

Originalni naučni rad

UTICAJ ODABRANIH FAKTORA NA TOK FERMENTACIJE MLIJEKA I VREMENA SKLADIŠTENJA JOGURTA

Milka Stijepić¹, Nikolina Malinović¹

¹JU Visoka medicinska škola Prijedor, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

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

Cilj istraživanja bio je ispitati uticaj dodatka bagremovog meda (M) u različitim koncentracijama (2%, 4% i 6%) u kombinaciji sa inulinom (1% IN) i koncentratom proteina surutke (1% KPS) i termičkog tretmana mlijeka (85°C/20 min ili 95°C/10 min) na tok fermentacije mlijeka inokulisanog probiotskim i jogurnim kulturama u koncentraciji 0,0025 % w/w. Proizvedeni su i kontrolni uzorci bez dodataka. Fermentacija mješovitim probiotskim bakterijama VIVOLAC DriSet BIOFLORA ABY 424 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium ssp.*) vođena je na 37°C, a jogurnim kulturama VIVOLAC DriSet Yogurt 442 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) na 41°C do postizanja pH 4,6. Uzorci su brzo ohlađeni na 20°C i smješteni u frižider na 4°C ± 1. Mjerenja pH vrijednosti uzoraka (pH 510/mV Meter, Eutech Instruments Oakton, England) vršena su 1., 7., 14. i 21. dana skladištenja. Utvrđene su razlike trajanja i toka fermentacije. Dodatak inulina i koncentrata proteina surutke, kao i njihove kombinacije s medom, znatno su ubrzali proces fermentacije ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne uzorke, bez obzira na primijenjeni termički tretman mlijeka. Međutim, različite primijenjene kulture nisu uticale na brzinu fermentacije mlijeka. Tokom skladištenja kod svih probiotskih uzoraka i kod tradicionalnog jogurta čije je mlijeko tretirano na 95°C/10min, uočena je značajna razlika u pH vrijednosti ($p < 0,05$) između uzoraka 1. dana skladištenja, s jedne strane i uzoraka mjerenih 7., 14. i 21. dana, s druge strane. Kod uzoraka tradicionalnog jogurta, čije je mlijeko tretirano na 85°C/20min, nije bilo statističke razlike s obzirom na vrijeme skladištenja. Generalno, dodaci meda, inulina i KPS-a, znatno su ubrzali tok fermentacije, dok je kod svih uzoraka tokom skladištenja došlo do stabilizacije promjene pH vrijednosti od 7-og dana skladištenja.

Ključne riječi: jogurt, probiotik, med, inulin, KPS

Uvod

Posljednjih nekoliko decenija razvoj funkcionalnih mliječnih proizvoda je oblast značajne ekspanzije u mliječnoj industriji, gdje se svake godine razvija stotine novih proizvoda koji čine jedan od najvećih sektora na globalnom tržištu funkcionalne hrane. Mlijeko je osnovna sirovina u proizvodnji mliječnih proizvoda. Kada se to isto mlijeko koje ima izvrsne nutritivne karakteristike podvrgne fermentaciji, dobije se proizvod dodate vrijednosti. Popularnost fermentisanih mlijeka temelji se upravo na činjenici da im je povećana nutritivna i funkcionalna vrijednost (de Oliveira, 2014),

uz istovremeno zadržavanje poželjnih fizičko-hemijskih i senzorskih svojstava. Povoljan uticaj na zdravlje ljudi prvenstveno se pripisuje živim mikroorganizmima koji moraju biti održivi, aktivni i zastupljeni u velikom broju u proizvodu do isteka roka trajanja tokom skladištenja (Codek Alimentarius, 2003) te metaboličkim supstancama (organske kiseline, poliol, egzopolisaharidi i antimikrobna jedinjenja) nastalim djelovanjem tih istih mikroorganizama (Khalid, 2011; Bintsis, 2018). Pored toga, ono što fermentisana mlijeka čini sigurnim i zdravim za upotrebu je nastala količina mliječne kiseline (0,7-1,2g/100ml) koja uništava prisutnost gotovo svih patogenih mikroorganizama.

Najvažnije mikrobne kulture za proizvodnju fermentisanih mlijeka su bakterije mliječne kiseline-BMK (mezofilne, termofilne, probiotske i mješovite) i kvasci. Fermentisana mlijeka najčešće zastupljena na tržištu su jogurt, acidofilno mlijeko, kiselo mlijeko, kefir i drugo. Jogurt se proizvodi fermentacijom mlijeka djelovanjem sojeva *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* koji sačinjavaju jogurtnu kulturu, te probiotske bakterije iz rodova *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp.

Jedan važan proces u proizvodnji fermentisanih mlijeka je zakiseljavanje koje utiče na ukus, viskozitet i rok trajanja samog proizvoda (Mudgil i Barak, 2019).

Proizvodnja jogurta podrazumijeva postepeno zakiseljavanje mlijeka, tokom nekoliko sati, na 40-45°C, dok je optimalna temperatura za rast i razvoj probiotika 37°C, uz dužu fermentaciju. Fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu od strane odabranih bakterijskih kultura postepeno izaziva pad pH mlijeka sa oko 6,7 na vrijednosti oko 4-5 (Lucey i Singh, 2003). Ovo smanjenje pH izaziva taloženje micela kazeina i stvaranje strukture gela. Proces fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu je vrlo složen i odvija se postepenom razgradnjom uz stvaranje brojnih međuprodukata i energije. Bakterije mliječne kiseline ne mogu koristiti laktozu direktno, već je pomoću enzima laktoza-permeaze prevode u svoju ćeliju gdje je cijepaju na glukozu i galaktozu, uz pomoć enzima β -galaktozidaze. Glukoza se dalje, preko brojnih međuprodukata, postepeno razgrađuje putem glikolize (Embden-Meyerhof Parnasovim put) do pirogroždane kiseline. Redukcijom pirogroždane kiseline (piruvata) djelovanjem specifičnog enzima laktat-dehidrogenaze, nastaje mliječna kiselina (laktat).

U proizvodnji fermentisanih mlijeka bakterije rastu u simbiozi, odnosno jedna drugu stimuliše pri rastu. Tako *Lactobacillus bulgaricus* stimuliše rast *Streptococcus thermophilus* preko nekih aminokiselina koje proizvodi tokom svog rasta, a *Streptococcus thermophilus* proizvodi neophodnu količinu CO₂ i mravlje kiseline, što stimuliše rast *Lactobacillus bulgaricus*. U zajedničkom rastu tih bakterija jogurtne kulture, razvoj kiseline u mlijeku je puno brži i veći, nego djelovanjem svake bakterije posebno. pH vrijednost komercijalnog jogurta kreće se od 3,7-4,3 (Tamime i Robinson, 2007).

Pored toga, jogurt može uključivati neke derivate mlijeka kao što su: koncentrat proteina surutke (Stijepić i sar., 2012), obrano mlijeko u prahu, surutka u prahu, kazein u prahu i sl. (Sfakianakis i Tzia, 2014) te fruktooligosaharide, inulin (Varga i sar., 2006; Unal i Ozer, 2018) i med (Kajiwaru i sar., 2002; Stijepić i sar., 2013; Glušac i sar., 2015; Sarkar i Chandra, 2020) u proizvodnji probiotskog jogurta.

Nekoliko faktora može uticati na tok fermentacije mlijeka, kao što su temperatura, vrijeme inkubacije, korištenje različitih dodataka, miješanje, vrsta mlijeka itd. (de Oliveira, 2014). Zbog toga, cilj istraživanja bio je ispitati uticaj dodatka bagremovog meda (M) u različitim koncentracijama (2%, 4% i 6%) u kombinaciji sa inulinom (1% IN) ili u kombinaciji sa koncentratom proteina surutke (1% KPS) i termičkog tretmana mlijeka (85°C/20min ili 95°C/10min) na tok fermentacije mlijeka inokulisanog probiotskim i jogurnim kulturama. Takođe, cilj je bio da se ispita promjena pH vrijednosti uzoraka tokom 21 dana skladištenja.

Materijal i metode

Materijal

- Sterilizovano i djelimično obrano kravlje mlijeko (1,5% mliječne masti, 3,0% proteina i 4,5% laktoze) "Moja Kravica" proizvođača Mlijekoprodukt d.o.o, Kozarska Dubica, Bosna i Hercegovina
- Za inokulaciju uzoraka mlijeka korištene su sljedeće kulture:
 - mješovita probiotska kultura VIVOLAC DriSet BIOFLORA ABY 424: 70 % *Streptococcus thermophilus*, 10 % *Lactobacillus bulgaricus*, 10 % *Lactobacillus acidophilus*, 10 % *Bifidobacterium ssp.* (Vivolac Culture Corporation, Indiana, USA), u koncentraciji 0,0025 % w/w,
 - jogurtna kultura VIVOLAC DriSet Yogurt 442: 10 % *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i 90 % *Streptococcus thermophilus* (Vivolac Culture Corporation, Indiana, USA), u koncentraciji 0,0025 % w/w,
- Bagremov med proizvođača „BK Kompani“ d.o.o. Banja Luka (Banja Luka, BiH), dodat je u koncentraciji 2 %, 4 % i 6 %,
- Koncentrat proteina surutke TexttrionTM PROGEL 800 – DMW International BV – Veghel - The Netherlands (sadržaj proteina 80,0 %, laktoze 7,0 %, masti 5,0 %, mineralnih materija 5,0 %), dodat je prije termičkog tretmana mlijeka u koncentraciji 1 %,
- Inulin (IN) Fibruline® Instant Cosucra Groupe Warcoing S.A., Belgium (min 90 % inulina, max 10 % fruktoze, glukoze i saharoze, max 0,3 % pepela), dodat je prije termičkog tretmana mlijeka u koncentraciji 1 %.

Metode

- pH vrijednost mlijeka, pH tokom fermentacije, te pH vrijednost jogurta, mjereni su korištenjem laboratorijskog pH- metra (pH 510/mV Meter, Eutech Instruments Oakton, England).

Statistička analiza

Rezultati rada su statistički obrađeni (Tukey test, $p < 0,05$) u programima SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc. USA) i Microsoft®Excel 2007.

Proizvodnja tradicionalnog i probiotskog jogurta

U zagrijano mlijeko na 55°C dodaje se 1% inulina i med u koncentraciji 2 %, 4 % i 6 %. Nakon homogenizacije pomoću magnetne mješalice i hlađenja na 37°C, mlijeko je inokulirano izabranim probiotskim starterom te inkubirano pri istoj temperaturi do postizanja vrijednosti pH 4,6. Fermentacija se zaustavlja brzim hlađenjem na 20°C. Uzorci probiotskog jogurta se zatim skladište 21 dan u frižideru na 5°C±1.

Homogenizovano i djelimično obrano mlijeko je podijeljeno na dva dijela. U jedan dio je dodato 1% koncentrata proteina surutke (KPS), a u drugi 1% inulina (IN), nakon čega je vršeno zagrijavanje mlijeka na 85°C/20 minuta, odnosno 95°C/10 minuta. Zatim su uzorci mlijeka ohlađeni na 55°C i podijeljeni tako da je dodat bagremov med (M) u koncentraciji 2%, 4% i 6%. Proizvedeni su i kontrolni uzorci bez dodataka. Nakon homogenizacije pomoću magnetne mješalice i hlađenja na 37°C (za probiotski jogurt) i 41°C (za tradicionalni jogurt) mlijeko je inokulisano izabranim starterima, te inkubirano pri istoj temperaturi do postizanja vrijednosti pH 4,6. Zatim su uzorci fermentisanog mlijeka brzo ohlađeni na 20°C i skladišteni 21 dan u frižideru na 5°C±1. Svako ispitivanje je ponovljeno tri puta.

Rezultati i diskusija

Hemijski sastav i fizičko-hemijske karakteristike mlijeka korištenog za proizvodnju probiotskog i tradicionalnog jogurta prikazani su u Tabeli 1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka mlijeka u skladu su sa važećim Pravilnikom o kvalitetu svježeg sirovog mlijeka (Službeni glasnik Republike Srpske, 34/06).

Tabela 1. Kvalitet mlijeka (n=6)

Table 1. Milk quality (n = 6)

Uzorci mlijeka/ Milk samples								
Hemijski sastav/ Chemical composition (g/100g)					Fizičko-hemijske karakteristike/ Physicochemical characteristics			
Suva materija/ Dry matter	Proteini/ Proteins	Mast/Fat	Laktoza/ Lactose	Pepeo/ Ash	Gustina Density kg/m ³	pH	Potencijal/ potential (mV)	Titraciona kiselost/ Titratable acidity (°SH)
10,1± 0,241	3,31± 0,141	1,5± 0,021	4,68± 0,042	0,79± 0,017	1,032± 0,001	6,60± 0,022	5,58± 0,694	6,6± 0,1414

S obzirom da je pri optimizaciji tehnološkog procesa proizvodnje fermentisanih mliječnih proizvoda, kiselost jedna od najznačajnijih parametara za određivanje kvaliteta proizvoda, praćene su promjene pH vrijednosti mlijeka tokom fermentacije i promjene pH vrijednosti probiotskog i tradicionalnog jogurta tokom skladištenja.

Prethodno je sproveden preliminarni eksperiment za određivanje optimalne koncentracije inulina (IN) (za probiotski jogurt) i koncentrata proteina surutke (KPS) (za tradicionalni jogurt) u cilju povećanja senzornog kvaliteta proizvoda i ubrzanja

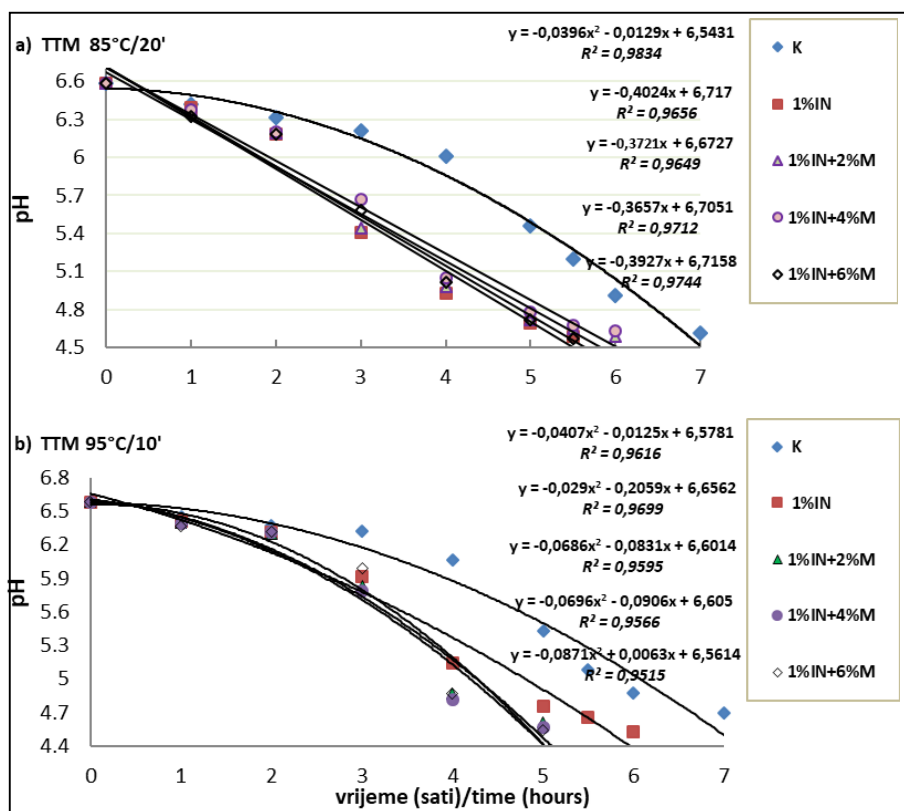
procesa fermentacije mlijeka. Preliminarnim ispitivanjem, na osnovu senzorne procjene uzoraka jogurta, ustanovljeno je da dodatak 1% IN, odnosno 1% KPS mlijeku prije fermentacije, daje jogurtu odličan ukus. Većim dodatkom IN i KPS smanjuje se karakteristična aroma proizvoda što ne odgovara tradicionalnom ukusu jogurta (Stijepić i sar., 2021).

Promjena kiselosti tokom fermentacije i skladištenja probiotskog jogurta

Podaci o promjenama pH-vrijednosti tokom fermentacije mlijeka, uz prethodno definisane termičke tretmane i dodatke, prikazani su na Slici 1.

Proces fermentacije mlijeka najduže je trajao kod kontrolnih uzoraka (7 sati), nezavisno od prethodnog termičkog tretmana mlijeka. Uzorci mlijeka sa dodatkom 1%IN, uz TTM na 95°C/10 min imali su duže vrijeme fermentacije za 0,5 sati (6,5 sati), u odnosu na uzorke čije je ishodno mlijeko podvrgnuto blažem termičkom tretmanu (85°C/20 min). Dodatak meda, uz inulin, generalno je uticao na ubrzanje fermentacije mlijeka: najbrže su fermentisali uzorci s TTM od 95°C/10 min (prosječno 5 sati), bez obzira na sadržaj meda; pri TTM na 85°C/20 min uzorak sa 6 % meda je fermentisao za 5,5 sati, dok je za uzorke sa sadržajem 2 i 4 % meda fermentacija završena za prosječno 6 sati. Generalno, dodatak inulina i kombinacija meda i inulina znatno su ubrzali proces fermentacije ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne uzorke, bez obzira na primijenjeni termički tretman mlijeka. Ovo se može pripisati snažnom djelovanju inulina i meda na odabranu probiotsku kulturu (Riazi i Ziar, 2008; Stijepić i sar., 2013; Coskun i Karabulut Dirican, 2019), te je kod ovih uzoraka znatno brža proizvodnja mliječne kiseline i brži pad pH vrijednosti.

Na Slici 1,a uočava se da su za sve uzorke regresioni pravci (koji predstavljaju pad pH vrijednosti tokom vremena fermentacije) imali karakteristike linearnih funkcija, osim kontrolnog uzorka čija je kriva u grafikonu sa karakteristikama kvadratne funkcije. Svi uzorci su imali vrlo visoke koeficijente determinacije R^2 (od 0,9649 do 0,9834). U drugom slučaju (Slika 1,b), sve krive u grafikonu su imale karakteristike kvadratnih funkcija, uz koeficijente determinacije (R^2) od 0,9515 do 0,9699.



Slika 1. Promjena pH tokom fermentacije probiotkog jogurta sa dodatkom inulina i različitih koncentracija meda uz prethodni termički tretman mlijeka (TTM): a) 85°/20 min i b) 95°/10 min
Figure 1. pH change during the fermentation of probiotic yogurt with the addition of inulin and different concentrations of honey with previous milk thermal treatment (TTM): a) 85° / 20 min and b) 95° / 10 min

Izračunata statistika Tukey-og testa u Tabeli 2 pokazuje da do trećeg sata fermentacije nema statistički značajne razlike između pH vrijednosti uzoraka probiotkog jogurta, dok nakon trećeg sata kod uzoraka sa dodatkom inulina i kombinacijom inulina i meda značajno se smanjuju pH vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne uzorke, bez obzira na primijenjeni termički tretman mlijeka.

Tabela 2. Izračunata statistika Tukey-og testa za pH vrijednosti tokom fermentacije probiotiskog jogurta sa dodatkom inulina (IN) i različitih dodataka meda (M)
Table 2. Calculated statistics of the Tukey test for pH values during the fermentation of probiotic yogurt with the addition of inulin (IN) and different concentrations of honey (M)

Vrijeme ¹ / Time	pH tokom fermentacije/ pH during fermentation									
	Uzorci jogurta/ Yogurt samples									
	TTM 85°C/20 min					TTM 95°C/10 min				
	K	1%IN	1%IN+2%M	1%IN+4%M	1%IN+6%M	K	1%IN	1%IN+2%M	1%IN+4%M	1%IN+6%M
0	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
2	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3	adf	be	be	bce	bce	ad	aec	aec	bcef	cd
4	a	b	b	b	b	a	b	b	b	b
5	a	b	b	b	b	a	b	b	b	b
5,5	a	-	b	b	b	a	b	-	-	-
6	a	-	-	-	-	a	b	-	-	-
7	a	-	-	-	-	a	-	-	-	-

^{abcdef} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istom redu na nivou značajnosti $p < 0,05$

^{abcdef} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same row at the level of significance $p < 0.05$

Promjena pH vrijednosti tokom skladištenja (Slika 2) kod svih uzoraka ima pravilan tok, bez obzira na termički tretman mlijeka, a najviše je izražena između 1. i 7. dana skladištenja.

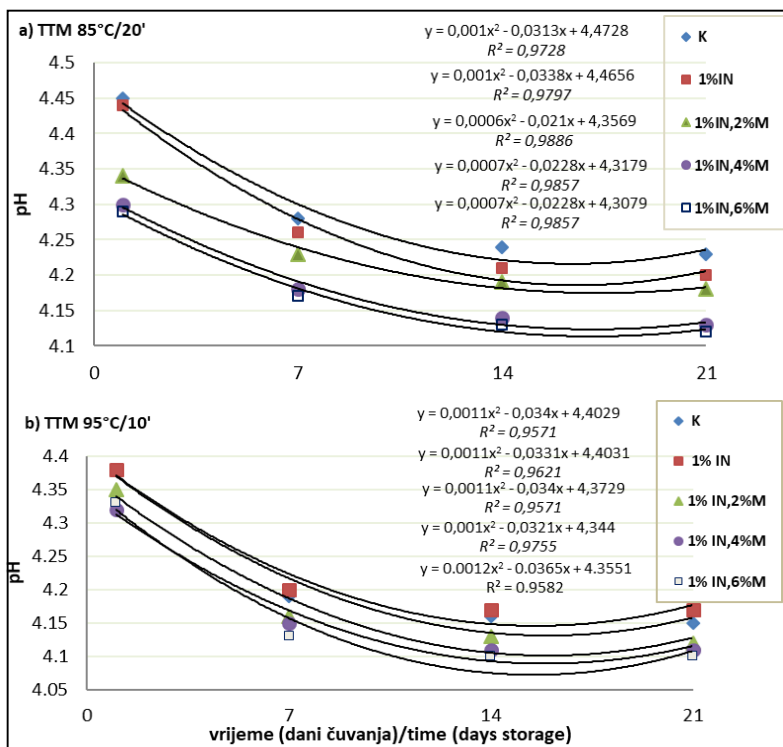
Post-acidifikacija je nepoželjan proces u fermentisanim mliječnim proizvodima. Osim što skraćuje vijek trajanja, to dovodi do brojnih nedostataka (jaka kiselost, povećana sinereza, promijenjen ukus, smanjen broj bakterija mliječne kiseline i dr.), a može dovesti i do solubilizacije koloidnog kalcijum-fosfata i djelimičnog restrukturiranja proteinske mreže (Guenard-Lampron, St-Gelais, Villeneuve i Turgeon, 2020). Pored toga, naknadna acidifikacija može štetno uticati na stabilnost probiotika ugrađenih u takve proizvode (Settachaimongkon i sar., 2016).

Nakon 21 dana (Slika 2,a), pad pH kod uzoraka proizvedenih od prethodno TTM na 85°C/20 min je iznosio: 0,22 pH jedinice za K uzorak, 0,24 pH jedinice za uzorak sa 1%IN, 0,16 pH jedinice za uzorak koji je sadržao 2%M i 0,17 pH jedinice za uzorke sa 4% i 6%M. Za uzorke proizvedene od mlijeka koje je TTM 95°C/10 min (Slika, 2,b), pad pH vrijednosti je bio: 0,23 pH jedinice za K uzorak, 0,21 za uzorak s 1%IN, 0,23 za uzorak s 2%M, 0,21 za uzorak s 4%M i 0,22 za uzorak u čijem je sastavu bilo 6%M.

¹ Vrijeme fermentacije (sati)/ Time of fermentation

Kod svih uzoraka vidljive su male promjene pH tokom skladištenja, s tim da su utvrđene niže pH vrijednosti kod uzoraka koji su proizvedeni od mlijeka koje je podvrgnuto oštrijoj termičkoj obradi (95°C), nezavisno od korištenih dodataka.

Može se zaključiti da su svi obuhvaćeni uzorci imali vrlo visoke koeficijente determinacije, dok su linije trenda, koje predstavljaju promjenu pada pH vrijednosti tokom skladištenja, imale karakteristike kvadratnih funkcija.



Slika 2. Promjena pH tokom skladištenja probiotičkog jogurta sa dodatkom inulina i različitih koncentracija meda uz prethodni termički tretman mlijeka (TTM): a) 85°/20 min i b) 95°/10 min

Figure 2. pH change during storage of probiotic yogurt with the addition of inulin and different concentrations of honey with previous thermal treatment of milk (TTM): a) 85° / 20 min and b) 95° / 10 min

Rezultati analize (Tabela 3) pokazuju da tokom skladištenja jogurta nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između pH vrijednosti različitih uzoraka jogurta, bez obzira na dodatke i primijenjene termičke tretmane mlijeka.

Tabela 3. Izračunata statistika Tukey-og testa za pH tokom skladištenja probiotskog jogurta sa dodatkom inulina (IN) i različitim dodacima meda (M)

Table 3. Calculated statistics of the Tukey test for pH values during the storage time of probiotic yogurt with the addition of inulin (IN) and different concentrations of honey (M)

Dani čuvanja/ Days of storage	pH vrijednost/pH value									
	Uzorci jogurta/ Yogurt samples									
	TTM 85°C/20 min					TTM 95°C/10 min				
	K	1%IN	1%IN+2M	1%IN+4M	1%IN+6M	K	1%IN	1%IN+2M	1%IN+4M	1%IN+6%M
1	aA	aA	abA	bA	bA	abA	abA	abA	abA	abA
7	abB	aB	abAB	abB	abB	abB	abB	abB	abB	bB
14	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB
21	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB	aB

^{ab} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istom redu na nivou značajnosti $p < 0,05$

^{AB} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istoj koloni na nivou značajnosti $p < 0,05$

^{ab} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same row at the significance level $p < 0.05$

^{AB} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same columns at significance level $p < 0.05$

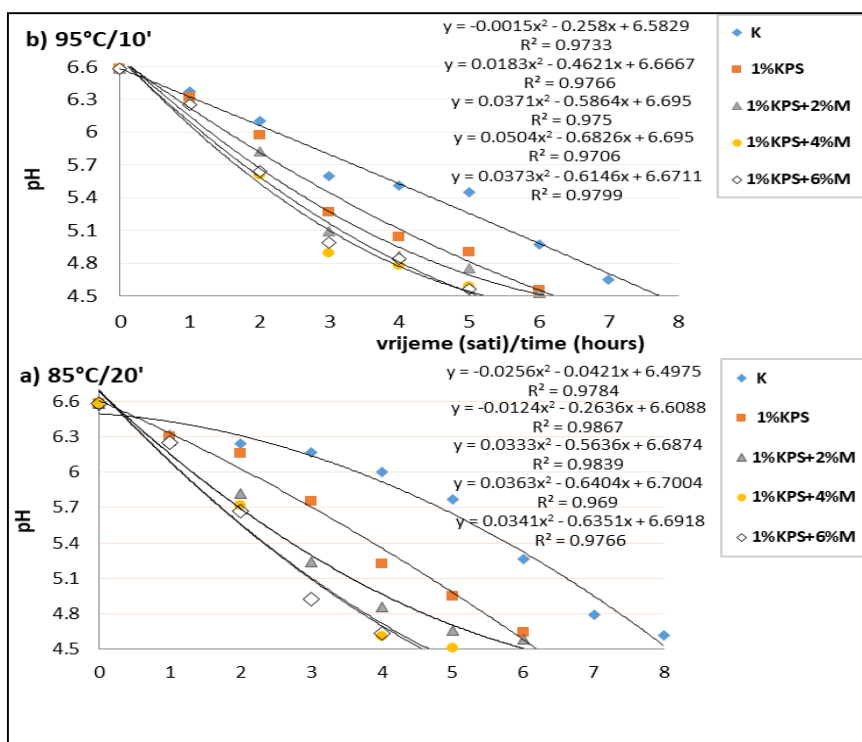
Promjena kiselosti tokom fermentacije i skladištenja tradicionalnog jogurta

Prema podacima datim na Slici 3,a (TTM 85°C/20 min), uočljivo je da je najkraće prosječno vrijeme fermentacije bilo kod uzoraka sa 1%KPS+4%M i 1%KPS+6%M (4 sata). Za 5 sati fermentisali su uzorci sa 1%KPS i 1%KPS+2%M, dok je za fermentaciju K uzorka bilo potrebno 7 sati.

Uzorci proizvedeni od mlijeka koje je prethodno zagrijavano na 95°C/10 min (Slika 3,b) i dodacima 1%KPS+4%M i 1%KPS+6%M završili su proces fermentacije za 4 sata, uzorci sa 1%KPS i 1%KPS+2%M fermentisali su za 5 sati, dok je K uzorku bilo potrebno 6 sati.

Linije trenda pada pH tokom fermentacije, kod svih analiziranih uzoraka, imale su karakteristike kvadratnih funkcija uz vrlo visoke koeficijente determinacije.

Prema statističkoj analizi (Tabela 4) uočava se da do trećeg sata fermentacije nema značajne razlike između pH vrijednosti uzoraka. Nakon trećeg sata kod uzoraka sa dodatkom KPS i kombinacijom KPS i meda značajno se smanjuju pH vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne uzorke, bez obzira na primijenjeni termički tretman mlijeka.



Slika 3. Promjena pH tokom fermentacije tradicionalnog jogurta sa dodatkom KPS i meda uz prethodni termički tretman mlijeka (TTM) na: a) 85°/20 min i b) 95°/10 min

Figure 3. Change of pH during fermentation of traditional yogurt with the addition of KPS and honey with previous thermal treatment of milk (TTM) to: a) 85° / 20 min and b) 95° / 10 min

Promjena pH vrijednosti tokom skladištenja tradicionalnog jogurta proizvedenog od mlijeka termički tretiranog na 85°C/20 min ili 95°C/10 min sa dodatkom 1%KPS, 1%KPS+2%M, 1%KPS+4%M i 1%KPS+6%M prikazana je na Slici 4.

Na osnovu Slike 4,a (TTM 85°C/20 min) uočava se da je tokom 21 dana skladištenja došlo do blagog pada pH vrijednosti: za K uzorak za 0,19 pH jedinica, za uzorak sa KPS je 0,05 pH jedinica, a za uzorke koji sadrže kombinacije KPS i 2, 4 i 6 % meda pH vrijednosti su se mijenjale za 0,02, 0,14 i 0,10 pH jedinica. Svi uzorci su imali vrlo visoke koeficijente determinacije, a linije opadanja pH vrijednosti su za K uzorak i uzorak sa 4% meda imale karakteristike kvadratnih funkcija, a ostale linije karakteristike linearnih funkcija.

Kod uzoraka sa oštrijim termičkim tretmanom mlijeka (95°C/10 min, Slika 4,b) pad pH vrijednosti je više izražen u periodu od 1. do 7. dana i tokom 21 dana skladištenja je iznosio: za K uzorak 0,31 pH jedinica, za uzorak sa KPS 0,19 pH jedinica, dok je ta promjena kod uzoraka sa 2, 4 i 6% meda iznosila za 0,18, 0, 16 i 0, 12 pH jedinice.

Tabela 4. Izračunata statistika Tukey-og testa za pH vrijednosti tokom fermentacije tradicionalnog jogurta sa dodatkom KPS i različitim dodacima meda (M)

Table 4. Calculated statistics of the Tukey test for pH values during the fermentation of traditional yogurt with the addition of KPS and different concentrations of honey (M)

Vrijeme ²	pH tokom fermentacije/ pH during fermentation									
	Uzorci jogurta/ Yogurt samples									
	TTM 85°C/20 min					TTM 95°C/10 min				
	K	1%	1%KPS+4%M	1%KPS+4%M	1%KPS+6%M	K	1%KPS	1%KPS+2%M	1%KPS+4%M	1%KPS+6%M
0	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
2	a	a	ab	ab	ab	a	ab	ab	b	b
3	a	a	bcd	b	b	a	be	bd	b	b
4	a	d	bd	b	bd	a	bcd	bd	bd	bd
5	a	b	b	b	b	a	bc	b	b	b
6	a	b	b	-	-	a	b	b	-	-
7	a	-	-	-	-	a	-	-	-	-
8	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{abcdef} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istom redu na nivou značajnosti $p < 0,05$.

^{abcdef} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same row at the significance level $p < 0.05$.

Promjena pH vrijednosti tokom skladištenja tradicionalnog jogurta proizvedenog od mlijeka termički tretiranog na 85°C/20 min ili 95°C/10 min sa dodatkom 1%KPS, 1%KPS+2%M, 1%KPS+4%M i 1%KPS+6%M prikazana je na Slici 4.

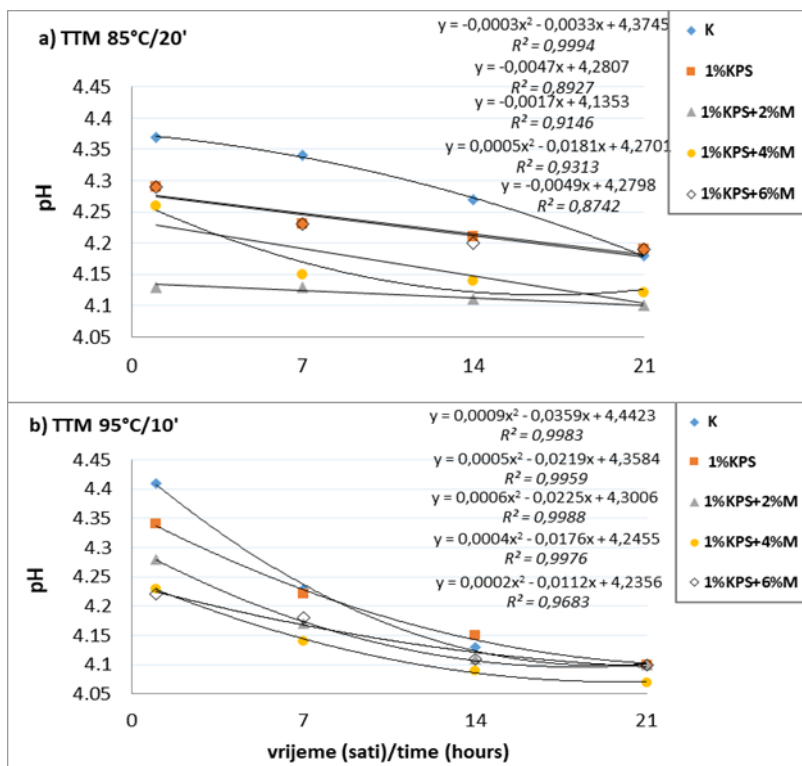
Na osnovu Slike 4,a (TTM 85°C/20 min) uočava se da je tokom 21 dana skladištenja došlo do blagog pada pH vrijednosti: za K uzorak za 0,19 pH jedinica, za uzorak sa KPS je 0,05 pH jedinica, a za uzorke koji sadrže kombinacije KPS i 2, 4 i 6 % meda pH vrijednosti su se mijenjale za 0,02, 0,14 i 0,10 pH jedinica. Svi uzorci su imali vrlo visoke koeficijente determinacije, a linije opadanja pH vrijednosti su za K uzorak i uzorak sa 4% meda imale karakteristike kvadratnih funkcija, a ostale linije karakteristike linearnih funkcija.

Kod uzoraka sa oštrijim termičkim tretmanom mlijeka (95°C/10 min, Slika 4,b) pad pH vrijednosti je više izražen u periodu od 1. do 7. dana i tokom 21 dana skladištenja

² Vrijeme fermentacije (sati) / Fermentation time (hours)

je iznosio: za K uzorak 0,31 pH jedinica, za uzorak sa KPS 0,19 pH jedinica, dok je ta promjena kod uzoraka sa 2, 4 i 6% meda iznosila za 0,18, 0, 16 i 0, 12 pH jedinice.

Može se zaključiti da su promjene pH vrijednosti tokom skladištenja kod svih uzoraka imale pravilan tok sa vrlo visokim koeficijentima determinacije, dok su krive u grafikonu imale karakteristike kvadratnih funkcija.



Slika 4. Promjena pH vrijednosti tokom skladištenja tradicionalnog jogurta u zavisnosti od dodatka (KPS i meda) i primijenjenih TTM

Figure 4. Change of pH value during storage of traditional yogurt depending on the addition (KPS and honey) and applied TTM

Tokom skladištenja nije bilo statistički značajne razlike ($p > 0,05$) između pH vrijednosti različitih uzoraka jogurta, bez obzira na dodatke i primijenjene termičke tretmane mlijeka (Tabela 5).

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je dodatak KPS ubrzao proces fermentacije u odnosu na K uzorke bez obzira na termički tretman mlijeka. To je u skladu sa literaturnim podacima Milanović i sar. (2009) koji govore da dodatak KPS i naknadna termička obrada mlijeka skraćuje vrijeme koagulacije, jer tokom acidifikacije proteini surutke, povezani sa kazeinskim micelama, reaguju i međusobno na pH vrijednosti bliskoj pH vrijednosti njihove izoelektrične tačke i tako doprinose bržoj koagulaciji mlijeka. Do sličnih rezultata su došli i Stijepić i sar. (2018). S druge strane, Puvanenthiran i sar. (2002) su utvrdili da dodatak KPS u mlijeko nakon termičkog tretmana ima suprotan efekat. Prema ovim autorima produžava se vrijeme

fermentacije zbog povećanog sadržaja proteina koji povećavaju puferski kapacitet jogurta.

Rezultati ispitivanja su takođe pokazali da je dodatak meda, uz dodatak KPS, dodatno djelovao na skraćenje fermentacije, što je vidljivo iz bržeg sniženja pH vrijednosti u uzorcima gdje postoji kombinacija KPS+M, u poređenju s uzorcima bez meda. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima Glušac i sar. (2015) koji su utvrdili da je fermentacija uzoraka sa medom (2% i 4%) i uzoraka jogurta obogaćenih sa KPS završena ranije od kontrolnih uzoraka. S druge strane, neki rezultati istraživanja uticaja dodavanja suncokretovog meda u mlijeko prije fermentacije su pokazali da med nije smanjio vrijeme fermentacije jogurta (Sert et al., 2011), što nije u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Tabela 5. Izračunata statistika Tukey-og testa za pH tokom skladištenja tradicionalnog jogurta s dodacima KPS i meda

Table 5. Calculated statistics of the Tukey pH test during storage of traditional yogurt with KPS and honey addition

Dani čuvanja/ Storage days	pH vrijednost/ pH value									
	Uzorci jogurta/ Yogurt samples									
	TTM 85°C/20 min					TTM 95°C/10 min				
	K	1% KPS	1%KPS+2%M	1%KPS+4%M	1%KPS+6%M	K	1% KPS	1%KPS+2%M	1%KPS+4%M	1%KPS+6%M
1	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA
7	aAB	aA	aA	aA	aA	aAB	aA	aA	aA	aA
14	aB	aA	aA	aA	aA	aB	aA	aA	aA	aA
21	aB	aA	aA	aA	aA	aB	aA	aA	aA	aA

^{ab} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istom redu na nivou značajnosti $p < 0,05$

^{AB} Tukey testom potvrđena statistička značajnost razlike između srednjih pH vrijednosti uzoraka jogurta u istoj koloni na nivou značajnosti $p < 0,05$

^{ab} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same row at the significance level $p < 0.05$

^{AB} Tukey test confirmed the statistical significance of the difference between the mean pH values of yogurt samples in the same column at the significance level $p < 0.05$

Zaključak

Rezultati ispitivanja pokazali su da je dodatak inulina (u proizvodnji probiotkog jogurta) i koncentrata proteina surutke (u proizvodnji tradicionalnog jogurta) pozitivno uticao na brzinu fermentacije mlijeka. Suplementacija uzoraka medom dodatno je uticala na ubrzanje procesa fermentacije. Uočena je stabilnost u pH vrijednosti tokom skladištenja kod svih uzoraka. Različiti termički tretmani

mlijeka nisu bitnije uticali na promjenu pH vrijednosti tokom fermentacije, niti tokom skladištenja.

Literatura

- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol.*,5:1065.
- Codex Alimentarius Commission (2003): *CODEX standard for fermented milks. Codex Stan* 243-2003
- Coskun, F., Karabulut Dorocan, L. (2019). Effects of pine honey on the physicochemical, microbiological and sensory properties of probiotic yoghurt, *Food Sci. Technol, Campinas*, 39 (Suppl. 2): 616-625
- de Oliveira, M.N., (2014). Fermented milks: fermented milks and yogurt. In: *Encyclopedia of Food Microbiology, second edition. Elsevier Inc.*, pp. 908–922.
- Glušac, J., Stijepić, M., Đurđević Milošević, D., Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V. 2015. Growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in traditional yoghurt enriched by honey and whey protein concentrate. *Iranian Journal of Veterinary Research* 16 (3), 249-254.
- Guenard-Lampron, V., St-Gelais, D., Villeneuve, S., & Turgeon, S. L. (2020). Effect of stirring operations on changes in physical and rheological properties of nonfat yogurts during storage. *Journal of Dairy Science*, 103, 210–214.
- Kajiwara, S., Gandhi, H., Ustunol, Z. (2002). Effect of the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J Food Prot.* 65(1), 214
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci.* (1) 1–13
- Lucey, J.A., Singh, H., (2003). Acid coagulation of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry—1. Proteins. Springer US*, pp. 1001–1025.
- Milanović, S., Ilić, M., Đurić, M., & Carić, M. (2009). Effect of transglutaminase and whey protein concentrate on textural characteristics of low fat probiotic yoghurt. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 64, 388-392.
- Mudgil, D., Barak, S., (2019). Dairy-based functional beverages. In: *Milk-Based Beverages: Volume 9: The Science of Beverages. Elsevier*, pp. 67–93.
- Puvanenthiran A, Williams RPW & Augustin MA 2002 Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal* 12 383–391
- Pravilnik o kvalitetu svježeg sirovog mlijeka (Službeni glasnik Republike Srpske, 34/06).
- Riazi, A., Ziar, H. (2008). Growth and viability of yoghurt starter organisms in honey-sweetened skimmed milk, *African Journal of Biotechnology*, 7, pp.2055-2063.
- Sarkar, S., Chandra, S. (2020). Honey as a functional additive in yoghurt—a review, *Nutrition & Food Science*, Vol. 50 No. 1, pp. 168-178. <https://doi.org/10.1108/NFS-03-2019-0090>
- Sert, D., Akin, N., & Dertli, E. (2011). Effects of sunflower honey on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics in set type yoghurt during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, 64 (1) 99-107
- Settachaimongkon, S., van Valenberg, H. J., Gazi, I., Nout, M. R., van Hooijdonk, T. C., Zwietering, M. H., et al. (2016). Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. *Food Microbiology*, 59, 14–22.

- Sfakianakis, P., Tzia, C., (2014). Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: *a review. Foods* 3 (1), 176–193.
- Stijepić, M., Glušac J., Đurđević Milošević D., Kalaba V. (2018). *Physicochemical properties of acidophilus milk with different protein supplements addition*. XII Conference of Chemists, Technologists and Environmentalists of Republic of Srpska Proceedings, Banja Luka, Republic of Srpska, pp. 359-368
- Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević Milošević, D., Pešić-Mikulec, D. (2013). Physicochemical characteristics of soy probiotic yogurt with inulin addition during the refrigerated storage. *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (2), p.8077-8085.
- Stijepić, M., Grujić, R., Malinović, N., Stijepić, I. (2021). Med kao suplement u proizvodnji probiotičkog jogurta, VI kongres o pčelarstvu i pčelinjim proizvodima sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, BiH, 20-21. Novembar, Zbornik radova 6(1), 95-102
- Stijepić, M., Milanović, S., Djurdjević-Milošević, D., Djurić, M., Glušac, J., Kanurić, K., Vukić, V. (2012). Effects of honey and whey protein concentrate addition on textural and sensory properties of probiotic yoghurt. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 67(3), p.277-280.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt: Science and technology*, Elsevier.
- Unal, G. i Ozer, E. (2018). Utjecaj dodatka inulina i rezistentnog škroba na teksturu i senzorska svojstva probiotičkog jogurta. *Mljekarstvo*, 68 (3), 192-200.
- Varga, L., Szigeti, J., Gyenis, B. (2006). Influence of chicory inulin on the survival of microbiota of a probiotic fermented milk during refrigerated storage. *Annals of Microbiology* 56 (2), 139–141. IF: 0.427

INFLUENCE OF SELECTED FACTORS ON THE SPEED OF FERMENTATION MILK AND YOGHURT STORAGE TIMES

Milka Stijepić¹, Nikolina Malinović¹

¹School of Applied Medical Sciences Prijedor, Republic of Srpska,
Bosnia and Herzegovina

Abstract: *Acidity is one of the most important characteristics of yoghurt quality and this parameter can have a very negative impact on the product quality. The purpose of the study was to examine the effect of the acacia honey addition in different concentrations (2%, 4% and 6%) in combination with 1% inulin and 1% whey protein concentrate and milk thermal treatment (85°C/20min or 95°C/10min) on the milk fermentation speed, inoculated with probiotic and yoghurt cultures in a concentration of 0.0025% w/w. Samples without supplements were also produced. Fermentation with mixed probiotic bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium ssp.*) was performed at 37°C and with yoghurt cultures (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*) at 41°C until pH 4.6 was reached. The samples were rapidly cooled to 20°C and placed in a refrigerator at 4°C±1. Measurements of the pH samples value (pH 510/mV Meter, Eutech Instruments Oakton, England) were performed on 1st, 7th, 14th, and 21st storage day. Differences in fermentation duration and speed were determined. The addition of inulin and whey protein concentrate, as well as their combinations with honey, significantly accelerated the fermentation process ($p < 0.05$) compared to control samples, regardless of the applied milk thermal treatment. However, the different applied cultures did not affect the speed of milk fermentation. During storage in all probiotic samples and in traditional yoghurt (95°C/10min), a significant difference in pH was observed ($p < 0.05$) between samples on the 1st compared to 7th, 14th and 21st day. For traditional yoghurt samples whose milk was treated at 85°C/20min there was no statistical difference with respect to the storage time. In general, the addition of honey, inulin and KPS significantly accelerated the fermentation speed, while in all samples during storage there was a stabilization of the change in pH value from the 7th storage day.*

Key words: *yoghurt, probiotic, honey, inulin, KPS, pH*