

# Fermentacija mlijeka kombuchom

---

Latin, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:294187>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Maja Latin 696/USH

**FERMENTACIJA MLIJEKA**  
*KOMBUCHOM*

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Rajke Božanić., Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc.dr.sc. Irene Barukčić.

*Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Rajki Božanić na izabranoj temi i velikoj pomoći pri pisanju diplomskog rada, kao i doc.dr.sc. Ireni Barukčić koja je stručnim savjetima pomogla pri izradi i pisanju ovog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene i pružila mi veliku potporu tijekom studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### FERMENTACIJA MLIJEKA *KOMBUCHOM*

Maja Latin, 696/USH

**Sažetak:** Kravlje mlijeko fermentirano je s 3 različite koncentracije inokuluma kombuche (5, 10 i 15%) te na dvije temperature (40 i 43 °C). *Kombucha* je uzgajana na crnom čaju te je kao takva korištena za inokulum. U uzorcima fermentiranog mlijeka praćene su razlike u trajanju fermentacije, titracijskoj kiselosti, sinerezi, suhoj tvari, reološkim svojstvima te senzorskim karakteristikama. Pri višoj temperaturi fermentacije i dodatkom većeg inokuluma fermentacija je trajala najkraće. Nisu primjećene značajne razlike između uoraka s obzirom na titracijsku kiselost i suhu tvar. Najbolja reološka svojstva pokazuje uzorak s najmanjom koncentracijom inokuluma (5%) fermentiran na nižoj temperaturi (40°C). Isto tako, taj uzorak pokazuje najbolje senzorske karakteristike te najmanju sinerezu. Općenito se može zaključiti da je najbolja fermentacija s 5% inokuluma pri 40°C.

**Glavne riječi:** kravlje mlijeko, *kombucha*, inokulum, fermentacija

**Rad sadrži:** 42 stranice, 8 slika, 9 tablica, 90 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof.dr.sc., Rajka Božanić

**Pomoć pri izradi:** Irena Barukčić, doc.dr.sc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak
2. Prof.dr.sc. Rajka Božanić
3. Doc.dr.sc. Irena Barukčić
4. Izv.prof.dr.sc. Suzana Rimac-Brnčić

**Datum obrane:** 30. rujna 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology and Engineering  
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### MILK FERMENTATION OBTAINED BY *KOMBUCHA* INOCULUM

Maja Latin, 696/USH

**Abstract:** Cow's milk was fermented with three different concentration of *kombucha* inoculum (5, 10, 15%) and on two temperatures (40 and 43°C). *Kombucha* was cultivated on black tea, and thus was used for milk fermentation. Differences between samples were observed by tracking duration of fermentation, titratable acidity, syneresis, dry matter, rheological properties and sensoric characteristics. The shortest fermentation was with addition of 15% inoculum on the higher fermentation temperature. There were not noticed significant differences between samples for titratable acidity and dry matter. The best rheological properties has shown the sample with 5% inoculum, fermented on 40°C. Also, that sample has had the best syneresis and sensoric characteristics. In general, the best fermentation was obtained by addition of 5% inoculum and on the lowest fermentation temperature.

**Keywords:** cow's milk, inoculum, *kombucha*, fermentation

**Thesis contains:** 42 pages, 8 figures, 9 tables, 90 references, 1 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Rajka, Božanić, Full professor

**Technical support and assistance:** PhD. Irena, Barukčić, Assistant Professor

**Reviewers:**

1. PhD. Anet, Režek Jambrak, Associate professor
2. PhD. Rajka, Božanić, Full professor
3. PhD. Irena, Barukčić, Assistant professor
4. PhD. Suzana, Rimac-Brnčić, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 30th September, 2016

## Sadržaj

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1	STARTER KULTURE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA.....	4
2.1.1	Mezofilne starter kulture.....	6
2.1.2	Termofilne starter kulture.....	6
2.2	FAKTORI KOJI INHIBIRAJU STARTER KULTURE.....	7
2.3	VRSTE FERMENTIRANIH MLIJEČNIH PROIZVODA.....	8
2.3.1	Mezofilna fermentacija.....	8
2.3.1.1	<i>Kiselo vrhnje</i> .....	8
2.3.1.2	<i>Nordijska fermentirana mlijeka</i> .....	9
2.3.2	Termofilna fermentacija.....	9
2.3.2.1	<i>Jogurt</i> .....	9
2.3.2.2	<i>Probiotički fermentirani mliječni proizvodi</i> .....	9
2.3.2.3	<i>Acidofilno mlijeko</i> .....	11
2.3.3	Fermentacija kvascima i bakterijama mliječne kiseline.....	11
2.3.3.1	<i>Kefir</i> .....	11
2.3.3.2	<i>Kumis</i> .....	12
2.3.4	Plijesni u mliječno kiseloj fermentaciji.....	13
2.3.4.1	<i>"Viili"</i> .....	13
2.4	KOMBUCHA.....	13
2.4.1	Mikrobiološki sastav.....	13
2.4.2	Primjena kombuche u proizvodnji napitaka.....	14
2.5	REOLOGIJA.....	17
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1	MATERIJALI.....	18
3.1.1	Mlijeko za fermentaciju.....	18
3.1.2	Kultura za fermentaciju.....	18
3.2	METODE RADA.....	19
3.2.1	Postupak fermentacije.....	19
3.2.2	Određivanje kiselosti.....	19
3.2.2.1	<i>Određivanje kiselosti fermentiranog mlijeka pH metrom</i> .....	19
3.2.2.2	<i>Određivanje stupnja kiselosti metodom po Soxhlet-Henklu</i> .....	20
3.2.3	Određivanje sinereze mlijeka fermentiranog <i>kombuchom</i> .....	20
3.2.4	Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku fermentiranog <i>kombuchom</i> .....	21



3.2.4.1	<i>Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari (sušenje u sušioniku)</i> .....	21
3.2.5	Određivanje reoloških svojstava mlijeka fermentiranog <i>kombuchom</i> .....	21
3.2.6	Senzorska analiza mlijeka fermentiranog <i>kombuchom</i> .....	22
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1	TIJEK I TRAJANJE FERMENTACIJE.....	24
4.2	UDIO SUHE TVARI, TITRACIJSKA KISELOST I SINEREZA.....	26
4.3	REOLOŠKA SVOJSTVA.....	27
4.4	SENZORSKO OCIJENJIVANJE.....	32
5	ZAKLJUČAK.....	36
6	LITERATURA.....	37
7	PRILOG.....	46

## 1 UVOD

Tehnološki razvoj i metabolička aktivnost tradicionalnih i nekonvencionalnih starter kultura omogućili su, na različitim tržištima, postojanje širokog asortimana fermentiranih mliječnih proizvoda. Visoka nutritivna vrijednost, terapijska svojstva, primjena probiotika i prebiotika doprinose stalnom povećanju potrošnje fermentiranih mliječnih napitaka u svijetu i kod nas. Rast ekonomske vrijednosti ovih proizvoda u svijetu, odraz je prihvaćenosti od strane potrošača. Posebno su traženi fermentirani proizvodi koji unaprjeđuju zdravlje zahvaljujući prisustvu funkcionalnih sastojaka. Osim toga, ovi proizvodi su visoko profitabilni i iznimno važni u industriji mlijeka širom svijeta. Razvojem tehnologije fermentiranih mliječnih napitaka unaprjeđuje se i proširuje asortiman visokokvalitetne funkcionalne hrane. Poznato je da tip starter kulture određuje nutritivne, reološke i senzorske osobine fermentiranog mliječnog proizvoda.

*Kombucha* je simbiotička zajednica gljivica i bakterija octene kiseline, koja metaboličkom aktivnošću na zaslađenom čaju daje ugodan, blago kiseli napitak koji ima mnoštvo blagotvornih utjecaja na ljudsko zdravlje, a što je već znanstveno dokazano od mnoštva autora. Osim saharoze, *kombucha* može konvertirati i koristiti i druge šećere za svoj rast, kao što su glukoza, fruktoza i laktoza.

Stvaranje gela tijekom proizvodnje fermentiranih mliječnih napitaka posljedica je destabilizacije kazeinskog kompleksa tijekom fermentacije zbog pada pH vrijednosti. Teksturalna i reološka svojstva fermentiranih mliječnih napitaka važni su parametri u određivanju kvalitete proizvoda, a na njih mogu utjecati razni faktori kao što su temperatura inkubacije, termički tretman mlijeka, kiselost te tip starter kulture. Zadnjih godina radilo se mnogo istraživanja o upotrebi *kombuche* za fermentaciju mlijeka kako bi se proširio izbor fermentiranih mliječnih napitaka, a bila su usmjerena na ispitivanje tehnoloških i nutritivnih karakteristika proizvoda.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati različitosti u nekoliko parametara kvalitete (pH, vrijednost sinereze, reološka svojstva) nakon fermentacije s obzirom na temperaturu provođenja fermentacija te koncentraciju dodanog inokuluma *kombuche*. Za ispitivanje promjena u mlijeku, kao starter kultura koristila se kombucha uzgajana na crnom čaju. Fermentacija se provodila na dvije različite temperature, 40 i 43 °C, te sa tri različite koncentracije inokuluma, 5, 10 i 15%. Osim toga, provela se i senzorska analiza svih uzoraka kako bi se bolje uočile razlike između različitih uzoraka.

## 2 TEORIJSKI DIO

Primarna funkcija fermentacije bila je produljenje trajnosti mlijeka. Sa ovim su došle brojne prednosti kao što su poboljšanje okusa i probavljivosti mlijeka, kao i proizvodnja širokog spektra proizvoda. Povijesno gledano fermentacija mlijeka može se pratiti unazad do oko 10 000 god. p.n.e., kada su ljudi prestali samo skupljati hranu već su je počeli i proizvoditi (Pederson, 1979). Najvjerojatnije je fermentacija nastala spontano, djelovanjem prisutne mikroflore u mlijeku. Veliki broj različitih fermentiranih mliječnih proizvoda (od kojih je najpopularniji jogurt), za koje postoji oko 400 naziva, proizvodi se širom svijeta. Potrošnja ovih proizvoda, po glavi stanovnika u svijetu, izuzetno je porasla tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Različiti tipovi fermentiranih mliječnih proizvoda klasificiraju se prema vrsti fermentacije i/ili proizvodnje koja je povezana sa vrstama mikroorganizama koji se pri tome koriste. Postoje brojne podijele ovih proizvoda, od kojih se mnoge, manje ili više, preklapaju. Tamime i Deeth (1980) predložili su klasifikaciju koja razvrstava tipove jogurta u četiri kategorije u ovisnosti o njihovim fizikalnim karakteristikama (tekući/viskozni, polučvrsti, čvrsti i praškasti).

Klasifikacija fermentiranih mliječnih proizvoda može se izvršiti i prema drugim kriterijima:

- porijeklu sirovine – mlijeko krave, ovce, koze, bivolje, devino i dr.;
- kemijskom sastavu mlijeka – punomasno, mlijeko standardizirano na određeni postotak masnoće, mlaćenica;
- načinu obrade mlijeka – pasterizirano, homogenizirano ili nehomogenizirano mlijeko;
- vrsti fermentacije – homofermentativna ili heterofermentativna;
- dodacima – proteini, vitamini, mineralne tvari, arome, voće, povrće i dr.

Fermentacija mlijeka podrazumijeva konverziju laktoze u mliječnu kiselinu djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Fermentirani mliječni proizvodi dobivaju se fermentacijom mlijeka korištenjem odgovarajućih mikroorganizama (Tablica 1). Ovi mikroorganizmi u proizvodu moraju biti prisutni u dovoljnom broju te biti živi i aktivni. Pažljiva selekcija mikroorganizama prisutnih u starter kulturi važna je za formiranje osnovnih i specifičnih karakteristika svakog fermentiranog mliječnog proizvoda uz temperaturu kao važan faktor.

Tablica 1. Tipovi fermentiranih mliječnih proizvoda i njihove starter kulture (Surono i Hosono, 2011)

Proizvod	Starter kultura
Acidofilno mlijeko	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Biogarde <sup>®</sup>	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Bioghurt <sup>®</sup>	<i>Sc. thermophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i>
Bifighurt <sup>®</sup>	<i>Bif. bifidum</i> <i>Sc. thermophilus</i>
Mlaćenica (bugarska)	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Mlaćenica (kultivirana)	Komercijalna starter kultura ili kombinacija: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , i <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Cultura	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Bif. bifidum</i>
Cultured cream	Kao za kultiviranu mlaćenicu, ali najčešće bez <i>Leuconostoc</i> spp.
Dahi	<i>Sc. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ili <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> (krajnji izbor zavisi od zemlje u kojoj se proizvodi)
Dadih	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> (zavisi od zemlje u kojoj se proizvodi)
Filmjölök	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>

Kefir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp.
Njemački kefir	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , citratno–pozitivne <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Candida kefyri</i>
Kumis	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces lactis</i> , <i>Torula koumiss</i>
Tätmjölk	Kao za Filmjölk
Viili	Kao za Filmjölk plus <i>Geotrichum candidum</i>
Yakult	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>
Jogurt (uključujući labneh i slične proizvode)	<i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

## 2.1. STARTER KULTURE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

Starter kulture su selekcionirani mikroorganizmi izolirani na osnovi različitih karakteristika, koji složenim biokemijskim procesima proizvode dominantno mliječnu kiselinu (homofermentativni oblici – tipično za jogurt i fermentirane mliječne proizvode tipa jogurta) ili pored mliječne kiseline, laktozu transformiraju i u druge produkte: etanol, ugljikov dioksid (heterofermentativni tip – tipično za kefir i kumis). Starter kulture su bile nepoznate do 1878. godine, kada je Joseph Lister izolirao čistu kulturu bakterija mliječne kiseline. Početkom XX. stoljeća komercijalna proizvodnja i upotreba starter kultura doživjela je ekspanziju. Suvremena proizvodnja kvalitetnih fermentiranih mliječnih proizvoda zahtijeva upotrebu starter kultura koje najčešće sadrže kombinaciju različitih vrsta i sojeva mikroorganizama, uglavnom bakterija mliječne kiseline. To su prirodni izolati selekcionirani na osnovi fizioloških karakteristika, tj. sposobnosti da stvaraju određene količine poželjnih komponenata (laktata, acetata, diacetila, acetaldehida, etanola, ugljikovog dioksida), kao i na osnovu rezistentnosti na bakteriofage, sposobnosti da rastu u međusobnim kombinacijama, a u posljednjih nekoliko godina naglasak je stavljen i na probiotička svojstva (Tamime i Robinson, 2004; Tamime,

2006). Kada je u pitanju primjena starter kultura u prehrambenoj industriji postoje opći kriteriji koji se odnose na sigurnost, tehnološke karakteristike i ekonomski aspekt primjene (Buchenhuskes, 1993; Nauth, 2006):

#### 1. Sigurnost:

- nepostojanje patogene aktivnosti,
- odsustvo toksičnog djelovanja;

#### 2. Tehnološke karakteristike:

- dominacija u odnosu na spontanu mikrofloru,
- otpornost na kontaminaciju tijekom tehnološkog procesa,
- stabilna metabolička aktivnost;

#### 3. Ekonomski aspekt:

- primjena kulture mora biti isplativa,
- osnovna svojstva se ne smiju mijenjati tijekom roka trajanja,
- rukovanje mora biti jednostavno,
- kulture moraju biti smrznute ili liofilizirane.

Poznato je da starter kulture imaju višestruku ulogu u formiranju fizikalno–kemijskih i senzorskih karakteristika fermentiranih mliječnih proizvoda:

- tijekom procesa fermentacije formira se mliječna kiselina koja ima konzervirajući učinak i doprinosi produžetku roka trajanja, tj. produžava trajnost proizvoda;
- proizvode se bakteriocini koji također mogu imati konzervirajuće djelovanje;
- poboljšavaju senzorske karakteristike uslijed proizvodnje organskih kiselina, karbonilnih komponenata i djelomične hidrolize proteina i masti;
- poboljšavaju reološka svojstva fermentiranih mliječnih proizvoda (viskoznost, čvrstoća i dr.);
- doprinose dijetetskim/funkcionalnim i nutritivnim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda, posebno u proizvodima sa probioticima.

Različiti mikroorganizmi (bakterije, kvasci i plijesni – pojedinačno ili u odabranim kombinacijama) mogu se koristiti za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda. Vrsta, udio i odnos pojedinih grupa mikroorganizama u starter kulturi utječe na proces i tip fermentacije – homo ili heterofermentacija. Bakterije mliječne kiseline koje se koriste kao starter kulture u odnosu na tolerantnost prema temperaturi općenito se dijele na:

- mezofilne (optimalna temperatura rasta 20–30°C) – koriste se za proizvodnju fermentiranih mlijeka, velikog broja sireva, sirnih namaza, maslaca;
- termofilne (optimalna temperatura rasta 37–45°C) – koriste se za proizvodnju fermentiranih napitaka tipa jogurta i nekih sireva.

### 2.1.1. Mezofilne starter kulture

Mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline za proizvodnju fermentiranih mliječnih napitaka sastavljene su od homofermentativnih vrsta bakterija *Lactococcus*, te heterofermentativnih bakterija vrste *Leuconostoc*. Mezofilne bakterije mliječne kiseline utječu na konzistenciju fermentiranih napitaka, na okus, miris i svojstvenu aromu, koji nastaju pri procesu fermentacije laktoze i limunske kiseline. Trajanje fermentacije djelovanjem mezofilnih bakterija mliječne kiseline ovisi o temperaturi inkubacije, ali i o aktivnosti i udjelu uporabljene sirovine (Tratnik, 1998). Mezofilne starter kulture su široko rasprostranjene u industriji fermentiranih mliječnih proizvoda kao što su "filmjök" i "lactofil" (u Švedskoj) i "ymer" (u Danskoj). Mezofilna starter kultura gotovo sigurno sadrži *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ali će rijetko ova vrsta biti sama. Mlaćenica, "långfil", i "villi", koji su popularni u Norveškoj, Švedskoj i Finskoj, pored *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sadrže i vrste roda *Leuconostoc*. Ostali fermentirani mliječni proizvodi sa mezofilnim starter kulturama su i kiselo vrhnje, kefir i dr.

### 2.1.2. Termofilne starter kulture

Termofilne kulture bakterija mliječne kiseline, obično su sastavljene od sojeva homofermentativnih bakterija *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Upotrebljavaju se i kao monokulture, ali najčešće kao mješovite kulture, uglavnom u proizvodnji jogurta i sličnih tipova fermentiranih mliječnih napitaka. Klasična, najstarija mljekarska kultura – „jogurtna kultura“, sastoji se od bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, u omjeru 1:1. U zajedničkom rastu tih bakterija razvoj kiseline u mlijeku puno je brži i veći, nego djelovanjem svake bakterije kao monokulture. Pojedinačni sojevi bakterija jogurtne kulture rastu pri različitim optimalnim temperaturama, ali se za zajednički rast u mlijeku (simbioza) preporuča temperatura od 42 °C, mješovita kultura obiju vrsta bakterija u omjeru 1:1, te udio inokuluma oko 2,0%. Gotovi jogurt tada sadržava oko 0,9 do 0,95% mliječne kiseline (Tratnik, 1998). Termofilne starter kulture se dijele u dvije osnovne grupe, sa nedefiniranim i definiranim vrstama mikroorganizama u svom sastavu. Primjeri definiranih termofilnih starter kultura su:

*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, gdje su njihov rast i proizvodnja mliječne kiseline poboljšani uzajamnim odnosom ove dvije vrste; *Lb. acidophilus*, koristi se u proizvodnji acidofilnog mlijeka i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* koristi se u proizvodnji "yakulta".

## 2.2. FAKTORI KOJI INHIBIRAJU STARTER KULTURE

Brojni čimbenici mogu negativno utjecati na aktivnost starter kultura i dovesti do loše kvalitete fermentiranog mliječnog proizvoda. Kad se mliječna kiselina ne proizvodi željenom brzinom i u potrebnim količinama, starter se naziva "sporim". Sporost u djelovanju startera može biti izazvana genetskim sklopom ili vanjskim faktorima. Vanjski faktori, između ostalog, uključuju: bakteriofage, rezidue antibiotika i agensa za sanitaciju, inhibitorne supstance prirodno prisutne u mlijeku, varijacije u sastavu mlijeka zbog mastitisa ili sezonskih faktora, i metabolite bakterija koje izazivaju kvarenje.

Bakteriofagi su virusi koji napadaju bakterije i izazivaju autolizu stanice. Nije moguće eliminirati ulaz bakteriofaga u mlijekaru, ali njihov rast može biti kontroliran efikasnom sanitacijom. Općenito, termofilne starter kulture su manje ugrožene od mezofilnih. U proizvodnji jogurta, fermentacija traje relativno kratko (3–4h) pa je malo vjerojatno da će bakteriofagi simultano djelovati na sve komponente starter kulture. U slučaju djelovanja bakteriofaga na jednu vrstu u starter kulturi, proizvodnja kiseline od strane vrste na koju bakteriofagi ne djeluju će se nastaviti, uzrokujući malo ili nimalo problema u proizvodnji. Mjere koje se poduzimaju da bi se minimalizirao rizik od djelovanja faga su: upotreba starter kultura koje sadrže više vrsta mikroorganizama (miješane kulture), striktno pridržavanje aseptičnih uvjeta, i odgovarajući termički tretman medija za rast startera (npr. na 85°C, 30 min.).

Rezidue antibiotika i agensi za sanitaciju kao što su kvaternarna amonijeva sol, hipokloriti i vodikov peroksid također inhibiraju rast starter kultura. Oni mogu kontaminirati mlijeko kao rezultat ljudske greške. Antibiotici se koriste u tretiranju mastitisa dok se deterdženti i dezinficijensi koriste za čišćenje i sanitaciju pogona. Starter kulture koje su u upotrebi razlikuju se prema osjetljivosti na ove agense.

Inhibitorne supstance prirodno prisutne u sirovom mlijeku, kao što su laktoni, laktoperoksidaza/ vodikov peroksid/tiocijanat spoj (LPS), aglutinini, i lizozim se općenito



uništavaju odgovarajućim termičkim tretmanom mlijeka koji prethodi proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda (Obradović, 2003).

Sezonske varijacije u sastavu mlijeka rezultiraju nižim sadržajem mikronutrijenata (elementi u tragovima, neproteinski azotni spojevi) i utječu na aktivnost starter kultura. Progresivna inhibicija proizvodnje kiseline i opadanje stope proizvodnje kiseline od strane starter kulture ispitana je u jogurtu proizvedenom uz dodatak saharoze, koja podiže osmotski tlak u sustavu. Sposobnost proizvodnje kiseline djelovanjem jogurtne starter kulture je sasvim uobičajena u sustavu koji sadrži 4–7% saharoze. Komercijalni starteri koji su relativno osmotolerantni mogu omogućiti viši udio korištenja saharoze bez kašnjenja u proizvodnji kiseline tijekom proizvodnje jogurta (Marshall, 1993; Frank i Hassan, 1998).

### **2.3. VRSTE FERMENTIRANIH MLIJEČNIH PROIZVODA**

Fermentirani mliječni proizvodi do sada dostupni na tržištu se prema vrsti i sastavu upotrijebljenog startera mogu sumarno podijeliti na:

- proizvode u kojima je zastupljena mliječno kisela fermentacija uslijed prisustva bakterija mliječne kiseline (jogurt);
- proizvodi gdje fermentaciju mlijeka uzrokuju kvasci i bakterije mliječne kiseline (kefir i kumis) i
- proizvodi u kojima je fermentacija izazvana kombinacijom plijesni i bakterija mliječne kiseline ("villi").

Mliječno kisela fermentacija mlijeka u ovisnosti o temperaturi inkubacije može biti mezofilna (djelovanjem mezofilnih starter kultura) i termofilna (djelovanjem termofilnih starter kultura).

Kultivirana mlaćenica, kiselo vrhnje, "lactofil", "filmjöl", nordijska fermentirana mlijeka, "ymer", "shrikhand" i "chakka" su proizvodi dobiveni mezofilnom fermentacijom mlijeka dok su jogurt, "laban", "zabady", "labneh", "skyr", "yakult", acidofilno mlijeko i bugarska mlaćenica proizvodi dobiveni kao rezultat termofilne fermentacije mlijeka.

#### **2.3.1. Mezofilna fermentacija**

##### **2.3.1.1. Kiselo vrhnje**

Kiselo vrhnje je ekstremno viskozan proizvod sa okusom i aromom mlaćenice. Krajnji pH pri proizvodnji iznosi 4,5. Najčešće ne sadrži manje od 18% masti. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* i *Lc. lactis* subsp. *lactis* su odgovorni za proizvodnju kiseline, dok su citratno

pozitivni sojevi *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* primarni izvori okusa i arome, zbog njihove sposobnosti da proizvedu diacetil, važnu hlapljivu komponentu koja proizvodu daje specifičnu aromu. Temperatura inkubacije iznosi 21–24°C.

#### 2.3.1.2. Nordijska fermentirana mlijeka

Glavne karakteristike nordijskih fermentiranih mlijeka su visok viskozitet i rastezljiva struktura. One su rezultat snažnog rasta kapsularnih laktokoka uglavnom *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Rastezljiva struktura je posljedica formiranja egzopolisaharida od strane laktokoka.

#### 2.3.2. Termofilna fermentacija

##### 2.3.2.1. Jogurt

Jogurt je proizvod koji se dobiva mliječno kiselom fermentacijom i djelovanjem bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, iz mlijeka ili proizvoda od mlijeka (pasterizirano mlijeko, koncentrirano mlijeko, pasterizirano djelimično obrano mlijeko, koncentrirano djelimično obrano mlijeko, pasterizirano vrhnje i kombinacija dva ili više prethodno navedenih proizvoda sa dodacima ili bez). Karakterizira ga glatka, viskozna struktura i delikatan orašast okus. Inkubacija se odvija na 42–45°C dok se ne dostigne titracijska kiselost od 0,9–1,2% (pH oko 4,5). Prepoznatljiv okus jogurta se postiže uzajamnim odnosom štapića i koka, a zavisi i od temperature fermentacije i proizvodnji kiseline. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* proizvodi aminokiseline i peptide koji su neophodni za rast *Streptococcus thermophilus*, dok folate proizvodi *Sc. thermophilus* i tako podržava rast *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Hlapljive aromatske komponente uključuju male količine octene kiseline, diacetila i acetaldehida koje proizvodi *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Jogurt i proizvodi tipa jogurta proizvode se širom Mediterana, Azije, Afrike i srednje Europe. "Zabady" ili egipatski jogurt se tradicionalno proizvodi od ovčjeg mlijeka. Mlijeko bizona se često koristi u proizvodnji ovih proizvoda, pretežno u kombinaciji sa kravljim mlijekom.

##### 2.3.2.2. Probiotički fermentirani mliječni proizvodi

Inkorporiranjem probiotičkih mikroorganizama u startere za fermentaciju ili u već fermentirano mlijeko, stvorena je nova vrsta proizvoda koji pokazuju brojna profilaktička i/ili tarapeutska svojstva (Milanović, 1997). Probiotici su živi mikroorganizmi izolirani iz

humanog intestinalnog trakta koji kada se unesu u ljudski organizam putem fermentiranog mliječnog proizvoda u adekvatnom broju, doprinose zdravlju istog (FAO/WHO, 2002). Kriterije izbora probiotičkih mikroorganizama za komercijalnu proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda detaljno su opisali Marshal i Tamime (1997), a neki od aspekata su primjerice otpornost na želučanu kiselinu i proteolitičke enzime; stabilnost na brzu promjenu pH vrijednosti tijekom proizvodnje i tijekom perioda skladištenja; otpornost prema žučnim kiselinama te da ne utječu negativno na okus i teksturu proizvoda. S obzirom da potječu iz humanog probavnog trakta, probiotičkim bakterijama mlijeko često nije pogodan supstrat za rast, pa su brzina rasta i proizvodnja kiseline veoma spore te se javlja nepoželjan okus, kao na primjer pri proizvodnji velike količine octene kiseline (Mattila–Sandholm i sur., 2002). Da bi se to izbjeglo, probiotičke bakterije u komercijalnoj upotrebi često se kombiniraju sa tradicionalnim kulturama kao što je jogurtna ili kulturama za proizvodnju sireva (Van de Castele i sur., 2006). Zdravstveni značaj probiotičkih mikroorganizama se prema literaturnim podacima ogleda u (Tamime, Robinson, 2004; Tamime, 2006):

- aktivnom djelovanju protiv *Helicobacter pylori* i povećanju probavljivosti laktoze;
- stimulaciji probavnog imuniteta i crijevne peristaltike;
- poboljšanju ravnoteže između mikrobne populacije;
- smanjenju fekalne enzimske aktivnosti i mogućnosti rasta *Salmonella* spp.;
- prevenciji/tretmanu akutnih, virusnih dijareja, kao i dijareja uzrokovanih antibioticima;
- poboljšanju imuniteta prema različitim bolestima;
- smanjenju povišenog tlaka;
- stabilnosti intestinalne mikroflore;
- sniženju sadržaja kolesterola.

Važno je napomenuti da samo svakodnevno konzumiranje može imati utjecaja na sastav crijevne flore jer životni vijek stanica iznosi oko 7 dana nakon kolonizacije (Obradović i sur., 2001).

Najčešće korišteni probiotici su različiti sojevi rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. *Saccharomyces boulardii* je jedina vrsta kvasaca za koju je dokazano da posjeduje svojstva probiotika. Temperaturni optimum za rast i metaboličke aktivnosti mu je 37°C. Pokazalo se da djeluje inhibitorno na brojne patogene mikroorganizme. Navedena vrsta nađena je u kulturama *kombuche* i kefira, pa su napravljeni prvi pokušaji u pogledu primjene ove vrste u

proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka u zajednici sa bakterijama mliječne kiseline. Iako nema mogućnost iskorištavanja laktoze, *Saccharomyces boulardii* koristi prisutne organske kiseline, galaktozu i glukozu nastalu tijekom metabolizma bakterija mliječne kiseline. Glavni problem za daljnju primjenu ove vrste predstavlja pojava CO<sub>2</sub> i alkohola, ali istraživanja treba nastaviti jer se potencijalno mogu dobiti proizvodi sa visokom nutritivnom vrijednošću (Obradović i sur., 2009). Da bi se stimulirao rast i metabolička aktivnost probiotičkih bakterija, fermentiranim mliječnim proizvodima se dodaju prebiotici. Danas, koncept prebiotika podrazumijeva neprobavljive sastojke hrane koji stimuliraju crijevnu mikrofloru (Aryana i sur., 2007). Prema Tamime (2005) prebiotici su općenito oligosaharidi, polimeri sa dva do dvadeset monomera, koji povoljno djeluju na rast i/ili aktivnost jedne ili više bakterijskih vrsta i time stimuliraju humani imunološki sustav da se bori protiv patogenih organizama. U najznačajnije prebiotike ubrajaju se: laktuloza, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, ostali neprobavljivi oligosaharidi i neprobavljivi škrob (Gregurek, 2001; Obradović i sur., 2001). Nedavna istraživanja pokazala su da obogaćivanje obranog mlijeka inulinom, čak i u malim koncentracijama, značajno poboljšava rast i razvoj *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium lactis* u nemasnom fermentiranom mlijeku (Oliveira i sur., 2011). Na ovaj način, inulin može zamijeniti mast u nemasnom funkcionalnom mliječnom proizvodu, dajući mu gotovo identične senzorske karakteristike (Akın i sur., 2007; Cruz i sur., 2010).

### 2.3.2.3. Acidofilno mlijeko

Acidofilno mlijeko je proizvod blagog okusa, tekuće konzistencije i kiselosti 44-46 °SH, maksimalno 55°SH (Šipka, 1972). Fermentacija se odvija djelovanjem kulture *Lactobacillus acidophilus*. S obzirom da ovaj mikroorganizam raste sporo i razgrađuje laktozu, a pri tome je osjetljiv na prisustvo drugih mikroorganizama, vrši se sterilizacija mlijeka (ili visoka pasterizacija). Fermentacija se odvija na 37°C uz dodatak 2–5% kulture i proces traje 8–10h do postizanja pH 4,5. Proizvod se zatim bez miješanja puni u ambalažu i čuva na 4–5°C. Tijekom skladištenja kiselost proizvoda ne raste, jer se *Lactobacillus acidophilus* ne razvija na temperaturama nižim od 5°C. U nekim zemljama, liječnici preporučuju acidofilno mlijeko pacijentima sa različitim poremećajima gastrointestinalnog trakta koji uključuju konstipaciju, neulcerativni kolitis i dijareju.

### 2.3.3. Fermentacija kvascima i bakterijama mliječne kiseline

#### 2.3.3.1. Kefir

Kefir je porijeklom sa Kavkaza. Ovaj pjenušavi napitak specifičnog okusa sadrži 0,9–1,1% mliječne kiseline i 0,3–1% alkohola i jako je popularan u istočnoj Europi dok je njegova potrošnja u drugim dijelovima svijeta ograničena zbog problema sa pakiranjem i distribucijom (ukoliko nije omogućena niska temperatura, kvasci prisutni u kefiru će nastaviti proizvoditi alkohol i ugljikov dioksid tijekom skladištenja). Kefir se uobičajeno proizvodi od punomasnog mlijeka koje se podvrgava termičkom tretmanu na 95°C u trajanju od 5 min kako bi se izvršila denaturacija proteina sirutke i time poboljšala viskoznost gotovog proizvoda. Tzv. kefirna zrnca, mješavina bakterija (octene i mliječne kiseline) i kvasaca okruženih polisaharidnim matriksom (kefiran), čine inokulum. Starter kultura se priprema iz kefirnih zrnaca. *Lactobacillus kefir*, i vrste rodova *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Acetobacter* rastu u snažnoj međusobnoj povezanosti. Kefirna zrnca sadrže i kvasce (*Kluyveromyces marxianus*) koji fermentiraju i koji ne fermentiraju laktozu (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*) (Tamime, 2006). Kefir se može smatrati izvorom probiotika jer, pored dobrog nutritivnog sastava povoljno utječe na čitav niz zdravstvenih stanja. Postoje brojne studije koje ispituju imunomodulatorni i digestivni učinak uzrokovan konzumiranjem kefira (Schneedorf i Anfiteatro, 2004). Digestivne učinke kefira istraživali su Cardoso i sur. (2003) koji su dokazali poboljšanje peristaltičke aktivnosti intestinalnog trakta štakora koji su tretirani šećernim kefirom 15 dana. Liu i sur. (2005) su pokazali da kefir (dobiven iz mlijeka) posjeduje značajnu količinu DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala koji nam pokazuje antiksidativnu aktivnost. Kefir također, pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv širokog spektra bakterija i gljivica. Patogena barijera stvorena od strane kefira potvrđena je u više studija na pilićima i ljudima, uključujući rezistentnost na enterohemoragičnu *Escherichia coli* (Ota, 1999), *Helicobacter pylori* (Bohmler, 1996) i *Staphylococcus aureus* (Rodrigues i sur., 2005). Stimulacija imunološkog sustava konzumiranjem kefira i izolacija sfingomijelina iz njegovih lipida također je demonstrirana (Osada, 1993).

#### 2.3.3.2. Kumis

Kumis je sličan kefiru jer se pri njegovoj proizvodnji pored mliječne odvija i alkoholna fermentacija. Tradicionalno se proizvodi od mlijeka kobile. Ovaj proizvod je rezultat fermentacije mlijeka djelovanjem *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i kvasaca koji fermentiraju laktozu kao npr. *Saccharomyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus*. Ugljikov dioksid je odgovoran za pjenušav izgled proizvoda i doprinosi okusu. Prilikom proizvodnje kumisa povećava se udio dušičnih komponenata, u prvom redu slobodnih esencijalnih

aminokiselina, što doprinosi nutritivnoj vrijednosti gotovog proizvoda. Mikroflora starter kulture kumisa pokazuje baktericidno i bakteriostatsko djelovanje protiv mnogih patogena, kao što su *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* i *Mycobacterium* spp. (Tamime, 2006).

#### 2.3.4. Plijesni u mliječno kiseloj fermentaciji

##### 2.3.4.1. "Viili"

Općenito, fermentirani mliječni proizvodi se ne proizvode djelovanjem plijesni kao komponentom starter kulture. Izuzetak je finski proizvod "viili". Starter kultura za njegovu proizvodnju uključuje citrat pozitivne bakterije *Lc. lactis* i *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, zajedno sa plijesni *Geotrichum candidum*. Karakteristična rastezljiva struktura ovog proizvoda rezultat je formiranja kapsula od strane laktokoka.

## 2.4. KOMBUCHA

### 2.4.1. Mikrobiološki sastav

Do sada se smatralo da *kombucha* predstavlja simbiotsku zajednicu bakterija octene kiseline (BOK) i autohtonih vrsta kvasaca. Samo nekoliko rodova BOK izolirano je iz *kombuche* i to najčešće *Acetobacter* (Chen i Liu, 2000; Dutta i Gachhui, 2006; Zhang i sur., 2011; El-Salam, 2012), te vrste *Gluconacetobacter* i *Lactobacillus* (Wu i sur., 2004; Yang i sur., 2010; Trovatti i sur., 2011; Zhang i sur., 2011). Najbolje proučena vrsta je *Komagataeibacter xylinus*, koji je ujedno i najefikasniji proizvođač bakterijske celuloze koja se u vidu pelikule formira na površini tekućine za kultivaciju *kombuche* (Strap i sur., 2011). *Komagataeibacter xylinus* je nedavno reklasificiran iz *Gluconacetobacter xylinus* (Yamada i sur., 2012), također, ranije poznat kao *Acetobacter xylinum* (Yamada i sur., 1997). Mikroskopskom analizom celulozne pelikule utvrđeno je da se na njenoj površini nalazi veliki broj štapićastih bakterija koje kao striktni aerobi zauzimaju položaj prema atmosferskom kisiku, dok se s donje strane pelikule mogu vidjeti nakupine stanica kvasaca, fakultativno anaerobnih mikroorganizama (Greenwalt i sur., 2000). Populacija kvasaca u *kombuchi* je raznovrsnija (Teoh i sur., 2004). Identificirane su vrste rodova *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces* and *Saccharomycoides* (Chen i Liu, 2000; Markov i sur., 2001; Teoh i sur., 2004). Uloga kvasaca je da pretvaraju saharozu u organske kiseline, ugljikov dioksid i etanol, koje će zatim upotrijebiti BOK za proizvodnju acetaldehida i octene kiseline. BOK također koriste glukozu (stanice kvasaca fermentativno metaboliziraju glukozu i fruktozu) za sintezu celuloze i glukonske kiseline (Greenwalt i sur.,

1998; Dufresne i Farnworth, 2000). Ukupan broj bakterija i kvasaca dostiže  $10^4$ – $10^6$  CFU/mL u *kombuchi* nakon otprilike deset dana fermentacije. Broj kvasaca blago nadmašuje broj bakterija (Chen i Liu, 2000; Teoh i sur., 2004; Goh i sur., 2012). Utvrđeno je da broj mikroorganizama polako opada tijekom procesa fermentacije zbog nedostatka kisika i ekstremno kiselih (pH 2,5) uvjeta sredine (Chen i Liu, 2000). U radu Radulović i sur. (2010) utvrđeno je prisustvo laktobacila ( $3,8 \times 10^3$  CFU/mL) i laktokoka ( $7 \times 10^3$  CFU/mL) u inokulumu *kombuche*. Najnovija istraživanja potvrđuju prisustvo bakterija mliječne kiseline, roda *Lactobacillus* u mikrobnim populacijama *kombuche* (Marsh i sur., 2014). Marsh i suradnici (2014) su utvrdili u analiziranim uzorcima *kombucha* napitka da je dominantan rod bakterija *Gluconacetobacter* (>85%) sa tragovima populacije *Acetobacter* (<2%). Što se populacije kvasaca tiče, spomenuti autori su ustanovili da je rod *Zygosaccharomyces* dominantan (>95%).

#### 2.4.2. Primjena *kombuche* u proizvodnji napitaka

Metaboličkom aktivnošću *kombuche* na različitim supstratima (Reiss, 1994; Malbaša i sur., 2008a; 2008b) naročito na crnom čaju zaslađenom saharozom dobiva se blago gazirani, blago kiseli i blago karbonizirani napitak, nutritivno jako vrijedan (Greenwalt i sur., 2000; Iličić, 2010). Postoji mogućnost kultivacije *kombuche* i na supstratima kao što su: coca–cola, pivo, vino, razni aromatični napici, ekstrakti biljnih mješavina, ekstrakt topinambura, melasa, mlijeko, sirutka i dr. (Malbaša, 2000; Belloso–Morales i Hernandez–Sanches, 2003; Malbaša i sur., 2008a; 2008b; 2009a; 2012). *Kombucha* se kultivira u aerobnim uvjetima na temperaturi od 25–30°C u posudi od stakla ili porculana sa širokim otvorom, kako bi se omogućilo dovoljno kisika iz zraka. Kvalitativni i kvantitativni sastav napitka od *kombuche* varira u ovisnosti o porijeklu *kombuche*, klimatskim faktorima, kao i o prisutnim sojevima kvasaca i bakterija. Glavni metaboliti identificirani u napitku od *kombuche* su:

- šećeri (saharoza, glukoza, fruktoza),
- kiseline (glukonska, glukuronska, mliječna, vinska, jabučna, limunska, oksalna, malonska, octena),
- vitamini (C, B1, B2, B3, B6, B12),
- enzimi (invertaza, amilaza, katalaza, citokrom oksidaza),
- alkoholi (etanol),
- ioni esencijalnih elemenata ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ).

Osim nabrojanih, utvrđeno je i prisustvo 14 aminokiselina, biogenih amina, vitamina E u tragovima, kofeina, antibiotski aktivnih spojeva, fenolnih kao i drugih spojeva (Malbaša, 2009). Od fenolnih spojeva najzastupljeniji su flavonoidi, posebno epigalokatehin galat (EGCG), epigalokatehin (EGC), epikatehin galat (ECG) i epikatehin (EC) (Friedman i sur., 2005). Sadržaj i sastav fenolne frakcije u *kombucha* napitku značajno varira u ovisnosti od vrste čaja i postupka njegove prerade. Kallel i sur. (2012) pratili su razgradnju saharoze tijekom fermentacije *kombuche* na crnom i zelenom čaju tijekom 15 dana. Sadržaj saharoze kontinuirano se smanjivao tijekom dva tjedna fermentacije i brzina nestajanja saharoze bila je niža u zelenom čaju u usporedbi sa crnim što je u skladu sa istraživanjima drugih autora (Chen i Liu, 2000). Mikroflora *kombuche* preferira glukozu kao izvor ugljika, osim ako se u fermentacijskom mediju ne dogodi substitucijska izomerizacija glukoze u fruktozu (Seto i sur., 1997). Tijekom fermentacije pH vrijednost napitka opada, a najznačajnije su promjene izražene do trećeg dana fermentacije. Nakon toga, do kraja fermentacije, ukupna promjena pH vrijednosti je za 0,46 pH jedinica, što ukazuje na to da ugljikov (IV) oksid koji se stvara tijekom fermentacije može imati puferski učinak (Kallel i sur., 2012). U radu Jayabalan i sur. (2007) koncentracija octene kiseline bila je viša u zelenom čaju fermentiranim *kombuchom* nego u crnom (9,5 i 6,2 g/L, respektivno, 15. dana fermentacije). Sadržaj octene kiseline varira od 5 do 10 g/L u fermentacijskim tekućinama (zeleni ili crni čaj fermentiran *kombuchom*) i ovisi o sastavu i/ili aktivnosti prisutnih bakterija octene kiseline. Koncentracija etanola (u granicama između 1,7 i 5,5 g/L (Chen i Liu, 2000)) naglo raste nakon trećeg dana u fermentiranim napitcima, ranije i brže u crnom čaju u usporedbi s zelenim, kao posljedica intenzivnog metabolizma kvasaca.

Mnoga istraživanja su proučavala fenolne frakcije *kombucha* napitaka iz zelenog i crnog čaja. Nisu utvrđene značajnije razlike u sadržaju ukupnih fenola i detektiranih monomera na kraju fermentacijskog perioda između crnog i zelenog čaja (Jayabalan i sur., 2008; Kallel i sur., 2012). Nasuprot tome, sadržaj teaflavina umjereno raste, a tearubigina izrazito opada tijekom fermentacije *kombuche* (Jayabalan i sur., 2007; Kallel i sur., 2012). Malbaša (2004) je objavio prve rezultate istraživanja antioksidativne aktivnosti *kombucha* napitka praćenjem sposobnosti transformacije i stabilizacije slobodnih radikala. Uzroci antioksidativne aktivnosti *kombucha* napitka mogu biti dvojaki. Jedan od uzroka je utjecaj flavonoidnih antioksidanata, koji potječu iz crnog i zelenog čaja, u prvom redu polifenolnih komponenata (EGCG, EGC, ECG, EC, TFs i TRs). Drugi uzrok antioksidativne aktivnosti *kombucha* napitka je nastanak metabolita, koji imaju svojstva antioksidansa, prvenstveno vitamina C, vitamina B grupe



(naročito B2 i B6), zatim purina i pirimidina, katalaze i nekih organskih kiselina itd. Jayabalan i sur. (2008) također su utvrdili visoku antioksidativnu aktivnost *kombucha* napitka na hidroksi (OH) i 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalima kao i djelovanje na superoksid radikal i utjecaj na anti-lipidnu peroksidaciju. Malbaša i sur. (2011) objavili su rezultate istraživanja utjecaja starter kulture *kombuche* na antioksidativnu aktivnost tradicionalnog *kombucha* napitka na hidroksi i DPPH radikale. Vitas i sur. (2013) ispitivali su antioksidativnu aktivnost fermentiranih mliječnih proizvoda dobivenih pomoću *kombuche* kultivirane na čaju od koprive i na čaju vrijeska. Ustanovljen je sinergistički učinak mliječne masti i temperature fermentacije na antioksidativnu aktivnost prema hidroksi radikalima za oba tipa dobivenih fermentiranih mliječnih proizvoda. U radu Hrnjez i sur. (2014) analiziran je antioksidativni kapacitet, aktivnost inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE) i stupanj proteolize fermentiranih mliječnih proizvoda dobivenih pomoću *kombuche* i uspoređen je sa fermentiranim mliječnim proizvodima dobivenim primjenom probiotičke i jogurtne starter kulture. Fermentirani mliječni proizvodi dobiveni primjenom *kombuche* imali su najvišu ACE aktivnost (63,43%) na kraju perioda skladištenja od 14 dana u usporedbi sa fermentiranim mliječnim proizvodima dobivenim primjenom probiotičke i jogurtne starter kulture. Antimikrobna aktivnost *kombuche* ispitana je prema velikom broju patogenih mikroorganizama (Sreeramulu i sur., 2000). Utvrđeno je da su: *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* i *Listeria monocytogenes* osjetljivi na *kombuchu*. Prema brojnim radovima, octena kiselina se smatra odgovornom za inhibitorski učinak prema mikroorganizmima (Greenwalt i sur., 1998; Sreeramulu i sur., 2000; Steinkraus i sur., 1996). Međutim, Sreeramulu i sur. (2000; 2001) su utvrdili da *kombucha* ima antimikrobni učinak prema *E. coli*, *S. sonnei*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, i *C. jejuni* čak i pri neutralnoj pH vrijednosti i nakon termičke denaturacije *kombuche*. Ovo ukazuje na prisustvo i drugih antimikrobnih komponenti u *kombucha* napitku osim octene kiseline i proteina velike molekulske mase. Battikh i sur. (2012) ispitivali su i usporedili antibakterijsku i antifungalnu aktivnost *kombuche* fermentirane na crnom čaju prema Gram (+) i Gram (-) patogenim bakterijama i *Candida* kvascima koristeći difuzijsku agar metodu sa *kombucha* analogima proizvedenim fermentacijom *kombuche* na biljnim ekstraktima: *Thymus vulgaris* L., *Lippia citriodora*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare* i *Mentha piperita*. Utvrđeno je snažno antifungalno djelovanje *kombucha* analoga, naročito onih proizvedenih fermentacijom na *L. citriodora* i *F. vulgare*, kao i antibakterijsko

djelovanje prema nekim patogenim bakterijama. Sinergija antimikrobnih komponenata i niske pH vrijednosti (zahvaljujući produkciji organskih kiselina) vjerojatno pojačava inhibitorni učinak *kombucha* napitka.

## 2.5. REOLOGIJA

Reologija je znanstvena disciplina koja se bavi tečenjem i deformacijom kako krutih (čvrstih), tako i tekućih materijala. Kod prehrambenih proizvoda, osim pri određivanju procesnih uvjeta, reologija se koristi i za definiranje parametara kakvoće. Osim kemijskog sastava, na stanje nekog reološkog sustava utječu još neki čimbenici, kao što su: temperatura, udio suhe tvari, pH, brzina smicanja, vrijeme smicanja, uvjeti pripreme i držanja materijala, kao i primijenjena metoda određivanja reoloških značajki. Viskoznost se može jednostavno definirati kao unutrašnje trenje koje djeluje unutar fluida (tekućine), tj. kao otpor tečenju. Odnos smičnog naprezanja i brzine smicanja, prikazan grafički, predstavlja pravac koji prolazi kroz ishodište. Prema tome Newtonski sustavi (fluidi, tekućine) su oni kod kojih postoji linearni odnos između smičnog naprezanja i brzine smicanja, pri čemu se konstanta proporcionalnosti naziva koeficijent viskoznosti ili jednostavno viskoznost. Međutim, mnogi prehrambeni proizvodi odstupaju svojim reološkim značajkama od zakonitosti opisanih Newtonovim izrazom. Takve nazivamo neNewtonovskim tekućinama (fluidima). Svojstva ne-Newtonovskih tekućina mogu se svrstati u dvije skupine, zavisno o tome da li se s vremenom smicanja ta svojstva mijenjaju ili ne, na vremenski zavisne i nezavisne sustave. Sustavi (fluidi) čija svojstva ne ovise o vremenu smicanja su sustavi kod kojih je brzina smicanja ovisna samo o lokalnom smičnom naprezanju. U ovu skupinu spadaju ovi sustavi (tekućine): pseudoplastični sustavi (smično naprezanje mnogo brže raste pri nižim brzinama smicanja nego pri višim), dilatantni sustavi (pri povećanju brzine smicanja naglo raste smično naprezanje) i binghamski plastični sustavi (kretanje (tečenje) počinje tek kada je postignut određeni prag naprezanja  $\tau_0$ ) (Viswanth i sur., 2007). Sustavi (fluidi) čija svojstva ovise o vremenu smicanja su sustavi kod kojih smično naprezanje ne ovisi samo o brzini smicanja nego i o vremenu. U tu skupinu spadaju ovi sustavi: tiksotropni sustavi (unutarnji otpor ovisi o primijenjenom naprezanju, trajanju naprezanja i prethodnim deformacijama, pri čemu dolazi do narušavanja strukture, a viskoznost se smanjuje s trajanjem naprezanja. Kada prestane djelovanje naprezanja, dolazi do ponovnog uspostavljanja početne strukture i porasta viskoznosti), reopektički sustavi (pokazuju suprotno ponašanje od tiksotropnih, tj. s vremenom naprezanja povećava se konzistencija) i viskoelastični sustavi (pri primjeni (smičnog) naprezanja ovi sustavi pokazuju i elastično i plastično ponašanje. Međutim, od

plastičnih fluida se razlikuju u tome, što se oba navedena svojstva javljaju istovremeno, s time, da nakon prestanka naprezanja, smicanje u materijalu u potpunosti ne prestaje) (Viswanth i sur., 2007).

### 3 EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1 Mlijeko za fermentaciju

Za sve pokuse korišteno je UHT mlijeko, marke Pulos s 2,8 % m.m. Mlijeko je prije samog postupka inokulacije bilo termostatirano na temperaturu od 40 °C. Za svaki pokus korišten je jednak volumen mlijeka od 250 mL. U tablici 2 prikazan je prosječni sastav mlijeka u 100 mL.

Tablica 2. Prosječan sastav mlijeka u 100 mL prema deklaraciji

Energetska vrijednost	238 kJ (57 kcal)
Proteini	3,2 g
Ugljikohidrati	4,7 g
Masti	2,8 g

##### 3.1.2 Kultura za fermentaciju

Za fermentaciju je korištena kultura *kombuche* koja je uzgajana na crnom čaju. Svakih tjedan dana kultura *kombuche* je precijepljivana na svježi crni čaj te je taj inokulum korišten za naciepljivanje na mlijeko u različitim koncentracijama (5%, 10% i 15%). Precijepljivanje na svježi čaj se izvodi tako da se prvo skuha čaj na način da se u litru crnog čaja doda 70 g rafiniranog šećera (saharoza). Kada se čaj ohladi na 25-27°C dodaje se 10% inokuluma kombuche (100 mL na 1 L čaja) i ostavi se u termostatu ( $29\pm 1^\circ\text{C}$ ) tjedan dana do ponovnog precijepljivanja.

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1 Postupak fermentacije

Fermentacija je započela termostatiranjem mlijeka na 40°C. Zatim se pripremio inokulum procijeđivanjem crnog čaja na kojem je uzgajana *kombucha* tjedan dana. Ukupno je korišteno 3 litre mlijeka za jedan pokus koje se razdijelilo u 12 čaša od 250 mL. Za svaku temperaturu fermentacije i za svaku koncentraciju inokuluma korištene su 2 paralele (jedna u kojoj se mjerio pH, a druga za analize). Proces pripreme za fermentaciju provodio se u sterilnim uvjetima. Nacijepljena su tri uzorka mlijeka sa 5%, 10% i 15% inokuluma te stavljena u termostat na temperaturu od 40 i 43°C. Svakih nekoliko sati mjerila se pH vrijednost, a kada se ista spustila ispod 4,6 naglim je hlađenjem ispod mlaza hladne vode zaustavljena fermentacija. Na uzorcima su provedene analize određivanja kiselosti po Soxhlet-Henkelu, određivanje suhe tvari, sinereza te su određivana reološka svojstva i provedeno je senzorsko ocjenjivanje uzoraka. Fermentacija i analize su ponavljane tri puta u razmacima od tjedan dana.

### 3.2.2 Određivanje kiselosti

Osim aktivne kiselosti koja je služila kao pokazatelj završetka fermentacije (pH 4,6) i koja je određena potenciometrijski pomoću pH-metra (Multi 340i, WTW, Wellheim, Germany), kiselost se određivala i titracijski (°SH) metodom prema Soxhlet-Henkel-u.

#### 3.2.2.1. *Određivanje kiselosti fermentiranog mlijeka pH metrom* (Božanić i sur., 2010)

##### Postupak:

pH se mjerio uranjanjem elektrode u uzorak fermentiranog mlijeka u određenim vremenskim intervalima. Kada se ustabilila, vrijednost pH je očitana na pH-metru. Elektroda se između dva mjerenja isprala destiliranom vodom i posušila staničevinom. pH vrijednost je mjerena kako bi pratili tijek fermentacije, a kada je pH pao ispod 4,6 fermentacija je zaustavljena hlađenjem ispod mlaza hladne vode.

### 3.2.2.2. Određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henklu (Božanić i sur., 2010)

Metoda po Soxhlet-Henklu je u Republici Hrvatskoj službena (referentna) titracijska metoda za određivanje stupnja kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda. Titracijska kiselost predstavlja broj mL 0,1 M NaOH koji se utroši za neutralizaciju 100 mL uzorka uz indikator fenolftalein.

#### Postupak:

Prvo se pripremi standardna boja koja služi kao orijentacija za boju do koje je potrebno titrirati fermentirano mlijeko sa NaOH. Ta standardna boja je dobivena miješanjem 20 mL uzorka i 1 mL 5%-tne otopine kobaltovog sulfata. Zatim su svi ostali uzorci pripremljeni tako da je u 20 mL uzorka dodano je 1 mL 2%-tne alkoholne otopine fenolftaleina. Smjesa je nakon toga promiješana i titrirana s 0,1 mL NaOH do postizanja boje koja je kao standardna boja i koja je kao takva bila stabilna 2 minute (blijedo ružičasta).

#### Izračun:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 2 \times f$$

gdje je:

a= mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 20 mL mlijeka

f= faktor otopine natrijeve lužine (NaOH)=0,1 mol/L=1

### 3.2.3. Određivanje sinereze mlijeka fermentiranog *kombuchom*

Sinereza predstavlja izdvajanje sirutke na površinu proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012).

#### Aparatura i pribor:

- 1) žlica
- 2) digitalna vaga (KERNKB, Balingen, Njemačka)
- 3) filter papir
- 4) lijevak
- 5) menzura od 25 mL

Postupak:

30 g fermentiranog mlijeka, odvađanog na filter papiru, zajedno s lijevkom, postavljeno je na grlo menzure volumena od 25 mL. Potom je sve skupa stavljeno u hladnjak na stajanje, pri temperaturi od +4°C, tijekom pet sati, nakon čega je zabilježen volumen sirutke koja se skupila u menzuri (Riener i sur., 2010).

3.2.4. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku fermentiranog *kombuchom*

3.2.4.1 *Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari (sušenje u sušioniku)* (Božanić i sur., 2010)

Udio ukupne suhe tvari određen je direktnom metodom sušenjem u sušioniku pri 105°C do konstantne mase. Ta metoda je referentna metoda za određivanje udjela ukupne suhe tvari u uzorcima, a udio suhe tvari je izračunat prema slijedećem izrazu:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari}$$

Postupak:

U aluminijske posudice prvo se stavlja žličica pijeska te se takve stavljaju sušiti u sušionik na 2 sata. Nakon toga se vade u eksikator i puštaju oko sat vremena da se dobro ohlade. Nakon hlađenja se važu te to predstavlja odvagiu prazne posudice. Zatim se u takve posudice odvaže 5 g fermentiranog uzorka i vraća na sušenje na 2 sata, nakon čega se vadi u eksikator, pušta da se ohladi, važe se uzorak s posudicom te se takav postupak ponavlja dok se masa uzorka ne ustabili.

3.2.5 Određivanje reoloških svojstava mlijeka fermentiranog *kombuchom*

Mjerenja reoloških svojstava provedena su na rotacionom reometru Rheometric Scientific RM-180, Rheometric, Inc., Piscataway, SAD uz pomoć mjernog sistema koji se sastoji od cilindričnog vretena (br.1;  $\phi$  30 mm; l=45 mm) i vanjskog plašta (br.1;  $\phi$  32,54 mm) u koji se stavlja uzorak od 32 mL.

Aparatura i pribor:

- 1) menzura
- 2) rotacioni reometar (Rheometric Scientific RM-180, Rheometric, Inc., Piscataway, SAD)

Postupak:

Cilindrično vreteno pričvršćeno je za tijelo uređaja zajedno s vanjskim plaštem u kojem se nalazio uzorak, čime se omogućilo da tijekom rotiranja konstatnom brzinom vreteno biva uronjeno u uzorak. Za mjerenje obrtnog momenta koji se javlja na rotirajućem vretenu korišteno je relativno obrtanje mjerne osovine u odnosu na pogonsku osovinu. Potenciometar uređaja, koji je vezan na dinamometar, prima podatke o relativnom obrtanju, pri čemu se obrtni moment pretvara u električni signal, koji se na kraju prevodi u digitalnu vrijednost koja se očitavala na zaslonu uređaja. Smično naprezanje i viskoznost mjereni su na brzinama smicanja u rasponu od 100 m/s do 1290 m/s.

Karakteristike mreže: 100/120 Volt, 50/60 Hz.

### 3.2.6 Senzorska analiza mlijeka fermentiranog *kombuchom*

Postupak:

Senzorsko ocjenjivanje provedeno je nakon svakog pokusa na uzorcima fermentiranog mlijeka. Senzorsku procjenu provelo je 5 senzorskih analitičara pri čemu je ocjenjivano 5 svojstava svakog uzorka (izgled, boja, konzistencija, miris i okus) na obrascu za ocjenjivanje (Prilog 1). Svakom svojstvu dodijeljena je određena ocjena: za izled i boju od 0 do 1, za konzistenciju maksimalna ocjena je 4, za miris 2, a za okus 12. Pri ocjenjivanju pojedini je uzorak mogao postići maksimalno 20 bodova.

#### 4 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je pratiti promjene u uzorcima dobivenim fermentacijom mlijeka pomoću *kombuche* obzirom na različite koncentracije inokuluma te različite temperature provođenja fermentacije.

Provedena su tri uzastopna pokusa u razmacima od tjedan dana, koliko je bilo potrebno za ponovni uzgoj *kombuche* na crnom čaju. Uzorci mlijeka nacijepljivani su s tri (5, 10 i 15%) različite koncentracije inokuluma *kombuche*, a fermentacija se provodila na dvije različite temperature (40 i 43°C). Za sve uzorke je praćeno trajanje fermentacije (tablica 3) odnosno promjena pH vrijednosti (slike 1 i 2). Po završetku fermentacije određivana je titracijska kiselost, vrijednost sinereze, udio suhe tvari (tablice 4 i 5) te reološka svojstva (tablice 6 i 7). Ovisnosti smičnog naprezanja o brzini smicanja prikazani su na slikama 3 i 5, a ovisnost viskoznosti o brzini smicanja na slikama 4 i 6. Provedeno je i senzorsko ocijenjivanje od strane panela (tablice 8 i 9 i slike 7 i 8). Na temelju svih parametara doneseni su zaključci o razlikama između uzoraka fermentiranih različitim koncentracijama inokuluma te na različitim temperaturama.

Svi rezultati su prikazani u obliku tablica i slika kao srednja vrijednost tri uzastupna pokusa sa standardnom devijacijom.

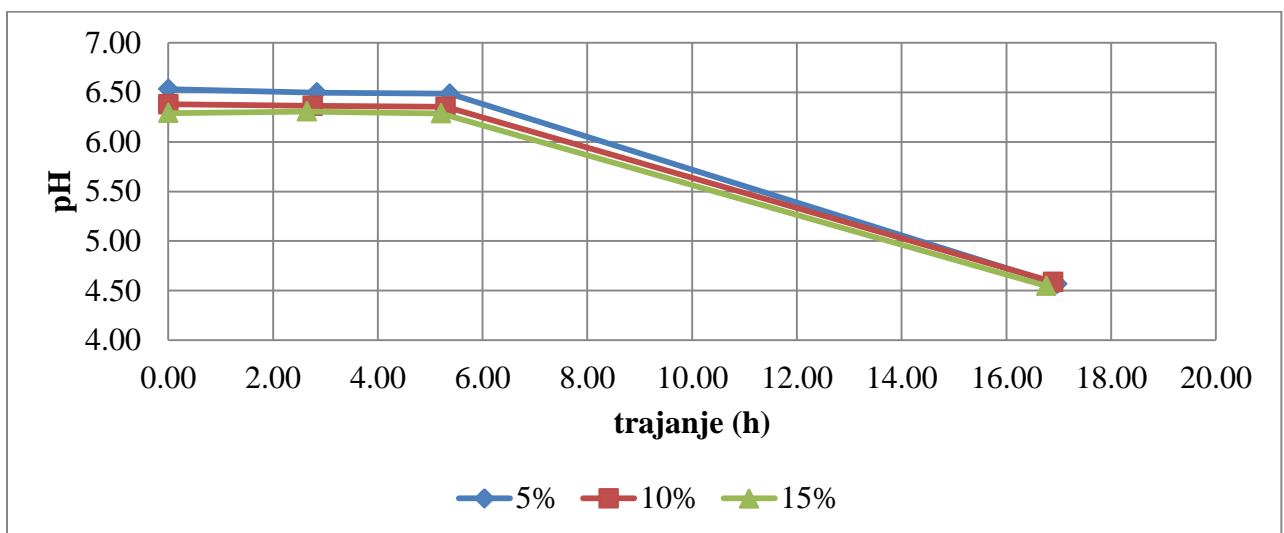


#### 4.1. TIJEK I TRAJANJE FERMENTACIJE

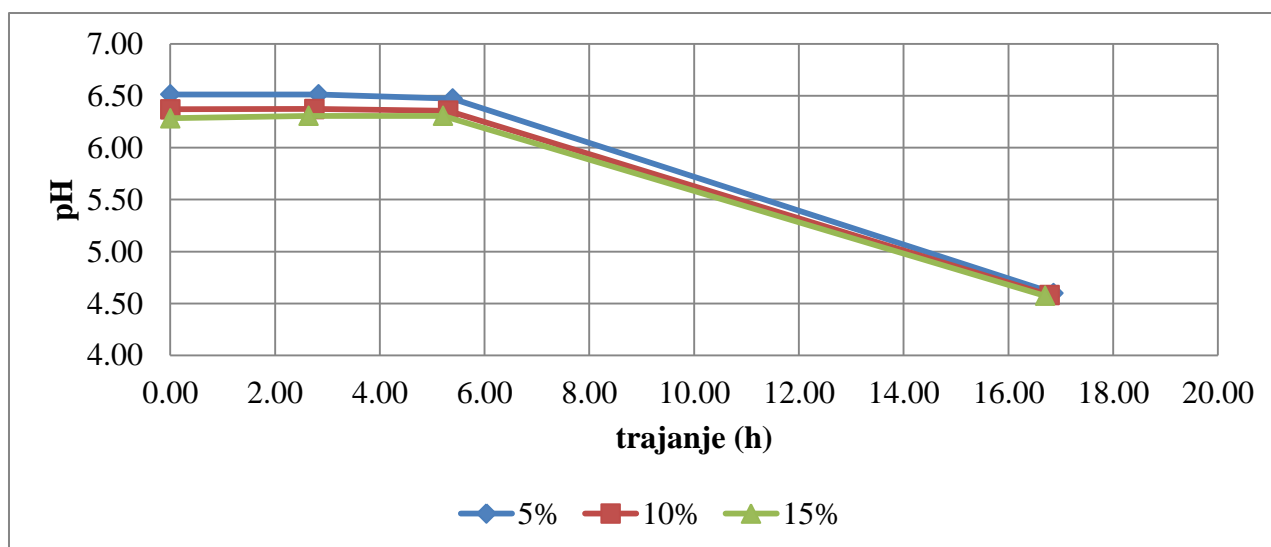
Tijek i trajanje fermentacije pratio se mjerenjem pada pH do vrijednosti od 4,6 (tablica 3, slike 1 i 2).

Tablica 3. Prosječne vrijednosti trajanja fermentacije (h) sa standardnom devijacijom za uzorke s dodatkom inokuluma *kombuche* od 5, 10 i 15% fermentacijom pri 40°C i 43°C

Uzorci	5%	10%	15%
trajanje fermentacije (h) pri 40°C	16,72 (16h i 43 min) $\pm$ 1,31	16,67 (16h i 40 min) $\pm$ 1,32	16,59 (16 h i 35 min) $\pm$ 1,38
trajanje fermentacije (h) pri 43°C	16,65 (16h i 39 min) $\pm$ 1,31	16,61 (16h i 37 min) $\pm$ 1,33	16,55 (16 h i 33 min) $\pm$ 1,36



Slika 1. Ovisnost promjene pH o trajanju fermentacije (h) za prosječne vrijednosti svih pokusa fermentacijom pri 40°C



Slika 2. Ovisnost promjene pH o trajanju fermentacije (h) za prosječne vrijednosti svih pokusa fermentacijom pri 43°C

Iz tablice 3 može se uočiti da fermentacija pri 43°C traje nešto kraće u odnosu na fermentaciju pri 40°C i takvu su zavisnost primijetili Milanović i sur. (2012) koji su vodili fermentaciju na 3 različite temperature (37, 40 i 43°C) i konstatirali da se povećanjem temperature smanjilo vrijeme fermentacije, ali i Kanurić i sur. (2011) te Malbaša i sur. (2009a). Osim toga postoji ovisnost duljine trajanja o koncentraciji inokuluma, pa je dodatkom inokuluma od 15% fermentacija trajala najkraće, dok je za inokulum od 5% trajala najdulje jer se povećanjem koncentracije inokuluma skraćuje vrijeme fermentacije.

Iz slika 1 i 2 vidljivo je da u početku dolazi do slabe, gotovo zanemarive promjene pH, te nakon toga do postupnog smanjenja kiselosti. Slične rezultate sa sigmoidalnom krivuljom promjene pH u ovisnosti o trajanju fermentacije su dobili Malbaša i sur. (2009a; b i 2014) te Milanović i sur. (2012), što se objašnjava korištenjem tradicionalnog inokuluma (iz čaja) pa su se mikroorganizmi morali adaptirati na novi supstrat.

Također, iz slika 1 i 2 može se uočiti da se nešto ranije postiže željeni pH kod najveće koncentracije inokuluma (15%), zatim kod 10 % i na kraju od 5%, što bi značilo da se povećanjem koncentracije inokuluma smanjuje trajanje fermentacije, a što se uočilo iz tablica za srednju vrijednost trajanja fermentacije (tablica 3).

Međutim, generalno gledajući može se reći da istraživana temperatura fermentacije i količina inokuluma zanemarivo utječu na njeno trajanje jer je razlika između najdulje i najkraće fermentacije 10 minuta, a sama fermentacija je trajala oko 17 sati.

## 4.2. UDIO SUHE TVARI, TITRACIJSKA KISELOST I SINEREZA

Dvadeset i četiri sata nakon proizvodnje, uzorcima je određena suha tvar, titracijska kiselost i sinereza (tablica 4 i 5).

Tablica 4. Prosječne vrijednosti sa standardnom devijacijom za udio suhe tvari (%), vrijednosti titracijske kiselost (°SH) i sinereze (mL) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

uzorak	udio suhe tvari (%)	titracijska kiselost (°SH)	sinereza (mL)
5%	11,44±0,19	33,87±2,78	12,67±0,94
10%	11,33±0,27	32,20±1,02	13,67±0,47
15%	11,39±0,17	32,00±1,82	13,67±0,47

Tablica 5. Prosječne vrijednosti sa standardnom devijacijom za udio suhe tvari (%), vrijednosti titracijske kiselosti (°SH) i sinereze (mL) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C

uzorak	udio suhe tvari (%)	titracijska kiselost (°SH)	sinereza (mL)
5%	12,06±0,31	33,33±1,76	13,00±0,82
10%	11,34±0,21	33,60±3,22	13,67±0,47
15%	11,66±0,26	32,93±0,81	13,33±0,47

Udio suhe tvari se određivao sušenjem uzorka pri 105°C do konstantne mase. Iz tablica 4 i 5 vidljivo je da su vrijednosti udjela suhe tvari (%) za uzorke fermentirane na 43°C nešto više, ali ne značajno. Najveće vrijednosti udjela suhe tvari imaju uzorci s dodatkom inokuluma od 5% nakon čega slijedi uzorak s inokulumom od 15 % i na kraju od 10%.

Titracijska kiselost određivana je titracijom uzorka otopinom NaOH, određene molarnosti, uz dodatak indikatora fenolftaleina, a vrijednosti za jogurt, koji je po svojstima najbliži proizvodu s *kombuchom*, kreće se ispod 55 °SH (Božanić i sur., 2010) što odgovara dobivenim vrijednostima za uzorke. Vrijednosti titracijske kiselosti se ne razlikuju mnogo

između dviju fermentacija na različitim temperaturama (tablice 4 i 5), ali je vidljivo da vrijednosti padaju povećanjem inokuluma što su u svom radu pokazali i Iličić i sur. (2012).

Sinereza predstavlja izdvajanje sirutke na površinu proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012). Vrijednosti sinereze nešto su bile niže pri nižoj temperaturi fermentacije (tablice 4 i 5) osim kod uzorka s dodatkom 15% inokuluma. Isto tako vrijednosti sinereze su bile najniže za inokulum od 5%, nakon čega slijedi inokulum od 15% (tablice 4 i 5).

Prema svim dobivenim vrijednostima za kemijske karakteristike koje su određivane može se zaključiti da postoje vrlo mali, gotovo zanemarivi utjecaj temperature fermentacije i koncentracije inokuluma što je dokazano i u radovima Kanurić i sur. (2011) te Milanović i sur. (2012) i Malbaša i sur. (2012a) koji su pokazali da različite temperature fermentacije nisu utjecale značajno na kemijske karakteristike.

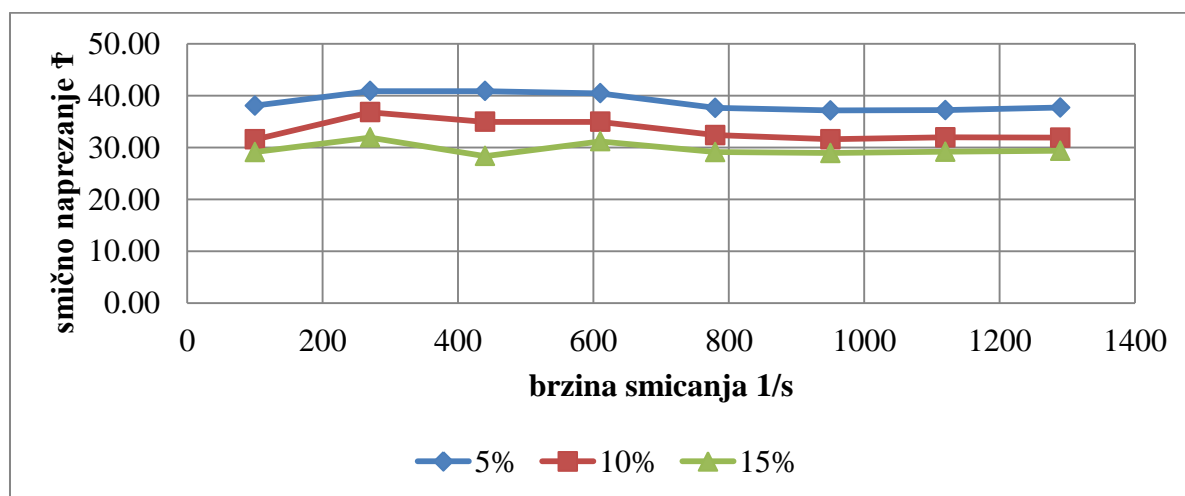
### **4.3. REOLOŠKA SVOJSTVA**

Reologija se bavi proučavanjem deformacija i protjecanja krutih i tekućih tvari podvrgnutih djelovanju sile te definira i opisuje teksturalna svojstva prehrambenih proizvoda (Stijepić i sur., 2011). To je posebice važno kod fermentiranih mliječnih proizvoda, što uključuje složenu analizu većeg broja svojstava, kao što su čvrstoća, stabilnost i viskoznost gela, te intenzitet sinereze. Na vrijednost ovih parametara značajno utječu: sastav mlijeka (Yumah i sur., 2001), struktura proteinskog kompleksa i omjera pojedinih frakcija proteina u mlijeku (Tamime i Marshall, 1997), udio masti i stabilnost emulzije mliječne masti u mlijeku (Tratnik, 1998).

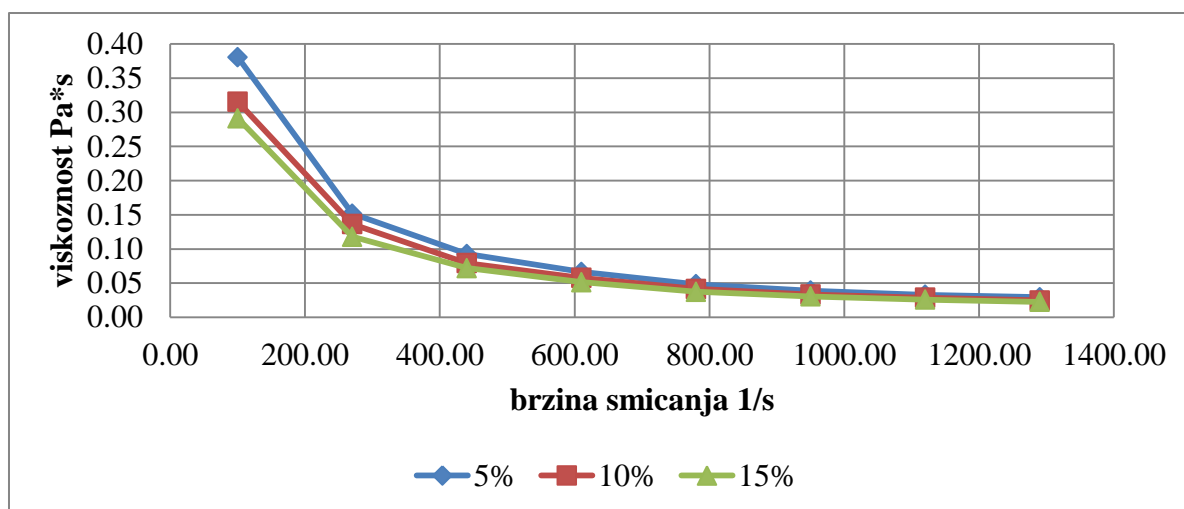
Iz tablice 6 i slike 3 vidljivo je da vrijednosti smičnog naprezanja u ovisnosti o brzini smicanja u početku (pri nižim brzinama smicanja) rastu, a zatim se ponovno vraćaju na početne vrijednosti. Najveće vrijednosti smičnog naprezanja pokazuje uzorak s 5% inokuluma *kombuche*, a najniže vrijednosti uzorak s 15% inokuluma. Vrijednosti viskoznosti padaju sa porastom brzine smicanja (slika 4), te najveću vrijednost viskoznosti pokazuje uzorak s 5% inokuluma s time da su vrijednosti viskoznosti za uzorak s 5 i 10% inokuluma vrlo bliske, a najniže vrijednosti pokazuje uzorak s 15% inokuluma fermentacijom pri 40°C.

Tablica 6. Prosječne vrijednosti za smično naprezanje ( $\tau$ ) i viskoznost ( $\mu$ ) u ovisnosti o brzini smicanja ( $D$ ) sa standardnom devijacijom za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

D (s <sup>-1</sup> )	5%		10%		15%	
	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)
100	38,07±0,82	0,38±0,01	31,57±1,84	0,32±0,02	29,13±5,53	0,29±0,06
270	40,90±0,45	0,15±0,00	36,80±3,96	0,14±0,02	31,93±5,09	0,12±0,02
440	40,90±0,73	0,09±0,00	34,97±1,48	0,08±0,00	28,37±4,06	0,07±0,01
610	40,47±1,41	0,07±0,00	34,97±1,97	0,06±0,00	31,20±4,32	0,05±0,01
780	37,63±1,39	0,05±0,00	32,40±1,72	0,04±0,00	29,13±3,35	0,04±0,00
950	37,17±1,37	0,04±0,00	31,60±1,15	0,03±0,00	28,93±3,21	0,03±0,00
1120	37,20±1,56	0,03±0,00	31,97±1,18	0,03±0,00	29,20±3,20	0,03±0,00
1290	37,70±1,50	0,03±0,00	31,90±0,80	0,03±0,00	29,37±3,04	0,02±0,00



Slika 3. Ovisnost smičnog naprezanja  $\tau$  o brzini smicanja (1/s) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

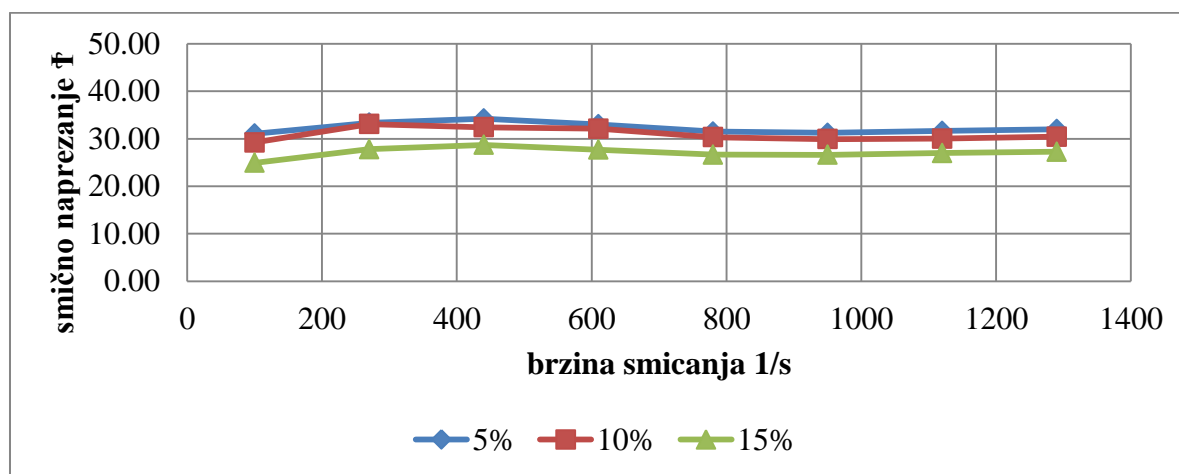


Slika 4. Ovisnost viskoznosti (Pa\*s) o brzini smicanja (1/s) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

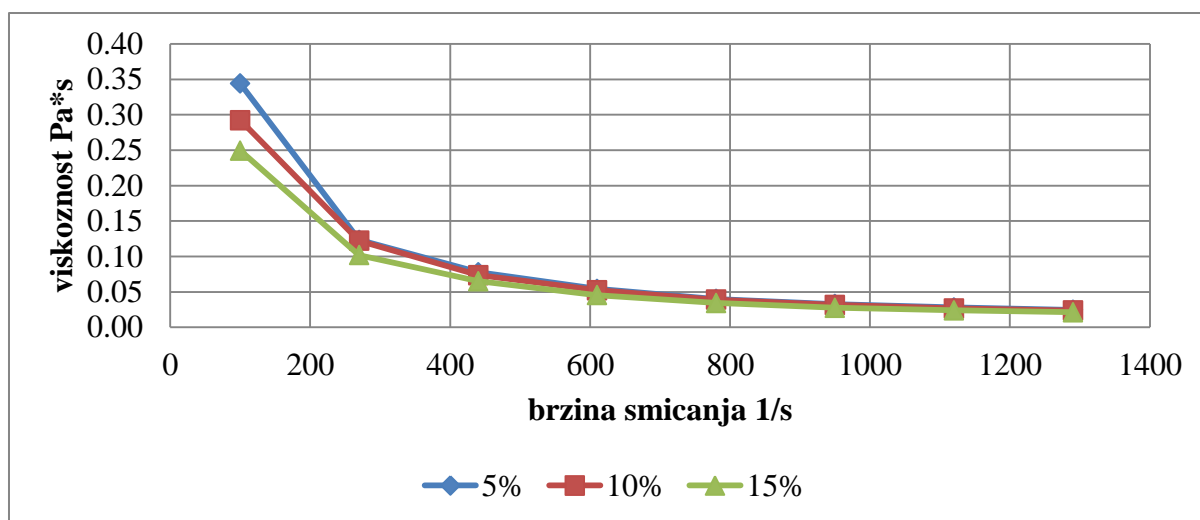
Iz tablice 7 vidljivo je kao i u prethodnoj tablici da vrijednosti smičnog naprezanja pri nižim brzinama smicanja rastu, a zatim se povećanjem brzine vraćaju u početne vrijednosti (slika 5), dok vrijednosti viskoznosti padaju porastom brzine smicanja (slika 6) što se može objasniti promjenama u kazeinskim micelama tijekom fermentacije. Poznato je da se aktivnošću starter kultura stvara mliječna kiselina koja uzrokuje smanjenje površinskog naboja (zeta potencijal) kazeinskih micela iz početnog visokog net negativnog naboja pri pH 6,7 do bez naboja približavanjem izoelektričnoj točki (4,6) kazeina. Ta promjena u površinskom naboju omogućava kazeinskim micelama da se spajaju pomoću hidrofobnih (vodikovih i Van der Waalsovih sila) i elektrostatskih interakcija. Snižavanjem pH smanjujuju se odbojne sile i omogućavaju hidrofobne interakcije uzrokujući koagulaciju kazeinskih micela (Tamime i sur., 2007). Najveće vrijednosti smičnog naprezanja pokazuje uzorak s 5% inokuluma, a najniže vrijednosti uzorak s 15% inokuluma fermentacijom pri 43°C. Vrijednosti viskoznosti su vrlo slične za uzorke s 10 i 15% inokuluma, iako su nešto više za uzorak s 10%, dok najniže vrijednosti viskoznosti pokazuje uzorak s 15% inokuluma fermentacijom pri 43°C.

Tablica 7. Prosječne vrijednosti za smično naprezanje ( $\tau$ ) i viskoznost ( $\mu$ ) u ovisnosti o brzini smicanja ( $D$ ) sa standardnom devijacijom za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C

D (s <sup>-1</sup> )	5%		10%		15%	
	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)	$\tau$ (Pa)	$\eta$ (Pa*s)
100	31,07±3,34	0,34±0,02	29,23±1,60	0,29±0,02	24,93±4,10	0,25±0,04
270	33,37±2,88	0,12±0,01	33,10±3,73	0,12±0,01	27,80±4,17	0,10±0,01
440	34,23±2,50	0,08±0,01	32,43±2,10	0,07±0,00	28,70±4,09	0,07±0,01
610	33,03±2,70	0,05±0,00	32,10±2,50	0,05±0,00	27,70±3,72	0,05±0,01
780	31,50±1,75	0,04±0,00	30,33±1,60	0,04±0,00	26,67±2,96	0,03±0,00
950	31,23±1,55	0,03±0,00	29,93±1,31	0,03±0,00	26,63±2,89	0,03±0,00
1120	31,63±1,61	0,03±0,00	30,03±1,24	0,03±0,00	27,00±2,99	0,02±0,00
1290	32,00±1,42	0,03±0,00	30,43±1,19	0,02±0,00	27,27±2,92	0,02±0,00



Slika 5. Ovisnost smičnog naprezanja  $\tau$  o brzini smicanja (1/s) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C



Slika 6. Ovisnost viskoznosti (Pa\*s) o brzini smicanja (1/s) za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C

Usporedbom tablice 6 i 7 može se uočiti da su dobivene dosta niže vrijednosti za smično naprezanje i viskoznost u ovisnosti o brzini smicanja za uzorke pri fermentaciji na 40°C u odnosu na višu temperaturu fermentacije. Slično su zaključili i Malbaša i sur. (2012a) kako najbolju čvrstoću, konzistenciju i indeks viskoznosti imaju uzorci fermentirani na nižoj temperaturi (fermentacija vođena pri 37, 40 i 43°C). Milanović i sur. (2009) su također pokazali kako veća količina inokuluma utječe na smanjenje čvrstoće uzoraka što je vjerojatno posljedica brže fermentacije.

Karakteristike tečenja fluida uglavnom ovise o viskoznosti. Viskoznost newtonskih fluida konstantna je vrijednost pri određenoj temperaturi i tlaku određen Newtonovim zakonom (Viswanth i sur., 2007). Iz slika 5 i 6 koje prikazuju ovisnost viskoznosti o brzini smicanja, može se zaključiti da su to pseudoplastični sustavi što su i pokazali Vukić i sur. (2014).

#### 4.4. SENZORSKO OCIJENJIVANJE

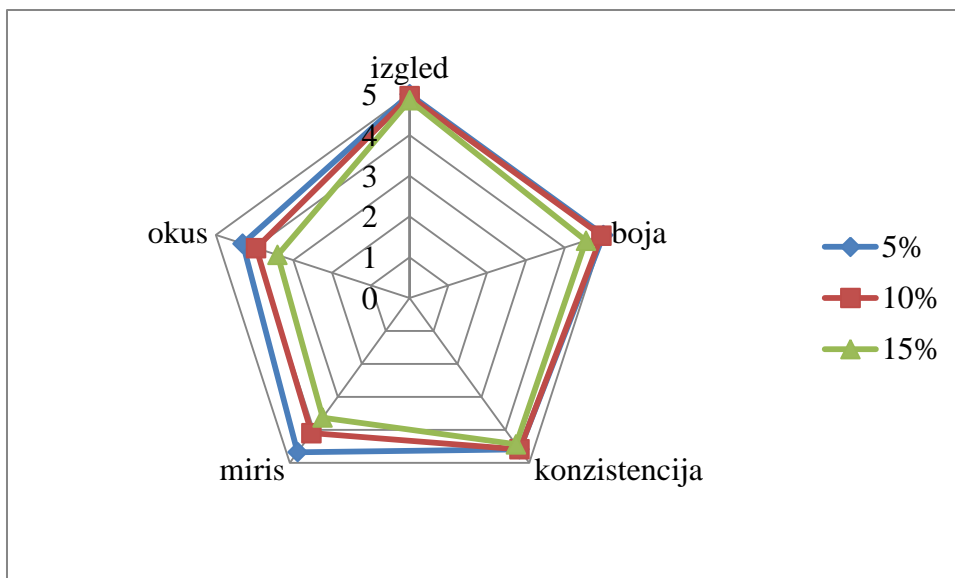
Senzorsku analizu proveo je panel od 5 ispitivača koji su prema obrascu za senzorsko ocijenjivanje (Prilog 1) ocjenjivali karakteristike dobivenih uzoraka. Senzorska (organoleptička) analiza je znanstvena disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica koja se određuju uz pomoć osjetila vida, mirisa, okusa, dodira i sluha (Božanić i sur., 2010). Tekstura gotovih proizvoda vrlo je važna za senzorsku prihvatljivost kod potrošača.



Svi uzorci su imali blag i ugodan okus bez separirane sirutke te ujednačene boje. Boja im je bila nešto tamnija nego kao što je kod jogurta, ali to je zbog korištenja inokuluma *kombuche* koja je rasla na crnom čaju. Prema senzorskim karakteristikama, najbolje ocijenjen izgled i boju ima uzorak s 5% inokuluma pri fermentaciji od 40°C, a najlošiji izgled i boju uzorak s 15% inokuluma (tablica 8 i slika 7). Za konzistenciju su jednake ocjene kod uzorka s 5 i 10% inokuluma, a nešto niža ocijena je za uzorak s 15%. Miris, okus i ukupna ocjena najveća je za uzorak s 5% inokuluma, a najniža za uzorak s 15% inokuluma *kombuche* (tablica 8). Malbaša i sur. (2009a; b) i Milanović i sur. (2008) su došli do zaključka da su pri nižim koncentracijama inokuluma bolje ocijenjene senzorske karakteristike.

Tablica 8. Prosječne ocjene za karakteristike pri senzorskom ocjenjivanju sa standardnim devijacijama za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

senzorske karakteristike	prosječne ukupne ocjene		
	uzorci		
	5%	10%	15%
izgled	1,00±0,00	0,99±0,02	0,97±0,03
boja	1,00±0,00	0,99±0,02	0,91±0,07
konzistencija	3,67±0,14	3,67±0,14	3,55±0,18
miris	1,87±0,08	1,64±0,09	1,45±0,19
okus	10,77±0,17	9,90±0,08	8,53±0,31
ukupno	18,31±0,36	17,21±0,15	15,42±0,62

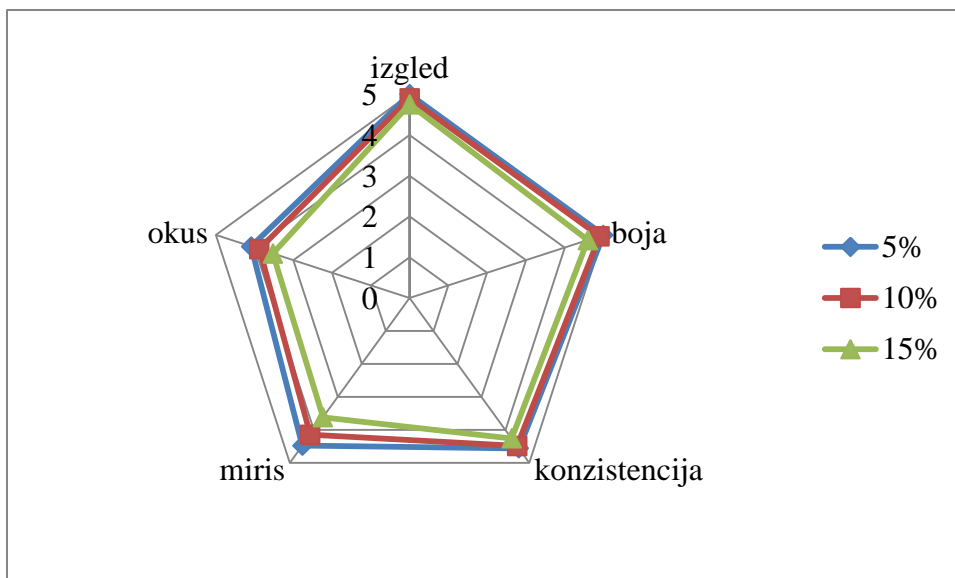


Slika 7. Usporedba prosječnih ocjena za karakteristike pri senzorskom ocjenjivanju za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 40°C

Najveću ocjenu za senzorske karakteristike izgleda i boje vidljivo iz tablice 9 i slike 8 dobio je uzorak s 5% inokuluma, dok je najlošije ocijenjen uzorak s 15% inokuluma fermentacijom pri 43°C. Također, takav se trend nastavlja i za konzistenciju, miris, okus te ukupnu ocjenu.

Tablica 9. Prikaz prosječnih ocjena za karakteristike pri senzorskom ocjenjivanju sa standardnim devijacijama za uzorke s dodatkom inokuluma od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C

senzorske karakteristike	prosječne ukupne ocjene		
	uzorci		
	5%	10%	15%
izgled	1,00±0,00	0,98±0,02	0,95±0,03
boja	1,00±0,00	0,98±0,02	0,92±0,07
konzistencija	3,65±0,14	3,59±0,16	3,41±0,31
miris	1,79±0,15	1,66±0,10	1,45±0,17
okus	10,23±0,61	9,70±0,22	8,83±0,45
ukupno	17,67±0,69	16,91±0,23	15,57±0,99



Slika 8. Usporedba prosječnih ocjena za karakteristike pri senzorskom ocjenjivanju za uzorke s dodatkom inokulum od 5%, 10% i 15% kulture *kombuche* iz crnog čaja fermentacijom pri 43°C

Na slikama 7 i 8 vidljivo je da su najveće razlike u ocjenama za karakteristiku mirisa i okusa. Tako je za tu karakteristiku najlošije ocijenjen uzorak u kojeg je dodano 15% inokuluma pri obje temperature fermentacije radi jakog mirisa na kvasac.

Također, za uzorak sa 15% inokuluma, pri obje temperature fermentacije, konzistencija je bila najrjeđa što se može povezati i s dobivenim najnižim vrijednostima za viskoznost (slika 4 i 6, tablica 6 i 7), a objašnjava se time da se većim dodatkom inokuluma sam uzorak razrijedio. Osjet konzistencije jogurta, koji je najbližiji proizvodu od *kombuche*, u ustima rezultat je proteinske mreže koja nastaje povezivanjem kazeina. U tu mrežu su uklopljeni serum (tekućinski dio) i masne globule (Kalab i sur., 1983).

Uspoređujući ocjene uzoraka na dvije različite temperature fermentacije, iz tablica 8 i 9, vidljivo je da niže ocjene za sve karakteristike pa onda samim time i ukupnu ocjenu imaju uzorci fermentirani na višoj temperaturi (43°C). Ali utjecaj koncentracije inokuluma za sve senzorske karakteristike je puno veći (što je viša koncentracija, lošije je ocijenjen uzorak) nego temperatura fermentacije.

Cilj ovog diplomskog rada bilo je ispitati različitosti u nekoliko parametara kvalitete (pH, vrijednost sinereze, reološka svojstva, senzorska svojstva) nakon fermentacije s obzirom na različite temperature provođenja fermentacije (40 i 43°C) te različite koncentracije inokuluma (5,10 i 15%).

Usporedbom svih dobivenih vrijednosti moglo bi se općenito zaključiti da je optimalna fermentacija s 5% inokuluma pri 40°C jer je tada sinereza najmanja, a senzorska ocjena najviša, te su dobivene najbolje vrijednosti za viskoznost i smično naprezanje u ovisnosti o brzini smicanja, dok je najlošija fermentacija s 15% inokuluma pri 43°C.

## 5 ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Fermentacijska krivulja je sigmoidalnog oblika, odnosno na početku dolazi do vrlo spore, gotovo zanemarive promjene pH dok na kraju fermentacije dolazi do naglog pada pH.
2. Fermentacija je bila najbrža korištenjem najvećeg inokuluma *kombuche* (15 %) te provođenjem fermentacije na višoj temperaturi (43°C) iako je općenito utjecaj koncentracije inokuluma i temperature bio vrlo mali.
3. Titracijska kiselost se ne razlikuje s obzirom na temperaturu fermentacije, ali neznatno pada povećanjem koncentracije inokuluma.
4. Najmanja sinereza bila je kod fermentacije provedene na nižoj temperaturi (40°C).
5. Najveće vrijednosti smičnog naprezanja i viskoznosti u ovisnosti o brzini smicanja pokazuje uzorak s 5% inokuluma fermentiran na nižoj temperaturi. Dobiveni mliječni *kombucha* napitak spada u pseudoplastični sustav.
6. Najbolje senzorske ocjene dobio je uzorak s 5% inokuluma fermentiran na 40 °C, dok je najlošije ocijenjen uzorak s 15% inokuluma fermentiran na 43°C koji je imao aromu na kvasac.
7. Najveći utjecaj na senzorsku ocjenu ima koncentracija inokuluma (najviša koncentracija inokuluma dala je nalošije ocijenjene uzorke), a utjecaj temperature fermentacije je značajno slabiji (viša temperatura fermentacije dala je slabije ocijenjene uzorke).
8. Općenito može se zaključiti da je optimalna fermentacija s 5% inokuluma pri 40°C jer je tada sinereza najmanja, a senzorska ocjena najviša.

## 6 LITERATURA

- Akın, M. B., Akın, M. S., Kırmacı, Z. (2007) Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chem* **104**, 93-99.
- Aryana, K. J., Plauche, S., Rao, R. M., Mcgrew, P., Shah, N. P. (2007) Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. *J Food Sci* **72** (3), M79-M84.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., Ammar, E. (2012) Antimicrobial effect of Kombucha analogues. *LWT – Food Sci Technol* **47**, 71-77.
- Belloso-Morales, G., Hernandez-Sanches, H. (2003) Manufacture of a beverage from cheese whey using a tea fungus fermentation. *Rev Lat Am Microbiol* **45** (1-2), 5-11.
- Bohmler, G., Gerwert, J., Scupin, E., Sinell, H. J. (1996) The epidemiology of helicobacteriosis in humans; studies of the survival capacity of the microbe in food. *Deut Tierarztl Woch* **103** (10), 438-443.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda*. Priručnik, Plejada, Zagreb.
- Buchenhuskes, H. J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures in various food commodities. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 253-272.
- Cardoso, L. V. G., Ferreira, M., Schneedorf, J. M., Carvalho J. C. T. (2003) Avaliação de fermentdo de quefir sobre o trânsito intestinal de ratos. *J Brasil Fitomed* **1**, 107-109 (na portugalskom).
- Chen, C., Liu, B. Y. (2000) Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* **89**, 834-839.
- Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A. M., Granato, D., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. (2010) Sensory analysis: Relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. *Compr Rev Food Sci F* **9**, 358-373.
- Dufresne, C., Farnworth, E. (2000) Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Res Int* **33**, 409-421.

- Dutta, D., Gachhui, R. (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp nov., isolated from kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1899-1903.
- El-Salam, S. S. A. (2012) 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea kombucha. *NY Sci J* **5**, 55-61.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food, <[www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>. Pristupljeno 16.svibnja 2016.
- Frank, J. F., Hassan, N. A. (1998) Starter cultures and their use. U: *Applied Dairy Microbiology*, (Marth, E. H. i Steele, J. L., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 131-172.
- Friedman, M., Kim, S. Y., Lee, S. J., Han, G. P., Han, J.S., Lee, R. K., Kozukue, N. (2005) Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. *J Food Sci* **70**, 550-559.
- Goh, W., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., Bhat, R. (2012) Fermentation of black tea broth (kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *Int Food Res J* **19**, 109-117.
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., Steinkraus, K. H. (1998) Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *LWT – Food Sci Technol* **31**, 291-296.
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., Ledford, R. A. (2000) Kombucha, the fermented tea: Microbiology, Composition and Claimed health effects. *J Food Protect* **63** (7), 976-981.
- Gregurek, Lj. (2001) Nova generacija prebiotika. *Preh. ind. – Mleko i ml. proizv.* **12** (1-2), 4.
- Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanović, S., Vukić, V., Iličić, M., Popović, Lj., Kanurić, K. (2014) The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *J Funct Food* **10**, 336-345.
- Iličić, M. (2010) Optimizacija tehnološkog procesa proizvodnje funkcionalnog fermentisanog mlečnog napitka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Swaminthan, K. (2007) Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem* **102**, 392-398.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathiskumar, M., Swaminthan, K. (2008) Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem* **109**, 227-234.
- Kalab, M., Allan-Wojtas, P., Phipps-Todd, B. (1983) Development of microstructure in set-style yoghurt: a review. *Food Microstruct.* **2**, 51-66
- Kallel, L., Desseaux, V., Handi, M., Stocker, P., Ajandouz, E.H. (2012) Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Res Int* **49**, 226-232.
- Kanurić, G.K., Hrnjez, D.V., Ranogajec, M.I., Milanović, S.D., Iličić, M.D., Vukić, R.V., Milanović, M. Lj. (2011) The effect of fermentation temperature on the functional dairy product quality. *APTEFF* **42**, 1-288, doi: 10.2298/APTI142063K.
- Liu, J. R., Chen, M. J., Lin, C. W. (2005) Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agr Food Chem* **53**, 2467- 2474.
- Malbaša, R. (2000) Mogućnost dobijanja dijetetskog napitka pomoću čajne gljive. Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Malbaša, R. (2004) Istraživanje antioksidativne aktivnosti napitka od čajne gljive. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Malbaša, R. (2009) Hemijska karakterizacija proizvoda od kombuhe. Monografija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Malbaša, R., Lončar, E., Đurić, M. (2008a) Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chem* **106**, 1039-1045.
- Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., Čanadanović-Brunet, J. (2011) Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem* **127**, 1727-1731.
- Malbaša, R., Milanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M., Kolarov, Lj. (2009b) Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chem* **112**, 178-184.



- Malbaša, R., Minić, S., Lončar, E., Kolarov, Lj. (2008b) Uticaj inokuluma kombuhe na kvalitet fermentisanih mlečnih proizvoda. *Preh. ind. – Mleko i ml. proizv.* **19 (1-2)**, 43-46.
- Malbaša, R., Vitas, J., Lončar, E., Grahovac, J., Milanović S. (2014) Optimization of the Antioxidant Activity of Kombucha Fermented Milk Products. *Czech J Food* **32 (5)**, 477-484.
- Malbaša, R., Vitas, J., Lončar, E., Milanović, S. (2012) Physical and textural characteristics of fermented milk products obtained by kombucha inoculums with herbal teas. *APTEFF* **43**, 51-58.
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Milianović, S.D., Kolarov, Lj.A. (2009a) Use of milk-based kombucha for milk fermentation. *APTEFF* **40**, 1-220, doi: 10.2298/APT0940047M.
- Malbaša, R.V., Vitas, J.S., Lončar, E.S., Milanović, S.D. (2012a) Physical and textural characteristics of fermented milk products obtained by kombucha inoculums with herbal teas. *APTEFF* **43**, 1-345, doi:10.2298/APT1243051M.
- Markov, S. L., Malbaša, R. V., Hauk, M. J., Cvetković, D. D. (2001) Investigation of tea fungus microbe associations: I: the yeasts. *Acta Per Technol* **32**, 133-138.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Paul Ross, R., Cotter, P. D. (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* **38**, 171-178.
- Marshall, V. M. (1993) Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J Soc Dairy Technol* **46 (2)**, 49-56.
- Marshall, V. M. E., Tamime, A. Y. (1997) Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *Int J Dairy Technol* **50**, 35-41.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* **12**, 173-182.
- Milanović, S. (1997) Fermentisani mlečni napici za specijalne namene. U: *Kvalitet mleka i fermentisanih proizvoda*, (Obradović, D. i sur., ured.), Jugoslovenski mlekarski simpozijum, Zlatibor, Beograd, str. 49-55.

- Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V., Hrnjez, D., Ilčić, M., Ranogajec, M., Milanović, M. (2012) Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. *AJB* **11**, 2320-2327, doi: 10.5897/AJB11.3788.
- Milanović, S.D., Iličić, M.D., Duraković, G.K., Vukić, R.V. (2009) Textural characteristics of fermented milk beverages produced by kombucha. *APTEFF* **40**, 1-220, doi: 10.2298/APT0940063M.
- Nauth, K. R. (2006) Yogurt. U: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, (Hui, Y. H., ured.), 4.izd., Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, str. 152-1–152-15.
- Obanda, M., Owuor, O., Mang'oka, R., Kavoi, M. M. (2004) Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chem* **85**, 163-173.
- Obradović, D. (2003) Tehnološka mikrobiologija, <<http://www.sirikajmak.rs/documents/predavanje-tehn-mikrobiologija.pdf>>. Pristupljeno 9. srpnja 2016.
- Obradović, D., Radin, D., Radulović, Z. (2009) *Saccharomyces boulardii* jedini kvasac probiotik. *Preh. ind. – Mleko i ml.i proizv.* **20** (1-2), 3-5.
- Obradović, D., Ristić, G., Karić, A. (2001) *Perspektive primene probiotika u industriji mleka*. Jugoslovenski mlekarSKI simpozijum: Savremeni trendovi u mlekarstvu, Vrnjačka Banja, Zbornik radova, str. 97-98.
- Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A. (2011) Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *J Food Eng* **107**, 36-40.
- Osada, K., Nagira, K., Teruya, K., Tachibana, H., Shirahata, S., Murakami, H. (1993) Enhancement of interferon- $\beta$  production with sphingomyelin from fermented milk. *Biotherapy* **7**, 115-123.
- Ota, A. (1999) Protection against an infection disease by enterohaemorrhagic *E. coli* 0–157. *Med Hypotheses* **53**, 87-88.

- Pederson, C. S. (1979) *Microbiology of Food Fermentations*, 2.izd., Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, str. 1-29.
- Peterson, J., Dwyer, J., Jacques, P., Rand, W., Prior, R., Chui, K. (2004) Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea. *J Food Compos Anal* **17**, 397-405.
- Radulović, Z., Paunović, D., Iličić, M., Mirković, N., Petrušić, M., Obradović, D. (2010) Promena mikroflore čajne gljive tokom skladištenja fermentisanih mlečnih napitaka. *Preh. ind. – Mleko i ml. proizv.* **21 (1-2)**, 99-102.
- Reiss, J. (1994) Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Z Lebensm Unters For* **198**, 258-261.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G. (2010) A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks. *Food Chem.* **119**, 1108-1103.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., Schneedorf, J. M. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents* **25**, 404-408.
- Schneedorf, J. M., Anfiteatro, D. (2004) Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação. U: *Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*, (Carvalho, J. C. T., ured.), Tecmedd, Ribeirão Preto, str. 443–467.
- Seto, A., Kojima, Y., Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F. (1997) Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for sucrose as a carbon source. *Biosci Biotech Biochem* **61**, 735-736.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2000) Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J Agr Food Chem* **48 (6)**, 2589-2594.
- Sreeramulu, G., Zhu, Y., Knol, W. (2001) Characterization of antimicrobial activity in Kombucha fermentation. *Acta Biotechnol* **21 (1)**, 49-56.

- Steinkraus, K. H., Shapiro, K. B., Hotchkiss, J. H., Mortlock, R. P. (1996) Investigations into the antibiotic activity of tea fungus/Kombucha beverage. *Acta Biotechnol* **16** (2– 3), 199-205.
- Stijepić, M., Milanović, S, Glušac, J., Vukić, V., Kanurić, K., Đurđević-Milošević, D., Ranogajec, M. (2011) Reološka i teksturalna svojstva probiotičkog jogurta. *Mljekarstvo* **61** (1), 92-101
- Strap, J. L., Latos, A., Shim, I., Bonetta, D. T. (2011) Characterization of pellicle inhibition in *Gluconacetobacter xylinus* 53582 by a small molecule, pellicin, identified by a chemical genetics screen. *PloS One* **6** (12), e28015.
- Surono, S., Hosono, A. (2011) Fermented Milks – Types and Standards of Identity. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (Fuquay, J. W., ured.), 2.izd., Elsevier Academic Press, London, 470-476.
- Šipka, M. (1972) Acidofilno mleko. *Mljekarstvo* (22) **6**, 129-133.
- Tamime, A. Y. (2006) Fermented Milks, Blackwell Science Ltd, London, str. 262.
- Tamime, A. Y. (2005) Probiotic Dairy Products, 1.izd., Blackwell Publishing, Oxford.
- Tamime, A. Y., Deeth, H. C. (1980) Yogurt: technology and biochemistry. *J Food Protect* **43**, 939-977.
- Tamime, A.Y., Hassan, A., Farnworth, E., Toba, T. (2007) Structure of fermented milks. U: *Structure of dairy products*, (Tamime, A. Y., ured.), Blackwell Publishing, Singapore, str. 134-169.
- Tamime, A.Y., Marshall (1997) V.M.E.m Microbiology and technology of fermented milks. U: *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, Chapman & Hall, London, str. 57-133.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2004) Yoghurt, Science and Technology, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, str. 619.
- Teoh, A. L., Heard, G., Cox, J. (2004) Yeast ecology of kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* **95**, 119-126.

- Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 13-207.
- Tratnik, L.J., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P. (2011) Gluconacetobacter sacchari: an efficient bacterial cellulose cell–factory. *Carbohydr Polym* **86**, 1417-1420.
- Van de Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruyssen, 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. *Int Dairy J* **16**, 1470-1476.
- Viswanth, D.S., Ghosh, T.K., Prasad, D.H.L., Dutt, N.V.K., Rani, K.Y. (2007) Viscosity of Liquids- Theory. U: *Estimation, Experiment and Data*, Springer, Dorderecht.
- Vitas, J., Malbaša, R., Grahovac, J., Lončar, E. (2013) The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *Chem Ind Chem Eng Q* **19** (1), 129-139.
- Vukić, R.V., Kanurić, K.G., Milanović, S.D., Ilić M.D., Hrnjez, D.V., Ranogajec, M.I.(2014) Correlation of the microstructure with viscosity and textural properties during milk fermentation by kombucha inoculum. *APTEFF* **45**, 89-98, doi: 10.2298/APT1445089V.
- Wu, W., Gai, B., Ji, B. (2004) Study on the isolation and identification of microbes of kombucha. *Food Sci* **25** (4), 55-58.
- Yamada, Y., Hoshino, K., Ishikawa, T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus Gluconoacetobacter to the generic level. *Biosci Biotech Biochem* **61**, 1244-1251.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Huong, T.L.V., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y. (2012) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J Gen Appl Microbiol* **58**, 397-404.

Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., Li, T. (2010) Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Appl Biochem Biotech* **160**, 446-455.

Yumah, R.Y., Shaker, R.R., Abu-Jdayil, B. (2001) Effect of Milk Source on the Rheological Properties of Yogurt during the Gelation Preprocess. *Int.J. Dairy Technol.* **54**, 89-96.

Zhang, H., Zhang, Z., Xin, X. (2011) Isolation and identification of microorganisms from kombucha fungus culture. *J Beijing Union Univer* **2**, 011.

## 7 PRILOZI

Prilog 1

Obrazac za senzorsko ocjenjivanje

**DATUM:**

**OCJENJIVAČ:**

TABLICA ZA SENZORSKO OCJENJIVANJE KISELOG MLIJEKA, JOGURTA, KEFIRA, ACIDOFILA I DRUGIH VRSTI FERMENTIRANOG MLIJEKA

OSObine	NAJVIŠI BROJ BODOVA	POSTIGNUT BROJ BODOVA			NAPOMENA
		5%	10%	15%	
Izgled	1				
Boja	1				
konzistencija	4				
miris	2				
okus	12				
<b>ukupno</b>	20				

**Termini koji određuju kvalitetu fermentiranih mliječnih proizvoda:**

Izgled:

prepunjeno, premalo punjeno, skvrčen, heterogene površine, netipične boje, smeđe boje, nejednolične boje, mramoran, zračni mjehurići, strana tvar, odvojenost sirutke, pljesniv, pjenušav, odvojene faze, sedimentacija, slaba distribucija sastojaka

Konzistencija:

grudice ili pahuljice, kapljice, nejednak, pjeskovit, ljepljiv, prejak, gust, previše tekuć, vlaknast ili ljepljiv, suha, želatinozna

Okus:

vodenast, jednoličan, gorak, kuhan, izgoren, dimljen, uljast, kemijski okus, hranjiv, stran okus, loše aromatiziran, loši sastojci, sirast, po sladu, metalik, pljesniv, oksidiran, kiseo, oštar, hrapav, mastan, pjenušav, užežen, pokvaren, koji se skuplja, nečist, presladak, preslan, sapunast