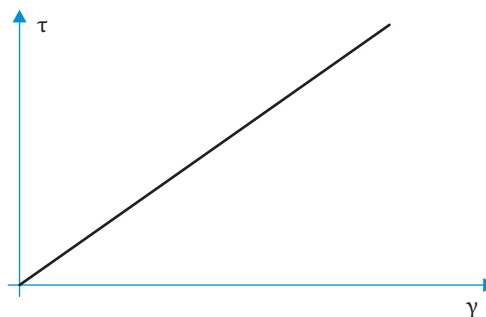
Uobičajeni fluidi poput zraka, vode, mineralnog ulja, šećerne otopine, slijede Newtonov zakon gdje su posmična naprezanja i brzina smicanja u proporcionalnom statusu. Odnosno, definirani su Newtonovim zakonom viskoznosti:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} = \text{konst.}$$

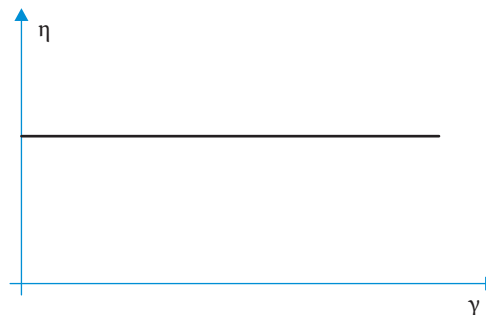
Drugim riječima, ako se Newtonovi fluidi podvrgnu sili smicanja (τ), viskozitet (η) se ne mijenja promjenom brzine smicanja ($\dot{\gamma}$). Tako je svojstvo tečenja materijala u koordinatnom sustavu ravna linija koja teče pod određenim kutom α (slika 6.6.). Kada se viskozitet unese preko brzine smicanja (ili sile smicanja) u koordinatni sustav, dobije se ravna linija koja počinje na $\dot{\gamma} = 0 \text{ s}^{-1}$ (ili $\tau = 0 \text{ Pa}$) i teče paralelno s apscisom i predstavlja idealan viskozni materijal (slika 6.7.). Idealan viskozni materijal ne ovisi o brzini smicanja.

U tom je smislu viskozitet vode na sobnoj temperaturi ($\sim 20 \text{ °C}$) približno 10^{-3} Pa s . Mlijeko se poput vode ponaša kao Newtonov fluid, a njegova je viskoznost na 20 °C približno $1,79 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ za punomasno, a $1,3 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ za obrano mlijeko. Prosječno utvrđena viskoznost za kozje mlijeko je $2,12 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$, a za ovčje $2,48 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$.

Ako se na idealne viskozne fluide primijeni vanjska sila poput gravitacijske sile, oni će pretrpjeti ireverzibilnu deformaciju. No, takvih je fluida s idealnim viskoznim ponašanjem koji imaju praktičnu važnost



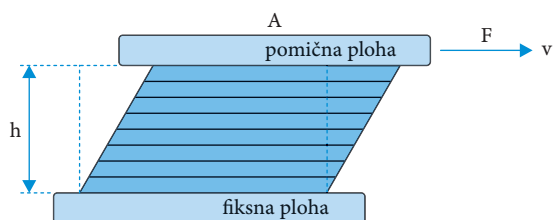
Slika 6.6.
Krivulja tečenja Newtonovih fluida. (S dopuštenjem tvrtke Brookfield.)



Slika 6.7.
Viskozna krivulja Newtonovih fluida. (S dopuštenjem tvrtke Brookfield.)

zanemariv broj. Većina fluida ne pokazuje niti idealna viskozna niti idealna elastična svojstva, već imaju istovremeno viskoelastična svojstva.

Prema jednostavnom modelu paralelnih ploča (slika 6.8.) najjednostavnije je objasniti reološka svojstva fluida. Gornja ploča A [m²] pokreće se silom F [N = kg m/s²] brzinom v [m/s]. Istovremeno, donja ploča ostaje u mirovanju. Udaljenost između ploča gdje je materijal povezan opisuje se kao h [m]. Dakle, najtanji elementi fluida raspoređeni su između ploča. Ovo laminarno svojstvo fluida od fundamentalne je važnosti za njihova reološka istraživanja.



Slika 6.8.

Reološka svojstva fluida ilustrirana modelom paralelnih ploča. (S dopuštenjem tvrtke Brookfield.)

Prema Newtonovu zakonu, sila raspoređena na površini proporcionalna je omjeru deformacije ili tečenja. Drugim riječima, sila smicanja (τ) jednaka je omjeru F/A . A viskoznost ili koeficijent viskoznosti (η) jednak je sila smicanja/brzina smicanja (Pa s^{-1}) i proporcionalan brzini smicanja (v/h). Konstanta proporcionalnosti poznata je kao dinamična viskoznost. Koeficijent viskoznosti (η) predstavlja otpor koji pokazuje određeni fluid na svojstvo tečenja pri kretanju kroz cijev. Reološka svojstva fluida izražavaju se jednadžbama:

- sila smicanja
 $\tau = F/A$ (u Pa)
- brzina smicanja
 $\gamma = v/h$ (u s^{-1})
- dinamički viskozitet
 $\eta = \tau/\gamma$ (u Pa s) $\leftrightarrow \tau/\gamma = \text{Pa}/\text{s}^{-1} = \text{Pa s}$
- deformacija (stres)
 $\gamma = \Delta x/h$ (ne izražava se u mjernim jedinicama)

Međutim, svi fluidi ipak ne slijede Newtonov zakon, već se ponašaju kao neneutronove tekućine. Ovu skupinu prvenstveno čine biološki fluidi gdje viskoznost nije konstantna veličina već ovisi o brzini smicanja pa se zbog toga naziva prividna viskoznost. Višestruka varijabilnost ponašanja neneutronovih fluida određena je svojstvima samog materijala. Ipak, radi jednostavnosti, neneutronovi fluidi klasificiraju se prema svom ponašanju najčešće na sljedeći način:

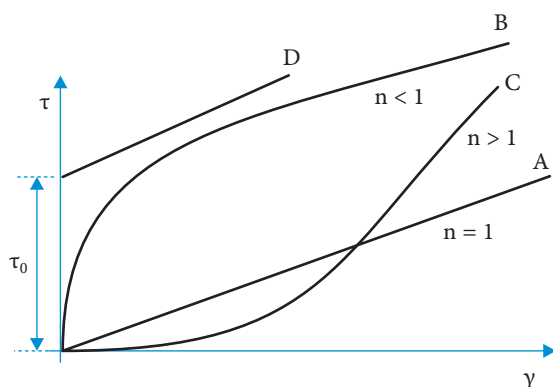
- vremenski neovisni
- vremenski ovisni bez elastičnog učinka.

U slučaju vremenski neovisnog ponašanja fluida prividna viskoznost (μ_α) ovisi jedino o brzini smicanja (γ). Kada se μ_α smanjuje s γ , fluidna tekućina opisuje se kao pseudoplastična. Suprotno, kada se μ_α povećava s γ , fluidna tekućina opisuje se kao elastična. Matematički, za opis vremenski neovisnog ponašanja fluida može se koristiti formula:

$$\tau = k \gamma^n$$

gdje je k indeks konzistentnosti (nepromijenjenosti), a n koeficijent snage tečenja. Iz čega proizlazi: kada je $n = 1$ fluid izražava karakteristike Newtonova fluida a tečenje se ne događa; kada je $n < 1$ tečenje je brzo; kada je $n > 1$ tečenje je sporo. Osim vremenski ovisnog tečenja, neki materijali iskazuju svojstvo količinskog naprezanja, što znači da takvi materijali ne pokazuju svojstvo tečenja ispod minimalnog korištenog posmičnog naprezanja. Čokolada je tijekom svoga proizvodnog procesa dobar primjer za opis svojstva obima količinskog naprezanja. U slučajevima kada je svojstvo tečenja određeno razinom posmičnog naprezanja koja prelazi količinsko naprezanje, tada se svojstvo tečenja materijala opisuje kao Binghamova plastičnost. Reološko ponašanje vremenski ovisnog neneutronova svojstva tečenja fluida ovisi o trajanju i primijenjenoj sili smicanja te njegovoj magnitudi. Odnos između napona smicanja i brzine tečenja neneutronovih u odnosu na Newtonov fluid gdje je $n = 1$, prikazan je slikom 6.9.

Mnogi su biološki fluidi također određeni određenom vrstom "strukture" koja osim viskoznosti pokazuje i svojstva elastičnosti poput čvrstih materijala (tijela) kada ih podvrgnemo sili. Kada se idealne elastične materijale podvrgne eksternoj sili oni prolaze kroz svoju elastičnu deformaciju. Energija potrebna za tu deformaciju pohranjena je unutar materijala, a kada sila prestane djelovati ta energija spontano se oslobađa dok materijal u potpunosti ne poprimi originalnu formu. Ovo specifično svojstvo materijala označava se kao modul pohrane G' . Suprotno, kada se idealne viskozne materijale podvrgne djelovanju



Slika 6.9.

Odnos između napona smicanja i brzine tečenja fluida.

Detalji: A, B i C predstavljaju tečenje koje je određeno modelom potencijalnog zakona: $\tau = k \gamma^n$; A predstavlja Newtonov fluid gdje je $n = 1$; B predstavlja pseudoplastični fluid gdje je $n < 1$; C predstavlja dilatacijski fluid gdje je $n > 1$. Linija D predstavlja Binghamov plastični fluid gdje je svojstvo tečenja određeno razinom posmičnog naprezanja koja prelazi količinsko naprezanje (τ_0). (preuzeto od Niranjana i Gutiérrez-López, 2009.)

eksterne sile oni prolaze kroz svoju ireverzibilnu deformaciju, a ulazna energija transformira se u toplinu što povećava viskozitet. Ovo specifično svojstvo materijala označava se kao modul gubitka G'' . Silom izazvano povećanje viskoziteta opisuje se kao svojstvo tečenja. Takvi fluidi poznati su pod imenom viskoelastični fluidi. Naime, mnogi hidrokoloide sposobni su formirati gel-strukture različite čvrstoće ovisno o vlastitoj strukturi i sastavu, te utjecaju vanjskih čimbenika poput temperature i pH. Kombinirana elastična i viskozna svojstva gel-strukture moguće je odrediti prema učinku što ga ima neka oscilirajuća sila na pokretanje materijala. Neke od deformacija viskoelastičnih materijala na konstantnu silu smicanja elastične su prirode i zadržavaju nultu vrijednost kada sila prestane djelovati. Zbog viskozne prirode materijala ostale konstantnom silom izazvane deformacije nakon prestanka djelovanja sile neće imati početnu vrijednost.

Odnosno, uz konstantnu silu elastično svojstvo zadržava konstantnost, a viskozno se povećava. U slučajevima kada primijenjena sila sinusoidalno varira u vremenu, tada je viskozna energija uvijek pozitivna i gubi se u obliku topline, dok promjene elastične energije mogu biti pozitivne ili negativne ali se energija ne gubi već se pohranjuje. Pod takvim uvjetima omjer deformacije zaostaje ispod promjena izazvanih silom za promjenu tangente kuta (δ). Tangenta kuta (δ) jednaka nuli označava idealno elastični gel (sva energija pohranjena je u materijalu), a 90° označava idealno viskozni gel (sva energija iz materijala oslobođena je toplinom). U slučajevima kada je tangenta kuta (δ) 45° znači da je uspostavljena ravnoteža između pohranjene i izgubljene energije, odnosno njezina je vrijednost 1. Vrijednosti $\text{tg}(\delta)$ veće od 1 znače da gel-struktura ima više tekuća, a manja od 1 više "kruta" svojstva neovisno o viskoznosti. Viskoelastična svojstva fluida izražavaju se jednadžbama:

$$\sigma(t) = \gamma_0 G'(\omega) \sin(\omega t) + \gamma_0 G''(\omega) \cos(\omega t) \quad (1)$$

$$\eta = G'' / \omega \quad (2)$$

$$\text{tg}(\delta) = G'' / G' \quad (3)$$

gdje: frekvencijski ovisna funkcija $G'(\omega)$ predstavlja modul pohrane ili elastičnosti, a frekvencijski ovisna funkcija $G''(\omega)$ modul gubitka ili viskoznosti.

Također, važno je izraziti odnos između sile smicanja, elastičnog stresa i viskoznog stresa (nastalih zbog promjenjive sile) terminom kompleksnog broja ($i = \sqrt{-1}$), gdje su viskozni stres i elastični stres obrnuto proporcionalni kako slijedi:

- sila smicanja = viskozni stres – i x elastični stres
- kompleksna viskoznost = viskozitet – i x elastični stres

Iz čega slijedi:

$$G^* = G' + i G''$$

gdje je G^* modul kompleksnosti (nastao kao rezultat promjenjivih deformacija; $G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$), G' modul pohrane, a G'' modul gubitka.

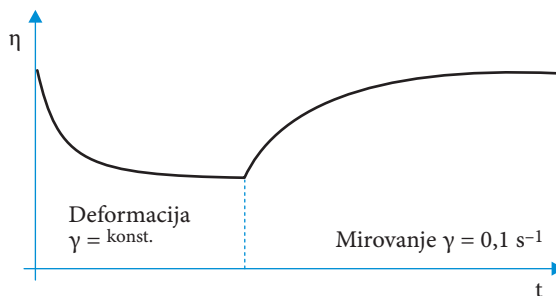
6.2.2.

Reološka svojstva jogurta

Zajedno fizikalne karakteristike teksture i reološka svojstva čine jedinstvenu kompleksnost teksture jogurta. Uz viskozitet, reološka svojstva koja opisuju stanje elastičnosti, čvrstoće ili lomljivosti te kohezijsku povezanost gel-strukture osobito su važna za kvalitetu jogurta. Viskozitet se definira kao sila trenja između dvaju slojeva tekućine koji se kreću jedan pored drugog i proporcionalan je površini slojeva i razlici njihovih brzina. Odnosno, viskoznost materijala može se opisati i kroz pojam dodane energije koja je u njemu sva raspršena u obliku topline. Kohezivnost označava granicu do koje se gel-struktura jogurta može deformirati prije nego pukne. Čvrstoća je povezana s kohezijskom povezanošću gel-strukture i tako određuje jačinu sile potrebne da se dostigne zadana deformacija prije svog pucanja. Elastičnost se opisuje atributom pruživosti i povezana je sa sposobnošću gel-strukture jogurta za vraćanje u nedeformirano stanje. Odnosno, elastičnost je pojam koji označava da je sva dodana energija pohranjena u materijalu. Viskoelastičnost označava da materijal ima neka od elastičnih svojstava od idealne krute tvari i neka od svojstava tečenja od idealne viskozne tekućine.

U kontekstu navedenog opisa reološkog ponašanja bioloških fluida, jogurt prema svojstvima teksture i svojim reološkim karakteristikama može biti klasificiran: (i) pseudoplastični materijal (sadrži određenu silu naprezanja koja se može osloboditi ako je nečim inicirana), (ii) viskoelastična fluidna tekućina (tekući i pitki jogurt) ili (iii) viskoelastična krutina (čvrsti jogurt). Također, jogurt pokazuje nenevtonovsko ponašanje fluida i ima svojstvo smicanja u određenom vremenu, ali nije čisti tiksotropni materijal. Naime, sve strukturalne promjene koje se događaju u jogurtu tijekom smicanja nisu potpuno reverzibilne reakcije u trenutku prestanka smicanja. Tako će čvrsti jogurti gel miješanjem uz konstantnu silu (postupak koji se primjenjuje u proizvodnji tekućeg jogurta) brzo prijeći u sol, ali nakon prestanka djelovanja sile jogurt

će ponovno brzo prijeći u svoju gel-strukturu (slika 6.10.). Međutim, ta gel-struktura bit će manje viskozna od one originalne prije miješanja. Za podsjetnik, tiksotropni materijal označava materijal koji miješanjem prelazi u sol (solovi su disperzije čvrstih čestica u tekućini), ali se stajanjem nakon prestanka djelovanja sile ponovno vraćaju u polučvrsto stanje.



Slika 6.10.

Vremenski ovisna viskozna krivulja tekućeg jogurta. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)

U praktičnom smislu, to znači da će neadekvatno korištenje proizvodnih procesa i mehaničkih manipulacija izazvati: (i) pucanje gela čvrstog jogurta koje se nikada neće u potpunosti obnoviti ili (ii) uzrokovati snižavanje prividnog viskoziteta tekućeg jogurta. Također, i distribucija tekućeg jogurta odmah nakon pakiranja bez završnog hlađenja uzrokovat će njegovu slabiju viskoznost.

6.2.2.1.

Mjerenja

Tijekom i nakon proizvodnje za kvalitetu jogurta od presudnog je značenja kontrolirati njegove reološke karakteristike i procjenjivati svojstva teksture formiranog gela. Za tu svrhu postoji nekoliko instrumentalnih metoda mjerenja, ali se one u osnovi mogu podijeliti u dvije skupine:

- metode koje se temelje na mjerenju malih deformacija (nedestruktivne metode)
- metode koje se temelje na mjerenju velikih deformacija (destruktivne metode).

Modernim instrumentima danas je moguće izmjeriti i obje vrste deformacija jogurtnog gela istim instrumentom. Za te svrhe koriste se instrumenti koji rade na principu kompresije (analizatori teksture) ili rotacije (viskozimetri, reometri). Osim tih vrsta instrumentalnih metoda često se za procjenu ukupne kvalitete jogurta koriste i različite mikroskopske, instrumentalne senzorne i organoleptičke metode. Mikroskopskim metodama fizička struktura jogurtnog gela se procjenjuje finom analizom mikrostrukture finalnog proizvoda. Indirektno, organoleptičkim se analizama također procjenjuje fizička struktura jogurta koja je osnova za sva osjetilna obilježja finalnog proizvoda. Tako su organoleptički atributi za teksturu i za svojstvo okusa jogurta u visokoj korelaciji s metodama mjerenja koje se temelje na mjerenju velikih deformacija gel-strukture proizvoda.

Reološka svojstva jogurta temeljena na procjeni određenog stupnja deformacije gel-strukture najčešće se određuju metodama mjerenja:

- amplituda malih oscilacija, u literaturi poznatih pod skraćenicom SAOR (engl. *Small Amplitude Oscillatory Reology*)
- amplituda velikih oscilacija
- penetracije
- analizom profila teksture.

Nabrojenim metodama moguće je procijeniti učinak tehnoloških parametara poput vrste korištene kulture, temperature fermentacije ili udjela suhe tvari na konzistenciju ili viskozitet jogurta. Također, moguće je diferencirati i elastična od viskoznih svojstava gel-strukture jogurta.

Reološka svojstva teksture čvrstog jogurta uobičajeno se procjenjuju cilindričnim penetracijskim testom. Ovim testom mjeri se snaga potrebna da se cilindar utisne u jogurt uz konstantnu brzinu do definirane dubine. Snaga sile predstavlja čvrstoću, a priprema uzoraka nije potrebna što je svakako znatna

prednost te metode. Međutim, kako većinu reoloških parametara jogurta karakterizira kazeinska gel-struktura koju predstavljaju dinamični moduli, moguće je i svojstva teksture čvrstog jogurta mjeriti dinamičnim viskoelastičnim testovima. Princip mjerenja tim testovima temelji se na primjeni malih sinusoidalnih sila i mjerenju njima izazvanih deformacija u linearnom viskoelastičnom području. Dinamični moduli u određenom linearnom viskoelastičnom području neovisni su o primijenjenoj sili naprezanja. Male amplitude oscilacija reda su veličina 1 - 3 % ili 5 % a definiraju se kao relativno male deformacije naprezanja ili kao promjene dimenzija analiziranog materijala ≤ 1 %. Zbog primjene malih sinusoidnih sila koje se koriste tijekom analize uzorka unutar linearne viskoelastične regije ne događaju se promjene osnovnog svojstva materijala. Za korištenje SAOR metode mjerenja reoloških svojstava bilo kojeg materijala prethodno je potrebno odrediti linearni viskoelastični limit za koji je linearna viskoelastična teorija prihvatljiva. Testiranje linearnog viskoelastičnog limita se izvodi na niskim frekvencijama oscilacija od primjerice 1 Hz. Drugim riječima, za mjerenja reoloških svojstava materijala mora se osigurati mjerno područje u kojem je deformacija proporcionalna primijenjenoj sili naprezanja prema prihvaćenoj linearnoj viskoelastičnoj teoriji iskazanoj jednadžbom:

$$\sigma(t) = \gamma_0 G'(\omega) \sin(\omega t) + \gamma_0 G''(\omega) \cos(\omega t)$$

gdje: frekvencijski ovisna funkcija $G'(\omega)$ predstavlja modul pohrane ili elastičnosti, a frekvencijski ovisna funkcija $G''(\omega)$ modul gubitka ili viskoznosti.

Modul pohrane ili elastičnosti (G') mjera je pohrane energije koja se oslobađa deformacijskim ciklusom po jedinici volumena na razini promjena molekula vezanih na prirodna elastična svojstva materijala. Zbog toga je G' vrijednost indikator svojstva čvrstoće testiranog materijala. Istodobno modul gubitka ili viskoznosti (G'') mjera je izgubljene energije u obliku topline koja se oslobađa deformacijskim ciklusom po jedinici volumena na razini promjena molekula vezanih na prirodna viskozna svojstva materijala. Zbog toga vrijednost G'' predstavlja količinu izgubljene energije viskoziteta i indikator je svojstva tečenja. U

dinamičnim viskoelastičnim testovima modul pohrane ili elastičnosti G' i modul gubitka ili viskoznosti G'' često se koriste za opis elastičnih i viskoznih svojstava materijala. Također, za opis reoloških svojstava materijala često se koristi i vrijednost modula gubitka tangente ($\tan \delta$) ili sinusa kuta (δ) (sinus kuta = α -kut zakretanja očit na rotacijskom viskozimetru). Modul gubitka tangente δ definira se kao omjer između modula gubitka i modula pohrane (G''/G') i predstavlja opis viskoelastičnih svojstava materijala. Visoka δ vrijednost ($G'' > G'$) znači da se materijal ponaša kao tekućina.

Linearno viskoelastično područje završava kada je G' vrijednost 5 % manja od gornje vrijednosti G' . U slučajevima kada se sila smicanja ili naprezanje povećava, linearno viskoelastično područje potpuno je poravnato, a vrijednost G' izjednačava se s vrijednošću G'' ($G' = G''$). Preklapanje tih vrijednosti smatra se dobrim indikatorom prekoračenja praga naprezanja kada struktura materijala puca i započinje tečenje. Ti parametri definirani su jednažbama:

$$G' = (\tau_0/\gamma_0) \cos \delta \quad (1)$$

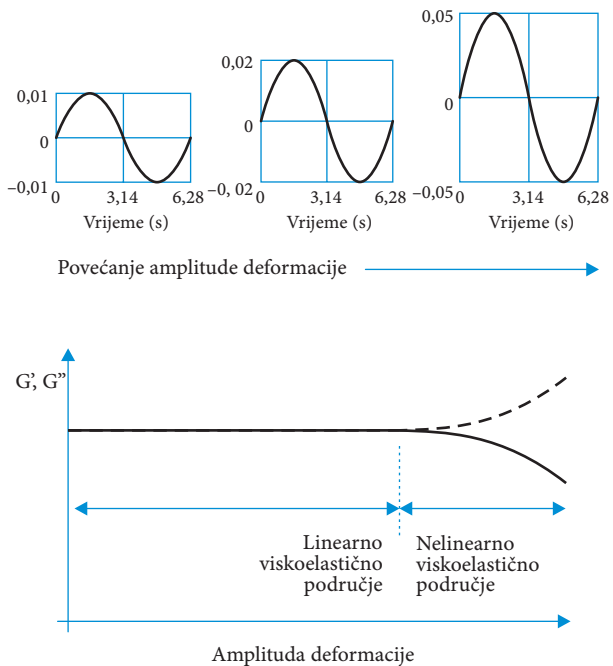
$$G'' = (\tau_0/\gamma_0) \sin \delta \quad (2)$$

$$\tan \delta = G''/G' \quad (3)$$

gdje je τ_0 amplituda napona smicanja, γ_0 je amplituda brzine smicanja, a δ je tangens kutova.

Shematski prikaz određivanja linearnoga viskoelastičnog limita koji će se koristiti za mjerenje reoloških svojstava određenog materijala prikazan je na slici 6.11.

Opisani SAOR testovi koriste se i za procjenu viskoelastičnih svojstava jogurta tijekom fermentacije. Za tu svrhu koristi se reologija još nižih amplituda oscilacije ($\leq 0,1\text{Hz}$) koje ne narušava nježnu strukturu gela koji se formira. Konkretno, kada se u definiranom linearnom viskoelastičnom području gel-struktura jogurta izloži reverzibilnom stresu s naponom smicanja manjim od 5 Pa ili naprezanju manjem od 1 %, svojstva teksture i čvrstoga i tekućeg jogurta neće se promijeniti. Treba istaknuti i činjenicu da su za formiranje gel-strukture jogurta tijekom fermentacije i u reološkom smislu karakteristične dvije odvojene faze. Najprije se uočava inicijalna ili lag- faza, nakon koje

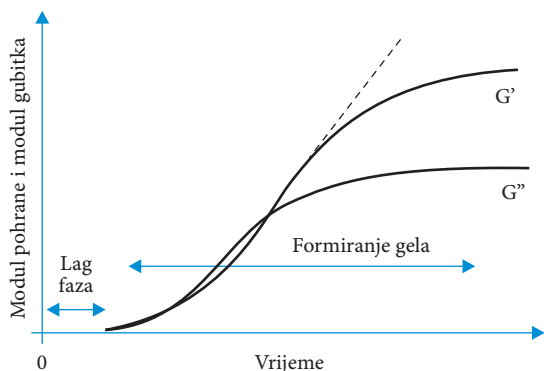


Slika 6.11.

Shematski prikaz određivanja linearnoga viskoelastičnog limita koji će se koristiti za mjerenje reoloških svojstava određenog materijala.

Detalji: amplitude deformacije povećavaju se ovisno o izabranoj frekvenciji, dok modul pohrane ili elastičnosti (G') i modul gubitka ili viskoznosti (G'') ostaju neovisni o primijenjenoj deformaciji. (Gunasekaran i Ak, 2000., s dopuštenjem Elseviera.)

slijedi dinamična faza koja ima veću vrijednost momenta sile od minimalne vrijednosti na reometru. U dinamičnoj fazi fermentacije vrijednosti modula G' i G'' brzo se povećavaju a omjer povećanja vrijednosti ovisan je o zadanim uvjetima fermentacije. Početno brzo povećanje vrijednosti modula G' i modula G'' u dinamičnoj fazi fermentacije nastaje zbog formiranja dodatnih veza između čestica proteina, preuređenja u proteinskoj strukturi i vjerojatno prihvaćanja ostalih nepovezanih sastojaka za strukturu proteinske mreže. Tijekom fermentacije izmjerena vrijednost



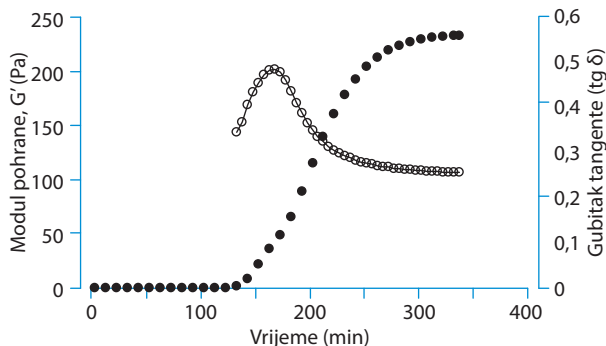
Slika 6.12.

Opis karakterističnih podataka za modul pohrane ili elastičnosti G' i modul gubitka ili viskoznosti G'' kao funkcije vremena formiranja gel-strukture jogurta.

Detalji: uočava se lag- faza, nakon koje slijedi dinamična faza u kojoj se formira gel-struktura jogurta. (Gunasekaran i Ak, 2000., s dopuštenjem Elsevieria.)

modula pohrane ili elastičnosti (G') pokazuje svojstva čvrstoće, a izmjerena vrijednost modula gubitka ili viskoznosti (G'') pokazuje svojstva viskoznosti gel-strukture jogurta. Shematski prikaz karakteristične krivulje formiranja gela tijekom fermentacije prikazan je slikom 6.12.

Karakteristično formiranje gel-strukture jogurta mjerenjem vrijednosti modula gubitka tangente ($\text{tg } \delta$) kojom se procjenjuju viskoelastična svojstva jogurta u odnosu na modul pohrane ili elastičnosti (G') shematski je prikazano slikom 6.13. Nakon najviše vrijednosti na početku fermentacije ($\text{tg } \delta = G''/G'$), vjerojatno zbog smanjenja elektrostatskog odbijanja čestica i povećanja kazein-kazein interakcija kao posljedice približavanja kazeina svojoj izoelektričnoj točki ($\text{pH} \sim 4,6$), vrijednost modula $\text{tg } \delta$ se smanjuje. Najnižu vrijednost modul $\text{tg } \delta$ ima kada tijekom fermentacije fermentacijsko mlijeko dostigne pH vrijednosti $\sim 4,6$. Promjene vrijednosti $\text{tg } \delta$ od navise do najniže, smatra se, direktna su posljedica postupnog prijelaza početno netopljive forme koloidnog kalcijevog fosfata (KCP) u topljivi micelarni kalcijev fosfat koji više nije



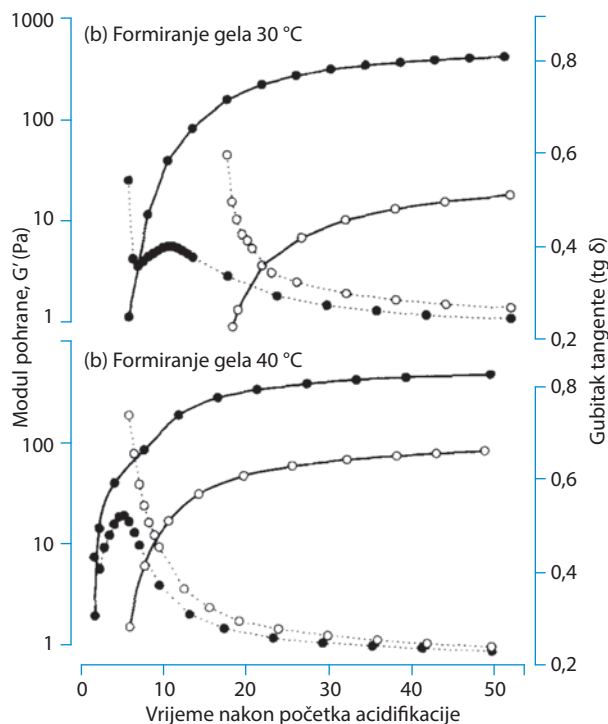
Slika 6.13.

Karakteristično formiranje viskoelastičnih svojstva jogurnog gela tijekom fermentacije.

Detalji: (●) u krivulji predstavlja modul pohrane (G'), (○) u krivulji predstavlja modul gubitka tangente (δ). Za mjerenja viskoelastičnih svojstava gel-strukture jogurta tijekom fermentacije (40°C) korišteno je toplinski obrađeno mlijeko na temperaturi $90^\circ\text{C}/5\text{ min}$, inokulirano standardnom jogurnom kulturom. (Lee i Lucey, 2010., s dopuštenjem časopisa AJAS.)

vezan za kazein. Za primjer, na slici 6.14. prikazana je razlika između načina formiranja gela kao funkcije modula pohrane (G') i modula gubitka tangente ($\text{tg } \delta$) ovisno o temperaturi toplinske obrade i temperaturi fermentacije.

Mjerenja amplituda velikih deformacija gel-strukture također su značajna reološka svojstva jogurta. Osobito su ona značajna za tekući i pitki jogurt, gdje se inicijalni gel djelovanjem sile razbija. Karakteristike velikih deformacija vezane su za svojstva jogurta poput oblika i okusa proizvoda u ustima. Zbog toga su i organoleptički atributi za opis teksture često u uskoj korelaciji s rezultatima testa mjerenja velikih deformacija jogurnog gela dobivenih instrumentom. Jedna od takvih vrsta mjerenja je i test u kojem se primjenjuje prekomjerna ili stalna sila smicanja. Reološki parametri kojima se procjenjuje kvaliteta jogurta uključuju prag sile smicanja ili energiju potrebnu da se tekućina pokrene ($\sigma_{\text{otpor deformaciji}}$) i oscilaciju brzine smicanja

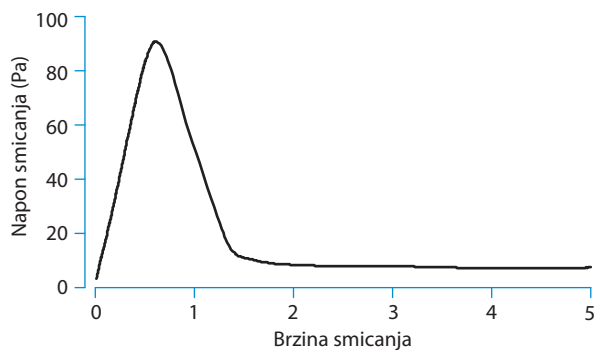


Slika 6.14.

Učinak temperature toplinske obrade mlijeka i temperature fermentacije na reološka svojstva mliječnom kiselinom formiranoga gela.

Detalji: (a) temperatura fermentacije 30 °C i (b) 40 °C; (○) toplinski neobrađeno mlijeko, (●) toplinski obrađeno mlijeko; (—) modul pohrane (G'), (---) modul gubitka tangente ($tg \delta$). (Lucey i Singh, 1997., s dopuštenjem Elseviera.)

(γ_{otpor} deformaciji), koja je definirana točkom kada sila naprezanja počinje slabiti. Niska vrijednost σ_{otpor} deformaciji upućuje na to da je struktura jogurtnog gela nježna, dok niska γ_{otpor} deformaciji vrijednost implicira da je ona krhka ili lomljiva. U tom smislu poželjan oblik gel-strukture i okusa jogurta u ustima određen je jačinom protein-protein veza i brojem poprečnih veza unutar agregirane strukture kazeina, i relaksacijskim vremenom veza unutar kazeinske mreže.



Slika 6.15.

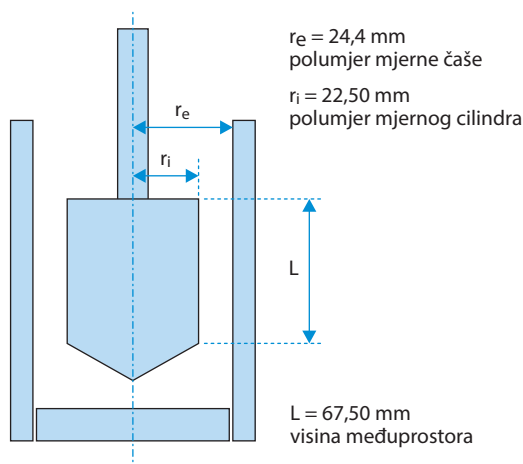
Karakteristična krivulja velikih deformacijskih svojstava gel-strukture jogurta mjerene na pH-4,6 korištenjem konstantne sile smicanja.

Detalji: jogurt je pripremljen od toplinski obrađenog mlijeka 85 °C/30 min, a fermentacija je provedena na temperaturi od 43 °C. (Lee i Lucey, 2010., s dopuštenjem časopisa AJAS.)

Tipična reološka krivulja mjerenja velikih deformacija tekture jogurta prikazana je na slici 6.15.

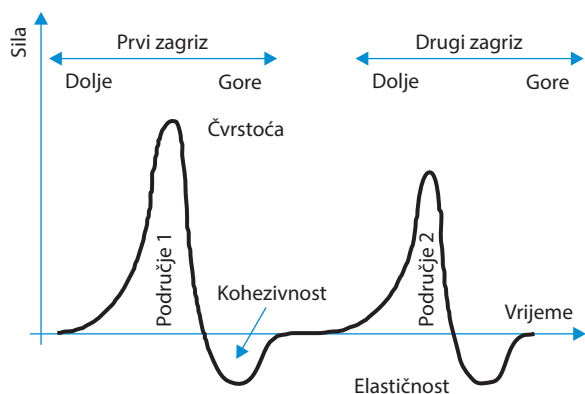
Za primjer utvrđivanja reoloških svojstava finalnog proizvoda princip i način mjerenja prividnog viskoziteta tekućeg jogurta prikazan je za rotacijski reometar na koji je priključen mjerni sustav Z-2 DIN (ISO 3219). Mjerni sustav Z-2 DIN koaksijalni je standardni mjerni sustav koji se sastoji od mjerne čaše i mjernog cilindra (slika 6.16.). Za brzinu smicanja najbolje je izabrati $0,5 \text{ s}^{-1}$ i vrijeme trajanja mjerenja unutar 5 sekundi, da se izbjegne destrukcija gel-strukture jogurta pojavom tranzicijske viskoznosti.

Mjerenjem amplituda velikih deformacija gel-strukture procjenjuje se i reološko svojstvo tečenja, osobito tekućih varijanti jogurta. Svojstvo tečenja jogurta prikazuje se krivuljom tečenja koja se dobije na temelju primjene različite jačine i brzine smicanja i mjerenja dobivenog odgovora analiziranog uzorka. Sila i brzina smicanja ovise o vrsti korištenog reometra, tako brzina smicanja može biti manja od 0,1 do 1000 sekundi.



Slika 6.16.

Shematski prikaz principa mjerenja rotacijskog reometra.



Slika 6.17.

Shematski prikaz principa rada instrumenta za analize profila teksture kojom je moguće definirati svojstva čvrstoće, kohezivnosti i elastičnosti jogurta.

Svojstva teksture jogurta procjenjuju se i analizom profila teksture koja imitira uvjete žvakanja u ustima. Iako uvjeti testiranja nisu identični onima u ustima, rezultati analize profila teksture u dobroj su korelaciji s organoleptičkom procjenom kvalitete jogurta. Instrumenti za analize profila teksture jogurta rade

na principu kompresije uzorka, te pripadaju destruktivnoj reološkoj metodi ili metodi koja se temelji na mjerenju velikih deformacija gel-strukture jogurta. Slika 6.17. prikazuje tipičnu krivulju analize profila teksture kojom je moguće definirati svojstva čvrstoće, kohezivnosti i elastičnosti jogurta. Čvrstoća je određena maksimalnom silom potrebnom da se izazove deformacija prvom kompresijom (prvi zagriz). Kohezivnost se definira kao omjer između pozitivne snage prve i druge kompresije (područje 1/područje 2). Elastičnost se definira visinom deformiranosti koja se ispravlja u vremenu između kraja prvog i početka drugog zagriza.

6.2.3.

Mikrostruktura

Pojam mikrostruktura jogurta označava fizičku strukturu gela koju čine kazeinske čestice povezane u klastere, lance (kratke do srednje dužine) i proteinske niti na koje su istaloženi denaturirani proteini sirutke. Zajedno ti proteini (kazein i proteini sirutke) s porama ili praznim prostorima u kojima se nalazi serum mlijeka (vodena faza) čine mrežu ili matriks gel-strukture jogurta. U proizvodima koji sadrže mliječnu mast, masne globule su također inkorporirane u proteinski matriks formiranoga jogurnog gela. Veličina pora unutar proteinskog matriksa prvenstveno ovisi o temperaturi toplinske obrade mlijeka, načinu obogaćivanja suhe tvari bez masti (**Sbm**) i fermentaciji, a mogu biti reda veličina između $< 10 \mu\text{m}$ i $< 30 \mu\text{m}$. U dobro formiranoj mikrostrukturi najveće pore ili prazni prostori u kazeinskom matriksu reda su veličine od $10 \mu\text{m}$, pa se takav matriks smatra kontinuiranim matriksom. Postojanje kontinuiranog matriksa u fizikalnom smislu implicira da je jogurni gel viskoelastični materijal (materijal koji pokazuje viskozna i elastična svojstva) karakteriziran prilično malom otpornošću na stres ($\sim 100 \text{Pa}$). Kada se gel razbije, što je slučaj u proizvodnji tekućeg jogurta, formira se potpuno newtonov fluid, a proizvod ima pravi prividni viskozitet. U usporedbi s mikrostrukturom čvrstog jogurta,

mikrostruktura tekućeg jogurta sadrži veći broj kazeinskih čestica koje unutar formiranog matriksa čine slabo povezani kazeinski klasteri. Drugim riječima, razbijanjem formirane gel-strukture nakon završene fermentacije u potpunosti se narušava karakteristična trodimenzionalna mikrostruktura čvrstog jogurta. Zbog toga se prema teksturi čvrsti i tekući jogurt značajno razlikuju.

Osim kemijskog sastava, vrste mlijeka i temperature toplinske obrade mlijeka, koji su od najveće važnosti za formiranje mikrostrukture jogurta, ostali tehnološki parametri koji se koriste u proizvodnji jogurta nisu manje značajni. Tako značajan utjecaj na svojstva mikrostrukture jogurta imaju sljedeći tehnološki parametri:

- vrsta i količina mliječnih ingredijenata za obogaćivanje Sbm mlijeka
- udjel ukupnih proteina i omjer kazein : proteini sirutke
- vrsta i količina stabilizatora
- udjel masti i uvjeti homogenizacije
- vrsta i svojstva mikrobne kulture
- temperatura inkubacije i količina inokuluma.

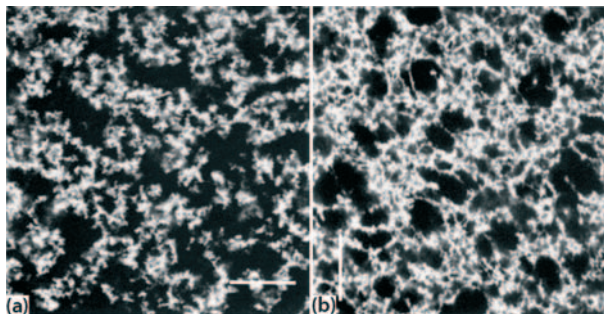
Na mikrostrukturu jogurta u većoj ili manjoj mjeri utječu i čimbenici poput pH vrijednosti u trenutku prekidanja fermentacije i u trenutku razbijanja formiranog gela, kao i uvjeti hlađenja i pohrane proizvoda.

Za precizno proučavanje mikrostrukture jogurta najčešće se koriste skenirajući elektronski mikroskop (SEM) i konfokalni laser-skenirajući mikroskop (CLSM).

6.2.3.1.

Temperatura

Općenito, gel-struktura jogurta ima veće proteinske klasterne (grublju strukturu) i veće pore u slučajevima nižih temperatura ($\leq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) toplinske obrade mlijeka. Suprotno, gel-struktura formirana nakon toplinske obrade mlijeka na temperaturama višim od $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ima bolje povezanu i finije razgranatu proteinsku strukturu unutar koje su pore malih veličina ($\leq 10\text{ }\mu\text{m}$).



Slika 6.18.

Mikrostruktura jogurnoga gela.

Detalji: (a) toplinski neobrađeno mlijeko, (b) toplinski obrađeno mlijeko ($80\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$). Slika je snimljena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM); bar = $20\text{ }\mu\text{m}$. (Lucey i sur., 1999., s dopuštenjem Elseviera.)

Za usporedbu važnosti temperature toplinske obrade mlijeka, slika 6.18. prikazuje razliku u mikrostrukтури jogurta proizvedenog od toplinski obrađenog i toplinski neobrađenog mlijeka. Mikrostruktura jogurta od toplinski neobrađenog mlijeka ima krupno zrnatu strukturu proteinskog matriksa, a unutar proteinske mreže ima nepravilan izgled praznih prostora i gustoće agregiranih proteina. Suprotno, mikrostruktura jogurta proizvedenog od toplinski obrađenog mlijeka sastoji se od proteinskih lanaca malih veličina i malih pora.

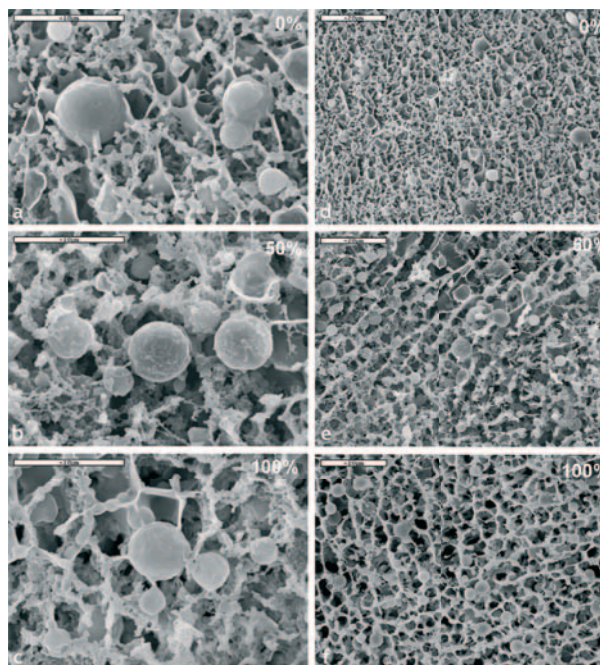
Usporedbom reoloških parametara za teksturu jogurta proizvedenog od sirovog mlijeka i onoga proizvedenog od toplinski obrađenog mlijeka dobivaju se različite vrijednosti za dinamičke module. Jogurt proizveden od toplinski neobrađenog mlijeka formira slabiju gel-strukturu ($G' < 50\text{ Pa}$), a zgrušavanje mlijeka započinje na pH-vrijednosti između 4,8 i 5,0. Nakon toga vrijednost modul pohrane ili elastičnosti (G') tijekom formiranja gel-strukture brzo raste do izoelektrične točke kazeina od približno pH-4,6. Istovremeno, vrijednost modula gubitka tangente ($\text{tg } \delta$) brzo se snižava do 0,4 i do približno 0,2 - 0,3 u vrijeme formiranja gela. Suprotno, tijekom formiranja gel-strukture jogurta proizvedenog od toplinski

obrađenog mlijeka posve je drukčiji i osobito je izražen u maksimalnoj vrijednosti modula gubitka tangente ($tg \delta$). Maksimalna vrijednost modula $tg \delta$ pokazuje da su veze i proteinske niti unutar matriksa podložnije lakšem pucanju ili relaksaciji, što podrazumijeva veće preuređenje u proteinskoj strukturi. Osim toga, maksimalna je vrijednost modula $tg \delta$ i posljedica djelomičnoga gubitka početno slabog matriksa zbog svojstva djelomične netopljivosti KCP i postupnog povećanja protein-protein interakcija između kazeinskih čestica dok se pH-vrijednost ne snizi do 4,6. Temeljeno na podacima dinamičnih mjerenja, tekstura tekućeg jogurta pokazuje slabu gel-strukturu ($G' > G''$), oba modula su neovisna o frekvenciji, a linearna brzina smicanja u viskoelastičnom području je mala ($\dot{\gamma} < 0,05 \text{ s}^{-1}$).

6.2.3.2.

Vrsta mlijeka

Za proizvodnju jogurta osim jedne vrste mlijeka može se koristiti i mješavina primjerice kravljega i kozjeg mlijeka. U nekoliko fizikalno-kemijskih karakteristika kozje se mlijeko razlikuje od kravljeg, što objašnjava i značajnu razliku u tehnološkim svojstvima tih dviju vrsta mlijeka. Kozje mlijeko sadrži niži udjel kazeina i ima različit omjer kazeinskih frakcija (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) te postoji velika varijacija u kemijskom sastavu između pasmina, a osobito u omjeru između α_{s1} i α_{s2} kazeina. Osim toga, kazein kozjeg mlijeka pokazuje veću disperzivnost, ima veću mineralizaciju micela, te nižu razinu hidratacije u usporedbi s kazeinom kravljeg mlijeka. Kozje mlijeko razlikuje se od kravljeg i po značajno većem udjelu malih globula mliječne masti. Navedene razlike između kravljega i kozjeg mlijeka dovode do razlika u načinu formiranja gel-strukture tijekom fermentacije ako se jogurt proizvodi od tih dviju vrsta mlijeka. U proizvodnji jogurta od mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka udjel kozjeg mlijeka od 25 - 50 % pozitivno djeluje na: (i) indeks bjeline (ii) smanjenje predispozicije jogurta za sinerezu i (iii) inkorporiranje globula mliječne masti u proteinski matriks. Istodobno svako povećanje



Slika 6.19.

Mikrostruktura jogurta proizvedenoga od kravljega, kozjeg i mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka.

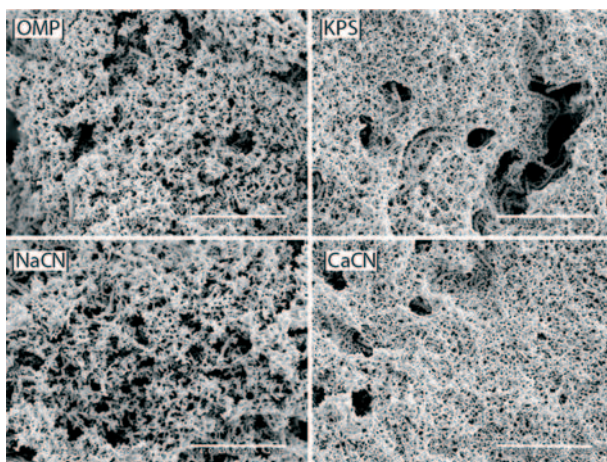
Detalji: (a, d) jogurt od kravljeg mlijeka, (b, e) jogurt od 50 % kravljeg i 50 % kozjeg mlijeka, (c, f) jogurt od kozjeg mlijeka. Slike (a, b, c) su snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) uz povećanje 5000 x (bar = 10 µm) a slike (d, e, f) uz povećanje 1500 x (bar = 20 µm). (Vargas i sur., 2008., s dopuštenjem Elseviera.)

udjela kozjeg u kravljem mlijeku veće od 50 % značajno smanjuje čvrstoću formiranog jogurnog gela, a razlike u mjerljivoj mikrostrukturi jogurta se povećavaju. Tako će mikrostrukturu jogurta u kome je udjel kozjeg u kravljem mlijeku između 50 i 75 % karakterizirati manji broj poveznih točaka, otvorenija struktura i veće pore unutar proteinskog matriksa. Zbog toga se za dobra reološka svojstva jogurta od mješavine kozjeg i kravljeg mlijeka ne preporučuje veći omjer miješanja tih dviju različitih vrsta mlijeka od 1 : 1 (50 : 50 %). Za ilustraciju, na slici 6.19.

Tablica 6.1.

	Mlijeko	OMP	NaCN	CaCN	KPS
Suha tvar	110,7	960	940	940	950
Mliječna mast	25,1	12,5	7,0	5,0	6,0
Laktoza	47,4	51,0	2,0	2,0	10,0
Kalcij	1,2	12,75	0,8	13,0	3,5
Protein	30,9	340	880	880	840

OMP – obrani mliječni prah; Na, Ca–kazeinat; KPS – koncentri proteina sirutke. (Remeuf i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 6.20.

Mikrostruktura jogurta nakon obogaćivanja mlijeka obranim mliječnim prahom (OMP), koncentratima proteina sirutke (KPS), Na-kazeinatom (NaCN), Ca-kazeinatom (CaCN).

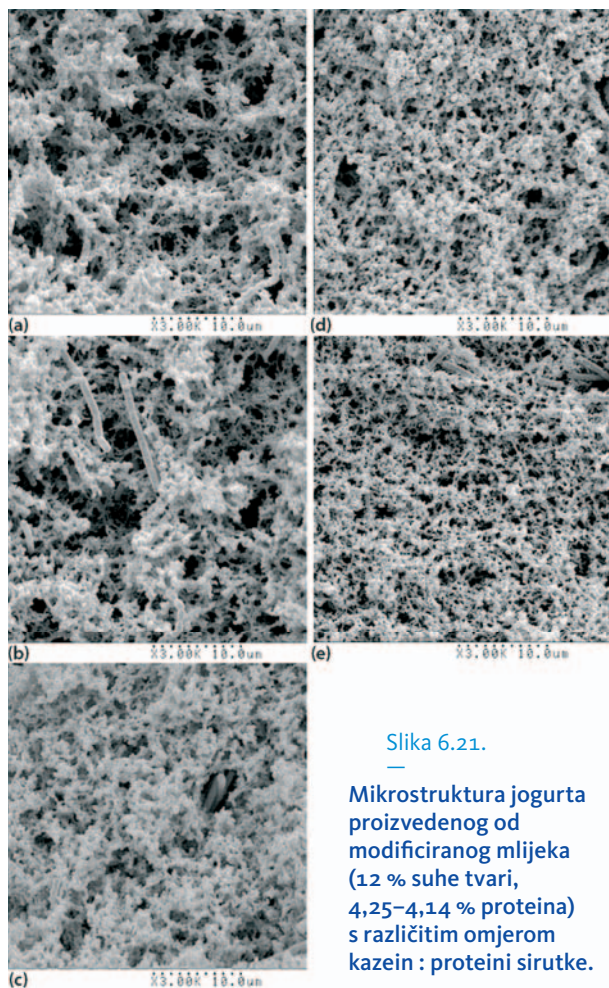
Detalji: dodatak OMP uzrokuje nepravilnu gel-strukturu s kratkim i pojedinačnim filamentoznim česticama kazeina uz brojne pore različitih veličina. KPS utječu na formiranje finije gel-strukture koja sadrži vrlo male pore, a lanac kazeinskih micela manje je istaknut u usporedbi s OMP. Gel-struktura jogurta s dodatkom NaCN mlijeku relativno je gruba i slabo povezana. Istodobno, dodatak CaCN mlijeku utječe na mikrostrukturu jogurta slično dodatku KPS mlijeku. Nakon obogaćivanja mlijeko je toplinski obrađeno na temperaturi od 90 °C/5 min Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), bar = 20 μm. (Remeuf i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

prikazana je različita mikrostruktura jogurta priređena od kravljeg, kozjeg i mješavine kozjeg i kravljeg mlijeka u omjeru 1 : 1. U konkretnom primjeru obje vrste mlijeka, ali svaka zasebno, toplinski su obrađene na temperaturi od 90 °C tijekom 5 minuta, a potom za jogurt od mješavine kozjeg i kravljeg mlijeka pomiješane u omjeru 1 : 1.

6.2.3.3.

Vrsta i količina mliječnih ingredijenata za obogaćivanje Sbm mlijeka

Za obogaćivanje bezmasne suhe tvari mlijeka (Sbm) mliječnim ingredijentima osim obranoga mliječnog praha (OMP) u proizvodnji jogurta često se koriste i drugi mliječni ingredijenti poput kazeinata (Na ili Ca-kazeinata), ili koncentrata proteina sirutke [KPS (34 - 80 % w/w proteina)]. Svaki od tih ingredijenata ima drukčija svojstva, a u svojstvu zamjene za OMP mogu se koristiti odvojeno ili međusobnim miješanjem. Kombinacija i omjer miješanja različitih mliječnih ingredijenata prvenstveno su uvjetovani željenim omjerom kazein : proteini sirutke u pripremljenom mlijeku. Primjerice, omjer miješanja između KPS i Ca-kazeinata može biti 2 : 1 ili 1 : 2. Nativna svojstva svakoga pojedinačnoga mliječnog ingredijenta uzročno-posljedično određuju mikrostrukturu i fizikalna svojstva (viskozitet, kapacitet za vezanje vode i stupanj granuliranosti teksture) jogurta. Primjer utjecaja dodatka različitih ingredijenata mlijeku na udjel pojedinih sastojaka mlijeka (tablica 6.1.) koji imaju direktni kasniji utjecaj na mikrostrukturu jogurta prikazan je slikom 6.20.



Slika 6.21.

Mikrostruktura jogurta proizvedenog od modificiranog mlijeka (12 % suhe tvari, 4,25-4,14 % proteina) s različitim omjerom kazein : proteini sirutke.

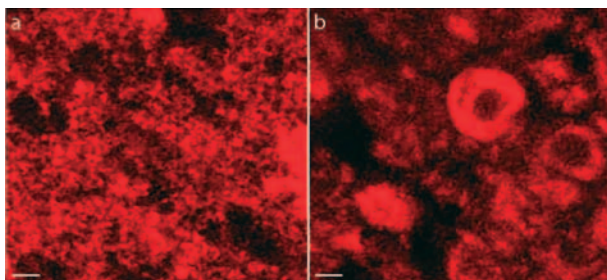
Detalji: (a) omjer kazein : proteini sirutke 4,7 : 1, (b) omjer kazein : proteini sirutke 2,9 : 1, (c) omjer kazein : proteini sirutke 2,0 : 1, (d) omjer kazein : proteini sirutke 1 : 1 (e) omjer kazein : proteini sirutke 0,5 : 1. Slika je snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 3000 x; bar = 10 µm. (Puvanenthiran i sur., 2002., s dopuštanjem Elsevier.)

Obogaćivanjem Sbm mlijeka koncentratima proteina sirutke (KPS) ili izolatima proteina sirutke (IPS) kojima se u mlijeku smanjuje omjer između kazeina i proteina sirutke, povećava se čvrstoća formirane gel-strukture jogurta. U tim slučajevima, za povoljan učinak

proteina sirutke na teksturu jogurta toplinska obrada mlijeka mora se provoditi na temperaturama višim od 90 °C tijekom najmanje 5 minuta. Visoka temperatura toplinske obrade mlijeka uvjetuje potpunu denaturaciju proteina sirutke i posljedično njihovo vezanje za kazeinske micelle. Usporedbom mikrostrukture jogurta proizvedenog bez i s dodatkom proteina sirutke uočava se značajna razlika (slika 6.21.). Dodatak proteina sirutke smanjuje omjer kazein : proteini sirutke, a struktura proteinske mreže postaje finija, veličina agregiranih čestica je manja, mreža je gušća, a pore unutar proteinske mreže su također manje (slika 6.21. b - e). Posljedično, tekstura jogurta s finijom strukturom proteinske mreže i malim porama unutar mreže iskazuje manju predispoziciju za sinerezu. Jogurt proizveden bez dodatka proteina sirutke (slika 6.21. a) pokazuje grublju strukturu s relativno velikim agregiranim česticama i velikim porama unutar proteinske mreže.

Dodatak proteina sirutke mlijeku u količini između 1 i 6 % nakon njegove toplinske obrade ima negativan učinak na teksturu jogurta. Temperaturom neizmijenjeni proteini sirutke ostaju inaktivni, te se ne mogu ugraditi u proteinsku mrežu jogurta. Posljedično oni postaju određena vrsta inertnih "punjača" koji narušavaju formiranje gel-strukture jogurta na način da se formira manje kazein-kazein veza unutar proteinske mreže. Pritom to inducira manju vrijednost modula pohrane ili elastičnosti (G') i slabiju otpornost na silu smicanja. Jasno vidljivu razliku između gel-strukture jogurta s dodatkom i bez dodatka proteina sirutke nakon toplinske obrade mlijeka prikazuje slika 6.22.

U kontekstu načina kojima se u tehnologiji proizvodnje jogurta nastoji poboljšati tekstura jogurta može se primijetiti da temperatura toplinske obrade mlijeka ima najveći utjecaj. Visoka temperatura toplinske obrade mlijeka (80 - 95°C/30 - 5 min) koja se koristi u proizvodnji jogurta povećava pH-vrijednost početka zgrušavanja mlijeka, skraćuje vrijeme formiranja gel-strukture kroz brže snižavanje pH-vrijednosti tijekom fermentacije, i znatno povećava vrijednost modula pohrane ili elastičnosti (G'). Također, visoka temperatura toplinske obrade mlijeka ima pozitivan utjecaj na smanjenje deformacija gel-strukture jogurta



Slika 6.22.

Mikrostruktura jogurnoga gela bez i s dodatkom proteina sirutke.

Detalji: (a) bez dodatka proteina sirutke i (b) s dodatkom proteina sirutke (6 %) nakon toplinske obrade mlijeka. Slika je snimljena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM), bar = 5 μm . (Guggisberg i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 6.23.

Izgled granulirane teksture čvrstog jogurta.

na djelovanje sile. Suprotno, dodatak proteina sirutke mlijeku nakon njegove toplinske obrade ne utječe na poboljšanje teksture već se može smatrati jedino nutraceutičkim dodatkom.

6.2.3.4.

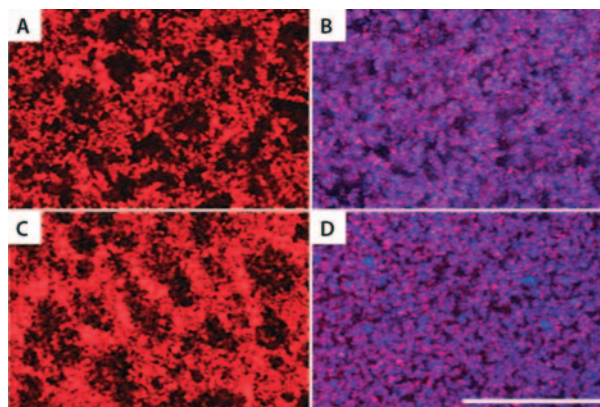
Udjel ukupnih proteina i omjer kazein : proteini sirutke

Za postizanje optimalnog omjera između kazeina i proteina sirutke u mlijeku iznimno je važan način obogaćivanja bezmasne suhe tvari (Sbm). Obogaćivanje Sbm mlijeka prevelikim količinama koncentriranih proteina sirutke povećava njihov udjel u kazeinskoj mreži. Posljedica prevelikog udjela proteina sirutke u matriksu formiranoga gela mijenja njegovu strukturu, koja umjesto glatke poprima krupnozrnatu strukturu (slika 6.23.) Omjer između kazein : proteini sirutke u matriksu formiranoga jogurnoga gela najčešće je od 2,9 : 1 do 4,6 : 1. Međutim, za kvalitetu jogurnoga gela najboljim omjerom kazein : proteini sirutke smatra se 3,3 : 1, budući da je tada povezivanje kazeinskih micela optimalno a okus proizvoda u ustima najbolji.

Popularnost jogurta s niskim udjelom mliječne masti ($\geq 2\%$), bezmasnih jogurta ($< 0,5\%$), a osobito njegovih tekućih i pitkih varijanti, u stalnom je porastu. Smanjenje mliječne masti u jogurtu s druge strane uzrokuje gubitak strukture i viskoznosti, a posljedica su izmijenjeni izgled, tekstura i osjećaj proizvoda u ustima. U praksi, smanjen udjel mliječne masti jogurta najčešće se zamjenjuje obranim mlijekom u prahu, Na-kazeinatom ili koncentratima proteina sirutke. Potrebna količina tih dodataka da bi se dobio okus punomasnog jogurta dovodi do intenzivne acidifikacije tijekom fermentacije, prekomjerne čvrstoće gel-strukture, a posljedično i do većeg stupnja izdvajanja sirutke, krupnozrnate teksture i brašnastog okusa.

U proizvodnji tekućih jogurta s niskim udjelom mliječne masti dodatak proteina sirutke može nadomjestiti smanjeni udjel mliječne masti i poboljšati njihova reološka svojstva. Za poželjna fizikalna svojstva tekućeg jogurta dodatak proteina sirutke treba biti usklađen s ukupnim udjelom proteina u mlijeku, omjerom kazein : proteini sirutke i udjelom mliječne masti. Naime, veličina čestica raste kao funkcija povećanja udjela proteina sirutke i smanjuje se kao funkcija povećanja udjela mliječne masti. Istodobno

čvrstoća i prividna viskoznost gel-strukture povećavaju se kao funkcija povećanja unutarnjih interakcija između čestica, što uzrokuje agregaciju proteina sirutke ili agregaciju masnih globula "pokrivenim" proteinima sirutke. Rezistentnost prema posmičnim silama koje induciraju puknuće gel-strukture jogurta povećava se s povećanjem udjela kazeina u ukupnom proteinu. Suprotno, rezistentnost na posmične sile smanjuje se kada je udjel proteina sirutke u ukupnim proteinima visok. Za bolje razumijevanje, izdvojen je primjer utjecaja različitoga kemijskog sastava mlijeka (pokriva širok raspon jogurta od bezmasnoga do grčke varijante jogurta): (i) ukupan protein, 3,5, 4,5 i 6 %; (ii) omjer kazein : proteini sirutke 80/20, 60/40, 40/60; (iii) udjel masti, 0,1, 6,0 i 12 % na mikrostrukturu jogurnog gela (slika 6.24.). Struktura jogurnog gela s visokim udjelom proteina sirutke i niskim udjelom mliječne masti isprekidana je velikim porama (slika 6.24. A). Prisutnost velikih agregacija proteina sirutke i niski udjel mliječne masti potiču formiranje krupnozrnate gel-strukture s velikim međuprostornim prazninama. Suprotno, što je veći udjel kazeina u ukupnom proteinu mlijeka, prazni prostori unutar proteinske mreže zbog dobrog balansa povezivanja kazeinskih micela s proteinima sirutke su manji. Visoki omjer kazein : proteini sirutke (80 : 20; 60 : 40) omogućuje formiranje finijih proteinskih lanca, manja je veličina čestica i pora zbog boljeg vezanja vode unutar proteinske mreže. Odnosno, proteini sirutke vezani za kazein u toplinski obrađenom mlijeku po svoj su prilici odgovorni za opsežnu strukturalnu reorganizaciju proteinske mreže tijekom formiranja gel-strukture. Unutar dobro izbalansiranog omjera između kazeina i proteina sirutke masne globule su male veličine i prilično ravnomjerno raspoređene unutar proteinske mreže (slika 6.24. B, D). Pritom to potvrđuje da globule mliječne masti u smislu određene vrste "punjača" imaju sposobnost podjednagog povezivanja s kazeinima i proteina sirutke povezanih u zajedničku proteinsku mrežu. Zbog toga povećanje udjela mliječne masti uvjetuje gušći i kompaktniji proteinski matriks s manjim porama, budući da globule mliječne masti ispunjavaju intermicelarne prostore u gel-strukturi kada je mlijeko obogaćeno proteinima



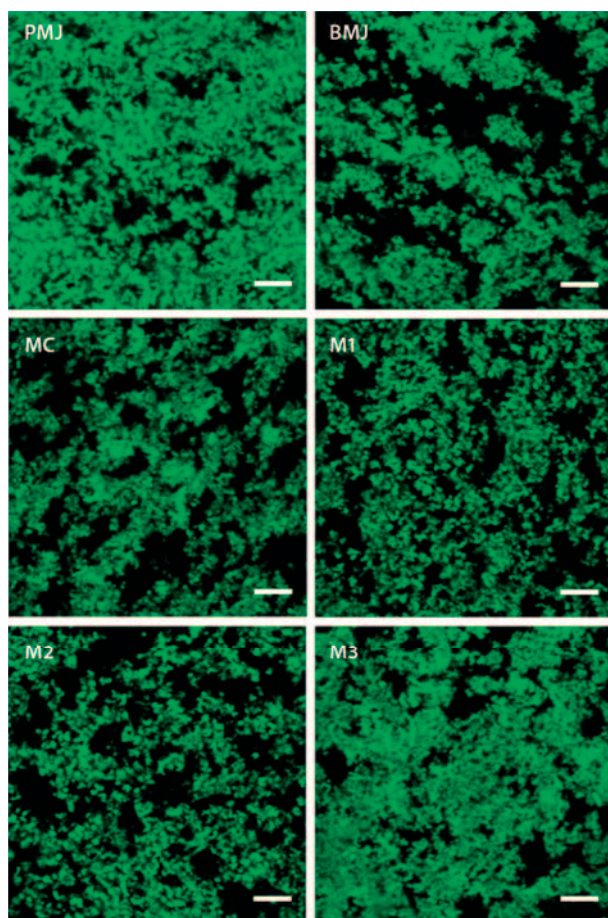
Slika 6.24.

Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog iz kemijski različitog sastava mlijeka.

Detalji: A) niski udjel mliječne masti (0,1 %), niski omjer kazein : proteini sirutke (40:60), B) visoki udjel mliječne masti (12,0 %) niski omjer kazein : proteini sirutke (40:60), C) niski udjel mliječne masti (0,1 %) visoki omjer kazein : proteini sirutke (80:20), D) visoki udjel mliječne masti (12,0 %) visoki omjer kazein : proteini sirutke (80:20). Crvena boja - protein, plava boja - masne globule u gel-strukturi. Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM), bar = 50 μ m. (Krzeminski i sur., 2011., s dopuštenjem Elseviera.)

sirutke. Dodatak mliječne masti poboljšava ukupnu gel-strukturu tekućeg jogurta s visokim udjelom proteina sirutke koja se može usporediti s jogurnim gelom s visokim udjelom kazeina u ukupnom proteinu. Iz navedenog proizlazi da se dodatkom proteina sirutke može nadomjestiti niži udjel masti u jogurtu. U tom kontekstu, tekući jogurt s niskim udjelom masti ima dobra svojstva teksture kada mlijeko sadrži 4,5 % proteina i omjer kazein : proteini sirutke 60/40.

Mikroproteini sirutke (MPS) s ujednačenom veličinom čestica prosječnog promjera $\leq 1 \mu$ m koji ne pokazuju tendenciju agregiranja danas se smatraju dobrom zamjenom za mliječnu mast jogurta. Osim toga, MPS osiguravaju emulgiranje i stabiliziranje pjene, stabilni su na visoke temperature i promjene pH i osiguravaju kremast okus u ustima. Ipak, poznato je



Slika 6.25.

Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog bez dodatka i s dodatkom kemijski različitih svojstava mikroproteina sirutke.

Detalji: PMJ - punomasni jogurt (3,5 % mliječne masti i 3,5 % proteina - kontrolni uzorak); BMJ - bezmasni jogurt (0,5 % mliječne masti i 5 % proteina, 70 : 30 omjer kazein : proteini sirutke- pokusni uzorak); MC M1, M2, M3 - mikroproteini sirutke različitih kemijskih svojstava korištenih kao zamjena za mliječnu mast. Zelenom bojom obojani su proteini. Slika je dobivena konfokalnim laserskenirajućim mikroskopom (CLSM). (Torres i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)

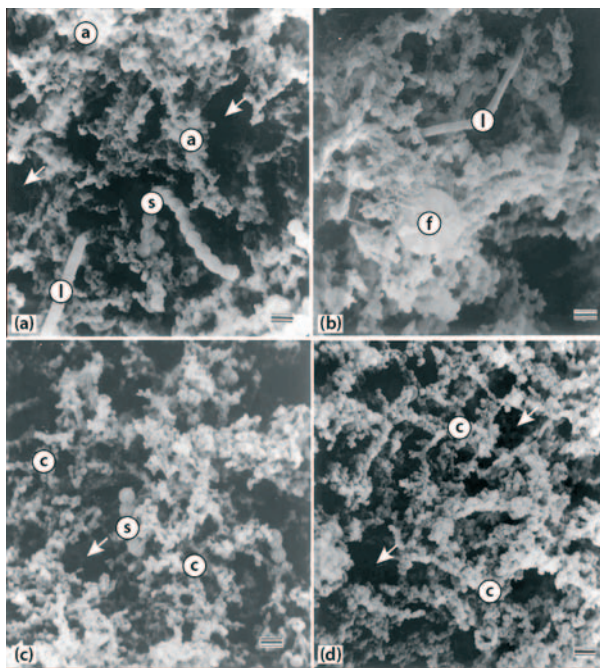
da način tehnologije proizvodnje MPS znatno utječe na fizikalne karakteristike sadržanih proteina, te posljedično tome na njihova funkcionalna svojstva. Slikom 6.25. prikazana je usporedba mikrostrukture bezmasnoga tekućeg jogurta (0,5 % mliječne masti) gdje je mliječna mast nadomještена MSP različitoga kemijskog sastava, s mikrostrukturom punomasnog (3,5 % mliječne masti) i bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta bez dodatka MPS.

Iz prikaza na slici 6.25. jasno se vidi da je mikrostruktura punomasnog jogurta sastavljena od kompaktne proteinske mreže, gdje su masne globule udružene s proteinima u velike agregate (lijeva strana slike 6.25., PMJ). Naime, smanjenje udjela mliječne masti u jogurtu utječe na manje međusobno povezivanje proteinskih čestica unutar matriksa i veću razinu serum-pora, budući da homogeniziranih globula mliječne masti nema dovoljno (0,5 %) za povezivanje s proteinskim kompleksom (desna strana slike 6.25. BMJ). Istodobno, supstitucija mliječne masti s mikroproteinima sirutke (MC, M1, M2 i M3) različitih kemijskih svojstava utječe na formiranje različite mikrostrukture jogurta. U konkretnom primjeru jogurt s dodatkom mikroproteina sirutke M3 pokazuje gušću proteinsku mrežu s malim porama (slika 6.25. označena M3) u usporedbi s mikrostrukturom jogurta (0,5 % mliječne masti) kojem nisu dodani MPS (desna strana slike 6.25. BMJ). Mikrostruktura jogurta (0,5 % mliječne masti) s dodatkom MPS (MC) pokazuje manje gustu i više heterogenu strukturu, koja sadrži velik broj sirutkinih kanala (slika 6.25. označena MC). Značajnu razliku u mikrostrukтури pokazuju jogurti (0,5 % mliječne masti) supstituirani s MPS (M1 i M2). Njihova mikrostruktura pokazuje otvoreniju strukturu u kojoj su proteini povezani u finu razgranatu mrežu. Sirutka nije vidljiva unutar prostora proteinskih niti, ali je vidljiva kao slobodna sirutka. Na temelju rezultata proučavanja MPS različitih kemijskih svojstava u svojstvu zamjene za smanjeni udjel mliječne masti u tekućem jogurtu, preporučuje se prethodno izvršiti pažljivu selekciju supstituenta u smislu dobivanja željene teksture i senzorskih karakteristika finalnog proizvoda.

Slikom 6.26. (a, b, c) prikazana je mikrostruktura čvrstog jogurta sa 1,5 % mliječne masti proizvedenog s trima različitim komercijalno dostupnim nadomjescima za smanjeni udjel mliječne masti u jogurtu. Za supstituciju su korišteni koncentraci proteina sirutke (KPS), mikroproteini sirutke (MPS) i modificirani tapioka (južnoamerička biljka) škrob (MTŠ) zasebno ili u kombinaciji. Kombinacija proizvedenih jogurta (J) je sljedeća:

- koncentraci proteina sirutke (J-KPS),
- mikroproteini sirutke (J-MPS),
- modificirani tapioka škrob (J-MTŠ),
- koncentraci proteina sirutke i mikroproteini sirutke (J-KPS-MPS)
- koncentraci proteina sirutke i modificirani tapioka škrob (J-KPS-MTŠ)
- mikroproteini sirutke i modificirani tapioka škrob (J-MPS-MTŠ)
- koncentraci proteina sirutke i mikroproteini sirutke i modificirani tapioka škrob (J-KPS-MPS-MTŠ).

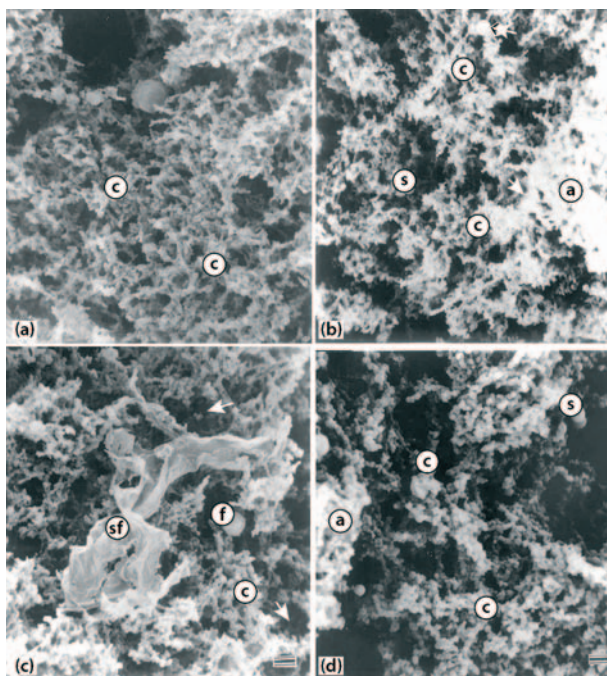
Na temelju mikrostruktura jogurta prikazanih na slici 6.26. (a, b, c) može se općenito zaključiti da je proteinski matriks jogurta s reduciranim udjelom mliječne masti u usporedbi s punomasnim jogurtom otvoreniji i manje gust. Kazeinske micelle u jogurtu proizvedenom s dodatkom koncentrata proteina sirutke (J-KPS) dominantno su vezane s česticama povezanim u duge lance. Mikrostruktura jogurta proizvedenog s mikroproteinima sirutke (J-MPS) otkriva prostornu distribuciju kazeinskih micela slično onoj za jogurt s reduciranim udjelom mliječne masti, u kojoj su mikročestice proteina sirutke dio proteinskog matriksa. U svim jogurtima gdje se za nadomjestak mliječne masti koristio modificirani tapioka škrob (MTŠ) jogurt pokazuje najslabiju strukturu. Neke od otopljenih molekula škroba integrirane su u kazeinski matriks, ali istodobno dio škrobnih fragmenata formira nezavisne strukture izvan matriksa. U usporedbi s punomasnim jogurtom tekstura je jogurta s dodatkom MTŠ veće čvrstoće. Jogurt proizveden s koncentratima proteina sirutke (KPS) i kombinacijom KPS i mikroproteina sirutke (MPS) osigurava karakteristike teksture slične onima za punomasni jogurt. Elastičnost i



Slika 6.26.a.

Mikrostruktura čvrstog punomasnog (3,5 % mliječne masti) i bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast.

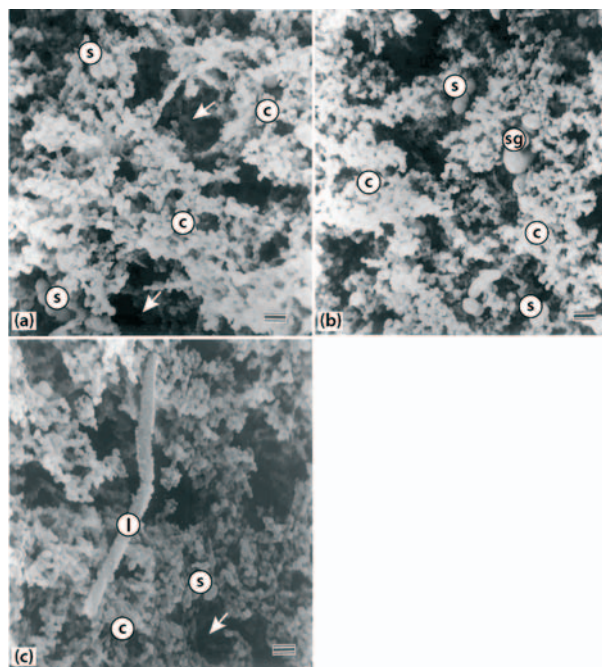
Detalji: (a) punomasni jogurt (PMJ): proteinska mreža sastoji se od kazeinskih micela čvrsto povezanih u agregate, (a) prazni prostori prvobitno ispunjeni sirutkom (svijetla strelica), (l) laktobacili, (s) streptokoki; (b): masne globule (f) integrirane u proteinsku mrežu, (l) laktobacili; (c) bezmasni jogurt (BMJ): proteinska mreža se sastoji od lanaca kazeinskih micela, (c) prazni prostori prvobitno ispunjeni sirutkom (svijetla strelica), (s) streptokoki; (d) jogurt J-KPS: proteinska mreža se sastoji od kazeinskih čestica povezanih u duge lance, (c) relativno mali prazni prostori prvobitno ispunjeni sirutkom (svijetla strelica). Puni naziv skraćenica vidljiv je u gore navedenom tekstu. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 5400 x; bar = 1 μm. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 6.26.b.

Mikrostruktura čvrstog bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast.

Detalji: (a) jogurt J-KPS: proteinska mreža sastoji se od blisko upakiranih lanaca kazeinskih micela, (c) masne globule pokrivene proteinima vide se u pozadini srednjega i gornjeg dijela slike; (b) jogurt J-MPS: proteinska mreža sastoji se od lanaca kazeinskih micela, (c) mikročestice proteina sirutke (kratka svijetla strelica) s nekoliko čvrsto povezanih kazeinskih agregata (a), (s) streptokoki; (c) jogurt J-MTŠ: proteinska mreža sastoji se od lanaca kazeinskih micela, (c) brojni međuprazni prostori (svijetla strelica) i fragmenti škroba (sf) te nekoliko masnih globula (f); (d) jogurt J-KPS-MPS: (c) proteinska mreža koju čine lanci kazeinskih micela, (a) čvrsto povezani agregati kazeina, (s) streptokoki. Puni naziv korištenih nadomjestaka za mliječnu mast istaknut skraćenicama vidljiv je u gore navedenom tekstu. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 5400 x; bar = 1 μ m. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

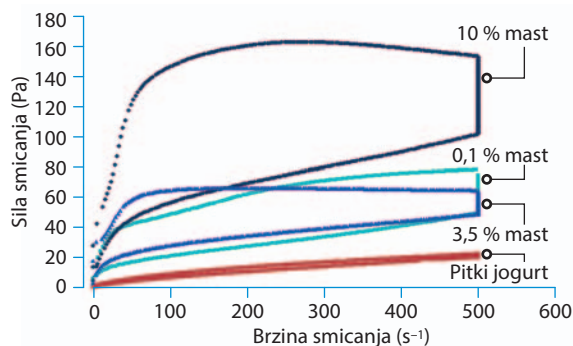


Slika 6.26.c.

Mikrostruktura čvrstoga bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast.

Detalji: (a) jogurt J-KPS-MTŠ: proteinska mreža sastoji se od lanaca kazeinskih micela, (c) veliki prazni prostori u kojima je zadržana sirutka (svijetla strelica), (s) streptokoki; (b) jogurt J-MPŠ-MTŠ: (c) proteinska mreža sastoji se od lanaca kazeinskih micela, (s) streptokoki, (sg) nekoliko granula škroba; (c) jogurt J-KPS-MPS-MTŠ: (c) proteinska mreža sastoji od kratkih lanaca kazeinskih micela, brojnih praznih prostora u kojima je prvotno sadržana sirutka (svijetla strelica), (l) laktobacili, (S) streptokoki. Puni naziv korištenih nadomjestaka za mliječnu mast istaknut skraćenicama vidljiv je u gore navedenom tekstu. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 5400 x; bar = 1 μ m. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

čvrstoća jogurta proizvedenog samo s MPS slabiji su ali je veća kohezivnost gel-strukture. U svojstvu zamjene za mliječnu mast kombinacija ugljikohidrata i proteina u jogurtu pokazuje manju elastičnost, čvrstoću i adhezivnost, ali veću kohezivnost gel-strukture u odnosu na punomasni jogurt.



Slika 6.27.

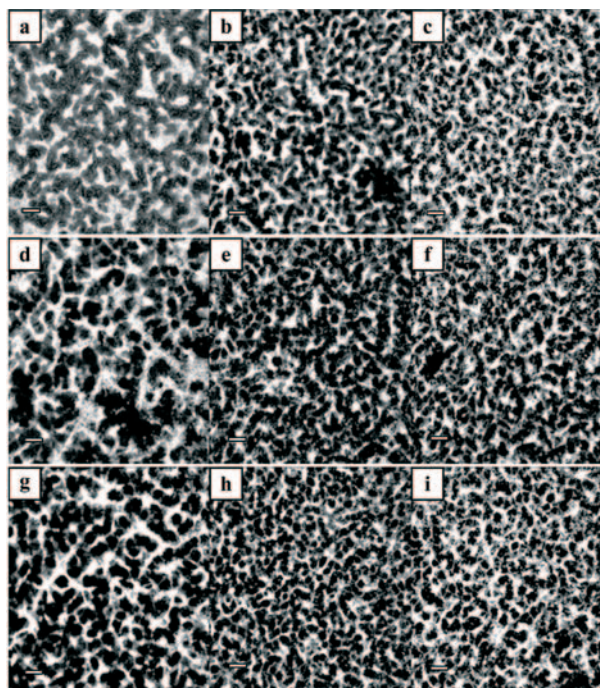
Utjecaj različitog udjela masti na čvrstoću i viskoznost jogurta kao funkcije brzine i sile smicanja. (S dopuštenjem U. Kulozika, 2007.)

Povećanje udjela kazeina i mliječne masti u mlijeku ako se ono homogenizira povoljno utječe na svojstva čvrstoće (modul pohrane ili elastičnosti G') i viskoznosti (modul gubitka ili viskoznosti G'') gelstrukture jogurta. Dodatak kazeina povećava broj kazeinskih čestica koje direktno poboljšavaju čvrstoću i viskoznost proizvoda. Nativne globule mliječne masti u sirovom mlijeku nemaju sposobnost interakcije s kazeinskim micelama. Kada se mlijeko homogenizira globule mliječne masti mijenjaju svoju strukturu i poprimaju svojstva "pseudokazeinskih čestica" koje se lagano inkorporiraju u proteinski matriks jogurtne strukture. Posljedično se čvrstoća i viskoznost teksture jogurta povećavaju (slika 6.27).

6.2.3.5.

Vrsta i svojstva kulture

Reološka svojstva teksture jogurta uvjetovana su i vrstom kulture, količinom inokuluma (0,5, 1, 2, 3 ili 4 %) i temperaturom fermentacije, čimbenicima koji direktno utječu na stupanj acidifikacije mlijeka. Tako jogurt pokazuje veću vrijednost modula pohrane ili elastičnosti (G') i maksimalnu vrijednost modula

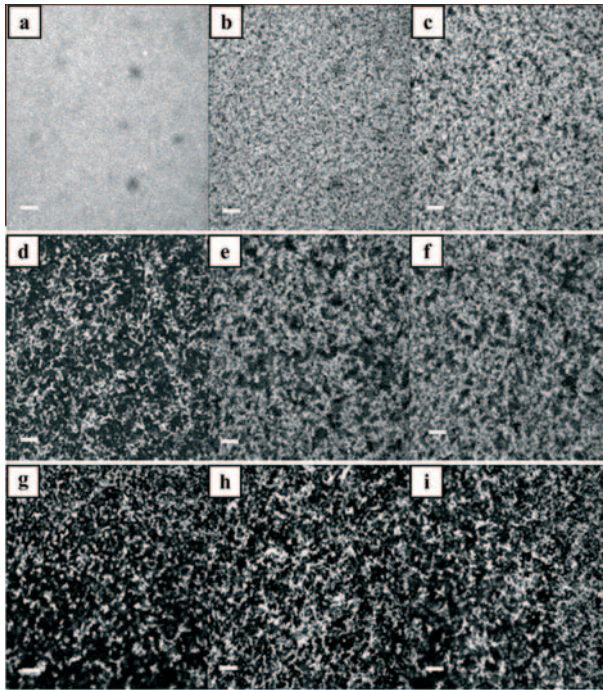


Slika 6.28.

Mikrostruktura jogurtne gela uz dodatak različite količine inokuluma i temperaturu inkubacije od 40 °C.

Detalji: (a, d, g) 0,5 %, (b, e, h) 3 % i (c, f, i) 4 % inokuluma. Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM), (bar = 30 μm), u trenutku početka formiranja koagulum (a, b, c) u vrijeme maksimalne vrijednosti modula gubitka tangente δ (d, e, f) i na kraju fermentacije kada je mlijeko dostiglo pH-4,6 (g, h, i). Proteinski matriks na slici je bijeli, a pore su crne. (Lee i Lucey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

gubitka tangente (δ) ako se proizvodi uz dodatak veće količine inokuluma i na nižim temperaturama inkubacije. Za ilustraciju, izgled mikrostrukture jogurtne gela proizvedenog s 0,5, 3 i 4 % inokuluma, uz temperaturu inkubacije od 40 °C, prikazan je na slici 6.28. Istodobno, na slici 6.29. prikazan je izgled mikrostrukture jogurtne gela proizvedenog s istom količinom inokuluma ali uz temperaturu inkubacije od 45,7 °C. U tom smislu, kombinacijom količine



Slika 6.29.

Mikrostruktura jogurnoga gela uz dodatak različite količine inokuluma i temperaturu inkubacije od 47,5 °C.

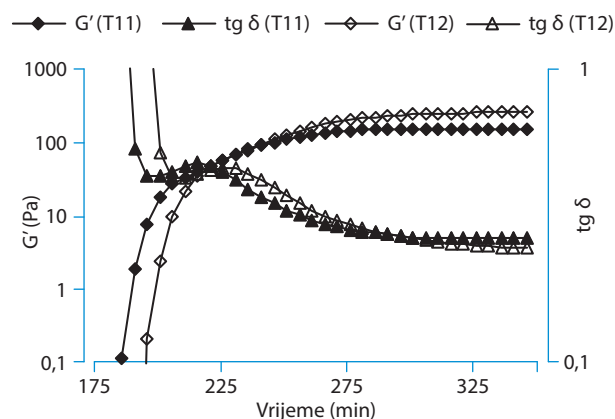
Detalji: (a, d, g) 0,5 %, (b, e, h) 3 % i (c, f, i) 4 % inokuluma. Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CLSM), (bar = 30 μm), u trenutku početka formiranja koaguluma (a, b, c) u vrijeme maksimalne vrijednosti modula gubitka tangente δ (d, e, f) i na kraju fermentacije kada je mlijeko dostiglo pH-4,6 (g, h, i). Proteinski matriks na slici je bijeli, a pore su crne. (Lee i Lucey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)

inokuluma od 2 % i niže temperature inkubacije od približno 40 °C mogu osigurati uvjete koji smanjuju pogreške teksture jogurta i njegovu predispoziciju za sinerezu. Količina inokuluma od 2 % dovoljno je velika da ne izazove prebrzo snižavanje pH gdje modul gubitka tangente (δ) postiže svoju maksimalnu vrijednost. Naime, između sinereze i maksimalne vrijednosti modula gubitka tangente (δ) postoji visoko pozitivna korelacija ($r = 0,94$). Osim toga, prebrzom

acidifikacijom onemogućuje se potpuna topljivost KCP. Kako je topljivost KCP kemijski spori proces za njegovu potpunu topljivost potrebno je sporije snižavanje pH-vrijednosti tijekom formiranja željene gel-strukture jogurta. Istovremeno, izdvajanje sirutke u negativnoj je korelaciji s modulom pohrane ili elastičnosti G' ($r = -0,48$). U proizvodnji jogurta niže temperature inkubacije osiguravaju i dobro formiranje gela uz niži udjel suhe tvari ili stabilizatora.

U proizvodnji jogurta gdje se koristi i dodatak probiotičkih bakterijskih sojeva, uz poželjnu teksturu važan je i stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva na kraju vijeka održivosti proizvoda od $\geq 10^6$ cfu mL⁻¹. S obzirom na značajnu razliku osobina i svojstava između probiotičkih sojeva unutar istih i između različitih bakterijskih vrsta, idealne tehnološke parametre koji će najpovoljnije utjecati na teksturu probiotičkog jogurta nije jednostavno definirati. Na temelju rezultata istraživanja, na teksturu i reološka svojstva varijanti jogurta i na stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva dobrim se pokazala praksa korištenja: (i) većeg udjela suhe tvari u mlijeku (~ 14 %), (ii) veće količine inokuluma (3 - 4 %) i (iii) nižih temperatura inkubacije (36 - 40 °C). Pod tim tehnološkim uvjetima: (i) acidifikacija mlijeka je sporija, (ii) fermentacija traje duže, ali je formirani gel čvršći (maksimalna vrijednost modula pohrane ili elastičnosti G') a (iii) izdvajanje sirutke najmanje (minimalna vrijednost modula gubitka tangente δ). Također, kada se koriste niže temperature inkubacije (36 - 38 °C) probiotički sojevi do vremena održivosti proizvoda od 21 dan pokazuju dobru kompetitivnost rasta s bakterijama jogurtne kulture. Za primjer, na slici 6.30. prikazan je odnos razvitka modula pohrane ili elastičnosti (G') i modula gubitka tangente (δ) u vremenu prema tehnološkim parametrima proizvodnje koji su navedeni u gornjem tekstu.

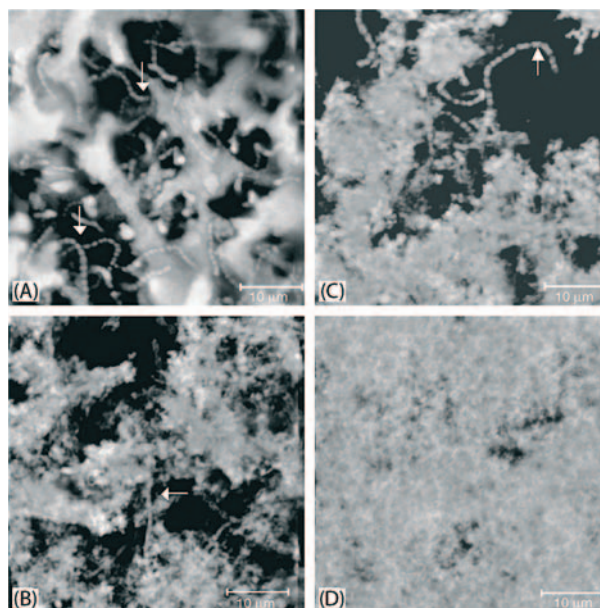
Korištenje mikrobne kulture koja ima sposobnost stvaranja egzopolisaharida (EPS) uzrokuje povećanje čvrstoće teksture čvrstog jogurta i smanjenje sinereze. Suprotno prijašnjim stavovima, i u tim je slučajevima potrebno obogaćivanje bezmasne suhe tvari (Sbm) mlijeka. Također, kako bi se postignula bolja čvrstoća



Slika 6.30.

Razvika modula pohrane (G') i gubitka tangente (δ) u vremenu u interakciji s udjelom suhe tvari (~ 14 %), količinom inokuluma (3 - 4 %) i temperaturom inkubacije (36 - 40 °C); T11, T12 - 2 % jogurtne kulture s različitim udjelom probiotičkog soja bakterije *L. paracasei* B117. (Kristo i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)

konzistencije čvrstog jogurta i smanjila predispozicija za sinerezu, osim suhe tvari u fermentacijskom mlijeku presudan je i omjer kazein : proteini sirutke 4 : 1. Naime, usporedbom mikrostrukture jogurta s 14 % i 9 % suhe tvari s različitim omjerom kazein : proteini sirutke (4 : 1, 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1), korištenjem standardne i dvije EPS (+) jogurtne kulture (kapsularni i difuzni oblik) utvrđene su značajne razlike. Neovisno o vrsti korištene EPS (+) kulture, uključivo i mezofilne vrste, čvrsti jogurt proizveden s 9 % suhe tvari s manjim omjerom kazein : proteini sirutke ima za posljedica smanjenje čvrstoće konzistencije i povećanje predispozicije za spontanu sinerezu. Korištenje EPS (+) kulture (kapsularni oblik), osobito ako je omjer kazein : proteini sirutke 4 : 1, tijekom pohrane (28 dana) značajno smanjuje predispoziciju jogurta za spontanu sinerezu. Objašnjenje je u činjenici da se bakterije mliječne kiseline koje imaju sposobnost stvaranja EPS kapsularnog oblika infiltriraju unutar pora proteinskog matriksa (slika 6.31.). Odnosno, EPS ne ulaze slobodno u proteinski matriks već su uglavnom locirani unutar pora gdje okružuju bakterijsku stanicu. Tako povećavaju



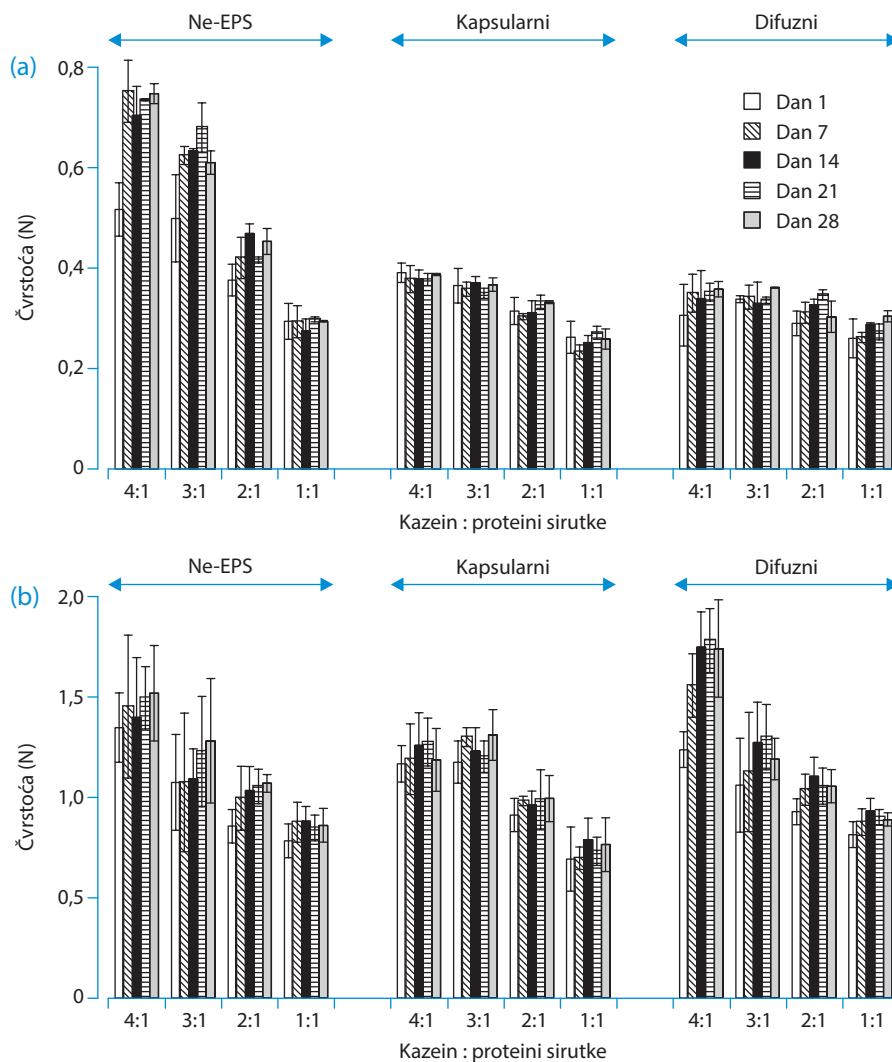
Slika 6.31.

Mikrostruktura gela čvrstog jogurta proizvedenog s EPS (+) kulturom.

Detalji: strelice pokazuju bakterijsku strukturu EPS (+) sojeva (bijelo) okruženu EPS (tamni prostor), (A) *L. lactis* subsp. *cremoris* NCC2771 (pH-5,18 ± 0,29), (B) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCC15 (pH-5,02 ± 0,11), (C) *S. thermophilus* NCC1971 (pH-5,11 ± 0,20), (D) *L. lactis* subsp. *cremoris* (EPS-) NCC2201 - kontrolni soj (pH-4,47 ± 0,12). Slika je dobivena konfokalnim laser-skenirajućim mikroskopom (CSLM) korištenjem uljne imerzije 63 x objektiv mikroskopa gdje je fermentirano mlijeko obojeno s Rhodamine 6G. (Girard i Schaffer-Lequart, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

gustoću proteinske mreže, a posljedica je povećanje kapilarne sile koja sprječava sinerezu. Vrijeme fermentacije jogurta korištenjem EPS (+) kulture ovisi o kinetici acidifikacije mlijeka određenog bakterijskog soja, dok je početak formiranja gela uglavnom određen prisutnošću EPS.

Suprotno, bakterije mliječne kiseline koje stvaraju difuzni oblik EPS unutar proteinske mreže ponašaju se poput "lista papira" povezanog za proteinske

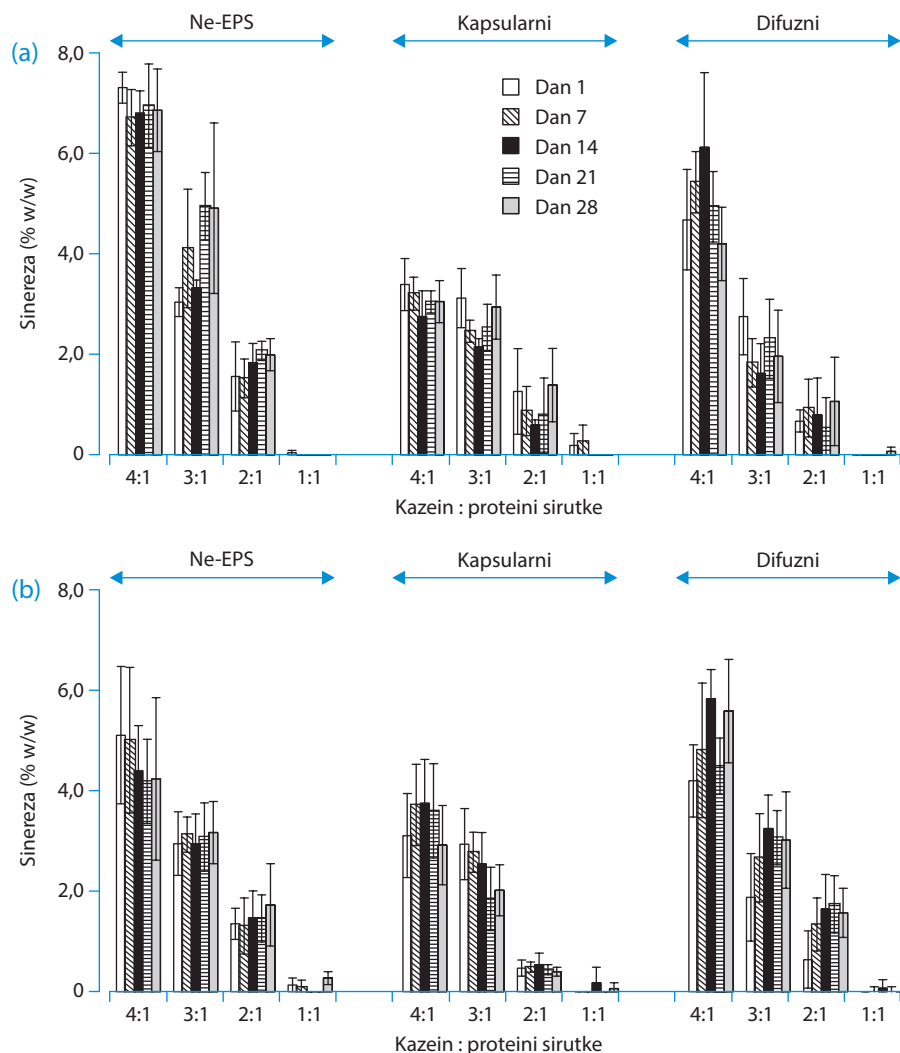


Slika 6.32.

Čvrstoća teksture čvrstog jogurta s 9 % (a) i 14 % (b) suhe tvari i s različitim omjerom protein : proteini sirutke uz korištenje standardne, EPS (+) kulture (kapsularni oblik) i EPS (+) kulture (difuzni oblik) tijekom pohrane od 28 dana. (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)

niti smještene izvan pora, i ne vežu se za proteine. Ti jogurti u svojoj mikrostrukturi imaju veću veličinu pora s manjim brojem proteinskih niti u usporedbi s istim jogurtom proizvedenim uz korištenje standardne jogurtne kulture. Zbog toga u proizvodnji čvrstog jogurta korištenje EPS (+) kulture (difuzni oblik), kako se čini, nije najpoželjnije. Istovremeno, mikrostruktura jogurta s 14 % suhe tvari, neovisno o vrsti korištene kulture, ima kompaktan proteinski matriks

i standardnu veličinu pora i u slučajevima smanjenja omjera kazein : proteini sirutke. U tom smislu, zbog smanjene čvrstoće konzistencije u proizvodnji čvrstog jogurta ne preporučuje se koristiti EPS (+) kulturu ako mlijeko sadrži nizak udjel suhe tvari. Na slici 6.32. prikazana je čvrstoća čvrstog jogurta s 9 i 14 % suhe tvari u odnosu na različiti omjer kazein : proteini sirutke, a na slici 6.33. njihova predispozicija na sinerezu. Mikrostruktura jogurta s 9 i 14 % suhe tvari



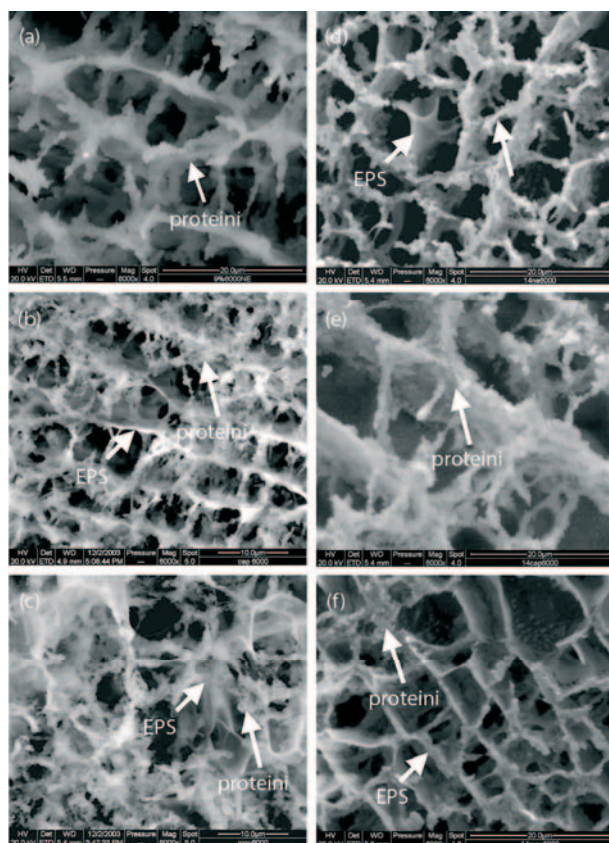
Slika 6.33.

Spontana sinereza čvrstog jogurta s 9 % (a) i 14 % (b) suhe tvari s različitim omjerom protein : proteini sirutke uz korištenje standardne, EPS (+) kulture (kapsularni oblik) i EPS (+) kulture (difuzni oblik) tijekom pohrane od 28 dana (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštanjem Elseviera.)

i omjerom kazein : proteini sirutke 4 : 1 uz korištenje standardne i EPS (+) kulture prikazana je na slici 6.34.

Viskoelastična svojstva čvrstog jogurta proizvedenog korištenjem standardne i EPS (+) jogurtne kulture tijekom fermentacije na temperaturi od 43 °C prikazana su na slici 6.35. Vremenski tijek snižavanja pH-vrijednosti i formiranja gel-strukture jogurta mjereni su SAOR testom. Ovisno o vrsti korištene jogurtne kulture, tijekom formiranja gel-strukture jasno se razlikuje.

Za obje kulture prije nastupanja fermentacijskih promjena karakteristična je lag-faza od približno 150 minuta od inokulacije. Pojava lag-faze objašnjava se aktivnošću bakterijske ureaze, čija je posljedica stvaranje amonijaka koji djelomično neutralizira mliječnu kiselinu. Početak stvaranja proteinske mreže određen je naglim rastom modula pohrane ili elastičnosti (G') i modula gubitka ili viskoznosti (G'') nakon fermentacije mlijeka od ~ 3 sata, gdje oba modula dostižu dvostruko povećanje vrijednosti u periodu kraćem od

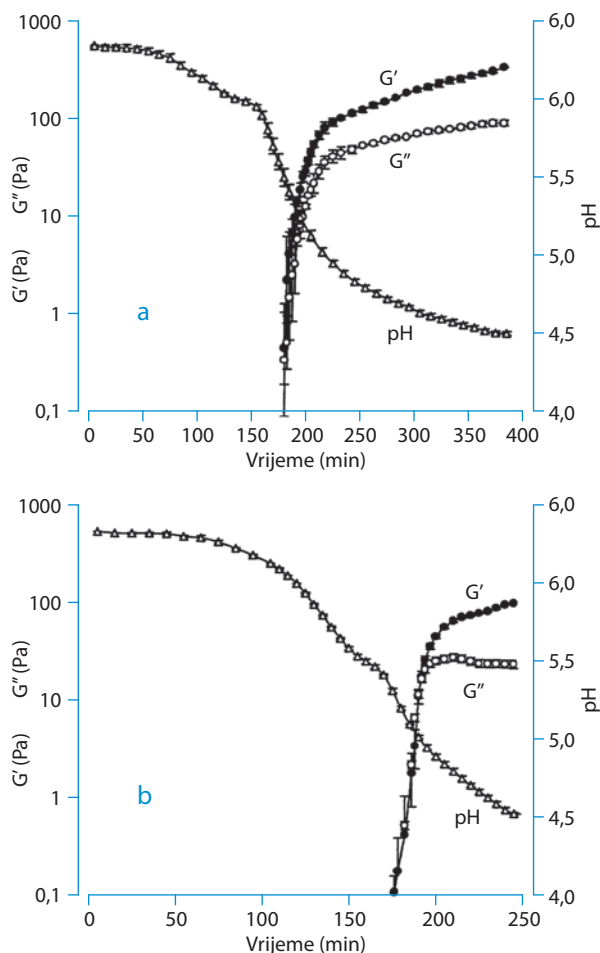


Slika 6.34.

Mikrostruktura čvrstog jogurta s 9 % i 14 % suhe tvari i omjerom kazein : proteini sirutke 4 : 1 uz korištenje standardne i EPS (+) kulture.

Detalji: jogurt s 9 % suhe tvari (a) standardna jogurtna kultura, (b) EPS (+) (kapsularni oblik), (c) EPS (+) (difuzni oblik); jogurt s 14 % suhe tvari: (d) standardna kultura, (e) EPS (+) (kapsularni oblik), (f) EPS (+) (difuzni oblik). Slika je snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 6000 x. (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)

nekoliko minuta. Slika 6.35. jasno pokazuje da obje kulture nakon inokulacije i inkubacije fermentacijskog mlijeka na temperaturi od 43 °C prije početka snižavanja pH-vrijednosti prolaze kroz lag-fazu fermentacije tijekom ~ 2,5 sata. Snižavanjem temperature



Slika 6.35.

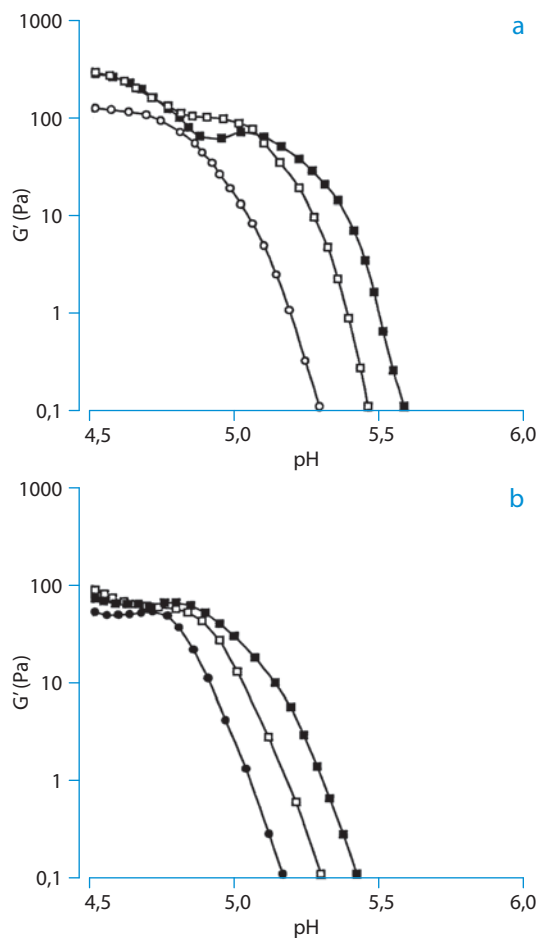
Vremenski tijek snižavanja pH-vrijednosti i formiranja gel-strukture jogurta proizvedenog standardnom jogurtnom kulturom (slika a) i EPS (+) jogurtnom kulturom (slika b) izraženo kroz mjerenje vrijednosti modula pohrane ili elastičnosti G' (označeno ●) i modula gubitka ili viskoznosti G'' (označeno ○). (Haque i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)

inkubacije, neovisno o vrsti korištene kulture, promjene pH vrijednosti pokazuju proporcionalno povećanje vremena potrebnog da se postigne finalni pH od 4,6. Povećanje potrebnog vremena da se postigne finalni pH od 4,6 sniženjem temperature inkubacije

(37 °C) manje je za jogurt koji se proizvodi jogurnom EPS (+) kulturom (slika 6.36.). Odnosno, to upućuje na zaključak da snižavanje temperature fermentacije ima manji učinak na sposobnost bakterija konverziji uree od njihove sposobnosti da na tim temperatura-ma konvertiraju laktozu u mliječnu kiselinu. Općenito se smatra da bakterijski sojevi BMK koji imaju sposobnost stvaranja egzopolisaharida (EPS) pozitivno utječu na sva fizikalna svojstva osobito tekućih varijanti fermentiranih mlijeka. Naime, oni tijekom fermentacije osim sposobnosti tvorbe EPS zadržavaju i svoju proteolitičku aktivnost.

Važnost utjecaja temperature inkubacije i vrste korištene kulture [u ovom slučaju: jogurtna kultura s EPS (+) sojevima (YC191) i EPS(-) sojevima (YC60) i temperatura inkubacije od 37 °C, 40 °C, 43 °C i 46 °C] na svojstva elastičnosti (G') formiranog gela i na brzinu snižavanja pH u proizvodnji jogurta prikazuje slika 6.36.

U proizvodnji biojogurta komercijalnog imena ABT kultura ili biogard, uz probiotičke sojeve *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. iz jogurtne kulture koristi se jedino vrsta *S. thermophilus*. Zbog toga tijekom fermentacije izostaje sinergistički odnos između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koji je karakterističan za proizvodnju klasičnog jogurta. Posljedično, vrijeme fermentacije je sporo, čvrstoća teksture čvrste varijante manja, a tekuće varijante jogurta slabije viskozna. Zbog toga se ABT kultura često proizvodi s dodatkom sojeva *S. thermophilus* koji imaju sposobnost stvaranja EPS. Negativna strana korištenja EPS (+) sojeva vrste *S. thermophilus* u proizvodnji ABT kulture je u činjenici da se tijekom održivosti proizvoda i stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva *Bifidobacterium* spp. relativno brzo značajnije smanjuje. U nastojanju da se izbjegnu te neželjene pojave jedan od načina je i uvođenje proteolitičkih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u mikrobnu kulturu za proizvodnju ABT kulture. Proteolitički sojevi *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* imaju povoljan utjecaj na veći stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva i na skraćanje vremena fermentacije na približno 5 sati. Istovremeno tijekom fermentacije ne utječu na rast i

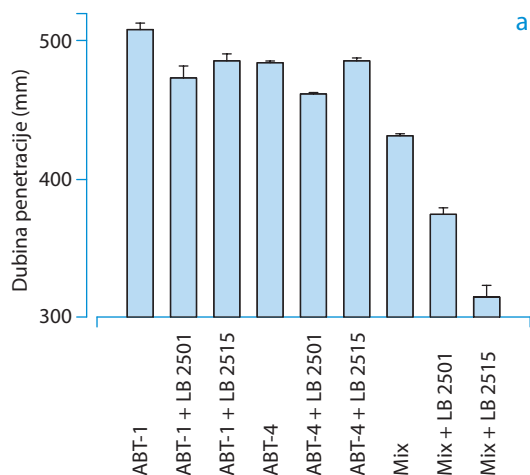


Slika 6.36.

Promjene vrijednosti modula pohrane ili elastičnosti G' ovisno o vrsti dodane kulture i temperaturi inkubacije.

Detalji: a) početak snižavanja pH tijekom fermentacije jogurta korištenjem YC191 kulture - EPS (+) i (b) YC60 kulture - EPS (-) na temperaturi od: 37 °C (○), 40 °C (●) 43 °C (□) i 46 °C (■) (Haque i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)

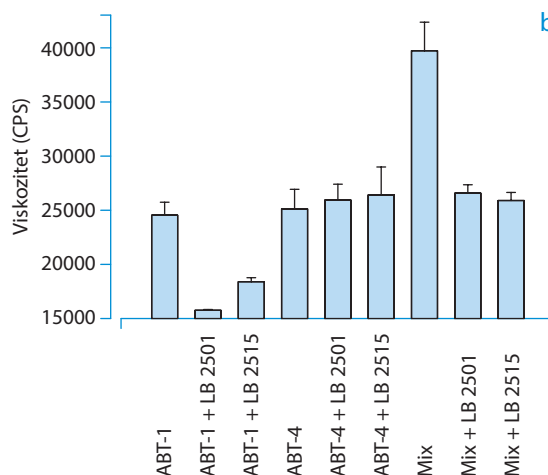
preživljavanje EPS (+) sojeva bakterije *S. thermophilus*. Također, čvrstoća gel-strukture jogurta (izmjerena penetracijskim testom) znatno se povećava. Međutim, proteolitički sojevi vrste *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koji su utjecali na skraćanje vremena fermentacije



Slika 6.37.a.

Čvrstoća biojogurta - ABT kulture izražena dubinom penetracije (mm) uzrokovane dodatkom proteolitičkih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Detalji: ABT-1 = *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *S. thermophilus*; ST = *S. thermophilus*; LA = *L. acidophilus*; BB = *Bifidobacterium* spp.; LB = *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; Mix (mješovita kultura) = *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. (Shihata i Shah, 2002., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 6.37.b.

Viskozitet biojogurta - ABT kulture s dodatkom proteolitičkih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Detalji: ABT = *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *S. thermophilus*; ST = *S. thermophilus*; LA = *L. acidophilus*; BB = *Bifidobacterium* spp.; LB = *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; Mix (mješovita kultura) = *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. (Shihata i Shah, 2002., s dopuštenjem Elseviera.)

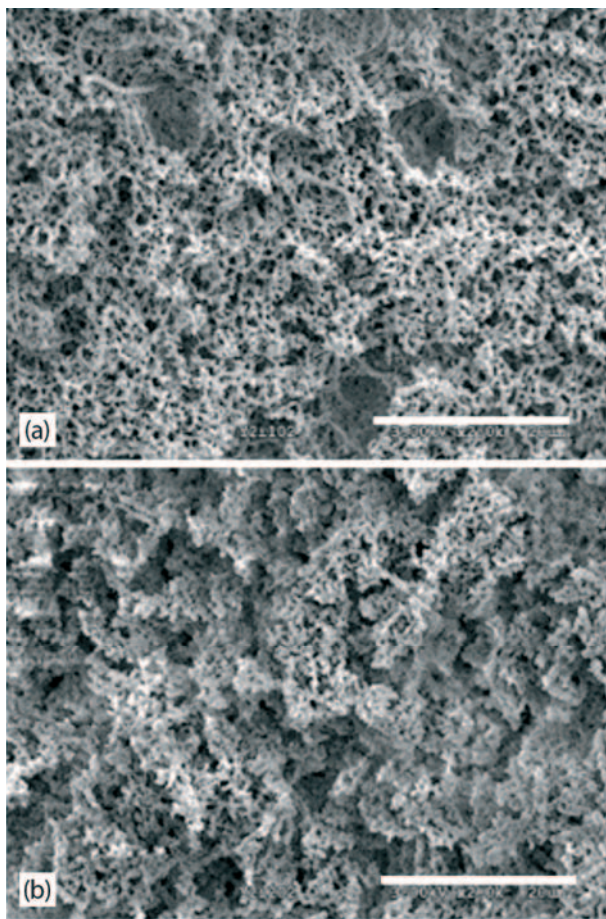
moгу nepovoljno utjecati na viskozitet proizvoda koji nije u korelaciji s tvorbom EPS. Na primjeru korištenja različitih komercijalno dostupnih kultura za proizvodnju ABT kulture kojima su dodana dva različita proteolitička soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, na slici 6.37. a prikazan je utjecaj na čvrstoću, a na slici 6.37. b utjecaj na viskoznost proizvoda.

6.2.3.6.

Vrsta i količina stabilizatora

Stabilizatori se u proizvodnji jogurta često koriste kao dodatci mlijeku radi poboljšanja željenih svojstava teksture jogurta. Korištenje stabilizatora prvenstveno pomaže u proizvodnji tekućih i pitkih varijanti jogurta tako da standardizira konzistenciju i smanjuje varijacije

između proizvodnih šarži. S druge strane, korištenje stabilizatora može izazvati i negativan učinak na fizikalna i reološka svojstva jogurta. Prvenstveno zbog njihova utjecaja na fermentacijsko vrijeme i metabolizam bakterija iz sastava kultura i posljedično njihova vezanja za proteine koji čine proteinsku mrežu gel-strukture jogurta. Tako dodatak hidrolizata proteina mlijeku u svojstvu hidrokoloida poboljšava acidifikaciju mlijeka, skraćuje fermentacijsko vrijeme i povećava stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva bakterija *L. acidophilus* (LA-5) i *L. rhamnosus* (LR-35). No, njihov dodatak mlijeku dovodi do drukčije organizacije proteinske mreže gel-strukture jogurta. Mikrostruktura jogurta bez proteinskog dodatka u svojstvu stabilizatora ima vrlo razgranatu i u visokom stupnju povezanu proteinsku mrežu. Suprotno, mikrostruktura jogurta s proteinskim dodatkom kao



Slika 6.38.

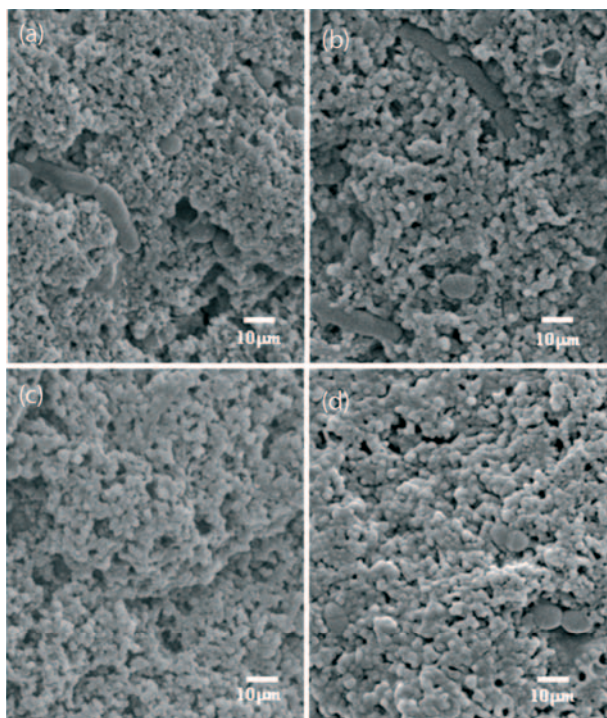
Mikrostruktura probiotičkog jogurta proizvedenog s dodatkom i bez dodatka hidrolizata proteina sirutke.

Detalji: (a) jogurt proizveden bez hidrolizata proteina sirutke uz korištenje kulture *S. thermophilus* ST-7 i *L. rhamnosus* LR-35, jogurt proizveden s hidrolizatom proteina sirutke (4 g L^{-1}) uz korištenje kulture *S. thermophilus* ST-7 i *L. rhamnosus*. (Sodini i sur., 2005., s dopuštenjem Elseviera.)

stabilizatorom ima grublju i slabije povezanu mrežu. Slabija mikrostruktura jogurta od poželjne objašnjava se kraćim fermentacijskim vremenom u kojem nije omogućeno dovoljno dobro povezivanje proteinske

mreže tijekom acidifikacije mlijeka. Osim toga, zbog proteinskog dodatka mlijeku tijekom toplinske obrade moguća je modifikacija načina povezivanja denaturiranog β -laktoglobulina za kazein. Zbog toga, neovisno o tome u kojoj je koncentraciji hidrolizat proteina dodan mlijeku ($0,25 - 4 \text{ g L}^{-1}$), nastaju promjene u mikrostrukturi i fizikalnim svojstvima jogurta. Jogurt proizveden uz dodatak hidrolizata proteina u koncentraciji 4 g L^{-1} ima nižu kompleksnu viskoznost i pokazuje veće deformacije inducirane konstantnom silom. Na slici 6.38. prikazana je mikrostruktura probiotičkog jogurta (kultura: *S. thermophilus* ST-7 i *L. rhamnosus* LR-35) s dodatkom i bez dodatka proteina sirutke.

U proizvodnji tekućih jogurta, za poboljšanje viskoznosti često se koriste metoksil pektini koji imaju $< 50\%$ karboksilnih skupina u svojoj strukturi [engl. *Low Methoxyl Pectins* (LMP)] ili modificirani metoksil pektini [engl. *Low Methoxyl Amidated Pectins* (LMA)] koji imaju između 15 i 20 % karboksilnih grupa. No, unatoč upotrebi stabilizatora općenito i optimiziranju tehnološkog procesa problemi vezani za reološka svojstva tekućeg jogurta, poput predispozicije za sinerezu i slabiju viskoznost od poželjne ipak ostaju. U smislu poboljšanja tih svojstava dobrim se pokazalo korištenje LMP ili LMA pektina u kombinaciji s dodatkom koncentriranih proteina. Učinak dodatka pektina na stabiliziranje acidifikacije mlijeka prvenstveno je povezan s njihovom steričkom stabilizacijom kazeina preko moguće kombinacije elektrostatskih i hidrofobnih interakcija. Istovremeni dodatak proteina, a osobito proteina sirutke ima funkciju poboljšanja okusa jogurta (simulira okus punomasnog jogurta) i smanjenja uobičajene potrebne količine stabilizatora. Na primjeru mjerenja reoloških svojstava, stupnja izdvajanja sirutke i procjene mikrostrukture tekućeg jogurta (slika 6.39.) dobrim se potvrdilo koristiti kompleks proteina sirutke i pektina bez njihove prethodne toplinske stabilizacije. Odnosno, učinak tog kompleksa na reološka svojstva jogurta znatno je bolji ako se kompleks proteina sirutke-LMP pektin prije dodavanja u standardizirano mlijeko za jogurt toplinski ne tretira. Također, u usporedbi s kompleksom proteina sirutke-LMP pektin, za poboljšanje viskoznosti i predispozicije za sinerezu boljom se pokazala praksa



Slika 6.39.

Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog dodatkom proteina sirutke i LMP-pektina.

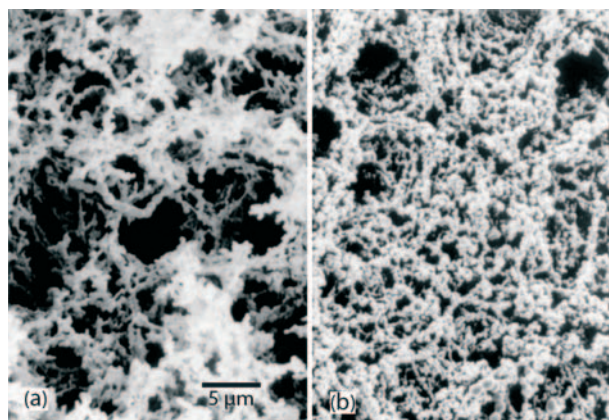
Detalji: (a) toplinski netretirani kompleks proteina sirutke-LMP pektin, (b) toplinski tretirani kompleks proteina sirutke-LMP pektin, (c) toplinski netretirani kompleks proteina sirutke-LMP pektin u tekućoj formi, (d) toplinski netretirani kompleks proteina sirutke-LMP pektin u formi praha. Slika je snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), 3000 x, bar = 10 µm. (S dopuštanjem M-C Gentès, 2007.)

njihova odvojenog dodavanja u standardizirano mlijeko u koncentraciji 4 : 1. Isti učinak na teksturu jogurta postiže se neovisno o tome dodaje li se kompleks u standardizirano mlijeko u tekućem ili u obliku praha. Međutim, da bi se postigli najbolji učinci na reološka svojstva tekućeg jogurta omjer kazein : proteini sirutke u mlijeku ne bi trebao prelaziti 60/40. Mikrostruktura tako proizvedenog jogurta pokazuje sličnu gustu i

dobro povezanu proteinsku strukturu, osim što dodatak toplinski netretiranog kompleksa u usporedbi s toplinski tretiranim kompleksom (proteini sirutke-LMP pektin) pokazuje nešto veće agregirane proteine.

Mikrobni enzim transglutaminaza (TGaza), koja ima sposobnost povezivanja s proteinima mlijeka pojačava proteinsku osnovu gel-strukture jogurta na razini molekula. Enzim katalizira reakciju koja uvjetuje povezivanje unutarnjih i međusobnih veza između aminokiselina glutamina i lizina unutar proteinskog lanca. Zbog toga je proteinska struktura gela pojačana, a posljedično jogurt ima bolju čvrstoću i veći kapacitet zadržavanja sirutke. Dodatak TGaze za poboljšanje reoloških svojstava jogurta najčešće se koristi za čvrste varijante s niskim udjelom mliječne masti ($\leq 2\%$) ili bezmasne jogurte ($< 0,5\%$ mliječne masti). Dodatak enzima TGaze na specifičan način mijenja jogurtnu mikrostrukturu u smislu veće homogenosti proteinskih čestica i smanjenja veličine proteinske mreže. Posljedično izmijenjenoj mikrostrukturi, jogurt ima manje izražena specifična svojstva konzistencije i okusa. Osim toga na mikrostrukturu jogurta značajno utječe način kako se TGaza dodaje mlijeku. U slučajevima ako se enzim dodaje u mlijeko prije fermentacije (inkubacija na $40\text{ }^{\circ}\text{C}/2$ sata) i nakon toga njegove inaktivacije ($80\text{ }^{\circ}\text{C}/1$ min), mikrostruktura jogurtnog gela slabije je povezana. Suprotno, kada se transglutaminaza dodaje mlijeku istovremeno s mikrobnom kulturom, proteinska mreža bolje je povezana i gušća. Posljedično tome unutar dva tjedna pohrane neaktivirana transglutaminaza znatno utječe na povećanje čvrstoće teksture čvrstog jogurta. Razlika u mikrostrukturi čvrstoga bezmasnog jogurta priređenog uz dodatak inaktivirane i neaktivirane transglutaminaze prikazana je na slici 6.40.

Za poboljšanje reoloških svojstava čvrstoga kozjeg jogurta transglutaminaza se također pokazala dobrim izborom. Modifikacijom kozjeg mlijeka dodatkom TGaze u proizvodnji kozjeg jogurta poboljšavaju se organoleptička svojstva, prividna viskoznost, čvrstoća gel-strukture i mikrostruktura a smanjuje predispozicija za sinerezu. Zbog specifičnoga kemijskog sastava kozjeg mlijeka a posebno strukture proteina,



Slika 6.40.

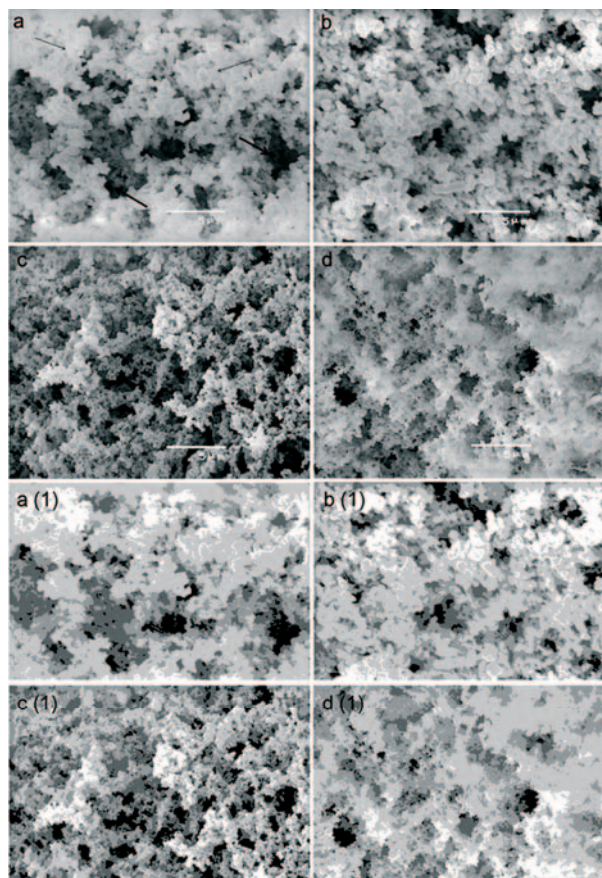
Mikrostruktura bezmasnog jogurta (< 0,5 % mliječne masti) uz dodatak enzima transglutaminaze.

Detalji: (a) dodatak transglutaminaze prije fermentacije i njena inaktivacija, (b) dodatak transglutaminaze istovremeno s mikrobnom kulturom bez inaktivacije. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), bar = 5 μm. (Lorenzen i sur., 2002., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

za uspješno oblikovanje proteinske mreže inducirano TGazom presudni su sljedeći čimbenici:

- pH-vrijednost mlijeka ne smije biti niža od 6,5
- udjel ukupnih proteina ne smije biti niži od 2,8 a kazeina ne niži od 2,5
- koncentracija enzima TGaz ne smije biti viša od 2 U TGaze g proteina⁻¹
- količina inokuluma jogurtne kulture ne bi trebala biti viša od 2 % w/w
- temperatura inkubacije ≤ 44 °C
- brzina acidifikacije optimalna (4 - 5 sati dok se ne postigne pH od ~ 4,8).

Utjecaj koncentracije TGaze od 2 U TGaze g proteina⁻¹ na mikrostrukturu čvrstoga kozjeg jogurta u usporedbi s mikrostrukturom čvrstoga kozjeg jogurta proizvedenog bez TGaze prikazuje slika 6.41. Općenito, viša koncentracija TGaze povoljno utječe na čvrstoću



Slika 6.41.

Mikrostruktura čvrstog kozjeg jogurta proizvedenog dodatkom različitih koncentracija transglutaminaze (TGaze).

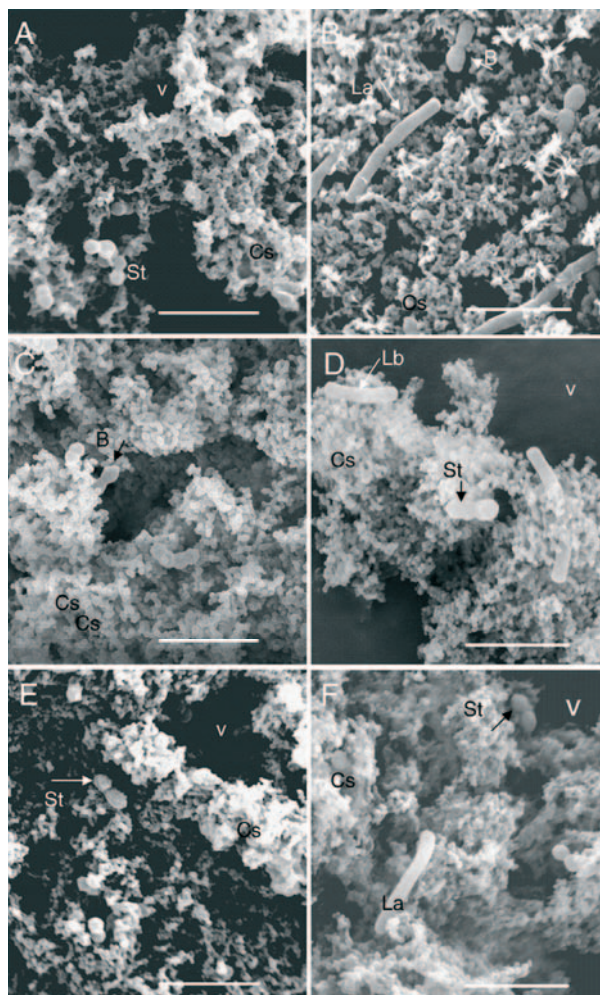
Detalji: (a) kozji jogurt bez dodatka TGaze - kontrolni uzorak (nakon 24 sata), (b) kozji jogurt bez dodatka TGaze - kontrolni uzorak (nakon 14 dana pohrane), (c) kozji jogurt s dodatkom TGaze od 2U TGaze g proteina⁻¹ (nakon 24 sata), (d) kozji jogurt s dodatkom TGaze od 2U TGaze g proteina⁻¹ (nakon 14 dana pohrane). Male strelice pokazuju proteinski matriks a velike strelice prazne prostore (pore) u proteinskom matriksu. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Digitalna slika mikrostrukture jogurtinoga gela a (1) - d (1) načinjena je u programu Grayscale a odgovara SEM slici. (Domagala i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

i smanjuje predispoziciju gel-strukture za sinerezu, ali koncentracije TGaze već od 3U TGaze g proteina⁻¹ tijekom pohrane jogurta utječu na povećanu sinerezu.

6.2.3.7.

Udjel mliječne masti i uvjeti homogenizacije

Probiotička fermentirana mlijeka najčešće se, gotovo u pravilu, proizvode od potpuno obranog mlijeka (0,1 - 0,5 % mliječne masti). Posljedično, nedostatak mliječne masti osim na okus ima nepoželjne posljedice na fizikalna i reološka svojstva tih proizvoda. U cilju poboljšanja okusa i teksture probiotičkih fermentiranih mlijeka s niskim udjelom mliječne masti, između mogućih tehnoloških postupaka visokotlačna homogenizacija (HPH) daje dobre rezultate. Učinak tehnološkog procesa na mikrostrukturu probiotičkoga niskokaloričnog jogurta proizvedenog trima različitim tehnološkim postupcima prije inokulacije s dvjema različitim komercijalnim kulturama objedinjen je slikom 6.42. U konkretnom slučaju jogurti su pripremljeni od obranog mlijeka (0,0 - 0,2 % mliječne masti) koje je obogaćeno obranim mliječnim prahom do 14 % ST mlijeka. Prije inokulacije mlijeko je: (i) toplinski obrađeno na temperaturi od 85 °C/30 min, (ii) homogenizirano (676 MPa/5 min) i (iii) homogenizirano (676 MPa/5 min) i toplinski obrađeno (85 °C/30 min). Usporedbom mikrostrukture jogurta jasno se uočava da su u usporedbi s primjenom HPH i toplinske obrade mlijeka micelle kazeina korištenjem samo toplinske obrade slabije povezane, nepravilnog oblika s velikim porama unutar proteinske mreže (slika 6.42. A i B). Suprotno, mikrostruktura jogurta proizvedenog procesom HPH ima više povezanih klastera gusto agregiranih proteina malih veličina sferičnog izgleda koji pokazuju homogenu distribuciju (slika 6.42. C i D). Jogurt proizveden od mlijeka koje je homogenizirano korištenjem HPH i nakon toga toplinski obrađeno pokazuje kompaktan jogurtni gel (slika 6.42 E i F) s povećanim brojem velikih klastera kazeinskih



Slika 6.42.

Mikrostruktura probiotičkoga jogurta ($\leq 0,2$ % mliječne masti, 14 % suhe tvari) proizvedenog s komercijalnom kulturom YO MIX 236 (A, C, E) i DPL ABY 611 (B, D i E) korištenjem toplinske obrade (A i B); visokotlačne homogenizacije HPH (C i D); kombinacije visokotlačne homogenizacije HPH i toplinske obrade (E i F).

Detalji: St- *Streptococcus thermophilus*; Lb- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; La- *Lactobacillus acidophilus*; B- *Bifidobacterium longum*; v - prazni prostori (pore) cs- kazeini. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), bar = 5 μm . (Penna i sur., 2007., s dopuštanjem Elseviera.)

micela s visokim stupnjem povezanosti. Između nakupina proteina prazni su prostori (pore). Okrugli oblik kazeinskih micela ima tendenciju spajanja i formiranja malih nepravilnih agregata u asocijaciju s nakupinama amorfnih čestica, a posljedica je poboljšanje teksture formiranoga gela i poboljšanje viskoznosti.

6.2.4.

Permeabilnost

Pojam permeabilnost (lat. *permeare*, proći kroz) znači prolaz ili difuziju plinova, para, tekućina ili čvrstih tvari kroz materijal bez fizikalnoga ili kemijskog utjecaja na njega. Za jogurt, omjer prolaza kroz mikro-membranu određen je veličinom pora u proteinskom matriksu gel-strukture i izražava se koeficijentom permeabilnosti (B). Koeficijent permeabilnosti (B) predstavlja mjeru tečenja kontinuirane tekuće faze (seruma) kroz gel-strukturu koja je izazvana poznatim gradijentom tlaka. Visoka B vrijednost upućuje na velike pore unutar proteinske mreže a tečenje seruma kroz matriks je brže. U proteinskom matriksu gel-strukture jogurta veličina pora odražava vrstu mikrostrukture gela koja se formira tijekom acidifikacije. Preuređenje unutar proteinske mreže može izazvati neprekinuto spajanje kazeinskih čestica preko pucanja proteinskih niti koje ih povezuju, što uvjetuje izgradnju proteinske mreže. Oba procesa dovode do laganog povećanja veličine pora i koeficijenta B. Jednom kada formirani gel dostigne pH-4,6 vrijednost koeficijenta B neznatno se

mijenja. Međutim, hlađenjem jogurta, pri čemu dolazi do "bubrenja" kazeina unutar kazeinske mreže, snižava se vrijednost koeficijenta B. Vrijednost koeficijenta permeabilnosti B izražava se sljedećom jednadžbom:

$$B = - [\ln (h_{\infty} - h_{t_2}) / (h_{\infty} - h_{t_1})] \eta H / [\rho g (t_2 - t_1)]$$

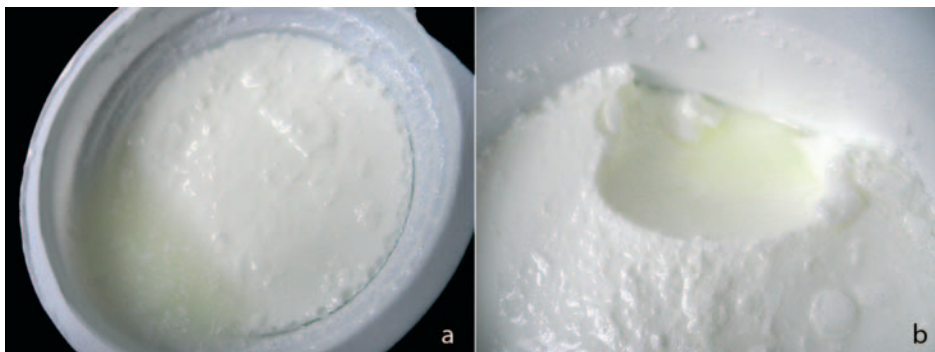
gdje je:

h_{∞} najveća količina sirutke u referentnoj tubi
 h_{t_1} najveća količina sirutke u tubi u vremenu t_1
 h_{t_2} najveća količina sirutke u tubi u vremenu t_2
 η viskozitet sirutke
H duljina gela
 ρ gustoća sirutke
g akceleracija uzrokovana gravitacijom.

6.2.5.

Sinereza

Sinereza je pojava izdvajanja sirutke ili seruma iz proteinske mreže, koja zbog toga postaje vidljiva na površini proizvoda (slika 6.43.). Najčešći je oblik izdvajanja sirutke spontana sinereza, koja bez utjecaja eksterne sile nastaje kao posljedica dinamičke kontrakcije nestabilne proteinske mreže ili povećanja preraspodjele kazeinskih čestica unutar proteinske mreže. Prekomjerna preraspodjela unutar matriksa povezana je s dinamikom i relaksacijom protein-protein veza, što se izražava modulom gubitka tangente (δ) i rezistentnosti kazeina na slabljenje protein-protein



Slika 6.43.

Izgled izdvojene sirutke na površini čvrstog jogurta (a) i u unutrašnjosti gel-strukture jogurta (b).

veza. Predispozicija jogurtnoga gela za sinerezu u tehnološkom je smislu određena brojnim tehnološkim parametrima:

- udjelom proteina i mliječne masti u mlijeku
- temperaturno-vremenskim uvjetima toplinske obrade mlijeka
- načinom i vrstom homogenizacije
- uvjetima inkubacije
- stupnjem mehaničkog narušavanja tijekom miješenja, pumpanja i punjenja proizvoda.

Za mjerenje sinereze ne postoji standardizirani analitički postupak pa se ona utvrđuje različitim metodama. Za spontanu sinerezu čvrstog jogurta može se koristiti jednostavan test tako da se fermentacija odvija u staklenoj odmjernoj tikvici, a izdvojena sirutka izmjeri. Metode temeljene na principu centrifugalne sile sinerezu određuju mjerenjem kapaciteta vezanja vode kao posljedicu primjene jake sile. Metode temeljene na principu gravitacijske sile u mjerenju sinereze korisne su za koncentrirana fermentirana mlijeka (npr. skyr, leben), gdje se u tehnologiji proizvodnje koristi cijeđenje.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta

7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka

- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka

Uvod

Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka pripadaju skupini proizvoda koji se nazivaju funkcionalnom hranom. Pojam funkcionalna hrana novijeg je datuma, a koristi se za hranu koja zbog svojeg sastava uz nutritivna ima i posebna svojstva. U usporedbi s drugom vrstom slične hrane posebnim svojstvima smatraju se primjerice u hrani sadržana visoka razina antioksidanta, antikancerogenih spojeva ili spojeva za usporavanje starenja organizma. Dizajniranje i razvitak funkcionalnosti fermentiranih mlijeka prvenstveno su povezani s obogaćivanjem ili modifikacijom njihove originalne prirodne osnove. U najvećem broju slučajeva modifikacija ili obogaćivanje prirodne osnove odnosi se jedino na dodatak probiotičkih sojeva određenih bakterijskih vrsta ili prebiotika. Od davne 1935. godine, kada su u Japanu počeli proizvoditi prvo probiotičko fermentirano mlijeko - yakult, danas se u svijetu proizvodi više od 500 različitih probiotičkih, prebiotičkih ili simbiotičkih fermentiranih mlijeka. U tom su smislu fermentirana mlijeka u kreiranju novih proizvoda na prvom mjestu liste funkcionalne hrane.

Provedene brojne znanstvene studije potvrđuju da te vrste fermentiranih mlijeka osim nutritivne

vrijednosti imaju i povoljan preventivan ili terapijski učinak na: dijareju, upalne bolesti crijeva, alergijske upale, urogenitalne infekcije, zubni karijes, snižavanje kolesterola ili redukciju kancerogen-induciranih enzima. Fiziološki učinak probiotičkih fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje primarno je vezan za bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije koje se koriste za njihovu proizvodnju. Određeni sojevi tih bakterijskih vrsta sposobni su preživjeti u probavnom sustavu, najvećem ljudskom perifernom organu za zaštitu od infekcija i mogućega imunosnog odgovora organizma, i imati povoljan utjecaj na humano zdravlje.

U cilju potpunijeg razumijevanja uspjeha i važnosti probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka u izbalansiranoj prehrani čovjeka u ovom su poglavlju knjige ukratko opisani: (i) razvitak probiotičkih fermentiranih mlijeka, (ii) primjena i preživljavanje probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku i (iii) vrste i tehnologija proizvodnje. Ovo poglavlje knjige sadrži i opise značenja pojmova funkcionalna hrana, probiotici, prebiotici i simbiotici. Također, u ovom poglavlju knjige objašnjeni su i načini preventivnoga i terapijskog djelovanja tih fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje.



7.1.

Razvitak probiotičkih fermentiranih mlijeka

Prve znanstvene spoznaje da fermentirana mlijeka osim ugodnog okusa i duže trajnosti imaju i povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje postale su dostupne javnosti potkraj 19. stoljeća. Njemačko-austrijski znanstvenik Theodor Escherich (1857. - 1911.) prvi je pretpostavio važnost uravnotežene crijevne mikrobne populacije za humano zdravlje. Odnosno, Escherich je smatrao postojanost prirodne ravnoteže unutar crijevne mikrobne populacije ključnom za razumijevanje probavnog mehanizma općenito, ali i važnom za procjenu patogenosti i liječenja probavnih bolesti.

Ipak, najvažnije spoznaje o povoljnom utjecaju konzumacije fermentiranih mlijeka na humano zdravlje temelje se na istraživanjima ruskog znanstvenika i dobitnika Nobelove nagrade Ilja Iljiča Mečnikova (1845. - 1916.). Mečnikov je tvrdio da je dobro zdravlje određeno interakcijama između crijevnih bakterija i domaćina. Upozorio je na moguću modifikaciju crijevne mikrobne populacije zamjenom *štetnih* bakterija s *korisnim* bakterijama mliječne kiseline. Starenjem organizma, kako je tvrdio, dolazi do povećane aktivnosti proteolitičkih bakterija koje razgradnjom proteina stvaraju toksične spojeve poput fenola, indola i amonijaka. Ti su spojevi, smatrao je, odgovorni za autointoksikaciju koja uvjetuje fiziološke promjene u organizmu. U to je vrijeme već bilo poznato da fermentacija mlijeka bakterijama mliječne kiseline (BMK) inhibira rast proteolitičkih bakterija. Tako je na temelju te činjenice Mečnikov pretpostavio da se konzumacijom fermentiranog mlijeka može sniziti pH-vrijednost u lumenu crijeva. Zbog snižavanja pH-vrijednosti u crijevima, kako je zaključio, dolazi do inhibicije rasta proteolitičkih bakterija. Svoja je istraživanja Mečnikov temeljio na proučavanju aktivnosti bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (tada *Lactobacillus bulgaricus*), izolirane iz bugarskoga kiselog mlijeka. Na temelju vlastitih rezultata istraživanja, bugarsko kiselo mlijeko je sam uveo u svoju prehranu i smatrao da mu

je zdravlje poboljšano. Njegov su primjer prihvatili i mnogi njegovi kolege, a pedijatri su uskoro počeli uvoditi kiselo mlijeko u prehranu svojih pacijenata.

Znanstvenik Henry Tissier, koji je kao i Mečnikov tada radio u Pasteurovu institutu u Parizu, prvi je iz stolice dojenčadi hranjene majčinim mlijekom izolirao bakteriju koju je nazvao *Bacillus bifidus communis* (poslije *Bifidobacterium bifidus*). Tissier je tvrdio da bifidobakterije mogu zamijeniti proteolitičke bakterije koje uzrokuju dijareju i preporučivao njihovo korištenje u liječenju djece koja su patila od tih simptoma.

Nešto kasnije radovi drugih znanstvenika potvrdili su da *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ne može preživjeti pasažu kroz probavni sustav. Zbog tih je rezultata Mečnikova teorija na toj razini odbačena. Ipak su i nakon smrti Ilja Iljiča Mečnikova (1916.) brojni znanstvenici nastavili istraživanja o mogućem povoljnom utjecaju BMK na ljudsko zdravlje. Posljedično tim istraživanjima je otkriveno da određeni sojevi bakterije *Lactobacillus acidophilus* koji potječu iz humanog probavnog sustava mogu preživjeti pasažu kroz želudac i imati poželjan učinak na crijevnu populaciju. U to su doba korištenjem tih bakterija sadržanih u fermentiranom mlijeku postignuti dobri rezultati u liječenju kroničnih opstipacija.

Prvu stabilnu kulturu s probiotičkim učinkom u proizvodnju fermentiranog mlijeka - yakult uveo je 1935. godine japanski znanstvenik i liječnik Minoru Shirota (1899. - 1982.). On je iz humanoga probavnog trakta izolirao bakteriju koja se pokazala otpornom na želučane kiseline i žučne soli. Zbog tog je otkrića Minoru Shirota pretpostavio da ta bakterija može neoštećena dospjeti u tanko crijevo. Njezinim dnevnim unosom u organizam, kako je smatrao, ona može promovirati intestinalnu stabilnost i spriječiti razvitak bolesti. Posljedično tome, vjerovao je Shirota, može se poboljšati kvaliteta življenja i produžiti životni vijek čovjeka. U njegovu čast ta je bakterija nazvana *Lactobacillus casei* Shirota. Poslije su tijekom mnogih godina istraživanja karakteristika bakterije *L. casei* Shirota brojne znanstvene studije potvrdile njenu prirodnu sposobnost različitog pozitivnog biološkog djelovanja na humani organizam.

U periodu između 1930. i 1950. godine istraživanja u tom području, zbog novonastalih prilika u svijetu (ekonomska kriza, rat), velikim su dijelom obustavljena. Istraživanja o povoljnom utjecaju bakterija, osobito vrsta rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* na humani organizam nastavljena su u ranim 1960-ima. Nakon otkrića i primjene molekularno-genetičkih tehnika koja su uslijedila od početka 1990-ih godina, istraživanja genetičkih, biokemijskih i funkcionalnih karakteristika bakterija mliječne kiseline (BMK) i bifidobakterija povećala su se u gotovo nezamislivom broju i intenzitetu. Slijedom tih istraživanja postignute su značajne fiziološke i biokemijske informacije potrebne za sigurno korištenje tih bakterija u svojstvu promotora humanog zdravlja.

7.2.

Probiotički i prebiotički koncept

Prema današnjim stavovima nutricionista i liječnika, primarna je uloga ljudske prehrane: (i) opskrbljivanje organizma nutrijentima potrebnima za uravnoteženi metabolizam i (ii) pružanje osjećaja zadovoljstva i blagostanja. Istovremeno napretkom biomedicine nedvojbeno je potvrđena važnost simbioze između mikrobiote debelog crijeva i humanog zdravlja. U tom se smislu na razini današnjeg znanja podržava hipoteza da humana prehrana osim potrebnih nutrijenata mora imati i određenu fiziološku funkciju, mora poboljšavati zdravlje i mora smanjiti rizik od nastanka bolesti. U proizvodnji fermentiranih mlijeka upravo na temelju tih spoznaja, najprije je prihvaćen probiotički a otprilike prije desetak godina i prebiotički koncept.

U suglasju s probiotičkim i prebiotičkim konceptom, fermentirana mlijeka koja sadrže probiotičke sojeve (prvenstveno sojeve *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp.), prebiotike ili istodobno oboje smatraju se funkcionalnom hranom. U skupinu funkcionalne hrane ona

se svrstavaju na temelju njihova istodobnoga povoljnoga hranjivog i fiziološkog učinka na ljudsko zdravlje. Prema općeprihvaćenoj definiciji: "Funkcionalna je hrana ona hrana koja osim osnovnoga hranjivog utjecaja sadrži i komponente koje se smatraju promotorima zdravlja, ili opće dobrobiti, ili smanjenja rizika za nastanak bolesti, djelovanjem na jednu ili više funkcija u tijelu". Također, pojam funkcionalna hrana obuhvaća i sljedeće postulate:

- mora "ostati" hrana
- mora imati povoljno djelovanje u količini koja se normalno očekuje u redovitoj prehrani
- nisu kapsule ili tablete.

U smislu točno određenog pojma - funkcionalna hrana, probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka u potpunosti ispunjavaju zadane kriterije. Osim toga, u proizvodnji tih fermentiranih mlijeka jedino se neznatnom modifikacijom osnovnoga fermentiranog mlijeka postižu željena svojstva karakteristična za proizvod uz istodobno potpuno očuvanje njegove hranjive i funkcionalne vrijednosti.

Hranjivi učinak fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje izražava se kroz dostatnost prirodnih sastojaka samih po sebi. Tako su za ljudski organizam, u odnosu na mlijeko, proteini, mliječna mast i laktoza sadržani u fermentiranom mlijeku znatno probavljiviji. Fermentirana mlijeka sadrže i znatno višu koncentraciju određenih B vitamina i esencijalnih aminokiselina, a istodobno sadrže nižu razinu laktoze. Koncentracija minerala tijekom fermentacije mlijeka gotovo da se i ne mijenja. Ali je znanstveno potvrđeno da je za ljudski organizam dostupnost topljivih oblika kalcija, fosfora i željeza iz fermentiranih mlijeka znatno bolja u odnosu na mlijeko. Mliječna kiselina koju sadrže sva fermentirana mlijeka potiče peristaltiku crijeva što poboljšava ukupnu probavu i apsorpciju hrane. Olakšana probava uz prirodne sastojke koje sadrže fermentirana mlijeka - dokazano osnovni su preduvjeti dobrog zdravlja.

Fiziološki ili funkcionalni učinak probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje izražava se njihovim preventivnim ili

terapijskim učinkom. Oba su učinka vezana za njihovo istodobno direktno i indirektno djelovanje u organizmu. Direktno djelovanje uzrokovano je prisutnošću bakterija ili prebiotika u intestinalnom sustavu samih po sebi, a indirektno se ostvaruje kroz novostvorene metabolite. Tako kada fermentirano mlijeko istodobno sadrži FOS-prebiotike (fruktooligosaharidi) i probiotičke sojeve bakterija *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp., tijekom fermentacije nastaju kratkolančane masne kiseline - maslačna, propionska i octena. Poslije te kiseline u debelom crijevu, pretpostavlja se, imaju funkciju prevencije nastanka karcinoma debelog crijeva.

Na temelju probiotičkog i prebiotičkog koncepta u posljednjih su se dvadesetak godina razvila nova fermentirana mlijeka, koja se od klasičnih razlikuju prema svojoj funkcionalnosti. Osim toga, u tehnološkom je smislu korištenje prebiotika u proizvodnji fermentiranih mlijeka poboljšalo neka od reoloških svojstava samoga proizvoda.

7.2.1.

Definicija probiotika

Od vremena Mečnikova i Tissiera, koji su prvi pretpostavili probiotičko djelovanje bakterija koje se koriste u fermentaciji mlijeka, definicija probiotika neprestano se mijenjala. Razlog je tome prvenstveno: (i) iznimna kompleksnost probiotičkih sojeva samih po sebi, (ii) interakcijska složenost njihova međusobnog djelovanja i (iii) nemogućnost potpuno objektivne procjene njihove funkcionalne učinkovitosti na domaćina. Osim poteškoća u definiranju, važno je istaknuti činjenicu da je i sama riječ probiotik u današnjem značenju te riječi utvrđena tek 1965. godine. Izvedena je iz riječi grčkog podrijetla *pro* i *bio* koja znači - za život kao antonim pojmu antibiotik koja znači - protiv života. U mikrobiološkom smislu riječ probiotik prvi su upotrijebili istraživači Lilly i Stillwell (1965. godine) za imenovanje supstancija koje stvaraju mikroorganizmi a kojima se potiče rast drugih mikroorganizama.

Znanstvenik G. S. Sperti 1971. godine riječ probiotik također je koristio za opis ekstrakta tkiva koji stimulira mikrobnog rast.

Najsličniju definiciju probiotika današnjoj još 1974. godine postavio je R. B. Parker a ona glasi: "*Probiotici su organizmi ili tvari koje pridonose intestinalnoj mikrobnog ravnoteži*". Parkerovu su definiciju poslije odbacili mnogi autori budući da prema njoj u probiotike mogu biti uključene različite tvari, čak i antibiotici. U namjeri da istakne mikrobnog prirodu probiotika, znanstvenik Roy Fuller je 1987. godine pretpostavio sljedeću definiciju: "*Živi prehrambeni dodatak koji povoljno utječe na poboljšanje intestinalne ravnoteže kod životinja kao domaćina*". Vrlo sličnu definiciju predložili su i Havenaar i Huis 1992. godine: "*Mono ili mješovita mikrobnog kultura bakterija koja primijenjena na životinje ili čovjeka ima povoljan učinak na domaćina poboljšanjem svojstava autohtone intestinalne mikrobnog populacije*". Konačna ali vjerojatno ne i posljednja definicija probiotika preporučena 2001. godine od FAO/WHO glasi: "*Živi mikroorganizmi koji konzumirani u adekvatnoj količini potvrđuju zdravstvene učinke na domaćina*". Na temelju važeće definicije, fermentirana mlijeka koja sadrže žive probiotičke bakterije nazivaju se probiotička fermentirana mlijeka ili probiotici.

7.2.1.1.

Podrijetlo i svojstva probiotičkih bakterija

Važeći nacionalni i internacionalni propisi u izboru i selekciji probiotičkih bakterijskih sojeva koji se koriste za proizvodnju fermentiranih mlijeka primarno nalažu njihovo humano podrijetlo. Zbog činjenice da se poznatim analitičkim metodama nakon izolacije više ne može točno utvrditi njihovo stvarno podrijetlo, zahtjev humanog podrijetla probiotičkih sojeva u praksi nije toliko striktan. Prema važećim propisima najvažniji su kriteriji u izboru probiotičkih sojeva za njihovo korištenje u proizvodnji fermentiranih mlijeka:

- poželjno humano podrijetlo
- dobra karakterizacija do razine soja

- nepatogenost (sigurnost soja)
- sposobnost aktivnosti u proizvodnji
- sposobnost preživljavanja u proizvodnji
- sposobnost preživljavanja u proizvodnim uvjetima
- rezistentnost na niski pH
- rezistentnost na želučanu kiselinu
- rezistentnost na žučne soli
- sposobnost adsorpcije za sluznicu crijeva
- sposobnost barem privremene kolonizacije gastrointestinalnog sustava
- sposobnost inhibitorynog djelovanja prema patogenim bakterijama.

Probiotički bakterijski sojevi, uz te istaknute kriterije, moraju imati i funkcionalna svojstva preko kojih mogu pozitivno utjecati na narušenu mikrobnu ravnotežu u crijevima. Posljedično uspostavljenoj ravnoteži, dodatno bi te bakterije trebale svojim direktnim ili indirektnim djelovanjem iskazati povoljan utjecaj na zdravlje domaćina. Važno je istaknuti i činjenicu da se određeni povoljan zdravstveni učinak odnosi jedino na točno testirani bakterijski soj a ne na cijelu vrstu. Implikacije su za soj-specifični zdravstveni učinak:

- testirani bakterijski soj mora biti imenovan prema znanstveno prihvaćenoj nomenklaturi: (i) rod, (ii) vrstom i (iii) alfanumeričkom oznakom pod kojom je pohranjen u jednoj od priznatih svjetskih kolekcija bakterijskih sojeva:

Rod	Vrsta	Oznaka soja
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> (DG)	CNCN I-1572
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i> (GG)	ATCC 53103
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> (LA-5)	DSM 13241
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	NCIMB 41003

DSM = DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen/German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Njemačka)

ATCC = American Type Culture Collection (SAD)

NCIMB = National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Velika Britanija)

CNCN = Collection National de Cultures de Microorganismes (Francuska)

- dokumentacija o zdravstvenom učinku koja je provedena za bakterijski soj koji je dio proizvoda

koji se prodaje prema Uredbi (EC) 1924/2006. (članak 13.5) i preporukama *European Food Safety Authority* (EFSA)

- rezultati znanstvenih istraživanja o specifičnosti određeni bakterijskih sojeva bez provedenog testiranja kroz proizvod koji se prodaje ne mogu se koristiti kao evidencija za potvrdu zdravstvenog učinka određenoga bakterijskog soja.

U tom se smislu znanstveno potvrđen preventivni ili terapijski učinak probiotičkih fermentiranih mlijeka na dijareju, upalne bolesti crijeva, alergijske upale, urogenitalne infekcije, zubni karijes, snižavanje kolesterola ili redukciju kancerogen-induciranih enzima ne smatra dovoljnim.

7.2.2.

Definicija prebiotika i simbiotika

Prebiotici su prema definiciji neprobavljivi sastojci hrane koji imaju povoljan učinak na zdravlje domaćina selektivnom stimulacijom rasta ili aktivnosti jedne ili limitiranog broja bakterija u debelom crijevu. Korištenje prebiotika u proizvodnji fermentiranih mlijeka u smislu općeprihvaćenog probiotičkog koncepta započelo je prije otprilike desetak godina. Prema istoj analogiji koja je usvojena za označavanje probiotičkih fermentiranih mlijeka termin: (i) prebiotici koristi se za ona fermentirana mlijeka koja sadrže prebiotike, a (ii) simbiotici za ona fermentirana mlijeka koja uz prebiotike sadrže i probiotičke sojeve.

Najčešće korišteni prebiotici u svrhu povećanja zdravstvene vrijednosti fermentiranih mlijeka su: inulin, oligofruktoza, fruktooligosaharidi i galaktooligosaharidi. Prirodan izvor inulina su mnoge biljke, a u visokoj koncentraciji sadrže ga cikorija, artičoka, luk, poriluk i češnjak. Inulin se sastoji od dvadesetak molekula fruktoze terminalno vezanih za molekule glukoze. Enzimatskom razgradnjom može se prirediti inulin s manjim brojem molekula fruktoze, čime se postiže poželjno smanjuje njegove molekularne težine. Prirodno, oligofruktozu sadrži brojno povrće i voće,

poput žitarica, luka, poriluka, češnjaka, banana i meda. Oligofruktoza se može izolirati i iz korijena cikorije ili enzimatski sintetizirati iz saharoze. Fruktooligosaharidi i galaktooligosaharidi su oligosaharidi koji su prema svojoj strukturi slični inulinu a prirodno su prisutni u određenim vrstama povrća.

Osim prirodnih prebiotika u proizvodnji fermentiranih mlijeka koriste se i sintetski oligosaharidi derivirani iz fruktoze (fruktooligosaharidi) ili galaktoze (galaktooligosaharidi). Ti su prebiotici poznati pod imenom **FOS** ili **GOS** i često se koriste za proizvodnju simbiotičkih fermentiranih mlijeka u kombinaciji s bifidobakterijama. Zajedničko je svojstvo i prirodnih i sintetskih prebiotika poticanje rasta endogenih bakterija, osobito bifidobakterija u debelom crijevu. Istodobno tijekom vijeka održivosti probiotičkih fermentiranih mlijeka oni su izvor nutrijenata koji bifidobakterijama osiguravaju potrebnu brojnost i duže preživljavanje.

Prebiotici se u proizvodnji fermentiranih mlijeka osim zbog povoljnog učinaka na zdravlje domaćina koriste i u druge svrhe. Različite vrste prebiotika mogu se koristiti za poboljšanja teksture proizvoda ili u svojstvu zamjene za mliječnu mast u niskokaloričnim varijantama fermentiranih mlijeka.

7.3.

Nazivlje, vrste i tehnologija proizvodnje

7.3.1.

Biojogurt

Biojogurt je netradicionalno fermentirano mlijeko koje se od kravljeg mlijeka u obliku čvrstog jogurta proizvodi u mnogim europskim zemljama. Prefiks *bio* dodan jogurtu znači da jogurt osim bakterija

standardne jogurtne kulture sadrži i probiotičke sojeve određenih bakterijskih vrsta. U literaturi se ime biojogurt prvenstveno odnosi na fermentirano mlijeko za čiju se proizvodnju isključivo koristi kultura sastavljena od vrste *S. thermophilus* i probiotičkog soja vrste *L. acidophilus*. Na kraju vijeka održivosti biojogurt sadrži *L. acidophilus* ~ 3×10^8 cfu mL⁻¹ i karakterizira ga blaga kiselost (pH - 4,5 - 4,7).

U praksi se naziv biojogurt koristi i za ona fermentirana mlijeka koja uz bakteriju *S. thermophilus* sadrže i drukčije kombinacije probiotičkih bakterijskih sojeva. Biojogurt koji uz *S. thermophilus* sadrži probiotičke sojeve bakterija *L. acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, naziva se trgovačkim imenom - biogard ili ABT kultura. U nekim zemljama nazivom fermentiranog mlijeka - AB kultura označava se jedino proizvod koji sadrži probiotičke sojeve bakterija *L. acidophilus* i *B. bifidum*. Većina zemalja ipak dopušta označavanje proizvoda imenom - AB kultura ako uz te dvije bakterijske vrste proizvod sadrži jednu ili obje vrste bakterija jogurtne kulture. Također, naziv AB kultura odnosi se na niz netradicionalnih fermentiranih mlijeka koja sadrže isključivo samo jednu ili obje vrste tih probiotičkih sojeva u kombinaciji s drugim BMK. Zbog toga se za sva fermentirana mlijeka proizvedena korištenjem probiotičkih bakterijskih sojeva u kombinaciji s jednom ili obje bakterijske vrste iz sastava standardne jogurtne kulture smije koristiti zajednički naziv biojogurt. Za primjer u tablici 7.1. prikazana su neka od trgovačkih imena koja se koriste za biojogurt.

Fermentirana mlijeka koja sadrže *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. i *L. casei* poznata su pod imenom ABC kultura. Prema istoj analogiji kao i za AB kulturu ili ABT kulturu neke zemlje dopuštaju korištenje imena ABC kultura i za proizvode koji osim tih bakterijskih vrsta sadrže i jednu ili obje bakterijske vrste iz sastava standardne jogurtne kulture.

U smislu općeprihvaćene definicije, biojogurt se smatra probiotičkim fermentiranim mlijekom samo onda ako na kraju svog vijeka održivosti sadrži najmanje 10^6 cfu mL⁻¹ od svakog dodanog probiotičkog soja određene bakterijske vrste.

Tablica 7.1.

Trgovačka imena za neke od vrsta biojogurta na svjetskom tržištu

A = *Lactobacillus acidophilus*,
B = *Bifidobacterium* spp.,
JK = jogurtna kultura
(prilagođeno prema
Gomesu i Malcatiju, 1999.,
i Lourens-Hattinghsu i
Viljoenu, 2001.)

Proizvod	Vrsta kulture	Zemlja
AB mlijeko	A + B	Danska
AB kultura	A + B	Danska, Norveška
Acidofil–bifido jogurt	A + B + JK	Njemačka
Bifidus activ	<i>B. longum</i> + JK	Francuska
Bifidus mlijeko	<i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i>	Njemačka
Bifidus jogurt	<i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i> + JK	mnoge zemlje
Bifighurt	<i>B. longum</i> + <i>S. thermophilus</i>	Njemačka
Bifilak	A + B	Rusija
Biokys ili Femilact	A + B + <i>Pediococcus acidilactici</i>	Češka
A–38	A + B + mezofilna LD kultura	Danska
Acidofilno mlijeko	A + B + mezofilna LD kultura	Švedska
Kyr	A + B + JK	Italija
Biogarde	A + B + <i>S. thermophilus</i>	Njemačka
Oflus	A + B + <i>S. thermophilus</i>	Francuska
BIO	A + B + JK	Francuska
Mil–Mil	A + B + <i>B. breve</i>	Japan
B–Active	A + B + JK	Francuska
Acidofilni jogurt	A + JK	mnoge zemlje
Biomild	A + B	mnoge zemlje

7.3.2.

Vrste probiotičkih fermentiranih mlijeka

Fermentirana mlijeka koja sadrže probiotičke sojeve različitih vrsta bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija u kombinaciji s klasičnom termofilnom ili mezofilnom kulturom zajedničkim se imenom nazivaju probiotička fermentirana mlijeka ili probiotici.

Probiotička fermentirana mlijeka proizvode se tako da se probiotički sojevi istodobno inokuliraju u mlijeko sa standardnom mezofilnom ili termofilnom kulturom. Alternativan način njihove proizvodnje temelji se na odvojenim procesima fermentacije gdje se probiotička kultura dodaje gotovom proizvodu. Probiotička kultura u kombinaciji sa standardnom mezofilnom kulturom (*Lactococcus/Leuconostoc*) u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka najčešće se koristi u Skandinaviji, Nizozemskoj i zemljama istočne Europe. U Finskoj je najpopularnije

fermentirano mlijeko ono proizvedeno s dodatkom probiotičkog soja *L. rhamnosus* (GG) i čini više od 50 % njihove ukupne proizvodnje fermentiranih mlijeka. Također, Finci su u usporedbi s drugim zemljama najveći potrošači probiotika. U zapadnoj Europi, uključivo i Hrvatsku, probiotička fermentirana mlijeka uglavnom se proizvode u kombinaciji s termofilnom kulturom (jogurtna kultura ili samo vrsta *S. thermophilus*).

Probiotička fermentirana mlijeka kao niti biojogurt ne pripadaju tradicionalnim vrstama fermentiranih mlijeka. Zahvaljujući dugoj povijesti sigurne konzumacije tradicionalnih vrsta potrošači su prihvatili *nova* fermentirana mlijeka bez promjene percepcije o njihovom povoljnom utjecaju na vlastiti organizam. Prema podacima u zapadnim europskim zemljama, korištenje probiotičkih bakterijskih sojeva kao dodataka funkcionalnoj hrani donosi godišnju zaradu veću od 1,4 milijarde eura. Očekivano, unutar skupine funkcionalne hrane prodajom probiotičkih jogurta ostvaruje se zarada od približno milijarde eura, od čega 10 % čine ostala probiotička fermentirana mlijeka. Također,

Tablica 7.2.

	<i>Lactobacillus</i> spp.	Oznaka soja	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Oznaka soja
Najčešće korišteni sojevi <i>Lactobacillus</i> spp. i <i>Bifidobacterium</i> spp. u sastavu komercijalnih probiotičkih kultura (prilagođeno prema Shahu, 2007.)	<i>L. acidophilus</i>	LA-1/LA-5	<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703, 94-BIM
	<i>L. acidophilus</i>	NCFM	<i>B. longum</i>	BB536
	<i>L. acidophilus</i>	La1	<i>B. longum</i>	SBT-2928
	<i>L. acidophilus</i>	DDS-1	<i>B. breve</i>	Yakult
	<i>L. acidophilus</i>	SBT-2062	<i>B. bifidus</i>	Bb-11
	<i>L. bulgaricus</i>	Lb12	<i>B. animalis</i>	Bb-12
	<i>L. lactis</i>	L1A	<i>B. essensis</i>	Danone
	<i>L. casei immunitas</i>	Danone	<i>B. lactis</i>	Bb-02
	<i>L. casei</i>	Shirota	<i>B. infantis</i>	Shirota
	<i>L. paracasei</i>	CRL 431	<i>B. infantis</i>	Immunitass
	<i>L. plantarum</i>	299v, Lpo1	<i>B. infantis</i>	744
	<i>L. rhamnosus</i>	GG (Valio)	<i>B. infantis</i>	01
	<i>L. rhamnosus</i>	GR-1	<i>B. laterosporus</i>	CRL 431
	<i>L. rhamnosus</i>	LB21	<i>B. lactis</i>	Lafti™, b94(DSM9)
	<i>L. rhamnosus</i>	271 (Probi AB)	<i>B. longum</i>	UCC 35624 (UCCork)
	<i>L. reuteri</i>	SD2112/MM2	<i>B. lactis</i>	DR10/HOWARU/Danisko
	<i>L. plantarum</i>	(Probi AB)		
<i>L. fermentum</i>	RC-14			
<i>L. helveticus</i>	Bo2			

rast godišnje prodaje tih proizvoda za sljedeće petogodišnje razdoblje očekuje se na razini od približno 7 - 8 %. U formi *dnevne doze* (65-125 mL) probiotička su se fermentirana mlijeka u Europi pojavila 1994. godine zahvaljujući ideji Japanaca da proizvodnju yakulta prenesu u Nizozemsku. Vodeći proizvođač probiotičkih fermentiranih mlijeka u formi *dnevne doze* danas je tvrtka Danone (DanActive u SAD-u) koja na tržište isporučuje proizvod actimel koji uz jogurtnu kulturu sadrži i probiotički soj *L. casei* DN-114. 001 poznat i pod imenom *L. casei* Danone. Probiotička fermentirana mlijeka drugih proizvođača u formi *dnevne doze* poput actimela na europskom su tržištu prisutna u širokom rasponu različitih varijanti od punomasnih do potpuno obranih s ili bez dodatka voća, mogu sadržavati fruktozu ili različita sladila. Vrlo često obogaćena su i mineralima koji potpomažu unos dnevnih potreba organizma za mineralima. Uobičajeno, *dnevne doze* sadrže dodani probiotički soj u količini od $\sim 10^8$ cfu mL⁻¹.

Probiotička kultura koja se koristi u proizvodnji fermentiranih mlijeka, sadrži uglavnom bakterijske sojeve

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* vrsta. Istovremeno, za određene bakterijske sojeve *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta smatra se da imaju dokaziv probiotički učinak na humani organizam. U tablici 7.2. prikazani su najčešće korišteni sojevi *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. izolirani iz humanoga probavnog trakta, koji čine sastav današnjih komercijalnih probiotičkih kultura. Osim toga bakterijski sojevi izolirani iz probavnog trakta u usporedbi s bakterijskim sojevima izoliranima iz mlijeka pokazuju veću rezistentnost na nizak pH i visoku koncentraciju žučnih soli.

U proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka koriste se i druge mikrobne vrste koje nisu nužno prirodni stanovnici humanoga probavnog trakta. Tako se u svojstvu probiotičkih organizama koriste i određeni bakterijski sojevi vrsta: *E. faecalis*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *E. coli* (soj *Nissle*) ili kvasac *Saccharomyces boulardii*. Primjere za mogući izbor i kombinaciju probiotičkih sojeva u proizvodnji komercijalno najpoznatijih fermentiranih mlijeka u svijetu i njihova trgovačka imena prikazuje tablica 7.3.

Tablica 7.3.

Probiotički bakterijski sojevi i trgovačka imena nekih od najpopularnijih probiotičkih fermentiranih mlijeka na svjetskom tržištu

(World Gastro, 2008.)

Bakterijski sojevi

Trgovačko ime

<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12	Bifiene
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align
<i>Bifidobacterium lactis</i> HNo19 (DR10/Howaru)	Howaru Bifido
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 <i>Enterococcus</i> BMK SF 68	Bioflorin
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Actimel
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	DanActive
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431	Kultura
<i>Lactobacillus casei</i> F19	
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATTC 55730	Reuteri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) Iyo	DiarSafe, Ultralevure

Kombinacija sojeva

<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285 i <i>Lactobacillus casei</i> Lbc8or	Bio K+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1	FemDophilus
<i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	
1 soj <i>Streptococcus thermophilus</i>	
4 soja <i>Lactobacillus</i> spp.	VSL#3
3 soja <i>Bifidobacterium</i> spp	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 i <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20	–
<i>Lactobacillus helveticus</i> Ro052 i <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Ro011	A'Biotica
<i>Bacillus clausii</i> O/C, NR, SIN, i T	Enterogermina

7.3.2.1.

Acidofilno mlijeko

Ovisno o načinu proizvodnje, acidofilno mlijeko može biti slatko ili kiselo pa na tržištu postoje dvije varijante tog proizvoda - slatko acidofilno mlijeko i kiselo acidofilno mlijeko. U oba slučaja mlijeko se inokulira bakterijom *L. acidophilus* u formi monokulture. Okus slatkoga acidofilnog mlijeka isti je kao i okus pasteriziranog mlijeka. Naime, u njegovoj proizvodnji izostaje fermentacija a tijekom pohrane proizvoda na niskim temperaturama gotovo i nema acidifikacije

mlijeka. Suprotno, acidofilno kiselo mlijeko proizvodi se fermentacijom mlijeka pa je njegov okus blago kiseli i pripada skupini fermentiranih mlijeka.

Zbog iznimne osjetljivosti korištenja *L. acidophilus* u monokulturi na fag-infekciju i slabe kompetitivnosti s drugim bakterijama, postupak proizvodnje acidofilnog slatkog i kiselog mlijeka zahtijeva intenzivnu toplinsku obradu mlijeka. Za proizvodnju slatkoga acidofilnog mlijeka uobičajeni je postupak proizvodnje:

- intenzivna toplinska obrada mlijeka (2 x 90 °C/20 minuta ili 1 x 140/2 sekunde)
- hlađenje mlijeka na temperaturu od 5 °C

- inokulacija hladnog mlijeka kulturom *L. acidophilus* u koncentraciji od 10^{10} cfu mL⁻¹
- punjenje u prodajnu ambalažu
- hladna pohrana proizvoda do potrošnje na temperaturi od 5 °C.

Uobičajeni postupak u proizvodnji acidofilnog kiselog mlijeka obuhvaća tehnološke operacije:

- obogaćivanje i standardizaciju mlijeka
- homogenizaciju (~ 14 MPa)
- toplinsku obradu (95 °C/60 min)
- hlađenje mlijeka na temperaturu inokulacije (37 °C) na kojoj se ostavi 3 - 4 sata (vrijeme potrebno da se razviju vegetativne stanice sporotvornih bakterija - ako su one bile prisutne u sirovom mlijeku)
- druga toplinska obrada mlijeka radi uništenja eventualno prisutnih vegetativnih stanica sporotvornih bakterija (95 °C/10 - 15 min)
- hlađenje mlijeka na temperaturu inokulacije (37 °C)
- inokulacija tehničkom (3 - 5 %) ili DVI kulturom
- inkubacija: (i) 12 - 16 sati ili do 0,65 % stvorene mliječne kiseline, (ii) 24 sata ili do 1,0 % stvorene mliječne kiseline
- brzo hlađenje na temperaturu od ≤ 5 °C
- pohrana na temperaturi od ≤ 5 °C do potrošnje.

Acidofilno kiselo mlijeko koje se koristi u terapijske svrhe mora sadržavati 5×10^8 cfu *L. acidophilus* mL⁻¹ u vrijeme konzumacije (14 - 21 dan). Finalni proizvod ima pH ~ 5,5 i blago kiselo-opor okus. Zbog toga se acidofilno mlijeko kada dosegne koncentraciju mliječne kiseline 0,65 % - 1,0 g 100 g⁻¹, mora naglo ohladiti na temperaturu ≤ 5 °C i na toj temperaturi pohraniti do potrošnje. Naglim hlađenjem zaustavlja se metabolička aktivnost bakterije *L. acidophilus* za tvorbu mliječne kiseline što osigurava njeno preživljavanje u visokom broju u proizvodu do potrošnje.

U tehnološkom se smislu za bolju konzistenciju proizvoda dobrim pokazalo korištenje monokultura sastavljenih od sojeva *L. acidophilus* koji nemaju sposobnost i onih koji imaju sposobnost tvorbe egzopolisaharida (EPS) u omjeru 4 : 1.

7.3.2.2.

Acidofilno-kvaščevo mlijeko

Acidofilno-kvaščevo mlijeko je fermentirano mlijeko koje se proizvodi u zemljama bivšeg SSSR-a, a prvotno je bilo dizajnirano za terapijsko korištenje u liječenju intestinalnih bolesti i tuberkuloze. Uz bakteriju *L. acidophilus* sadrži laktozu fermentativne kvasce za koje se vjeruje da imaju jako antibakterijsko djelovanje na bakteriju *Mycobacterium tuberculosis*. Prema istraživanjima, najjače antibakterijsko djelovanje acidofilnog-kvaščevog mlijeka je trećeg dana nakon proizvodnje, a potom se ono značajno smanjuje.

Acidofilno-kvaščevo mlijeko proizvodi se od punomasnoga ili obranog mlijeka zagrijanog na 90 - 95 °C/10 - 15 min, koje se potom ohladi na 35 °C i inokulira mješovitom kulturom u količini 3 - 5 %. Kultura se sastoji od odabranih sojeva *L. acidophilus* i laktoza fermentativnih kvasca (*Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*) koji se pripremaju odvojeno. Oba mikroorganizma iz laktoze stvaraju mliječnu kiselinu, a kvasci stvaraju još i etanol i CO₂. Odmah po dodatku kulture fermentacijsko mlijeko puni se u prodajnu ambalažu i započinje prvi stupanj fermentacije na 35 °C tako dugo dok se ne postigne koncentracija mliječne kiseline u proizvodu od 0,8 %. Slijedi druga faza fermentacije na temperaturi 10 - 17 °C tijekom 6 - 12 sati. Gotovi se proizvod do potrošnje pohranjuje na temperaturi < 8 °C u hermetički zatvorenoj ambalaži.

Acidofilno-kvaščevo mlijeko sadrži *L. acidophilus* u prilično velikom broju reda veličine od ~ 6 - 9 x 10⁸ cfu mL⁻¹. Zbog toga je za dobro preživljavanje te bakterije ali i istodobno bolju konzistenciju proizvoda nužno obogaćivanje mlijeka s 1,5 % obranog mlijeka u prahu i 0,5 % agara. Obogaćeno se mlijeko potom toplinski obrađuje na temperaturi od 90 °C/20 min, hladi na temperaturu od 33 ili 37 °C i inokulira kulturom. Fermentacija traje ~ 20 sati. Agar dodan mlijeku tijekom fermentacije sprječava prekomjerno stvaranje CO₂ i bombažu kartonske ambalaže. Konzistencija acidofilnog-kvaščevog mlijeka je lagano viskozna, a

okus mu je blago kiselo-opor uz specifičnu aromu po kvascima. Sadrži oko 0,5 % alkohola i relativno nisku koncentraciju CO₂.

7.3.2.3.

Yakult

Yakult je japansko fermentirano mlijeko koje se već 60 godina proizvodi u Japanu a koristi se za terapijske svrhe. Naime, znanstveniku Minoru Shiroti uspjelo je izolirati intestinalnu bakteriju za koju je vjerovao da može pomoći u održavanju prirodne mikrobne ravnoteže u crijevima. Također, uspio je u njezinoj kultivaciji, a zahvaljujući tome omogućena je proizvodnja yakulta. Danas se zbog pretpostavljenoga terapijskog učinka yakult prodaje u 28 zemalja svijeta.



Slika 7.1.

Karakterističan izgled pakiranja yakulta u bočicama volumena 65 mL (CC BY-SA 3.0.)

Yakult se proizvodi od obranog mlijeka s vrlo niskim udjelom ST (~ 3,7 %), kojem je dodan šećer u količini od ~ 14 %. Mliječna osnova toplinski se obrađuje na temperaturi od 140 °C/2 - 3 s, a zbog visokog udjela dodanog šećera nakon toplinske obrade boja mlijeka postaje svijetlosmeđa (vjerojatno zbog Maillardove reakcije). Mlijeko se inokulira monokulturom koja sadrži probiotički soj *L. casei* Shiota. Fermentacija u sanitarno ekstremno čistim uvjetima traje do 5 dana. Ponekad se proizvodu zbog arome dodaje sok od povrća. Međutim, precizni detalji u tehnologiji

proizvodnje yakulta još uvijek nisu raspoloživi izvan Japana. Na tržištu yakult je dostupan u formi ambalažnih bočica *dnevne doze* volumena od 65 do 100 mL (slika 7.1.). Svaka bočica sadrži više od 10⁸ cfu mL⁻¹ probiotičkog soja *L. casei* Shiota.

7.3.3.

Sposobnost preživljavanja probiotičkih bakterija

Biojogurt kao i sva ostala probiotička fermentirana mlijeka u trenutku konzumacije prema važećem standardu moraju sadržavati najmanje 10⁶ cfu g⁻¹ živih probiotičkih bakterijskih sojeva. Većina probiotičkih sojeva, osobito onih *Bifidobacterium* spp. (osim *B. longum*) i vrste *L. acidophilus*, slabo rastu u mlijeku. Objašnjenje slabog rasta i sposobnosti preživljavanja probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku je u činjenici da mlijeko kao medij nije pogodna sredina za poticanje njihova rasta i razmnožavanja. Zbog toga fermentacija mlijeka korištenjem jedino probiotičkih sojeva *L. acidophilus* ili onih *Bifidobacterium* spp. traje 20-24 sata, a stupanj njihovog preživljavanja u komercijalno dostupnom probiotičkom fermentiranom mlijeku vrlo je često nizak. Za željeno preživljavanje i aktivnost probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku tehnološkim procesima potrebno je uskladiti i optimizirati:

- specifičnost soja i interakciju između vrsta
- koncentraciju inokuluma
- koncentraciju dostupnih nutrijenata, dodanog šećera, promotora i inhibitora rasta
- dužinu trajanja fermentacije
- završnu kiselost proizvoda
- stupanj otopljenosti kisika.

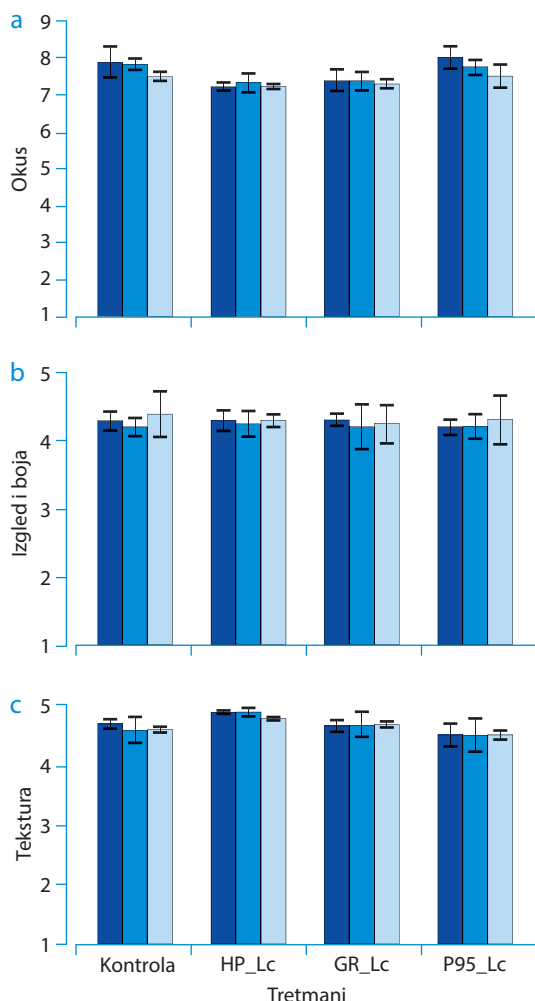
Zbog visoke koncentracije kisika u fermentacijskom mlijeku dodatno se primjerice usporava rast i aktivnost bakterija *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. koje su po svojoj prirodi mikroarofilne ili anaerobne vrste. Tehnološkim operacijama i tijekom pohrane

penetracijom kroz ambalažu kisik lagano može ući i otopiti se u fermentacijskom mlijeku. Potom otopljeni kisik na probiotičke sojeve ima istovremeno direktno i indirektno inhibitorno djelovanje. Direktno, kisik inhibira rast bakterijskih stanica zbog svoje toksičnosti same po sebi. Indirektno inhibitoran učinak kisika na probiotičke sojeve tih bakterijskih vrsta pripisuje se njegovom poticanju stvaranja drugih toksičnih spojeva. Bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ako raste u kokulturi u prisutnosti većih koncentracija kisika tvori visoku koncentraciju mliječne kiseline i vodikov peroksid koji su toksični za te probiotičke sojeve. Zbog toga se bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vrlo često izostavlja iz sastava kultura za proizvodnju AB probiotičkih fermentiranih mlijeka. Istodobno bakterija *S. thermophilus* tijekom fermentacije mlijeka troši prisutan kisik te tako stimulira rast probiotičkih sojeva. U kokulturi za proizvodnju AB probiotičkih fermentiranih mlijeka zbog tog je svojstva bakterija *S. thermophilus* najčešće korištena vrsta. Važno je istaknuti i da određeni sojevi *S. thermophilus* svojim metabolizmom također mogu inhibirati rast bifidobakterija. Neovisno o ostalim poželjnim karakteristikama te sojeve iz proizvodnje onih probiotičkih fermentiranih mlijeka koja sadrže probiotičke sojeve *Bifidobacterium* spp. treba izostaviti.

Usprkos tim činjenicama bakterije *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zbog ubrzavanja fermentacije i tvorbe poželjnih spojeva okusa nužne su u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka. Za ublažavanje mogućih negativnih učinaka bakterija jogurtne kulture na probiotičke sojeve i poboljšanja stupnja njihova preživljavanja, u praksi se najčešće koristi fermentacija mlijeka u dvije faze. Inicijalna fermentacija mlijeka započinje probiotičkom kulturom i traje ~ 2 sata, potom slijedi fermentacija jogurtom kulturom koja traje iduća 4 sata. U periodu inicijalne fermentacije probiotičke bakterije uspijevaju postići svoju kasnu lag-fazu ili početnu log-fazu rasta, koje im omogućavaju da na kraju šesterosatne fermentacije u fermentacijskom mlijeku budu prisutne u dovoljnom broju. Drugi je mogući način sprječavanja gubitka aktivnosti i povećanja stupnja preživljavanja probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku korištenje

ABT kulture (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. i *S. thermophilus*). Korištenjem te kulture bez dodataka nutrijenata mlijeku koji imaju funkciju skraćivanja vremena fermentacije i poboljšavanja stupnja preživljavanja probiotičkih sojeva, fermentacija se mlijeka produžava i traje do 10 sati. Za skraćivanje trajanja fermentacije na ~ 7 - 8 sati i povećanja stupnja preživljavanja probiotičkih bakterijskih sojeva sadržanih u ABT kulturi mlijeko se obogaćuje hidrolizatima kazeina ili proteina sirutke, cisteinom, kvaščevim ekstraktom, glukozom i vitaminima. Dodatak proteina poboljšava preživljavanje bifidobakterija tako da povećava puferni kapacitet mlijeka. Dodatak cisteina (aminokiseline koja sadrži sumpor) mlijeku u koncentraciji od 50 - 250 mg L⁻¹ snižava oksidoredukcijski potencijal mlijeka, te je preživljavanje *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. u probiotičkom fermentiranom mlijeku veće. Istovremeno niži oksido-redukcijski potencijal mlijeka pogoduje boljem rastu *S. thermophilus* čija je posljedica skraćivanje vremena fermentacije.

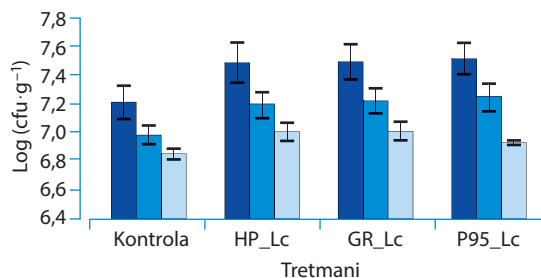
Preživljavanje i aktivnost probiotičkih sojeva u proizvodu i poslije u humanom probavnom sustavu poboljšava se dodatkom prebiotika u mlijeko. Velika većina ostalih prirodno prisutnih intestinalnih bakterija ne može koristiti te ugljikohidrate, te oni u probavnom sustavu postaju promotori rasta probiotičkim sojevima. U proizvodnji niskokaloričnih ili bezmasnih probiotičkih fermentiranih mlijeka (što je vrlo često) prebiotici poput inulina dodaju se i u svojstvu zamjene za mliječnu mast. U tim je slučajevima potrebno izabrati prebiotik koji istodobno svojim svojstvima osigurava poželjna fizikalna i reološka svojstva proizvoda i dobro preživljavanje probiotičkih sojeva. Na primjeru probiotičkog jogurta proizvedenog korištenjem kulture koja sadrži *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i probiotički soj vrste *L. casei* na slici 7.2. prikazan je utjecaj inulina (dugolančanoga, srednjelančanoga i kratkolančanog) na teksturu, okus i izgled proizvoda. Inulin je neovisno o dužini svog oligosaharidnog lanca u proizvodnji jogurta korišten u količini od 1,5 %. Organoleptička svojstva jogurta procijenjena su bodovnom skalom od: 1 - 10 za okus, 1 - 5 za boju i izgled i 1 - 5 za teksturu. Probiotički jogurti s postignutim brojem bodova za okus većim



Slika 7.2.

Prosječne vrijednosti za organoleptička svojstva teksture, izgleda i boje probiotičkog bezmasnog jogurta s dodatkom probiotičkog soja bakterije *L. casei* i inulina.

Detalji: Lc = probiotički soj bakterije *L. casei*; HP = dugolančani, GR = srednedugolančani, P95= kratkolančani inulin dodani u koncentraciji 1,5 %; (a) okus, (b) izgled i boja, (c) tekstura. Simboli: ■ prvi tjedan, ■ drugi tjedan, □ peti tjedan. (Aryana i McGrew, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 7.3.

Prosječan broj preživljavanja probiotičkog soja bakterije *L. casei* u probiotičkom jogurtu proizvedenom uz dodatak inulina praćen tijekom 5 tjedana pohrane.

Detalji: Lc = probiotički soj bakterije *L. casei*, HP = dugolančani, GR = srednedugolančani, P95= kratkolančani inulin dodani u koncentraciji 1,5 %. Simboli: ■ prvi tjedan, ■ drugi tjedan, □ peti tjedan. (Aryana i McGrew, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

od 7, za boju i izgled većim od 4 i za teksturu većim od 4,5, kako se smatra, imaju poželjne karakteristike proizvoda. Preživljavanje probiotičkog soja vrste *L. casei* u jogurtu mjereno tijekom 5 tjedana prikazano je slikom 7.3.

Rezultati prikazani na slikama 7.2. i 7.3. jasno pokazuju različit učinak inulina na mjerene osobine, ovisno o njegovoj strukturalnoj građi. Drugim riječima, u usporedbi s kontrolnom skupinom jogurta kratkolančani inulin (P95) ima najslabiji učinak na stupanj preživljavanja probiotičkog soja bakterije *L. casei*. Istodobno, kratkolančani inulin (P95) pokazuje najpovoljniji utjecaj na okus. Suprotno, u razdoblju mjerenja dugolančani inulin pokazao se najpovoljnijim za oblikovanje teksture i preživljavanje probiotičkog soja bakterije *L. casei* u jogurtu. Zbog toga je u proizvodnji simbiotičkih fermentiranih mlijeka, osobito njihovih bezmasnih varijanti, potrebno izabrati oblik i vrstu prebiotika koji istodobno osiguravaju: (i) prihvatljiva organoleptička svojstva i (ii) minimalno potreban stupanj preživljavanja probiotičkog soja od 10^6 cfu mL⁻¹.

U kontekstu stupnja preživljavanja probiotičkih sojeva *Bifidobacterium* spp. u probiotičkom fermentiranom mlijeku i njihove kasnije aktivnosti u probavnom traktu važno je istaknuti i činjenicu da svi sojevi ne pokazuju istu tolerantnost na koncentracije žučnih soli i kiselost sredine. Najtolerantniji su sojevi *B. longum*, a manje su tolerantni sojevi *B. infantis*, *B. adolescentis* i *B. bifidum*. Suprotno, probiotički soj podvrste *B. animalis* subsp. *animalis* u usporedbi s ostalim probiotičkim sojevima *Bifidobacterium* spp. pokazuje najbolji rast u fermentiranom mlijeku i najveću toleranciju na pH-želuca i koncentraciju žučnih soli. Također, zbog iznimne osjetljivosti probiotičkih sojeva na kisik, kao ambalaža staklene su se boce za njihovo preživljavanje u proizvodnji pokazale boljima u odnosu na plastičnu ambalažu.

7.4.

Preventivni i terapijski učinci

7.4.1.

Humana crijevna mikrobiota

U cilju potpunijeg razumijevanja probiotičkog i prebiotičkog koncepta u humanoj prehrani, bez svake je sumnje potrebno poznavati osnovnu strukturu i funkciju prirodne crijevne mikrobne populacije.

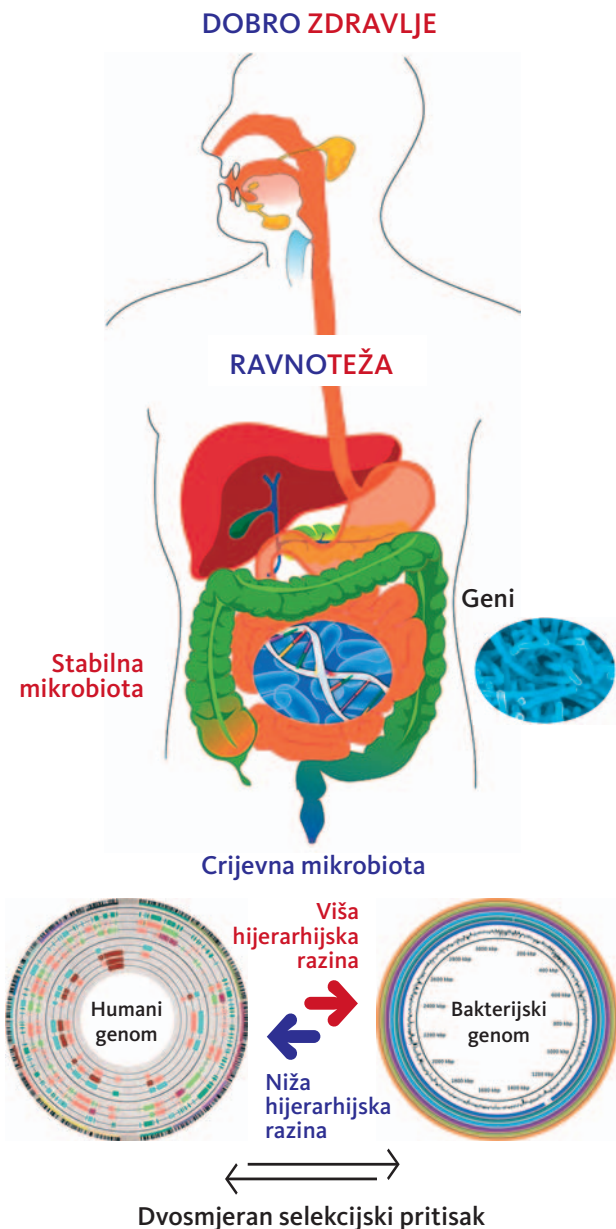
Prema današnjim spoznajama, humani gastrointestinalni sustav sastoji se od približno 100 trilijuna (10^{14}) mikroba, od kojih su većina bakterije koje su s domaćinom razvile simbiotski odnos. Mikrobna zajednica ili mikrobiota humanoga probavnog sustava sadrži više od 1000, a prema nekim pretpostavkama i do 10.000 različitih vrsta. Od pretpostavljenog broja, dosad je opisano više od 1800 rodova i više od 300 različitih mikrobnih vrsta. Drugim riječima, u ljudskom

organizmu broj je bakterija barem 10 puta veći od broja njegovih tjelesnih stanica. Uzimajući u obzir i činjenicu da je istraživanje ljudskog genoma otkrilo da humani organizam određuje približno 23.000 gena, ne čudi opravdana i već nekoliko godina prihvaćena paradigma da čovjekovu cjelovitu prirodu zapravo određuje njegov metagenom. Važno je istaknuti i činjenicu da je od ukupnog broja humanih gena njih 37 % homologno s bakterijskim i genima arheja, a sljedećih 28 % s jednostaničnim eukariotskim organizmima.

Humani probavni sustav prije rođenja je sterilan, ali odmah nakon rođenja započinje kolonizacija crijeva bakterijama iz okoliša. Zbog toga je humana mikrobiota u prvim danima života određena načinom poroda (prirodni ili carski rez) i hranjenja (majčino mlijeko ili dojenačka formula), i razinom higijene u rađaonici. Tako neovisno o načinu hranjenja, intestinalni sustav novorođenčeta unutar prva dva dana nakon rođenja naseljavaju koliformne bakterije, laktokoki, enterokoki, klostridije i laktobacili. Od trećega do četvrtog dana počinju se pojavljivati bifidobakterije koje u crijevima oko petog dana postaju dominantnom populacijom. Procijenjeni broj bifidobakterija u crijevima novorođenčeta hranjenog majčinim mlijekom petog dana nakon rođenja reda je veličine 10^{10} - 10^{11} cfu g^{-1} . U odnosu na ostale bakterijske vrste, one čine 25 % ukupne intestinalne mikrobne populacije. Povećanjem broja koliformnih bakterija, laktokoka, enterokoka i ostalih za organizam štetnih bakterija na razinu nižu od 1 %. Istodobno, za usporedbu u intestinalnoj je populaciji novorođenčadi hranjenih dojenačkom formulom broj bifidobakterija petog dana nakon poroda niži za jednu log jedinicu (10^9 - 10^{10} cfu g^{-1}), a broj ostalih prvotno naseljenih bakterija veći od 1 %. U smislu brojnosti smatra se da su zapravo bifidobakterije i laktobacili prvi dominantni kolonizatori crijeva koji imaju sposobnost modulacije ekspresije gena domaćina. Drugim riječima u interakciji s domaćinom te su bakterije sposobne inicirati prve uvjete koji onemogućavaju rast drugih nepoželjnih bakterija. Istodobno, ti novostvoreni uvjeti u probavnom sustavu potiču njihov rast i razmnožavanje te one mogu potisnuti rast patogenih bakterija.

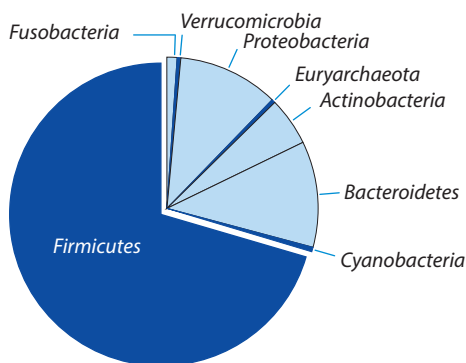
Nakon prestanka hranjenja majčinim mlijekom ili dojenačkom formulom i s godinama života čovjeka, mikrobiota gastrointestinalnog sustava postupno se mijenja. Tako je postotna zastupljenost bifidobakterija u crijevnoj mikrobnj populaciji zdrave odrasle osobe približno 3 %, a dječja vrsta *B. bifidum* zamijenjena je vrstama *B. longum* i *B. adolescentis*. Neovisno o tim promjenama mikrobna je populacija u zdravih odraslih osoba uvijek u ravnoteži i prilično je stabilna. Struktura i sastav mikrobiote humanog probavnog trakta tijekom života svakog pojedinca određeni su prirodnom dvosmjernom selekcijom na razini domaćina i mikroba. Na razini domaćina ona teče u smjeru favoriziranja stabilne mikrobne zajednice koja ima visoki stupanj funkcionalnosti. Suprotno, na razini mikroba pritisak selekcije usmjeren je na razvitak funkcionalno specijaliziranih mikrobnih stanica. Dvosmjerni selekcijski pritisak između humanog organizma i crijevne mikrobiote temelji se na hijerarhijskoj teoriji i ekološkim principima. Prema hijerarhijskoj teoriji, viša razina ograničava moguća organizacijska rješenja na nižoj razini. Pritom ekološki principi na razini domaćina pretpostavljaju da će selekcija ići u smjeru razvitka funkcionalnosti koja dovodi do razvitka zajednice različitih mikrobnih vrsta, čiji genomi sadrže funkcionalno slične gene. Sljedeća je pretpostavka učinka dvosmjerne selekcije pojava i razvitak brojnih mikrobnih mehanizama za horizontalni prijenos gena. Natjecanje unutar mikrobiote dovodi do selekcije specijaliziranih genoma s funkcionalno različitim genima za bakterijsku metaboličku aktivnost. Jednom uspostavljena *nova* povezanost između osobina različitih mikroba može se održavati novostvorenim barijerama za homolognu rekombinaciju gena. Odnosno, međusobnim je zajedničkim djelovanjem između domaćina i mikroba unaprijeđena funkcionalna stabilnost toga kompleksnog ekosustava (slika 7.4.).

Mikrobiota humanoga intestinalnog trakta s približno 10^{14} mikroba predstavlja jednu od mikrobnj najnaseljenijih ekosustava u prirodi. Iznenađujuće, usprkos brojnosti čini je relativno niska razina mikrobne filogenetičke bioraznolikosti. Na temelju je



Slika 7.4.

Pojednostavljeni shematski prikaz dvosmjernoga selekcijskog pritiska na razini domaćina i mikroba u oblikovanju crijevne mikrobiote.



Slika 7.5.

Relativna proporcija zastupljenosti pojedinih filogenetskih mikrobnijskih koljena unutar humane crijevne mikrobiote. (Candela i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

16S rRNA sekvencijske analize gena utvrđeno da se humana mikrobiota pretežno sastoji od bakterijskih vrsta koje taksonomski čine samo 8 od danas poznatih 70 različitih bakterijskih koljena. Unutar tih 8 filogenetskih koljena bakterijske vrste koje pripadaju koljenu *Bacteroidetes* i koljenu *Firmicutes* zajedno čine 90 % ukupne mikrobne populacije humanog intestinalnog sustava (slika 7.5.).

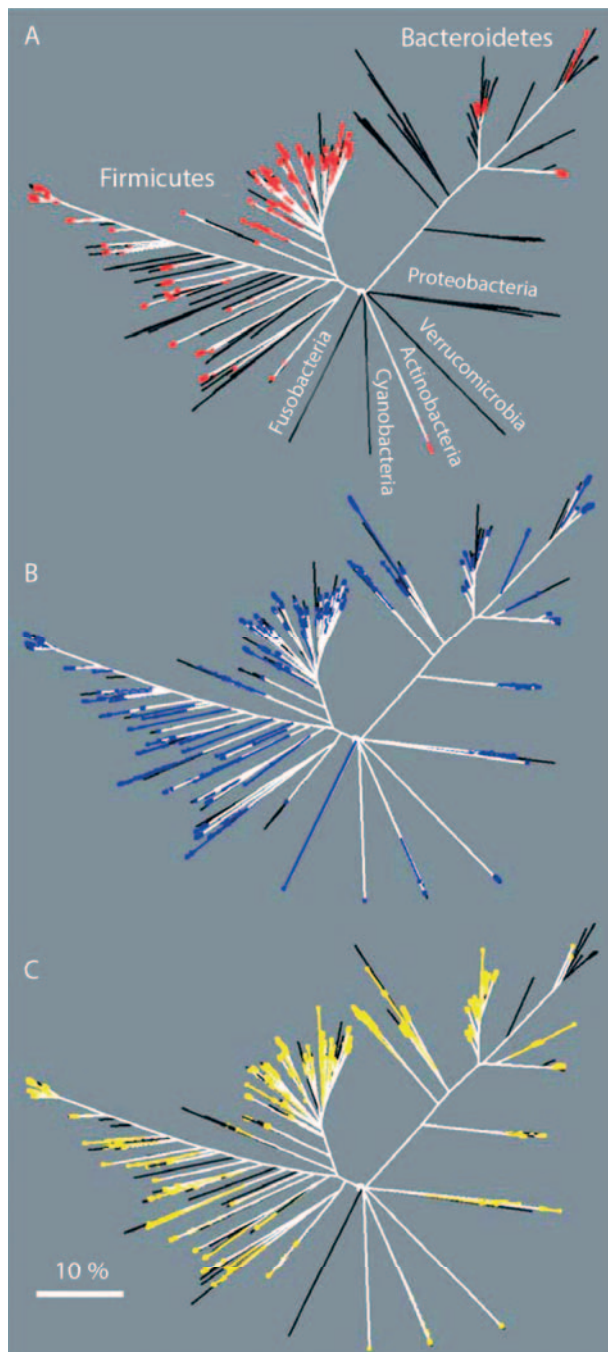
U humanom probavnom traktu odraslih zdravih osoba, ali u daleko manjem broju, prisutne su i vrste koje pripadaju domeni Archaea. Između vrsta iz domene Archaea najzastupljeniji je organizam *Methanobrevibacter smithii*. Ipak, omjer je zastupljenosti pojedinih mikrobnijskih vrsta u humanom gastrointestinalnom sustavu primarno određen pojedincem kao individualnom jedinkom. Za ilustraciju te tvrdnje na slici 7.6. prikazana je varijabilnost mikrobiote kolona triju zdravih osoba.

Dvosmjernim selekcijskim pritiskom uspostavljena uravnotežena mikrobiota potiče ekspresiju različitih gena domaćina koji utječu na: (i) apsorpciju nutrijenata i metabolizam, (ii) angiogenezu i zaštitnu funkciju mukozne sluznice crijeva i (iii) razvitak gastrointestinalnoga živčanog sustava. Povrh toga, bakterijskim komenzalizmom uvjetovanim simbiotskim

odnosom u crijevima nastaju uvjeti koji osiguravaju normalan razvitak i funkciju mukoznog imunskog sustava. Odnosno, dvosmjernom selekcijom omogućena je osnovna funkcija crijevne mikrobiote u zaštiti crijeva od kolonizacije patogenim bakterijama iz okoliša i potencijalno štetnih udomaćenih mikrobnijskih vrsta. Za tu je svrhu crijevna mikrobiota selekcijskim pritiskom razvila nekoliko mehanizama, koji uključuju direktnu kompeticiju za limitirane nutrijente i modulaciju imunskog odgovora domaćina. Također, dvosmjernom je selekcijom unutar prirodne mikrobne zajednice uspostavljen aktivan metabolizam koji je istodobno adaptabilan i obnovljiv. Prisutne bakterije stvaranjem kratkolančanih masnih kiselina pozitivno utječu na diferencijaciju i proliferaciju epitelnih stanica ili posreduju u drugim metaboličkim reakcijama. Kompleksna bakterijska metabolička aktivnost između ostalog obnavlja i tjelesno vrijednu energiju i apsorbira supstrate za domaćina, a istodobno osigurava energiju i nutrijente za vlastito razmnožavanje. Na temelju dosadašnjih istraživanja raspoloživo je i dovoljno dokaza koji pretpostavljaju da je bakterijska metabolička aktivnost u intestinalnom sustavu najodgovornija za održavanje čovjekove normalne tjelesne težine.

Kiseline, žučne soli i sekret pankreasa sprječavaju kolonizaciju bakterija u želucu i proksimativnom dijelu tankog crijeva, a koncentracija kisika određuje dominantne mikrobne vrste (slika 7.7.)

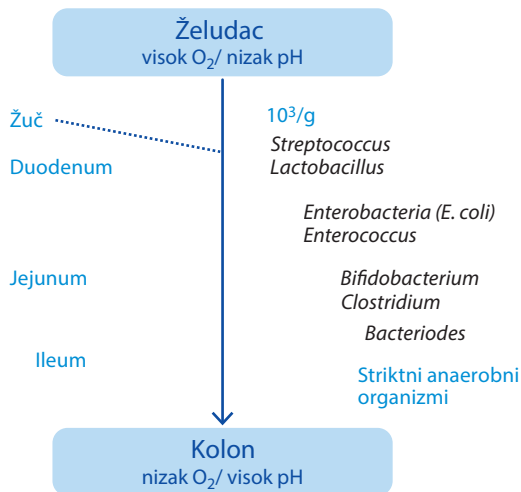
Gustoća bakterija povećava se u distalnom dijelu tankog crijeva i u debelom crijevu. Tako je ona reda veličine $10^{11} - 10^{12} \text{ g}^{-1}$ suhe tvari sadržaja debelog crijeva i čini do 60 % fekalne mase. Osim razlika u bakterijskom brojčanom omjeru i vrstama uzduž osi probavnog sustava, mikrobna se populacija međusobno razlikuje i ovisno o mjestu na kojem se nalazi u crijevima. U tom je smislu omjer anaerobnih u odnosu na aerobne bakterije na mukoznoj površini manji od onog u lumenu crijeva. Prikaz najčešće zastupljenih bakterijskih anaerobnih i aerobnih rodova u gastrointestinalnom sustavu i njihovu brojčanu zastupljenost uzduž osi probavnog sustava, i funkciju intestinalne mikrobiote objedinjuje slika 7.8.



Slika 7.6.

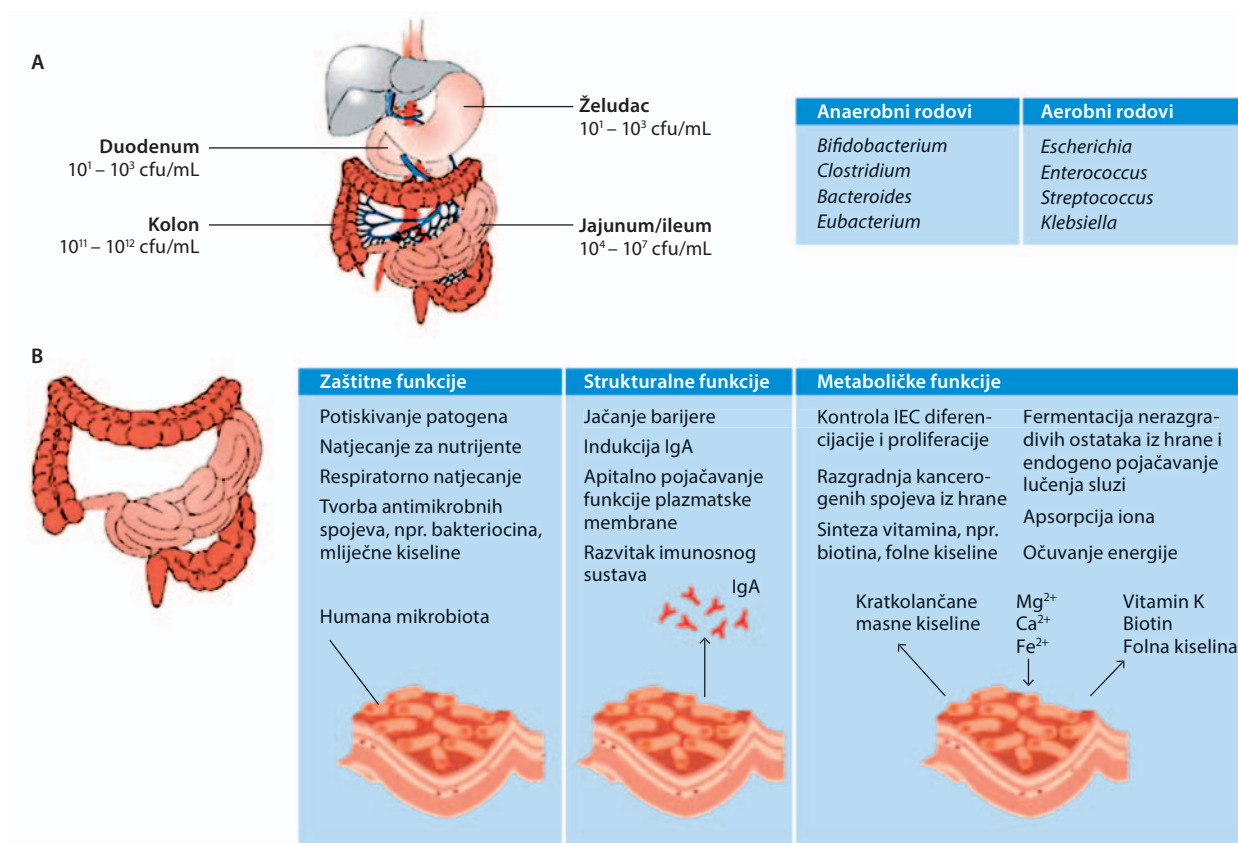
Mikrobiota kolona triju zdravih osoba.

Detalji: svako stablo (A, B, C) predstavlja mikrobiotu kolona triju odraslih osoba. Unutar stabla grane obojene crveno, plavo i žuto predstavljaju jedinstvenu različitost mikrobiote kolona karakterističnu za pojedinca, a grane obojene bijelo predstavljaju zajedničke mikrobnne vrste koje dijele sve tri osobe. Crne grane stabla predstavljaju različitost koja nije utvrđena za određenog pojedinca. Pojedinaac B (plavo) ima najveću različitost mikrobnog sastava kolona i prisutnost *Methanobrevibacter smithii* (Archaea). Pojedinaac C (žuto) ima srednju različitost mikrobnog sastava kolona, ali sadrži i *Methanobrevibacter smithii*. Pojedinaac A (bijelo) ima najmanju različitost mikrobnog sastava kolona i ne sadrži *Methanobrevibacter smithii*. Filogenetsko stablo sačinjeno je na temelju ukupnih podataka za 16S rRNA bakterijske sekvence (n = 11831). (Ley i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 7.7.

Zastupljenost dominantnih mikrobnih rodova u tankom crijevu ovisno o pH-vrijednosti i koncentracije kisika. (Shigwedha i Jia, 2013., CC BY 3.0.)



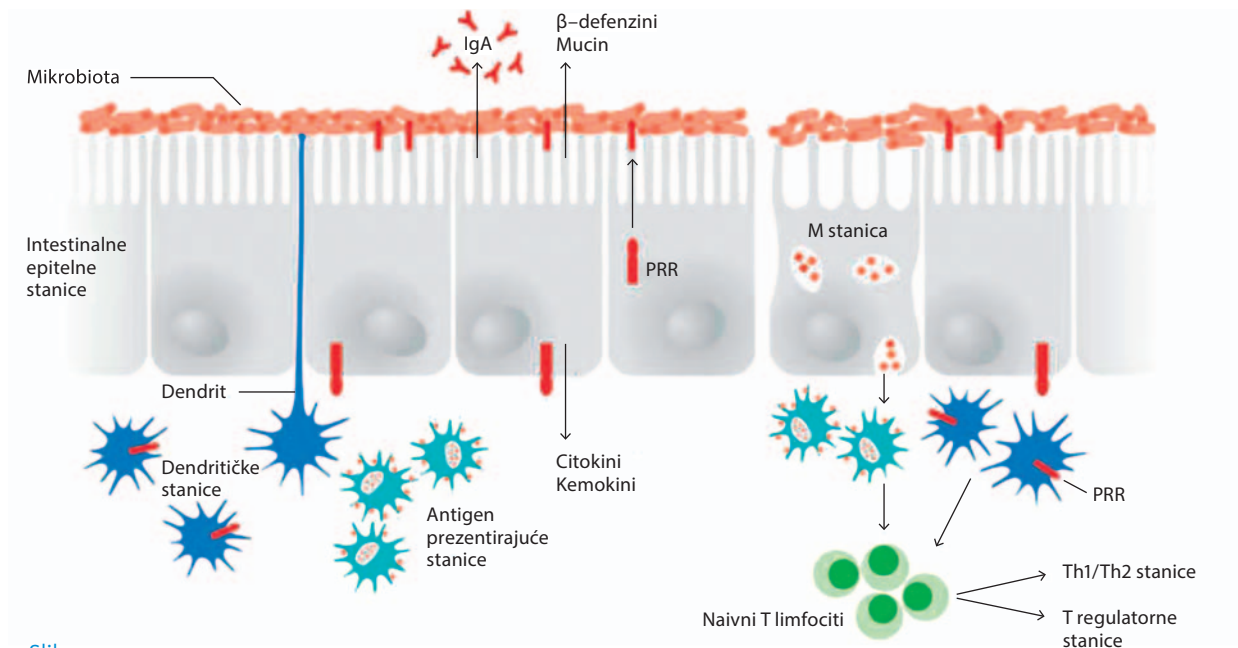
Slika 7.8.

Raspoređenost i funkcija mikrobiote humanoga probavnog trakta.

Detalji: (A) brojčana zastupljenost bakterija uzduž osi probavnog trakta i prikaz najčešće zastupljenih bakterijskih anaerobnih i aerobnih rodova, (B) zaštitna, strukturalna i metabolička funkcija intestinalne mikrobiote. (O'Hara i Shanahan, 2006., s dopuštenjem izdavača Wiley -VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.)

Interakcija između domaćina i crijevne mikrobiote domaćinu osigurava: (i) jasno razlikovanje prirodne mikrobiote od povremeno prisutne patogene populacije i (ii) preciznu regulaciju potrebnoga imunskog odgovora. Tako je u smislu potrebnoga imunskog odgovora epitelna sluznica probavnog trakta preko uglavnom triju glavnih vrsta imuno osjetnih stanica prva obrambena linija za obranu domaćina od patogenih bakterija (slika 7.9.). Najprije površinski enterociti kao povezni senzori prepoznaju opasnost unutar

crijevnog okruženja. Odmah nakon toga počinju se lučiti kemokini i citokinini koji su znak za uzbunu prirođenom i stečenom imunitetu za imunski odgovor na inficirano mjesto. Potom limfatične specijalizirane M stanice, koje su raspoređene unutar samog epitela, prenose bakterijske antigene na susjedne dendritičke i druge antigen prezentirajuće stanice, koje preko mezenteričnih limfnih čvorova potiču lučenje T limfocita. Spособnost imuno osjetnih stanica za raspoznavanje patogene vrste između vrsta prirodne



Slika 7.9.

Imunosno prepoznavanje intestinalne populacije.

Detalji: enterociti na površini luče više imuno medijatora, poput antibakterijskih peptida, imunoglobulina (IgA), kemokina i citokina kao imunosni odgovor na strane antigene. Specijalizirane epitelne stanice (M stanice) prenose antigene na antigen prezentirajuće stanice koje ih dalje prenose do naivnih stanica T limfocita. Dendritičke antigen prezentirajuće stanice preko mezenteričnih limfnih čvorova potiču lučenje T limfocita. PRR receptori kao medijatori nastali nakon prepoznavanja antigena od strane enterocita i dendritičke prezentirajućih stanica posreduju u oblikovanju imunskog reagiranja ili tolerancije kroz lučenje efektornih ili regulatornih T limfocita (O’Hara i Shanahan, 2006., s dopuštenjem izdavača Wiley-VCH Verlag, GmbH and Co. KGaA.)

mikrobiote koordinirana je specifičnim receptorima za prepoznavanje uzorka mikrobnih specifičnih molekula. Specifični receptori su mali signalni proteini prirođenog imunskog sustava obično smješteni na staničnoj membrani koji nakon prepoznavanja specifičnih molekula patogenih bakterija posreduju u imunskom odgovoru organizma. Naime, svi specifični receptorni sustavi domaćina imaju ključnu ulogu u imuno staničnoj aktivaciji i imunskom odgovoru na bakterijski antigen, poput lipopolisaharida, teikoične kiseline ili specifičnih bakterijskih proteina.

7.4.2.

Probiotici, prebiotici i simbiotici

Stres, neredovita i neuravnotežena prehrana uz posljedice nastale zbog gastrointestinalnih bolesti, uzimanja lijekova - prvenstveno antibiotika, steroida i hormona ili terapije zračenjem smatraju se najčešćim razlogom disbalansa crijevne mikrobiote. Disbalans u crijevnoj mikrobnj populaciji ali rjeđe može biti uzrokovan i prirođenom genetičkom preosjetljivošću

određenog broja osoba. Osim toga, problem konstipacije kao posljedice narušavanja ravnoteže crijevne mikrobne populacije često je prisutan u starijih osoba. Posljedično tome narušena ravnoteža unutar crijevne mikrobiote postaje direktno ili indirektno uzrok pojave različitih bolesti. Drugim riječima, mikrobna ravnoteža crijevne populacije ključna je za zdravlje domaćina jer: *"Bolest je obično rezultat neuvjerljivog pregovaranja o simbiozi, prekoračenju linije jedne ili druge strane u biološkom smislu interpretacije granice"*.

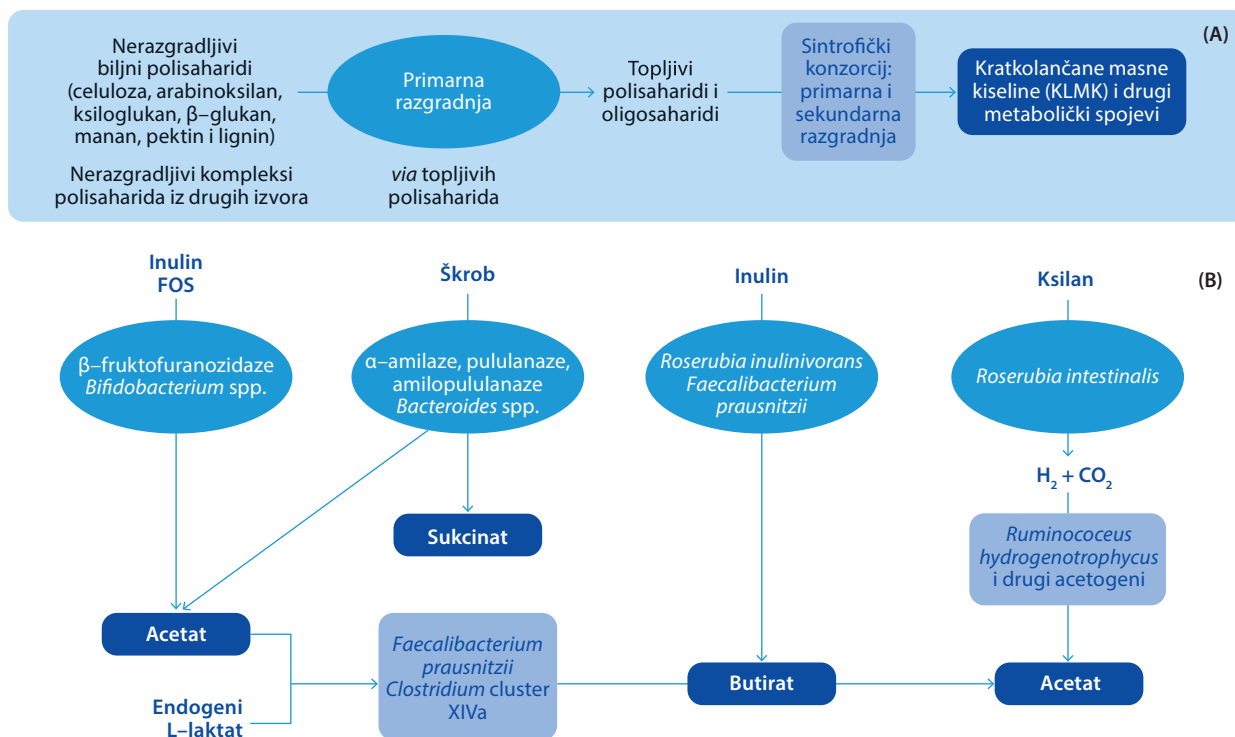
Neovisno o uzroku, disbalans crijevne mikrobiote u većini je slučajeva povezan sa smanjenjem broja laktobacila i bifidobakterija u ukupnoj mikrobnoj crijevnoj populaciji. Upravo se na toj činjenici temelji mogući preventivni ili terapijski učinak probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka na ljudski organizam. Naime, probavni je sustav najveći imunosan organ u ljudskom organizmu i njegova metabolička aktivnost ekvivalentna je ulozi koju za organizam imaju jetra. Zbog toga ne čude brojne znanstveno potvrđene činjenice da je dobro zdravlje čovjeka određeno crijevnom mikrobnom ravnotežom i njenom potencijalno pozitivnom modulacijom unosom hrane koja se fermentira u debelom crijevu. Iz toga proizlazi da aktivnost i mikrobni sastav crijevne mikrobiote u humanom intestinalnom sustavu tijekom života svakog čovjeka određuju:

- dostupnost nutrijenata
- fizikalno-kemijska svojstva nutrijenata
- vrijeme zadržavanja nutrijenata u crijevima
- pH u lumenu crijeva
- dob domaćina
- razina perifernog imuniteta
- individualna bakterijska fermentacijska sposobnost
- bakterijska sposobnost stvaranja metabolita.

U tom smislu, mogući preventivni ili terapijski učinak probiotičkih sojeva sadržanih u mlijeku temelji se na njihovoj pomoći u razgradnji onih nutrijenata unesenih hranom u organizam koji su dostupni za fermentaciju u debelom crijevu. Tako u proksimativnom dijelu kolona različite simbiotski povezane bakterijske vrste primarno razgrađuju nerazgradljive

polisaharide u topljive oligosaharide i kratkolančane masne kiseline. Od razgradnjom ugljikohidrata nastalih kratkolančanih masnih kiselina u dominantnoj koncentraciji nastaju octena, propionska i maslačna kiselina. Propionska kiselina prenosi se u jetra gdje služi za glukoneogenezu, a octenu kiselinu kao izvor energije koriste mnogi organi u tijelu domaćina. Maslačna kiselina se uglavnom oksidira u epitelnim stanicama kolona. Povećanjem koncentracije kratkolančanih masnih kiselina snižava se pH vrijednost u lumenu crijeva, te nastaju nepovoljniji uvjeti za njegovu kolonizaciju patogenim bakterijama. Niža pH-vrijednost u lumenu crijeva smanjuje sekreciju i žučnih kiselina i aktivnost specifičnih proteolitičkih enzima. Važna je uloga stvorenih kratkolančanih masnih kiselina i u stimuliranju proliferacije i diferencijacije epitelnih stanica u debelom crijevu. Kratkolančane masne kiseline imaju i određeni antiupalni kapacitet te je velika vjerojatnost da sudjeluju u prevenciji nastanka nekih od patoloških stanja u organizmu, poput ulceroznog kolitisa ili kancerogeneze kolona. U distalnom dijelu kolona udjel raspoloživih ugljikohidrata u odnosu na protein znatno je niži te dominantnu mikrobnu populaciju čine proteolitičke bakterije. One svojim proteolitičkim anarobnim metabolizmom osim kratkolančanih i razgranatih masnih kiselina stvaraju i za organizam potencijalno toksične spojeve poput amonijaka, amina, fenola ili indola. Mikrobna proteoliza povećava i pH u lumenu crijeva bliže neutralnim vrijednostima te sredina postaje pogodnijom za rast potencijalno patogenih bakterija. Utvrđeni način metaboličke aktivnosti sintrofičnih bakterijskih vrsta smještenih u proksimativnom dijelu kolona koje posjeduju specifične enzime koje ne dijele s ostalim vrstama unutar crijevne mikrobiote prikazuje slika 7.10. Istodobno nastali krajnji produkti njihove primarne fermentacije polisaharida služe ostalim vrstama crijevne mikrobiote za lako dostupan izvor energije.

Istraživanja metabolizma prirodne humane mikrobiote intestinalnog sustava, i ostvareni rezultati za osobine i svojstva BMK i bifidobakterija na molekularnoj razini, najzaslužniji su za danas općeprihvaćen probiotički i prebiotički koncept u ljudskoj prehrani. Dodatkom probiotičkih bakterijskih sojeva,



Slika 7.10.

Utvrđena metabolička aktivnost bakterijskog konzorcija u humanom ekosustavu kolona.

Detalji: (A) primjer glavnoga bakterijskoga metaboličkoga puta razgradnje oligosaharida i (B) bakterijskoga simbiotičkoga mehanizma korištenja krajnjih produkata razgradnje. (Candela i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

prebiotika ili jednih i drugih fermentiranom mlijeku prvenstveno se želi stimulirati saharolitička, a istodobno limitirati proteolitička aktivnost u debelom crijevu. Analitičkim metodama moguće je identificirati i različite biomarkere preko kojih se može pouzdanije i točnije procjenjivati njihov potencijalni preventivni ili terapijski učinak na humani organizam. Tako se preventivna ili terapijska uloga probiotika i prebiotika može izraziti kroz njihovo višestruko djelovanje na humani organizam:

- jačanje prirodne stanične aktivnosti
- poboljšanje imunostnog sustava kroz sintezu i biodostupnost nutrijenata

- smanjenje ili prevenciju upalnih reakcija
- smanjenje simptoma intolerancije na laktozu
- prevenciju alergijskih simptoma u osjetljivih osoba
- ublažavanje simptoma iritabilnog crijeva (SIC*) [SIC* je kronični, ponavljajući poremećaj karakteriziran simptomima bolova u donjem dijelu trbuha, poremećajem defekacije, nadutošću i odsutnošću organske bolesti]
- smanjenje simptoma upalnih bolesti crijeva (Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, divertikulitis, nekrozni enterokolitis ili karcinom kolona)
- prevenciju razvitka tumora debelog crijeva

- smanjenje simptoma urogenitalnih i vaginalnih infekcija, te *Helicobacter pylori* želučanih infekcija
- prevenciju nastanka zubnog karijesa
- prevenciju bolesti srca kroz kontrolu razine kolesterola u krvi
- poboljšanje mentalnog zdravlja.

Točan fiziološki mehanizam probiotičkog i prebiotičkog djelovanja na humani organizam nije objašnjen. Glavni su razlozi tome: (i) kompleksnost gastrointestinalnog ekosustava sama po sebi, (ii) brojnost potencijalnih bakterijskih sojeva s probiotičkim učincima od kojih se neki mijenjaju njihovim uzgojem u kulturi i (iii) različita strukturna građa unutar skupine prebiotika. Vrlo je teško provoditi i klinički relevantne studije budući da je intestinalna mikrobiota svakog pojedinca određena rođenjem i promjenama s godinama života. Unatoč tome probiotičko ili prebiotičko djelovanje na humani organizam na razini današnjeg znanja moguće je objasniti sljedećim međusobno nedjeljivim teorijama:

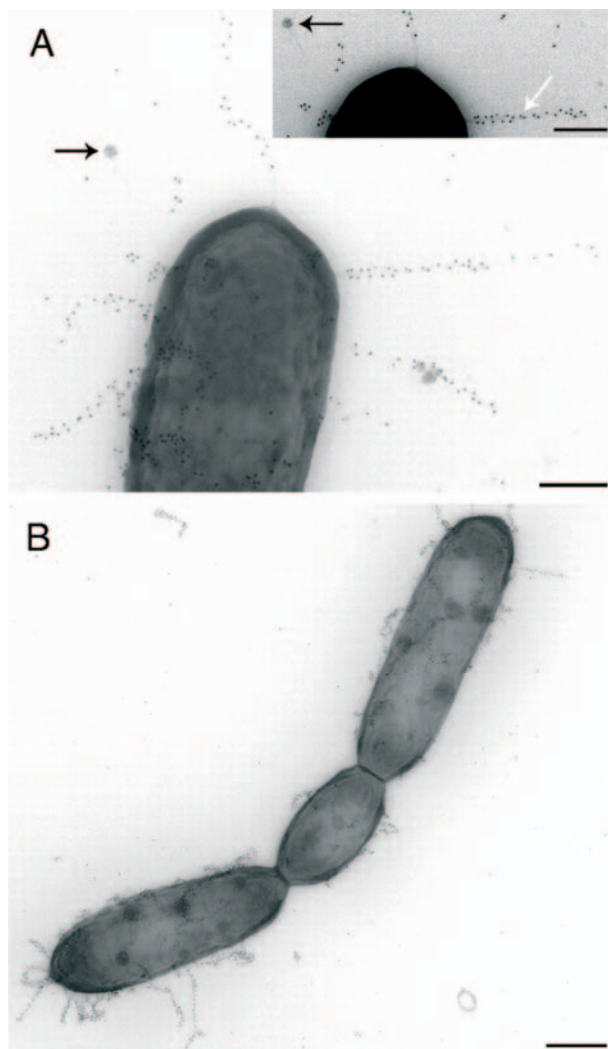
- inhibicijom rasta nepoželjnih mikroorganizama
- modifikacijom metaboličkih procesa u probavnom sustavu
- stimulacijom imunskog sustava domaćina.

Teorija sposobnosti inhibicije rasta nepoželjnih mikroorganizama temelji se na činjenici da gotovo svi probiotički bakterijski sojevi koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka imaju sposobnost tvorbe određenih vrsta antimikrobnih spojeva poput organskih kiselina ili bakteriocina. Organske kiseline octena, mliječna, piruvična, citronska, orotična, hipurinska ili maslačna u nedisociranom obliku ulaze u stanicu patogene bakterije. Posljedično tome snižavaju intercelularni pH pa je rast patogene bakterije usporen ili potpuno zaustavljen. Djelovanje bakteriocina u inhibiciji rasta u intestinalnom sustavu nepoželjnih patogenih bakterija, kako se pretpostavlja, je dvojako. U određenim dijelovima crijeva bakteriocini mogu imati samo selektivni inhibicijski učinak koji posljedično omogućava povećanje probiotičke funkcionalnosti intestinalnim BMK i bifidobakterijama za inhibiciju prisutnih patogenih bakterija. S druge

strane bakteriocini različitim mehanizmima poput lize bakterijske stanice ili slabljenja potencijala membrane i smanjenja intercelularne koncentracije ATP imaju direktan inhibicijski učinak na rast patogenih bakterija. Za ilustraciju snažnog direktnog inhibicijskog učinka na patogene bakterije prisutne u crijevima dobar su primjer probiotički sojevi bakterije *L. rhamnosus* koji imaju sposobnost tvorbe pet kemijski različitih antimikrobnih spojeva koji inhibiraju rast *Salmonella* spp. i mnogih drugih patogenih vrsta u rasponu pH-vrijednosti od 3 do 5.

Modifikacija metaboličkih procesa u intestinalnom sustavu temelji se na teoriji bolje bakterijske sposobnosti probiotičkih sojeva u natjecanju za: (i) hranjive supstrate osobito u prisutnosti prebiotika i (ii) mjesta vezanja za receptore na crijevnom epitelu. Komponente vanjske bakterijske stijenke, poput egzopolisaharida ili površinski stanično vezanih proteina - adhezina, omogućavaju probiotičkim sojevima prihvaćanje za intestinalne stanice crijeva. Nakon prihvaćanja, te bakterije mogu ostvariti brojne specifične interakcije s ostalim bakterijskim vrstama unutar crijevne mikrobiote. Za ilustraciju bolje sposobnosti probiotičkih sojeva kolonizaciji crijeva u usporedbi s neprobiotičkim sojevima, na slici 7.11. prikazani su pili bakterije *L. rhamnosus* ATCC 53103 (GG) koji dodatno pomažu njezinu prihvaćanju na receptorska mjesta u crijevnom epitelu. Na vrhu ali i sporadično kroz cijelu strukturu pila smješteni su specifični adhezijski proteini (Spa C-pilin). Zanimljivo, iako je *L. rhamnosus* (GG) od svih poznatih probiotičkih bakterijskih sojeva znanstveno najviše istraživana bakterija postojanje Spa C-pilina na njenim pilima otkriveno je tek 2009. godine korištenjem imuno-zlatnoga elektronskog mikroskopa.

Modifikacija metaboličkih procesa ostvaruje se u interakciji s vrstama crijevne mikrobiote preko "teorije različitih mehanizama". U užem smislu ta teorija podrazumijeva aktivaciju poželjnih i inaktivaciju nepoželjnih enzima koji sudjeluju u degenerativnim procesima u organizmu. Aktivacijom poželjnih i susprezanjem aktivnosti nepoželjnih metaboličkih enzima uzrokovano djelovanjem probiotičkih bakterijskih sojeva u kolonu se značajno: (i) smanjuje aktivnost fekalnih enzima β -glukuronidaze, nitroreduktaze i azoreduktaze, i



Slika 7.11.

Prikaz pila na staničnoj stijenci bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, na kojima je na vrhu smješten specifični antigen protein-pilin, koji omogućava prihvaćanje bakterije za sluznicu crijeva.

Detalji: (A) konjugirane zlatne čestice (10 nm) negativno obojene i snimljene transmisivskim elektronskim mikroskopom, prikaz pila i izometričkog bakteriofaga (crna strelica) snimljenih elektronskim mikroskopom. Umetnuta slika predstavlja bolji kontrastni prikaz između tamnih i svijetlih područja da se lakše uoči struktura pila (bijela strelica). (B) Prikaz pila smještenih na polovima stanice. (Kankainen i sur., 2009., s dopuštenjem PNAS-a.)

koncentracija slobodnih amina u fecesu i (ii) povećava aktivnost antitoksikativnih enzima kao i koncentracija bioaktivnih kiselina antikancerogenih svojstava. Tako se njihova sposobnost prevencije karcinoma debelog crijeva objašnjava sljedećim mehanizmima:

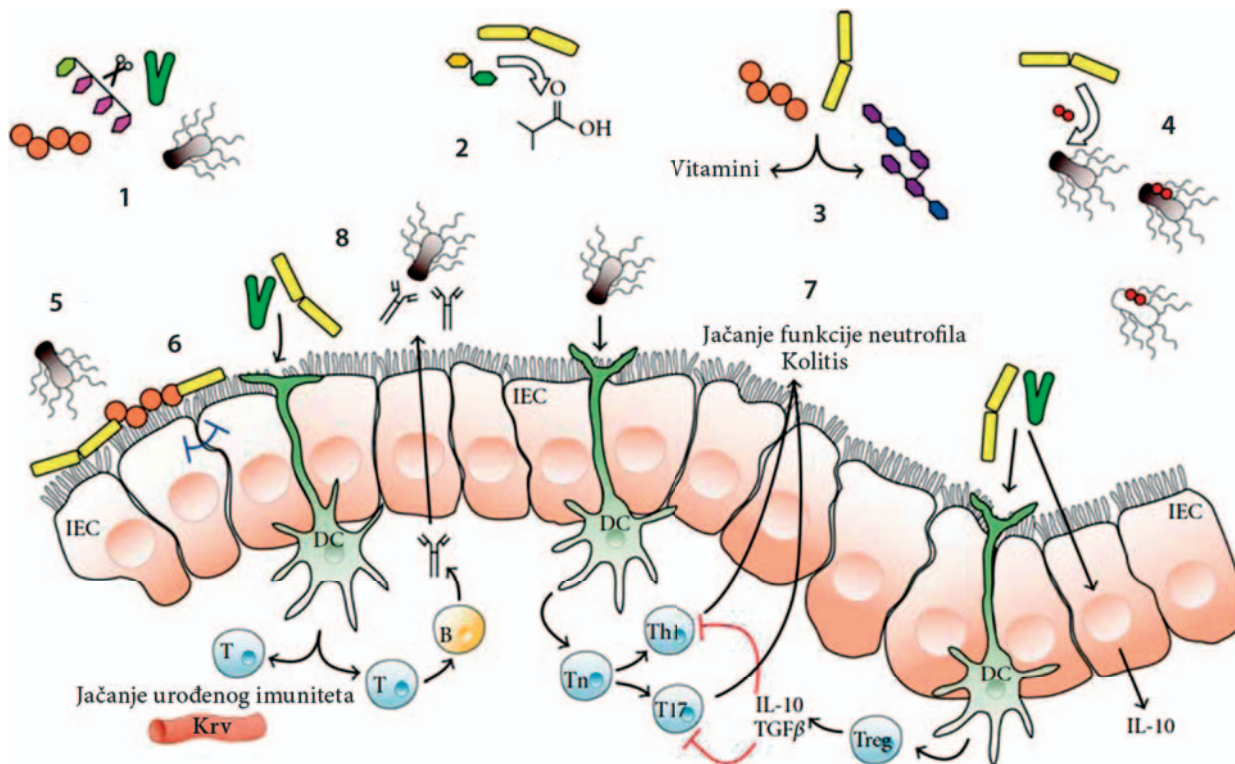
- inhibicijom transformacije prokarcinogena u aktivne karcinogene
- vezanjem ili inaktivacijom mutagenih komponenti
- stvaranjem antimutagenih komponenti
- potiskivanju rasta prokancerogenih komponenti
- smanjenjem apsorpcije karcinogena
- kontrolom koncentracije žučnih soli.

U tom se smislu može navesti i primjer probiotičkog djelovanja BMK i bifidobakterija na snižavanje razina kolesterola u krvi 4 - 5 %, što je iznimno važno za prevenciju bolesti srca. Snižavanje razine kolesterola u krvi uzrokovano probiotičkim djelovanjem bakterija objašnjava se sljedećim pretpostavljenim procesima:

- asimilacijom kolesterola u bakterijsku stanicu
- dekonjugacijom žučnih kiselina preko bakterijskih enzima
- vezanjem kolesterola za staničnu stijenu
- smanjenjem sinteze kolesterola u jetrima
- preraspodjelom kolesterola iz plazme u jetra kroz povećanu tvorbu kratkolančanih masnih kiselina.

Direktno ili indirektno kroz mijenjanje sastava ili aktiviteta crijevne mikrobne populacije probiotički bakterijski sojevi utječu na tjelesne imunofunkcije. Odnosno, njihovo se probiotičko djelovanje objašnjava teorijom stimulacije imunskog sustava domaćina. Znanstveno je dokazano da jogurt i probiotička fermentirana mlijeka u obrani od bolesti stimuliraju u organizmu tvorbu γ -interferona, citokina, interleukina 6 i 10, imunoglobulina IgA, te drugih nespecifičnih antitijela. Zajedno te supstancije u organizmu induciraju proizvodnju limfocita i time osiguravaju dovoljnu količinu T stanica za specifično djelovanje protiv infektivnih agensa. Potencijalni ili poznati mehanizmi kojima bakterijski probiotički sojevi mogu utjecati na crijevnu mikrobiotu su:

- natjecanje za ingredijente iz hrane koji im služe za dobar rast



Slika 7.12.

Shematski prikaz poznatih mehanizama preko kojih probiotički bakterijski sojevi mogu pozitivno utjecati na humanu crijevnu mikrobiotu.

Detalji: 1 natjecanje za ingredijente iz hrane koji im služe za dobar rast, 2 tvorba stimulatora rasta poput EPS ili vitamina za druge u crijevima prisutne korisne bakterije, 4 direktni antagonizam prema patogenim bakterijama preko stvorenih bakteriocina, 5 kompetitivno isključivanje drugih bakterija za specifične receptore na epitelnim stanicama, 6 poboljšanje funkcije zaštitnih barijera u crijevima, 7 smanjenje upalnih procesa čime se poboljšavaju uvjeti za njihovu kolonizaciju i perzistenciju unutar crijevne mikrobiote, 8 stimulacija urođenoga imunskog odgovora (nepoznatim mehanizmom) koji djeluje na intestinalne epitelne stanice (IEC), dendritičke stanice (DC) i T-stanice. (S dopuštenjem tvrtke Custom Probiotics/Harry Bronozian)

- biokonverzija nutrijenata u spojeve s inhibitorynim svojstvima
 - tvorba stimulatora rasta poput egzopolisaharida (EPS) ili vitamina za druge u crijevima prisutne korisne bakterije
 - direktni antagonizam prema patogenim bakterijama preko stvorenih bakteriocina
 - kompetitivno isključivanje drugih bakterija za specifične receptore na epitelnim stanicama
 - poboljšanje funkcije zaštitnih barijera u crijevima
 - smanjenje upalnih procesa čime se poboljšavaju uvjeti za njihovu kolonizaciju i perzistenciju unutar crijevne mikrobiote
 - stimulacija prirodnoga imunog odgovora (nepoznatim mehanizmom) koji djeluje na intestinalne epitelne stanice, dendritičke stanice i T-stanice.
- Pojednostavljeni prikaz poznatih mehanizama preko kojih probiotički bakterijski sojevi mogu pozitivno utjecati na crijevnu humanu mikrobiotu prikazuje slika 7.12.

Na temelju poznatih mehanizama djelovanja probiotičkih bakterijskih sojeva njihova potencijalna uloga u humanom organizmu u prevenciji nastanka bolesti može se opisati kroz sljedeće promjene i poboljšanja funkcije ukupne crijevne mikrobiote:

- pozitivne promjene u sastavu vrsta i sojeva crijevne mikrobiote
- jačanjem epitelne barijere
- obnovom epitelnih stanica
- inhibicijom rasta potencijalno patogenih bakterija
- metaboličkim produktima uvjetovanom metabolizmu
- sprječavanjem sinteze za organizam toksičnih spojeva.

Primjena probiotičkih bakterijskih sojeva u terapijskom liječenju pokazala je najbolje rezultate u liječenju: (i) akutnih dijareja uzrokovanih rotavirusima, (ii) dijareja povezanih infekcijom bakterijom *Clostridium difficile* ili dijareje uzrokovane uzimanjem antibiotika i (iii) *Helicobacter pylori* želučanih infekcija.

U svijetu se na godišnjoj razini bilježi 4 milijarde slučajeva dijareje (tri ili više vodenih stolica tijekom najmanje dvaju uzastopnih dana) pa se ona smatra globalnim problemom. U terapijskom liječenju ali i prevenciji dijareje znanstvenim je studijama potvrđen značajan utjecaj primjene probiotičkih bakterijskih sojeva. Studija koja je tijekom boravka u bolnici pratila dobro uhranjenu djecu s akutnim proljevom uzrokovanim rotavirusom (82 % djece) potvrdila je smanjenje trajanja dijareje za 50 %. Drugom provedenom studijom utvrđena je dobra kolonizacija intestinalnog sustava probiotičkim bakterijskim sojevima iz fermentiranog mlijeka u: (i) 78,6 % pacijenata s dijarejom uzrokovanom virusima, (ii) 75 % pacijenata s dijarejom bakterijskog podrijetla i (iii) 85,7 % pacijenata s dijarejom nepoznate etiologije.

Pojava dijareje u 5 - 80 % slučajeva česta je posljedica i terapije antibioticima klindamicinom, cefalosporinom ili penicilinom. Osim toga, često korištenje antibiotika postaje uzrok za: (i) dominantnost bakterijskih vrsta unutar prirodne mikrobiote crijeva rezistentnih na antibiotik, i (ii) značajnog smanjenja broja vrsta u crijevnoj mikrobioti. Tako narušena mikroba

ravnoteža omogućava brz rast bakterije *Clostridium difficile* (patogena bakterija koja je u zanemarivom broju inače prirodni stanovnik crijeva) koje je posljedica dijareja.

Metaanaliza (koja kombinira i sintetizira statističke i analitičke rezultate međusobno nezavisnih studija i interpretira njihove rezultate u zajedničku jedinstvenu cjelinu) na ukupno 25 kliničkih studija pokazala je značajan utjecaj probiotičkih fermentiranih mlijeka na smanjenje pojave dijareje. Uzimanje probiotičkih fermentiranih mlijeka tijekom i nakon prestanka terapije antibioticima prema provedenim studijama ima učinak na smanjenje: (i) pojave dijareje u 52 % slučajeva, (ii) veličine disbalansa crijevne mikrobiote i (iii) pojavnost dominantno na antibiotik rezistentnih vrsta unutar prirodne mikrobiote crijeva.

Bakterija *Helicobacter pylori* u otprilike polovice stanovništva stečena je bakterijska vrsta, čija je pojavnost vezana za dječju dob do desete godine. Ona u želucu bez vidljivih simptoma bolesti može perzistirati tijekom cijelog života. U određenim životnim okolnostima, ta bakterija može postati uzrokom povećanog rizika razvitka peptičnih ulkusa, karcinoma želuca ili limfoma. Terapija za *Helicobacter pylori* želučane infekcije uobičajeno uključuje jake protusekretorne lijekove (inhibitore proton-pumpe) kombinirane s dvama različitim antibioticima. U određenog broja bolesnika zbog toga se javljaju neugodne nuspojave poput bolova u gornjem dijelu želuca, dijareja, opstipacija, mučnina, povraćanje ili tegobe vida. Uz lijekove, za ublažavanje nuspojava terapije liječenja *Helicobacter pylori* kao i učinkovitije eradikacije bakterije, istodobno uzimanje probiotičkih fermentiranih mlijeka pokazalo se dobrom opcijom.

Procjenu sposobnosti prihvaćanja i kolonizacije probiotičkih bakterijskih sojeva na epitelne stanice crijeva danas je moguće utvrditi *in vitro* pokusima preko različitih kontinuiranih staničnih linija (stanice koje imaju sposobnost beskrajnog rasta i diobe). Sposobnost prihvaćanja, kolonizacije i perzistencije u crijevima osnovni je preduvjet za potvrđivanje potencijalno preventivnog ili terapijskog učinka probiotičkih bakterijskih sojeva sadržanih u fermentiranom



Slika 7.13.

Prihvatanje probiotičkih bakterijskih sojeva za različite intestinalne stanice.

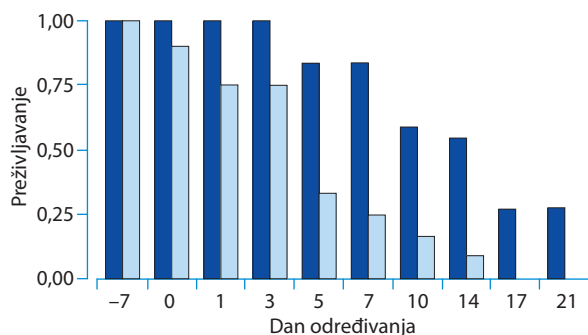
Detalji: (A) prihvaćanje bakterije *B. lactis* HN019 za staničnu liniju HT-29 stanica, (B) prihvaćanje bakterije *L. rhamnosus* HN001 za staničnu liniju CaCo-2 stanica, (C) prihvaćanje bakterije *L. acidophilus* HN017 za staničnu liniju HT-29 stanica. Na sve tri slike jasno se uočava njihovo prihvaćanje za mikrovile koji su formirani na površini jedne i druge vrste stanica. (Gopal i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)

mlijeku na humano zdravlje. Za ilustraciju, na slici 7.13. prikazana je sposobnost prihvaćanja probiotičkih sojeva *L. rhamnosus* HN001 (poznata i kao DR20) *L. acidophilus* NH017 i *B. lactis* HN019 (poznatih i kao DR10) na diferencirane stanične linije epitelnih intestinalnih stanica (HT-29, CaCo-2) i na mukozno-sekrecijske stanice (HT-29-MTX) u *in vitro* provedenom pokusu. Istovremeno je za iste bakterijske sojeve utvrđen i adhezijski indeks (definiran brojem bakterijskih stanica koje su se prihvatile za 100 epitelnih stanica nakon što su podvrgnute intenzivnom ispiranju) prihvaćanja za stanice HT-29 ~ 99 CaCo-2 ~ 219 i HT-29-MTX ~ 257- 410. Za većinu testiranih probiotičkih bakterijskih sojeva uočeno je specifično vezanje za epitelne stanice u parovima ili kratkim lancima. Zbog toga, velika je vjerojatnost da je njihova sposobnost adhezije puno više od nespecifičnoga fizičkog uklještenja. Za kontrolnu je skupinu u pokusu korištena bakterija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-1 koja nema sposobnost adhezije.

Osim sposobnosti prihvaćanja za intestinalne stanice, za povoljan probiotički učinak na humano zdravlje od osobite je važnosti i dužina perzistencije

probiotičkih bakterijskih sojeva u crijevima. Tako je utvrđeno da probiotički soj *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (GG) upravo zbog adhezijskog proteina (Spa C-pilin) ima veću brojnost i sedam dana dužu sposobnost perzistencije u crijevima u usporedbi s *Lactobacillus rhamnosus* LC705, koji ne posjeduje SpaC gen za stvaranje specifičnih pilin-proteina (slika 7.14.). Inače, *Lactobacillus rhamnosus* LC705 probiotički je soj koji se često koristi u proizvodnji probiotičkih fermentiranih mlijeka. Studija mehanizama uključenih u interakciju između probiotičkih sojeva i domaćina temeljena je na analizi njihova kompletnoga genoma. Za procjenu sposobnosti perzistencije u crijevima u konkretnom pokusu izabrano je 12 zdravih odraslih osoba koje su tijekom sedam dana uzimale probiotike. Uzorci fecesa uzimani su tijekom tih 7 dana i nakon prestanka uzimanja probiotika (0 - 21 dan).

U studijama *in vitro* i *in vivo* probiotički sojevi *Bifidobacterium* spp. u ponovnom uspostavljanju ravnoteže crijevne mikrobiote pokazali su značajnu učinkovitost. Naime, prirodna je karakteristika bifidobakterija da mogu koristiti različite oligosaharide koje fermentiraju u octenu i mliječnu kiselinu.



Slika 7.14.

Preživljavanje *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (GG) (tamno plava boja) i *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (svijetlo plava boja) u crijevima.

Detalji: (-7 dana) predstavlja perzistenciju probiotičkih bakterijskih sojeva u crijevima 12 zdravih osoba tijekom sedam dana uzimanja probiotika; 0-21 dan određivanja predstavlja perzistenciju probiotičkih bakterijskih sojeva u crijevima 12 zdravih osoba nakon prestanka uzimanja probiotika. (Kankainen i sur., 2009., s dopuštenjem PENS- a.)

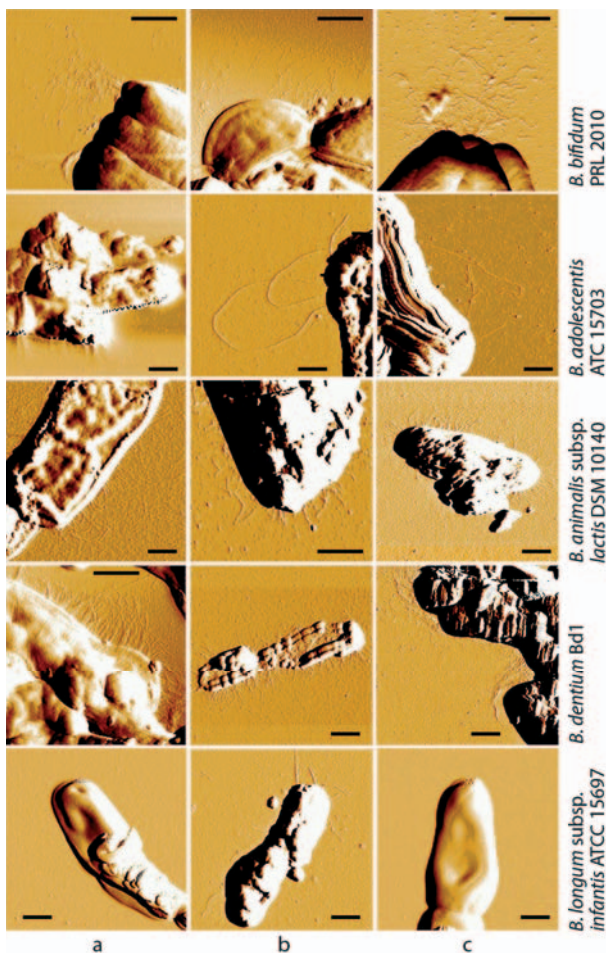
Naknadno te kiseline služe kao učinkovit "pročišćivač" tankog crijeva u slučajevima ako je bifidobakterijama dostupna dovoljna količina nerazgradljivih oligosaharida koje druge mikrobne vrste poput *E. coli*, *Clostridium perfringens* ili *Bacteroides* spp. ne mogu koristiti. Posljedično se poboljšanim rastom bifidobakterija snižava aktivnost fekalnih enzima i fekalni pH, te koncentracija indola i fenola. Indirektno, bifidobakterije organizam domaćina: (i) opskrbljuju energijom, korisnim metaboličkim spojevima i mikronutrijentima (ii) utječu na razinu kolesterola i triacilglicerola u krvnom serumu, i (iii) sudjeluju u kontroli krvnog tlaka u osoba starije dobi s povišenim masnoćama u krvi. Bifidobakterije osobito u kombinaciji s drugim probiotičkim sojevima primjerice *L. rhamnosus* (GG) ili *L. casei* Shirota ili prebiotcima ublažavaju tegobe konstipacije u starijih osoba. Konstipacija je uobičajena pojava u starijih osoba koja je usko povezana s izraženim smanjenjem broja bifidobakterija u crijevnoj mikrobioti. Egzaktano se ne može tvrditi da je izrazito

smanjenje broja bifidobakterija u crijevima uzrok konstipacije ali se zna da promjena mikrobne populacije unosom hrane koja se fermentira u debelom crijevu može ublažiti te tegobe. Dnevnom konzumacijom simbiotičkih fermentiranih mlijeka, kako pokazuju istraživanja, u približno 25 % starijih osoba može se poboljšati peristaltika crijeva i povećati broj tjednih pražnjenja crijeva. Drugim riječima, neovisno o tome radi li se o zdravim, starijim ili bolesnim osobama bifidobakterijama se pripisuje pozitivan učinak na: (i) poboljšanje ravnoteže intestinalne mikrobne populacije, (ii) formiranje konzistentne i redovite stolice i (iii) metabolizam masti.

Slično kao i određeni probiotički sojevi *Lactobacillus* spp., bifidobakterije imaju sposobnost tvorbe morfološki različitih staničnih struktura, poput onih sličnih pilima koje im omogućavaju prihvaćanje za crijevnu sluznicu. Za ilustraciju, na slici 7.15. prikazan je različit morfološki izgled pilima sličnih staničnih struktura bakterija *Bifidobacterium* spp. ovisno o izvoru raspoloživog ugljika u mediju (glukoza, laktoza ili FOS).

Preventivni ili terapijski učinak prebiotičkih fermentiranih mlijeka na humano zdravlje, kako se pretpostavlja, određen je stimulacijom rasta prvenstveno bifidobakterija i laktobacila u crijevnoj mikrobioti ili stvaranja kratkolančanih masnih kiselina. Posljedično tome te bakterije ili stvoreni metaboliti direktno stimuliraju stvaranje mukozne sluzi i proinflatornih imunih stanica. Indirektno, organizam domaćina opskrbljuju energijom, povećavaju stvaranje vitamina i probavnih enzima i smanjuju razinu štetnog amonijaka u krvi. Na slici 7.16. prikazana je pretpostavljena shema načina djelovanja prebiotika u humanom intestinalnom sustavu.

Iz pretpostavljenog načina djelovanja prebiotika na humani organizam smatra se da moguće stimuliranje rasta bifidobakterija i laktobacila u ukupnoj crijevnoj mikrobioti stimulira: (i) povećano stvaranje mukozne sluzi, (ii) regulaciju gena uključenih u formiranje stabilnih spojeva između epitelnih stanica i (iii) aktivnost imunoloških stanica. Kratkolančane masne kiseline (2 - 6 C - u lancu), kako se pretpostavlja, stimuliraju: (i) rast i diferencijaciju epitelnih stanica, (ii) reguliranje



Slika 7.15.

Prisutnost i morfološki izgled pilima sličnih staničnih struktura probiotičkih sojeva *Bifidobacterium* spp.

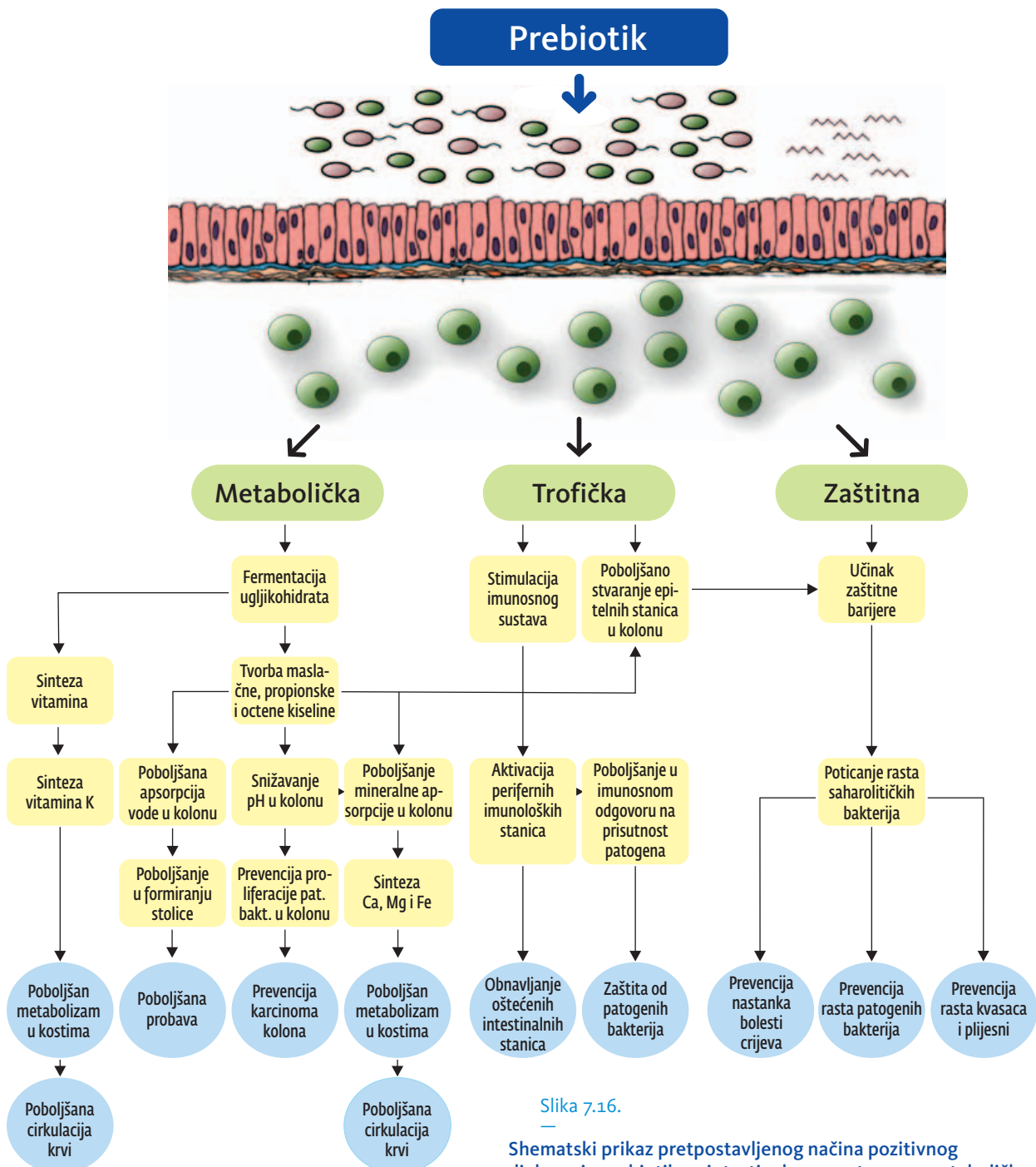
Detalji: slike a, b, c prikazuju pilima slične stanične strukture bifidobakterija kultiviranih s glukozom, laktozom ili FOS-oligosaharidima. Slika je dobivena pomoću *Atomic Force Microscope* (AFM) ili mikroskopom vrlo visoke rezolucije koji diferencira objekte reda veličina nanometara; bar = 0,5 μm. (Feroni i sur., 2011., CC BY 2,0.)

formiranja stabilnih spojeva između epitelnih stanica i (iii) stvaranje i izlučivanje proinflamatornih stanica.

Od vremena Ilje Iljiča Mečnikova koji je 1907. godine pretpostavio: da se bakterijama mliječne kiseline može normalizirati humana crijevna mikrobiota i posljedično tome utjecati na poboljšanje zdravlja i produžavanje životnog vijeka, u znanstvenom se smislu ta pretpostavka nije promijenila ni do danas. Molekularne i genetičke studije u velikoj su mjeri pomogle u otkrivanju temeljnih mehanizama potrebnih za učinkovitu aktivnost probiotičkih bakterijskih sojeva na zdravstveni boljitak čovjeka. Zahvaljujući tim bazičnim istraživanjima, u posljednjih desetak godina znanstvena su se istraživanja probiotičkih bakterijskih sojeva gotovo nemjerljivo povećala. Na temelju rezultata istraživanja postignut je znatan napredak u selekciji i karakterizaciji probiotičkih bakterijskih sojeva a mnoge su zdravstvene tvrdnje vezane za njihovo korištenje i potvrđene. Dijetetska modulacija sastava humane mikrobiote crijeva i njezine aktivnosti potvrđena je u slučajevima svakodnevne konzumacije probiotika, prebiotika ili simbiotika. Kliničke studije utjecaja svakodnevnog korištenja probiotika potvrdile su boljitak za: (i) smanjenje respiratornih infekcija, (ii) učinkovitiju tvorbu kratkolančanih masnih kiselina, i (iii) frekvenciju i volumen stolice. U usporedbi s osobama koje ih uopće ne konzumiraju, svakodnevna njihova konzumacija uvjetuje statistički značajno nižu razinu enterobakterija u crijevima, uz istodobno znatno povećanje aktivnosti enzima galaktozidaze.

Probiotička fermentirana mlijeka u načelu su namijenjena zdravim osobama koje ih konzumiraju iz vlastita uvjerenja da im ona pomažu u održavanju zdravlja kroz potencijalno odgađanje rizika od nastanka bolesti: gastrointestinalnog, urogenitalnog ili respiratornog trakta te kardiovaskularnih bolesti. Za tu je svrhu potrošačima na tržištu dostupan zaista velik broj proizvoda, ali o konkretnoj dobrobiti za većinu njih nažalost ne postoje kliničke studije ili su one vrlo oskudne. Razlozi nepostojanja dovoljnog broja relevantnih kliničkih studija brojni su ali ih se nekoliko može smatrati objektivnima:

- općenito, o bakterijama mliječne kiseline i bifidobakterijama još se uvijek zna malo
- nemaju svi sojevi iste bakterijske vrste isti učinak djelovanja



Slika 7.16.

Shematski prikaz pretpostavljenog načina pozitivnog djelovanja prebiotika u intestinalnom sustavu na metaboličku, trofičku i zaštitnu stimulaciju humanog organizma.



Slika 7.17.

Izvjeshni dokumentirani fiziološki učinci probiotičkih fermentiranih mlijeka na humano zdravlje. (Granato i sur., 2010., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

- dokazani probiotički učinak bakterijskog soja na neku bolest ne znači da je on dobar za sve bolesti u smislu preventivnoga ili terapijskog učinka
- mehanizam probiotičkog djelovanja nije u potpunosti utvrđen
- rezultati su teško mjerljivi
- istraživanja su provedena s različitim ciljevima - premalo usporedivih rezultata
- istraživanja su provedena u različitim populacijskim skupinama
- u istraživanjima su korišteni različiti bakterijski sojevi i njihove koncentracije
- klinički su pokusi limitirani djelomično i zbog važeće zdravstvene legislative.

Neovisno o istaknutim ograničenjima, u usporedbi s drugim vrstama funkcionalne hrane u definiranju fizioloških svojstava fermentiranih mlijeka ostvareno je najviše pozitivnih rezultata (slika 7.17.). Također, ono što probiotička fermentirana mlijeka dodatno čini zaista posebnima znanstveno je potvrđena činjenica da ona nužno ne uvjetuju promjenu aktivnosti imunskog sustava u zdravih osoba.

Osim toga, farmaceutska industrija ne može dovoljno brzo pronaći adekvatan lijek za određene bolesti. S druge strane, prekomjerna je upotreba antibiotika dovela do mikrobne rezistentnosti na većinu njih. Zbog tih istaknutih činjenica znanstveni se svijet danas sve više slaže da sva fermentirana mlijeka preventivno kroz pomoć u stabiliziranju crijevne mikrobiote potvrđuju nedvojbeni preventivni učinak na ljudsko zdravlje. Također, smatra se da preventivni ili terapijski učinak fermentiranih mlijeka u bliskoj budućnosti kroz smanjenje zdravstvenih troškova može imati i veliku epidemiološku važnost.

U usporedbi s istraživanjima preventivnoga ili terapijskog utjecaja probiotičkih bakterijskih sojeva na humano zdravlje, istraživanja prebiotika za iste učinke znatno su manja. Osobito je najmanje onih povezanih s učinkom prebiotika na intestinalne patogene bakterije. Na temelju dosadašnjih rezultata očigledan je pozitivan učinak prebiotika u sprječavanju određenih upalnih procesa. Istodobno, slično kao i za probiotike postoje brojne znanstvene i stručne kontroverze oko prihvaćanja prebiotika kao dodatka funkcionalnoj hrani. To više što su neke studije pokazale da postoje

indicije da određene vrste prebiotika mogu povećavati osjetljivost na specifične gastrointestinalne infekcije. Drugim riječima, to znači da neki prebiotici mogu direktno utjecati na intestinalne stanice, tako da se vežu na specifične receptore ili da na epitelne stanice djeluju iritabilno. Posljedice su moguće povećanje permeabilnosti crijevnog epitela i rizik od izlaska intestinalnih bakterija iz crijeva u druge stanice organizama. Neka su istraživanja potvrdila i da prebiotici uz stimulaciju rasta bifidobakterija u intestinalnom traktu mogu stimulirati i rast potencijalno štetnih bakterija poput *Clostridium* spp.

Usprkos kontroverznim rezultatima, odgovor na pitanje mogu li prebiotička ili simbiotička fermentirana mlijeka popraviti ili spriječiti narušavanje našeg zdravlja je potvrđan. Istraživanjima prebiotika kroz brojne eksperimentalne studije potvrđen je njihov pozitivan utjecaj na povećanje bioraspoloživosti minerala i stimulacije imunskog sustava. Način djelovanja prebiotika na životinje i *in vitro* studije dobro su dokumentirale povećano stvaranje kratkolančanih masnih kiselina koje su biljeg povećane saharolitičke razgradnje u crijevima. Za prebiotike poput inulina, FOS-a (fruktooligosaharidi), GOS-a (galaktooligosaharidi), ili XOS-a (ksilooligosaharidi) utvrđena je dobra stabilnost u neekstremnim uvjetima prema temperaturi i pH. Zbog toga se oni istodobno mogu uspješno koristiti u proizvodnji fermentiranih mlijeka u svojstvu: (i) zamjene za mliječnu mast, (ii) sredstva za poboljšanje reoloških i organoleptičkih svojstava i (iii) promotora rasta probiotičkih bakterijskih sojeva. Osim toga, u današnje je vrijeme, osobito u razvijenim zemljama, sve više skupina ljudi (djece, trudnica, imunougroženih, starijih ili antibiotikom tretiranih pacijenata) koji su podložniji specifičnim infekcijama. Na temelju dosadašnjih ostvarenih rezultata opravdano se predviđa da su upravo prebiotici ona vrsta supstancija koje će u bliskoj budućnost bez štetnih posljedica imati preventivno djelovanje na specifične humane infekcije.

Od FAO/WHO predložena i općeprihvaćena definicija probiotika glasi: "Živi mikroorganizmi koji konzumirani u adekvatnoj količini potvrđuju zdravstvene

učinke na domaćina", zbog nedostataka mjerljivih zdravstvenih tvrdnji nije prihvatljiva za *European Food Safety Authority* (EFSA), ali niti američku *Food and Drug Administration* (FDA). U 2012. godini EFSA je zbog nepotpunih istraživanja i posljedično neuvjerljivih dokaza odbacila 260 zdravstvenih tvrdnji vezanih za probiotička fermentirana mlijeka. Zbog toga se danas na tržište ne smiju isporučivati niti reklamirati fermentirana mlijeka sa zdravstvenim tvrdnjama koje nije odobrila EFSA i koje nisu uvedene u Registar dopuštenih nutritivnih i zdravstvenih tvrdnji (engl. *Register of nutrition and health claims made on foods* /<http://ec.europa.eu/nuhclaims/>). Istovremeno, EFSA nije osporila učinkovit potencijal koji probiotici i prebiotici mogu imati na ljudsko zdravlje, već samo tvrdnje koje nisu dovoljno potkrijepljene do danas provedenim istraživanjima. Također je istina i da usprkos brojnim istraživanjima pojedinačnih probiotičkih bakterijskih sojeva, zbog izrazite kompleksnosti, postoji svega nekoliko bakterijskih sojeva koji su opisani na temelju bazičnih i kliničkih studija.

Važno je istaknuti, u međuvremenu, probiotike i prebiotike treba smatrati dijetetskim pripravcima a ne lijekovima. Drugim riječima, povoljan učinak probiotičkih, prebiotičkih i simbiotičkih fermentiranih mlijeka na humano zdravlje treba uspoređivati kroz nutricionističke a ne kliničke studije koje procjenjuju ciljano djelovanje razvijenih lijekova na određene bolesti. Tako se na razini današnjeg znanja smatra da neće proći dugo vremena da rezultati o povoljnom učinku probiotika i prebiotika na humano zdravlje postanu dovoljno mjerljivi. Preliminarna istraživanja potvrđuju da bi potencijalni učinak istovremenim korištenjem više različitih probiotičkih sojeva mogao biti znatno učinkovitiji od korištenja samo jednog soja. Te pretpostavke temelje se na činjenici da se humana mikrobiota sastoji od nekoliko stotina vrsta i da bi se genetički različiti probiotički sojevi zajedno lakše adaptirali unutar prirodne mikrobne populacije.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka

8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka

329

- 9 Literatura
- 10 Kazalo pojmova

Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka

Uvod

Za konzistentnu i uspješnu proizvodnju fermentiranih mlijeka visoke kvalitete kontrola kvalitete temelji se na utvrđivanju: (i) kemijskog sastava i fizikalnih osobina, (ii) mikrobiološke kvalitete i (iii) organoleptičke ocjene sirovog mlijeka, svih ingredijenata, dodataka i finalnog proizvoda.

U ovom poglavlju knjige navedene su osnovne i specifične fizikalne, kemijske i mikrobiološke analize kojima se procjenjuju kvaliteta sirovog mlijeka, ingredijenata, dodataka i gotovih proizvoda. Također, u poglavlju knjige opisane su pogreške fermentiranih mlijeka i navedeni su mogući uzroci njihova nastajanja.



8.1.

Kontrola kvalitete sirovog mlijeka

Kvaliteta sirovog mlijeka za proizvodnju fermentiranih mlijeka u mljekari prosuđuje se na temelju: fizikalnih, kemijskih i higijenskih parametara. Neke od tih analiza, radi jednostavnosti, preporučuje se provoditi prije pohrane, a neke od njih nakon što je sirovo mlijeko pohranjeno u spremnike.

8.1.1.

Osnovne i specifične analize

Prema općeprihvaćenim kriterijima, prije pohrane sirovog mlijeka uobičajeno se provode analize:

- provjere temperature mlijeka koja mora biti $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- organoleptičke procjene mirisa, a nakon laboratorijske pasterizacije procjena okusa
- direktne mikroskopske kontrole broja bakterija
- krioskopije za procjenu vrijednosti točke leđišta koja ne smije biti niža od: $-0,520\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kravlje, $-0,560\text{ }^{\circ}\text{C}$ za ovčje, $-0,540\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kozje mlijeko
- titracijske kiselosti metodom prema Soxhlet-Henkelu ($^{\circ}\text{SH}$) koja za kravlje mora biti 6,0 - 6,8 $^{\circ}\text{SH}$, za ovčje 8,0 - 12 $^{\circ}\text{SH}$, a 6,4 - 6,8 $^{\circ}\text{SH}$ za kozje mlijeko
- utvrđivanja ostataka antibiotika.

Premda su svi navedeni parametri kvalitete sirovog mlijeka važni za dobru kvalitetu fermentiranih mlijeka, test za utvrđivanje antibiotskih ostataka je obvezan. Antibiotski ostatci prisutni u sirovom mlijeku tijekom fermentacije mogu u potpunosti zaustaviti rast mikrobnih kultura. Zbog toga je ekonomski učinak proizvodnje fermentiranih mlijeka za mljekare znatno umanjen. S druge strane, utvrđivanje ostataka antibiotika u mlijeku kao obvezatnog testa nalažu službeni zdravstveni propisi.

U praksi se za utvrđivanje ostataka antibiotika u mlijeku koriste brojni testovi različite osjetljivosti.

Ipak, radi jednostavnosti izvođenja i brzine dobivanja rezultata, u upotrebi su najčešće Delvo - $^{\circ}\text{P}$ test s granicom detekcije $0,004\text{ IU mL}^{-1}$ kroz 2,5 sata i Delvo-X-Press $^{\circ}$ i Lac-Tek $^{\circ}$ s granicom detekcije $0,006\text{ IU mL}^{-1}$ za 7 minuta.

Nakon pohrane mlijeka u spremnike, za procjenu kvalitete sirovog mlijeka u mljekari preporučuje se provoditi osnovne i specifične analize za utvrđivanje:

- osnovnog kemijskog sastava (suha tvar bez masti, bjelančevine, mliječna mast, laktoza, pepeo)
- vrijednosti pH
- ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija
- broja somatskih stanica
- broja termorezistentnih bakterija
- pojavnosti bakterije *Alcaligenes viscolactis*
- broja spora aerobnih bakterijskih vrsta (*Bacillus* spp.)
- broja psihrotrofnih bakterija.

Procjena kemijskog sastava sirovog mlijeka, osobito udjela bezmasne suhe tvari i omjera kazein : proteini sirutke, važna je radi točnog utvrđivanja stupnja koncentriranja mlijeka ili dodatka ingredijenata potrebnih za obogaćivanje suhe tvari bez masti. Utvrđivanje pH vrijednosti pohranjenog sirovog mlijeka važno je radi procjene njegovih preradbenih osobina. Uobičajeno, za tu se svrhu koriste sljedeće metode:

- metoda infracrvene spektrofotometrije (HRN ISO 9622:2001) - za utvrđivanje udjela: suhe tvari i bezmasne suhe tvari, proteina, mliječne masti i laktoze
- metoda po Kjeldahlu (HRN EN ISO 8968-5:2003) - za utvrđivanje udjela ukupnih proteina
- metoda po Kjeldahlu (HRN ISO 17997-2:2010) - za utvrđivanje udjela kazeina
- metoda po Kjeldahlu (HRN EN ISO 8968-4:2003) - za utvrđivanje neproteinskog dušika.
- potenciometrijska metoda kalibriranim pH-metrom - za utvrđivanje pH vrijednost mlijeka.

Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku može se utvrditi klasičnom metodom brojanja poraslih kolonija na standardnom hranilištu na temperaturi od $30\text{ }^{\circ}\text{C}/72\text{ sata}$ (referentna metoda), ili metodom protočne citometrije (HRN EN ISO

21187:2008) na mjernom instrumentu. Za proizvodnju fermentiranih mlijeka ukupan broj bakterija u izabranom mlijeku ne bi trebao biti veći od 30.000 cfu mL⁻¹. U procijeni bakteriološke kvalitete može se koristiti i jednostavna brza fermentacijska proba. Postupak je sljedeći:

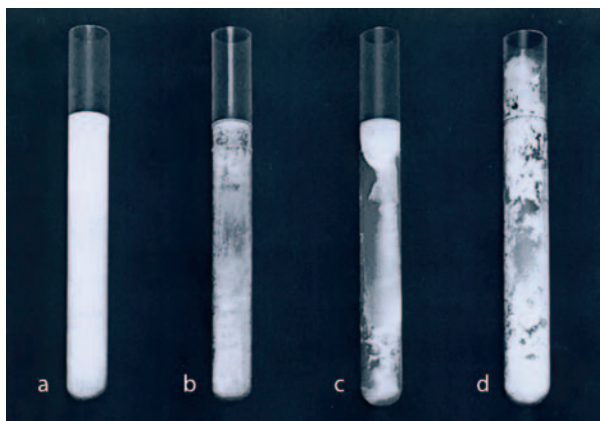
- u sterilne epruvete nalije se 40 mL sirovog mlijeka
- mlijeko se inkubira na temperaturi 38 - 40 °C/12 - 24 sata
- reakcija mlijeka prvi se put procjenjuje nakon 12, a drugi put nakon 24 sata.

Mlijeko koje je nakon inkubacije od 24 sata ostalo tekuće ili je koagulum jednoličan, gladak smatra se pogodnim za preradu u fermentirana mlijeka. Mlijeko koje nakon inkubacije pokazuje sirišni (stisnuti), pahuljast (manje ili veće pahuljice) ili plinovit (mjehurići plina, rupičasti, pliva na sirutki) koagulum nije pogodno za preradu u fermentirana mlijeka (slika 8.1.). Fermentacijska proba kao analiza bakteriološke kvalitete sirovog mlijeka pogodna je za mljekare manjeg kapaciteta prerade.

Broj somatskih stanica u mlijeku prosuđuje se mikroskopskom metodom (referentna metoda), ili fluoro-opto-elektronskom metodom (HRN EN ISO 13366-2:2007) na instrumentu. U mlijeku izabranom za proizvodnju fermentiranih mlijeka broj somatskih stanica za kravlje mlijeko ne smije biti veći od 400.000 mL⁻¹, za ovčje ne veći od 750.000 mL⁻¹, a za kozje ne veći od 1,500.000 mL⁻¹.

U slučajevima ako higijenska kvaliteta sirovog mlijeka (ukupan broj bakterija i broj somatskih stanica) nije u legislativom propisanim granicama, preporučuje se provođenje specifičnih mikrobioloških analiza. Tako se za probleme održivosti gotovog proizvoda na policama treba utvrditi broj termorezistentnih bakterija u sirovom mlijeku korištenjem laboratorijske pasterizacije. U pravilu, nakon laboratorijski provedene pasterizacije utvrđeni broj termorezistentnih bakterija > 500 cfu mL⁻¹ upozorava na ozbiljne pogreške u organizaciji mužnje i pohrane sirovog mlijeka na farmi.

Ponekad je bakteriološka kontaminacija sirovog mlijeka i uzrok pojave "sluzavosti" mlijeka. Prvenstveno, ta



Slika 8.1.

Izgled koaguluma nakon inkubacije sirovog mlijeka na temperaturi 38 - 40 °C/12 - 24 sata.

Detalji: koagulumi označeni slovima a i b predstavljaju sirovo mlijeko pogodno za preradu.

je mikrobna pogreška mlijeka indikacija nečiste opreme za mužnju i pohranu mlijeka na farmi. U slučajevima pojavnosti "sluzavosti" mlijeka preporučuje se mlijeko svakog proizvođača testirati. Za testiranje mlijeka može se koristiti jednostavna test-proba koja uključuje inkubaciju mlijeka na temperaturi od približno 15 - 21 °C tijekom 12 - 24 sata. Pojava rastezljivih niti na staklenom štapiću dužih od 0,5 do 0,6 cm nakon njegova prethodnog uranjanja u inkubirano mlijeko na nekoliko mjesta smatra se pozitivnim rezultatom. Pogrešku "sluzavosti" mlijeka u većoj ili manjoj mjeri mogu uzrokovati različite mikrobne vrste, uglavnom gram-negativnih bakterija, ali se najčešće ona pripisuje bakteriji *Alcaligenes viscolactis*.

Paradoksalno, pojavnost bakterijskih spora gram-pozitivnih bakterija najčešća je u higijenski visoko kvalitetnom sirovom mlijeku. U mlijeku s niskim brojem ostalih bakterijskih vrsta izostaje uobičajena kompeticija i sporotvorne bakterije postaju dominantnom populacijom (~95 %). U tim se slučajevima preporučuje u sirovom mlijeku utvrditi broj aerobnih spora.

Za tu se svrhu može koristiti relativno brza analiza koja uključuje: (i) laboratorijsku pasterizaciju mlijeka (80 °C/12 minuta) nakon koje slijedi brzo hlađenje i (ii) inokulaciju uzoraka na standardno hranilište i inkubaciju na temperaturi od 32 °C/48 h. Broj utvrđenih aerobnih spora u mlijeku ne bi trebao prelaziti broj od 100 - 200 cfu mL⁻¹.

Broj psihrotrofnih gram-negativnih bakterija u sirovom mlijeku za proizvodnju fermentiranih mlijeka preporučuje se utvrditi zbog sposobnosti te skupine bakterija tvorbi termorezistentnih enzima (proteinaza, lipaza i fosfolipaza). Sirovo mlijeko koje se prije prerađuje duže pohranjuje na niskim temperaturama tako može biti uzrok smanjene kvalitete gotovog proizvoda. Niske temperature i duža pohrana mlijeka favoriziraju rast psihrotrofnih bakterija koje svojim proteolitičkim i lipolitičkim enzimima razgrađuju protein i mliječnu mast mlijeka. Zbog termorezistentnosti tih enzima nepoželjne proteolitičke i lipolitičke promjene događaju se i tijekom fermentacije a pogreške se manifestiraju u promjeni teksture i okusu gotovog proizvoda. Jogurt primjerice zbog proteolize κ -kazeina koja započinje u sirovom mlijeku i nastavlja se tijekom fermentacije ima čvršću gel-strukturu i veću viskoznost, ali je istodobno sinereza izraženija. Zanimljivo je istaknuti i činjenicu da proteolitičke promjene pogoduju rastu mikrobne kulture kroz povećanje koncentracije slobodnih aminokiselina. S druge strane, tipična aroma izostaje, a zbog istodobnih izraženih lipolitičkih promjena uzrokovanih lipazama psihrotrofnih bakterija okus proizvoda je atipičan i opisuje se kao gorak, užegnut, nečist i okus po voću.

Za kontrolu broja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku u praksi se može koristiti brza metoda, koja uključuje inkubaciju uzoraka na standardnom hranilištu na temperaturi od 21 °C/25 sati (IDF Standard, 132:1985). Za poželjnu kvalitetu fermentiranih mlijeka broj psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku ne bi trebao biti veći od 5000 cfu mL⁻¹.

8.2.

Kontrola kvalitete ingredijenata i voća

U načelu, fizikalno-kemijske i mikrobiološke analize ingredijenata i voća koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka rutinski se ne provode u mljekari. Prema potrebi, u određenim slučajevima kvaliteta ingredijenata i voća se kontrolira osnovnim ili specifičnim fizikalno-kemijskim ili mikrobiološkim analizama.

8.2.1.

Osnovne analize

Od dodataka koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka u mljekari obično se kontrolira jedino udjel voća u gotovom proizvodu. Zbog važeće legislative i tržišta katkad je u proizvodu potrebno odrediti vrstu i koncentraciju dodanih ingredijenata, poput stabilizatora ili konzervansa. Za većinu tih ingredijenata postoje standardni testovi opisani u AOAC metodama (engl. *Official Methods of Analysis*), ali je bolje te analize obaviti u akreditiranim laboratorijima. Sladila, boje i arome koji se dodaju nakon toplinske obrade mlijeka mogu biti uzrok mikrobiološke kontaminacije. U tim se slučajevima treba organizirati mikrobiološka kontrola gotovih proizvoda na prisutnost patogenih bakterija i drugih mikrobnih uzročnika kvarenja. Neovisno o načinu korištenja, za sigurnu proizvodnu fermentiranih mlijeka za sve dodatke i ingredijente u mljekari potrebno je osigurati sljedeću kontrolu i nadzor:

- nabavljati sirovine jedino dobre kvalitete koja se jamči i potvrđuje proizvođačkom specifikacijom
- osigurati kontrolirane uvjete za njihovu pohranu
- provoditi redovitu tehničku kontrolu mjesta pohrane sirovina (temperatura, vlaga i slično).

8.3.

Kontrola kvalitete fermentiranih mlijeka

U mljekari kontrola kvalitete fermentiranih mlijeka, poput kontrole sirovog mlijeka, procjenjuje se na temelju rezultata fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških analiza. Neke od tih analiza pripadaju u skupinu osnovnih, a neke u skupinu specifičnih analiza.

8.3.1.

Fizikalno-kemijske analize

U praksi, za svakodnevnu procjenu kvalitete fermentiranih mlijeka koriste se jednostavne osnovne fizikalno-kemijske analize. Osnovne fizikalno-kemijske analize uključuju:

- određivanje udjela: suhe tvari, mliječne masti, laktoze, mliječne kiseline, a prema potrebi i ukupnih ugljikohidrata, glukoze i fruktoze
- mjerenje pH-vrijednosti.

Zbog jednostavnosti, za utvrđivanje udjela suhe tvari, mliječne masti, laktoze i mliječne kiseline najčešće se koristi kalibrirana automatizirana metoda infracrvene spektrofotometrije. Također, kalibriranom automatiziranom analizom temeljenoj na infracrvenoj spektrometriji u voćnim i aromatiziranim varijantama mogu se još dodatno utvrđivati udjeli ukupnih ugljikohidrata, glukoze i fruktoze. Za te analize ne postoje standardi pa se metoda infracrvene spektrometrije u utvrđivanju kemijskog sastava fermentiranih mlijeka smatra rutinskom. Umjeravanje mjernog područja instrumenta postiže se pomoću linearne regresije usporedbom s rezultatima dobivenim referentnim metodama.

U kontroli kemijskog sastava fermentiranih mlijeka, osobito u dizajnu novih proizvoda, preporučuje se

koristiti standardne i referentne metode. Referentna metoda za utvrđivanje suhe tvari fermentiranih mlijeka je gravimetrijska metoda (HRN ISO 13580:2010), koja uključuje sušenje najmanje 1 dL uzorka na temperaturi 102 ± 2 °C do konstantne težine. Kako bi se kompenzirao gubitak vode koji je rezultat neutralizacije jogurta cink-oksikom (~ 2 g najmanje čistoće 99 %), treba odrediti i titracijsku kiselost analiziranog jogurta (izraženu u gramima mliječne kiseline u 100 g jogurta) u skladu sa standardom (HRN ISO 11869:1999). Uzorke prirodnih i voćnih varijanti fermentiranih mlijeka prije analize treba zagrijati na temperaturu između 20 i 25 °C i homogenizirati.

Udjel suhe tvari izražava se kao postotak mase (% suhe tvari), a izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ suhe tvari} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100 + (0,1 \times a)$$

gdje je:

m_0 = masa posudice s poklopcem, štapićem i cink-oksikom

m_1 = masa posudice s poklopcem, štapićem, cink-oksikom i uzorkom

m_2 = masa posudice s poklopcem, štapićem, cink-oksikom i osušenim uzorkom

a = titracijska kiselost uzorka prema ISO 11869

0,1 = korekcijska vrijednost za gubitak vode zbog neutralizacije cink-oksikom.

Klasičnim se metodama mliječna mast u fermentiranom mlijeku može utvrđivati gravimetrijskom metodom po Röse-Gottliebu, ili volumetrijskom metodom po Gerberu.

Vrijednost pH gotovog proizvoda određuje se potenciometrijskom metodom redovito umjerenim pH-metrom. Kalibracija podrazumijeva standardizaciju mjernog područja instrumenta korištenjem pufera koji imaju pH-vrijednost višu i nižu od očekivane pH-vrijednosti uzorka. Za fermentirana mlijeka uobičajeno se za kalibraciju pH-metra koriste puferi pH-vrijednosti 4 i 7.

Navedene osnovne analitičke metode prvenstveno služe za evaluaciju samoga tehnološkog procesa i zbog kontrole zadanih standarda u deklaraciji proizvoda. U



Slika 8.2.

Prirodan izgled voćnog jogurta s dodatkom jagode.



Slika 8.3.

Različiti intenzitet boje voćnog jogurta s dodatkom jagode.

slučajevima kada su fizikalno-kemijski parametri u željenim okvirima dodatne ili specifične analize fizikalnih svojstava fermentiranih mlijeka nisu neophodne.

U osnovne analize za procjenu kvalitete fermentiranih mlijeka ubraja se i organoleptička ocjena izgleda, boje, mirisa, okusa i konzistencije gotovog proizvoda. Njihova je prvenstvena svrha utvrditi odstupanja od željenih i zadanih karakteristika proizvoda i očekivanja potrošača. Kada se proizvodu dodaje boja o proizvođaču ovisi treba li ona biti prirodna, prirodno identična ili sintetska da bi se dobio željeni izgled proizvoda. Međutim, intenzitet se izabrane boje može promijeniti zbog različito dodane koncentracije. Određenim skupinama potrošača koji preferiraju boju sličnu originalnom voću (primjerice svijetloružičasta za jogurt s dodatkom jagode) favoriziranje izrazito tamnih nijansi boje može biti uzrok odbijanja od kupnje proizvoda. Primjer prirodne boje jogurta s dodatkom jagode koja je slična originalnoj boji jagode prikazuje slika 8.2. Za ilustraciju, na slici 8.3. prikazan je intenzitet boje jogurta s dodatkom jagode različitih proizvođača. Zbog toga se objektivna ocjena boje za voćne i aromatizirane varijante fermentiranih mlijeka u smislu moguće korekcije proizvodnje smatra izrazito važnim svojstvom.

Internu organoleptičku kontrolu kvalitete fermentiranih mlijeka u mljekari poželjno je provoditi svakodnevno. Kako je ta analiza subjektivna, procjenu kvalitete proizvoda moraju obavljati uvježbane stručne osobe u timu od najmanje pet članova. Za opis pojedinih svojstava proizvoda koristi se IDF standard 99A:1987, a svakom se svojstvu ovisno o usvojenom bodovnom sustavu dodjeljuje određen broj bodova. U Hrvatskoj se koristi bodovni sustav od 20 bodova, koji podrazumijeva sljedeća dva načina rada: (i) za svaku se pogrešku od maksimalnog broja bodova za određeno idealno svojstvo oduzima najmanje 0,25 bodova,

Tablica 8.1.

Faktori značaja i ponderirani bodovi za ocjenjivana svojstva fermentiranih mlijeka

Svojstvo	Faktor značaja	Ponderirani bodovi
Okus	2,0	10
Tekstura	1,2	6
Miris	0,4	2
Boja	0,2	1
Opći izgled	0,2	1

Tablica 8.2.

Svojstvo	Najveći broj bodova	Postignuti broj bodova	Napomena
Izgled	2	1,75	previše napunjen
Boja	1	1	—
Tekstura (konzistencija)	3	2,5	previše mekana
Miris	2	2	—
Okus	12	10	slabo izražena aroma po acetaldehidu
Ukupno	20	17,25	—

Ocjenjivački list za fermentirana mlijeka bez dodataka (uzorak: čvrsti jogurt)

Tablica 8.3.

Svojstvo	Najveći broj bodova	Postignuti broj bodova	Napomena
Izgled	2	1	premalo napunjen, izdvojen stabilizator
Boja	2	1,5	blijeda
Tekstura (konzistencija)	3	2,25	previše rijetka
Miris	3	2	neizražen, ne osjeti se miris jagode
Okus	10	8	vodenast
Ukupno	20	14,75	—

Ocjenjivački list za fermentirana mlijeka s dodacima (uzorak: voćni jogurt s dodatkom jagode)

ili (ii) svako se svojstvo ocjenjuje ocjenom od 1 do 5 a ostvarena ocjena za pojedinačno svojstvo se množi s faktorom značajnosti. U slučajevima ako se u ocjeni proizvoda koristi faktor značajnosti, ukupna se ocjena izražava ponderiranim bodovima (tablica 8.1.).

Odstupanja od idealnog obilježja određenog svojstva proizvoda opisne su prirode. U suglasju s opisom veličine pogreške, analiziranom se svojstvu dodjeljuju negativni bodovi. Opisni termini koji određuju odstupanja od idealnog obilježja za svojstvo izgleda, boje, teksture, mirisa i okusa su sljedeći:

- izgled - prepunjeno, premalo napunjeno, skvrčen izgled, nejednolika površina, netipična boja, smeđa boja, mramorirani, neujednačena boja, zračni mjehurići, izdvojena sirutka, strane tvari, pljesniv, pjenušav, odvojene faze (npr. raspuknuti gel i izdvojena sirutka), sediment na dnu, slabo - nedovoljno homogenizirani dodani sastojci
- boja - atipična, previše ili premalo izražena, umjetna (kada se radi o fermentiranom mlijeku s dodacima voća, boja i slično)
- tekstura - grudičasta, pahuljasta, nejednolika, ljepljiva, lomljiva, previše gusta, previše tekuća, suha, želatinozna, tekuća

- miris - stran, atipičan, bez mirisa, miris po kvascima, miris po plijesnima, miris po pasterizaciji, miris po sladu
- okus - vodenast, bezličan, gorak, okus po kuhanom, uljast, kemijski okus, strani okus, okus po siru, okus po sladu, oksidirani okus, kiseli, oštar, slabo kiseli, bez osjeta kiseline, mastan, nečist, previše sladak, pokvaren.

Primjeri načina bodovanja organoleptičkih svojstava prirodnoga i voćnog jogurta kada ona odstupaju od idealnog obilježja za svojstvo izgleda, boje, teksture, mirisa i okusa i ocjenjivačke liste prikazani su u tablicama 8.2. i 8.3.

Prema vlastitim zadanim ciljevima kvalitete za određenu vrstu fermentiranog mlijeka, na temelju postignutog broja bodova proizvođač se odlučuje da li je ona za njega, izvrsna, vrlo dobra, dobra, zadovoljavajuća, dovoljna, loša ili vrlo loša. Zbog činjenice da se neovisno o stručnosti ocjenjivačkog tima organoleptička ocjena proizvoda temelji isključivo na ljudskim osjetilima, velika je vjerojatnost pogreške u objektivnosti prosudbe. Zbog toga se za povećanje objektivnosti preporučuje 2 - 3 puta godišnje provesti statističku

analizu ukupnih rezultata svakoga pojedinačnog ocjenjivača primjenom Spearmanove rang-korelacije (engl. *Spearman's rank correlation*). Spearmanovom rang-korelacijom (r_s), koja je u statističkom smislu neparametarski test, jednostavno se može utvrditi jesu li ocjenjivači ujednačeni i jesu li njihove ocjene u korelaciji korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

Za ilustraciju, način provođenja Spearmanove rang-korelacije u nastavku je teksta u tablici 8.4. prikazan rezultat ocjena za rangiranje 10 proizvoda ocjenom od 1 do 10 (1 najbolji, a 10 najlošiji) za dva ocjenjivačka povjerenstva, i način tumačenja rezultata.

$$r_s = 1 - \frac{6 \times 10}{10(99)} = 1 - \frac{6}{99} = 0,94$$

$$n = 10$$

Vrijednost $r_s = 0,94^{**}$ uspoređuje se s tabličnom za n broj parova:

$$r_s (p = 0.05) = 0,648$$

$$r_s (p = 0.01) = 0,794$$

$r_s \geq r_s (p = 0.01)$ - nulta hipoteza (H_0) se odbacuje ($p = 0.01$); ocjene ocjenjivačkih timova su ujednačene, odnosno u vrlo su jakoj pozitivnoj korelaciji.

Suprotno, istim testom utvrđeni negativni korelacijski koeficijent za pojedinačnog ocjenjivača znači da je njegova objektivna sposobnost procjene kvalitete lošija od prosjeka. Zamjena objektivno lošijeg s objektivno boljim ocjenjivačem ključna je za poboljšanje kvalitete interne organoleptičke ocjene proizvoda.

Skupinu specifičnih analiza fermentiranih mlijeka čine precizna mjerenja: (i) udjela aromatskih komponenti u proizvodu, (ii) reoloških parametara oblikovanog gela i (iii) kapaciteta za vezanje vode. Udjel karakterističnih aromatskih komponenti okusa fermentiranih mlijeka, prvenstveno diacetila, acetaldehida i etanola (za kefir ili kumis) dokazuju se plinskom kromatografijom (GC). Zbog iznimne nestabilnosti tih hlapljivih spojeva, za točnost i pouzdanost rezultata razvijena je

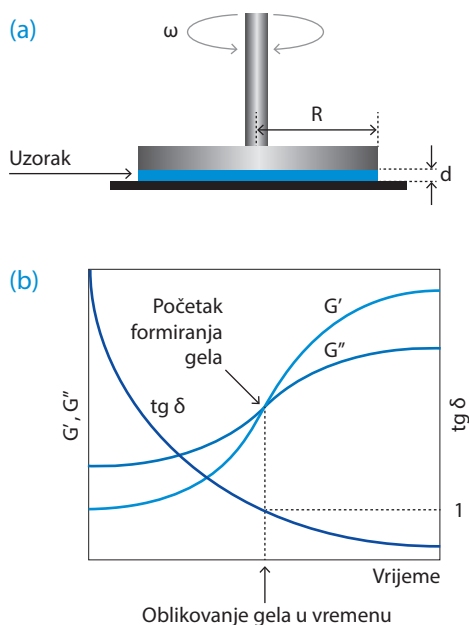
Tablica 8.4.

Primjer načina provođenja Spearmanove rang-korelacije (r_s)

Proizvod	Ocjenjivač A	Ocjenjivač B	d	d ²
1	4	5	-1	1
2	1	2	-1	1
3	9	10	-1	1
4	5	6	-1	1
5	2	1	1	1
6	10	9	1	1
7	7	7	0	0
8	3	3	0	0
9	6	4	2	4
10	8	8	0	0

metoda koja onemogućava oksidativnu dekarboksilaciju. Metoda GC prije mjerenja zahtijeva namještanje pH-vrijednosti uzorka na 7. Procedura mjerenja kvantificira i udjele ostalih hlapljivih komponenti u uzorku, acetona, acetoina, 2, 3-butilen glikola, ili etilacetata.

Mjerenja reoloških parametara fermentiranih mlijeka koja uključuju svojstva čvrstoće, viskoznosti, kohezivnosti, elastičnosti i viskoelastičnosti oblikovane strukture gela najčešće se provode instrumentima koji rade na principu kompresije (analizatori teksture) ili rotacije (viskozimetar, reometar). Za čvrste varijante fermentiranih mlijeka reološko svojstvo čvrstoće oblikovanoga gela u praksi se najučinkovitije procjenjuje mjerenjem njegove otpornosti na pucanje. Odnosno, njegove kritične točke prije pucanja strukture gela mjerene jednim od kompresijskih testova. U praksi, za tu se svrhu najčešće koristi standardni penetrometar. Mjerenje čvrstoće gel-strukture tim instrumentom temelji se na principu konstantne brzine (~ između 10 i 100 mm min⁻¹) penetracije cilindričnog klipa u uzorak ohlađen na temperaturu nižu od 10 °C. Odgovor na silu promatra se kao funkcija dubine penetracije cilindričnog klipa u uzorak. Tekuće varijante fermentiranih mlijeka s reološkog gledišta svrstavaju se u newtonovske fluide, zbog toga se za procjenu njihove viskoznosti preporučuje koristiti dinamičke reološke instrumente (slika 8.4.) kojima se određuju



Slika 8.4.

Shematski prikaz principa mjerenja dinamičkim reometrom. Detalji: (a) stalna sila smicanja u paralelnoj konfiguraciji ploča reometra, (b) dinamička viskoelastična svojstva gel-strukture kao funkcija reakcije u vremenu. (Murata, 2012., CC BY 3.0)

njihova viskoelastična svojstva. Dinamička reološka mjerenja temelje se na primjeni slabe sile i mjerenju odgovora materijala na primijenjenu silu.

Vrijednosti mjerenja viskoznosti izražavaju se preko modula pohrane (G') koji predstavlja elastična svojstva i modula gubitka (G'') koji predstavlja viskozna svojstva kao funkcije amplituda malih oscilacija (primjerice uz frekvenciju od 0,25 Hz i amplitudni raspon od 2×10^{-3} do 2×10^{-2} mNm). Dobro proizveden tekući jogurt ima za modul pohrane (G') 5 - 7 puta višu vrijednost od modula gubitka (G''). Dinamičkim reološkim mjerenjima može se procijeniti da li je temperatura inkubacije optimalno izabrana, ili procijeniti utjecaj mikrobnog kulture na fermentaciju. U tom će smislu jogurt čija je fermentacija provedena na temperaturi

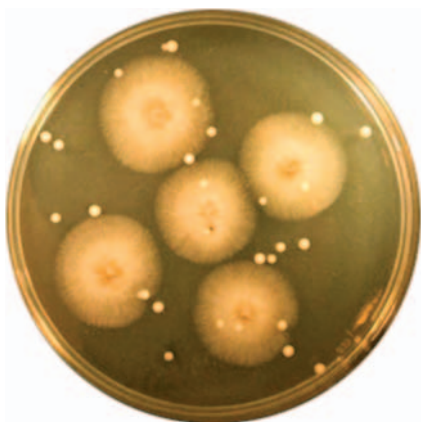
od 42 °C pokazati veće vrijednosti za modul pohrane (G') i modul gubitka (G'') u usporedbi s jogurtom inkubiranim na temperaturi od 37 °C. Dobiveni rezultat mjerenja predstavlja prividnu viskoznost tekućih varijanti fermentiranih mlijeka. Ako je potrebno, iz modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') može se izračunati i modul gubitka tangente ($\delta = G''/G'$) koji određuje vrstu viskoelastičnih svojstava u uzorku. Tako neovisno o viskoznosti, vrijednosti $\text{tg } (\delta) > 1$ znače da gel-struktura fermentiranog mlijeka ima više tekuća, a < 1 više "kruta" svojstva. Priprema uzoraka i način mjerenja viskoziteta proizvoda pomoću dinamičkih reoloških instrumenta izvode se prema uputama proizvođača instrumenta.

Analizom kapaciteta proizvoda za vezanje vode zapravo se procjenjuje predispozicija proizvoda za sine-rezu. Pojam sinereza koristi se za izdvajanje sirutke ili seruma iznad gornje površine gel-strukture proizvoda i tehnološki je pojam. Sama po sebi ona nije niti najmanje štetna za potrošača, ali je zato dobar indikator za tehnološke pogreške nastale tijekom proizvodnje. Za mjerenje sinereze ne postoji standardizirani analitički postupak, pa se ona utvrđuje različitim metodama koje se temelje ili na principu gravitacije ili na principu centrifugalne sile. Zbog toga se preporučuje da proizvođač sam izabere metodu pomoću koje će najobjektivnije moći procijeniti u kojem dijelu proizvodnje griješi. U okviru zadanih uvjeta proizvodnje, procjena kapaciteta vezanja vode proizvoda smatra se učinkovitom analizom za minimaliziranje mogućeg uzroka nepoželjnih pogrešaka.

8.3.2.

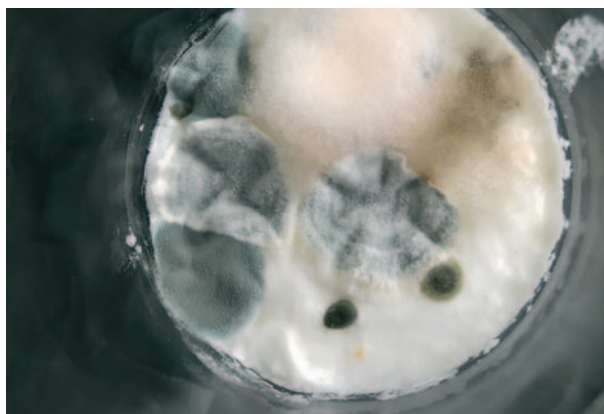
Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize gotovih fermentiranih mlijeka uključuju procjenu: (i) mikrobnih uzročnika kvarenja, (ii) prisutnost patogenih bakterija i (iii) broja standardnih i specifičnih mikroorganizama iz sastava kulture. Indirektno, u mikrobiološke analize



Slika 8.5.

Izgled kolonija kvasaca (male kolonije) i plijesni (velike kolonije) na kvašćevom ekstrakt dekstroza- kloramfenikol hranilištu. (LAB 119.)



Slika 8.6.

Izgled kolonija plijesni na površini čvrstog jogurta.

ubraja se i dnevna procjena aktiviteta kulture koja će se koristiti u tekućoj proizvodnji.

8.3.2.1.

Mikrobni uzročnici kvarenja

Niska pH-vrijednost i visoka koncentracija mliječne kiseline koju sadrže fermentirana mlijeka idealna su sredina za rast kvasaca i plijesni. Zbog toga se može ustvrditi da su ti organizmi, a osobito kvasci, glavni uzročnici kvarenja fermentiranih mlijeka. U proizvod dopijevaju naknadnom kontaminacijom i higijenski lošom kvalitetom voća ili drugih ingredijenata. Vrste kvasaca poput *Kluyveromyces marxianus* i *Saccharomyces* spp., koje su sposobne fermentirati laktozu i neke druge šećere, osim u kefiru i kumisu, kod svih ostalih fermentiranih mlijeka uzrokuju nepoželjnu plinovitu fermentaciju.

U slučajevima pojave plinovite fermentacije uzrokovane kvascima nužno je odmah poboljšati higijenske uvjete proizvodnje. Pogreška se osim prema konzistenciji, okusu i mirisu proizvoda (izraženi miris i okus po kvascima) prepoznaje i po izdignutom poklopcu,

napuhnutoj ambalaži, a pri većim kontaminacijama ambalaža proizvoda može se i raspuknuti. Vrste kvasaca kao što su *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulasporea*, *Trichosporon* takozvani su oksidativni kvasci koji u proizvodu rastu dok ima raspoloživog kisika. Pogreška se prepoznaje po rastu vlažnih, ravnih kolonija, ili kvasci mogu rasti u formi gustog filma na površini proizvoda ili uz rubove ambalaže. Kontaminacija kvascima ili plijesnima mora se redovito pratiti, a najbolje se dokazuje na malt ekstrakt hranilištu kojem je dodana mliječna kiselina, ili na hranilištu koji sadrži kloramfenikol (slika 8.5.).

Premda u usporedbi s kvascima plijesni rjeđe kontaminiraju fermentirana mlijeka, kontaminacija plijesnima predstavlja značajan problem kada se proizvodi prije prodaje duže vrijeme drže na temperaturi oko 0 °C. Rastu u zračnom prostoru između površine proizvoda i poklopca u formi vidljivih micela koje sličie gustom pokrovu ili velikim gumbima (slika 8.6.).

Osim kvasaca i plijesni, u fermentiranom mlijeku određuje se i broj *Enterobacteriaceae*. Uobičajeno se za tu namjenu može koristiti kristal-violet neutralni-crveni žučni agar s glukozom (VRBG).

Prema mikrobiološkim standardima, za fermentirana mlijeka definirane su donja ($m = 10 \text{ cfu g}^{-1}$) i gornja ($M = 10^2 \text{ cfu g}^{-1}$) granična vrijednost broja izraslih kolonija kvasaca, plijesni i enterobakterija. U slučajevima kada je cfu g^{-1} manji od 10, rezultat se interpretira kao zadovoljavajući, a ako je on između m i M , rezultat se definira kao prihvatljiv. Pojedinačan broj bilo koje mikrobne vrste veći od M znači da proizvod ne zadovoljava propisane kriterije kvalitete.

8.3.2.2.

Pojavnost patogenih bakterija

Fermentirana mlijeka zbog niske pH-vrijednosti i visoke koncentracije mliječne kiseline, rijetko su povezana s kontaminacijom patogenim bakterijama. Infekcija fermentiranih mlijeka patogenim organizmima ipak je moguća:

- tehnološkim pogreškama kada je pH-vrijednost proizvoda > 5
- u proizvodnji slabo kiselih fermentiranih mlijeka
- u slučajevima reinfekcije pasteriziranog mlijeka ili gotovih proizvoda
- zbog kontaminiranih ingredijenata ili voća.

Zbog toga se preporučuje povremena kontrola fermentiranih mlijeka na pojavnost za čovjeka izrazito patogenih bakterija: *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus* spp. i *Staphylococcus aureus*.

8.3.2.3.

Utvrđivanje broja bakterija iz sastava kulture

Utvrđivanje broja bakterija iz sastava korištene kulture u proizvodnji određene vrste fermentiranog mlijeka primarno je određeno općeprihvaćenim Codex Alimentarius standardom za fermentirana mlijeka (Codex Stan 243). Broj bakterija iz sastava standardne

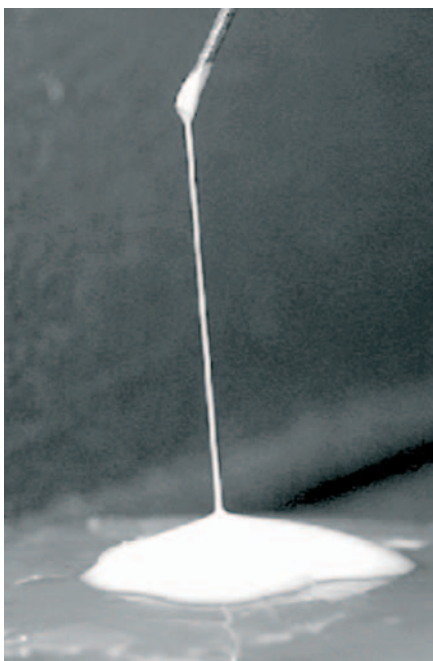
kulture prema standardu na kraju vijeka održivosti fermentiranog mlijeka mora biti veći od 10^7 cfu g^{-1} . Istodobno, broj specifičnih mikroorganizama iz sastava kulture, poput probiotičkih bakterijskih sojeva, u trenutku konzumacije proizvoda mora biti veći od 10^6 cfu g^{-1} . Kefir i kumis prema istom standardu moraju na kraju svog vijeka održivosti sadržavati najmanje 10^4 cfu g^{-1} kvasaca. Utvrđivanje broja bakterija iz sastava korištene kulture u proizvodu važno je i zbog prosuđivanja ispravnosti samoga tehnološkog postupka. Niža populacijska razina od 10^7 cfu g^{-1} *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u klasičnom jogurtu može biti povezana s predugim trajanjem fermentacije, ali i s izostankom razvitka karakterističnih aromatskih tvari u proizvodu. Suprotno, prevelika populacijska razina tih organizama u jogurtu uzrokuje previsoku kiselost, pojačanu sinerezu i neizbalansiranost okusa. Posljedično kontinuiranom stvaranju mliječne kiseline tijekom pohrane proizvod se sustavno kvari.

8.3.2.3.1.

Mikrobne vrste jogurtne kulture

Za utvrđivanje broja bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u standardnom jogurtu uobičajeno se koriste mikrobna hranilišta koja odvajaju rast jedne ili druge vrste, ili razlikuju obje vrste na istom hranilištu.

Hranilište M17 koje sadrži di-natrijev-glicerofosfat (pH-6,8) selektivno je hranilište preporučeno i od Mljekarske međunarodne organizacije (FIL-IDF) za utvrđivanje broja *S. thermophilus* u jogurtu. Bijeke kolonije u promjeru veličine 1 - 2 mm vidljive su nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od $35 \text{ °C}/48$ sati. Također, hranilište M17 može se uspješno koristiti i za morfološko razlikovanje laktoza negativnih od laktoza pozitivnih sojeva u kulturi. Morfološki, kolonije laktoza negativnih sojeva *S. thermophilus* značajno su manje od kolonija laktoza pozitivnih sojeva. Uz dodatak Ca hranilište M17 može se uspješno koristiti i za dokazivanje bakteriofagne infekcije streptokoka. Nakon završene inkubacije uzoraka ($35 \text{ °C}/48$ sati)



Slika 8.7.

Makroskopski izgled "sluzave" niti koja se formira iz stanične mase EPS+ sojeva bakterija mliječne kiseline sadržanih u komercijalnoj kulturi za jogurt na MRS hranilištu. (Ruas - Madiedo i de los Reyes - Gavilán, 2005., s dopuštanjem Elseviera.)

bakteriofagna infekcija streptokoka prepoznaje se po jasno vidljivom plaku koji prekriva bakterijske kolonije.

Hranilište MRS (de Man Rogosa Sharpe) s reduciranim pH-medija na 5,2 preporučeno je hranilište za utvrđivanje broja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u jogurtu. Nakon anaerobne inkubacije na 43 °C/72 sata ta bakterija tvori vidljive bijele, grube, nepravilne kolonije približnog promjera 1 mm.

MRS hranilište obogaćeno visokim koncentracijama saharoze (100 mg/L) preporučuje se koristiti za utvrđivanje egzopolisaharid pozitivnih sojeva EPS (+) bakterija mliječne kiseline u jogurtu. Na površini MRS hranilišta EPS (+) sojevi nakon inkubacije uzoraka na 37 °C/72 sata tvore mukozne sluzave kolonije koje

pokazuju neprekinutu nit kada se staklenim štapićem izdignu od površine (slika 8.7.).

Selektivno L-S hranilište (*Lactobacillus/ Streptococcus* razlikovni agar) koje sadrži 10 % obranog mlijeka u prahu i 2 % trifeniltetrazolium klorida (TTC), primjer je hranilišta za istodobno utvrđivanje obiju vrsta organizama jogurtne kulture u proizvodnju. Ukupan broj i omjer sojeva *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u jogurtu se prosuđuje prema morfološkim razlikama poraslih kolonija nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 42 °C/48 sati. Kolonije laktobacila su crvene, nepravilnog oblika ("nazubljen rub"), okružene bijelom neprozirnom zonom, a u promjeru su veličine 1,0 - 1,05 mm. Streptokoki na L-S hranilištu također rastu kao crvene kolonije, ali su one pravilnoga okruglog ili ovalnog oblika i upola su manje (0,2 - 0,5 mm) u usporedbi s veličinom kolonija laktobacila. Nakon brojanja kolonija izračunava se relativan broj svake vrste pojedinačno. Ukupan broj organizama u finalnom proizvodnju dobre kvalitete mora biti za svaku pojedinačnu vrstu > 10⁷ cfu mL⁻¹, a omjer podjednak (1 : 1). Neke od ostalih selektivnih hranilišta i opis izgleda kolonija prikazuje tablica 8.5.

Nabrojena komercijalna hranilišta nisu selektivna za ostale termofilne vrste bakterija mliječne kiseline. Važno je napomenuti da niti svi sojevi *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* neće na tim hranilištima pokazati tipične reakcije.

U praksi, za rutinsko prosuđivanje ukupnog broja i omjera streptokoka i laktobacila u mikrobnjoj kulturi za jogurt i finalnom proizvodnju najčešće se koristi brza metoda brojanja organizama na predmetnici pod mikroskopom. Postupak je sljedeći:

- uzorak se razrijedi u 1 %-tnoj otopini peptona na razrjeđenje 10⁻¹
- razrijeđeni uzorak dobro se promiješa 30 sekundi prije izuzimanja količine uzorka od 0,01 mL
- uzorak se nanese na predmetnicu u krugu od 1 cm²
- boji se najčešće metilenskim modrilom
- promatra pod mikroskopom.

Za utvrđivanje ukupnog broja organizama u 1 mL dovoljno je brojati 10 nasumično odabranih

Tablica 8.5.

Komersijalna selektivna hranilišta za brojanje *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u mikrobnjoj kulturi i jogurtu

Hranilište	Izgled kolonija		Uvjeti inkubacije
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
Lee's hranilište	male žute, glatke s ravnim rubovima	velike blijedožute, ravne, nepravilni nazubljeni rubovi	mikroaerofilni 37 °C/48 h
YLA ili jogurt mliječni agar	male bijele	velike, bijele, okružene zamućenom jasno vidljivom zonom	anaerobni 37 °C/48 h
LAB agar	male, okrugle ili u obliku leće	grube, nepravilne	anaerobni 42 °C/48 h
Modificirani mliječni agar s trifeniltetrazolium kloridom (TTC)	male crvene kolonije	velike bijele	anaerobni 37 °C/48 h
TYP–HGME agar	male svijetloplave kolonije	velike tamnoplave kolonije	anaerobni 37 °C/72 h
YGLP–YLA agar	male briljantno bijele kolonije	velike bijele kolonije	anaerobni 37 °C/48 h
RCPB agar	velike bijele kolonije s malom plavom zonom	male bijeloplave kolonije sa širokom plavom zonom	anaerobni 37 °C/48 h

mikroskopskih polja. Zbog tendencije streptokoka da se miješanjem uzorka razdvoje u manje jedinice, za dobar omjer streptokoki : laktobacili uzima se omjer 2,7 : 1, kada je temperatura inkubacije 42 °C.

8.3.2.3.2.

Mikrobne vrste jogurtne i probiotičke kulture

Na tržištu postoje brojna selektivna hranilišta kojima je moguće određivati jednu mikrobnju vrstu u fermentiranom mlijeku. Za istodobno utvrđivanje prisutnosti različitih vrsta koje dijele slične morfološke karakteristike u većoj ili manjoj mjeri u praksi je prisutan problem njihova dokazivanja standardnim mikrobiološkim metodama. Naime, zbog opće prirodne kompleksnosti svih do sada poznatih bakterija samih po sebi, ne čudi činjenica da nije ni najmanje jednostavno izabrati najpogodnije bakteriološko hranilište. Osim toga, u nastojanju proizvođača da u relativno kratkom vremenu dizajniraju stalno nova fermentirana mlijeka s dodatkom različitih mikrobnih vrsta BMK i bifidobakterija, na tržištu nije uvijek moguće osigurati pogodno bakteriološko hranilište. Posljedično tome dolazi do problema u izboru optimalnog hranilišta

kojim se može pouzdano utvrditi broj pojedinačnih bakterijskih vrsta u određenom fermentiranom mlijeku. Osobito je taj problem izražen za izbor hranilišta koje omogućava diferencijaciju različitih vrsta na istom hranilištu. U takvim slučajevima dodatan problem predstavlja i izbor najpogodnijih uvjeta inkubacije uzoraka. Neovisno o činjenici da se zbog objektivnosti u prosudbi i usporedivosti rezultata postojeće metode i hranilišta neprestano unaprjeđuju i modificiraju, ona se u načelu prema stupnju osjetljivosti i razlikovne moći grubo mogu podijeliti u nekoliko osnovnih skupina:

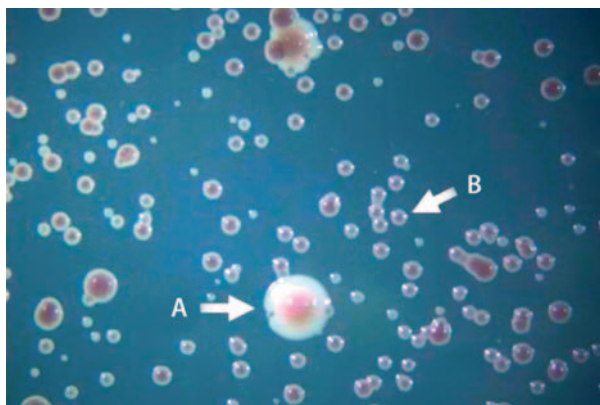
- MRS i M17 - neselektivna hranilišta za bakterije mliječne kiseline
- modificirano MRS hranilište
- selektivna hranilišta bez antibiotika
- MRS hranilište s različitom kombinacijom antibiotika
- selektivna hranilišta za bifidobakterije.

Tako se MRS hranilište za utvrđivanje broja različitih bakterijskih vrsta pojedinačno ili u mješovitoj kulturi obogaćuje žučnom soli, Na-propionatom, litijevim kloridom, cisteinom, gentamicinom ili dikloksacinom. Žučne soli koriste se za inhibiciju rasta neintestinalnih bakterija, a natrijev i litijev klorid za inhibiciju rasta *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp.

bulgaricus i *S. thermophilus*. Cistein u podlozi snižava oksidoredukcijski potencijal i favorizira rast mikroaerofilnih organizama. Određeni antibiotici se dodaju u podlogu za inhibiciju rasta određenih vrsta bakterija mliječne kiseline bez inhibicije rasta bifidobakterija.

U razlikovanju bakterijskih vrsta jogurtne kulture od *Bifidobacterium* spp. i *L. acidophilus* u proizvodnju dobrom se hranjivom podlogom pokazala TPPYPB podloga (triptozna proteozna pepton kvašičev ekstrakt agar kojem je dodan tamnoplavi sintetski dobiveni pigment - prusko plavetnilo). Bifidobakterije na TPPYPB podlozi rastu kao bijele kolonije, *S. thermophilus* kao blijedoplave kolonije okružene slabom blijedoplavom zonom, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kao male bijele kolonije okružene širokom zonom intenzivno plave boje, a *L. acidophilus* stvara velike bijele kolonije okružene zonom intenzivno plave boje.

Hranilište HHD (fruktoza, KH_2PO_4 , triptozna pepton, aminokiseline i peptidi iz kazeina, kvašičev ekstrakt, tween 80, zeleni-bromkrezol kao pH-indikator i agar) temelji se na sposobnosti diferencijacije homofermentativnih od heterofermentativnih vrsta bakterija mliječne kiseline (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*). Nakon inkubacije uzoraka na 30 °C/72 sata homofermentativne vrste tvore kolonije plave do zelene boje, a heterofermentativne vrste bijele boje. Također, HHD hranilište može se koristiti za utvrđivanje broja bakterija *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. Bakterija *S. thermophilus* na HHD hranilištu morfološki pokazuje dvije vrste kolonija: (i) male, okrugle glatke, prozirne kolonije ili (ii) okrugle, konveksne i tamnozeleno obojene kolonije. Morfološki su kolonije bifidobakterija slične kolonijama *S. thermophilus*, ali su manje prozračne i više konveksne. Kolonije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* su velike, nepravilnog oblika, ravne površine, obično svijetlozelene boje koja se pokazuje u formi crtica. Istodobno, bakterija *L. acidophilus* na HHD hranilištu tvori velike nepravilne kolonije konveksno-piramidalne površine svijetlosmeđe boje, u čijem je centru tamnozeleno mrlja. Prednost je ovog hranilišta u mogućnosti istovremene diferencije četiriju bakterijskih vrsta na istom hranilištu u relativno kratkom vremenu. Također, korištenjem HHM



Slika 8.8.

Izgled kolonija bakterija *B. longum* DJO10A (A) i *B. animalis* subsp. *animalis* Bb12 (B) na selektivnom BIM 25 hranilištu. (Scheller i O'Sullivan, 2011., s dopuštenjem Elseviera.)

hranilišta štedi se vrijeme potrebno za analize kao i količina potrebnih drugih hranilišta. Zbog toga se za utvrđivanje dviju različitih vrsta probiotičkih bakterijskih sojeva u kombinaciji s vrstama jogurtne kulture HHD hranilište smatra dobrom opcijom za rutinsku kontrolu te vrste proizvoda. Za utvrđivanje probiotičkih sojeva *L. acidophilus* sadržanih u fermentiranom mlijeku s drugim bakterijama mliječne kiseline ili bifidobakterijama dobru selektivnost pokazuju i hranilišta MRS - klindamicin agar (anaerobna inkubacija na 37 °C/48 - 72 sata) i X-Glu agar (anaerobna inkubacija 37 °C/48 - 72 sata).

Za utvrđivanje broja bifidobakterija u kombinaciji s drugim vrstama BMK sadržanih u fermentiranom mlijeku preporučuje se koristiti MRS-NPNL agar koji sadrži 0,05 % L-cistina. Uz anaerobnu inkubaciju na temperaturi od 37 °C/72 sata sastav MRS-NPNL agar podržava jedino rast bifidobakterija. Također, dobrom selektivnom podlogom za utvrđivanje broja *Bifidobacterium* spp. pokazalo se hranilište BIM 25 (*Bifidobacterium* - jod-acetat medium 25). Izgled kolonija dviju vrlo često korištenih probiotičkih sojeva vrsta bifidobakterija na BIM 25 hranilištu prikazuje slika 8.8.

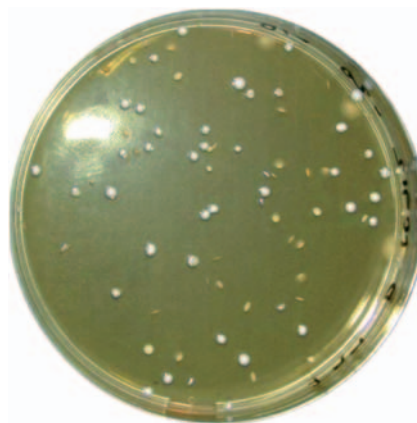
Za utvrđivanje pojedinačnih vrsta probiotičkih sojeva *B. animalis* Bb12, *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01 u mješovitim kulturama s *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* preporučuje se koristiti sljedeća hranilišta i inkubacijske uvjete:

- *B. animalis* Bb12 - 4ABC-MRS agar [A = dikloksacilin (2,0 mg/L), B = litijum klorid (5 g/L), C = cistein (0,5 g/L)]; 42 °C/anaerobni uvjeti
- *L. acidophilus* LA-5- LC agar, 42 °C/aerobni ili anaerobni uvjeti
- *L. casei* LC-01-LP-MRS agar [MRS agar obogaćen litijevim kloridom (2 g/L) i natrijevim propionatom (3 g/L)]; 42 °C/aerobni ili anaerobni uvjeti
- *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i probiotičke bakterije (*B. animalis* Bb12, *L. acidophilus* LA-5, *L. casei* LC-01) - MRS agar zamjenom glukoze s maltozom uz inkubaciju uzoraka na 37 °C ili 42 °C u anaerobnim uvjetima dobro diferencira probiotičke od neprobiotičkih bakterija.

U slučajevima ako se u proizvodnji fermentiranih mlijeka uz jogurtne vrste koristi jedino probiotički soj *L. acidophilus*, za utvrđivanje ukupnog broja te bakterije može se izabrati LC agar. Inkubacija za *L. acidophilus* organizira se u aerobnim ili anaerobnim uvjetima na temperaturi od 42 °C. Istodobno, za utvrđivanje broja bakterijskih vrsta jogurtne kulture koristi se MRS ili MRS (pH-5,4) agar.

Hranilište MRS uz dodatak otopine antibiotika (vankomicina, klindamicina ili ciprofloksacina) ili LC agar mogu se koristiti za utvrđivanje broja probiotičkih bakterija *L. casei* i *L. rhamnosus* u fermentiranom mlijeku. Izgled kolonija *L. rhamnosus* na MRS hranilištu s dodatkom vankomicina (50 mg/L) prikazuje slika 8.9.

Inkubacija u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima na temperaturi nižoj od 37 °C za MRS/48 - 72 sata i 27 °C/72 sata za LC agar selektivna je za utvrđivanje broja *L. casei* kada bakterija *L. rhamnosus* nije prisutna u proizvodu. U slučajevima ako su u proizvodu prisutne obje vrste, broj *L. casei* utvrđuje se korištenjem



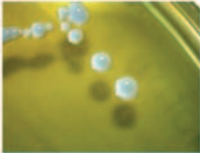
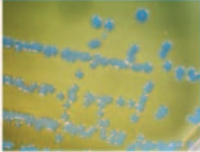
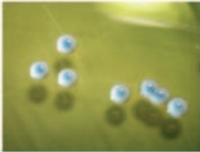
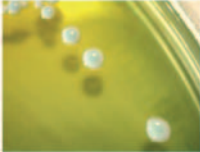

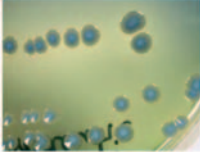

Slika 8.9.

Morfološka razlika izgleda kolonija *L. rhamnosus* (bijelesne ujednačene kolonije) između ostalih mikrobnih vrsta sadržanih u probiotičkom fermentiranom mlijeku na MRS hranilištu nakon anaerobne inkubacije na temperaturi od 37 °C/72 sata.

MRS hranilišta inkubacijom uzoraka na temperaturi od 37 °C/72 sata. Istovremeno, broj *L. rhamnosus* na MRS hranilištu utvrđuje se nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 43 °C/72 sata.

Modificirana MRS hranjiva podloga može se koristiti za dokazivanje različitih probiotičkih bakterijskih sojeva različitih vrsta. Modifikacija podrazumijeva obogaćivanje MRS agara s 1 % vankomicina, 0,05 % L-cisteina i korekciju pH-medija na $6,2 \pm 0,2$ s 1 M HCl. Dodatak plavog bromkrezola u hranilište u koncentraciji od 0,002 % služi kao indikator (0,02 g/L otopi se u 1 M Na OH). Nakon inkubacije u anaerobnim uvjetima (37 °C/72 sata) na temelju morfološkog izgleda kolonija poraslih na hranilištu mogu se razlikovati bakterije *L. casei*, *L. paracasei*, *L. casei* Shirota, *L. reuteri* ili *L. plantarum* (slika 8.10.).

Selektivno utvrđivanje broja različitih bakterijskih vrsta sadržanih u probiotičkom fermentiranom mlijeku može se postići i korištenjem MRS i M17 hranilišta bez dodatka antibiotika, neznatnom modifikacijom sastava ili zamjenom određenih šećera u hranjivoj podlozi.

<i>Lactobacillus</i> spp.	Morfološki izgled kolonija	Opis
<i>L. casei</i> ATCC 4646		2 - 5 mm u promjeru, okrugle, konveksne s ravnim rubovima, glatke i sjajne površine; krem boja prstena sa plavim centrom, maslaste konzistencije; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zeleno/žutu boju (pH < 5)
<i>L. paracasei</i> F19		1 - 3 u promjeru, okrugle, ravne s ravnim rubovima, glatke i sjajne površine; često pigmentirane; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zelenkasto/žučkastu boju (pH < 5)
<i>L. casei</i> ATCC Shirota, Vakult®		2 - 5 mm u promjeru, okrugle, konveksne s ravnim rubovima, glatke i sjajne površine; krem boja prstena sa plavim centrom; maslaste konzistencije; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zelenkasto/žučkastu boju (pH < 5)
<i>L. casei</i> ATCC DN-114 001, Actimel®		2 - 5 mm u promjeru, okrugle, konveksne s ravnim rubovima, glatke i sjajne površine; krem boja prstena sa plavo/zelenim centrom, maslaste konzistencije; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zeleno/žutu boju (pH < 5)
<i>L. reuteri</i> NCIMB 11951		1 - 5 mm u promjeru, okrugle, uzdignute, ravni rubovi; prozirni okrugli prsten oko svijetlo plavog centra; sluzave/mukozne konzistencije; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zelenkasto/žučkastu boju (pH < 5)
<i>L. reuteri</i> Prodentis®, Perio Balance™		1 - 5 mm u promjeru, često okrugle, uzdignute, ravni rubovi, okrugli plavi prsten oko svijetlo plavog centra; sluzave/mukozne konzistencije; tvorba kiseline je indicirana promjenom boje agara u zelenkasto/žučkastu boju (pH < 5)
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8014		1 - 3 mm u promjeru, nepravilne, ravne sa izdignutim centrom, sjajna hrapava površina; bijelo/krem boje, bez pigmentacije, bez vidljive tvorbe kiseline

Slika 8.10.

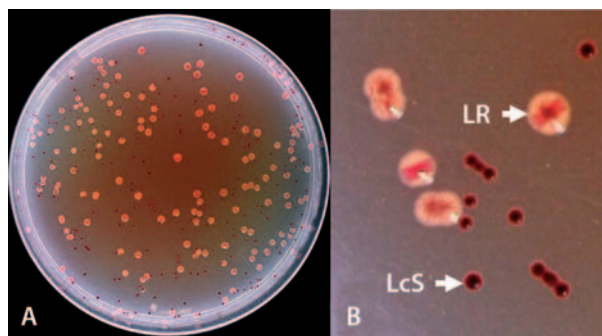
Morfološki izgled kolonija sojeva *Lactobacillus* spp. izoliranih iz komercijalnih probiotičkih fermentiranih mlijeka poraslih na modificiranom MRS hranilištu (vankomicin, L-cistein, plavi bromfenol, pH-6,2) nakon anaerobne inkubacije na temperaturi od 37 °C/72 sata. (Sutula i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)



Slika 8.11.

Različiti izgled kolonija bakterija termofilne kulture.

Detalji: (a) razlika između izgleda kolonija bakterija *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *B. lactis* na MRS-fruktoza hranilištu, (b) razlika između *L. acidophilus* i *L. paracasei* subsp. *paracasei* na MRS-maltoza hranilištu. (Tabasko i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)



Slika 8.12.

Izgled kolonija *L. casei* Shirota i *L. rhamnosus* DMS 20021^T poraslih na M-RTLTV selektivnom hranilištu.

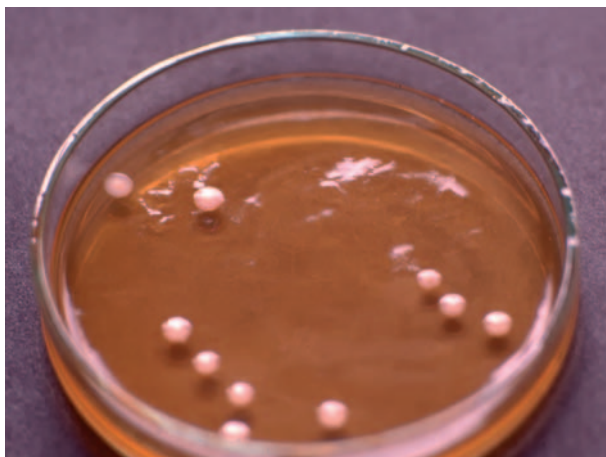
Detalji: LcS - *L. casei* Shirota, LR- *L. rhamnosus* DMS 20021^T; (A) mješovita kultura LcS i LR na M-RTLTV selektivnom hranilištu, LcS-okrugle crvene kolonije, LR-okrugle bijele kolonije s crvenom mrljom, (B) uvećana slika slike A. (Sakai i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)

Tako se na hranilištu M17 s dodatkom 1 % laktoze i inkubacijom uzoraka na temperaturi od 43 °C/24 sata može utvrditi broj *S. thermophilus*. MRS obogaćeno hranilište sa 0,2 % Tween 80, i s dodatkom 1 % fruktoze, 0,8 % hidrolizata kiselog kazeina i 0,05 % cisteina pogodno je za utvrđivanje broja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. acidophilus*. Nakon inkubacije na temperaturi od 45 °C/72 sata *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tvori lentikularne (slične leći) kolonije u promjeru 1 - 2 mm. Kolonije *L. acidophilus* na istom hranilištu imaju izgled pamučne vate i promjera su 2 mm (slika 8.11. a).

Zamjenom laktoze s maltozom i izostavljanjem 0,8 % hidrolizata kiselog kazeina iz MRS modificiranog hranilišta, i inkubacijom uzoraka u mikroaerofilnim uvjetima (20 % CO₂) na 37 °C/72 sata jasno se može razlikovati vrsta *L. acidophilus* i podvrsta *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Bakterija *L. acidophilus* na podlozi tvori ravne, grube kolonije promjera 1 - 2 mm nepravilnih rubova, a bakterija *L. paracasei* subsp. *paracasei* tvori bijele, glatke, okrugle kolonije promjera 2 - 3 mm (slika 8.11. b). Utvrđivanje broja *B. lactis* na

modificiranom MRS hranilištu postiže se dodatkom 1 % rafinoze i 0,05 % LiCl, i inkubacijom uzoraka na temperaturi od 45 °C/72 sata u anaerobnim uvjetima.

U nastojanju da se što jednostavnije i točnije u probiotičkom fermentiranom mlijeku utvrdi broj korištenih probiotičkih sojeva bakterija *L. casei* Shirota, *L. paracasei* subsp. *paracasei* i *L. rhamnosus* dizajnirano je i M-RTLTV hranilište (modificirani-ramnoza-2, 3-5-trifeniltetrazolim klorid (TTC)-LBS-vankomicin agar). U M-RTLTV hranilištu L-ramnoza služi za izvor ugljika, TTC kao indikator boje, a inkubacija uzoraka provodi se u anaerobnim uvjetima na 37 °C/72 sata. Nakon inkubacije uzoraka morfološkim izgledom kolonija jasno se mogu razlikovati *L. casei* Shirota i *L. paracasei* subsp. *paracasei* od *L. rhamnosus* na istom hranilištu. Bakterije *L. casei/paracasei* u anaerobnim uvjetima ne mogu fermentirati L-ramnozu i na površini agara tvore crvene kolonije. Suprotno, bakterija *L. rhamnosus* koja može kao izvor ugljika koristiti L-ramnozu formira ili ružičasto obojene ili bijele kolonije s crvenom mrljom. Izgled kolonija bakterija *L. casei* Shirota i *L. rhamnosus* poraslih na M-RTLTV selektivnom hranilištu prikazuje slika 8.12.



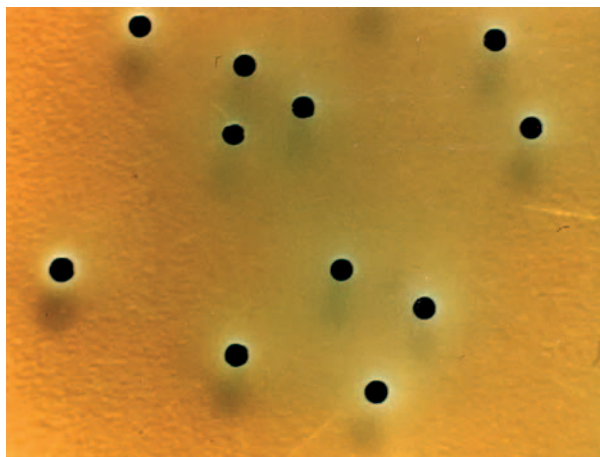
Slika 8.13.

Karakterističan izgled kolonija laktokoka na M17 hranilištu nakon inkubacije u mikroaerofilnim uvjetima na temperaturi od 30 °C/72 sata.

8.3.2.3.3.

Mikrobne vrste laktokoka

Hranilište M17 ima bolje karakteristike za utvrđivanje mezofilnih *Lactococcus* spp. u usporedbi s drugim raspoloživim hranilištima na tržištu. Koristi se za kultivaciju, brojanje i razlikovanje laktoza pozitivnih od laktoza negativnih sojeva bakterija *L. lactis* subsp. *lactis* i subsp. *cremoris* i subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Inkubacija uzoraka traje 48 sati na temperaturi od 30 °C. Nakon inkubacije, porasle kolonije laktoza pozitivnih laktokoka na M17 hranilištu bijele su boje promjera 3 - 4 mm (slika 8.13.). Suprotno, laktoza negativni mutanti rastu u obliku malih bijelih kolonija promjera manjeg od 1 mm. Osim toga, M17 hranilištem može se uz dodatak β-glicerofosfata utvrditi i bakteriofag infekcija. Infekcija bakteriofagima na M17 hranilištu prepoznaje se po pojavi neprozirnoga velikog plaka na koloniji bakterije domaćina. Za razlikovanje citrat pozitivnih od citrat negativnih sojeva *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* u sastavu mezofilne kulture laktokoka može se koristiti selektivno



Slika 8.14.

Citrat pozitivne kolonije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* na diferencijalnom hranilištu prema Kempleru i McKayu (1980.).

Detalji: nakon inkubacije u mikroaerofilnim uvjetima na temperaturi od 30 °C/48 sati citrat pozitivne kolonije su vidljive u formi velikih tamnoplavih kolonija (~ 3 mm) s jasno izraženom zamućenom zonom oko ruba kolonije.

hranilište prema Kempleru i McKayu (1980.). Citrat pozitivni sojevi na tom hranilištu tvore velike tamnoplave kolonije prosječnog promjera 3 mm s jasno zamućenom zonom oko ruba kolonije (slika 8.14.). Citrat negativni sojevi na istom hranilištu ne stvaraju zamućenu zonu oko ruba kolonije.

Za utvrđivanje broja kvasaca u kefiru i kumisu u praksi se uobičajeno koristi Sabouraud dekstroza agar.

8.3.2.4.

Aktivitet kulture

Utvrđivanje aktiviteta kulture ili sposobnosti kulture da u mlijeku u očekivanom vremenu stvori dovoljnu koncentraciju mliječne kiseline važno je za izbor kulture koja će se koristiti u proizvodnji. Za tu se svrhu može koristiti jednostavan test koji uključuje:

- pripremu kulture u omjeru razrjeđenja 1 : 10 (1 mL kulture u 9 mL 1 %-tne otopine peptona)
- inokulaciju pripremljene kulture u 10 mL procesnog mlijeka (toplinski obrađenog mlijeka standardnom toplinskom obradom za fermentirana mlijeka)
- inkubaciju uzoraka u temperaturno-vremenskim uvjetima karakterističnima za mezofilnu ili termofilnu kulturu (primjerice na 30 °C/5 - 6 sati ili 42 °C/3 - 4 sata)
- mjerenje kiselosti metodom po Soxhlet-Henkelu (°SH) i prema potrebi izraženo u postotku mliječne kiseline (°SH podijele se sa 44,4).

Odstupanje od karakteristične sposobnosti kulture za stvaranje određenog postotka mliječne kiseline (primjerice 0,7 - 0,8 %) u zadanom vremenu znači da aktivitet kulture nije optimalan. Aktivitet kulture može se određivati i preciznijom metodom kontinuiranog mjerenja pH- vrijednosti (ISO standard 26323).

8.3.3.

Pogreške fermentiranih mlijeka

Za konzistentnu proizvodnju fermentiranih mlijeka visoke kvalitete postoje točno određeni preduvjeti koji se ne smiju izostaviti, a oni su:

- korištenje mlijeka visoke kvalitete s dostatnim udjelom proteina
- korištenje jedino visokokvalitetnih certificiranih ingredijenata ili dodataka
- ovisno o vrsti fermentiranog mlijeka i korištenim ingredijentima birati jednofaznu ili dvofaznu homogenizaciju ili visokotlačnu homogenizaciju
- temperature toplinske obrade standardiziranog mlijeka dizajnirane prema vrsti i načinu obogaćivanja suhe tvari bez masti (Sbm) i standardizaciji udjela mliječne masti i drugih dodataka u proizvodu
- odgovarajuća inokulacija aktivne kulture
- točno definirano vrijeme i temperatura inkubacije ovisno o proizvodu i specifičnostima određene kulture

- točan protokol hlađenja proizvoda za prekidanje fermentacije
- apsolutno čista procesna linija i strojevi za pakiranje
- koristiti adekvatnu ambalažu u smislu kvalitete i primjerene veličine
- pohrana proizvoda na temperaturi 2 - 4 °C.

U slučajevima ako neki od zadanih preduvjeta izostanu fermentirana mlijeka imaju, neovisno o vrsti, manje ili više izražene organoleptičke pogreške. Te pogreške mogu se podijeliti u tri glavne skupine:

- pogreške izgleda
- pogreške okusa i arome
- pogreške teksture (konzistencije i viskoziteta).

8.3.3.1.

Pogreške izgleda

Najčešće su pogreške izgleda fermentiranih mlijeka izdvajanje sirutke na površinu proizvoda (slika 8.15.), nježan izgled strukture gela (slika 8.16.), a rjeđe promjene na površini proizvoda (slika 8.17.). Sirutka se izdvaja u slučajevima nepotpuno izgrađene proteinske mreže - fizičke osnove oblikovane gel-strukture tijekom fermentacije. Također, brza acidifikacija, visoka temperatura inkubacije, pH fermentacijskog mlijeka niži od 4,8, nizak udjel proteina i masti u mlijeku, neadekvatna homogenizacija ili toplinska obrada, čimbenici su koji značajno utječu na povećano izdvajanje sirutke iz gel-strukture proizvoda. Ostali su uzroci izdvajanja sirutke na površinu proizvoda:

- nizak udjel mliječne masti u mlijeku
- nizak udjel suhe tvari bez masti u mlijeku
- krivi izbor modificiranog škroba (stabilizatora) tijekom obogaćivanja mlijeka
- preniska temperatura toplinske obrade i prekratko vrijeme zadržavanja mlijeka na zadanim temperaturama toplinske obrade
- zagrijavanje ili mehaničko uznemiravanje stvorenoga gela tijekom fermentacije ili nakon fermentacije
- dodatak prevelike količine sirila (primjerice u proizvodnji skyra)



Slika 8.15.

Izdvojena sirutka na površini i nekarakterističan izgled strukture oblikovanoga gela čvrstog jogurta.

- nedovoljno stvaranje mliječne kiseline tijekom fermentacije - previsoki pH (~ 4,8)
- previsoka temperatura inkubacije ili prebrza inkubacija
- naknadna acidifikacija
- inkorporacija zraka tijekom miješanja tekućih varijanti
- neadekvatna kultura.

Uzroci nježnog izgleda strukture oblikovanoga gela:

- nizak udjel proteina u mlijeku
- nizak udjel suhe tvari bez masti u mlijeku
- preniska temperatura i prekratko vrijeme toplinske obrade mlijeka
- prebrza fermentacija
- neadekvatna kultura
- prejako miješanje za tekuće varijante
- mehaničko uznemiravanje gel-strukture prije završetka fermentacije
- neadekvatne pumpe koje se koriste za prebacivanje gela
- nedovoljna količina ili neadekvatan stabilizator.



Slika 8.16.

Izgled nježne strukture gela čvrstog jogurta.

Uzroci promjena na površini proizvoda:

- formiranje kolonija ili filma - rast kvasaca ili plijesni
- formiranje filma na površini zbog isušivanja ili kristalima slična struktura na površini zbog zamrzavanja; naslanjanje poklopca ambalaže na površinu proizvoda; oštećenja ambalaže
- izdvajanje masti na površinu - neadekvatna homogenizacija
- atipična boja (voćne, aromatizirane varijante) - dodatak voćnog sirupa, umjetne voćne boje
- blijeda boja (voćne, aromatizirane varijante) - diskoloracija voća zbog previsoke temperature; previše blijeda boja voćne baze ili dodanih aroma; nestabilnost boje na niskom pH
- nehomogen izgled - nedovoljno miješanje tijekom tehnološkog procesa razbijanja gel-strukture proizvoda
- kondenzirana vlaga ispod poklopca ambalaže - velike oscilacije u temperaturnim i tlačnim režimima proizvodnje.



Slika 8.17.

Izgled previše blijede boje za voćni jogurt s dodatkom šumskog voća.

8.3.3.2.

Pogreške okusa i arome

Nedostatak karakteristične arome i okusa najučestalija je i najčešća organoleptička pogreška fermentiranih mlijeka. Rezultat je smanjene koncentracije ili potpunog izostanka jednog ili više karbonilnih spojeva (acetaldehida, acetona, acetoina i diacetila) odgovornih za karakterističan okus i aromu proizvoda. Zbog toga bilo koji čimbenik koji može utjecati na metaboličku aktivnost bakterija iz sastava kultura može biti uzročnik tih vrsta pogrešaka finalnog proizvoda. Ipak, najčešći su uzroci:

- temperatura i vrijeme inkubacije koji nisu optimalni
- prisutnost inhibitornih tvari u sirovom mlijeku
- bakteriofag infekcija.

Bakterija *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u najvećoj je mjeri tijekom fermentacije klasičnog jogurta odgovorna za stvaranje karbonilnih spojeva, a *Streptococcus thermophilus* u početnoj fazi fermentacije

za razvitak kiselosti. Zato će smanjen rast ili nepotpuna metabolička aktivnost tih bakterija biti uzrok izostanka karakteristične arome proizvoda. Odnosno, bilo koji čimbenik koji utječe na rast i aktivnost tih bakterijskih vrsta onemogućit će karakterističnu izbalansiranost okusa i arome u finalnom proizvodu.

Za dobivanje dobro izbalansiranih karakteristika okusa i arome proizvoda temperatura inkubacije i količina inokuluma također moraju biti pomno odabrani. U proizvodnji klasičnih jogurta temperatura inkubacije, kako se smatra, trebala bi biti između 41 i 43 °C, a količina inokuluma između 1 i 2 %. Temperatura inkubacije viša od 43 °C i premala količina inokuluma mogu biti uzrok pogreške nedostataka okusa i arome. Suprotno, ista temperatura inkubacije i prevelika količina inokuluma (ovisno o omjeru stvaranja mliječne kiseline) karakterističnu aromu jogurta može maskirati povišenom kiselošću. Naglo hlađenje koje slijedi nakon fermentacije uzrokuje izostanak okusa i arome tekućih jogurta. Za sprječavanje tih pogreški preporučuje se hlađenje tekućih varijanti jogurta obvezno provesti u dvije faze. U prvoj se fazi fermentirano mlijeko u proizvodnom spremniku lagano miješa da se dobije homogena struktura jogurnog gela, uz postupno hlađenje do temperature 20 - 24 °C. U toj fazi proizvod se puni u prodajnu ambalažu, a ako se radi o voćnim varijantama prije punjenja dodaje se voće. U drugoj se fazi proizvod u prodajnoj ambalaži hladi 10 - 12 sati u atmosferi hladnog zraka temperature niže od 10 °C, ili temperature između 7 i 10 °C tijekom 5 - 6 sati. Potom se atmosfera hladnog zraka reducira na 1 - 2 °C za završno hlađenje. U proizvodnji čvrstih varijanti jogurta radi očuvanja okusa i arome proizvoda hlađenje se često provodi u jednoj fazi, odnosno odmah nakon završene fermentacije jogurt se direktno ohladi na temperaturu nižu od 10 °C.

Ostale pogreške i uzročnici promjena u okusu i aromi fermentiranih mlijeka mogu biti:

- okus po stočnoj hrani - prisutan u mlijeku zbog hranjenja muznih životinja silažom, repom, pivskim tropom i sl.; aeracijom ne prozračeno mlijeko
- okus po kuhanom - previsoke temperature i predugo trajanje toplinske obrade mlijeka

- gorak okus - neizbalansiran omjer pojedinačnih bakterijskih sojeva u kulturi (npr. previše laktobacila); postfermentacijski metabolizam bakterija iz sastava kulture koji uzrokuje prekomjernu proteolizu uz koju istovremeno dolazi i do povišenja kiselosti i prekomjerne sinereze; proteolitički enzimi iz mrtvih bakterijskih stanica iz sastava kultura; proteolitički termostabilni enzimi psihrotrofnih bakterija (mikrobiološka kontaminacija sirovog mlijeka)
- brašnjav okus - previsok udjel mliječnog praha, prejaka evaporacija
- previše kiseli okus; prevelika količina inokuluma; prebrza acidifikacija tijekom fermentacije i nakon završene fermentacije
- slabo kiseli okus - neizbalansiran omjer pojedinačnih bakterijskih sojeva u kulturi; preniske temperature toplinske obrade; nedovoljna količina inokuluma; previsoka koncentracija šećera; fag-infekcija; rezidue antibiotika ili drugih kemijskih inhibitora
- oksidirani okus - izlaganje proizvoda svjetlosti (premda se oksidirani okus bez prisutnosti svjetlosti ili metala događa i spontanim reakcijama nakon 1 - 2 dana hladne pohrane)
- užegnut okus - razgradnja mliječne masti najčešće zbog termostabilnih lipolitičkih enzima psihrotrofnih bakterija (mikrobiološka kontaminacija sirovog mlijeka)
- voćni, po kvascima, fermentirani okus - kontaminacija oksidativnim kvascima
- umjetni okus (okus po bombonima) - prevelik udjel voćnih pripravaka ili umjetnih aroma
- previše slatki okus - preveliki dodatak šećera
- atipični, ravan okus - dodatak tvari za pojačavanje arome; neutralizatori voćnih kiselina; opetovano zagrijavanje voćnih baza ili koncentrata arome; pogreške u manipulacijama s voćnim koncentratima
- nečisto kiseli okus - mikrobna kontaminacija (primjerice, BMK, koliformni, propionske bakterije i dr.)
- nekarakterističan okus kefira - neizbalansirani omjer bakterijskih vrsta iz sastava kultura, okus

po octu - prekobrojnost *Saccharomyces cerevisiae* i *Acetobacter* spp., gorak okus i okus po kvascima - prekobrojnost kvasaca, pljesniv okus - kontaminacija primjerice *Geotrichum candidum*.

8.3.3.3.

—

Pogreške teksture

Konzistencija, viskoznost i tekstura međusobno su različiti pojmovi kojima se opisuje fizička struktura fermentiranih mlijeka. Međutim, vidljiva je pogreška teksture prvenstveno uzrokovana promjenama konzistencije ili viskoziteta proizvoda.

Izgled i mogući uzroci pogrešaka teksture čvrstih varijanti:

- previše čvrsta gel-struktura i sirutka na površini - prejaka acidifikacija mlijeka prije hlađenja; neadekvatno hlađenje; previše stvorene mliječne kiseline zbog krivo izabrane kulture; preniske temperature toplinske obrade mlijeka
- previše mekana gel-struktura - niska koncentracija proteina u mlijeku; premala količina inokuluma; kratko vrijeme inkubacije; mehaničko narušavanje tijekom oblikovanja gel-strukture prije završetka fermentacije
- raspuknuti/razdvojeni gel - mehaničko protresanje gela.

Za ilustraciju, na slici 8.18. prikazana je previše mekana i granulirana tekstura čvrstog jogurta. Slika 8.19. objedinjuje izgled istovremenih različitih pogrešaka čvrstoga voćnog jogurta. U konkretnom primjeru pogreške u izgledu, boji i teksturi proizvoda posljedica su propusta u izboru tehnoloških procesa za proizvodnju te varijante (švicarska varijanta) jogurta. Zbog toga je proizvod: (i) previše napunjen, (ii) tekstura je previše mekana, nejednolika s jasno vidljivim izdvojenim stabilizatorom i (iii) boja je previše intenzivna, pa proizvod ima potpuno umjetni izgled.



Slika 8.18.

Izgled previše mekane i granulirane teksture čvrstog jogurta.



Slika 8.19.

Izgled istovremenih pogrešaka izgleda, boje i teksture voćnog jogurta s dodatkom šumskog voća.

Izgled i mogući uzroci pogrešaka teksture tekućih i pitkih varijanti:

- pjeskovita/zrnasta - nedovoljno aktivna kultura; opetovano zagrijavanje mlijeka koje uzrokuje nestabilnost kazeina; previsok temperaturno-tlačni režim homogenizacije; prevelik dodatak tvari za obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm); trešnja tijekom inkubacije; krivi izbor stabilizatora; miješanje/razbijanje jogurtne gela na visokim temperaturama (npr. $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), zatim ponovno držanje tekućeg jogurta na temperaturama $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - sluzava/ljepljiva - previše sojeva u kulturi koji imaju sposobnost tvorbe EPS; preniske temperature inkubacije; mikrobna kontaminacija
- rasteljiva/žilava - krivi izbor stabilizatora; pogreške u inkorporaciji stabilizatora; prevelika količina dodanog stabilizatora
 - gel na površini, sirutka na dnu - primjesa zraka; naglo hlađenje; prejako miješanje ili pumpanje
 - previše tekuća - presnažno miješanje gela; premali udjel Sbm; premalo voća, voćnog pripravka u voćnim varijantama; nedovoljna dužina hlađenja; premali udjel bakterijskih sojeva u kulturi koji imaju sposobnost tvorbe EPS.



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka

9 Literatura

- 10 Kazalo pojmova

Literatura

- Aachary, A. A., Prapulla, S. G. (2011): Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 2 - 16. doi:10.1111/j.1541 - 4337.2010.00135.x
- Adolfsson, O., Meydani, S. N., Russell, R. M. (2004): Yogurt and gut function. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 245 - 256.
- Affolter, M., Grass, L., Vanrobaeys, F., Casado, B., Kussmann, M. (2010): Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics* 73, 1079 - 1088.
- Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2013): Lactose and β -glucosides metabolism and its regulation in *Lactococcus lactis*: a review. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/50889. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactose-and-glucosides-metabolism-and-its-regulation-in-lactococcus-lactis-a-review>
- Aly, S., Cheik, O., Ilboudo, A. T., Jules, A., Traoré, A. S. (2011): Mini review on contribution of HACCP system in raw and fermented milk quality in small dairy industries of Burkina Faso. *New York Science Journal* 4, 83 - 91.
- Amatayakul, T. (2005): The improvement of physical properties of yoghurts by varying casein/whey protein ratio and EPS-producing starter cultures. PhD thesis, Victoria University Library, WER thesis 637.1476 AMA, 30001008599138, 1 - 241.
- Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F., Shah, N. P. (2006): Physical characteristics of yoghurt made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal* 16, 40 - 51.
- Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, N. P. (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.
- Anema, S. G. (2008): Effect of milk solids concentration on the gels form by the acidification of heated pH-adjusted skim milk. *Food Chemistry* 108, 110 - 118.
- Anema, S. G. (2008): Effect of milk solids concentration on whey proteins denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure-treated skim milk. *International Dairy Journal* 18, 228 - 235.
- Anifantakis, E. M., Rosakis, B., Ramou, C. (1980): Travaux Scientifiques de l'Institut Technologique Supérieur des Industries Alimentaires (Scientific work of the Technology Institut for Nutrition Industries). Plovdiv, Bugarska, Tom XXVII, CB1.
- Anifantakis, E. M. (1986): Comparison of the physico-chemical properties of ewe's and cow's milk, International Dairy Federation, Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk, Athens, Greece, *Bulletin* 222, 42 - 53.
- Appukuttan, A. A., Prapulla, G. S. (2011): Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 10, 2 - 16.
- Argov, N., Lemay, D. G., German, J. B. (2008): Milk fat globule structure and function: nano science comes to milk production. *Trends in Food Science and Technology* 19, 617 - 623.
- Aryana, K. J., McGrew, P. (2007): Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT-Food Science and Technology* 40, 1808 - 1814.
- Ashraf, R., Shah, P. (2011): Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - a review. *International Journal of Food Microbiology* 149, 194 - 208.
- Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. (2013): Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology* 4, article 191, doi: 10.3389/fmicb.2013.00191
- Auputinan, P., Tragoolpua, Y., Pruksakorn, S., Thongwai, N. (2011): Profiles of plasmids in lactobacilli isolated from fermented foods. *Chiang Mai Journal of Science* 38, 648-652.
- Avonts, L., Van Uytven, E., de Vuyst, L. (2004): Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal* 14, 947 - 955.

- Balciunas, E. M., Castello Martinez, F. A., Dimitrov Todorov, S., Gombossy de Melo Franco, B. D., Converti, R., Pinherio de Suoza Oliveira, R. (2013): Novel biotechnical applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32, 134 - 142.
- Barinov, A., Bolotin, A., Langella, P., Maguin, E., van de Guchte, M. (2011): Genomic of genus *Lactobacillus*. U knjizi, Lactic Acid Bacteria and Bifidobacterija- Current Progress in Advanced Research, ed. K.Sonomoto i A. Yokota, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 1 - 32.
- Barlowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J. (2011): Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 291 - 302.
- Benkerroum, N., Tamime, A. Y. (2004): Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products. (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology* 21, 399 - 413.
- Bensmira, M., Nsabimana, C., Jiang, B. (2010): Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. *LWT- Food Science and Technology* 43, 1180 - 1184.
- Bergmann, R. S. O., Pereira, M. A., Veiga, S. M. O. M., Schneedorf, J. M., Oliveira, N. M. S., Fiorini, J. E. (2010): Microbial profile of a kefir sample preparation - grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas* 30, 1022 - 1026.
- Bird, J. (1996): The application of membrane systems in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 16-23.
- Blanc, B. (1984): The nutritional value of fermented dairy products. *FIL - IDF Bulletin* 179, 33 - 53.
- Boekhorst, J., Siezen, R. J., Zwahlen, M-C, Vilanova, D, Pridmore R. D, Mercenier A., Kleerebezem, M., de Vos W.M., Brüssow, H., Desiere, F. (2004): The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content. *Microbiology* 150, 3601 -3611.
- Boels, I.C., Kleerebezem, M., de Vos, W. M. (2003): Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1129 - 1135.
- Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I., Nes, I. F., Holo, H. (1998): Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF 221. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 606 - 612.
- Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I. (2000): *Lactobacillus* K7 - a new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology* 38, 113 - 119.
- Bonaparte, C., Reuter, G. (1996): Bifidobacteria in commercial dairy products: which species are used? U Proceeding of the Symposium Probiotic in Man and Animal, Berlin, 20-22.6. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, e.V., Berlin, p 33.
- Bönisch, M. P., Huss, M., Weitzl, K., Kulozik, U. (2007): Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal* 17, 1360 - 1371.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Yasuyuki, S., Schure, E. T., van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E .B. (2012): Food fermentations: microorganisms with technology beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154, 87 - 97.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., Garmyn, D. (2001): Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Le Lait* 81, 75 - 82.
- Božanić, R., Tratnik, L.J., Marić, O. (2000.): Utjecaj dodatka koncentrata proteina sirutke na viskoznost i mikrobiološku kakvoću jogurta tijekom čuvanja. *Mljekarstvo* 50, 15 - 24.
- Brennan, C. S., Tudorica, M. C. (2008): Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilisation of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 842 - 833.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., Sawyer, L. (1997): Bovine β -lactoglobulin at 1,8 Å resolution- still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5, 481 - 495.
- Bylund, G. (1995): Dairy processing handbook, Tetra Pak, Processing Systems AB, Lund, Sweden
- Bylund, G. (2003): Dairy processing handbook, Tetra Pak, Processing Systems AB, Lund, Sweden, dopunjeno izdanje
- Camaschella, P., Mignot, O., Pirovano, F., Sozzi, T. (1998): Method for differentiated enumeration of mixed cultures of thermophilic lactic acid bacteria and bifidobacteria by using only one culture medium. *Le Lait* 1998, 78, 461 - 467.
- Canchaya, C., Claesson, M. J., Fitzgerald, F. G., Van Sinderen, D., O'Toole, P. W. (2006): Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 152, 3185 - 3196.

- Candela, M., Maccaferri, S., Turrone, S., Carnevali, P., Brigidi, P. (2010): Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International Journal of Food Microbiology* 140, 93 - 101.
- Caplice, E., Fitzgerald, F. G. (1999): Food fermentations: role of microorganism in food production preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131 - 149.
- Capra, M. L., Neve, H., Sorati, P. C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K. J., Quiberoni, A. (2013): Extreme thermal resistance of phage isolated from dairy samples: updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal* 30, 59 - 63.
- Cardak, A. D., Yetismeyen, A., Brückner, H. (2003): Quantitative comparison of camel, goat and cow milk fatty acids. *Milchwissenschaft* 58, 34 - 36.
- Chandan, R. C. (2006): Milk composition, physical and processing characteristics. U knjizi, *Manufacturing Yoghurt and Fermented Milks*, ed. by Chandan, R.C., associate editors, White, C. H., Kilara, A., Hui, Y. H., Blackwell Publishing, UK, 17 - 39.
- Chandan, R.C., O'Rell, K. R. (2006): Manufacture of various types of yogurt. U knjizi, *Manufacturing Yoghurt and Fermented Milks*, ed. by Chandan, R.C., associate editors, White, C. H., Kilara, A., Hui, Y. H., Blackwell Publishing, UK, 211 - 236.
- Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. (2012): Prebiotics in foods. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 187 - 191.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998): Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology* 51, 123 - 136.
- Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., Brodtkorb, A. (2006): Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin: technological implications for processing. *International Dairy Journal* 16, 1229 - 1240.
- Cho, Y. H., Lucey, J. A., Singh, H. (1999): Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal* 9, 537 - 545.
- Ciron, C. I. E., Gee, W. L., Kelly, A. L., Auty, M. A. E. (2010): Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. *International Dairy Journal* 20, 314 - 320.
- Ciron, C. I. E., Gee, W. L., Kelly, A. L., Auty, M. A. E. (2012): Modifying the microstructure of low-fat yoghurt by microfluidisation of milk at different pressures to enhance rheological and sensory properties. *Food Chemistry* 130, 510 - 519.
- Codex Alimentarius (2003): Codex standard for fermented milks (CODEX STAN 243-2003), Adopted in 2003, Revision 2008, 2010, 1-11.
- Cogan, T., M., Accolas, J. P. (1990): Starter cultures: types, metabolism and bacteriophage. U knjizi, *Dairy Microbiology*, vol 1. Ed. R.K. Robinson, Elsevier Applied Science, London, 77 - 114.
- Cogan, T., M. (1995): Flavour production by dairy starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology (suppl.)* 79, 49S - 64S.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhänen, E.-L. (2006): Conjugated linolic acids in milk fat: variation and physiological effects. *International Dairy Journal* 16, 1347 - 1361.
- Colombo, M., Zimmermann de Oliveira, A. E., de Carvalho, A. F., Nero, L. A. (2014): Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food Microbiology* 39, 89 - 95.
- Coni, E., Bocca, B., Caroli, S. (1999): Minor and trace element content of two typical Italian sheep dairy products. *Journal of Dairy Research* 70, 355 - 357.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. (2011): Progress in genomic, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 149, 4 - 18.
- Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A., Granato, D., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. (2010): Sensory analysis: relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 358 - 373.
- Čanžek Majenič, A. (2006): Enterococci: yin-yang microbes. *Mljekarstvo* 56, 5 - 20.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., Goff, H. D. (2004): A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* 14, 1025 - 1031.
- Dalgleish, D. G. (2006): Food emulsions - their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids* 20, 415 - 422.
- Damin, M. R., Alcântara, M. R., Nunes, A. P., Oliveria, M. N. (2009): Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure on nonfat stirred yogurt. *LWT-Food Science and Technology* 42, 1744 - 1750.
- Danone World Newsletter (1996): Kefir. 11.

- De Carvalho Lima, K. G., Kruger, M. F., Behrens, J., Destro, M. T., Landgraf, M., Gombossy de Melo Franco, B. D. (2009): Evolution of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT- Food Science and Technology* 42, 491 - 495.
- De Kruijff, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., Petukhov, A. V. (2012): Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science* 171 - 172, 36 - 52.
- De Preter, V., Hamer, H., Windey, K., Verbeke, K. (2011): The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? *Molecular Nutrition and Food Research* 54, 1 - 12.
- De Vos, M., Hugenholtz, J. (2004): Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *TRENDS in Biotechnology* 22, 72 - 79.
- De Vos, W. M. (2011): Systems solution by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microbial Cell Factories* 10 (suppl. 1), S2 <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/S1/S2>, Open Access
- De Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B. (2001): Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11, 687 - 707.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., Degeest, B., Vaningelgem, F. (2003): Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal* 13, 707 - 717.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. (2006): Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extensions. *International Dairy Journal* 16, 1058 - 1071.
- Dellaglio, F., Torriani, S., Vlaeminck, G., Cornet, R. (1992): Specific characteristics of microorganisms used for new fermented milks. *New Technologies for Fermented Milks, FIL -IDF Bulletin* 277, 1 - 16.
- Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (2012): Food composition and nutrition tables. Medline online database, Leibniz Institut. <http://www.sfk-online.net/cgi-bin/sfkstart.mysql?language=english> (preuzeto 03.04.2012.)
- Devoyod, J.-J., Poullain, F. (1988): Les leuconostoc propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le Lait* 68, 249 - 280.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., van Camp, J. (2008): Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal* 18, 436 - 457.
- Domagala, J., Wszolek, M., Tamime, Y. A., Kupiec-Teahan, B. (2013): The effect on transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research* 112, 154 - 161.
- Drakoularakou, A.P., Kehagias, C., Karakanas, P. N., Koulouris, S., Timbis, D. (2003): A study of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in bovine, ovine and caprine milk. *International Journal of Dairy Technology* 56, 59 - 61.
- Driessen, F. M., (1984): Modern trends in the manufacture of yogurt. *FIL -IDF Bulletin* 179, 107 - 115.
- Driessen, F. M., Loones, A. (1992): Developments in the fermentation process (liquid, stirred and set fermented milks). *New Technologies for Fermented Milks, FIL -IDF Bulletin* 277, 28-40.
- Državni zavod za statistiku RH (2014): Proizvodnja fermentiranih proizvoda u Republici Hrvatskoj uvoz na tržište RH i izvoz na druga tržišta u vremenu od 2000-2013. (zatraženi podaci)
- Dumay, E., Chevalier - Lucia, D., Picart - Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia - Julià, A., Blayo, C. (2013): Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science and Technology* 31, 13 - 26.
- El-Salam, M. H. A. (2002): Fermented milks/Middle East. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1041-1048.
- El-Salam, M.H.A., EL-Shafei, K., Sharaf, O. M., Effat, B. A., Asem, F. M., El-Assar, M. (2010): Screening of some potential probiotic lactic acid bacteria for their ability to synthesis conjugated linoleic acid. *International Journal of Dairy Technology* 63, 62 - 69.
- Espírito-Santo, A. P., Lagazzo, A., Sousa, A. L. O. P., Perego, P., Oliveira, M. N. (2013): Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International* 50, 224 - 231.
- Fadela, C., Abderrahim, C., Ahmed, B. (2008): Use of lactic strains isolated from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogurt. *African Journal of Biotechnology* 7, 1181 - 1186.
- Fadela, C., Abderrahim, C., Ahmed, B. (2009): Physico-chemical and rheological properties of yoghurt manufactured with ewe's milk and skim milk. *African Journal of Biotechnology* 8, 1938 - 1942.

- Fadela, C., Abderrahim, C., Ahmed, B. (2009): Sensorial and physico-chemical characteristics of yoghurt manufactured with ewe's and skim milk. *World Journal of Dairy and Food Science* 4, 136-140.
- FAO/WHO (2001): <http://www.fao.org/es/ESN/probio/probio.htm>
- Farnworth, E. R. (2005): Kefir - a complex probiotic. *Functional Foods 2, Food Science and Technology Bulletin* 1 -17.
- Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S., Otte, J., Jacobsen, C. (2010): Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2-characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry* 123, 1090 - 1097.
- Ferreira, I. M., Pinho, O., Monteiro, D., Faria, S., Cruz, S., Perreira, A., Roque, A. C., Tavares, P. (2010): Short communication: effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science* 93, 27 - 31.
- FIL - IDF Bulletin (1985): Milk estimation of number of psychrotrophic microorganisms- Rapid Colony Count Techniques 25hours at 21°C, Standard 132, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (1990): Enumeration of Yeasts and Moulds, Standard 94 B, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (1991): Practical phage control. Standard 263, 1-39. Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (1992): General standard of identity for fermented milks. Standard 163, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (1992): General standard of identity for milk products obtain from fermented milks heat treated after fermentation. Standard 164, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (1997): Sensory evaluation of dairy products by scoring - reference methods. Standard 99 C, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (2010): The World Dairy Situation 446/2010, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (2011): The World Dairy Situation 451/2011, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (2012): Safety Demonstration of Microbial Food Cultures (MFC) in Fermented Food Products. 455/2012, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (2012): The World Dairy Situation 458/2010, Bruxelles.
- FIL - IDF Bulletin (2013): The World Dairy Situation 470/2013, Bruxelles.
- Fiszman, S. M., Lluch, M. A., Salvador, A. (1999): Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties. *International Dairy Journal* 9, 895 - 901.
- Floris, R., Bodnár, I., Weinbreack, F., Alting, A. C. (2008): Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. *International Dairy Journal* 18, 566 - 573.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E. (2013): Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/47766. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-source-of-functional-ingredients>
- Foda, I. M., El-Aziz, AM, Awad A. A. (2007): Chemical, rheological and sensory evaluation of yoghurt supplemented with turmeric. *International Journal of Dairy Science* 2, 252 - 259.
- Foroni, E., Serafini, F., Amidani, D., Turrone, F., He, F., Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Viappiani, A., Zhang, Z., Rivetti, C., van Sinderen, D., Ventura, M. (2011): Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microbial Cell Factories* 10 (suppl 1): S16, [http:// www.Microbialcellfactories.com/content/10/S1/S16](http://www.Microbialcellfactories.com/content/10/S1/S16)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2000): Starter cultures. U knjizi, *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication, Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland, 54 - 96.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology* 66, 365-378.
- Furet, J-P. Quénee, P., Tailliez, P. (2004): Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 97, 197 - 207.
- García-Quintás, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., López, P. (2008): Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1988 - 1996.
- García-Risco, M. R., Ramos, M., López-Fandiño, R. (2002): Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. *International Dairy Journal* 12, 679 - 688.
- Garneau, J. E., Moineau, S. (2011): Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories* 10(Suppl 1):S20

- Gassem, M. A., Frank, J. F. (1991): Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. *Journal of Dairy Science* 74, 1503 - 1511.
- Generalić, E. (2013): "Permeabilnost" Englesko-hrvatski kemijski riječnik & glosar. 18 Mar. 2013. KTF-Split. <<http://glossary.periodni.com>>.
- Gentès, M.-C. (2007): Utilisation de complexes formés de pectine et d'isolat de protéines sériques dans la formulation de yogourts brassés. PhDtheses, <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/25036/25036.html>
- Germond, J.-G., Lapiere, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G. E., Dellaglio, F. (2003): Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a patrial study with reflection on prokariotic species concept. *Molecular Biology and Evolution* 20, 93 - 104.
- Girard, M., Schaffer- Lequard, C. (2007): Gelation and resistance to shearing of fermented milk: role of exopolysaccharides. *International Dairy Journal* 17, 666 - 673.
- Gogos, U., Smith, C. (2010): n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science and Technology* 45, 417 - 436.
- Gomes A.M.P., Malcata, F.X. (1999): *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trend in Food Science and Technology* 10, 139 - 157.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H. S. (2001): In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Echerichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 207 - 2016.
- Granato, D., Branco, F. A., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Shah, N. P. (2010): Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 9, 455 - 470.
- Gregurek, Lj. (1999): Effect of level of starter culture on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Mljekarstvo* 49, 3 - 8.
- Grønnevik, H., Falstad, M., Narvhus, J. A. (2011): Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal* 21, 601 - 605.
- Guggisberg, D., Cuthbert- Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., Eberhard, P. (2009): Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influence by inulin addition. *International Dairy Journal* 19, 107 - 115.
- Guggisberg, D., Eberhard, P., Albrecht, B. (2007): Rheological characterization of set yoghurt of native whey proteins. *International Dairy Journal* 17, 1353 - 1359.
- Guizani, N., Kasapis, S., Al-Ruzeiki, M. (2001): Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk). *International Journal of Food Science and Technology* 36, 199 - 205.
- Gunasekaran, S., Mehmed Ak, M. (2000): Dynamic oscillatory shear testing of foods - selected applications. *Trends in Food Science and Technology* 11, 115 - 127.
- Guyot, C., Kulozik, U. (2011): Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal* 21, 628 - 635.
- Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E., Seydim, A. C. (2005): Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control* 16, 205 - 209.
- Habibi, N., Soleimani-Zad, S., Sheikh Zeinoddin, M. (2011): Optimization of kefir grains production by using Taguchi technique and mini-fermentation. *World Applied Sciences Journal* 12, 613 - 618.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (2012): Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal* 80, 447 - 451.
- Haque, A., Richardson, R. K., Morris, E. R. (2001): Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloides* 15, 593 - 602.
- Harutoshi, T. (2013): Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/50839. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/exopolysaccharides-of-lactic-acid-bacteria-for-food-and-colon-health-applications>
- Harzallah, D., Belhadj, H. (2013): Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/50732. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-probiotics-characteristics-selection-criteria-and-role-in-immunomodulation-o>
- Heanlain, G. F. W., Caccese, R. (1984): Goat milk versus cow milk. U knjizi, Extension Goat Handbook eds. by Heanlain, G.F.W. and Ace, D.L., Publ. Washington, DC, 1, E-1.
- Heller, K. J. (2001): Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 374 - 379.

- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. (2004): Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14, 467 - 494.
- Hess, S. J., Roberts, R. F., Ziegler, G. R. (1997): Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *Journal of Dairy Science* 80, 252 - 263.
- Hirneisen, K. A., Black, E. P., Cascarino, J. L., Fino, V. R., Dallas, G. H., Kniel, K. E. (2010): Viral inactivation in foods: a review of traditional and novel food-processing technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 9, 1 - 20.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S. D., Guedon, E., Monnet, W., Renault, P., Kleerebezem, M. (2005): New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 435 - 463.
- Holt, C. (1999): Structure of casein micelle. Yearbook/Hannah Research Institute, Ayr, University of Glasgow.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (suppl), 365S - 73S.
- Horne, D. S. (1998): Casein interaction: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* 8, 171 - 177
- Horne, D. S. (1999): Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal* 9, 261 - 268.
- Horne, D. S. (2003): Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 213, 255 - 263.
- Horne, D. S. (2006): Casein micelle structure: models and muddles. *Currently Opinion Colloid Interface Science* 11, 148 - 153.
- Houzé, G., Cases, E., Colas, B., Cayot, P. (2005): Viscoelastic properties of acid milk gel as affected by fat nature at low level. *International Dairy Journal* 15, 1006 - 1016.
- Hrvatski zavod za norme (2001): Punomasno mlijeko-Određivanje udjela mliječne masti, bjelančevina i laktoze-Uputstvo za rad na MID-infrared instrumentima, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 9622:2001.
- Hrvatski zavod za norme (2003a): Mlijeko-Određivanje sadržaja proteinskog dušika-2. dio, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN EN ISO 8968-5:2003.
- Hrvatski zavod za norme (2003b): Mlijeko-Određivanje sadržaja neproteinskog dušika-5. dio, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN EN ISO 8968-4:2003.
- Hrvatski zavod za norme (2003c): Jogurt-prebrojavanje svojstvenih mikroorganizama-postupak brojenja kolonija na 37°C, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 7889:2003.
- Hrvatski zavod za norme (2003d): Mlijeko-određivanje sadržaja dušika-2. Dio: Metoda blok-digestije, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 8968-2:2003.
- Hrvatski zavod za norme (2007): Mlijeko-brojanje somatskih stanica-2.dio: uputa za rad fluor-opto-elektronskim brojačima, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 13366-2:2007.
- Hrvatski zavod za norme (2008a): Mlijeko-kvantitativno određivanje bakteriološke kvalitete-upute za uspostavljanje i potvrđivanje konverzijskog odnosa između rezultata rutinske metode i rezultata temeljne metode, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN EN ISO 21187:2008.
- Hrvatski zavod za norme (2008b): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje-Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje *Enterobacteriaceae*-2. dio-metoda određivanja brojenja kolonija, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 21528-2:2010.
- Hrvatski zavod za norme (2009): Mliječni proizvodi- određivanje kiselinske aktivnosti mliječarskih kultura kontinuiranim mjerenjem pH (CpH), Zagreb: HNZ, Oznaka norme: HRN EN ISO: 26 323: 2009.
- Hrvatski zavod za norme (2010a): Mlijeko-određivanje točke ledišta-termistorsko krioskopska metoda, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN EN ISO 5764:2010.
- Hrvatski zavod za norme (2010b): Mlijeko-određivanje udjela kazeinskog dušika-2. dio-direktna metoda, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 17997-2:2010.
- Hrvatski zavod za norme (2010c): Mlijeko i mliječni proizvodi-brojanje jedinica kvasaca i/ili plijesni koji formiraju kolonije-brojenje kolonija pri 25°C, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 6611:2010.
- Hrvatski zavod za norme (2010c): Mlijeko-određivanje udjela masti-gravimetrijska metoda, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN EN ISO 1211:2010.
- Hrvatski zavod za norme (2010d): Jogurt-određivanje udjela suhe tvari, Zagreb: HZN, Oznaka norme: HRN ISO 13580:2010.
- Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L., Chen, M. J. (2012): Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology* 157, 73 - 81.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Hutkins, R. W. (2007): Functional activity of commercial probiotics. *International Dairy Journal* 17, 770 - 775.

- Hughenoltz, J., Kleerebezem, M. (1999): Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 492 - 497.
- Hughenoltz, J. (2008): The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal* 18, 466 - 475.
- Hutkins, R. W. (2001): Metabolism of starter cultures. Uknjizi, Applied Dairy Microbiology, sec.edition, ed. Marth, E.H., Steele, J.L., Food Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, 207 - 241.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. (2004): Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 18, 299 - 313.
- Jacob, M., Nobel, S., Jaros, D., Rohm, H. (2010): Physical properties of acid milk gels: acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids* 15, 1 - 7.
- Janzen, T., Stuer-Lauridsen, B., Rasmussen, P., Schnabl, J., Riisberg, L. (2003): Development of bacteriophage resistant starter cultures- genetic engineering vs. classical methods. Fermented Milk, International Dairy Federation-ref. S.I. 0301, 367 - 370.
- Jaros, D., Haque, A., Kneifel, W., Rohm, H. (2002): Influence of the starter culture on the relationship between dry matter content and physical properties on stirred yogurt. *Milchwissenschaft* 57, 447 - 450.
- Jaros, D., Pätzold, J., Schwarzenbolz, U., Rohm, H. (2006): Small and large deformation rheology of acid gels from transglutaminase treated milks. *FOBI* 1, 124 - 132.
- Jayamanne, V. S., Adams, M. R. (2006): Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurt. *Letters in Applied Microbiology* 42, 189 - 194.
- Jenness, R. (1980): Composition and characteristic of goat milk a review. *Journal of Dairy Science* 63, 1605 - 1630.
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L., Hanhu, J., Mingsheng, D. (2009): Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 26, 770 - 775.
- Judson, (2012): Kefir-an overview. http://judsonnotes.com/notes/attachments/701_kefir-overview.pdf
- Kailasapathy, K., Chin, J. (2000): Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* 78, 80 - 88.
- Kandler, O. (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 209 - 224.
- Kankainen, M., Paulin L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx A P., Lebeer, S., de Keersmaecker, S C J., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., de Vos, W M. (2009): Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 106, 17193 - 17198.
- Katsiari, M. C., Leandros, P. V., Kondyli, E. (2002): Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. *Food Chemistry* 77, 413 - 420.
- Kelly, W. J., Ward, L. J. H., Leahy, S. C. (2010): Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biology and Evolution* 2, 729 - 744.
- Kempler, G. M., McKay, L. L. (1980): Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 926 - 927.
- Khalid, K. (2011): An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* 11, 1 - 13.
- Khurana, H. K., Kanawija, S. K. (2007): Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science* 3, 91 - 108.
- Khurana, H. K., Kanawjia, S. K. (2007): Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science* 3, 91 - 108.
- Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Sasakawa, C. (2010): Bacterial interaction with the host epithelium. *Cell Host and Microbe* 8, 20 - 35.
- Kip, P., Meyer, D., Jellema, R. H. (2006): Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal* 16, 1098 - 1103.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, A., Altermann, E. (2005): Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393 - 409.
- Kleerebezem, M., Hughenoltz, J. (2003): Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 232 - 237.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41, 103 - 125.

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quest, C., Horn, M., Glöckner, F. O. (2013): Evolution of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, 1 - 11.
- Kongo, J. M. (2013): Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/55937. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-starter-cultures-for-cheese-processing-past-present-and-future-developments>
- Kopanos, G. M., Puigjaner, L., Georgiadis, M. C. (2011): Resource-constrained production planning in semicontinuous food industries. *Computers and Chemical Engineering* 35, 2929 - 2944.
- Kosikovsk, F. V., Mistry, V. V. (1999): *Fermented milks*. U knjizi, *Cheese and Fermented Milk Foods Vol.1. Origins and Principles*, 3th edition, published by F.V. Kosikowski, L. L. C. SAD, 57 - 108.
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., Tzanetakis, N. (2003): Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal* 13, 517 - 528.
- Kristo, E., Miao, Z., Correding, M. (2011): The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *International Dairy Journal* 21, 656 - 662.
- Kroger, M., Meister, K., Kava, R. (2006): Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 5, 35 - 47.
- Krzeminski, A., Großhable, K., Hinrichs, J. (2011): Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT- Food Science and Technology* 44, 2134 - 2140.
- Küçükçetin, A. (2008): Effect of heat treatment and casein to whey protein ratio of skim milk on graininess and roughness of stirred yoghurt. *Food Research International* 41, 165 - 171.
- Kulozik, U. (2003): II.1- Impact of technology on the functional properties of fermented dairy products - new possibilities for product and process design. *Fermented milk, International Dairy Federation, Proceedings of the IDF seminar on aroma and texture of fermented milk held in Kolding, Denmark, June, 2002*, 168 - 183.
- Kulozik, U. (2007): Novel means to create and to optimise fermented dairy products textures. *IDF Regional Conference on Fermented Milks, Moskva, 17.5*. PP prezentacija 1 - 49.
- Kurman, J. A. (1984): The production of fermented milks in the world. *FIL -IDF Bulletin* 179, 8-26.
- Kurman, J. A., Rašić, J. Lj., Kroger, M. (1992): An international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products. U knjizi, *Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products, An AVI Book, New Jourk*, 1 - 368.
- Lee, W. J., Lucey, J. A. (2004): Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science* 87, 3153 - 3164.
- Lee, W. J., Lucey, J. A., (2010): Formation and physical properties of yogurt, *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 23, 1127 - 1136.
- Leroy, F., Vuyst, de L. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15, 67 - 78.
- Lewis, J. N., Thomas, L. V., Weir, W. (2009): The potential of probiotic fermented milk products in reducing risk of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* disease. *International Journal of Dairy Technology* 62, 461 - 471.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2006): Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837 - 848.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., Lv, J., (2013): Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control* 34, 675 - 680.
- Libudzisz, Z., Piatkiewicz, A. (1990): Kefir production in Poland. *Dairy Industriales International* 55, 31 - 32.
- Libudzisz, Z., Stepaniak, L. (2002): *Fermented milks/Buttermilk*. U knjizi, *Encyklopedia of Dairy Science*, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1028 - 1034
- Licht, T. Ebersbach, R., Frøkiær, T. (2012): Prebiotics for prevention of gut infections. *Trend in Food Science and Technology* 23, 70 - 82.
- Lilly, D. M., Stillwell, R. H. (1965): Probiotics growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science* 147, 747 - 748.
- Liu, X., Liu, W., Zhang, Q., Tian, F., Wang, G., Zhang, H., Chen, W. (2013): Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. *Food Control* 30, 563 - 568.
- Locke, S. (2012): Introduction to rheology, V2.1, Rheotec E. doc. www.rheotec.de, 1 - 48.

- Lopez, C. (2011): Milk fat globules enveloped by their biological membrane: unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 16, 391 - 404.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006): Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología* 23, 67 -74.
- Lorenzen, PC, Neve, H., Mautner, A., Schliemme, E. (2002): Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 55, 152 - 157.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, C. B. (2001): Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11, 1 - 17.
- Loveday, S. M., Sarkar, A., Sing, H. (2013): Inovative yoghurts: novel processing technologies for improving acid milk gel tekture. *Trends in Food Science and Technology* doi: 10.1016/j.tifs.2013.06.007.
- Lucey, J. A., Singh, H. (1997): Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International* 30, 529 - 542.
- Lucey, J. A., Munro, P. A., Singh, H. (1999): Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal* 9, 275 - 279.
- Lucey, J. A. (2004): Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology* 57, 77 - 84.
- Lucy, H., Deegan, P., Cotter, D., Hill, C., Ross, P. (2006): Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf - life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058 - 1071.
- Lüthi-Peng, Q., Dileme, F. B., Puhán, Z. (2002): Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 289 - 296.
- Magalhães, K. T., Dragone, G. M., De Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., Silva, J. B. A., Schwan, R. F. (2011): Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry* 126, 249 - 253.
- Maiocchi, G. (2003): Influence of technological conditions on fermented milk production. Fermented Milk, International Dairy Federation- ref. S.I. 0301, 202 - 210.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2007): Evolutinary genomic of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 1199 - 1208.
- Marafon, A. P., Sumi, A., Alcântara, M. R., Tamime A. Y., de Oliveira M. N. (2011): Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. *LWT- Food Science and Technology* 44, 511 - 519.
- Marcó, M. B., Moineau, S., Quiberoni, A. (2012): Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149 - 158.
- Marco, M. L., Wells-Bennik, M. H. J. (2008): Impact of bacterial genomics on determining quality and safety in the dairy production chain. *International Dairy Journal* 18, 486 - 495.
- Marilley, L., Casey, M. G. (2004): Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90, 139 - 159.
- Marshall, V. M., Cole, W. M., Brooker, B. E. (1984): Observation on the structure of kefir grains and distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology* 57, 491 - 497.
- Marshall, V. M., Tamime, A. Y. (1997): Starter cultures in the manufacture of biofermented milks. *International Journal of Dairy Technology* 50, 35 - 41.
- Marsshal, V. M., Tamime, A. Y. (1997): Physiology and biochemistry of fermented milks. U knjizi, Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks, second edition, ed by B.A. Law, Blackie Academic and Professional, London, 153 - 192.
- Marten, B., Pfeuffer, M., Schrezenmeir, J. (2006): Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal* 16, 1374 - 1382.
- Martín-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2003): Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 13, 827 - 833.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., Swings, J. (2004): Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1137 - 1143.
- Matia-Merino, L., Singh, H. (2007): Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocolloids* 21, 765 - 775.
- Matumoto-Pintro, P. T., Rabiey, L., Robitaille, G., Britten, M. (2011): Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal* 21, 21 - 26.

- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martin, P., Bardowski, J. (2010): Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. U knjizi, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Application*, Ed. Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M., Wiley - Blackwell, SAD, 3 - 33.
- McKinley, M. C. (2005): The nutrition and health benefits of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 58, 1 - 12.
- Mellema, M., Walstra, P., van Opheusden J. H. J., van Vliet, T. (2002): Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science* 98, 25 - 50.
- Metchnikoff, E. (1908): Prolongation of life. Optimistic studies (engleski prijevod), ed. M.P. Chalmers, Putman's Sons, 1 - 339.
- Michalski, M. C., Januel, C. (2006): Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science and Technology* 17, 423 - 437.
- Michalski, M. C., Ollivon, M., Briard, V., Leconte, N., Lopez, C. (2004): Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behaviour. *Chemistry and Physics of Lipids* 132, 247 - 261.
- Mills, S., McAuliffe, O. E., Coffey, A., Fitzgerald, G. F., Ross, R.P. (2006): Plasmids of lactococci-genetic accessories of genetic necessities? *FEMS Microbiology Reviews* 30, 243-273.
- Mitsuoka, T. (1990): Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* 6, 263 - 268.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucula, G., Willemot, R.-M., Rемаud-Siméon, M. (2001): Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11, 675 - 685.
- Moreira, S. R., Schwan, R. F., de Carvalho, E. P., Wheals, A. E. (2001): Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 117 - 122.
- Moreno, Y., Collado, M. C., Ferrús, M. A., Hernández, E., Hernández, M. (2006): Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4 °C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 275 - 280.
- Muir, D. D. (1996): The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 1, 24 - 32.
- Muir, D. D. (1996): The shelf life of dairy products: 3. Factors influencing raw milk intermediate and long life dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 67 - 72.
- Muir, D. D., Hunter, E. A., Dalaudier, C. (1997): Association of the sensory properties of commercial, strawberry flavoured fermented milks with product composition. *International Journal of Dairy Technology* 50, 28 - 41.
- Muir, D. D., Tamime, A. Y., Wszolek, M. (1999): Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt. *International Journal of Dairy Technology* 52, 129 - 134.
- Murata, H. (2012): Rheology - theory and application to biomaterials, polymerization. Dr. Ailton De Souza Gomes (Ed.), ISBN: 978-953-51-0745-3, InTech, DOI: 10.5772/48393. Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerization/rheology-theory-and-application-to-biomaterials>
- Nilsson, L.-E., Lyck, S., Tamime, A. Y. (2006): Production of drinking products. U knjizi, *Fermented Milks* ed. A.Y Tamime, Blackwell Publishing, UK, 95 - 127.
- Niranjan, K., Gutiérrez- López, G. F. (2009): Food physics. U knjizi, *Food Science and Technology*, ed. Campbell-Platt, G., Wiley-Blackwell, Oxford, UK.193-206.
- Nobel, J. M., Jaros, D., Rohm, H. (2010): Physical properties of acid milk gels: acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids* 15, 1 - 7.
- Nsabimana, C., Jiang, B., Kossah, R. (2005): Manufacturing, properties and shelf life of labneh: a review. *International Journal of Dairy Technology* 58, 129 - 137.
- O'Connor, E. B., Barrett, G. E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., Ross, R. P. (2005): Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. U knjizi, *Probiotic Dairy Products*, ed. A.Y. Tamime, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 167 - 194.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7, 687 - 693.
- Oliveira, A. P., Nielsen, J., Förster, J. (2005): Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiology* 5:39, doi: 10.1186/147-2180-5-39.
- Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., Corrieu, G. (2001): Effect of milk supplementations and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 11, 935 - 942.
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., Hill, C. (2012): Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology* 152, 189 - 205.
- Östlie, H. M., Helland, M. H., Narvhus, J. A. (2003): Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology* 87, 17 - 27.

- Otes, S., Cagindi, O. (2003): Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* 2, 54 - 59.
- Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Salminen, S. J. (1999): Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiology Letters* 172, 61 - 64.
- Özer, B. (2010): Strategies for yogurt manufacturing. U knjizi, Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products, ed. F.Yildiz, CRC Press, SAD, 48 - 96.
- Özer, B.H., Kirmaci, H. A. (2010): Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology* 63, 1 - 15.
- Paliyath, G., Shetty, K. (2011): Functional foods, nutraceuticals and disease prevention: a window to the future of health promotion. U knjizi, Functional Foods, Nutraceuticals, and Degeneration Disease Prevention, First edition. 3-9. John Willey & Sons, Inc.
- Papavasilious, G., Kourkoutas, Y., Rapti, A., Sipsas, V., Soupioni, M., Koutinas, A. A. (2008): Production of freeze-dried kefir culture using whey. *International Dairy Journal* 18, 247 - 254.
- Park, Y. W., Chukwu, H. I. (1988): Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Ruminant Research* 1, 157 - 165. Park, Y. W., Chukwu, H. I. (1989): Trace mineral concentrations in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds during the first 5 months of lactation. *Journal of Food Composition and Analysis* 2, 161 - 169.
- Park, Y. W. (2006): Goat milk-chemistry and nutrition. U knjizi, Handbook of Milk and Non-bovine Mammals, ed. Park, Y. W., Haenlein, G.F.W., Oxford: Blackwell Publishing Professional, UK i Ames, Iowa, USA, 34 - 58.
- Park, Y. W. (2007): Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 73 - 87.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramons, M., Heanlein, G. F. W. (2007): Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88 - 113.
- Parker, R. B. (1974): Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health* 29, 4 - 8.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H. Y. (2006): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1171 - 1185.
- Paskov, V., Karsheva, M., Pentchev, I. (2010): Effect of starter culture and homogenization on the rheological properties of yoghurts. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 45, 59 - 66.
- Patra, F., Tomar, S. K., Arora, S. (2009): Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 74, R16-R23. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.01005.x
- Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. de J., Nascimento, R., de Melo, I. S., Roque, M. R. de A., de Asis, S. A. (2012): An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 32, 710 - 714, doi: 10.1590/S0101-20612012005000094.
- Penna, A. L. B., Subbarao-Gurram, Barbosa-Cánovas, G. V. (2007): High hydrostatic pressure processing on microstructure of probiotic low-fat yogurt. *Food Research International* 40, 510 - 519.
- Permyakov, E. A., Berliner, L. J. (2000): α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* 473, 269 - 274.
- Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., Vrvic, M. M. (2012): Heat induced casein-whey protein interactions at natural pH of milk: a comparison between caprine and bovine milk. *Small Ruminant Research* 108, 77 - 86.
- Pessione, E. (2012): Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Cellular and Infection Microbiology* doi: 103389/fcimb.2012.00086, 1-15.
- Pfeiler, E., Klaenhammer, T. R. (2007): The genomic of lactic acid bacteria. *TRENDS in Biotechnology* 15, 546 - 563.
- Phyo, T., A., Myint, M., Aye, K N. (2008): Production of exopolysaccharides from selected lactic acid bacteria of food origins. International Conference on Sustainable Development: Issues and Prospects or the GMS, 1 - 3.
- Pogačić, T., Kagkli, D.M., Sikora, S., Kalit, S., Havranek, J., Samaržija, D. (2011.): Experimental approaches for identification of indigenous lactococci isolated from traditional dairy products. *Mljekarstvo* 6, 3 - 14.
- Pogačić, T., Kelava, N., Zamberlin, Š., Dolenčić-Špehar, I., Samaržija, D. (2010): Methods for culture-independent identification of lactic acid bacteria in dairy products. *Food Technology and Biotechnology* 48, 3 - 10.
- Pogačić, T., Samaržija, D., Corich, V., D'Andrea, M., Kagkli, D-M., Giacomini, A., Čanžek Majhenič, A., Rogelj, I. (2010): Microbiota of Karakačanski skakutanac, an artisanal fresh sheep cheese studied by culture-independent PCR-ARDRA and PCR-DGGE. *Dairy Science and Technology* 90, 461 - 468
- Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D. (2013): Mikrobni sastav kefirnih zrna. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* 63, 3 - 14.

- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F. (2011): Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes and Nutrition* 6, 285 - 306.
- Posati, L. P., Orr, M. L. (1976): Composition of foods. U knjizi, Agricultural handbook, Washington: ARS, USDA, SAD, 8 - 1.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P. K. (1998): Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993 - 1002.
- Prasanna, P. H. P., Grandision, A. S., Charalampopoulos, D. (2014): Bifidobacteria in milk products: an overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International* 55, 247 - 262.
- Pravilnik o prehranbenim aditivima (2011): NN 062/2011
- Puhan, Z. (1990): Developments in the technology of fermented milk products. *Cultural Dairy Products Journal* 5, 4 - 10
- Puhan, Z. (1996): Influence of dairy technology on nutritional properties of milk and milk products. 1st Slovenian International Congress: Milk and Dairy Products, Portorož, Slovenija, Research Reports Supplement 24, 323 - 331.
- Purnomo, H., Muslimin, L. D. (2012): Chemical characteristics of pasteurized goat milk and goat milk kefir prepared using different amount of Indonesian kefir grains and incubation times. *International Food Research Journal* 19, 791 - 794.
- Purwandari, U., Shah, N. P., Vasiljevic, T. (2007): Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *International Dairy Journal* 17, 1344 - 1352.
- Puvanenthiran, A., Williams, R. P. W., Augustin, M. A. (2002): Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ration. *International Dairy Journal* 12, 383 - 391.
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G. M., Reinheimer, J., Ackermann, H-W. (2010): *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal* 20, 657 - 664.
- Quwehand, A. C., Salvadori, B. B., Fondén R Mogenes, G., Salminen, S., Sellars, R. (2003): Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *FIL -IDF Bulletin* 380, 4 - 19.
- Raikos, W. (2010): Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces - a review. *Food Hydrocolloids* 24, 259 - 265.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S.K., Adams, M.C. (2010): Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43, 1 - 7.
- Ranadheera, R. D. C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., Baines, S. K. (2012): Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry* 135, 1411 - 1418.
- Rashid, M. H., Togo, K., Ueda, M., Miyamoto, T. (2007): Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk Dahi in Bangladesh. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 125 - 133.
- Rašić, J. Lj. Kurman, J. A. (1978): Treatment of milk in the dairy. U knjizi, Yoghurt Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, 148 - 185.
- Ratray, W., Jelen, P. (1996): Protein standardization of milk and dairy products. *Trends in Food Science and Technology* 7, 227 - 234.
- Ratray, F. P., O'Connell, M. J. (2011): Kefir. U knjizi, Encyclopedia of Dairy Science 2nd edition, Elsevier Ltd., 518 - 524.
- Rawson, H. L., Marshall, V. M. (1997): Effect of "ropy" strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on reology of stirred yogurt. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 213 - 220.
- Raynal- Ljutovac, K., Lagrffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008): Composition of goat and sheep milk product: an update. *Small Ruminant Research* 79, 57 - 72.
- Raynal, K., Remeuf, F. (1998): The effect of heating on physico-chemical and renneting properties of milk: a comparison between caprine, ovine and bovine milk. *International Dairy Journal* 8, 695 - 706.
- Regula, A. (2007): Free fatty acid profiles of fermented beverages made from ewe's milk. *Le Lait* 87, 71 - 77.
- Remeuf, F., Mohammed, S., Sodini, I., Tissier, J.P. (2003): Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal* 13, 773 - 782.
- Renan, M., Guyomarch'h, F., Arnoult-Delest, V., Pâquet, D., Brulé, G., Famelart, M.-H. (2009): Rheological properties of stirred yoghurt as affected by gel pH on stirring, storage temperature and pH changes after stirring. *International Dairy Journal* 19, 142 - 148.
- Renard, D., Robert, P., Faucheron, S., Sanchez, C. (1999): Rheological properties of mixed gels made of microparticulated whey proteins and β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 113 - 121.
- Ribeiro, A. C., Ribeiro, S. D. A. (2010): Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* 89, 225 - 233.

- Roberfroid, M. B. (2000): Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Society for Clinical Nutrition* 71, 1682 - 1687.
- Robinson, R. K. (2002): Fermented milks/yoghurt types and manufacture. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1055 - 1058.
- Robinson, R. K. (2002): Fermented milks/yoghurt, role of starter cultures. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1059 - 1063.
- Robinson, R. K., Tamime, A. Y., Wszolek, M. (2002): Microbiology of fermented milks. U knjizi, Dairy Microbiology Handbook, The microbiology of milks and milks products, ed. R.K. Robinson, John Wiley and Sons, Inc., New York, 367 - 430.
- Rodriguet, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., Medina, M. (2000): Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal* 10, 7 - 15.
- Rogelj, I., Bogovič Matijašić, B., Čanžek Majhenič, A., Stojković, S. (2002): The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF 2221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 76, 83 - 91.
- Roginski, H. (2002): Fermented milks/Northern Europe. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd. 1034 - 1041.
- Routray, W., Mishra, H. (2011): Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste - a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* 10, 208 - 220.
- Roy, D. (2005): Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait* 85, 135 - 138.
- 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.
- Ruas-Madiedo, P., Zoon, P. (2003): Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 213, 245 - 253.
- Ruas-Madiedo, P., Alting, A.C., Zoon, P. (2005): Effect of exopolysaccharide and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity and structure of fermented milks. *International Dairy Journal* 15, 155 - 164.
- Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005): Invited review: Methods for the screenings, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88, 843-856.
- Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., Nomoto, K., Kushiro, A. (2010): M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 139, 154 - 160.
- Salaün, F., Miettton, B., Gaucheron, F. (2005): Buffering capacity of dairy products. *International Dairy Journal* 15, 95 - 109.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2002): Probiotics, applications in dairy products. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 2315-2322.
- Salminen, S., van Loveren, H. (2012): Probiotics and prebiotics: health claim substantiation. *Microbial Ecology in Health and Disease* 23, 18568-[http:// dx.doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18568](http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18568).
- Samaržija D., Tudor, M., Prtilo, T., Dolenčić Špehar, I., Zamberlin, Š., Havranek, J. (2009): Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje. *Mljekarstvo* 59, 28 - 32.
- Samaržija, D. (2011.): Fermentirana mlijeka, vrhnje, maslac. Priručnici/ nastavni tekst Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Izdavač Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ISBN 978-953-6135-96-7
- Samaržija, D., Antunac, N., Lukač Havranek, J. (2001): Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo* 51, 35 - 48.
- Samaržija, D., Lukač Havranek, J., Antunac, N., Sikora, S. (2001): Characteristics and role of mesophilic lactic cultures. *Poljoprivredna znanstvena smotra* 66, 113-120.
- Sanders, M. E., Klaenhammer, T. R. (2001): Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science* 84, 319 - 331.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E. J. (2004): Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal* 14, 151 - 159.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J.M., Marquina, D. (2003): The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 434 - 437.
- Sanz, Y. (2007): Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal* 17, 1284 - 1289.
- Sarkar, M. M., Nahar, T. N., Alam, M. K., Rahman, M. M., Rashid, M. H., Islam, M. A. (2012): Chemical and bacteriological quality of popular Dahi available in some selected areas of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Animal Science* 41, 47 - 51.

- Savard, P., Lamarche, B., Paradies, M-E., Thiboutot, H., Laurin, E., Roy, D. (2011): Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* 149, 50 - 57.
- Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fondén, R., Reniero, R. Mattila-Sandholm, T. (1999): The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10, 387 - 392.
- Saxelin, M. (2008): Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clinical Infectious Diseases* 46, 76 - 79.
- Scheller, M., O'Sullivan, D. J. (2011): Comparative analysis of an intestinal strain of *Bifidobacterium longum* and a strain of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 94, 1122 - 1131.
- Schleifer, K-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R. (1995): Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1081 - 1092.
- Schmidt, D. G. (1982): Association of casein and casein micelle structure. U knjizi, *Developments in Dairy Chemistry*, ed., Fox, P.F. Applied Science Publishers, Barking, UK, 61 - 86.
- Schorsch, C., Carrie, H., Norton, I. T. (2000): Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid induced gelation. *International Dairy Journal* 10, 529-539.
- Šcibisz, I., Ziarno, M., Mitek, M., Zaręba, D. (2012): Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanines in blueberry yoghurts. *LWT- Food Science and Technology* 49, 208 - 212.
- Scintu, M.F., Piredda, G. (2007): Typical and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research* 68, 221 - 231.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K., Sagredos, A. (2012): Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chemistry* 134, 1839 - 1846.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., Ferragut, V. (2007): Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal* 17, 782 - 790.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. (2009): Flavour profile and survival of starter cultures of yogurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal* 19, 100 - 106.
- Shah, N. P. (2000): Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894 - 907. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8
- Shah, N. P. (2003). The exopolysaccharide production by starter cultures and their influence on textural characteristics of fermented milks. *Fermented Milk*, International Dairy Federation-ref.S.I.0301., 101 - 115.
- Shah, N. P. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1262 - 1277.
- Shieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., Eyer, H. (2004): Impact of microbial culture on conjugated linoleic acid in dairy products - a review. *International Dairy Journal* 14, 1 - 15.
- Shigwedha, N., Jia, L. (2013): *Bifidobacterium* in human GI tract: screening, isolation, survival and growth kinetics in simulated gastrointestinal conditions. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/50457. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/bifidobacterium-in-human-gi-tract-screening-isolation-survival-and-growth-kinetics-in-simulated-gast>
- Shihata, A., Shah, N. P. (2002): Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal* 12, 765 - 772.
- Shkorporov, A. N., Efimov, B. A., Khokhlova, E. V., Steele, J. L., Kafarskaia, Lj. I., Smeianov, V. V. (2008): Characterization of plasmids from human infant *Bifidobacterium* strains: sequence analysis and construction of *E.coli*-*Bifidobacterium* shuttle vectors. *Plasmid* 60, 136-148.
- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholts, J., van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008): Unrevealing microbial interactions in food fermentation: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4997 - 5007.
- Silfverberg, P. (2003): Consistency of stirred fermented milk after fermentation. *Fermented Milk*, International Dairy Federation- ref. S.I. 0301, 211 - 214.
- Silva, S. V., Malcata, F. X. (2005): Casein as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15, 1 - 15.
- Singh, H. (1995): Heat-induced changes in casein, including interaction with whey proteins. U knjizi, *Heat-Induced Changes in Milk*, ed. P.F.Fox., International Dairy Federation, Bruxelles, 86 - 104.

- Sivieri, K., Bedani, R., Cardoso Umbelino Cavallini, D., Rossi, E. A. (2013): Probiotics and intestinal microbiota: implications in colon cancer prevention. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/51696. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/probiotics-and-intestinal-microbiota-implications-in-colon-cancer-prevention>
- Skriver, A., Stenby, D. M., Folkenberg, D. M., Runge, M., Bang Jensen, N. (2003): Tools in the development of future starter cultures for fermented milk. *Fermented Milk*, International Dairy Federation-ref.S.I. 0301
- Sodini, I., Lucas, A., Tissier, J.P., Corrieu, G. (2005): Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal* 15, 29 - 35.
- Sodini, I., Mattas, J., Tong, P. S. (2006): Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties on whey protein concentration in yoghurt. *International Dairy Journal* 16, 1464 - 1469.
- Spearman, C. (1904): The proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology* 15, 72 - 101.
- Spence, J.T. (2006): Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 19S4-S6.
- Spreer, E. (1998): Milk as raw material and food. U knjizi, *Milk and Dairy Product Technology*, Marcel Dekker, INC., New York, 11 - 58.
- Steele, J. L. (1998): Genetics and metabolism of starter cultures. U knjizi, *Applied Dairy Microbiology*, Ed. Marth, E.H., Steele, J.L., Food Science and Technology, Marcel Dekker, Inc., New York, 173 - 193.
- Stelious, K., Emmanuel, A. (2004): Characteristics of set type yoghurt made from caprine or ovine milk and mixtures of the two. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 319 - 324.
- Stepaniak, L., Fetliński, A. (2002): Fermented milks/Kefir. U knjizi, *Encyklopedia of Dairy Science*, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd. 1049 - 1054
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 63, 1 - 29.
- Suárez, V. B., Maciel, N., Guglielmotti, D., Zago, M., Giraffa, G., Reinheimer, J. (2008): Phage-resistance linked to cell heterogeneity in the commercial strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactic* Ab 1. *International Journal of Food Microbiology* 128, 401 - 405.
- Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., Wadhwa, S. S. (2013): Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control* 32, 450 - 460.
- Surono, S., Hosono, A. (2002): Fermented milks/Types and standards of identity. U knjizi, *Encyklopedia of Dairy Science*, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1018 - 1028.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanić, K., Matošić, S. (2010): Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48, 296 - 307.
- Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009): Probiotički koncept-probiotici kao dodatci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju i nutricionizam* 4, 77 - 84.
- Sutula, J., Coulthwaite, L., Verran, J. (2012): Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbial Methods* 90, 65 - 71.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, H. N., Hugenholtz, J. (2003): Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 8, 4542 - 4548.
- Szczepankowska, A. K., Górecki, R. K., Kołakowski, P., Bardowski, J. K. (2013). Lactic acid bacteria resistance to bacteriophage and prevention techniques to lower phage contamination in dairy fermentation. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/51541. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-resistance-to-bacteriophage-and-prevention-techniques-to-lower-phage-contaminant>
- Tabasco, R., Paarup, Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2007): Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1107 - 1114.
- Taïbi A., Dabour N., Lamoureux M., Roy D., LaPointe G. (2010): Evaluation of the genetic polymorphism among *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains using comparative genomic hybridization and multilocus sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 144, 20 - 28.

- Takano, T., Yamamoto, N. (2002): Fermented milks/Health effects of fermented milks. U knjizi, Encyklopedia of Dairy Science, ed. H. Roginski, J.W. Fuguay, P.F. Fox, Elsevier Ltd., 1063 - 1068.
- 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 Safety* 3, 117 - 124.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2004): Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurt. *International Dairy Journal* 14, 143 - 149.
- Tamime, A. Y. (2002): Fermented milks: a historical food with modern application - a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 56, Suppl. 4, S2 - S15.
- Tamime, A. Y., Barrantes, E., Sword, A. M. (1996): The effect of starch based fat substitutes on the microstructure of set-style yogurt made from reconstituted skimmed milk powder. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 1 - 10.
- Tamime, A.Y. Robinson, R.K. (1999): Historical background. U knjizi, Yoghurt Science and Technology, Second edition ed. Woodhead Publishing Limited, CRC, Cambridge, UK, 1 - 9.
- Tamime, A. Y., Marshall, V. M. E. (1997): Microbiology and technology of fermented milks. U knjizi, Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks ed. Law, B. A. Blackie Academic and Professional, London, 57 - 152.
- Tamime, A. Y., Wszolek, M., Božanić, R., Özer, B. (2011): Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research* 101, 2 - 16.
- Tarahomjoo, S. (2013): Exploring surface display technology for enhancement of delivering viable lactic acid bacteria to gastrointestinal tract. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0955-6, InTech, DOI: 10.5772/50783. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/exploring-surface-display-technology-for-enhancement-of-delivering-viable-lactic-acid-bacteria-to-ga>
- Tharmaraj, N., Shah, N. P. (2003): Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science* 86, 2288 - 2296.
- Thebaudin, J. Y., Lefebvre, A. C., Harrington, M., Bourgeois, C. M. (1997): Dietary fibers: nutritional and technological interest. *Trends Food Science and Technology* 8, 41 - 48.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C. (2003): High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and and microbial inactivation. *International Dairy Journal* 13, 427 - 439.
- Tissier, H. (1906): Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. C. R. Soc. Biol. 60:359 - 361.
- Toh, H., Oshima, K., Nakano, A., Takahata, M., Murakami, M., Takaki, T., Nishiyama, H., Igimi, S., Hattori, M., Morita, H. (2013): Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One* 8 (10): e75073. doi:10.1371/journal.pone.0075073, Open Access
- Tomar, P. F., Arora, S. K. S. (2009): Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 74, 1, R16 - R - 23.
- Tomaschunas, M., Hinrichs, J., Köhn, E., Busch-Stockfish, M. (2002): Effect of casein-to-whey protein ratio, fat and protein on sensory properties of stirred yoghurt. *International Dairy Journal* 26, 31 - 35.
- Torre, L. L., Tamime, A. Y., Muir, D. D. (2003): Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. *International Journal of Dairy Technology* 56, 163-170.
- Torres, I. C., Rubio, J. M. A., Ipsen, R. (2012): Using fractal image analysis to characterize microstructure of low-fat stirred yoghurt manufactured with microparticulated whey protein. *Journal of Food Engineering* 109, 721 - 729.
- Torres, I.C., Janhøj, T., Østergaard Mikkelsen, B., Ipsen, R. (2011): Effect of microparticulated whey protein with varying content of denaturated protein on the rheological and sensory characteristics of low-fat yoghurt. *International Dairy Journal* 21, 645 - 655.
- Trachoo, N. (2002): Yogurt: the fermented milk. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 24, 4, 727-737.
- Trachoo, N. (2003): Evidence of association of milk fat globule membrane with protein matrix in dairy gels as revealed by confocal microscopy. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 25, 791 - 797.
- Tratnik, L.J., Božanić, R. (1996.): Primjena ultrafiltracije u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, U knjizi, Fermentirani mliječni proizvodi u prehrani i dijetetici, Hrvatska akademija medicinskih znanosti (HAMZ), Zagreb, str. 45 - 56.
- Tratnik, L.J., Božanić, R. (1996.): Utjecaj dodanog koncentrata proteina sirutke na rast i aktivnost laktobacila i strepto koka tijekom fermentacije i čuvanja jogurta i acidofila. *Mljekarstvo* 46, 169 - 181.

- Tratnik, L.J., Božanić, R. (1997.): Primjena ultrafiltracije pri proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 47, 31 - 44.
- Tratnik, L.J. (1998.): Postupci membranske obrade mlijeka. U knjizi, Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 105 - 116.
- Tratnik, L.J., Božanić, R. (2012): Proteini sirutke. U knjizi, Mlijeko i mliječni proizvodi, Bašić, Z.(ur) Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 49 - 55.
- Tudor, M., Samaržija, D., Havranek, J. (2008.): Dodatci u proizvodnji jogurta. *Mljekarstvo* 58, 21 - 32.
- Turpin, W., Humblot, C., Muriel, T., Guyot, J.-P. (2010): Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 143, 87 - 102.
- Vadamuthu, E. R. (2006): Starter cultures for yogurt and fermented milks. U knjizi, Manufacturing Yogurt and Fermented Milks, ed. Chandan, R.C. ass.ed. White, C.H., Kilara, A., Hui, Y.H., Blackwell Publishing, Oxford, UK, 89-115.
- Valli, C., Traill, W. B. (2005): Culture and food: a model of yoghurt consumption in the EU. *Food Quality and Preference* 16, 291 - 304.
- Van de Castele, S., Van Heuvelzwin, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., Huys, G. (2006): Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16, 1470 - 1476.
- Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Hugenholtz, J. (2007): Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1290 - 1297.
- Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Hugenholtz, J. (2007): Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1290 - 1297.
- Van Pijkeren, J.-P., Britton, R. A. (2012): High efficiency recombineering in lactic acid bacteria. *Nucleic Acids Research* 40, 1 - 13.
- Van Vliet, T., Lakemond, C. M. M., Visschers, R. W. (2004): Rheology and structure of milk protein gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9, 298 - 304.
- Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2008): Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *International Dairy Journal* 18, 1146 - 1152.
- Vasbinder, A. J., Alting, A. C., Kess, G., de Kruif, K. G. (2003): Quantification of heat-induced casein-whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31, 115 - 123.
- Vasbinder, A. J., Alting, A. C., Visschers, R. W., de Kruif, K. G. (2003): Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *International Dairy Journal* 13, 29 - 38.
- Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2008): Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18, 714 - 728.
- Vedamuthu, E. R. (2006): Starter cultures for yogurt and fermented milks. U knjizi, Manufacturing Yogurt and Fermented Milks ed. Chandan R.C., ass.ed. White, C.H., Kilara, A., Hui, Y.H., Blackwell Publishing, SAD, 89 - 115.
- Ventura, M., O'Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. (2007): From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 120, 2 - 12.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. (2004): Inside into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhouek* 86, 205 - 223.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A. (2000): Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L.acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal* 10, 271 - 275.
- Vollmer, W. (2012): Bacterial outer membrane evolution via sporulation? *Nature Chemical Biology* 8, 14 - 18.
- Von Ah, U., Mozzetti, V., Lacroix, C., Kheadr, E. E., Fliss, I., Meile, L. (2007): Classification of moderately oxygen-tolerant isolated from baby faeces as Bifidobacterium thermophilum. *BMC Microbiology* 7, 79 Available from: <http://www.biomedcentral.com/141-2180/7/79>, doi:10.1186/1471-2180 - 7 - 79.
- Vujičić, I. F. (1985): Fizička i fizičko-hemijska svojstva mleka. U knjizi, Mljekarstvo I deo, Naučna knjiga, Beograd, 101 - 160.
- Walstra, P. (1990): On the stability of Casein Micelles. *Journal of Dairy Science* 73, 1965 - 1979.
- Walstra, P. (1999): Casein sub-micelles: do they exist. *International Dairy Journal* 9, 189 - 192.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (1999): Lactic fermentation. U knjizi, Dairy Technology-Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, INC., New York, 325 - 362.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (1999): Fermented Milks. U knjizi, Dairy Technology-Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, INC., New York, 517 - 537.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (1999): Colloidal Particles of Milk. U knjizi, Dairy Technology-Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, INC., New York, 107 - 147.

- Wang, S. Y., Chen, K. N., Lo, Y. M., Chiang, M. L., Chen, H. C., Liu, J. R., Chen, M. J. (2012): Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology* 32, 274 - 285.
- Wang, T.T., Lee, B.H. (1997): Plasmids in *Lactobacillus*. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, 227 - 272.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., Song, S. (2008): Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 283 - 288.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X. (2010): Physical characterisation of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers* 82, 895 - 903.
- Waugh, D. G. (1958): The interaction of α s, β and κ - caseins in micelle formation. *Faraday Society Discussions* 25, 186 - 192.
- Welman, A. D., Maddox, I. S. (2003): Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *TRENDS in Biotechnology* 21, 269 - 274.
- WGO (2008): Probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organization Practice Guideline 1-22.
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. (2006): Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology* 17, 97 - 104.
- Woese, C. R. (2000): Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of sciences* (PNAS) 98, 8392 - 8396.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., Michiels, C. W. (2002): Bacterial inactivation by high pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 77, 205 - 212.
- Zamberlin, Š., Dolenčić Špehar, I., Kelava, N., Samaržija, D. (2012.): *Lactobacillus rhamnosus* beneficial and adverse effects on human health. *Milkwissenschaft* 67, 30 - 33.
- Zamberlin, Š., Mioč, B., Samaržija, D. (2011): Influence of yogurt culture on some chemical parameters of sheep's milk yoghurt during storage. Proceedings, 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture, Opatija, 14-18, 908 - 911.
- Zamberlin, Š., Pogačić, T., Mahnet, S., Golem, Ž., Havranek, J., Samaržija, D. (2010): The effect of heat treatment of ovine milk on the compositional and sensory properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 63, 587 - 592.
- Zamberlin, Š., Samaržija, D., Mamula, P., Havranek, J., Pecina, M., Pogačić, T. (2007): Viskoznost tekućeg jogurta tijekom pohrane. *Mljekarstvo* 57, 209 - 218.
- Zhang, Z-G., Ye, Z-Q., Yu, IL. Shi, P. (2011): Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evolutionary Biology* 11:1 [http:// www.biomedcentral.com/1471-2148/11/1](http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/1) Open Access



Fermentirana mlijeka

- 1 Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani
- 2 Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i
metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija
- 3 Mikrobne kulture
- 4 Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka
- 5 Jogurt i druga fermentirana mlijeka
- 6 Fizikalna i reološka svojstva jogurta
- 7 Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka
- 8 Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka
- 9 Literatura

10 Kazalo pojmova

Brojevima stranica u *kurzivu* označeni su pojmovi koji su prikazani slikom, a **podebljanim** brojevima stranica pojmovi koji su prikazani tablicom.

A

- 4ABC–MRS agar, *B. animalis* Bb–12 344
- AB/ABC/ABT kultura 14, 288, 303, 304, 309
- ACE enzimi / inhibitori 16–17
- acetaldehid
 - aromatski spoj / bakterijske vrste 49, 51, 61–62, 77, 94, 94, 100, 110, 201–202, 215
 - jogurt 220, 241, **336**, 337, 350
 - kefir 252
 - kiselo mlijeko 243
 - mezofilna kultura 89, 91
 - način sinteze 76, 76
 - termofilna kultura 94
- Acetobacter* spp. 351
- acetoin/aceton, aromatski spojevi
 - bakterijske vrste 47, 49, 70, 70, 73
 - jogurt 202, 215, 220, 222, 242, 350
 - kefir 252
 - kiselo mlijeko 201, 243
 - metabolizam citrata 75–76
 - mezofilna kultura 91
 - mlačenica 245
 - termofilna kultura 94
- acidifikacija
 - fizikalno–kemijske i biokemijske promjene 142, 197–201
 - hlađenje 204, 222
 - jogurt 216–217, 226
 - kultura 89, 108–109, 117, 219
 - mlijeko 142
 - oblikovanje gel–strukture jogurta 219
 - pogreške 348, 351
 - postacidifikacija 217, 218, 241, 349
 - TGaza 167–168
 - ultrafiltracija 153
 - visokotlačna homogenizacija 183
- acidofilno mlijeko 12, 12, 13, 14, 195, 242
 - acidofilno–kvaščevo mlijeko 307
 - kiselo acidofilno mlijeko 306–307
 - slatko acidofilno mlijeko 306–307
- actimel 14, 305
- Actinomyces* grana G+ bakterija 44
- adhezija
 - adhezijski indeks 323
 - kultura 98
 - probiotičkih bakterijskih sojeva 319, 323
- aditivi 149, 159
- adsorpcija 89, 130, 175, 175, 178, 300, 302
- Aerococcus*, taksonomija 42, 43, 49
- aglutini /aglutinizacija 89, 111
- AISY, automatski inokulacijski sustav 106–107
- aktivitet kulture 347–348
- albumini
 - bioaktivni peptidi 17
 - denaturacija 189–190, 193
 - koncentrati proteina mlijeka 155
 - koncentrati proteina sirutke 156
 - mlijeko 123, 130
 - proteini sirutke 134–135
- Alcaligenes viscolactis* 331, 332
- alkoholna fermentacija 10, 14, 70, 89, 111, 202, 236, 252, 254
- aminokiseline
 - fermentirana mlijeka 16, 56, 167, 213, 222, 241, 300
 - kazein 131, 133, 167
 - metabolizam proteina 64
 - proteini sirutke 18, 134
- anaerobna inkubacija 64, 74, 308, 341, 342, 343, 345, 346
- analizator teksture 226
- antibiotik izazvana dijareja 322
- antibiotik rezistencija 41, 49, 61, 322, 327, 343, 344
- antihipertenzivno djelovanje 17
- antikancerogeno djelovanje 84, 320
- antimikrobna aktivnost
 - bakterijski sojevi 45, 60, 98, 319
 - laktoferin 111, 122, 134
 - proteini/peptidi 17, 82–83
- antimikrobne supstancije 60, 82, 82, 98, 319
- antimikrobni učinak 75, 84, 98, 319
- AOAC metode (*Official Methods of Analysis*) 333
- API test 33, 34
- Archaea* 41, 42, 313
- arginin 33, 50

aromatizirana fermentirana mlijeka 12, 13, 23, 164, 204,
209, 217, 222, 226, 334, 349

aromatski spojevi

bifidobakterije 97

jogurt 220–222, 241

tvorba aromatskih spojeva 201–203

kefir 252

kiselomliječko 243

kultura 51, 87, 91, 94, 109

metabolizam citrata 75–76

stvaranje acetaldehida 76–77

aseptički uvjeti

automatski inokulacijski sustav (AISY) 106, 107

priprema i inokulacija kultura 102–105, 105

punjenje i pakiranje 229, 232

aspartam 164

ATCC (*American Type Culture Collection*, SAD) 32

ATP (adenozintrifosfat) 8

B

B. adolescentis 52–55, 305, 311, 312

B. animalis 52–55, 54, 55, 63, 63–64, 95, 109, 305, 311, 343,
344

B. bifidum 52–55, 55, 95, 97, 109, 167, 303, 304, 305, 311, 312

B. breve 41, 52–55, 55, 97, 304, 305

B. infantis 41, 54, 95, 305

B. lactis 52–55, 95, 305, 323, 346, 346

B. longum 41, 52–55, 55, 95, 97, 304, 305, 308, 311, 312, 343

Bacteroidetes spp.

filogeneza 43

humana mikrobiota 313, 313

bakterije mliječne kiseline (BMK)

filogeneza 42–44

genetske, morfološke i fiziološke karakteristike

Enterococcus 49–50

L. acidophilus 57–58

L. casei skupina 58–60

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 55–57

L. reuteri 60–61

Lactobacillus 46–48

Lactococcus 49

Lactococcus lactis 62–63

Leuconostoc 50–51

Pediococcus 51–52

S. thermophilus 61–62

Streptococcus 50

metabolički inženjering 37, 38, 39

kontrola sustava nizin ekspresije (NICE) 38–39

rekombinacija gena za sintezu aminokiselina 38

rekombinacija gena za sintezu EPS 38

rezistentnost na vankomicin 40

metabolizam citrata 40, 47, 49, 51, 62, 76, 91, 109, 201

kiselomliječko 243

leukonostok kometabolizam 69, 70

metabolizam laktoze 9, 10, 11, 66–72

ATP–ovisni laktoza permeazni sustav 41, 62, 66,
67, 68

Embden–Mayerhof–Parnasov put (EMP) 48, 55,
66, 67, 67, 68, 73

fosfoenolpiruvat (PEP)–ovisni fosfotransferazni
(PEP:PTS) sustav 41, 66, 67, 68

fosfoketolazni put (PKP) 47–48, 66, 68–69, 70

heterofermentativni 7, 46, 48, 60, 68

homofermentativni 7, 46, 51, 55, 56, 78, 100, 343

Leloirov put 56, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 81

Tagatozni put 67, 68, 70, 72, 81

metabolizam proteina 37, 40, 41, 62, 64, 65, 89, 90, 94,
202, 203, 217, 220

opis 45–46

plazmidi

genetski materijal 30, 31, 32, 40–41

plazmidno kodirani metabolizmi BMK 80, 89, 90

taksonomsko klasificiranje 33–34

tvorba acetaldehida 61, 73, 76–77, 91, 94, 110 201–202,
215

koncentracije jogurt 220–221

kozji jogurt 241

tvorba egzopolisaharida 50, 56, 60, 62, 77–82, 81

kefirna kultura 246, 248

metabolički inženjering 38, 38

probiotički sojevi 321

viskozna kultura 217, 283, 288, 307, 341

bakteriocini

klasifikacija i funkcija 82–84, 88, 89, 98, 319, 321
nizin 38, 38, 83, 83, 89, 164

bakteriofag

izvor

kultura 87, 88, 89, 114
obrano mlijeko u prahu 113
sirovo mlijeko 112
toplinski obrađeno mlijeko 114

kontrola 116–119, 340, 347

laktobacili 115

laktokoki 90, 90, 113, 113, 115

rezistentnost 87, 89, 116

streptokoki 62, 115, 115

životni ciklus 112

BCCM/LMG (*Bacteria Collection*, Belgija) 32

bifidobakterije

Bifidobacterium spp.

opis i tehnološke karakteristike 52, 53, 55, 97, 166

B. adolescentis 305, 311, 312

B. animalis 54, 55, 63–64

B. bifidum 54, 95, 305

B. breve 41, 54, 305

B. infantis 41, 54, 95, 305

B. lactis 95, 305, 323, 346

B. longum 41, 54, 95, 305, 308, 311

bifidociklus hidrolize laktoze 72, 72

humana mikrobiota 312

morfologija i fiziologija 52, 53, 55

plazmidi 41

probiotička fermentirana mlijeka 54, 63, 96, 217, 22,

242, 288, 293, 303, 305, 309, 311

taksonomsko klasificiranje 33–34, 44, 45, 45, 52

Actinomyces grana G+ bakterija 44

bifidociklus razgradnje laktoze 72, 72

BIM 25 hranilište, bifidobakterije 343

bioaktivni lipidi

glicerofosfolipidi 20, 23, 129

konjugirane linolne kiseline (CLA) ili ω 3, 6 masne kiseline, 18, 20, 23

maslačna kiselina 23, 317, 318

octena kiselina 23, 317, 318

sfgolipidi 23, 129, 140

bioaktivni peptidi

derivati kazeina 16, 17

antimikrobna 17

imunomodulacija 17

snižavanje krvnog tlaka

angiotenzin konvertirajući enzimi (ACE) i

ACE inhibitor 16

vezanje minerala 17

derivati proteina sirutke (α -La, β -Lg) 17

metabolizam masti i opioidna funkcija 17

biojogurt 208, 289, 303, 308

biološka vrijednost

fermentirana mlijeka 15, 18, 20, 39

biotin (B8) 22, 139

BMK, vidi bakterije mliječne kiseline

2–3 butan glikol 22, 220, 317

butirofilin 21, 23

C

Candida spp. 10, 11, 87, 247, 255, 399

Carnobacterium 42, 45, 49

cistein 50, 62, 134, 135, 192, 309, 342, 344, 346

cistin 94, 192, 214, 343

citokin 315, 316, 320

citrat metabolizam

Enterococcus spp. 49

L. lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 40, 51, 62, 75

Leuconostoc spp. 51, 69, 70, 75

CLA, vidi konjugirane linolne kiseline

Clostridium spp., probiotički učinak 322, 324, 328

CNCN (*Collection National de Cultures de*

Microorganismes, Francuska) 302

Codex Alimentarius Standard 243–2003

dodatci 159

fermentirani mliječni napitci 13

fermentiranih mlijeka 12, 12, 13, 246

CPP, kazeinfosfolipidi 16–17, 23

crijevna mukoza 45, 313, 323

Crohnova bolest 20, 318

Č

čvrsti jogurt

klasična jogurtna kultura 94, 94, 95, 213–216, 218, 218, 220

opis 5, 12, 76–77, 224

tehnologija 154–155, 185, 185, 202, 203, 204, 210–213, 221, 223–225

D

dahi/dadhi/dahee/dadih 3, 4, 6, 14, 15

deaeracija 148, 149, 155, 172, 211

- definicija
 fermentirana mlijeka 11
 funkcionalna hrana 22
 kulture 87
 prebiotika i simbiotika 302
 probiotika 301
- dekstroza 101
- delvo X test 331
- denaturacija
 kazeina 193–194
 proteina sirutke 189–193, 190
- povezivanje 193
- dentričke stanice 316, 321
- DGGE (elektroforeza u gel denaturirajućem gradijentu)
 33, 34, 35, 249
- diacetil
 antimikrobno djelovanje 82, 98
 jogurt 202, 220, 222, 242
 kefir 252
 kiselo mlijeko 77, 91–92, 243
 metabolizam citrata 75–76
 mlaćenica 245
- diacilglicerol 126, 238
- digestija 16, 17
- dijareja, prevencija i liječenje 322
- DNA (deoksiribonukleinska kiselina), građa 30
- dnevna doza 305, 308
- dokosaheksaenska kiselina (DHA) 19, 124
- DSM/DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen / German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Njemačka) 302
- DVI/DVS kulture 105, 253
- E**
- E. faecium* / *E. faecalis*
 morfologija i metabolizam 49–50
 sastav kultura 87, 305
- EFSA (*European Food Safety Authority*) 86, 302, 328
- egzopolisaharidi (EPS) BMK 77, 78
 kefir 80, 284–249
 metabolički put tvorbe 77–80, 81
 učinak na formiranje gel–strukture 216, 284, 287
 učinak na mikrostrukturu 80, 284–286
 viskozna fermentirana mlijeka 80, 257
 viskozne kulture 80, 81, 82, 215, 218
- eikosapentenska kiselina (EPA) 19, 124
- emulgacija 155, 156, 157, 175, 182, 278
 emulgatori 159, 165, 238
- emulzija 124, 140, 140, 175, 175, 176, 182, 186
- Enterobacteriaceae* 339
- Enterococcus*
 taksonomsko klasificiranje 42, 44
E. faecium / *E. faecalis*
 morfologija i metabolizam 49–50
 sastav kultura 87, 305
- enzimi
 bifidociklus razgradnje laktoze
 acetat kinaza 72
 enzim iz EMP puta 72
 fruktoza–6P fosfoketolaza 72
 glukoza 6–P izomeraza 72
 heksokinaza 72
 ksiluloza–5 fosfoketolaza 72
 laktat dehidrogenaza 72
 riboza–5 P–3–epimeraza 72
 riboza–5P izomeraza 72
 transaldolaza 72
 transketolaza 72
- glukoza–citrata kometabolizam *Leuconostoc* spp.
 acetat kinaza 70
 alkohol dehidrogenaza 70
 2, 3 butilen glikol dehidrogenaza 70
 citrat liaza 70
 citrat permeaza 70
 fosfotransacetilaza 70
 laktat dehidrogenaza 70
 oksalacetat dekarboksilaza 70
 α–acetolaktat dekarboksilaza 70
 α–acetolaktat sintaza 70
- metabolizam galaktoze Leloirov put
 epimeraza 70
 fosfoglukoza 70
 β–galaktokinaza 70
- metabolizam galaktoze Tagatolni put
 D–galaktoza–6–fosfat izomeraza 70
 D–tagatoza 1, 6P–aldolaza 70
 D–tagatoza–6–fosfat kinaza 70
- metabolizam laktoze Embden–Mayer–Parnas put (EMP)
 endolaza 67
 fosfofruktokinaza 67
 fosfoglicerokinaza 67
 fosfogliceromutaza 67
 fosfoglukomutaza 67
 fosfoglukoza izomeraza 67
 fruktoza–1, 6–difosfat aldolaza 67, 68

galaktokinaza 67
 galaktoza 6-fosfat izomeraza 67
 glukokinaza 67
 glukoza: galaktoza-1-P uridil transferaza -UDP-
 glukoza epimeraza 67
 laktat dehidrogenaza 67, 68
 piruvat kinaza 67, 68
 P-β galaktozidaza 67
 tagatoza-1, 6-difosfat aldolaza 67
 tagatoza-6-fosfat kinaza 67
 trioza fosfat dehidrogenaza 67
 β-D- galaktozidaza 67, 68,
 metabolizam laktoze fosfoketolazni put (PKP)
 6-fosfoglukonat dehidrogenaza 69
 acetaldehid dehidrogenaza 69
 acetat kinaza 69
 enolaza 69
 epimeraza 69
 etanol dehidrogenaza 69
 fosfoacetil transferaza 69
 fosfoglicerokinaza 69
 fosfogliceromutaza 69
 fosfoglukomutaza 69
 fosfoketolaza 69, 69
 galaktokinaza 69
 glukokinaza 69
 glukoza 6-fosfat dehidrogenaza 69, 69
 glukoza: galaktoza-1-P- uridil transferaza -
 UDP-glukoza epimeraza 69
 laktat dehidrogenaza 69
 piruvat kinaza 69
 trioza fosfat dehidrogenaza 69
 β-D-galaktozidaza 69
 metabolizam lipida
 deaminaze 66
 dekarboksilaze 66
 metabolizam proteina
 aldolaze 65
 aminopeptidaze 65
 dipeptidaze 65
 endopeptidaze 65
 stanično vezane proteinaza 64
 tripeptidaze 65
 epilaktoza 194
 epitelne stanice
 učinak BMK, ibifidobakterija, prebiotika 58, 313, 315,
 317, 319, 321, 321-325,

Escherich, Theodor, znanstvenik
 crijevna ravnoteža 299
Escherichia coli
 inhibicija 98, 184
 intestinalni trakt 314, 324
 esteri/esterifikacija 17, 18, 64, 66, 126, 129, 131, 160
 etanol
 alkoholna fermentacija 10, 11
 heterofermentivna fermentacija 46, 48, 50, 59, 66, 69,
 76, 77, 98, 201, 202
 homofermentativna fermentacija 73, 100, 202
 kefir / kumis / acidofilno-kvaščevo mlijeko 11, 253,
 254, 307
 kiselo mlijeko i srodne vrste 77
 evaporacija u vakuumu 7, 150-151, 153, 351

F

fag (vidi bakteriofag)
 FAO (*Food and Agriculture Organization*) 83, 301, 328
 FDA (*Food and Drug Administration, SAD*) 328
 fenol 299, 317, 324
 fermentacija
 alkoholna 10
 biokemijski procesi 13, 18, 108, 197, 201-202, 219
 fermentacija u fermentacijskim spremnicima 14, 195,
 196, 204, 218, 219, 225, 243
 fermentacija u prodajnoj ambalaži 14, 171, 195, 218,
 219, 230, 252, 257, 307
 fizikalno-kemijski procesi 13, 197-201
 heterofermentativna 68, 69, 72
 homofermentativna 68
 kontinuirana fermentacija 195, 196
 mliječna 9-10
 mliječna kiselina 73
 octena kiselina 75
 pojam 8
 polukontinuirana fermentacija 195, 196
 predfermentacija i glavna fermentacija 194-195, 219,
 224
 prekidanje fermentacije hlađenjem 202, 222, 224, 225,
 226, 228, 239, 251, 252, 253, 256, 273, 307
 fermentacija heksoza, vidi metabolizam heksoza
 fermentirana mlijeka
 definicija 11
 fiziološka vrijednost 16-20, 22-23, 239-240, 300
 preventivni i terapijski učinci 317-325, 326, 327
 hranjiva vrijednost 15-16, 18-19, 21-22, 239-240, 300

klasifikacija 13–14
 osnovni tehnološki procesi 143–148, 148
 povijesni razvitak 3
 proizvodnja i potrošnja 23–24
 fermentirani mliječni napitci 13
 FIL–IDF, Međunarodna mljekarska federacija (engl. *International Dairy Federation*; franc. *Fédération Internationale du Lait*) 12, 86, 340
 filmjölök 6
 filogenetski odnos
 između bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes* 43
 između bakterija mliječne kiseline 44
 između bakterijskih koljena u usporedbi s eukariotskim organizmima 41
 između BMK i bifidobakterija 44, 45
 između glavnih filogenetskih skupina gram–pozitivnih bakterija 43
 između glavnih linija bakterija 42
Firmicutes 42, 43, 43, 46, 49, 50, 51, 313
 fizikalna svojstva, gel strukture 261, 262, 267, 272, 294, 295,
 fizikalno–kemijske analize
 fermentirana mlijeka
 osnovne 334–337
 specifične 267–272, 337–338
 mlijeko 331–333
 fiziološka vrijednost
 fermentirana mlijeka 16–20, 22–23, 239–240, 300
 pojam 15, 23
 folna kiselina
 biosinteza 38, 39, 57, 213
 fermentirana mlijeka 16, 21, 21, 22, 23, 110
 FOS, vidi fruktooligosaharidi
 francuska varijanta voćnog jogurta 229, 230–231
 fruktani 79, 79
 fruktooligosaharidi (FOS)
 prebiotici 165
 tehnološko korištenje 164, 165, 166, 227, 328
 zdravstveni učinak 165, 301, 302, 303, 323–325
 fruktoza 20, 79, 160, 164, 302, 305, 334
 fruktoza–1, 6–difosfat aldolaza, hidroliza laktoze (EMP) 68
 FUFOS (European Functional Food Science Programme) 22
 funkcionalna hrana 22, 298, 239, 300, 301, 304, 327
 funkcionalna kultura 98, 99

G

β -D–galaktozidaza, hidroliza laktoze, 68, 69
 D–galaktoza–6–fosfat izomeraza, Tagatozni put 70
 galaktooligosaharidi (GOS)
 prebiotici 165
 tehnološko korištenje 165, 167, 328
 zdravstveni učinak 165, 302, 303, 323–325
 galaktoza
 komponentni šećer pektina 160
 komponentni šećer laktoze 136
 konverzija 79, 81
 Leloirov put 56, 68, 69, 70, 81
 metabolizam laktoze 66–71
 Tagatozni put 67, 68, 70, 72, 81
 galakturonska kiselina, pektini 160, 161
 Galenos, grčki liječnik i filozof
 liječenje mikrobnog crijevnog disbalansa 4
 gastrointestinalna mikrobiota 311–313
 gel–struktura
 biokemijski procesi 13, 18, 108, 197, 201–202, 219
 fizikalno–kemijski procesi 13, 197–201, 262
 reološka svojstva 267, 270, 271, 272–273
 učinak homogenizacije 172, 176, 182 183, 184, 188, 190, 192, 282
 učinak kazein : proteini sirutke 198, 275, 276, 277–278, 284, 291
 učinak obogaćivanja suhe tvari bez masti 149, 154, 154 156, 157, 158, 275
 učinak toplinske obrade 134, 138, 188, 190, 192, 212, 273, 273
 učinak transglutaminaze 167, 168, 168
 ostali dodatci 163, 165, 290
 vrste mlijeka 274
Geotrichum candidum 11, 14, 87, 202, 351
 glicerofosfolipidi 20, 23, 129
 glicerol
 elektron akceptor 60
 metabilizam lipida/laktoze 64, 255
 glicin 16, 76, 77, 134, 220, 221, 241
 glikoliza 68, 70, 73, 81, vidi i metabolizam heksoza
 glikoproteini, membrana masne globule 20, 21, 129
 bioaktivni peptidi 23, 129
 globula mliječne masti 18, 124, 125, 125, 126, 129
 proteinski matriks 272, 274, 278, 280, 282
 glukoza
 komponentni šećer laktoze 136
 metabolizam laktoze 66–73

glukoza 6–fosfat dehidrogenaza, fosfoketolazni put 69
 β -glukuronidaza 319
 glutamin, TGaza 291
 GOS, vidi galaktooligosaharidi
 granulirana tekstura 158, 218, 275, 277, 351, 352
 gravimetrijska metoda po Röse-Gottliebu, mliječna mast 344
 gravimetrijska metoda, utvrđivanje suhe tvari 334
 grčka varijanta jogurta 149, 153, 158, 211, 234, 235
 grčki jogurt 14, 233, 234, 234
 guar guma, stabilizator 100, 238

H

Helicobacter pylori
 gastrointestinalni sustav 322
 učinak prebiotika i probiotika 319, 322
 HEPA, sustav za filtraciju zraka 118, 119
 heterofermentivna fermentacija 37, 37, 46, 46, 68
 bakterijske vrste 48, 48, 50, 59, 69, 72, 75
 HHD mikrobnog hranilište
 diferencijacija homofermentativnih i heterofermentativnih vrsta 343
 utvrđivanje broja bakterijskih vrsta 343
 hidrokoloide 156, 278, 289, 290
 hidroliza laktoze 63–73
 histidin 62, 64, 94, 214
 hlađenje
 prekidanje fermentacije 202, 222, 224, 225, 226, 228, 239, 251, 252, 253, 256, 273, 307
 sistem tunelnog hlađenja 146, 147, 205, 218
 završno hlađenje 122, 144, 204, 205, 225, 226, 224, 350
 hlapljive masne kiseline
 fermentirana mlijeka 60, 75, 202, 216, 222
 homofermentativna fermentacija 37, 37, 46, 46, 68, 70, 75, 100
 bakterijske vrste 48, 48, 51, 55–58, 61, 62, 213
 homogenizacija
 klasična 172–174
 hladna homogenizacija 228
 tlak 172–173
 učinak 174–179
 visokotlačna (HPH) 179–182
 učinak 182–186
 horizontalni transfer gena 29–30
 HTST pasterizacija 187
 humana mikrobiota
 disbalans crijevne mikrobiote 316–317
 razvitak 311–313, 315
 učinak probiotika, prebiotika i simbiotika 317–328

I

identifikacija bakterija 32
 IDF Bulletin 263, 1991, kontrola fag infekcije 117
 IDF Standard 132:1985, kontrola psihotropnih bakterija 333
 IDF Standard 99A:1987, opis svojstava fermentiranih mlijeka 335
 ILSI (*International Life Science Institute of Europe*) 22
 imunoglobulini 134, 136, 190
 imunosni odgovor
 probiotici/prebiotici 318–319, 321, 326, 327
 indol 299, 317, 324
 infracrvena spektrofotometrija, kemijska analiza fermentiranih mlijeka 344
 ingredijenti 114, 148, 149, 209, 245, 275, 348
 inhibitorne tvari u mlijeku 111–112
 inkubacija
 fermentacija
 kontinuirana fermentacija 195, 196
 polukontinuirana fermentacija 195, 196
 u fermentacijskim spremnicima 14, 195, 196, 204, 218, 219, 225, 243
 u prodajnoj ambalaži 14, 171, 195, 218, 219, 230, 252, 257, 307
 mikrobiološke analize 338–347
 inkubacijske komore 195, 224, 275
 inokulacija 107–108
 inokulacija mlijeka 105, 107, 252, 307, 348
 inokulum
 količina 105, 106, 109, 215, 217, 218, 292
 učinak na formiranje gel–strukture 200, 201, 273, 282, 282
 intestinalna mikrobiota 311–313
 inulin
 BMK 79
 prebiotik 156, 166
 tehnološko korištenje 159, 166, 170, 227, 242, 309, 310, 328
 zdravstveni učinci 320
 γ -interferon 320

J

JCM (*Japan Collection of Microorganisms*, Japan) 32
 jogurt
 fermentacija
 oblikovanje gel–strukture 142, 167–168, 197–201, 219
 tehnološko–tehnički uvjeti 194–196
 tvorba aromatskih spojeva 202–203, 220–221

- hlađenje 204–205, 222
 osnovne tehnološke operacije 143–148, 148
 priprema mlijeka
 deaeracija 172
 homogenizacija 172–187, 211–212
 visokotlačna 179–187
 obogaćivanje suhe tvari 149–158
 ostali dodatci 159–172
 standardizacija mliječne masti 158
 toplinska obrada 187–188
 fizikalno–kemijske promjene 189–194
 pakiranje 205–206
 tehnologija
 čvrsti jogurt 223–224
 jogurt s produženim vijekom 232
 jogurt u prahu 237–238
 koncentrirani jogurt 233–234
 kozji jogurt 241–242
 ovčji jogurt 238–239
 pitki jogurt 226–227
 tekući jogurt 225–226
 upjenjeni jogurt 238
 voćne varijante 228–232
 zamrznuti jogurt 236–237
 jogurtna kultura 95, 213–216
- K**
- kalcij
 kazein 130–131
 koloidni kalcijev fosfat 138, 141, 180, 194
 oblikovanje gel–strukture 140, 167, 198–199, 218, 270
 mineralni sastav mlijeka 137, 138, 193
 proteini sirutke 135, 136
 kapronska, kaprilna, kaprinska kiselina 98, 128
 okus jogurta 202, 241
 β–oksidacija masti 18
 kazein
 derivati kazeina
 fiziološka vrijednost 16–17, 17, 23
 koloidni kalcijev fosfat 140, 142
 kompleks kazein–proteini sirutke 189–194
 Na/Ca –kazeinat 149, 155, 155, 156,
 oblikovanje gel–strukture 197–201
 mjerjenja 267–272
 opis i svojstva 130–134, 132 133, 140, 142, 159, 193
 udio u mlijeku 123, 123, 130, 130, 241, 274
 proteinska mreža 272–273
 kazein : proteini sirutke, omjer 156, 157, 158, 169, 170, 189, 198, 200, 275, 276, 277–282, 284–286, 287, 231
 kazeinati Na/Ca 149, 155, 156
 kazeinfosopeptidi (CPP) 16–17, 23
 kefir
 kefirna zrna 246, 247, 248–243, 250
 kefiran 246, 248, 248
 klasična kultura 250–251
 komercijalna kultura 51, 80, 106
 opis 12, 12, 13, 14, 18, 245–246, 254
 alkoholna fermentacija 10
 tehnologija 11, 173, 195, 252–253, 253
 kontrola 337, 340, 351
 kemijski sastav fermentiranih mlijeka 227, 230, 234, 236, 238, 239, 242, 254, 254, 255,
 kemijski sastav mlijeka
 albumini seruma 136
 fosfolipidi i sfingolipidi 139–140
 imunoglobulini 136
 kazein 130–134
 laktoza 136–137
 minerali i vitamini 137–139, 138, 139
 mliječna mast 124–130
 proteini sirutke 134
 kemokin 315, 316
 P–ketolaza, hidroliza laktoze (PKP) 69
 kiselo mlijeko
 opis 4, 14, 18, 91–92
 tehnologija 195, 201, 243–244
 kiselost mlijeka 141, 150, 331
 Kjeldahl metoda, određivanje proteina 331
 klarifikacija 171–172
 klasična jogurtna kultura 213–216
 klasifikacija fermentiranih mlijeka 12–15
 klostridijalna grana G+ bakterija 42
Kluyveromyces spp. 12, 87, 246, 248, 251, 307
 kobalt 21, 130
 kolesterol
 metabolizam bakterija mliječne kiseline 302, 319, 320, 324
 mlijeko i fermentirana mlijeka 18, 20, 66, 126, 139
 koloidni kalcijev fosfat (KCP) 130, 131, 133, 140, 141, 167, 180, 198, 200, 201, 270, 274, 283
 koloidni sustavi 129, 130, 137, 138, 140, 140, 141
 kolon, mikrobiota 313, 314
 kolonizacija gastrointestinalnog sustava
 probiotički i prebiotički učinak 320, 322–323, 323, 324
 koncentrirana – zamrznuta – osušena kultura 104–105

- koncentrirana – zamrznuta kultura 103–104, 103
 - koncentrirana fermentirana mlijeka
 - jogurt 233–234, 235
 - opis 12, 13, 14, 334
 - tehnologija 149, 211, 235–336, 255–256
 - kontrola kvalitete
 - fizikalno kemijske analize 334–337, 267–272, 337–338
 - mikrobiološke analize
 - bakterija iz sastava kultura 340–347
 - aktivitet kulture 347–348
 - mikrobni uzročnici kvarenja 340
 - patogene bakterije 339
 - organoleptička ocjena 335–337
 - konzervansi 148, 164, 211, 228
 - konzistencija
 - fermentiranih mlijeka 12, 14
 - tehnološko–tehnički uvjeti 80, 144–146, 156, 157, 158, 162, 163, 178, 187, 190, 211, 216, 228
 - konjugirane linolne kiseline (CLA)
 - fiziološki učinak 20, 23
 - koncentracija u fermentiranom mlijeku 19, 240–241, 241
 - kozji jogurt
 - karakteristike 64, 77, 241
 - mikrostruktura jogurta uz dodatak kravljeg mlijeka 274–275, 274
 - tehnologija 142, 157, 1991, 192, 221, 241–242
 - kulture, vidi mikrobne kulture
 - kumis
 - opis 3, 4, 12, 12, 13, 14, 202, 254
 - alkoholna fermentacija 10
 - tehnologija 11, 51, 255
 - kvašćev ekstrakt dekstroza–kloramfenikol hraniliše 339, 339
- L**
- L. acidophilus*
 - opis morfoloških, fizioloških i tehnoloških
 - karakteristika 57–58, 58, 96, 108, 198, 202
 - probiotička fermentirana mlijeka 217, 288, 303
 - sastav kultura 95, 107–108, 305
 - L. casei* Shiota 299, 308
 - L. casei* skupina bakterija
 - opis genetskih, morfoloških i fizioloških
 - karakteristika
 - L. casei* 36, 58–60
 - ABC kultura 305
 - Actimel 305
 - funkcionalna kultura 98
 - L. casei* Shiota
 - Yakult 308
 - L. plantarum* 59
 - funkcionalna kultura 98
 - L. rhamnosus* 36, 59–60
 - probiotička fermentirana mlijeka 304
 - probiotički učinak 319, 320, 322–323, 324, 324
 - L. paracasei* subsp. *paracasei* 36, 59, 59
 - L. delbrueckii* skupina bakterija
 - L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
 - jogurtna kultura 94, 94, 95, 100, 103, 104, 213–216
 - kultura za probiotički jogurt 216–217
 - opis morfoloških, fizioloških i tehnoloških
 - karakteristika 55–56, 56 75, 77, 88
 - L. delbrueckii* subsp. *lactis* 56
 - L. helveticus* 48, 236, 238, 255
 - L. johnsonii* 48, 57, 58
 - L. lactis* subsp. *cremoris* 19, 34, 49, 62, 80, 89, 91, 92, 108, 109, 197, 243, 251, 255, 257
 - L. lactis* subsp. *lactis* 19, 49, 51, 62, 63, 73, 80, 89, 91, 92, 108, 109, 243, 245, 251, 257
 - nizin 83
 - L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* 62–63, 76, 77, 89, 91, 92, 100, 108, 109, 242, 243, 245, 251, 255
 - metabolizam citata 75–76, 201
 - L. paracasei* subsp. *paracasei* 36, 59, 59
 - L. rhamnosus* 36, 59–60
 - probiotička fermentirana mlijeka 304
 - probiotički učinak 319, 320, 322–323, 324, 324
 - L. gasseri* 48, 57, 58
 - L. kefiranofaciens*, kefirno zrno 247
 - L. kefir*, kefirno zrno 247
 - L. plantarum* 59, 98
 - L. reuteri* 60–61, 61
 - pitki jogurt 227
 - LAB agar 342
 - labneh 3, 12, 14, 233, 234, 234
 - Lactobacillus*
 - humani gastrointestinalni sustav 311
 - sastav kultura 87, 305, 305
 - taksonomsko klasificiranje 36, 42, 45, 46–48, 48
 - plazmidi 41
 - Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
 - jogurtna kultura 213–216
 - opis morfoloških, fizioloških i tehnoloških
 - karakteristika 55–57, 56, 68, 75, 80, 94, 100, 202, 217, 218, 236, 241, 244, 254, 288, 309

Lactococcus

taksonomsko klasificiranja 36, 42, 45, 49

Lactococcus lactis

opis morfoloških, fizioloških i tehnoloških

karakteristika

genetički inženjering 37, 37, 38, 38

kefir 246

kiselo mlijeko 243

L. lactis subsp. *cremoris* 62–63, **92**

L. lactis subsp. *lactis* 62–63, 63, **92**

L. lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 62–63,

92

metabolizam citata 75–76, 201

metabolizam proteina 64, 65

mlačenica 245

nizin, bakteriocin 83

plazmidi 40

sastav kultura 80, 91, 91, **109**

skandinavska fermentirana mlijeka 255, 257

laktacija

utjecaj na sastav mlijeka 124, 127, 133, 137, 139

laktat dehidrogenaza, hidroliza laktoze 68, 69

laktoperoksidaza 89, 111

laktorfin 111, 122, 134

bioaktivni peptidi 23

opioidna aktivnost 14

laktoza

metabolizam 66–73

ATP– ovisni laktoza permeazni sustav 66, 67–68

fosfoenolpiruvat (PEP)– ovisni fosfotransferazni sustav (PEP:PTS) 41, 66, 67–68,

laktoza permeaza 72

mliječna kiselina 9, 73–75

opis i svojstva 136–137, 137, **140**

učinak toplinske obrade 194

laktuloza 165, 194

långofil 14, 62

LC hranilište, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* LA–5 344

Lc. lactis 51, 91, **93**

Lc. mesenteroides subsp. *cremoris* 51, 51, 91, 92, **93**, 243, 251

Lc. mesenteroides subsp. *dextranicum* 51, 79, 91, **93**, **109**,

275

lecitin, fosfolipid 18, 245

Lee's hranilište **342**

Lee's hranilište, *Lactobacillus/Streptococcus* razlikovni agar **342**

Leloirov put razgradnje heksoza 70

leucin, metabolizam proteina 62, 64, 97, 214

Leuconostoc

opis morfoloških, fizioloških i tehnoloških

karakteristika

Lc. lactis 51

Lc. mesenteroides subsp. *cremoris* 51

Lc. mesenteroides subsp. *dextranicum* 51

metabolizam 68, 69, 71, 73, 79, **93**

stvaranje bakteriocina 83–84

tvorba diacetila 96–70, 70, 75–76, 201

mezofilna kultura 51, 77, 80, 88, 91 109, 304

kefir 246, 252

kiselo mlijeko 243

mlačenica 245

taksonomsko klasificiranje 42, 43, 44, 45, 50–54

Leuconostoc spp. 51, 69 70, 75

Linné, Carl, znanstvenik

imenovanje vrsta 31

liofilizirana kultura za direktnu inokulaciju (DVI/DVS)

101, 105, 106

lipaze

bakterijske 64, 333

mlijeka 130, 172

lipidi

globula mliječne masti 126–127, 127, **128**

membrana globule mliječne masti 129

fosfolipidi i sfingolipidi 139–140

lipolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline 64–66

Lister, Joseph, liječnik i znanstvenik

Bacterium lacis 5

Listeria spp. 42, 84, 96, 340

lizin, TGaza, 167, 291

LP–MRS agar, *L. casei* LC–01 344

L–S hranilište, *Lactobacillus/Streptococcus* razlikovni

agar 341

α–laktalbumin

bioaktivni peptidi 17

opis i svojstva **130**, 134–136, 135, 182

denaturacija 184, 189–194, 190

α–linolna kiselina (ALA) 14, 124, 129

β–laktoglobulin

bioaktivni peptidi 17

opis i svojstva **130**, 134, 135, 138, 142, 182, 185, 187, 189

denaturacija 189–194, 190

M

M17 hranilište, neselektivno za bakterije mliječne

kiseline *Lactococcus lactis*, podvrste i biovar 347, 347

modificirano M17 hranilište 340, 342, 344, 346

- magnezij
 - BMK 45
 - fermentirana mlijeka 21, 22, 242
 - mlijeko 130, 138
- Maillard reakcija 137, 308
- makroelementi, koncentracija
 - fermentirana mlijeka 16, 17
 - mlijeko 138
- maslačna fermentacija 18
- maslačna kiselina
 - fermentirana mlijeka 23, 73, 98, 126, 202, 301
 - probiotički i prebiotički učinak 317, 319, 326
- masne kiseline
 - dugolančane 214, 240
 - hlapljive masne kiseline
 - fermentirana mlijeka 60, 75, 202, 216, 222
 - kratkolančane
 - fermentirana mlijeka 18, 222, 240, 240, 301
 - gastrointestinalna mikrobiota 313, 317, 320, 324, 325, 328
 - mlijeko 126
 - nehlapljive masne kiseline, okus jogurta 222
 - polinezasićene 19, 20, 124, 126, 127, 129
 - fermentirana mlijeka 19, 19, 240, 241
 - kultura 214
 - omega 3, 6, 9 20, 124, 129
 - mlijeko 20, 124, 126, 127, 129,
 - slobodne masne kiseline, koncentracija
 - fermentirana mlijeka 18, 64, 66, 222, 240, 240, 241
 - mlijeko 111, 126
 - srednjelančane
 - fermentirana mlijeka 18, 240
 - zasićene 66, 126
- materijali za pakiranje 205–206
- matzoon/madzoon 6
- Mečnikov, Ilja Iljič, znanstvenik i nobelovac
 - ideja probiotičkog koncepta 299, 325
 - teorija dugovječnosti 7
- Međunarodno vijeće za sistematiku prokariotskih organizama (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*) 32
- mehaničko uglađivalo 145, 145
- membrana globule mliječne masti 20, 128, 129–130
- membranske tehnike 149, 150, 151, 152, 153, 156, 157, 210, 234, 241
- membranske tehnologije 150, 151, 152
 - reverzna osmoza 153
 - ultrafiltracija 153
- metabolički inženjering
 - biosinteze egzopolisaharida (EPS) 38, 38
 - de novo* potaknuta biosinteza B vitamina 38, 39
 - kontrola sistema nizin ekspresije gena (NICE) 38, 38
 - povećanje proteolitičke aktivnosti 37, 37
 - preusmjeravanje homofermentativnog u
 - heterofermentativni metabolizam 37, 37
 - promjena oksidoredukcijske ravnoteže 100
 - redukcija prirodne rezistentnosti na vankomicin 40
 - metabolizam heksoza
 - bifidociklus 72–73
 - heterofermentativni 7, 46, 48, 60, 68
 - homofermentativni 7, 46, 51, 55, 56, 78, 100, 343
 - Leloirov put 56, 68, 69, 70, 81
 - Tagatozni put 67, 68, 70, 72, 81
- metabolizam proteina bakterija mliječne kiseline 64, 65
- mezofilne bakterije mliječne kiseline 11, 49, 50, 51, 62, 66, 68, 75, 80
 - kontrola 347, 348
- mezofilne kulture 14, 18, 77, 80, 87, 89, 91–93, 106, 109, 118, 172, 196, 197, 201, 243, 245, 255, 256, 304
- miješalice 106, 144, 145, 224, 255
- mikrobiološke analize
 - fermentirana mlijeka
 - bakterije iz sastava kultura 340–347
 - aktivitet kulture 347–348
 - mikrobni uzročnici kvarenja 340
 - patogene bakterije 339
 - mlijeko 331–333
- mikrobiota
 - humana 300, 311–316
 - kefirnog zrna 246–249
 - kumisa 255
- mikrobiota humanog gastrointestinalnog sustava 311–315, 315
- mikrobne kulture
 - aseptička priprema kulture 104, 105
 - automatski inokulacijski sustav (AISY) 106–107
 - inokulacija 107–108, 107
 - bakteriofag infekcija 114–116
 - rotacija kultura 118
 - definicija 87
 - definirane 88–90
 - funkcionalna kultura 98
 - tradicionalne 87–88
 - mezofilna kultura 80, 87–88, 89, 91, 91, 202
 - fermentirana mlijeka 243, 244, 251, 255

- oblik
 - koncentrirana – zamrznuta – osušena kultura
 - 104–105
 - tehnička kultura 102, 103, 105
 - koncentrirana – zamrznuta kultura 103–104
 - liofilizirana kultura za direktnu inokulaciju (DVI/DVS) 104–105
 - tekuća kultura 101–102
 - zamrznuta osušena nekoncentrirana kultura 102
- probiotička kultura 96, **96**, 97, **305**
 - probiotička fermentirana mlijeka 306, 307, 308
- termofilna kultura 94–95 **95**
 - jogurtna kultura 95, 213–216
 - jogurt 223
 - kultura za probiotički jogurt 216–217
 - probiotički jogurt 303
- uloga 108–109, **109**, 110
- mikrobni uzročnici kvarenja 339–340
- mikroelementi, koncentracija
 - fermentirana mlijeka 16, 17
 - mlijeko **138**
- mikroproteini sirutke (MPS)
 - dodatci 149, 156, 157, 211
 - mikrostruktura 278–281
- mikrostruktura jogurta 272–298
 - učinak proteina i omjera kazein : proteini sirutke 277–282
 - učinak temperature toplinske obrade 273–274
 - učinak udjela mliječne masti i homogenizacije 293–294
 - učinak vrsta i količina aditiva 275–277
 - učinak vrsta i količina stabilizatora 289–293
 - učinak vrste i svojstva kultura 282–288
 - učinak vrste mlijeka 274–275
- minerali, vidi mikroelementi i makroelementi
- mlačenica
 - opis i tehnologija 244–245
- mliječna fermentacija 9–10, 13–14, 48, 66–75, 198– 200
- mliječna kiselina
 - fermentacija 66–75
 - koncentracija
 - fermentirana mlijeka 219, 239, 241, 244, 252, 307
 - kultura 91, **92**, **93**, **94**, 95, 96, **96**, **97**
 - konfiguracija
 - D (–) izomer 10, 55, 56, 244
 - D L izomer 51, 57, 215
 - NAD⁺ ovisna laktat dehidrogenaza (nLDH) 10, 66, 70, 73
 - piruvat–format liaza 73
 - recemaza 59, 73
 - L (+) izomer 10, 61, 62, **97**, 244
 - opis 73–75
- mliječna mast
 - nutritivna i funkcionalna vrijednost 18–20, 317
 - opis i karakteristike 124–130
 - standardizacija udjela mliječne masti u mlijeku 49
 - učinak homogenizacije 178, 189
 - učinak toplinske obrade 189
- mliječna plazma 140
- mliječni serum 140
- mlijeko
 - fizikalna svojstva
 - kiselost 141
 - puferni kapacitet 141–142
 - izbor mlijeka za proizvodnju fermentiranih mlijeka 142–143
 - kemijski sastav 123, **123**
 - laktoza 136–137
 - mliječna mast 124–130
 - fosfolipidi i sfingolipidi 139–140
 - kolesterol 139
 - proteini 130
 - albumini seruma 136
 - imunoglobulini 136
 - kazein 130–134
 - proteini sirutke 134–136
 - vitamini i minerali 137–139, 138, 139
 - voda 124
- modificirani mliječni agar s TTC, *Lactobacillus/ Streptococcus* razlikovni agar 342
- molekularne metode
 - AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphisms*) 33, 34
 - DNA (rDNA) probe za klasifikaciju, identifikaciju i filogenetske odnose 29, 30, 33, 34, 52
 - DNA–DNA hibridizacija 32
 - PCR metoda (*Polymerase chain reaction*) 7, 32
 - PCR–DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) 33, 34
 - PCR–TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) 33, 34
 - qPCR (*Quantitative Real Time PCR*) 33, 34
 - RAPD–PCR analize (*Random Amplified of Polymorphic DNA*) 33, 34
 - RFLP PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)) 33, 34
 - ribotipizacija 34

- molibden 21, 130, 138
 monoacilgliceroli 126, 238
 monokultura 87
 mravlja kiselina 73, 98, 202, 213, 222
 MRS hranilište, neselektivno za bakterije mliječne
 kiseline
 modificirana MRS hranilišta 341, 341, 342, 343, 344, 344, 345, 343, 346
 MRS-NPNL agar, bifidobakterie u kombinaciji s drugim bakterijama 343
 M-RTLV hranilište, probiotički sojevi laktobacila 346
Mycobacterium tuberculosis, acidofilno-kvaščevo
 mlijeko 307
- N**
- NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) + ovisna laktat-dehidrogenaza (nLDH) 10, 66, 70, 73
 NCIMB (*National Collection of Industrial and Marine Bacteria*, Velika Britanija) 302
 newtonovi fluidi 265
 neproteinski dušik 65, 123
 Newtonovi fluidi 264, 264
 nezasićene masne kiseline, omega-3, 6, 9 masne kiseline
 fiziološki učinak 20, 23
 koncentracija u fermentiranom mlijeku 19, 240–241
 membrana globule mliječne masti 129
 niacin
 jogurt 22, 110
 mlijeko 139
 NICE, kontrola sistema nizin ekspresije gena 38, 38
 nitroreduktaze 319
 nizin, bakteriocin 89, 164
 nomenklatura bakterija 31–32
 nutraceutici 15, 23
 nutritivna vrijednost 88, 98, 126, 130, 157, 165, 240, 241, 244, 252, 328
 definicija 15
- O**
- obogaćivanje suhe tvari bez masti (Sbm) 149–158
 obrano mlijeko u prahu
 bakteriofag infekcija 113
 dodatci 149, 153–154, 154
 tehnoško korištenje 16, 82, 101, 142, 184, 211, 234, 242, 250, 252
 octena kiselina
 heterofermentativna razgradnja laktoze 46, 48, 51, 52, 66, 69, 75
 hlapljive masne kiseline 202, 220, 222, 252, 255
 zaštitna funkcija 18, 23, 75, 98, 301, 317, 319
Oenococcus, taksonomija 42, 45
 oksidacija 8, 18, 66, 70, 108
 oksidoredukcijski potencijal 90, 343
 oligofruktoza 302
 oligopeptidni transportni sustav 37, 40, 64
 oligosaharidi 23, 165
 omega-3, 6, 9 masne kiseline, vidi i konjugirane linolne kiseline
 mlijeko 20, 124, 126, 127, 129,
 fermentirana mlijeka 19, 19, 240, 241
 kultura 214
 Opus lactarum, kiselo mlijeko 4
 organoleptička ocjena 335–337
 organske kiseline 70, 73, 82, 97, 98, 188, 252, 319
 Orla-Jansen, Sigurd, znanstvenik
 klasifikacija BMK 6
 ostali dodatci 159–170
 ovčje mlijeko
 sastav i osobine 16, 123, 124, 127, 128, 137, 138, 139, 142, 191, 194
 ovčji jogurt 18, 64, 238–241
 oxygala, kiselo mlijeko 4
- P**
- pakiranje 23, 145, 146, 165, 205, –206
 palmitinska kiselina 18, 126
 pantotenska kiselina(B5) 22, 56, 110
 pasterezacija
 HTSH sustav 186
 Pasteur, Luis, kemičar i mikrobiolog
 opis fermentacije 5
 patogene bakterije
 inhibicija rasta djelovanjem BMK i bifidobakterija 58, 83, 84, 98, 201, 302, 319, 321, 322
 pojavnost 12, 340
 PCR (*Polymerase chain reaction*) metoda lančane reakcije polimerazom 7, 32
Pediococcus 51–52
 pektin
 karakteristike 161
 mikrostruktura jogurta 161, 162, 228, 230, 231, 290, 291
 stabilizatori 160, 164
 penetrometar 268, 337
Penicillium spp. 98
 PEP : PTS sustav, metabolizam laktoze 66, 67
 permeabilnost 168, 198, 200, 212, 294

- pH
 fermentacija 194–195, 197–198, 201, 202,
 finalni proizvodi 225, 228, 236, 244, 252, 255, 256, 257
 hlađenje 204–205, 222, 223, 253
- piridoksin 22, 139
- piruvat 10, 37, 46, 47, 68, 69, 70, 73, 75, 76, 100, 222
- piruvat kinaza 68
- pitki jogurt
 kultura 81, 94, 202, 213–216
 opis 14, 226–227, 228
 tehnologija 162–163, 219, 220, 227–228, 229
- plijesni
 uzročnici kvarenja 336, 339, 339, 340, 349
- Plinije Stariji, rimski pisac i znanstvenik
 liječenje crijevnih infekcija 4
- plinska kromatografija (GC), aromatski spojevi 337
- pločasti izmjenjivači topline (pasterizator) 187
- pogreške fermentiranih mlijeka
 izgleda 348–349, 349
 okusa/arome 10, 63, 75, 77, 89, 100, 143, 157, 163, 171,
 172, 201, 202, 217, 218, 222, 242, 243, 251, 255
 tekture 75, 89, 137, 188, 200, 217, 218, 231, 232, 251, 276,
 277, 333, 336, 351–352
- polietilen tetraftalat (PET) 205
- polinezasićene masne kiseline, vidi masne kiseline
- polipropilen 205
- ponderirani bodovi, organoleptička ocjena 335, 336
- postacidifikacija 217, 218, 241, 349
- prava otopina 140, 141
- prebiotik
 definicija 302
 prebiotički koncept 301, 302, 303, 317–319, 324, 326
 tehnološko korištenje 303, 309, 310
 vrste 165–167
- predtretiranje mlijeka 148–149, 172, 187
- prirodni/klasičan jogurt 209, 217, 218
- probiotička fermentirana mlijeka
 definicija 301
 nazivlje 217
 hranilišta za dokazivanje probiotičkih sojeva u
 proizvodu 342–346
 kultura 216–217
 selekcijski kriteriji 301–302
 probiotički jogurt 209, 239, 242
 ostala fermentirana mlijeka 257, 304, 305, 304,
 306, 307, 308
 probiotički koncept 301, 302
 tehnologija 156, 165, 166, 167, 171, 194, 219, 227, 228, 283,
 288, 289, 293, 303, 308–309
- probiotička fermentirana mlijeka 303, 304, 304, 306, 307,
 308
- probiotička kultura 96, **96**, 97, 305, 216–217
- probiotički sojevi
 učinak na zdravlje 327
- procesne linije
 čvrsti jogurt 225
 pitki jogurt 229
 tekući jogurt 227
- prolin 16, 131
- Propionbacterium* spp. 9
- propionska fermentacija 8
- proteini sirutke
 denaturacija toplinom 84, 189–194
 imunoglobulini 136
 koncentracije proteina sirutke 156–157
 α -laktalbumin 134–136
 β -laktoglobulin 134
 proteoze peptoni 134
 serum albumini 136
- proteini, vidi proteini mlijeka
- proteinski kompleks, formiranje 189–194
- proteoliza, bakterije mliječne kiseline 16, 55, 64, 74, 88,
 89, 143, 175, 176, 178, 202, 203, 217, 333, 351
- proteoze peptoni 134
- PrpP – proteinaza 64
- psihrotrofne bakterije 143, 331, 333, 351
- puferni kapacitet 74, 110, 141–142, 150, 189, 211, 213, 214,
 309
- R**
- dTDP–ramnoza, biosinteza EPS 38, 81
- RAPD (*Random Amplified of Polymorphic DNA*) 33, 34,
 35
- rast BMK i bifidobakterija iz sastava kultura
 čimbenici usporenog rasta 80, 111, 116, 218
 kultura, 87, 90, **92**, **93**, **94**, **96**, 107, 216–217
 mlijeko kao medij 64, 73, 96, 111, 172, 187
 sinergistički rast 76, 88, 89, 213–215
 tehnološka poboljšanja rasta 108, 150, 165, 1666, 194,
 195, 283, 288, 303, 308–311
- RCPB selektivno hranilište *S. thermophilus* /L.
delbrueckii subsp. *bulgaricus* **342**

- Registar dopuštenih nutritivnih zdravstvenih tvrdnji
(*Register of nutrition and health claims made on foods*) 328
- renin 140, 210
- reologija
- mjerenja 267–272, 268, 271–272, 337–338
 - amplitude malih oscilacija (SOAR) 268, 269, 286
 - amplitude velikih oscilacija 271, 270–272
 - penetrometar 268, 337
 - reometar 268, 271, 337
 - viskozimetar 237, 268
 - opći principi reologije hrane 263–263
 - nenevtonovi fluidi 265
 - čvrstoća 267
 - elastičnost 267
 - kohezivnost 267
 - modul gubitka G'' ili viskoznosti 266, 268, 270
 - modul gubitka tangente ($tg\delta$) 269, 270
 - modul pohrane G' ili elastičnosti 265, 268, 270
 - viskoelastičnost 267
 - viskoznost 263, 236, 267
 - Newtonovi fluidi 264, 264
 - reološka svojstva jogurta
 - mikrostruktura jogurta 272–298
 - opis 267, 267
 - permeabilnost 297
 - sinereza 294–295
 - reometar 268, 271, 337
 - reuterin, bakteriocin 40, 60, 98
 - reverzna osmoza 150, 153, 156, 230
 - riboflavin (vit B2) 22, 38, 110, **139**, 206
 - ribosomi 32
 - RNA (ribonukleinska kiselina), građa 30
 - Röse Gotlieb metoda, utvrđivanje mliječne masti 334
 - rotacijska pumpa 145
 - rotacioni viskozimetar/reometar 269, 271, 272, 337
 - rRNA (rDNA) klasifikacija, identifikacija, filogeneza 29, 30, 33, 34, 52
- S**
- °SH, titracijska kiselost 73, 110
 - Saccharomyces* spp. 87, 96, 246, **247**, 248, 251, 255, 305, 307, 339, 351
 - Salmonella* spp., inhibicija 319, 340
 - selekcija bakterijskih sojeva 37, 88, 89, 90, 116
 - selekcija probiotičkih bakterijskih sojeva 37, 301–302, 325
 - selektivno hranilište prema Kempleru i McKayu, razlikovanje citrat–pozitivnih i citrat negativnih sojeva laktokoka 342
 - serin 16, 131
 - sezonske varijacije mlijeka 111, 123–124, 138
 - sfgolipidi 20, 23, 129, 130, 139, 140
 - Shirota, Minoru, japanski liječnik i znanstvenik održavanje mikrobne ravnoteže 299, 308
 - simbiotička fermentirana mlijeka 300, 302, 303, 310, 310, 317, 324, 325
 - sinereza
 - opis 200, 294, 294–295
 - poticanje 81, 156, 157, 161, 166, 174, 186, 199, 204, 212, 222, 224, 232, 244
 - učinak na mikrostrukturu, vidi mikrostruktura jogurta
 - spriječavanje 80, 81, 155, 156, 157, 158, 162–163, 168, 168, 172–173, 178, 185, 186, 188, 216, 218, 230, 239, 242
 - skyr
 - opis i tehnologija 14, 233, 235–236
 - sladila 12, 100, 159, 164–165, 236, 305
 - slobodne aminokiseline
 - fermentirana mlijeka 16, 94, **97**, 202
 - mlijeko 64, 111, 187, 213, 241
 - slobodne masne kiseline, koncentracija
 - fermentirana mlijeka 18, 64, 66, 202, 222, 240, 240, 241, 301
 - mlijeko 111, **126**
 - sluzava tekstura 14, 62, 80, 217, 257
 - SOAR (*Small Amplitude Oscillatory Reology*) amplitude malih oscilacija 268, 269, 286
 - somatske stanice 311, 332
 - sorbitol 16, 23, 98, 164
 - Spearmanova rang–korelacija, organoleptička analiza 337
 - specifična gustoća, mlijeko 149
 - spособnost preživljavanja probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku 54–55, 59, 165, 166, 170, 239, 242, 283, 288, 289, 303, 307, 309
 - ST, vidi suha tvar
 - stabilizatori
 - opis i tehnološka funkcija 124, 148, 153, 159, 160, 163–164, 164, 171, 172, 173, 186, 273, 289
 - pitki jogurt 227, 228
 - varijante jogurta 232, 234, 236, 238
 - voćni jogurt 230, 231
 - standardizacija mliječne masti 149
 - standardni (klasični) jogurt 209, 217, 218
 - Staphylococcus* 42, 340

- stearinska kiselina 18, 66, 126, **128**
- stimulacija imunostnog sustava 165, 302, 317, 318, 319, 320, 321, 324, 326, 327
- Streptococcus thermophilus*
jogurtna kultura 213–216
opis morfoloških, fizioloških i teholoških
karakteristika 41, 50, 61, 61–62, 73, 76, 209, 303, 304, 309
bakteriofagi 115, 115
- suha tvar (ST) 123, 149, 186, 211, 234, **275**
- suha tvar bez masti (Sbm)
obogaćivanje 149–150
kazein 155–156, 211, 275, 277
tekstura 156, 275, 275
membranske tehnologije 150–153
tekstura 155, 230, 234, 241
obrano mlijeko u prahu 153–155
tekstura 155, 155, 184, 242, 252
proteini mlijeka 155, 211
tekstura 290
proteini sirutke 156–158, 211
omjer kazein:proteini sirutke 163, 169, 198, 277, 278
tekstura 158, 162, 242, 275, 275, 276, 280–281
zamjena za mliječnu mast 158, 277, 278, 279
- superoksid dizmutaze 45
- Š**
- škrob, stabilizator 100, 124, 160, 163–164, 173, 211, 229, 348
- švicarska varijanta voćnog jogurta
opis i tehnologija 229–230, 230
- T**
- D–tagatoza 1, 6 P–aldolaza, Tagatozni put 70
- D–tagatoza–6–fosfat kinaza, Tagatozni put 70
- taksonomija
bifidobakterije 44
BMK 42
molekularne metode
AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) 33, 34
DNA – DNA hibridizacija 32
PCR metoda (*Polymerase Chain Reaction*) 7, 32
PCR–DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) 33, 34
PCR–TTGE (*Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) 33, 34
qPCR (*Quantitative Real Time PCR*) 33, 34
- RAPD–PCR analize (*Random Amplified of Polymorphic DNA*) 33, 34
- RFLP PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) 33, 34
- ribofizacija 34
- rRNA (rDNA) klasifikacija, identifikacija, filogeneza 29, 30, 33, 34, 52
- osnove 29–33
identifikacija 32
klasifikacija 29
nomenklatura 31
rRNA(rDNA) 29, 30, 34
- tarhó 3, 4, **6**
- tätte/ tettemjolk 3, 6, 14, 62
- tehnologija
fermentacija 194– 203
hladenje 204– 205
osnovni tehnološki principi 143–146
osnovni tehnološki procesi 147–148, 148
pakiranje 205–206
predtreiranje mlijeka
homogenizacija 172–187
obogaćivanje suhe tvari bez masti 149–158
standardizacija mliječne masti 158–159
toplinska obrada 187–194
- tehnološki procesi
osnovni 147–148, 148
- tekuća kultura 101
- tekući jogurt
jogurtna kultura 81, 94, 100, 213–216, 220
opis 14, 225, 226
tehnologija 186, 225–226, 227, 278, 338, 156, 158, 161, 162–163, 163, 169, 170, 186, 195, 205, 219, 219, 221, 222, 225–226
- temperatura za dodatak voća u jogurtnu osnovu 223, 226, 231
- temperature fermentacije
- tehnološko – tehnički uvjeti 164, 169, 172, 194–196, 202, 215, 216, 218–221, 222, 224, 226, 228, 236, 237, 243, 245, 252, 282, 283
- terapeutska svojstva 252, 225, 307, 308, 316–324
- termofilna kultura 94–95, **95**
- termofilne bakterije mliječne kiseline 11, 13, 14, 18, 46, 66, 68, 80, 209
- Tetragenococcus*, taksonomija 42, 49
- Tissier, Henry, znanstvenik
pretpostavljeno probiotičko djelovanje 299, 301
- titracijska kiselost (°SH) 73, 110

toplinska obrada mlijeka
 fizikalno kemijske promjene 187–189
 laktoze 194
 mineralnih soli 194
 mliječne masti 189
 proteina 189–194
 učinak na fizikalna svojstva gel–strukture 190, 200–201, 262, 273, 273–274

tradicionalne mješovite kulture
 karakteristike 87–88

tradicionalne prirodne kulture
 karakteristike 87

transglutaminaza (TGaza)
 mikrostruktura jogurta 168–169, 168, 169, 170, 262, 292, 292
 oblikovanje gel strukture 167–168, 168, 169, 170, 242, 292
 opis i način djelovanja 167, 167
 priprema 169, 169, 170, 291
 zamjena za mliječnu mast 170, 291

treonin 16, 76, 77, 221, 222, 241

triacilgliceroli 18, 20, 126, 126, 127, 127, 129, 129, 203, 222, 324

triptofan 18

TYP–HGME agar, *Lactobacillus/Streptococcus* razlikovni agar 342

U

ugljični dioksid
 acidofilno–kvaščevo mlijeko 307
 bakterijske potrebe 94, 142, 187, 213
 citrat metabolizam 62, 75–76, 91, 201
 heterofermentativna razgradnja laktoze 46, 48, 50, 66, 69
 kefir 202, 251, 252
 kiselo mlijeko 243
 kumis 202, 254
 ymer 256

ugljikohidrati metabolizam, humana mikrobiota 317, 318

UHT toplinska obrada 188

ulcerozni kolitis 20, 317, 318

ultrafiltracija (UF) 142, 150, 153, 155, 156, 230, 234, 236, 241, 256

umjetna sladila 159, 164

urea 142, 200, 213

ureaza 142, 213, 286
užegnuti okus 172, 333, 351

V

Vagococcus, taksonomija 42, 49

vankomicin
 rezistentnost 40, 50, 344, 346

viili
 opis i tehnologija 11, 14, 62, 80, 202, 256–257

viskozimetar 237, 268

viskozitet
 hlađenje 226, 228, 273
 reologija 236, 266, 267, 268, 270
 tehnološki postupci 80, 82, 126, 145, 146, 176, 185, 186, 216, 226, 228, 241

visokotlačna homogenizacija (HPH) 179–182
 učinak 182–186

vitamini
 koncentracija u fermentiranom mlijeku 22
 koncentracija u mlijeku 21, 138–139, 139

voće/voćna pulpa
 dodatci 171, 171
 miješanje s jogurtnom osnovom 228–232

voćni jogurt
 opis i tehnologija 228–232

vodikov peroksid 55, 56, 82, 98, 309

volumetrijska metoda po Gerberu 334

vrste kultura
 selekcionirane ili definirane 88–89
 funkcionalne 98
 mezofilne 91–93
 probiotičke 96
 termofilne 94–95
 viskozne 80, 81, 82
 tradicionalne 87–88

VSL#3 probiotik 306

Z

zabady/zabade 6

zamrznuta osušena nekoncentrirana kultura 102

zamrznuti jogurt
 opis i tehnologija 236–237

zdravstvene tvrdnje 302, 328

Ž

željezo 21, 130, 138, 300

W

Weissella, taksonomija 42, 45

WHO (*World Health Organization*) Svjetska zdravstvena organizacija 83, 301, 328

Y

yakult

opis i tehnologija 14, 295, 305, 308

YGLP-YLA agar *Lactobacillus* / *Streptococcus* razlikovni agar **342**

YLA ili jogurt mliječni agar, *Lactobacillus* / *Streptococcus* razlikovni agar **342**

ymer

opis i tehnologija 3, 12, 14, 173, 233, 255–256



Popis tablica

- 1. Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani**
- Tablica 1.1. 6 Imena najpoznatijih tradicionalnih fermentiranih mlijeka i njihovo podrijetlo (prilagođeno prema Kurmanu i sur., 1992., i Tamimu i Robinsonu, 1999.)
- Tablica 1.2. 12 Fermentirana mlijeka definirana mikrobnom kulturom (CODEX STAN 243–2003., revidiran 2008., 2010.)
- Tablica 1.3. 13 Kvalitativna i kvantitativna svojstva fermentiranih mlijeka (CODEX STAN 243–2003., revidiran 2008., 2010.)
- Tablica 1.4. 22 Hranjiva vrijednost jogurta (150 g) i količine (%) od preporučenih dnevnih potreba (prilagođeno prema McKinleyu, 2005.)
- 2. Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija**
- Tablica 2.1. 29 Taksonomsko rangiranje bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- Tablica 2.2. 43 Filogenetsko taksonomsko rangiranje bakterija mliječne kiseline do razine roda
- Tablica 2.3. 45 Filogenetsko taksonomsko rangiranje bifidobakterija do razine roda
- Tablica 2.4. 48 Genetičke i fiziološke karakteristike nekih od bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus* značajnih za fermentaciju laktoze mlijeka (prilagođeno prema Barinovu i sur., 2011.)
- Tablica 2.5. 55 Razlikovanje pet vrsta bifidobakterija na temelju fermentacije šećera (prilagođeno prema Bonaparteu i Reuteru, 1996.)
- 3. Mikrobne kulture**
- Tablica 3.1. 92 Tehnološke karakteristike *L. lactis* podvrsta i biovara (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)
- Tablica 3.2. 93 Tehnološke karakteristike *Leuconostoc* vrsta i podvrsta (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)
- Tablica 3.3. 94 Tehnološke karakteristike bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)
- Tablica 3.4. 95 Moguće kombinacije bakterijskih vrsta u termofilnoj kulturi

- Tablica 3.5. 96 Tehnološke karakteristike bakterija *L. acidophilus* i *L. casei* subsp. *casei* (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)
- Tablica 3.6. 97 Tehnološke karakteristike bakterija *Bifidobacterium* spp. (prilagođeno prema Dellagliju i sur., 1992.)
- Tablica 3.7. 109 Mogući bakterijski sojevi vrsta bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija u sastavu komercijalnih kultura (prilagođeno prema Klaenhammeru i sur., 2005, Kellyju i sur., 2010.)
- Tablica 3.8. 110 Odnos između titracijske kiselosti (SH) i pH-vrijednosti tijekom fermentacije mlijeka (preuzeto od Vujičića, 1985.)

4. Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka

- Tablica 4.1. 123 Prosječan kemijski sastav kravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka (prema Posatiu i Orru, 1976., Anifantakis i sur., 1980., Jennessu, 1980., Heanlainu i Cacceseu, 1984.)
- Tablica 4.2. 126 Sastav mliječne masti/lipida u kravljem mlijeku (prilagođeno prema Chandanu, 2006., i Walstri i sur., 1999.)
- Tablica 4.3. 128 Udjel najzastupljenijih masnih kiselina u mliječnoj masti mlijeka (prema Chandanu, 2006.; Parku i sur., 2007.; Lopez, 2011.; Barlowska i sur., 2011.)
- Tablica 4.4. 130 Udjeli pojedinačnih proteina u kravljem mlijeku (preuzeto od Spreera, 1998., i Chandana, 2006.)
- Tablica 4.5. 138 Koncentracija makroelemenata u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (mg 100g⁻¹) (prema: Jennessu, 1980., Parku i Chukwu, 1988., 1989., Coniju i sur., 1999., Deutchen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2012.)
- Tablica 4.6. 138 Koncentracija mikroelemenata u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (prema: Jennessu, 1980., Parku i Chukwu, 1988., 1989., Coniju i sur., 1999., Deutchen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2012.)
- Tablica 4.7. 139 Koncentracija vitamina topljivih u mastima i vodi u kravljem, kozjem i ovčjem mlijeku (u 100 g) (prilagođeno prema Raynal-Ljutovcu i sur., 2008.)
- Tablica 4.8. 140 Fizikalni status, vrsta i veličina čestica raspoređenih u mlijeku (prilagođeno prema Chandenu, 2006.)
- Tablica 4.9. 154 Utjecaj dodatka obranog mlijeka u prahu na povećanje udjela suhe tvari bez masti i proteina u mlijeku (prilagođeno prema Rašiću i Kurmanu, 1978.)
- Tablica 4.10. 164 Preporučene količine stabilizatora koji se najčešće koriste u proizvodnji jogurta (prilagođeno prema Özeru, 2010.)
- Tablica 4.11. 171 Najčešće korištene vrste voća i voćne kombinacije u proizvodnji jogurta

5. Jogurt i druga fermentirana mlijeka

- Tablica 5.1. 218 Utjecaj količine inokuluma na omjer vrsta *S. thermophilus* (ST) i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LB) u jogurtu (preuzeto od Rašić i Kurmana, 1997., i Chandana i O' Rella, 2006.)
- Tablica 5.2. 221 Aromatske komponente jogurta (Routray i Mishra, 2011., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

- Tablica 5.3. 230 Standardni sastav švicarske varijante voćnog jogurta s različitim udjelom mliječne masti (prilagođeno prema Chandanu i O'Rellu , 2006.)
- Tablica 5.4. 239 Kvalitativne karakteristike ovčjeg jogurta proizvedenog toplinskom obradom mlijeka na temperaturi od 65 °C/5 min i temperaturi od 95 °C/5 min nakon 21 dana pohrane na temperaturi od 4 °C
- Tablica 5.5. 247 Dominantna mikrobna populacija izolirana iz kefirnog zrna (Ratray i O'Connell, 2011., s dopuštenjem izdavača Esvier Books)
- Tablica 5.6. 254 Kemijski sastav kefira proizvedenog od kravljeg mlijeka (g 100 g⁻¹) tijekom tri dana hladnog zrenja (preuzeto od Robinsona i sur., 2002.)

6. Fizikalna i reološka svojstva jogurta

- Tablica 6.1. 275 Sastav mlijeka i dodanih ingredijenata za obogaćivanje bezmasne suhe tvari mlijeka (g kg⁻¹) (Remeuf i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera)

7. Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka

- Tablica 7.1. 304 Trgovačka imena za neke od vrsta biojogurta na svjetskom tržištu (prilagođeno prema Gomesu i Malcatiju, 1999., i Lourens-Hattinghsu i Viljoenu, 2001.)
- Tablica 7.2. 305 Najčešće korišteni sojevi *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. u sastavu komercijalnih probiotičkih kultura (prilagođeno prema Shahu, 2007.)
- Tablica 7.3. 306 Probiotički bakterijski sojevi i trgovačka imena nekih od najpopularnijih probiotičkih fermentiranih mlijeka na svjetskom tržištu (World Gastro, 2008.)

8. Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka

- Tablica 8.1. 335 Faktori značaja i ponderirani bodovi za ocjenjivana svojstva fermentiranih mlijeka
- Tablica 8.2. 336 Ocjenjivački list za fermentirana mlijeka bez dodataka (uzorak: čvrsti jogurt)
- Tablica 8.3. 336 Ocjenjivački list za fermentirana mlijeka s dodacima (uzorak: voćni jogurt s dodatkom jagode)
- Tablica 8.4. 337 Primjer načina provođenja Spearmanove rang-korelacije (r_s)
- Tablica 8.5. 342 Komercijalna selektivna hranilišta za brojanje *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subspp. *bulgaricus* u mikrobnoj kulturi i jogurtu



Popis slika

- 1. Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani**
- Slika 1.1. 3 Proizvodnja mlijeka, reljef Sumerana, Tell al-'Ubaid, 2900 – 2460 g. pr. Kr. (Kurman, 1984., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 1.2. 4 Amfora za kumis, Certomlyk, 4. stoljeće pr. Kr. (Kurman, 1984. s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 1.3. 4 Plinije Stariji (Gaius Plinius Secundus Maior, 23. - 79. g.), imaginarni portret iz 19. stoljeća i naslovnica knjige *Naturalis Historia* izdana 1669. godine)
- Slika 1.4. 5 Galenos (lat. Claudius Galenus, 129. - 216. g.), grčki liječnik i filozof; litografija, Pierre Roche Vigneron (Pariz: Lith de Gregoire et Deneux ca. 1865. godine)
- Slika 1.5. 5 Jogurt u glinenoj posudi.
- Slika 1.6. 6 Louis Pasteur (1822. - 1895.) i Joseph Lister (1827. - 1912.)
- Slika 1.7. 7 Ilya Iljič Mečnikov (1845. - 1916.).
- Slika 1.8. 9 Mikrobne vrste i stvoreni metaboliti fermentacijom laktoze.
- Slika 1.9. 9 Shematski prikaz nastajanja mliječne kiseline iz glukoze djelovanjem bakterija koje imaju sposobnost fermentacije šećera.
- Slika 1.10. 10 Shematski prikaz nastajanja mliječne kiseline iz pirogroždane kiseline djelovanjem bakterijskog enzima NAD + ovisne laktat-dehidrogenaze (nLDH).
- Slika 1.11. 11 Shematski prikaz hidrolize glukoze u etanol i CO₂ djelovanjem saharolitičkih kvasaca.
- Slika 1.12. 17 Fiziološke funkcije bioaktivnih peptida u humanom organizmu deriviranih iz kazeina. (Silva i Malcata, 2005., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 1.13. 18 Shematski prikaz konfiguracije konjugirane linolne kiseline (CLA) ili omega (ω) -3, 6 masne kiseline. (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=omega-3+masne+kiseline.>)
- Slika 1.14. 19 Koncentracija konjugirane linolne kiseline (CLA) u µg mL⁻¹ u fermentiranom mlijeku nakon dodatka linolne kiseline mlijeku u koncentraciji od 1000 i 5000 µg mL⁻¹ ovisno o korištenoj vrsti bakterija mliječne kiseline (Sieber i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 1.15. 20 Pretpostavljeni fiziološki učinak fermentiranih mlijeka na humani organizam.
- Slika 1.16. 21 Koncentracije kobalamina (B₁₂) u µg 100g⁻¹ jogurta u odnosu na bakterijske vrste *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Blanc, 1984., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 1.17. 21 Koncentracije folne kiseline (B₉) u µg 100g⁻¹ jogurta nastale metaboličkom aktivnošću bakterijskih vrsta *S. thermophilus*, *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Blanc, 1984., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 1.18. 23 Proizvodnja fermentiranih mlijeka u Hrvatskoj za razdoblje od 2000. do 2013. godine.
- Slika 1.19. 24 Odnos između proizvođača fermentiranih mlijeka na hrvatskom tržištu i uvoza fermentiranih mlijeka na godišnjoj razini.

- 2. Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija**
- Slika 2.1. 30 Shematski prikaz kemijske građe nukleinskih kiselina: DNA (dezoksiribonukleinska kiselina) i RNA (ribonukleinska kiselina) (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=nukleinska+kiselina>.)
- Slika 2.2. 31 Carl Linné (1703. - 1778.), portret, Aleksander Roslin (1718. - 1793.), Nationalmuseum, Stockholm, Švedska.
- Slika 2.3. 34 Fermentacija 49 različitih šećera API 50 CH testom (bioMerieux, Francuska) za referentni baktericidni soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Chr. Hansen's lab. Danska).
- Slika 2.4. 35 Različiti RAPD profil sojeva *L. lactis* subsp. *cremoris* dobiven pomoću triju početnica [5-GATCGGACGG-3 (P2), 5-CTGGGCACGA-3 (P15), 5-TCGCCAGCCA (P16)].
- Slika 2.5. 35 PCR-DGGE obrasci dobiveni amplifikacijom V3 regije 16S rDNA iz uzoraka konzorcija izoliranog od tradicionalno proizvedenoga svježega ovčjeg sira. (Pogačić i sur., 2010., s dopuštenjem izdavača Springer Science + Business media.)
- Slika 2.6. 36 Razvitek genomskog sekvencioniranja genoma bakterija mliječne kiseline u posljednja dva desetljeća. (de Vos, 2011., CC by 2,0.)
- Slika 2.7. 36 Shematski prikaz genoma *L. casei* skupine bakterija. (Toh i sur., 2013., CC BY -SA 3,0.)
- Slika 2.8. 37 Shematski prikaz metaboličkim inženjeringom uspješnoga preusmjeravanju primarnoga homofermentativnog metabolizma ugljika u stanici bakterije *L. lactis* u heterofermentativni metabolizam. (Hugenholtz i Kleerebezem 1999., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.9. 37 Shematski prikaz utjecaja metaboličkog inženjeringa na razinu proteolitičke aktivnosti i biosinteze dušičnih spojeva u stanici bakterije *L. lactis*. (Hugenholtz i Kleerebezem, 1999., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.10. 38 Shematski prikaz načina preusmjeravanja biosinteze egzopolisaharida (EPS) u stanici bakterije *L. lactis* koji vodi do sinteze specifičnog B₄₀-EPS. (Kleerebezem i Hugenholtz, 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.11. 38 Shema nizin kontroliranog sustava ekspresije gena (NICE) u stanici bakterije *L. lactis*. (Hugenholtz, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.12. 39 Shematski prikaz biosinteze vitamina B₉ (folne kiseline), B₂ (riboflavina), B₁₂ [deoksiadenozil (kobalamin)] u stanici bakterije *L. lactis* povezanih multienzimatskim interakcijama. (Kleerebezem i Hugenholtz, 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.13. 41 Pojednostavljeni prikaz filogenetskog odnosa između bakterijskih koljena (*phylum*) u usporedbi s drugim organizmima. Eukarioti (Eukarya) su označeni crvenom, a arheje (Archaea) zelenom bojom
- Slika 2.14. 42 Filogenetsko stablo podrijetla glavnih linija bakterija sačinjeno na temelju komparativne analize 16S rRNA sekvenci. (Schleifer i sur., 1995., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.15. 43 Filogenetski odnos između bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes* u odnosu na ostale bakterije (lijeva strana slike) i njihove najvažnije skupine bakterija (desna strana slike). (Vollmer, 2012., s dopuštenjem Macmillan Publishers Ltd-a.)

- Slika 2.16. 44 Filogenetsko stablo bakterija mliječne kiseline konstruirano na temelju kombinacije 232 gena i 16S rRNA gena. (Zhang i sur., 2011., CC BY 2,0)
- Slika 2.17. 45 Filogenetsko stablo skupine gram-pozitivnih bakterija mliječne kiseline s niskim mol % udjelom G + C u DNA i od njih odvojenu skupinu gram-pozitivnih bakterija rodova *Bifidobacterium* i *Propionibacterium* s visokim mol % udjelom G + C u DNA molekulama. (Schleifer i sur. 1995., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.18. 46 Uopćena shema za primarnu homofermentativnu i heterofermentativnu fermentaciju glukoze bakterija mliječne kiseline. (Caplice i Fitzgerald, 1999., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.19. 47 Uopćena shema za sekundarni metabolizma piruvata bakterija mliječne kiseline. (Caplice i Fitzgerald, 1999., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.20. 47 Morfološki izgled bakterijskih stanica *Lactobacillus* spp. (a - bacili, b - kokobacili) ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)
- Slika 2.21. 49 Morfološki izgled bakterije *Enterococcus faecalis* ispod optičkog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 2.22. 51 Morfološki izgled bakterijskih stanica *Leuconostoc* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x. (T. Pogačić, darovana slika.)
- Slika 2.23. 51 Morfološki izgled bakterije *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.24. 52 Morfološki izgled bakterijskih stanica *Pediococcus* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa. (Sukumar i Ghosh, 2013., CC BY-SA 3,0.)
- Slika 2.25. 53 Filogenetsko stablo *Bifidobacterium* spp. temeljeno na 16S rDNA sekvencama. (von Ah i sur., 2007., CC BY 2,0)
- Slika 2.26. 54 Dendrogram *Bifidobacterium* spp. izveden na temelju 138 fenotipskih karakteristika vrsta roda *Bifidobacterium*. (Klein i sur., 1998., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.27. 54 Morfološki izgled bakterijskih stanica *Bifidobacterium* spp. ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)
- Slika 2.28. 55 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)
- Slika 2.29. 56 Izgled volutinskih zrnaca unutar bakterijske stanice *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.
- Slika 2.30. 56 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.31. 57 Shematski prikaz pojednostavljenog evolucijskog stabla triju podvrsta bakterije *Lactobacillus delbrueckii*. (Prilagođeno prema Germondu i sur., 2003.)
- Slika 2.32. 58 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus acidophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.
- Slika 2.33. 58 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus acidophilus* La-5 snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 1 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.34. 58 Shematski prikaz filogenetskog odnosa između *Lactobacillus casei* skupina bakterija dobiven na temelju homolognosti i sekvencije 16S rRNA. (Klein i sur., 1998., s dopuštenjem Elseviera.)

- Slika 2.35. 59 Morfološki izgled stanica *Lactobacillus casei* skupine bakterija ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)
- Slika 2.36. 59 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.37. 60 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.
- Slika 2.38. 60 Morfološki izgled bakterije *Lactobacillus rhamnosus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.39. 61 Morfološki izgled bakterije *L. reuteri* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.40. 61 Morfološki izgled bakterije *Streptococcus thermophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x.
- Slika 2.41. 61 Morfološki izgled bakterije *Streptococcus thermophilus* snimljen skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.42. 62 Morfološki izgled bakterije *L. lactis* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje, 1000 x. (A. Čanžek Majhenič, darovana slika.)
- Slika 2.43. 63 Morfološki izgled bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM); bar = 2 μm. (Chr. Hansen, darovana slika.)
- Slika 2.44. 63 Morfološki izgled bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* u formi zadebljanih kratkih štapića ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x
- Slika 2.45. 65 Shematski prikaz proteolitičkog sustava laktokoka. (Prilagođeno prema Steelu, 1998.)
- Slika 2.46. 65 Shematski prikaz metabolizma kazeina, peptida i aminokiselina bakterija mliječne kiseline kojim se tijekom fermentacije mlijeka stvaraju aromatski spojevi. (Hugenholtz, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.47. 67 Shematski prikaz glikolitičkog Embden-Mayerhof-Parnasovog (EMP) puta metabolizma laktoze homofermentativnih bakterija mliječne kiseline nakon unosa laktoze u bakterijsku stanicu: PEP:PTS mehanizmom (lijeva strana) i ATP-permeaznim sustavom (desna strana). (Prilagođeno prema Marshallu i Tamimu, 1997., i Vedamuthu, 2006.)
- Slika 2.48. 68 Aldolna reakcija u glikolitičkom ciklusu (EMP) razgradnje glukoze.
- Slika 2.49. 69 Shematski prikaz fosfoketolaznog puta (PKP) metabolizma laktoze heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline nakon unosa laktoze u bakterijsku stanicu ATP-permeaznim mehanizmom. (Prilagođeno prema Marshallu i Tamimu, 1997., i Vedamuthu, 2006.)
- Slika 2.50. 70 Shematski prikaz heterofermentativne razgradnje laktoze bakterija *Leuconostoc* spp. koja uključuje glukoza-citrat kometabolizam. (Bourel i sur., 2001., s dopuštenjem časopisa *Le Lait*.)
- Slika 2.51. 71 Shematski prikaz bazičnog metabolizam *Leuconostoc* spp. bakterija. (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.52. 72 Shematski prikaz metabolizma galaktoze bakterija mliječne kiseline. (Prilagođeno prema Walstri i sur., 1999.)
- Slika 2.53. 72 Bifidociklus razgradnje glukoze (Prasanna i sur., 2014., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.54. 76 Metabolizam citrata bakterija *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc* vrsta. (preuzeto od Marshalla i Tamima, 1997.)

- Slika 2.55. 77 Mikroskopska slika kapsularnog oblika egzopolisaharida bakterije *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Shah, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 2.56. 77 Mikroskopska slika kapsularnog oblika egzopolisaharida bakterije *S. thermophilus* (Shah, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 2.57. 78 Prihvaćanje bakterija *Leuconostoc* spp. na površinu kalupa za sir. Slika je dobivena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). (Devoyod i Poullain, 1988., s dopuštenjem časopisa *Le Lait*.)
- Slika 2.58. 78 Shematski prikaz strukture glukana (Monsan i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.59. 79 Shematski prikaz strukture fruktana (Monsan i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.60. 80 Shematski prikaz heteropolisaharida.
- Slika 2.61. 81 Shematski prikaz biosinteze heteropolisaharida koji nastaju konverzijom laktoze, galaktoze i glukoze u bakterijskoj stanici bakterija mliječne kiseline. (De Vuyst i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 2.62. 82 Mikroskopska slika interakcije između EPS (+) sojeva bakterije *S. thermophilus* i proteinske mreže jogurta. (Shah, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 2.63. 82 Antimikrobni spojevi bakterija mliječne kiseline.
- Slika 2.64. 83 Shematski prikaz kemijske strukture lantibiotika – nizina.

3. Mikrobnе kulture

- Slika 3.1. 90 *L. lactis* osjetljivi sojevi na fag infekciju (fluorescentna zona) i sojevi neosjetljivi na fag infekciju (bez fluorescentne zone). (Janzen i sur., 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 3.2. 91 Karakterističan izgled mezofilne mješovite kulture sastavljene od bakterijskih sojeva *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.
- Slika 3.3. 95 Karakterističan izgled termofilne jogurtne kulture sastavljene od bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.
- Slika 3.4. 95 Mikroskopski izgled termofilne kulture koja sadrži bakterije *S. thermophilus* i *L. acidophilus* ispod svjetlosnog mikroskopa, povećanje 1000 x.
- Slika 3.5. 99 Sposobnost adhezije određenih protektivnih bakterijskih sojeva vrsta bakterija mliječne kiseline na bakterijsku stanicu enteroinvazivne *E. coli* (EIEC). (Liu i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 3.6. 99 Inhibitorno djelovanje funkcionalne kulture (*L. casei* AST18; (2 % v/v) na rast kvasaca (a) i plijesni (b) u jogurtu. (Li i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 3.7. 101 Laboratorijska tekuća kultura.
- Slika 3.8. 102 Shematski prikaz aseptičkog načina pripreme radne ili međukulture iz matične tekuće kulture. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 3.9. 102 Shematski prikaz postupka pripreme tehničke kulture iz tekuće kulture. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

- Slika 3.10. 103 Izgled koncentrirane - zamrznute jogurtne kulture (pohranjene u suhom ledu na temperaturi od - 45 °C).
- Slika 3.11. 104 Shematski prikaz aseptičkog transfera koncentrirane - zamrznute kulture u procesni spremnik. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 3.12. 105 Aseptički način inokulacije koncentrirane - zamrznute ili koncentrirane - zamrznute - osušene kulture direktno u fermentacijski spremnik ili u spremnik za pripremu tehničke kulture. (Bylund, 2003. s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 3.13. 106 Izgled DVI/DVS monokulture (*Lactobacillus acidophilus*).
- Slika 3.14. 106 Izgled DVI/DVS monokulture (*Bifidobacterium bifidum*).
- Slika 3.15. 107 Shematski prikaz aseptičke inokulacije koncentrirane DVS (zamrznute ili zamrznute - osušene) kulture AISY sustavom. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 3.16. 107 Shematski prikaz proizvodnje fermentiranih mlijeka koja se proizvode korištenjem standardne i probiotičke kulture. (Driessen i Loones, 1992., s dopuštanjem FIL-IDF-a.)
- Slika 3.17. 108 Omjer stvaranja mliječne kiseline kao funkcije pH-vrijednosti pojedinačnih bakterijskih sojeva vrsta bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija. (Marshall i Tamime, 1997., s dopuštanjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 3.18. 109 Tvorbina mliječne kiseline i diacetila u obranom mlijeku na 20 °C uz 1 % inokuluma mezofilne LD kulture (*L. lactis* subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*). (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 3.19. 110 Tvorbina mliječne kiseline i acetaldehida tijekom fermentacije mlijeka na 43 °C uz dodatak klasične jogurtne kulture (*S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 3.20. 112 Shematski prikaz načina infekcije bakterijske stanice bakteriofagom. (CC BY 2,5.)
- Slika 3.21. 113 Različiti morfološki izgled infektivnih bakteriofaga *Lactococcus lactis* snimljen transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). (Atamer i sur., 2013., CC BY 3,0.)
- Slika 3.22. 113 A) Temperaturno-vremenska krivulja toplinske obrade koncentrata proteina sirutke (5,3 % proteina) i obranoga mliječnog praha koja pokazuje potrebno vrijeme za 9-log inaktivaciju *Lactococcus lactis* faga P68o (termostabilan) i Poo8 (termolabilan), (B) morfološki izgled faga Poo8 i P68o.. (Atamer i sur., 2013., CC BY 3,0.)
- Slika 3.23. 114 Morfološke varijante fag-rezistentnih sojeva *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab1. (Suárez i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 3.24. 114 Stanična morfologija sojeva Ab1 T i Ab1 C dobivenih iz fag-rezistentnog soja *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Ab1. (Suárez i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 3.25. 115 *Streptococcus thermophilus* fag (ALQ 13) koji formira rozete (mala slika). Slika je dobivena Philips EM 300 elektronskim mikroskopom; bar = 100 nm. (Quiberoni i sur., 2010., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 3.26. 115 Morfološka slika termorezistentnih bakteriofaga koji inficiraju bakterije mliječne kiseline sadržane u sastavu kultura. (Capra i sur., 2013., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 3.27. 117 Shematski prikaz izvođenja plak-testa i načina brojanja faga u analiziranom uzorku. (CC BY –SA 3,0.)

- Slika 3.28. 118 Izgled krivulje acidifikacije mlijeka inokuliranog mješovitom kulturom u prisutnosti virulentnih bakteriofaga. (Szczepankowska i sur., 2013., CC BY 3,0.)
- Slika 3.29. 119 Shematski prikaz primjera plana rotacije kulture i dezinfekcije u slučajevima bakteriofagne kontaminacije. (Szczepankowska i sur., 2013., CC BY 3,0.)
- Slika 3.30. 119 Sistem za filtraciju zraka kroz apsolutni filter za proizvodni prostor i proizvodno postrojenje. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)

4. Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka

- Slika 4.1. 124 Kemijska struktura arahidonske kiseline (C_{20:4}; ω-6), linolne kiseline (C_{18:2}; ω-6) i linolenske kiseline (C_{18:3}; ω-3). (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=omega-3+masne+kiseline>.)
- Slika 4.2. 125 Izgled globula mliječne masti obavijenih membranom. (Lopez, 2011., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.3. 125 Veličina i distribucija globula mliječne masti u kravljem mlijeku. (Michalski i sur., 2004., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.4. 127 Unutarnja struktura triacilglicerola (TAG) kravljega, kozjeg i ovčjeg mlijeka s obzirom na postotak esterificiranih (mol %) masnih kiselina u Sn-1, Sn-2 i Sn-3 poziciji. (Prilagođeno prema Lopez, 2011.)
- Slika 4.5. 127 Strukturni izgled zasićenih, monozasićenih i polinezasićenih masnih kiselina sadržanih u globuli mliječne masti. (Generalić, 2013., <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=masna+kiselina>.)
- Slika 4.6. 128 Shematski prikaz strukture globule mliječne masti i njezine membrane s detaljnim prikazom glavnih proteina koji su smještenih u membrani. (Affolter i sur., 2010., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.7. 129 Heterogenost sastava i strukture membrane masne globule (MMG). (Lopez, 2011., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.8. 132 Pretpostavljeni modeli istraživanja izgleda strukture kazeinske micelle u posljednjih 50-ak godina. (de Kruif i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.9. 133 Mikroskopska struktura površine pojedinačne kazeinske micelle. (Dalglish i sur., 2004. s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.10. 133 Mikroskopska struktura površine kazeinske micelle i njene pridružene proteinske strukture. (Dalglish i sur., 2004., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.11. 135 Prostorna struktura jedne podjedinice β-laktoglobulina. (Brownlow i sur., 1997., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.12. 135 Prostorna struktura α-laktalbumina. (Permyakov i Berliner, 2000., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.13. 137 Mutarotacija laktoze u mlijeku. (Generalić, 2013., http://glossary.periodni.com/preuzimanje_slike.php?name=laktoza.png&source=laktoza.)
- Slika 4.14. 143 Shematski prikaz općeg hodograma u proizvodnji fermentiranih mlijeka od faze sakupljanja sirovog mlijeka do gotovog proizvoda. (Kopanos, 2011., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 4.15. 145 Shematski prikaz koničnog fermentacijskog spremnika. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)

- Slika 4.16. 145 Mehaničko ugladivalo (a) i pneumatsko ugladivalo (b). (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 4.17. 146 Shematski prikaz statičkih modela miješalica za jogurte pripremljene s dodatkom voćnog pirea. (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 4.18. 146 Shematski prikaz dinamičkih modela miješalica. (Maiocchi, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 4.19. 146 Učinak punilice na veličinu komadića voća tijekom pripreme voća i u voćnom jogurtu. (Silfverberg, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 4.20. 147 Shematski prikaz hlađenja fermentiranih mlijeka u rashladnom tunelu. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.21. 147 Shematski prikaz linije za predtretiranje sirovog mlijeka u proizvodnji fermentiranih mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.22. 148 Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji čvrstih, tekućih i pitkih varijanti fermentiranih mlijeka s dodatkom i bez dodatka voća ili aroma. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.23. 149 Aseptički dozator ugrađen u proizvodnu liniju za doziranje dopuštenih termolabilnih dodataka mlijeku. (S dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.24. 150 Sustavi za dodavanje različitih ingredijenata mlijeku. (S dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.25. 151 Shematski prikaz temeljnih principa membranskih tehnika za odvajanje sastojaka mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.26. 152 Shematski prikaz načina uklanjanja dijela vode iz mlijeka sustavom za evaporaciju mlijeka u vakuumu. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.27. 152 Konfiguracija polimerne membrane spiralnog namotaja povezane s antikompresijskom jedinicom. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.28. 154 Izgled strukture obranoga mliječnog praha.
- Slika 4.29. 154 Mikrostruktura toplinski obrađenog mlijeka (90 °C/5 min) obogaćenog obranim mliječnim prahom do 14 % (w/w) ukupne suhe tvari. (Tamime i sur., 1996., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 4.30. 155 Izgled strukture osušenog koncentrata proteina mlijeka.
- Slika 4.31. 155 Izgled kazeina u prahu (a) Na-kazeinat, (b) Ca-kazeinat.
- Slika 4.32. 156 Izgled konzistencije čvrstog jogurta dodatkom kazeina u prahu > 2 %.
- Slika 4.33. 157 Izgled strukture osušenih pripravaka sirutke.
- Slika 4.34. 158 Shematski prikaz obiranja mliječne masti iz mlijeka djelovanjem centrifugalne sile. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.35. 159 Sustav za standardizaciju mlijeka u proizvodnoj liniji. (S dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.36. 159 Izdvojeni prikaz standardizacijske jedinice koja služi za kontinuirani proces standardizacije udjela mliječne masti, suhe tvari bez masti i proteina u mlijeku. (s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.37. 160 Shematski prikaz osnovne struktura pektina. (Willats i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.38. 161 Utjecaj pektina na stabilizaciju gel-strukture fermentiranih mlijeka. (Willats i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.39. 162 Mikrostruktura jogurnog gela s različito dodanim koncentracijama LMA-pektina. (Matia-Merino i Sing, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)

- Slika 4.40. 162 Izgled formiranoga jogurnog gela uz dodatak različitih koncentracija LMA-pektina nakon inkubacije od 24 sata. (Matia-Merino i Sing, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.41. 163 Izgled konzistencije tekućeg jogurta proizvedenog s dodatkom izolata proteina sirutke (IPS) i pektina. (S dopuštenjem M-C. Gentès, 2007.)
- Slika 4.42. 164 Mikrostruktura jogurta nakon obogaćivanja mlijeka dodatkom škroba. (Tamime i sur., 1996., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 4.43. 166 Shematski prikaz strukturne građe laktuloze.
- Slika 4.44. 166 Shematski prikaz strukturne građe inulina.
- Slika 4.45. 166 Utjecaj različitih vrsta komercijalno dostupnih prebiotika na preživljavanje različitih probiotičkih bakterijskih sojeva. (Huebner i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.46. 167 Transglutaminazom (TGaza) inducirano povezivanje proteina u mlijeku. (Kulozik, 2003., s dopuštenjem FIL-IDF-a.)
- Slika 4.47. 168 Shematski prikaz pretpostavljenog načina oblikovanja gel-strukture fermentiranih mlijeka dodatkom transglutaminaze (TGaza). Detalji: KCP- koloidni kalcijev fosfat. (Schorsch i sur., 2000., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.48. 168 Mikrostruktura disperzije kazeinskih micela u gel-strukturi čvrstog jogurta inducirana mliječnom kiselinom (a) bez transglutaminaze i (b) sa transglutaminazom (1 % w/w). Slika je dobivena konfokalnim skenirajućim laser-elektronskim mikroskopom (CSLM); bar = 25 µm. (Schorsch i sur., 2000., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.49. 169 Sinereza čvrstog jogurta (%) proizvedenog od punomasnog i obranog mlijeka s dodatkom i bez dodatka transglutaminaze. (Lorenzen i sur., 2002., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 4.50. 169 Shema načina dodavanja transglutaminaze u proizvodnji jogurta. (S dopuštenjem U. Kulozika, 2007.)
- Slika 4.51. 170 Izgled teksture tekućeg jogurta proizvedenog s različitim omjerom kazein : proteini sirutke (KSP) i dodatkom transglutaminaze nakon 6 tjedana pohrane na 4 °C. (Bönisch i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.52. 170 Promjene pH-vrijednosti i trajanje fermentacije tekućeg jogurta ovisno o vrsti enzimatskog pripravka transglutaminaze. (Bönisch i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.53. 171 Nova generacija klarifikatora koja se može koristiti za pročišćavanje mlijeka kao i za hladnu i toplu separaciju sastojaka mlijeka. (S dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.54. 173 Shematski prikaz principa homogenizacije mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.55. 173 Nova generacija homogenizatora kapaciteta 55 - 52.000 L/h s mogućnošću namještanja tlaka do 63 MPa. (S dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.56. 174 Shematski prikaz načina povezivanja homogenizatora u proizvodnu liniju fermentiranih mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.57. 174 Shematski prikaz izgleda globula mliječne masti u mlijeku nakon homogenizacije. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.58. 174 Krivulja distribucije veličine masnih globula u mlijeku homogeniziranom uz tlak od 10 i 25 MPa. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

- Slika 4.59. 175 Shematski prikaz glavnih fizikalno-kemijskih reakcija uključenih u stvaranje emulzije. (Raikos, 2010., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.60. 175 Mikrostruktura emulzija sojinog ulja i mlijeka formirana dodatkom Na-kazeinata. (Dalglish, 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.61. 176 Mikrostruktura punomasnog mlijeka (~ 3,8 % m.m) određena tehnološkim procesima obrade mlijeka. (García-Risco i sur., 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.62. 177 Mikrostruktura obranog mlijeka (~ 0,5 % m.m) određena tehnološkim procesima obrade mlijeka. (García-Risco i sur., 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.63. 179 Shematski prikaz principa rada visokotlačne homogenizacije (HPH) s dvostrukim pojačivačima. (Dumay i sur., 2013., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.64. 180 Princip rada i dizajn ventila za visokotlačnu homogenizaciju. ([http://web.utk.edu/~fede/high %20pressure %20homogenization.html](http://web.utk.edu/~fede/high%20pressure%20homogenization.html))
- Slika 4.65. 181 A) promjene veličine kazeinske micela u obranom mlijeku i (B) promjene veličine kazeinske micela u obranom mlijeku. (Anema, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.66. 181 Denaturacija β -Lg i α -La . (Anema, 2008., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.67. 182 Shematski prikaz utjecaja temperature, visokotlačne homogenizacije (HPH) i kombiniranog utjecaja HPH i toplinske obrade mlijeka na formiranje proteinske mreže tijekom fermentacije. (Penna i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.68. 183 Mikrostruktura jogurta proizvedenog s komercijalnim kulturama YO MIX 236 (A, C, E) i DPL ABY 611 (B, D i E) korištenjem različitih postupaka obrade mlijeka. (Penna i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.69. 183 Veličina i distribucija masnih globula u mlijeku uvjetovana tlakom homogenizacije. (Thiebaut i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.70. 184 Omjer inaktivacije ukupnog broja bakterija kao funkcije korištenog tlaka visokotlačne homogenizacije i ulazne temperature mlijeka. (Thiebaut i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.71. 184 Inaktivacija gram-pozitivnih (a) i gram-negativnih bakterija kao funkcije korištenog tlaka visokotlačne homogenizacije i ulazne temperature mlijeka od 25 °C. (Wuytack i sur. 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.72. 185 Vrijednosti čvrstoće teksture čvrstog jogurta kao funkcije jačine sile tlaka visokotlačne homogenizacije i temperature. (Serra i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.73. 185 Kapacitet vezanja vode (% w/w) čvrstog jogurta kao funkcije jačine sile tlaka visokotlačne homogenizacije i temperature. (Serra i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.74. 186 Mikrostruktura proteinske mreže tekućeg jogurta pripremljenog standardnim tehnološkim postupkom i uz korištenje visokotlačne homogenizacije i standardne toplinske obrade. (Ciron i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.75. 188 Shematski prikaz kompletne linije za pasterizaciju mlijeka. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.76. 190 Postotak denaturacije α -laktalbumina i β -laktoglobulina ovisno o temperaturi zagrijavanja mlijeka. (Vasbinder i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.77. 191 Shematski prikaz povezivanja denaturiranih proteina sirutke s micelama kazeina. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

- Slika 4.78. 192 Stupanj denaturacije proteina sirutke kravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka nakon toplinske obrade mlijeka na različitim temperaturama. (Raynal i Remeuf, 1998., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.79. 193 Shematski prikaz interakcija između micela kazeina i denaturiranih proteina sirutke u kravljem i kozjem mlijeku nakon toplinske obrade mlijeka. (Pesic i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.80. 196 Shematski prikaz tehničko-tehnoloških uvjeta kontinuirane fermentacije u proizvodnji tekućega voćnog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 4.81. 197 Tijek fermentacije i početak oblikovanja gel-strukture fermentiranog mlijeka na temperaturi inkubacije od 20 i 30 °C korištenjem mezofilne kulture. (Ruas - Mediedo i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.82. 198 Dužina trajanja i promjene pH-vrijednosti tijekom fermentacije mlijeka u proizvodnji jogurta proizvedenog od mlijeka s različitim omjerom kazein : proteini sirutke. (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.83. 198 Promjene pH-vrijednosti i stvorene koncentracije mliječne kiseline (%) tijekom 12 sati fermentacije probiotičkog fermentiranog mlijeka proizvedenog od kravljega, ovčjega i kozjeg mlijeka. (Drakoularakou i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.84. 199 Shematski prikazan način oblikovanja gel-strukture fermentiranih mlijeka induciranog mliječnom kiselinom. (S dopuštenjem U. Kulozik, 2007.)
- Slika 4.85. 199 Shematski prikaz unutarnje organizacije kazeinske micelle. (Horn, 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.86. 199 Shematski prikaz preuređenja strukture kazeinskog gela tijekom fermentacije. (Mellema i sur., 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.87. 203 Biokemijske reakcije koje sudjeluju u formiranju arome fermentiranih mlijeka. (Marilley i Casey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 4.88. 205 Kombinirani način organizacije hlađenja jogurta.
- Slika 4.89. 205 Oblici ambalaže za fermentirana mlijeka.

5. Jogurt i druga fermentirana mlijeka

- Slika 5.1. 210 Shematski prikaz glavnih razlikovnih karakteristika komercijalnih varijanti jogurta. (Prilagođeno prema Tamimu i Robinsonu, 1999., i Chandanu i O'Rellu, 2006.)
- Slika 5.2. 212 Shematski prikaz valovitog dizajna ploča (A i B) pasterizatora koji omogućava zanemarivu turbulenciju mlijeka uz istodobno optimalan prijenos energije. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.3. 213 Shematski prikaz dizajna paralelnog protoka mlijeka i medija za zagrijavanje i hlađenje kroz kanale sekcija zagrijavanje/hlađenje (4 x 2/2 x 4) pasterizatora. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.4. 215 Pojednostavljeni prikaz sinergističkog rasta između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta.
- Slika 5.5. 216 Promjene brojčanog omjera između bakterija *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tijekom fermentacije jogurta kao funkcije utjecaja visine temperature inkubacije. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)

- Slika 5.6. 220 Shematski prikaz strukture glavnih aromatskih spojeva u jogurtu. (Routray i Mishra, 2011., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 5.7. 222 Shematski prikaz formiranja acetaldehida iz treonina tijekom fermentacije jogurta.
- Slika 5.8. 223 pH-interval za početak i završetak hlađenja jogurta. (preuzeto od Rašić i Kurmana, 1978.)
- Slika 5.9. 223 Početak hlađenja tekućega voćnoga i standardnoga čvrstoga ili aromatiziranog jogurta kao funkcije pH-vrijednosti i načina inkubacije. (preuzeto od Rašić i Kurmana, 1978.)
- Slika 5.10. 224 Izgled vanjske i unutarnje teksture čvrstog jogurta.
- Slika 5.11. 225 Shematski prikaz linije za proizvodnju čvrstog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.12. 226 Izgled vanjske i unutarnje teksture tekućeg jogurta.
- Slika 5.13. 227 Shematski prikaz linije za proizvodnju tekućeg jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.14. 228 Izgled teksture pitkog jogurta.
- Slika 5.15. 229 Shematski prikaz linije za proizvodnju pitkog jogurta. (Bylund, 1995., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.16. 230 Izgled teksture švicarske varijante voćnog jogurta.
- Slika 5.17. 231 Izgled teksture francuske varijante voćnog jogurta.
- Slika 5.18. 231 Izgled čvrstog voćnog jogurta uz dodatak arome vanilije s voćem na dnu ambalaže.
- Slika 5.19. 232 Shematski prikaz dodatka voća čvrstom jogurtu. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.20. 233 Shematski prikaz kompletne linije za proizvodnju pitkog jogurta s produženim vijekom održivosti. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.21. 234 Izgled teksture ličke base.
- Slika 5.22. 234 Izgled teksture koncentriranog jogurta proizvedenog na tradicionalan način (a) grčki jogurt, (b) labneh.
- Slika 5.23. 235 Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji koncentriranog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.24. 235 Izgled teksture industrijski proizvedene varijante grčkog jogurta.
- Slika 5.25. 236 Izgled teksture industrijski proizvedenog skyra. (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 5.26. 236 Izgled teksture zamrznutog voćnog jogurta. (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 5.27. 237 Shematski prikaz osnovnih tehnoloških operacija u proizvodnji zamrznutog jogurta. (Bylund, 2003., s dopuštenjem Tetra Paka.)
- Slika 5.28. 240 Izgled teksture ovčjeg jogurta proizveden nestandardnom toplinskom obradom mlijeka (65 °C/5 min).
- Slika 5.29. 240 Promjene koncentracija slobodnih masnih kiselina u kravljem i ovčjem jogurtu tijekom pohrane. (Serafeimidou i sur., 2013., s dopuštenjem Elsevier.)
- Slika 5.30. 241 Promjene ukupnih omega-3 masnih kiselina u kravljem i ovčjem jogurtu tijekom pohrane. (Serafeimidou i sur., 2013., s dopuštenjem Elsevier.)
- Slika 5.31. 242 Izgled teksture čvrstoga kozjeg jogurta.

- Slika 5.32. 243 Izgled teksture kiselog mlijeka.
- Slika 5.33. 244 Izgled teksture bugarskoga kiselog mlijeka. (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 5.34. 245 Izgled teksture (viskoznosti) mlaćenice (desna strana slike) u usporedbi sa svježim mlijekom (lijeva strana slike). Zbog veće viskoznosti, mlaćenica na stjenci čaše ostavlja gušći trag. (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 5.35. 247 Pretpostavljeni model formiranja kefirnog zrna. (Wang i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 5.36. 248 Polisaharidno svojstvo kolonija bakterije *Lactobacillus kefiranofaciens*. (Wang i sur., 2008., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 5.37. 248 Morfološki izgled i mikrostruktura mikrobnog biofilma kefirnih zrna. (Wang i sur., 2012., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 5.38. 249 Mikrostruktura tibetskoga kefirnog zrna. (Jianzhong i sur., 2009., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 5.39. 250 Izgled aktivnih kefirnih zrna nakon višekratne inokulacije u mlijeko. (Zhou i sur., 2009., s dopuštanjem Elseviera.)
- Slika 5.40. 253 Shematski prikaz procesnih operacija u proizvodnji kefira. (Bylund, 2003., s dopuštanjem Tetra Paka.)
- Slika 5.41. 254 Izgled teksture kefira proizvedenog tradicionalnim načinom iz kefirnih zrna (a) i komercijalnom kulturom koja ne sadrži kvasce (b).
- Slika 5.42. 254 Izgled teksture kumisa. (CC BY - SA 3,0.)
- Slika 5.43. 256 Izgled teksture ymera u odnosu na teksturu drugih triju vrsta fermentiranih mlijeka proizvedenih mezofilnom kulturom. (CC BY -SA 3,0.)
- Slika 5.44. 256 Vanjski karakterističan izgled i tekstura tradicionalno proizvedenoga finskoga fermentiranog mlijeka - viilija. (<http://viiliculture.files.wordpress.com/2011/08/viili.jpg>)
- Slika 5.45. 257 Karakterističan izgled villija proizvedenog na industrijski način. (CC BY - SA 3,0.)

6. Fizikalna i reološka svojstva jogurta

- Slika 6.1. 261 Tekstura ili konzistencija čvrstog jogurta.
- Slika 6.2. 261 Tekstura tekućeg jogurta bez dodatka voća i s dodatkom voća.
- Slika 6.3. 262 Tekstura pitkog jogurta s dodatkom jagode.
- Slika 6.4. 263 Krivulja tečenja fluida. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)
- Slika 6.5. 263 Viskozna krivulja fluida. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)
- Slika 6.6. 264 Krivulja tečenja Newtonovih fluida. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)
- Slika 6.7. 264 Viskozna krivulja Newtonovih fluida. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)
- Slika 6.8. 265 Reološka svojstava fluida ilustrirana modelom paralelnih ploča. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)
- Slika 6.9. 266 Odnos između napona smicanja i brzine tečenja fluida. (preuzeto od Niranjana i Gutiérrez-Lópeza, 2009.)
- Slika 6.10. 267 Vremenski ovisna viskozna krivulja tekućeg jogurta. (S dopuštanjem tvrtke Brookfield.)

- Slika 6.11. 269 Shematski prikaz određivanja linearnoga viskoelastičnog limita koji će se koristiti za mjerenje reoloških svojstava određenog materijala. (Gunasekaran i Ak, 2000., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.12. 270 Opis karakterističnih podataka za modul pohrane ili elastičnosti G' i modul gubitka ili viskoznosti G'' kao funkcije vremena formiranja gel-strukture jogurta. (Gunasekaran i Ak, 2000., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.13. 270 Karakteristično formiranje viskoelastičnih svojstva jogurnog gela tijekom fermentacije. (Lee i Lucey, 2010., s dopuštenjem časopisa AJAS.)
- Slika 6.14. 271 Učinak temperature toplinske obrade mlijeka i temperature fermentacije na reološka svojstva mliječnom kiselinom formiranoga gela. (Lucey i Singh, 1997., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.15. 271 Karakteristična krivulja velikih deformacijskih svojstava gel-strukture jogurta mjerene na pH-4,6 korištenjem konstantne sile smicanja. (Lee i Lucey, 2010., s dopuštenjem časopisa AJAS.)
- Slika 6.16. 272 Shematski prikaz principa mjerenja rotacijskog reometra.
- Slika 6.17. 272 Shematski prikaz principa rada instrumenata za analize profila teksture kojom je moguće definirati svojstva čvrstoće, kohezivnosti i elastičnosti jogurta.
- Slika 6.18. 273 Mikrostruktura jogurnoga gela. (Lucey i sur., 1999., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.19. 274 Mikrostruktura jogurta proizvedenoga od kravljega, kozjeg i mješavine kravljeg i kozjeg mlijeka. (Vargas i sur., 2008., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.20. 275 Mikrostruktura jogurta nakon obogaćivanja mlijeka obranim mliječnim prahom (OMP), koncentratima proteina sirutke (KPS), Na-kazeinatom (NaCN), Ca-kazeinatom (CaCN). (Remeuf i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.21. 276 Mikrostruktura jogurta proizvedenog od modificiranog mlijeka (12 % suhe tvari, 4,25–4,14 % proteina) s različitim omjerom kazein : proteini sirutke.
- Slika 6.22. 277 Mikrostruktura jogurnoga gela bez i s dodatkom proteina sirutke. (Guggisberg i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.23. 277 Izgled granulirane teksture čvrstog jogurta.
- Slika 6.24. 278 Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog iz kemijski različitog sastava mlijeka. (Krzeminski i sur., 2011., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.25. 279 Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog bez dodatka i s dodatkom kemijski različitih svojstava mikroproteina sirutke. (Torres i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.26.a. 280 Mikrostruktura čvrstog punomasnog (3,5 % mliječne masti) i bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.26.b. 281 Mikrostruktura čvrstog bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.26.c. 281 Mikrostruktura čvrstoga bezmasnog (0,5 % mliječne masti) jogurta s različitim nadomjescima za mliječnu mast. (Sandoval - Castilla i sur., 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.27. 282 Utjecaj različitog udjela masti na čvrstoću i viskoznost jogurta kao funkcije brzine i sile smicanja. (S dopuštenjem U. Kulozika, 2007.)

- Slika 6.28. 282 Mikrostruktura jogurnoga gela uz dodatak različite količine inokuluma i temperaturu inkubacije od 40 °C. (Lee i Lucey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.29. 283 Mikrostruktura jogurnoga gela uz dodatak različite količine inokuluma i temperaturu inkubacije od 47,5 °C. (Lee i Lucey, 2004., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.30. 284 Razvitak modula pohrane (G') i gubitka tangente (δ) u vremenu u interakciji s udjelom suhe tvari (~ 14 %), količinom inokuluma (3 - 4 %) i temperaturom inkubacije (36 -40 °C); T11,T12 - 2 % jogurtne kulture s različitim udjelom probiotičkog soja bakterije *L. paracasei* B117. (Kristo i sur., 2003., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.31. 284 Mikrostruktura gela čvrstog jogurta proizvedenog s EPS (+) kulturom. (Girard i Schaffer-Lequart, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.32. 285 Čvrstoća teksture čvrstog jogurta s 9 % (a) i 14 % (b) suhe tvari i s različitim omjerom protein : proteini sirutke uz korištenje standardne, EPS (+) kulture (kapsularni oblik) i EPS (+) kulture (difuzni oblik) tijekom pohrane od 28 dana. (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.33. 286 Spontana sinereza čvrstog jogurta s 9 % (a) i 14 % (b) suhe tvari s različitim omjerom protein : proteini sirutke uz korištenje standardne, EPS (+) kulture (kapsularni oblik) i EPS (+) kulture (difuzni oblik) tijekom pohrane od 28 dana (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.34. 287 Mikrostruktura čvrstog jogurta s 9 % i 14 % suhe tvari i omjerom kazein: proteini sirutke 4 : 1 uz korištenje standardne i EPS(+) kulture. (Amatayakul i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.35. 287 Vremenski tijek snižavanja pH-vrijednosti i formiranja gel-strukture jogurta proizvedenog standardnom jogurnom kulturom (slika a) i EPS (+) jogurnom kulturom (slika b) izraženo kroz mjerenje vrijednosti modula pohrane ili elastičnosti G' . (Haque i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.36. 288 Promjene vrijednost modula pohrane ili elastičnosti G' ovisno o vrsti dodane kulture i temperaturi inkubacije. (Haque i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.37.a. 289 Čvrstoća biojogurta - ABT kulture izražena dubinom penetracije (mm) uzrokovane dodatkom proteolitčkih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Shihata i Shah, 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.37.b. 289 Viskozitet biojogurta - ABT kulture s dodatkom proteolitčkih sojeva *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (Shihata i Shah, 2002., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.38. 290 Mikrostruktura probiotičkog jogurta proizvedenog s dodatkom i bez dodatka hidrolizata proteina sirutke. (Sodini i sur., 2005., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.39. 291 Mikrostruktura tekućeg jogurta proizvedenog dodatkom proteina sirutke i LMP-pektina. (S dopuštenjem M-C Gentès, 2007.)
- Slika 6.40. 292 Mikrostruktura bezmasnog jogurta (< 0,5 % mliječne masti) uz dodatak enzima transglutaminaze. (Lorenzen i sur., 2002., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)
- Slika 6.41. 292 Mikrostruktura čvrstog kozjeg jogurta proizvedenog dodatkom različitih koncentracija transglutaminaze (TGaze). (Domagala i sur. 2013., s dopuštenjem Elseviera.)

- Slika 6.42. 293 Mikrostruktura probiotičkoga jogurta ($\leq 0,2$ % mliječne masti, 14 % suhe tvari) proizvedenog s komercijalnom kulturom YO MIX 236 (A, C, E) i DPL ABY 611 (B, D i E) korištenjem toplinske obrade (A i B); visokotlačne homogenizacije HPH (C i D); kombinacije visokotlačne homogenizacije HPH i toplinske obrade (E i F). (Penna i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 6.43. 294 Izgled izdvojene sirutke na površini čvrstog jogurta (a) i u unutrašnjosti gel-strukture jogurta (b).

7. Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka

- Slika 7.1. 308 Karakterističan izgled pakiranja yakulta u bočicama volumena 65 mL (CC BY-SA 3,0.)
- Slika 7.2. 310 Prosječne vrijednosti za organoleptička svojstva teksture, izgleda i boje probiotičkog bezmasnog jogurta s dodatkom probiotičkog soja bakterije *L. casei* i inulina. (Aryana i McGrew, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 7.3. 310 Prosječan broj preživljavanja probiotičkog soja bakterije *L. casei* u probiotičkom jogurtu proizvedenom u dodatak inulina praćen tijekom 5 tjedana pohrane. (Aryana i McGrew, 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 7.4. 312 Pojednostavljeni shematski prikaz dvosmjernoga selekcijskog pritiska na razini domaćina i mikroba u oblikovanju crijevne mikrobiote.
- Slika 7.5. 313 Relativna proporcija zastupljenosti pojedinih filogenetskih mikrobnih koljena unutar humane crijevne mikrobiote. (Candela i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 7.6. 314 Mikrobiota kolona triju zdravih osoba. (Ley i sur., 2006., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 7.7. 314 Zastupljenost dominantnih mikrobnih rodova u tankom crijevu ovisno o pH-vrijednosti i koncentracije kisika. (Shigwedha i Jia, 2013., CC BY 3,0.)
- Slika 7.8. 315 Raspoređenost i funkcija mikrobiote humanoga probavnog trakta. (O'Hara i Shanahan, 2006., s dopuštenjem izdavača Wiley -VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.)
- Slika 7.9. 316 Imunosno prepoznavanje intestinalne populacije. (O'Hara i Shanahan, 2006., s dopuštenjem izdavača Wiley-VCH Verlag, GmbH and Co. KGaA.)
- Slika 7.10. 318 Utvrđena metabolička aktivnost bakterijskog konzorcija u humanom ekosustavu kolona. (Candela i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 7.11. 320 Prikaz pila na staničnoj stijenci bakterije *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, na kojima je na vrhu smješten specifični antigen protein-pilin, koji omogućava prihvaćanje bakterije za sluznicu crijeva. (Kankainen i sur., 2009., s dopuštenjem PNAS-a.)
- Slika 7.12. 321 Shematski prikaz poznatih mehanizama preko kojih probiotički bakterijski sojevi mogu pozitivno utjecati na humanu crijevnu mikrobiotu. (S dopuštenjem tvrtke Custom Probiotics/Harry Bronozian.)
- Slika 7.13. 323 Prihvaćanje probiotičkih bakterijskih sojeva za različite intestinalne stanice. (Gopal i sur., 2001., s dopuštenjem Elseviera.)

- Slika 7.14. 324 Preživljavanje *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (GG) (tamno plava boja) i *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (svijetlo plava boja) u crijevima. (Kankainen i sur., 2009., s dopuštenjem PENS- a.)
- Slika 7.15. 325 Prisutnost i morfološki izgled pilima sličnih staničnih struktura probiotičkih sojeva *Bifidobacterium* spp. (Foroni i sur., 2011., CC BY 2,0.)
- Slika 7.16. 326 Shematski prikaz pretpostavljenog načina pozitivnog djelovanja prebiotika u intestinalnom sustavu na metaboličku, trofičku i zaštitnu stimulaciju humanog organizma.
- Slika 7.17. 327 Izvjesni dokumentirani fiziološki učinci probiotičkih fermentiranih mlijeka na humano zdravlje. (Granato i sur., 2010., s dopuštenjem izdavača John Wiley and Sons.)

8. Kontrola kvalitete i pogreške fermentiranih mlijeka

- Slika 8.1. 332 Izgled koaguluma nakon inkubacije sirovog mlijeka na temperaturi 38 - 40 °C/12 -24 sata.
- Slika 8.2. 335 Prirodan izgled voćnog jogurta s dodatkom jagode.
- Slika 8.3. 335 Različiti intenzitet boje voćnog jogurta s dodatkom jagode.
- Slika 8.4. 338 Shematski prikaz principa mjerenja dinamičkim reometrom. Detalji: (a) stalna sila smicanja u paralelnoj konfiguraciji ploča reometra, (b) dinamička viskoelastična svojstva gel- strukture kao funkcija reakcije u vremenu. (Murata, 2012., CC BY 3,0.)
- Slika 8.5. 339 Izgled kolonija kvasaca (male kolonije) i plijesni (velike kolonije) na kvašćevom ekstrakt dekstroza- kloramfenikol hranilištu. (LAB 119.)
- Slika 8.6. 339 Izgled kolonija plijesni na površini čvrstog jogurta.
- Slika 8.7. 341 Makroskopski izgled "sluzave" niti koja se formira iz stanične mase EPS+ sojeva bakterija mliječne kiseline sadržanih u komercijalnoj kulturi za jogurt na MRS hranilištu. (Ruas - Madiedo i de los Reyes - Gavilán, 2005., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 8.8. 343 Izgled kolonija bakterija *B. longum* DJO10A (A) i *B. animalis* subsp. *animalis* Bb12 (B) na selektivnom BIM 25 hranilištu. (Scheller i O'Sullivan, 2011., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 8.9. 344 Morfološka razlika izgleda kolonija *L. rhamnosus* (bijeke ujednačene kolonije) između ostalih mikrobnih vrsta sadržanih u probiotičkom fermentiranom mlijeku na MRS hranilištu nakon anaerobne inkubacije na temperaturi od 37 °C/72 sata.
- Slika 8.10. 345 Morfološki izgled kolonija sojeva *Lactobacillus* spp. izoliranih iz komercijalnih probiotičkih fermentiranih mlijeka poraslih na modificiranom MRS hranilištu (vankomicin, L-cistein, plavi bromfenol, pH-6,2) nakon anaerobne inkubacije na temperaturi od 37 °C/72 sata. (Sutula i sur., 2012., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 8.11. 346 Različiti izgled kolonija bakterija termofilne kulture. (Tabasko i sur., 2007., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 8.12. 346 Izgled kolonija *L. casei* Shirota i *L. rhamnosus* DMS 20021^T poraslih na M-RTL^V selektivnom hranilištu. (Sakai i sur., 2010., s dopuštenjem Elseviera.)
- Slika 8.13. 347 Karakterističan izgled kolonija laktokoka na M17 hranilištu nakon inkubacije u mikroaerofilnim uvjetima na temperaturi od 30 °C/72 sata.

- Slika 8.14. 347 Citrat pozitivne kolonije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* na diferencijalnom hranilištu prema Kempleru i McKayu (1980.).
- Slika 8.15. 349 Izdvojena sirutka na površini i nekarakterističan izgled strukture oblikovanoga gela čvrstog jogurta.
- Slika 8.16. 349 Izgled nježne strukture gela čvrstog jogurta.
- Slika 8.17. 350 Izgled previše blijede boje za voćni jogurt s dodatkom šumskog voća.
- Slika 8.18. 352 Izgled previše mekane i granulirane teksture čvrstog jogurta.
- Slika 8.19. 352 Izgled istovremenih pogrešaka izgleda, boje i teksture voćnog jogurta s dodatkom šumskog voća.





9 789537 472108