

¹TATJANA H. TOMIĆ
²SNEŽANA T. JOVANOVIĆ
²OGNJEN D. MAČEJ

¹Frikom AD, Beograd

²Poljoprivredni fakultet, Zemun

UDK 663.67:637.047

DEFINISANJE TEHNOLOŠKIH PARAMETARA PROIZVODNJE PROBIOTSKOG SLADOLEDA

Globalni porast potrošnje mlečnih probiotskih proizvoda odražava se i na pojavu sladoleda sa probiotskim kulturama. Brojne studije pokazuju pozitivan uticaj probiotika na zdravlje. U industriji mleka kao probiotici najčešće se koriste selekcionirani sojevi iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.

U radu su prikazani rezultati dvogodišnjeg zajedničkog rada Frikoma i Danisco-a na definisanju i uvođenju prvog probiotskog sladoleda na naše tržište. Istraživanja su sprovedena praćenjem populacije *L. acidophilus* u 2 krem sladoleda, sa ukusom vanile i jabuke, dodate u različitim fazama tehnološkog procesa proizvodnje i u različitim periodima skladištenja i čuvanja.

Dobijeni rezultati iskorišćeni su kao osnov za kreiranje porodičnog probiotskog sladoleda Frikoma ad.

Ključne reči: probiotski sladoled • *L. Acidophilus* • funkcionalni proizvod

1. UVOD

Probiotski sladoled svrstava se u grupu funkcionalnih proizvoda saglasno usvojenim međunarodnim definicijama po kojima se proizvod može smatrati funkcionalnim ukoliko je naučno potvrđeno da pozitivno utiče na određene funkcije u organizmu, pored uobičajenog nutritivnog dejstva, u smislu promocije zdravlja i smanjenja rizika od bolesti (Berner i sar., 1988).

Adresa autora:

Tatjana Tomić, dipl. ing. Industrija smrznute hrane FRIKOM ad, Zrenjaninski put bb, 11213 Beograd, SCG
 011 2074 185; 063 290 682;
tanja.tomic@frikom.co.yu

Brojne studije potvrđuju pozitivan uticaj probiotskih kultura na zdravlje, od kojih su najznačajniji: antimikrobna aktivnost, redukcija ukupnog holesterola, ublažavanje probavnih smetnji, intolerancija laktoze, jačanje imunog sistema, diareja (Conway i sar., 1987, Sanders, 1998b).

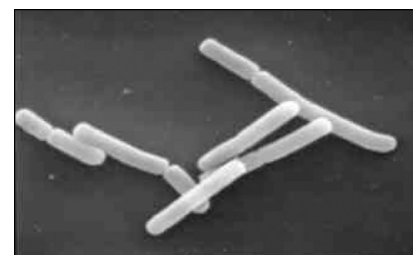
Sladoled sa dodatkom jedne ili više probiotskih kultura postaje proizvod sa kvalitetom više; pored potvrđenog i popularnog senzornog profila, predstavlja spoj užitka dopunjenog funkcionalnošću. Ova nova generacija proizvoda beleži trend rasta, a od ove sezone nalaziće se u ponudi porodičnih sladoleda i u našoj zemlji.

Današnje tržište probiotskih proizvoda beleži rast u brojnim kategorijama prehrambenih proizvoda (BioGaia, 2004). Razumevanje važnosti funkcionisanja gastrointestinalnog trakta dugo je bilo nerazumljivo i neprihvatljivo za mnoga tržišta. Međutim, brojne publikacije i studije približile su vrednost funkcionalne hrane i konačno uticale na šire korišćenje probiotika (Stataton, 2001). Konačni dokaz opšte prihvatljivosti probiotskih proizvoda je i njihovo prisustvo u industriji brze hrane, kakva je npr. zajednička licenca BioGaia i McDonalda, ostvarena u probiotskom sladoledu *Life-Top Straw* u SAD-u.

Za probiotske mlečne proizvode najčešće su korišćeni selekcionirani probiotski organizmi iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Conway i sar., 1996).

L. acidophilus NCFM® prvi put je izolovan i opisan ranih 70-ih godina u istraživačkoj mikrobiološkoj laboratoriji Univerziteta Severne Karoline, po čemu je i dobio komercijalnu oznaku

(NCFM®= North Carolina Food Microbiology). Hood i sar. (1987) su proučavali karakteristike soja *Lactobacillus*. Pored Univerziteta, kao partner u razvoju ovog soja uključen je i Danisco (Barrangou i sar., 2003). Komercijalna primena ovog probiotika danas je prisutna naročito na tržištu Severne Amerike.



Slika 1. SNIMAK ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM ČELIJA *L. ACIDOPHILUS* NCFM® (SANDERS, 2001)

Figure 1. ELECTRON MICROGRAPHY OF *L. ACIDOPHILUS* NCFM® CELLS (SANDERS, 2001)

Generalni zahtev kod probiotskih mlečnih proizvoda je da se oni mogu deklarirati kao takvi samo u slučaju kad 1g proizvoda sadrži najmanje 10⁶ živih ćelija (cfu/ml) (Pravilnik, 2002).

Prema Modler i sar. (1990), probiotske bakterije u sladoled mogu biti inokulirane na različite načine:

- dodatkom fermentisanog jogurta sa probiotskim kulturama u sladolednu smešu;
- fermentacijom sladoledne smeše sa probiotskim kulturama;
- direktnim dodavanjem probiotika u sladolednu smešu pre friziranja.

U periodu od proizvodnje, pa sve do konzumiranja proizvoda ili do kraja roka upotrebe proizvoda, postoji mnogo faktora koji mogu uticati na broj živih ćelija probiotske kulture, što dokazuju u studije Sultana i sar. (2000). Parametri koji se moraju uzeti u obzir su: opšta stabilnost i druge funkcionalne osobine probiotske kulture, tehnološke operacije u proizvodnji sladoleda i fizičko-hemijske karakteristike finalnog proizvoda (Ravula i Shah, 1998).

Prema Hekmat-u (1992), niska temperatura skladištenja zamrznutog sladoleda je idealna za dug period preživljavanja bakterija. Inkorporacija probiotskih bakterija u sladoled mlečne osnove, čiji je pH u intervalu 6.5–6.7, ne predstavlja problem za aktivnost ovih mikroorganizama. Laroia i sar. (1991) su ispitivali mogućnosti preživljavanja probiotskih kultura i u voćnim sladoledima, koji imaju niže vrednosti pH u odnosu na mlečne sladolede. Na taj način došlo se do podataka koji su omogućili da se ponuda probiotskih sladoleda ostvari u praktično svim formulacijama sladoleda.

2. MATERIJAL I METODI

Ogledi su rađeni u pilot laboratoriji Danisco-a (Arhus, Danska) u periodu maj 2004. godine – februar 2006. godine. Rezultati ispitivanja su poslužila kao osnov za definisanje i realizaciju prvog probiotskog sladoleda na našim prostorima. U ogledima je korišćen soj *L. aci-*

dophilus NCFM®, proizvođača Danisco (Danska).

Kao osnov za komparativno poređenje efekata primene *L. acidophilus* NCFM® korišćena su dva krem sladoleda – sa ukusom vanile i jabuke, istog hemijskog sastava (zastupljen isti sadržaj mlečne masti, obranog mleka u prahu, šećera, glukoznog sirupa, integrisanog emulgatora/stabilizatora, arome vanile). Kod sladoleda sa ukusom jabuke uključen je jabuka koncentrat i zelena boja, a konačna kiselost standardizovana je dodatkom limunske kiseline.

2.1. Postupak proizvodnje sladoleda

1. U izradi sladoledne smeše primenjene su sledeće tehnološke faze:
2. Rastvaranje mleka u prahu u vodi i pripremno zagrevanje na 60°C
3. Sukcesivno dodavanje šećera, sirupa, otopljenog maslaca, uz povećanje temperature
4. Zagrevanje smeše na 65°C i održavanje na toj temperaturi tokom 15 minuta
5. Dvostepena homogenizacija na 72°C, sa radnim pritiskom 100/40bara
6. Pasterizacija na 85°C tokom 30 sekundi
7. Hlađenje na 4°C
8. Inokulacija sa *L. acidophilus* NCFM® (CFU 1x10⁸ u 50g sladoledne smeše)

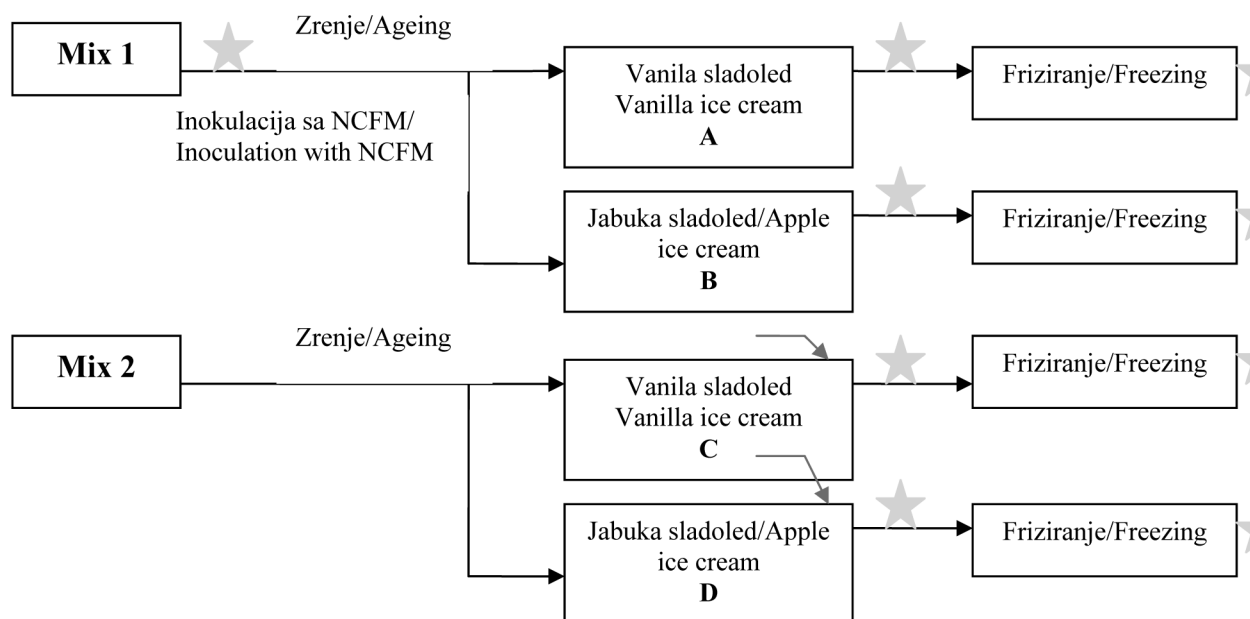
Inokulacije kulture probiotika u označene sladoledne smeše je obavljena pre faze zrenja i nakon faze zrenja, što je prikazano na slici 2. Sladoledne smeše gde je inokulacija vršena pre zrenja, označene su u slučaju sladoleda sa ukusom vanile kao uzorak A, a za sladoled sa ukusom jabuke uzorak B. Sladoled sa ukusom vanile, gde je inokulacija vršena pre friziranja označen je kao uzorak C, odnosno uzorak D za sladoled sa ukusom jabuke.

2.2. Praćenje fizičko-hemijskih parametara kvaliteta sladoleda

- Određivanje suve materije u sladoledu vršeno je referentnom metodom sušenja IDF/ISO/AOAC (Carić i sar., 2000)
- pH sladoleda određivan je potenciometrijski korišćenjem pH-metra Sentron 1001

2.3. Identifikacija *L. acidophilus* NCFM® u sladoledu

Za identifikaciju specijalno ovog soja korišćena je specifična metoda. Inokulacija je standardna korišćenjem MRS-podloge, inkubacija na 37°C u anaerobnim uslovima u toku 48 sati (Müller, 2004).



Slika 2. INOKULACIJA SLADOLEDNE SMEŠE SA NCFM
Figure 2. INOCULATION NCFM IN ICE CREAM

2.4. Praćenje populacije *L. acidophilus* NCFM® u sladolednoj smeši i sladoledu

Stepen preživljavanja populacije probiotika NCFM® u sladolednoj smeši i sladoledu je praćen u različitim fazama tehnološkog procesa.

Za sladolede, kod kojih je inokulacija probiotikom vršena pre zrenja (Uzorci A i B) uvedena je kontrolna tačka T0.

Praćenje populacija NCFM rađeno je u 5 karakterističnih tačaka za sve uzorke sladoleda (A, B, C, D) i to u sledećim kontrolnim tačkama, označenim kao:

T1 – pre friziranja

T2 – nakon friziranja

T3 – inokulacija pre zrenja i nakon perioda skladištenja od 9 dana

T4 – inokulacija pre zrenja i posmatranje nakon perioda skladištenja od 2 meseca

T5 – inokulacija pre zrenja i posmatranje nakon perioda skladištenja u periodu dužem od 1 godine.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. Parametri kvaliteta uzoraka sladoleda

Osnovni parametri kvaliteta sladoleda prikazani su u tabeli 1.

3.2. Praćenje populacije NCFM u sladolednoj smeši i sladoledu

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 3, može se uočiti da u sladolednim smešama kod kojih je inokulacija vršena pre zrenja, nema značajnijeg pada populacije probiotika. Kod sladoleda sa ukusom jabuke (uzorak B), populacija mikroorganizama stagnira i nakon procesa friziranja i nakon skladištenja od 9 dana. Dužim skladištenjem (u periodu od 2 meseca do 1 godine), primetan je pad populacije NCFM, osim kod sladoleda sa ukusom vanile (uzorak A), gde se uočava izvestan rast populacije tokom jednogodišnjeg skladištenja.

U smešama gde je inokulacija sa probioticima vršena pre friziranja (kontrolna tačka-T1), uočava se linearan pad populacije mikroorganizama u svim uzorcima, osim u slučaju sladoleda sa ukusom jabuke (uzorak D), gde populacija probiotika raste nakon perioda skladištenja dužem od 1 godine.

Dobijeni pokazatelji poslužili su da se opredelimo za inokulaciju probiotika u sladolednu smešu pre zrenja, jer se populacija mikroorganizama najbolje održala u proizvodu u uslovima dužeg

Tabela 1. SASTAV SLADOLEDA
Table 1. FORMULATION OF ICE CREAM MIX

	A %	B %	C %	D %
Voda / Water	59.49	52.83	59.49	52.83
Obrano mleko u prahu / Skim Milk Powder	10	10	10	10
Šećer / Sugar	12	12	12	12
Glukozni sirup / Glucose syrup	6	6	6	6
Maslac / Milkfat	12	12	12	12
E/S / Meyrogen IC 2000	0.50	0.50	0.50	0.50
Aroma vanile / Flavour vanilla	0.01	0.01	0.01	0.01
Jabuka konc. 65°Bx / Apple concentrate 65°Brix	–	6.67	–	6.67
Total	100%	100%	100%	100%
Limunska kiselina / Citric acid	–	X	–	X
Boja zelena / Green colour	–	2 ml	–	2 ml
SM/TS:	39.03%	39.03%	39.03%	39.03%
pH:	6.60	5.20	6.60	5.20

Uzorak / Sample

A – sladoled sa ukusom vanile, inokulacija sa NCFM® vršena pre zrenja / *vanilla ice cream, inoculation with NCFM® before ageing*

B – sladoled sa ukusom jabuke, inokulacija sa NCFM® vršena pre zrenja / *apple ice cream, inoculation with NCFM® before ageing*

C – sladoled sa ukusom vanile, inokulacija sa NCFM® vršena pre friziranja / *vanilla ice cream, inoculation with NCFM® before freezing*

D – sladoled sa ukusom jabuke, inokulacija sa NCFM® vršena pre friziranja / *apple ice cream, inoculation with NCFM® before freezing*

skladištenja kakvo je i realno prisutno u našoj proizvodnoj praksi.

3.3. Preživljavanje probiotika u periodu skladištenja dužem od 1 godine

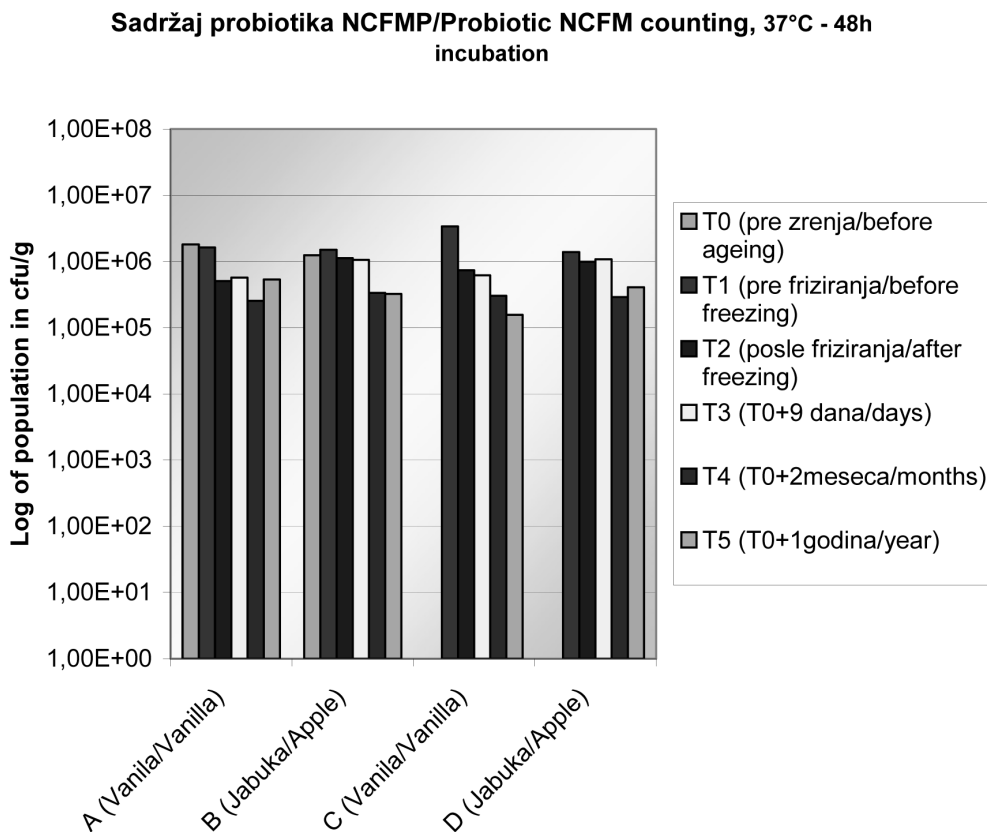
Na slici 4 prikazani su rezultati dobijeni praćenjem populacije probiotika u gotovom proizvodu skladištenom u periodu dužem od 1 godine.

Na slici 4 se vidi da je u ispitivanim uzorcima, skladištenim u periodu dužem od 1 godine, najveći stepen preživljavanja populacije probiotika zabeležen kod sladoleda sa ukusom vanile, inokuliranih zrenja (Uzorak A).

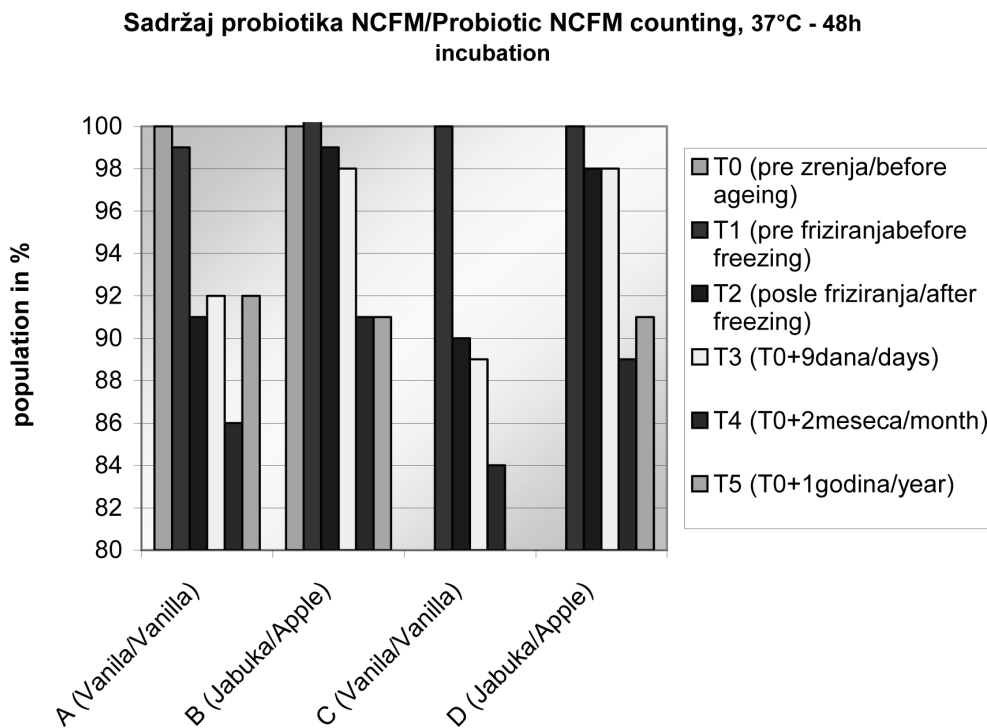
Stepen preživljavanja probiotika u uzorcima skladištenim u periodu dužem

od 1 godine u ostalim posmatranim karakterističnim pokazateljima (T1, T2, T3, T4) nisu imali signifikantan značaj, s obzirom na prirodu dalje manipulacije industrijskog sladoleda.

Dobijeni pokazatelji uticali su na konačan izbor sladoledne smeše za naš probiotički sladoled. Krem sladoled sličnog sastava kao sladoled sa ukusom vanile (Uzorak A), prilagođen je izabranoj formi sladoleda. Prema Tomić i sar. (1998), porodični krem sladoled ima naglašenu soft konzistenciju, nežnu kremastu strukturu. Stepem slasti proizvoda i finalna konzistencija prilagođeni su navikama naših potrošača.

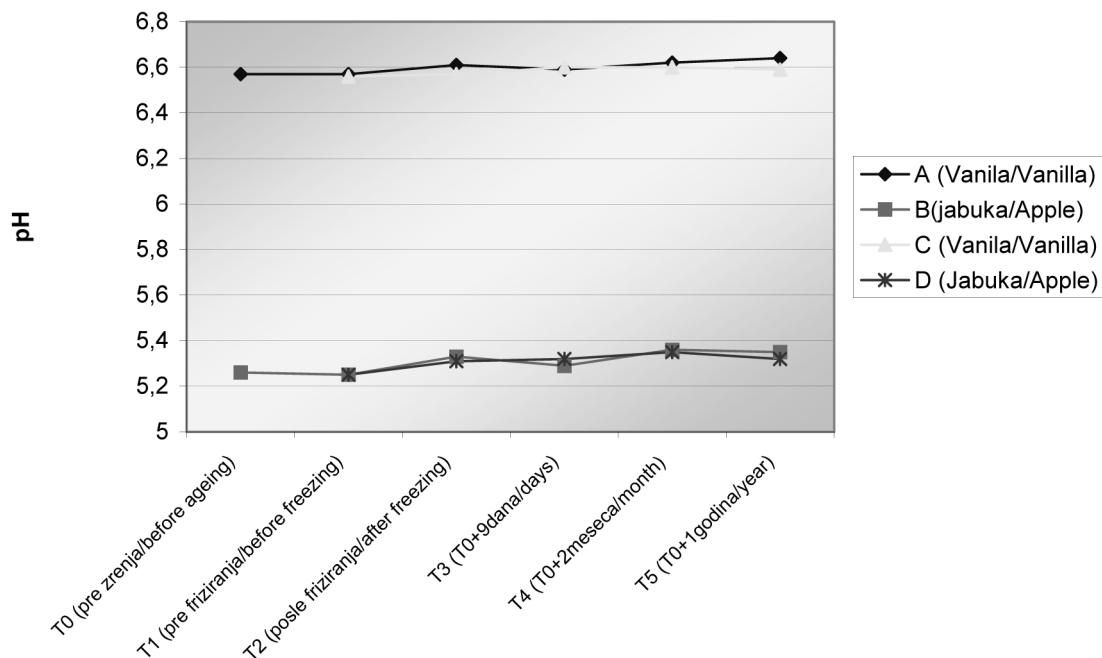


Slika 3. POPULACIJA NCFM U SLADOLEDNOJ SMEŠI I SLADOLEDU
 Figure 3. NCFM POPULATION IN MIX AND ICE CREAM



Slika 4. PREŽIVLJAVANJE NCFM U PERIODU SKLADIŠTENJA DUŽEM OD 1 GODINE
 Figure 4. SURVIVAL OF NCFM OVER ONE YEAR OF STORAGE

Sadržaj probiotika NCFM/Probiotic NCFM counting, 37°C - 48h incubation



Slika 5. VREDNOSTI PH TOKOM SKLADIŠTENJA UZORAKA DUŽE OD 1 GODINE
Figure 5. PH VALUES OVER ONE YEAR OF STORAGE

3.4. Promena pH vrednosti sladoleda

Na slici 5 prikazane su vrednosti dobijene praćenjem pH vrednosti u različitim periodima tehnološkog procesa proizvodnje i skladištenja.

Kao što se sa slike 5 može videti, tokom skladištenja dužem od godine dana nije dolazilo do bitne promene vrednosti pH kod svih ispitivanih uzoraka sladoleda, a dobijeni rezultati poslužili su za definisanje Frikomovog probiotskog sladoleda, čije su konačne pH vrednosti bile 6.59

ZAKLJUČAK

Na osnovu analize dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Zapaženo je značajno smanjenje broja ćelija *L. acidophilus* NCFM® tokom friziranja;
- Nakon perioda skladištenja proizvoda dužeg od jedne godine, približno 90% bakterija preživljava (izuzev sladoleda sa ukusom vanile – uzorak C, gde je zabeležen stepen preživljavanja samo 79%);
- Nema značajnijih razlika u preživljavanju sojeva kod dva sladoleda sa ukusom vanile i jabuke u posmatranim tačkama (sa inokulacijom pre i posle zrenja);

- U sladoledima sa ukusom vanile uočen je manji stepen preživljavanja kada je inokulacija vršena pre faze procesa friziranja, u periodu skladištenja dužem od jedne godine;
- U periodu skladištenja dužem od jedne godine, pH vrednosti kod svih ispitivanih sladoleda (A, B, C i D) nisu bitno promenjene;
- Inokulaciono doziranje od 1×10^8 živih ćelija kulture *L. acidophilus* NCFM® je optimalni prag za obezbeđenje zakonskog osnova deklarisanja sladoleda kao probiotskog.

LITERATURA

1. Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R. and Klaenhammer, T.R.: Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *L. acidophilus*. Proc Natl Acad Sci USA, 100 (2003) 8957–8962.
2. Berner, L.A. and O'Donnel, J.A.: Functional Foods and Health Claims Legislation: Application to Dairy Foods. International dairy Journal, (1988) 355–362.
3. BioGaia. BioGaia Annual Report. (2004).
4. Carić, M., Milanović, S., Vucelja, D.: Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda (2000.).
5. Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R.: Survival of lactic acid bacteria in the humans stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci., 70 (1987) 1–12.
6. Conway, P.L.: Selection criteria for probiotic microorganisms. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 5 (1996) 10–14.
7. Danisco: Product Description – PD 208154–2EN, *L. acidophilus* NCFM® LYO 10 DCU
8. Haynes, I.N. and Playn, M.J.: Survival of probiotic cultures in low-fat ice cream. Australian Journal of Dairy Technology, 57 (2002) 10–14.
9. Hekmat S., and McMahon, D.J.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. Journal of Dairy Science, 75 (1992) 1415–1422.
10. Hood, S.K., and Zottola, E.A.: Electron microscopic study of the adherence properties of *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci., 52 (1987) 791–805.
11. Laroia, S. and Martin, J.H.: Effect on pH survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. Cultured Dairy Products Journal, 26 (1991) 13–21.
12. Markakis, P.: Anthocyanins as Food Colors. J. Agric Food Chem, 21 52(8) (2004) 2411–20.
13. Modler, H.W., McKellar, R.C., Goff, H.D. and Mackie, D.A.: Using Ice Cream as a Mechanism to Incorporate Bifidobacteria and Fructooligosaccharides into the Human Diet. Cultured Dairy Products Journal, 25 (1990) 4–9
14. Müller H.: Méthode valable pour *L. acidophilus* NCFM®, Danisco (2004)
15. Ravula, R.R. and Shah, N.P.: Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in ferment-

- ted frozen dairy desserts. Australian Journal of Dairy Technology, 53 (1998) 175–179.
16. Sanders, M.E.: Development of consumer probiotics for the US market. British Journal of Nutrition, 80 (Suppl.2) (1998a) S213-S218.
 17. Sanders, M.E.: Overview of Funkcional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. International Dairy Journal, 8 (1998b) 341–347.
 18. Sanders, M.E., Klaenhammert, T.R.: The Scientific Basis of *L.acidophilus* NCFM® Functionality as a Probiotic. J. Dairy Sci., 84 (2001) 319–331.
 19. Stataton C., et al.: Market Potential for Probiotics. The American Journal of Clinical Nutrition, 73 (2001) 476–4783.
 20. Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. And Kailasapathy, K.: Survival of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* and the measurement of β -galactosidase activity i probiotic ice cream (2000).
 21. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za mleko, mlečne proizvode, kompozitne mlečne proizvode i starter kulture, SL SRJ, 26/2002.
 22. Tomić, T., Jovanović. S., Mačej. O.: Važniji parametri tehnološkog postupka proizvodnje «soft» sladoleda, Jugoslovenski mlekarški simpozijum «Savremeni trendovi u mlekarstvu», Zlatibor, 1998, Zbornik radova, 215–224.
 23. Tomić, T.Jovanović. S., Mačej.O.: Trendovi u proizvodnji sladoleda. Jugoslovenski mlekarški simpozijum «Savremeni trendovi u mlekarstvu», Zlatibor, 2004, Zbornik radova, 157–164.
 24. Vela, G.: Applied Food Microbiology, Star, CA (1997).
 25. Wright, C.T, and T.R. Klaenhammer: Calcium-induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. Appl. Environ 41 (1981) 807–815.

DEFINING OF THE TECHNOLOGICAL PARAMETERS IN THE PRODUCTION OF PROBIOTIC ICE CREAM

¹Tatjana H. Tomić, ²Snežana T. Jovanović, ²Ognjen D. Mačej

¹Frikom AD, Belgrade, ² Faculty of Agriculture, Zemun

Summary

Probiotics are live microorganisms which, when added in adequate amounts, provide health benefit on the host (FAO/WHO 2001). In the past few years, we have seen consummation increase of functional ice cream, which contains live probiotic bacteria.

Most probiotics are either *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *L. acidophilus* is naturally present in the human gastrointestinal tract, and in some traditional fermented dairy products, such as kefir. *L. acidophilus* NCFM® is a probiotic which was isolated and characterized in the food microbiology laboratories at North Carolina State University. Over 75 publications, more than 20 of which refer to human studies, in peer-reviewed journals, describe multi-faceted properties of *L. acidophilus* NCFM® regarding characterization safety and efficiency.

The incorporation of probiotics into ice cream would ideally also contain cultures selected for healthy benefits to the consumers. Survival of the *L. acidophilus* NCFM® was monitored during 9 days, 2 months, and over one year. Probiotic ice cream with *L. acidophilus* NCFM® was prepared at 4 different formulations of ice cream (Vanilla and Apple flavouring) and analyses were compared before ageing, before freezing, after freezing and during frozen storage at –20°C.

We demonstrated that probiotic ice cream is a suitable product which brings beneficial microorganisms such as *L. acidophilus* NCFM® to consumers. The results indicate that this form of direct culture addition could be optional method for producing a probiotic ice cream.

The bacteria can be grown to high numbers in ice cream and remain viable during storage.

Key words: Probiotic ice cream • *L.acidophilus* NCFM® • Functional food.