

¹ZORICA T. RADULOVIĆ¹DUŠANKA D. PAUNOVIĆ²MIRELA D. ILIČIĆ¹NEMANJA MIRKOVIĆ¹MILICA M. PETRUŠIĆ¹DRAGOJLO B. OBRADOVIĆ¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Srbija²Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

NAUČNI RAD

UDK: 663.88.014:637.146

Čajna gljiva nalazi sve veću primenu u proizvodnji inovativnih prehrambenih proizvoda, kako kod nas tako i u svetu. Ovakav trend se pripisuje pre svega njenim potencijalnim terapeutskim svojstvima. Hemizam ovakvog dejstva je još uvek predmet istraživanja, ali sasvim je sigurno da čajnu gljivu čini simbioza sirćetnih bakterija i kvasaca, koje mogu biti veoma raznovrsne, zavisno od porekla i geografskog regiona. Konzumiranje čajnog napitka ima veoma dugu tradiciju, ali primena čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka predstavlja novu tehnologiju, koja svakako može naći svoju perspektivu u industriji mleka. S obzirom da je sama tehnologija velikim delom determinisana, postavlja se pitanje održivosti proizvoda i njegovog kvaliteta tokom skladištenja.

U tom smislu, u radu je izvršeno ispitivanje promene mikrobiološke slike prisutnih bakterija i kvasaca čajne gljive tokom skladištenja od 10 dana. Za dobijanje fermentisanog mlečnog napitka, primenjen je inokulum čajnog napitka, u mleku sa različitim sadržajem mlečne masti (0,9% i 2,2%) u koncentraciji od 10%. Ispitana je sposobnost rasta sirćetnih bakterija, bakterija mlečne kiseline i kvasaca. Utvrđeno je da je ispitivana mikroflora bila veoma aktivna, pa je u 0-om danu broj laktokoka bio na nivou 10^5 ćelija/mL, sirćetnih bakterija 10^4 ćelija/mL i kvasaca i laktobacila 10^3 ćelija/mL. Nakon 10 dana skladištenja fermentisanog mlečnog napitka na 4°C vijabilnost sirćetnih bakterija je bila najveća i iznosila 10^8 ćelija/mL, laktokoka i kvasaca 10^4 ćelija/mL i laktobacila 10^3 ćelija/mL. Promena ispitivane mikroflora ukazuje na njenu dobru aktivnost u toku čuvanja fermentisanog mlečnog napitka. Međutim, veoma je važno ispitati i druga svojstva ovog proizvoda, kao što su senzorna svojstva, hemijski i nutritivni sastav.

Ključne reči: čajna gljiva • mikroflora • fermentisani mlečni napici

*Rad je deo istraživanja u okviru projekta TR 20008 "Funkcionalni fermentisani mlečni napitak – nova tehnologija" koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Adresa autora:

dr Zorica Radulović, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun, Tel. 011 2615-315; e-mail: zradulovic@agrif.bg.ac.rs

PROMENA MIKROFLORE ČAJNE GLJIVE TOKOM SKLADIŠTENJA FERMENTISANIH MLEČNIH NAPITAKA*

UVOD

Razvoj novih tehnologija u industriji mleka je veliki izazov, a koji ima sve veći značaj. Primena starter kultura i dobijanje mlečnih proizvoda je osnov na kome baziraju sve industrijske tehnologije proizvodnje mlečnih proizvoda. Međutim, kako se u oblasti razvoja tehnologija i starter kultura, sa klasičnim i novim funkcionalnostima, decenijama radi na poboljšanju i uvođenju novih tehnologija, korišćenje potpuno novih starter kultura u industriji mleka je inovacija, kako kod nas tako i u svetu. Jedna od pomenutih inovativnosti je i primena čajne gljive - kombuhe kao starter kulture u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. Poznato je da je napitak od čajne gljive ili kombuhe proizvod fermentacije simbiotske zajednice kvasaca i sirćetnih bakterija, nastao fermentacijom zelenog ili crnog čaja zaslađenog saharozom. Kako je osnovni šećer mleka laktoza, vršena su istraživanja o sposobnosti fermentacije laktoze čajnom gljivom (Reiss, 1994), a kasnije su Lončar i sar. (2001), Milanović i sar., (2002), Duraković i sar., (2008), Malbaša i sar. (2008, 2009) ispitivali aktivnost kombuhe u mleku. Razlog popularnosti čajne gljive - kombuhe je sve veći broj preporuka za njenu primenu kod jačanja imuno sistema, suzbijanja artritisa, prevenciji karcinoma i dr. Međutim, mora se naglasiti da povećani interes za zdravstvene efekte čajne gljive pobuđuje sve veći broj istraživanja, ali još uvek ne postoje čvrsti naučni dokazi (Greenwalt i sar. 2000).

Ovakve pretpostavke pobuđuju istraživanja u ovoj oblasti, od identifikacije mikroflora kombuhe, kao i njene sposobnosti rasta na različitim supstratima, do utvrđivanja metabolita koji nastaju njenom aktivnošću, o čemu

svedoče veliki broj literaturnih podataka (Zahoor i sar., 2006, Blanc, 1996, Lončar i sar., 2001). Međutim, istraživanja u ovoj oblasti su još uvek u razvoju, naročito ako se ima u vidu složenost mikroflora čajne gljive, neispitanost njihovog simbiotskog metabolizma i uticaj samih metabolita na senzorna i nutritivna svojstva fermentisanog mlečnog proizvoda. Sa druge strane, ostvarenje ovakve proizvodnje bi imalo i druge efekte, kako u proširenju asortimana fermentisanih mlečnih proizvoda, tako i u dobijanju novih proizvoda sa potencijalnim terapeutskim dejstvom.

Cilj ovog rada je bio da se ispita promena broja mikroorganizama čajne gljive u fermentisanim mlečnim napicima i ispita njihova vijabilnost kako u toku same fermentacije, tako i tokom njihovog čuvanja u uslovima skladištenja na 4°C.

MATERIJAL I METODI

U radu su proizvedeni fermentisani mlečni napici inokulacijom kombuha čajnog napitka. Inokulum je primenjen u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka sa različitim sadržajem mlečne masti (0,9% i 2,2%). Inokulacija mleka je izvršena sa 10% inokuluma čajnog napitka. U samom inokulumu i mleku pre inokulacije, kao i mleku nakon inokulacije i nakon 10 dana skladištenja na 4°C, praćen je broj prisutnih ćelija kvasaca, bakterija sirćetne kiseline i bakterija mlečne kiseline.

Određivanje broja ćelija sirćetnih bakterija, kvasaca i bakterija mlečne kiseline je izvršeno zasejavanjem na odgovarajućim selektivnim podlogama. Za rast sirćetnih bakterija korišćena je GYC podloga sledećeg sastava: 10g kvaščevog ekstrakata, 50 g glukoze, 30 g CaCO₃, 25g agar agara. Za rast kvasaca primenjena je selek-

tivna podloga Saburov maltozni agar („Torlak“) koji sadrži 10 g peptona i 40 g maltoze, a za rast mlečnih bakterija upotrebljen je MRS agar (MERCK, Germany) za laktobacile i M17 agar (MERCK, Germany) za laktokoke. Inkubacija zasejanih podloga izvršena je na 30°C u toku 48 sati u aerobnim uslovima, osim za laktobacile koji su inkubirani u fakultativno anaerobnim. Na Saburovom, MRS agaru i M17 agaru su brojane sve izrasle kolonije, a na GYC agaru samo kolonije koje su imale prosvetljene zone. Promene broja prisutne mikroflore u uzorcima fermentisanih mlečnih napitaka, čuvanih na 4°C u toku 10 dana, utvrđene su primenom pomenute metode i selektivnih podloga. Analize su urađene u dva ponavljanja, a u rezultatima su prikazane srednje vrednosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka upotrebljen je čajni napitak kombuhe i pasterizovano mleko sa različitim sadržajem mlečne masti. Mikrobiološka slika ovih medijuma data je u tabeli 1.

Na osnovu dobijenih rezultata zapaža se da su oba uzorka mleka bila odličan medijum za fermentaciju, gde je pasterizacijom postignut željeni efekat kao preduslov za dobijanje fermentisanog mlečnog napitka potpuno kontrolisanom fermentacijom pod uticajem dodatog inokuluma kombuhe.

Mikrobiološki sastav pasterizovanog mleka inokulisanog sa 10% inokuluma čajnog napitka kombuhe, je prikazan u tabeli 2.

Evidentno je da je startni broj praćene mikroflore bio na zadovoljavajućem nivou iz čega se može očekivati uspešan razvoj fermentacije. Međutim poređenjem podataka za ispitivane medijume, zapaža se da je broj sirćetnih bakterija nešto niži u mleku sa 2,2% mm.

Na kraju nultog dana fermentacije mlečnih napitaka kombuhe, dobijena je sledeća promena mikrobiološkog sastava (Tabela 3).

U toku nultog dana fermentacije zapažen je porast broja prisutnih mikroorganizama, što potvrđuje pretpostavku o dobroj aktivnosti ćelija u inokulumu. Najveće povećanje se pokazalo kod broja laktokoka, tako da je ono iznosilo 3 log jedinice, a kod laktobacila 1 log. Broj sirćetnih bakterija se povećao za 2 log jedinice u mleku sa 0,9% mm, a u mleku sa 2,2% mm

Tabela 1. UKUPAN BROJ BAKTERIJA MLEČNE KISELINE, BAKTERIJA SIRĆETNE KISELINE I KVASACA U INOKULUMU I MLEKU
Table 1. TOTAL COUNT NUMBER OF LACTIC ACID BACTERIA, ACETIC ACID BACTERIA AND YEAST IN INOCULUM AND MILK

UZORCI	Broj laktobacila	Broj laktokoka	Broj sirćetnih bakterija	Broj kvasaca
Inokulum čajne gljive	$3,8 \times 10^3$	7×10^3	$1,3 \times 10^3$	$5,99 \times 10^4$
Mleko (0,9 %mm)	0	10	0	0
Mleko (2,2 %mm)	0	7	0	0

Tabela 2. UKUPAN BROJ BAKTERIJA MLEČNE KISELINE, BAKTERIJA SIRĆETNE KISELINE I KVASACA U INOKULISANOM MLEKU
Table 2. TOTAL COUNT NUMBER OF LACTIC ACID BACTERIA, ACETIC ACID BACTERIA AND YEAST IN INOCULATED MILK

UZORCI	Broj laktobacila	Broj laktokoka	Broj sirćetnih bakterija	Broj kvasaca
Mleko 0,9 %mm + 10% inokuluma	$2,35 \times 10^2$	$3,05 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$	$4,1 \times 10^3$
Mleko 2,2%mm + 10% inokuluma	$1,9 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$7,75 \times 10$	$3,26 \times 10^3$

3 loga. Najmanje povećanje broja je zapaženo kod kvasaca, tako da je njihov broj ostao na istom redu veličine kao na startu fermentacije.

Dobijeni rezultati ukazuju da je proces proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka dobro organizovan i vođen, tako da se već u nultom danu zapaža značajna aktivnost prisutnih mikroorganizama, a što je svakako preduslov da se fermentacija pravilno izvede do kraja.

Na osnovu dobijenih podataka očekivalo se da nakon 10 dana čuvanja fermentisanih napitaka na 4°C po-

stigne znatno povećanje broja bakterija sirćetne kiseline, koje su najvećim delom nosioci fermentacije u kombuha napicima. Ova očekivanja su ostvarena, što je i prikazano u rezultatima tabele 4.

Poređenjem podataka iz tabela 3 i 4 dobija se uvid promene broja prisutne mikroflore. Evidentno je da se najviše povećao broj sirćetnih bakterija, i to za 4 log jedinice. Takođe i broj kvasaca se povećao za 1 log jedinicu, dok je broj laktobacila ostao skoro na istom nivou, broj laktokoka se smanjio. Stagnacija, odnosno smanjenje

Tabela 3. UKUPAN BROJ BAKTERIJA MLEČNE KISELINE, BAKTERIJA SIRĆETNE KISELINE I KVASACA U FERMENTISANIM MLEČNIM NAPICIMA
Table 3. TOTAL COUNT NUMBER OF LACTIC ACID BACTERIA, ACETIC ACID BACTERIA AND YEAST IN FERMENTED MILK BEVERAGE

UZORCI	0. dan fermentacije			
	Broj laktobacila	Broj laktokoka	Broj sirćetnih bakterija	Broj kvasaca
FMN 1	$7,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$
FMN 2	$8,1 \times 10^3$	$1,21 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$9,4 \times 10^3$

FMN1- fermentisani mlečni napitak sa 0,9% mlečne masti
FMN2 - fermentisani mlečni napitak sa 2,2% mlečne masti

Tabela 4. PROMENE BROJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE, BAKTERIJA SIRĆETNE KISELINE I KVASACA TOKOM ČUVANJA FERMENTISANOG MLEČNOG NAPITKA PRI TEMPERATURI OD 4°C
Table 4. YEAST, ACETIC ACID BACTERIA AND LACTIC ACID CELL COUNT CHANGES DURING FERMENTED MILK BEVERAGE STORAGE AT 4°C

UZORCI	10.dan skadištenja			
	Broj laktobacila		Broj laktobacila	
FMN 1	$9,5 \times 10^3$	FMN 1	$9,5 \times 10^3$	FMN 1
FMN 2	$7,6 \times 10^3$	FMN 2	$7,6 \times 10^3$	FMN 2

FMN1- fermentisani mlečni napitak sa 0,9% mlečne masti
FMN2 - fermentisani mlečni napitak sa 2,2% mlečne masti

broja bakterija mlečne kiseline je najvećim delom posledica njihove osetljivosti na niske temperature na kojoj su fermentisani mlečni napici skladišteni. Povećanje broja bakterija sirćetne kiseline i kvasaca je uzročno-posledično povezano, s obzirom da aktivnošću kvasaca nastaje alkohol, koji sirćetne bakterije koriste za svoj rast. Do sličnih rezultata se došlo i u ranijim istraživanjima o mogućnosti proizvodnje fermentisanih mlečnih napitaka primenom čajne gljive kombuha (Radulović i sar., 2009). Broj ćelija kvasaca u mlečnom napitku je znatno niži u odnosu na broj ćelija sirćetnih bakterija, što je verovatno posledica slabije sposobnosti prisutne mikroflore kvasaca da fermentiše laktozu iz mleka (Malbaša i sar., 2008, 2009). Takođe, i prisustvo kiseonika ima za posledicu podsticaj rasta aerobnih sirćetnih bakterija i kvasaca. Kako su i drugi autori pokazali (Sievers i sar., 1995., Zahoor i sar., 2006) simbiozu čajne gljive čine najvećim delom aerobne vrste *Gluconobacter xylinum* i *Acetobacter aceti*, a od kvasaca mogu biti prisutne mnogobrojne aerobne vrste *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces*, *Candida* (Harrera i sar., 1989) *Zygosaccharomyces kombuchaensis* (Steels i sar., 2002), *Saccharomyces* (Mayser i sar., 1995).

Generalno govoreći, tokom proizvodnje i čuvanja fermentisanih mlečnih napitaka sa čajnom gljivom, održavao se značajan broj bakterija mlečne kiseline, sirćetnih bakterija i kvasaca, tako da se može govoriti o pravilno vođenom, kontrolisanom procesu fermentacije. Svakako da se iz ovih istraživanja otvaraju nova pitanja, koja se odnose na hemijski, nutritivni i senzorni aspekt ispitivanja tokom čuvanja fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih primenom čajne gljive (Iličić i sar., 2009, Malbaša i sar., 2009). Sveobuhvatna ispitivanja bi svakako dala doprinos boljem definisanju novih fermentisanih mlečnih proizvoda na našem tržištu.

ZAKLJUČAK

Na osnovu ispitivanja mikroflore inokuluma i mleka za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka, utvrđena je dobra aktivnost bakterija mlečne kiseline, sirćetnih bakterija i kvasaca, a pasterizovano mleko, koje je primenjeno za proizvodnju sadržao je samo zanemarljiv broj laktokoka.

Shodno broju ispitivanih mikroorganizama u inokulumu, njihov broj u mleku odmah nakon inokulacije je bio za 1 log jedinicu niži nego u inokulumu.

Nakon 0-og dana fermentacije mlečnih napitaka, utvrđeno je znatno povećanje broja mikroflore. Najveće povećanje se pokazalo kod broja laktokoka, tako da je bilo na nivou 10^5 ćelija/mL, kod sirćetnih bakterija se povećao do nivoa 10^4 ćelija/mL, a kod laktobacila i kvasaca je iznosio 10^3 ćelija/mL.

Posle 10 dana skladištenja na 4°C , utvrđena je najveća aktivnost sirćetnih bakterija sa brojem od 10^8 ćelija/mL, broj laktokoka i kvasaca je iznosio 10^4 ćelija/mL, a broj laktobacila je ostao na nivou 10^3 ćelija/mL.

Generalno se može reći da su ispitivani mikroorganizmi bili značajno prisutni nakon skladištenja, pri čemu je evidentno da su najveću aktivnost pokazale bakterije sirćetne kiseline.

Dalja istraživanja u pogledu hemijskog i nutritivnog sastava, kao i senzornih svojstava dobijenih fermentisanih napitaka, svakako bi upotpunila ovu vrstu istraživanja.

LITERATURA

- Blanc, P.: Characterization of the Tea Fungus metabolites. *Biotechnology Letters* 18 (1996) 139-142.
- Duraković, K., Milanović, S., Carić, M., Iličić, M., Đurić, M., Tekić, M., Lenđel, J.: Funkcionalni niskoenergetski fermentisani mlečni napak proizveden uz primenu kombuhe. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 19, (1-2), (2008) 66-73.
- Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H. and Ledford, R.: Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition and Claimed health Effects. *Journal of Food Protection* 63(7) (2000) 976-981.
- Harrera, T., Calderon-Villagomez, A.: Species of yeasts isolated in Mexico from the tea fungus. *Rev. Mex. Microbiol.*, 5 (1989) 205-210.
- Iličić, M., Milanović, S., Carić, M., Đurić, M., Tekić, M., Vukić, V., Duraković, K., Popović, S.: Primena kombuhe u tehnologiji funkcionalnih fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 20, (1-2) (2009) 65-69.
- Lončar E., Milanović S., Carić, M., Malbaša R., Panić M.: Metabolička aktivnost čajne gljive u mleku. *Prehrambena industrija* 1-2 (2001) 13-17.
- Malbaša, R., Lončar, E. and Đurić, M.: Comparison of the products of Kombucha fermentation on source and molasses. *Food Chemistry*, 106 (2008) 1039-1045.
- Malbaša, R., Milovanović, S., Lončar, E., Đurić, M., Carić, M., Iličić, M. and Kolarov, Lj.: Milk-based beverages obtained by Kombucha application. *Food Chemistry*, 112 (2009) 178-184.
- Malbaša, R., Lončar, E., Kolarov, Lj.: Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe. *Prehrambena in-*

- dustrija – Mleko i mlečni proizvodi*, 20 (1-2) (2009) 31-34.
- Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C. and Grunder, K.: The yeast spectrum of the "tea fungus Kombucha". *Mycoses*, 38 (1995) 289-295.
- Milovanović, D.S., Carić, Đ.M., Lončar, S.E., Panić, D.M., Malbaša, V.R., Dobrić, Đ.D.: Primena koncentrata čajne gljive u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka. *Prehrambena industrija*, 1-2 (2002) 8-13.
- Radulović, Z., Iličić, M., Radin, D., Paunović, D., Mitrović N., Petrušić, M., Obradović, D.: Karakterizacija mikroflore kombuhe u fermentisanim mlečnim napicima. *Prehrambena industrija*, Vol. 20, 1-2, (2009) 106-109.
- Reiss, J.: Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 198 (1994) 258-261.
- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U. and Teuber, M.: Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation System. *Appl. Microbiol.*, 18 (1995) 590-594.
- Steels, H., James, A.J., Bond, C.J., Roberts, N.I., Stratfore, M.: *Zygosaccharomyces kombuchaensis*: the physiology of a new species related to the spoilage yeasts *Zygosaccharomyces lentus* and *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast research*, 2(2) (2002) 113-121.
- Zahoor, T., Siddique, F. and Farooq U.: Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *British Food Journal*, 109 (6) (2006) 429-439.

SUMMARY**CHANGES IN MICROFLORA OF TEA FUNGUS DURING STORAGE OF FERMENTED DAIRY BEVERAGES**

¹Zorica T. Radulović, ¹Dužanka D. Paunović, ²Mirela D. Iličić, ¹Nemanja Mirković, ¹Milica M. Petrušić, ¹Dragojo B. Obradović,

¹University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Zemun, Serbia

²University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

The tea fungus is being increasingly used in the production of innovative food products, both in Serbia and in other countries. This trend can be primarily ascribed to potential therapeutic characteristics of the fungus. The mechanism of this effect is still being researched, but it is quite certain that the tea fungus contains a symbiosis of acetic acid bacteria and yeasts, which can vary to a great degree depending on the origin and geographic region. The consummation of kombucha tea has a very long tradition; however, the use of the tea fungus in the production of fermented milk beverages is a new technology which can most certainly find its perspective in the dairy industry. Bearing in mind that the technology has been determined to a great extent, the question remains as to the sustainability of the product and its quality during the storage period.

In this sense, this paper looks into the changes in the microbiological image of kombucha bacteria and yeasts present in the product, during a ten day storage period. In order to get a fermented dairy beverage, fermented tea inoculum was prepared, in milk with a varied milk fat content (0.9 %, 2.2 %) to the concentration of 10 %. The growth ability of acetic acid bacteria, lactic acid bacteria and yeasts was examined. It was determined that the examined microflora was very active, with the number of lactococci on day 0 amounting to 10^5 cfu/ml, of acetic acid bacteria to 10^4 cfu/mL and of yeasts and lactobacillus to 10^3 cfu/ml. After ten days of storing the fermented dairy product at 4°C, the viability of acetic acid bacteria was the highest and stood at 10^8 cfu/ml, of lactococci and yeasts at 10^4 cfu/mL and of lactobacillus at 10^3 cfu/ml. The changes in the examined microflora indicate good activity during the storage of the fermented dairy beverage; however, other characteristics of this product must also be looked into, including sensory characteristics, the chemical and nutritional composition.

Key words: tea fungus • microflora • fermented dairy beverages