

# Fermentacija mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka probiotičkom bakterijom *Lactobacillus casei* LC-Y uz jogurtanu kulturu

---

**Vučemilović, Filip**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:222081>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2017.

Filip Vučemilović

739/PI

FERMENTACIJA MJEŠAVINE  
KRAVLJEG MLIJEKA I SOJINO  
NAPITKA PROBIOTIČKOM  
BAKTERIJOM *Lactobacillus casei*  
LC-Y UZ JOGURTNU KULTURU

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 te uz pomoć doc. dr. sc. Irene Barukčić, dr. sc. Katarine Lisak Jakobović i teh. sur. Snježane Šimunić.

*Srdačno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Rajki Božanić na odabranoj temi, pomoći i uputama prilikom izvedbe i pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ireni Barukčić na uputama i stručnim savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Katarini Lisak Jakopović na stručnim savjetima i prijedlozima prilikom pisanja ovog rada.*

*Hvala teh. sur. Snježani Šimunić na pruženoj pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mr. sc. Edini Šertović na pruženoj suradnji prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.*

*Srdačno se zahvaljujem VIRO šećerani na pruženom razumijevanju prilikom pisanja rada.*

*Veliko hvala obitelji, rodbini i prijateljima, a posebice mojoj teti i baki koje su svojim osmijehom bili podrška u mom studiranju.*

*Naposljetku, najveće i bezuvjetno hvala ide mojim roditeljima koji su mi pružili podršku, poticaj, uvjete studiranja i sigurnost da ovo sve bude omogućeno.*

## 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 MJEŠAVINE KRAVLJEG MLIJEKA I SOJINOG NAPITKA PROBIOTIČKOM BAKTERIJOM *Lactobacillus casei* LC-Y UZ JOGURTNU KULTURU

*Filip Vučemilović 739/PI*

**Sažetak:** Cilj rada je bio proizvesti prehrambeni funkcionalni proizvod s probiotičkim svojstvima te ispitati zadovoljava li uvjete prihvatljivosti od strane potrošača. Pripravljeno je 5 uzoraka različitih omjera kravljeg mlijeka i sojinog napitka u 3 pokusa. Uzorci su bili podvrgnuti fermentaciji s pomoću probiotičkog soja *L. casei* LC-Y i jogurtne kulture te su čuvani 21 dan na 4°C. Pratilo se preživljavanje *L. casei* LC-Y, pH vrijednost, titracijska kiselost, viskoznost, senzorsko ocjenjivanje i prihvatljivost proizvoda. Nakon fermentacije uzorci ne zadovoljavaju probiotički minimum od 10<sup>6</sup> CFU/mL, stoga nemaju značajke probiotičkog proizvoda. pH vrijednost, titracijska kiselost i viskoznost se nisu značajno mijenjale. Senzorska ocjena pokazuje najmanje vrijednosti kod sojinog jogurta. Sojin jogurt je kod ocjene prihvatljivosti dobio najnižu ocjenu te ne zadovoljava standarde potencijalnih kupaca.

**Ključne riječi:** kravlje mlijeko, sojin napitak, probiotici, *Lactobacillus casei*

**Rad sadrži:** 45 stranica, 12 slika, 11 tablica, 51 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad 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:** *doc. dr. sc. Irena Barukčić, dr. sc. Katarina Lisak Jakopović, Snježana Šimunić, teh. sur.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Dr. sc. Irena Barukčić, docent (predsjednik)
2. Prof. dr. sc. Rajka Božanić (mentor)
3. Prof. dr. sc. Nada Vahčić (član)
4. Prof. dr. sc. Ksenija Marković (zamjena)

**Datum obrane:** 3. studeni, 2017.

## 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

### **FERMENTATION OF MIXTURE OF COW'S MILK AND SOY BEVERAGE WITH PROBIOTIC STRAIN *Lactobacillus casei* LC-Y WITH YOGURT CULTURE**

*Filip Vučemilović 739/PI*

**Abstract:** The goal of this study was to produce functional food product with probiotic properties as well as to determine whether this product will be accepted by consumers. 5 samples were made of different ratios of cow's milk and soy beverage which were subjected to fermentation with probiotic bacteria *L. casei* LC-Y and yoghurt culture. 3 experiments were made and stored at 4°C during 21 days. *L. casei* LC-Y survivability, pH value, titratable acidity, viscosity, sensory quality and product acceptability were determined. Probiotic minimum ( $10^6$  CFU/mL) was not reached after fermentation, therefore samples have no probiotic characteristics. pH, titratable acidity and viscosity had no significant oscillations during storage. Soy yoghurt had the lowest value amongst samples considering sensory quality and acceptability. Soy yoghurt in this research does not meet potential consumer standards.

**Keywords:** cow's milk, soy beverage, probiotics, *Lactobacillus casei*

**Thesis contains:** 45 pages, 12 figures, 11 tables, 51 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and digital version (pdf format) 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, PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Scientific Assistant, *Srježana Šimunić*, Technical Associate

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant Professor
2. PhD. *Rajka Božanić*, Full Professor
3. PhD. *Nada Vahčić*, Full Professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** 3 November 2017

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Soja .....	2
2.1.1. Sojini proteini .....	3
2.1.2. Sojine masti .....	3
2.1.3. Sojini ugljikohidrati .....	4
2.1.4. Sojini izoflavoni .....	4
2.1.5. Ne nutritivni sastojci soje .....	5
2.2. Kravlje mlijeko .....	7
2.3. Sojino mlijeko .....	8
2.4. Probiotici .....	9
2.4.1. Probiotičke bakterije .....	11
2.5. Probiotički sojin jogurt .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. Materijali .....	17
3.1.1. Uzorci kravljeg mlijeka, sojinog napitka i bakterijske kulture .....	17
3.2. Metode rada .....	17
3.2.1. Postupak pripreme inokuluma .....	17
3.2.2. Postupak pripreme uzoraka .....	17
3.2.3. Čuvanje fermentirane mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka .....	18
3.2.4. Određivanje kiselosti probiotičkog jogurta mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka različitih omjera .....	18
3.2.5. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda .....	20
3.2.6. Određivanje reoloških svojstava fermentiranim mliječnim napicima .....	22
3.2.7. Senzorska ocjena mlijeka i mliječnih proizvoda .....	23
3.2.8. Prihvatljivost potrošača .....	24
3.2.9. Statistička obrada podataka .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Mikrobiološka analiza proizvedenih fermentiranih napitaka .....	26
4.2. Aktivna i titracijska kiselost uzoraka fermentiranih napitaka tijekom 21 dan skladištenja .....	27
4.3. Reološka svojstva proizvedenih fermentiranih napitaka .....	29
4.4. Senzorsko ocjenjivanje proizvedenih fermentiranih napitaka .....	32
4.5. Ocjena prihvatljivosti proizvedenih fermentiranih napitaka .....	36



5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

## 1. UVOD

U zadnjih nekoliko desetaka godina zahtjevi potrošača u području proizvodnje hrane se drastično mijenjaju. Današnja konzumacija hrane nije samo usmjerena ka utaživanju gladi, već prema tome da osigura potrebne nutrijente za čovjeka, da djeluje preventivno na neke vrste bolesti koje se povezuju sa hranom te da poboljša fizičku i mentalnu dobrobit potrošača. Funkcionalna hrana može pozitivno utjecati na opće stanje čovjeka u smanjivanju rizika nekih bolesti te čak i u njihovom liječenju (Siro i sur., 2008).

Mlijeko sadržava većinu hranjivih tvari koje su potrebne u prehrani ljudi stoga se godinama koristi kao osnovna sirovina za pripremu prehrambenih proizvoda, povećavajući tako njihovu prehrambenu vrijednost. Unutar sastojaka mlijeka nalaze se brojne tvari različitih bioloških učinaka koje mlijeku daju epitet funkcionalne hrane (Marenjak i sur., 2006).

Soja i proizvodi od soje su u sve većem porastu proizvodnje zbog toga što su dobar izvor biljnih proteina i sadrže niski udio masti te stoga imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja ljudi. Neki od pozitivnih utjecaja su prevencija bolesti srca, raka, bubrega, dijabetesa, pretilosti, osteoporoze i regulacije kolesterola u krvi (Garcia i sur., 1997).

Fermentacijom pozitivno utječemo na senzorska svojstva proizvoda od soje. Utječe se na smanjenje okusa po grahoricama i nekih ne nutritivnih sastojaka poput fitinske kiseline i neprobavljivih ugljikohidrata. U odnosu na mliječne proizvode, sojini proizvodi poput sojinog jogurta imaju neke prednosti kao što su smanjen udio kolesterola, zasićenih masnih kiselina i potpuno su bez laktoze što ih čini prihvatljivima za konzumaciju kod osoba sa netolerancijom na laktozu (Favaro Trindade i sur., 2001). Probiotici su prehrambeni proizvodi fermentirani s pomoću bakterija mliječne kiseline koji pružaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Ouwehand i sur., 2002).

Osnovna svrha ovog istraživanja bila je odrediti omjere mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka koji će zadovoljiti uvjete za razvoj probiotičkog proizvoda kao funkcionalne hrane. Istraživan je proces fermentacije mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka u različitim omjerima sa jogurtnom kulturom i probiotičkim sojem *Lactobacillus casei* LC-Y. U vremenskom slijedu od 1., 7., 14. i 21. dana pratilo se preživljavanje probiotičkog soja *Lactobacillus casei* LC-Y i promjena senzorskih i fizikalnih (viskoznost, pH, titracijska kiselost-°SH) svojstava uzoraka. Svi uzorci su se čuvali u hladnjaku pri temperaturi od 4°C.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Soja

Soja (*Glycine max L.*) je biljka koja pripada porodici leguminoza (Slika 1). Potječe iz istočne Azije, no uzgaja se širom svijeta zbog svog visokog udjela proteina i masti. Zemlje istočne Azije koriste soju u pripremi tradicionalnih jela kao što su sojino mlijeko, sojin umak, pasta od soje, tempeh, miso, tofu i natto. U zapadnoj kulturi soja se pretežito koristi u proizvodnji sojinog brašna i sojinog ulja. Soja u sebi sadrži brojne biološki aktivne tvari koje imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje čovjeka. Pozitivni učinci soje na zdravlje čovjeka su antikancerogena, antioksidativna i antihipertenzivna svojstva, te pozitivan utjecaj na kardiovaskularni sustav, funkcije mozga (sposobnost učenja i pamćenja), regulaciju imunološkog sustava, probavu hrane, regulaciju metabolizma lipida, estrogensku aktivnost, prevenciju osteoporoze, prevenciju raka debelog crijeva i prevenciju nekih drugih vrsta raka. Pozitivni učinci soje su razlog njezine sve veće primjene u ljudskoj prehrani. Predviđa se da soja više neće biti primarno stočna hrana, već će se primarno konzumirati u ljudskoj prehrani (Medic i sur., 2014). Prosječni sastav sojinog zrna prikazan je u tablici 1.



Slika 1. Soja (*Glycine max L.*) (Anonymus 1, 2017)

Tablica 1. Prosječni sastav sojinog zrna (USDA, 2016)

Sastojci	Udio (% u suhoj tvari)
<b>Voda</b>	8,54
<b>Proteini</b>	36,49
<b>Masti</b>	19,94
<b>Vlakna</b>	9,30
<b>Ugljikohidrati</b>	30,16
<b>Pepeo</b>	4,87

### 2.1.1. Sojini proteini

Proteini soje igraju važnu ulogu u prehrani životinja, te sve veću u samoj prehrani čovjeka. Nisu idealni proteini zbog toga što im u aminokiselinskom sastavu nedostaje određen udio metionina. Zrno soje može sadržavati čak i do 48% proteina, koji su uglavnom smjesa skladišnih ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ - konglicinin, glicinin i drugi globulini) i bioaktivnih proteina ( $\beta$ -amilaza, citokrom c, lektin, lipooksigenaza, ureaza, tripsin i kimotripsin inhibitori). Proteini soje se u ljudskoj prehrani uglavnom konzumiraju u obliku formula za dojenčad, sojinog brašna, proteinskih izolata i koncentrata te teksturiranih vlakana. U usporedbi s proteinima mlijeka, sojini proteini su nutritivno slabije kakvoće zbog toga što imaju manje metionina, slabija im je probavljivost, te zbog sadržaja ne nutritivnih sastojaka poput inhibitora probavljivih enzima i lektina. Klijanjem, djelomičnim frakcioniranjem sojinog zrna i toplinskom obradom može se povoljno utjecati na nutritivnu kakvoću proizvoda od soje. Kod manjeg postotka dojenčadi je uočena netolerancija na sojine proteine prilikom prehrane bazirane na proizvodima od soje. Većina dojenčadi u tim slučajevima gubi netoleranciju do 3. godine svoga života (Friedman i Brandon, 2001).

### 2.1.2. Sojine masti

Masti soje se u prosjeku uglavnom sastoje od 13% zasićenih, 30% jednostruko nezasićenih i 54% višestruko nezasićenih masnih kiselina (2.9, 4.4 i 11.3 g zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina na 100 g sojinog zrna). Višestruko nezasićene masne kiseline u zrnu soje su omega-6 linolna i omega-3  $\alpha$ -linolenska kiselina. Odnos tih dviju kiselina je u prosjeku 8:1. Sojino zrno i proizvodi od cjelovitog zrna soje su

dobri izvori ovih dviju esencijalnih masnih kiselina, te kao primjer, u SAD-u sojino ulje predstavlja oko 40% od njihovog cjelokupnog unosa (Messina, 2016).

### **2.1.3. Sojini ugljikohidrati**

Ugljikohidrati soje su pretežito polisaharidi i neprobavljiva vlakna. Većina ugljikohidrata u soji su hemiceluloza, celuloza, stahioza, rafinoza, arabinoza i glukoza (Garcia i sur., 1997). Konzumiranje namirnica bogatih vlaknima je usko povezano s održavanjem optimalnog zdravlja jer pomaže u stvaranju otpornosti na bolesti. Topljiva vlakna snižavaju LDL kolesterol u krvnom serumu, a netopljiva vlakna imaju sveukupni zaštitni utjecaj i smanjuju rizik od pojave karcinoma (Božanić, 2006). Enzim  $\alpha$ -galaktozidaza koji je odsutan u ljudskim crijevima ne hidrolizira stahiozu i rafinozu koje su odgovorne za pojave nadutosti kod čovjeka. Bakterije u tankom crijevu koriste stahiozu i rafinozu kao izvor energije i nastaje vodik, ugljikov dioksid i metan (Garcia i sur., 1997). Postoje određene metode kojima se uklanja ili smanjuje prisutnost stahioze i rafinoze u soji i proizvodima od soje. Neke od tih metoda su ekstrakcija sa etanolom, klijanje sojinog zrna od 1 do 4 dana, fermentacija sojinog mlijeka, tretiranje sa  $\alpha$ -galaktozidazom, ultrafiltracija, te genetska manipulacija (Liener, 1994).

### **2.1.4. Sojini izoflavoni**

Izoflavoni se nalaze u mnogim namirnicama biljnog porijekla. Njihova prisutnost u soji doseže vrlo visoku razinu. U sojinom zrnu se pojavljuju u glikozidnom obliku, dok se prilikom ingestije šećerna jedinica hidrolizira te se omogućava njihova apsorpcija. U fermentiranim proizvodima od soje bakterijskom hidrolizom glikozidni oblici izoflavona prelaze u anglikonski oblik koji se apsorbira brže i u većoj količini. Najzastupljeniji predstavnici izoflavona u soji su genistein (50%), daidzein (40%), glicitin (10%) i njihovi glikozidni oblici. Jedan gram sojinog proteina odgovara u prosjeku 3,5 mg izoflavona, stoga kao primjer jedno serviranje (250 mL) sojinog mlijeka je jednako unosu od 25 mg izoflavona iako to značajno ovisi o načinu obrade namirnice. Kemijska struktura izoflavona je slična hormonu estrogenu. Vežu se na estrogenske receptore i u određenim uvjetima mogu uzrokovati učinke slične onima koje uzrokuju sami estrogene te se zbog toga izoflavoni nazivaju još i fitoestrogeni (Messina, 2016). Izoflavoni su komponente koje nemaju nutritivnu

vrijednost, ali se povezuju sa brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Brojna istraživanja pokazuju da se konzumacijom soje pozitivno utječe na smanjenje rizika nekih kroničnih bolesti kao što su dijabetes, pretilost, bolesti srca, osteoporoza, rak dojke i rak prostate (Barbalho i Farinazzi-Machado, 2011). Prilikom nastajanja proizvoda od soje, neki procesi poput termičke obrade, namakanja, koagulacije, ekstrakcije, ispiranja i fermentacije mogu smanjiti ili ukloniti prisutnost izoflavona (Villares, 2011.).

#### **2.1.5. Ne nutritivni sastojci soje**

Soja sadrži različite ne nutritivne sastojke koji imaju negativan učinak na njenu nutritivnu kvalitetu. Glavni predstavnici su proteaza inhibitori i lektin, te manje značajni goitrogeni, tanini, fitoestrogeni, stahioza, rafinoza, fitati i saponini. Glavno negativno svojstvo proteaza inhibitora je učinak na gušteraču prilikom čega dolazi do njene hipertrofije i hiperplazije, te u konačnici do njene inhibicije rasta. Lektini su proteini koji se vežu na ugljikohidrate. Imaju tendenciju aglutiniranja sa crvenim krvnim stanicama i drugim vrstama stanica što je negativna karakteristika jer time sprječava njihovu metaboličku ulogu. Postoje različite metode pomoću kojih se smanjuju ili uklanjaju ne nutritivni sastojci soje, a neke od njih su toplinska obrada, klijanje, ekstrakcija i kemijska obrada (Liener, 1994).

Fitinska kiselina služi kao izvor fosfora u leguminozama i žitaricama u kojima se akumulira kroz period zrenja. Ljudski probavni sustav ne sadrži enzim fitazu, stoga je fosfor iz fitinske kiseline biološki nedostupan za čovjeka. Fitinska kiselina se u sojinom zrnu nalazi u obliku različitih miješanih fitata i fitinskih soli. Fitinske soli keliraju metalne katione poput cinka, kalcija, magnezija i željeza čineći ih tako biološki nedostupnima. Fitinska kiselina se može vezati sa skladišnim proteinima soje pri čemu proteini gube svoje funkcionalno svojstvo poput izoelektrične točke i topivosti (Medic i sur., 2014).

Goitrogeni su tvari koje mogu uzrokovati gušavost u čovjeka. Toplinski neobrađena zrna soje mogu uzrokovati povećanje tiroidne žlijezde. Točan uzrok još nije poznat, no pretpostavlja se da su uzrok tome niskomolekularni oligopeptid i sojasapogenol koji narušavaju unos joda i njegovu koncentraciju u tiroidnoj žlijezdi. Goitrogenska aktivnost se može smanjiti toplinskom obradom i suplementacijom sa jodom.

Tanini su polifenolne molekule koje imaju molarnu masu veću od 500 g/mol. Sastoje se od polimera flavonoidnih jedinica koje su međusobno povezane ugljikovim vezama. Leguminoze

sadrže značajan udio tanina koji varira od 45-2000 mg/100g. Glavno negativno svojstvo tanina je reakcija sa proteinima i ugljikohidratima prilikom čega nastaju oblici koji su rezistentni na enzimsku hidrolizu čime dolazi do smanjenja njihove probavljivosti. Ostale ne nutritivne značajke tanina su svojstvo oštećivanja intestinalne mukoze, toksičnost tanina i njegovih metabolita koji se apsorbiraju u intestinalnom traktu i interferencija u apsorpciji željeza, glukoze i vitamina B<sub>12</sub>. Tanini su stabilni na visokim temperaturama, stoga toplinska obrada neznajčajno utječe na smanjenje njihove koncentracije. Nalaze se najviše u sjemenskom sloju kojem daju boju, stoga je najjednostavnija metoda ljuštenje zrna soje. Ostale metode za smanjenje udjela tanina su namakanje u vodi ili otopini soli i klijanje.

Fitoestrogeni pored svojih pozitivnih značajki imaju i negativno svojstvo. Izoflavoni prisutni u soji vrše interferenciju sa reproduktivnim sustavom kod eksperimentalnih životinja, no njihov negativan značaj kod ljudi je upitan. Istraživanja pokazuju da je količina sojinih fitoestrogena u ljudskoj prehrani niska što je nedovoljno za takav fiziološki odgovor.

Iako netoksične, fenolne tvari imaju znantan negativan utjecaj na miris, okus i boju. Glavna fenolna komponenta u soji je siringinska kiselina dok su druge fenolne komponente prisutne u manjim količinama. Uklanjanjem fenolnih komponenata sa aktivnim ugljikom pozitivno utječemo na miris i okus nekih sojinih proizvoda.

Saponini su molekule koje se sastoje od steroida ili sapogenina povezanih sa jednim ili više oligosaharida. Posjeduju hemolitičku aktivnost, uzrokuju pjenjenje i uzrok su gorkog okusa i osjećaja trpkosti. U sojinom zrnu je identificirano najmanje 5 saponina koji se mogu vezati sa bilo kojim od sljedećih šećera: galaktoza, arabinoza, ramnoza, glukoza, ksiloza i glukuronska kiselina. Udio saponina u proizvodima od soje uvelike ovisi o vrsti procesa kojima su proizvedeni. Saponini su stabilni pri visokim temperaturama, stoga toplinska obrada ne utječe značajno na smanjenje njihove razine u proizvodima od soje. Saponini imaju slab, negativan utjecaj na mukozne stanice tankog crijeva čime utječu na aktivni transport nutrijenata.

Rafinoza i stahioza su niskomolekularni oligosaharidi koji sadrže  $\alpha$ - galaktozidnu i  $\beta$ -fruktozidnu vezu. Njihovo glavno negativno svojstvo je uzrok nadutosti u ljudskoj prehrani prilikom konzumacije soje i proizvoda od soje kod kojih nije izvršeno uklanjanje ugljikohidrata. Najefikasniji način za smanjenje svojstva nadutosti kod čovjeka je uklanjanje sojinih ugljikohidrata iz proizvoda od soje ekstrakcijom sa 80%-tnim etanolom. Nadutost u čovjeka se javlja prilikom dospijuća rafinoze i stahioze u intestinalni trakt zbog odsutnosti enzima  $\alpha$ - galaktozidaze koji je nužan za njihovu hidrolizu u jednostavnije apsorbirajuće

šećere. Crijevna mikroflora metabolizira rafinozu i stahiozu te nastaje ugljikov dioksid, vodik i u manjoj količini metan koji uzrokuju nadutost. Oligosaharidi odgovorni za nadutost u čovjeka su stabilni pri visokim temperaturama zbog čega je njihova eliminacija usmjerena prema enzimskoj hidrolizi. Neke od tih metoda uključuju klijanje, primjenu plijesni i fermentaciju. Fermentacijom sojinog mlijeka sa bakterijama mliječne kiseline koje sadrže enzim  $\alpha$ -galaktozidazu smanjuje se udio rafinoze i stahioze. Ostale enzimske metode uključuju primjenu enzima  $\alpha$ -galaktozidaze izoliranog iz različitih vrsta gljivica i kvasaca. U slučaju kontinuirane obrade sojinih proizvoda enzimi se imobiliziraju na nosač. Metode poput ultrafiltracije i genetske manipulacije su neenzimatske metode kojima se uspješno snižava udio rafinoze i stahioze (Liener, 1994).

## **2.2. Kravlje mlijeko**

Svjetska proizvodnja mlijeka ima izuzetan gospodarski značaj. Koristi se u svrhu u proizvodnje ljudske hrane i prehrane stanovništva. Mlijeko se dobiva od krava, bivola, ovaca, koza, deva i kobilica, a dominantno je kravlje mlijeko. Mlijeko i proizvodi od mlijeka su gospodarska djelatnost u poljoprivredi i u prehrambenoj mljekarskoj industriji koja koristi sirovo mlijeko kao sirovinu (Bosnić, 2003).

Prema definiciji sirovo mlijeko je "normalni sekret mliječne žljezde, dobiven redovnom i neprekidnom mužnjom, jedne ili više zdravih muznih životinja, pravilno hranjenih i držanih, kojem ništa nije dodano ili oduzeto, koje nije zagrijano na temperaturu višu od 40 °C niti je bilo podvrgnuto nekom drugom postupku koji ima isti učinak, a namijenjeno je konzumaciji kao tekuće mlijeko ili mlijeko za daljnju obradu odnosno preradu" (Pravilnik, 2007).

Kravlje mlijeko, kao i sve druge vrste mlijeka, složen je biološki proizvod raznolikog i promjenjivog sastava, a ovisi o mnogim faktorima. Sadrži niz fizikalno kemijskih sastojaka, a neki od njih su sadržaj vode, mliječne masti, bjelančevina, mliječnog šećera (laktoze) i sadržaj pepela te ukupna bezmasna suha tvar. Mlijeko karakterizira gustoća, viskoznost, vrelište, ledište i kiselost, te kao skupni podatak, sadržaj bezmasne suhe tvari (BSH). Sadrži prosječno 87,40% vode. Mliječna mast je najviše promjenjivi sastojak u mlijeku, a ima najveću energetske vrijednosti koja se uglavnom sastoji od triglicerida. Najvažniji sastojak mlijeka su bjelančevine koje se sastoje od dvije grupe: kazein (78,5%) i bjelančevine sirutke (16,5%). Laktoza (mliječni šećer) prisutna u mlijeku je prirodni šećer (Bosnić 2003). Kravlje mlijeko



sadrži različite minerale u obliku kationa i aniona poput kalcija, fosfora, magnezija, natrija, kalija i klora. Vitamini prisutni u kravljem mlijeku su vitamin A, B6, B12, C, D, K, E, tiamin, niacin, biotin, riboflavin, folati i pantotenska kiselina (Fox, 1995). Imunoaktivni proteini u mlijeku omogućavaju otpornost i zaštitu ljudskog organizma od bakterija, virusa i drugih uzročnika bolesti. Mineralne tvari prisutne u mlijeku, naročito kalcij, utječu na rast kostiju, kontrakciju mišića i prijenos živčanog impulsa. Prema nekim istraživanjima unos veće količine kalcija i vitamina D u organizam smanjuje rizik nastanka nekih vrsta karcinoma (Tratnik, 1998).

### **2.3. Sojino mlijeko**

Sojino mlijeko je zdravi prehrambeni napitak koji potječe iz Azije. Primarno se konzumira u Kini i Japanu dok se u današnje vrijeme konzumacija sojinog mlijeka proširila širom svijeta. Sojino mlijeko se proizvodi od sojinog zrna putem određenih procesa. Prvo se vrši namakanje sojinog zrna u vodi 12 sati na sobnoj temperaturi nakon čega se sojino zrno odvaja od tekuće faze. Sojino zrno se potom ispire i usitnjava. Pri usitnjavanju nastaje kaša koja se kuha na temperaturi od 100°C, te se potom hladi na sobnu temperaturu. Posljednji korak u pripremi sojinog mlijeka je filtracija kojom se odvaja netopivi dio u vodi (okara) od sojinog mlijeka (Villares i sur., 2011).

Najveći nedostatak tradicionalnog sojinog mlijeka okus po grahoricama. Taj nepoželjan okus potječe od nekih aldehida i ketona, osobito heksanala i heptanala nastalih oksidacijom višenezasićenih masnih kiselina koju katalizira lipoksigenaza. Postoje određene metode kojima se rješava problem nepoželjnog okusa u sojinom mlijeku, a neke od tih metoda su toplinska inaktivacija lipoksigenaze, upotreba odmašćenih početnih sirovina, deodorizacija, prikrivanje gorčine i nepoželjnih okusa zaslađivanjem i aromatiziranjem i razvoj genetički modificiranih sorti soje bez lipoksigenaze.

Sojino i kravlje mlijeko imaju vrlo malo zajedničkih osobina, osim velikog udjela visokovrijednih proteina (Tablica 2). Sojini proteini sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline, dok su manjkavi na aminokiselinama koje sadrže sumpor, kao što su metionin i cistein. U odnosu na kravlje mlijeko, sojino mlijeko ima određene prednosti. Sojini proteini povoljno utječu na smanjivanje razine kolesterola u krvi, ublažavanje simptoma menopauze, umanjivanje rizika oboljenja od raznih bolesti kao što su karcinomi, osteoporozu i žučni

kamenac. Ugljikohidrati u sojinom mlijeku su oligosaharidi stahioza i rafinoza. Sojino mlijeko ne sadrži kolesterol i laktozu, te je prikladno za gotovo svačiju prehranu. Količina željeza je oko 10 puta veća u odnosu na kravlje mlijeko, ali je njegova bioiskoristivost manja zbog prisutnih fitata. S obzirom na povećani interes za sojine proizvode i njihove pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, proizvođači traže što više načina za razvoj proizvoda od soje (Božanić, 2006.).

Tablica 2. Usporedba sastava sojinog i kravljeg mlijeka (Berk, 1992)

Nutritivna vrijednost 100 g	Kravlje mlijeko		Sojino mlijeko
	Punomasno	Djelomično obrano	
<b>Proteini</b>	3,4 g	3,5 g	3,6 g
<b>Masti</b>	3,5 g	1,5 g	2,3 g
<b>Ugljikohidrati</b>	4,6 g	5,4 g	3,4 g
<b>Kcal</b>	64	49	49
<b>Kolesterol</b>	10 mg	5 mg	0 mg
<b>Sastav masnih kiselina</b>			
<b>Zasićene</b>	63,5%	63,5%	14,0%
<b>Jednostruko nezasićene</b>	3,0%	3,0%	63,5%
<b>Višestruko nezasićene</b>	33,5%	33,5%	21,6%

## 2.4. Probiotici

Probiotik se može definirati kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primijenjen u ljudi ili životinja blagotvorno djeluje na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Šušćković i sur., 1997). Najčešće korišćeni probiotički mikroorganizmi koji ujedno spadaju i u grupu bakterija mliječne kiseline su laktobacili, enterokoki i bifidobakterije. Laktobacili su glavni predstavnici ove skupine, a vrste iz ovog roda koje imaju zabilježene pozitivne utjecaje na ljudsko zdravlje su *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* i *L. salivarius*.

Glavna svojstva probiotičkih bakterija su otpornost na niske pH vrijednosti, žuč i enzime gušćeraće, adhezija na intestinalnu mukozu, ljudsko porijeklo, dokumentirani zdravstveni učinci, sigurnost za ljudsku uporabu i dobra tehnološka svojstva. Koristi navedenih svojstva su brojne, a one uključuju preživljavanje puta do gastrointestinalnog trakta, imunomodulaciju,

smanjenje broja patogenih vrsta, povećano liječenje oštećenog mukoznog tkiva, interakciju probiotika i domaćina, istinite zdravstvene tvrdnje, isključenje rizika na zdravlje za potrošača, stabilnost soja, proizvodnju na industrijskoj razini i toleranciju na kisik. Razvoj probiotika je kroz zadnjih nekoliko desetaka godina pokazao važnu prednost u prehrambenim industrijama koje razvijaju proizvodnju funkcionalne hrane. Probiotici imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, a neki od tih učinaka su zamjena potencijalno štetnih kolidiformnih bakterija i klostridija sa probiotičkim vrstama, utjecaj na imunološki sustav, prevencija nekih vrsta alergija, omogućenost konzumacije kod ljudi sa netolerancijom na laktozu, liječenje dijareje, ublažavanje simptoma Kronove bolesti i ulcerativnog kolitisa. Najčešći način konzumiranja probiotika je putem fermentiranih mliječnih proizvoda, te se u slučaju nefermentiranih namirnica probiotici konzumiraju kao dodaci prehrani u obliku kapsula i prahova (Ouwehand i sur., 2002).

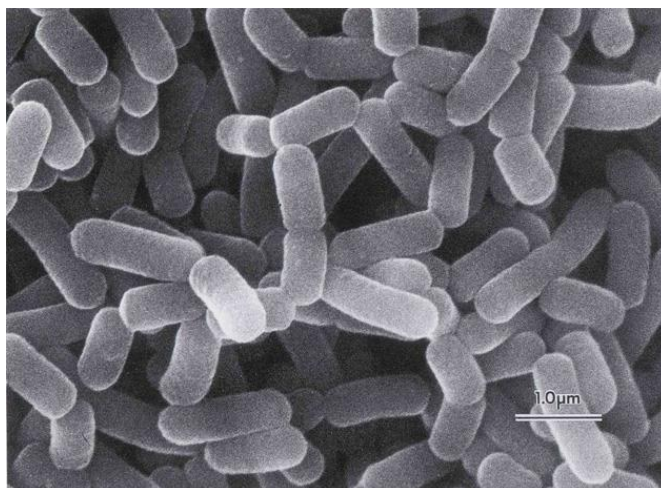
Jedna od definicija koja na jednostavan način objašnjava pojam funkcionalne hrane je ta da se hrana može nazvati funkcionalna ako pored svoje osnovne nutritivne vrijednosti na pozitivan i zadovoljavajući način utječe na jedan ili više ciljanih funkcija tijela smanjujući rizike razvoja pojedinih bolesti (Čalić i sur., 2011). Dodatkom probiotika u hranu ona postaje funkcionalna, a koristi se u pripremi sira, deserata na mliječnoj bazi, mlijeka u prahu za dojenčad, maslaca, majoneza, praškastih prehrambenih proizvoda i kapsula te fermentirane hrane biljnog porijekla. Mliječni proizvodi se smatraju idealnim sredstvom za distribuciju probiotika u ljudski gastrointestinalni trakt. Visok udio masti inhibira rast nekih probiotičkih vrsta, dok se dodatkom nekih vitamina, proteina sirutke i prebiotika njihov rast i aktivnost stimuliraju. Postoje neka ograničenja prilikom distribucije probiotika u mliječnim proizvodima kao što su prisutnost alergena i nužnost hladnog okruženja što dovodi do razvoja proizvoda koji nisu bazirani na mliječnoj osnovi poput voća, povrća, leguminoza i žitarica. Voće i povrće se zbog sadržaja minerala, vitamina, dijetalnih vlakana i antioksidansa smatraju dobrim osnovama. Prilikom fermentacije žitarica i leguminoza probiotičkim vrstama dolazi do degradacije neprobavljivih ugljikohidrata, povećanja kvalitete i razine lizina, povišenja dostupnosti vitamina B grupe te degradacije fitata i otpuštanja minerala poput mangana, željeza, cinka i kalcija (Soccol i sur., 2010).

#### 2.4.1. Probiotičke bakterije

Najčešće korištene probiotičke bakterije u proizvodnji probiotika su bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*. Da bi se zadovoljilo tržište, probiotičke kulture moraju imati visok stupanj preživljavanja i visoku fermentacijsku aktivnost. U gotovom probiotičkom proizvodu, najniža vrijednost gustoće živih mikroorganizama mora biti  $10^6$  cfu/mL (Grajek i sur., 2005). Kod proizvodnje takvih proizvoda problem može biti i spor rast nekih probiotičkih vrsta, loše preživljavanje tijekom skladištenja proizvoda te siromašan okus i aroma proizvoda nakon fermentacije. Zbog toga se probiotičke bakterije često koriste u mješovitim kulturama, najčešće sa jogurnom (Rogelj i sur., 1998).

##### *Lactobacillus*

Laktobacili su nesporogene, gram pozitivne bakterije. Važan su dio ljudske bakterijske flore, a najčešće se mogu pronaći u ustima, gastrointestinalnom traktu i genitourinalnom traktu kod žena. To su nepokretne bakterije štapićastog oblika čija dužina može varirati od dugačkih do kratkih oblika (Slika 2). Većina roda iz ove vrste su fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji rastu u prisustvu ili odsustvu anaerobnog okruženja. Oko 20% vrsta izoliranih iz čovjeka su obligatni anaerobi. Mliječna kiselina je glavni metabolički produkt laktobacila u fermentaciji glukoze dok octena i jantarna kiselina nastaju u malim količinama. Gastrointestinalni trakt sisavaca je najčešće koloniziran laktobacilima, a najčešće vrste koje se u njemu mogu pronaći su *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* i *L. salivarius*. Laktobacili se također mogu izolirati i sa zubne stijenke, sline i vaginalnog trakta ljudi i drugih sisavaca. S obzirom na sve veću popularnost "prirodnih" proizvoda u tretmanu bolesti, suplementi sa *Lactobacillus* sp. dobivaju na sve većoj pozornosti. Takvi proizvodi se nazivaju probiotici. Prilikom korištenja, probiotici imaju pozitivne učinke na zdravlje djelujući preventivno ili u liječenju nekih vrsta bolesti.



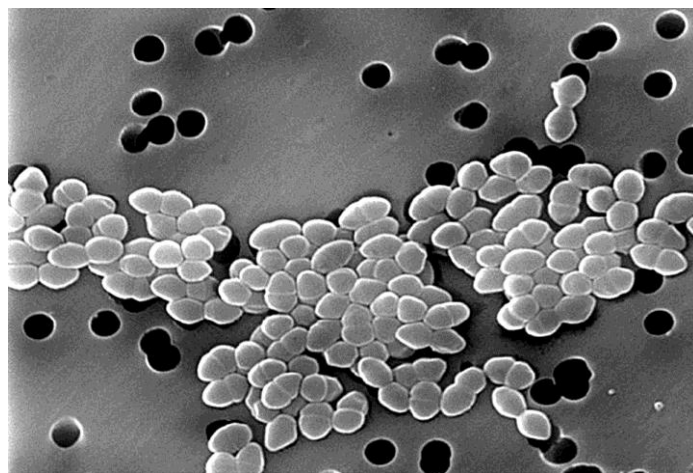
Slika 2. *Lactobacillus* spp. (Anonymus 2, 2017)

Laktobacili djeluju preventivno na infekcije uzrokovane patogenim vrstama. Proizvode supstance slične bakteriocinima i time reguliraju rast potencijalnih patogenih vrsta. Laktobacili su vrlo važni mikroorganizmi koji se koriste u industrijskoj proizvodnji prehrambenih proizvoda. Najčešće se koriste u proizvodnji jogurta, sira, kiselih krastavaca, kiselog kupusa i kruha od kiselog tijesta. Fermentacijom proizvodi mliječnu kiselinu koja uzrokuje pad pH vrijednosti okoline u kojoj se nalazi. Pri tom padu pH vrijednosti dolazi do inhibicije patogenih vrsta i vrsta bakterija koje izazivaju truljenje. Laktobacili također podižu i nutritivnu vrijednost fermentiranih proizvoda prilikom čega proizvode esencijalne aminokiseline i vitamine te povećavaju biodostupnost nekih minerala. Kroz zadnje stoljeće, prehrambena i mikrobiološka industrija su intenzivno proučili laktobacile i smatraju ih sigurnima za ljudsku konzumaciju (Slover i Danziger, 2008).

### *Enterococcus*

Enterokoki su gram pozitivne, nesporogene, katalaza negativne, oksidaza negativne, fakultativno anaerobne bakterije u obliku koka koje se mogu pojaviti zasebno, u paru ili u lancima (slika 3). Optimalna temperatura za njihov rast je 35°C, dok neke vrste rastu u temperaturnom intervalu od 10 do 45°C. Mogu rasti i u prisustvu soli u koncentraciji od 6,5% pri pH 9,6 i preživjeti temperaturu od 60°C kroz 30 minuta. Enterokoki igraju važnu ulogu u zrenju sireva preko svoje proteolitičke i lipolitičke aktivnosti te razgradnje citrata čime pridonose njihovom tipičnom okusu i aromi. Prisutne su još i u drugim fermentiranim namirnicama poput kobasica i maslina. Proizvode bakteriocine koji imaju antimikrobnu aktivnost prema gram pozitivnim bakterijama kao što su vrste iz roda *Listeria*. *Enterococcus*

*faecium* je jedna od probiotičkih vrsta ovog predstavnika koja djeluje preventivno na dijareju uzrokovanu antibioticima i u liječenju dijareje kod djece. Neke vrste se koriste i u veterinarskoj praksi kroz suplementaciju. Enterokoki se prvenstveno nalaze u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja u kojima je brojčano najprisutniji *E. faecalis* iako u nekih individualaca može prevladavati *E. faecium*. Prisutni su još i na površini voda, biljkama, povrću, insektima i u tlu. U prehrambenoj industriji se koriste u proizvodnji sireva (Manchego, Mozzarella, Kefalotiry, Picante de Beira Baixa, Serra, Cebreiro...), mesnih proizvoda (Chorizo, Espetec...), fermentiranih maslina i fermentiranog povrća (Folquie Moreno i sur., 2006).

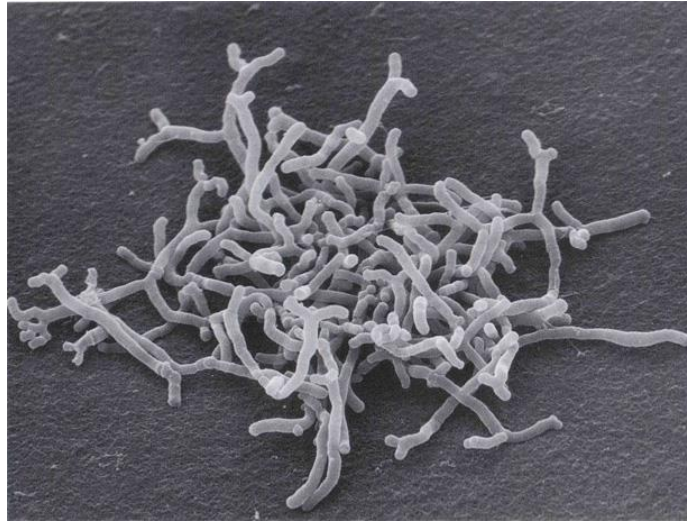


Slika 3. *Enterococcus* sp. (Anonymus 3, 2017)

### *Bifidobacterium*

Bifidobakterije su anaerobni mikroorganizmi štapićastog oblika. To su gram pozitivni, nesporogeni, nepokretni, katalaza negativni anaerobni mikroorganizmi. Pojavljuju se u različitim oblicima poput kratkih i zaobljenih štapića, duguljastih štapića i dvokrakog Y (slika 4). Glavni produkti bifidobakterija su octena i mliječna kiselina pri čemu ne nastaje CO<sub>2</sub> plin osim u prisustvu glukonata. Sve bifidobakterije ljudskog porijekla koriste glukozu, galaktozu, laktozu i fruktozu kao izvor ugljika. Mogu fermentirati i neke kompleksne ugljikohidrate poput D-galaktozamina, D-glukozammina, amiloze i amilopektina. Optimalni pH interval za rast bifidobakterija je 6-7, dok je optimalni temperaturni interval 37-41°C. Bifidobakterije igraju važnu ulogu u intestinalnom traktu ljudi, ostalih toplokrvnih životinja i pčela. Nalaze se u gastrointestinalnom i genitourinarnom traktu kod ljudi u omjeru koji je prvenstveno određen sa dobi čovjeka i njegovim individualnim načinom prehrane. Njihova populacija prevladava kod dojenčadi koja se uspostavlja nedugo nakon rođenja. Broj kod čovjeka se smanjuje sa starenjem te postaje treća po redu zastupljena bakterijska vrsta. Najčešće korištene vrste iz

roda *Bifidobacterium* u proizvodnji probiotičkih proizvoda su *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum*. Bifidobakterije proizvode octenu i mliječnu kiselinu u omjeru 3:2, stoga njihov pretjerani rast u prehrambenim proizvodima uzrokuje okus po octu što za potrošača nije poželjna karakteristika. Znanstvena istraživanja koja uključuju primjenu bifidobakterija u prehrambene svrhe su usmjerena prema određenim prehrambenim proizvodima kao što su fermentirana mlijeka, jogurti, smrznuti jogurti, deserti, sladoledi, sirevi, fermentirana sojina mlijeka i sojini jogurti (Gomes i Malcata, 1999).



Slika 4. *Bifidobacterium* sp. (Anonymus 4, 2017)

#### **2.4.1.1. *Lactobacillus casei***

*Lactobacillus casei* je bakterijska vrsta koja pripada rodu *Lactobacillus*. Ona je mezofilna, gram pozitivna, nesporogena bakterija štapićastog oblika. Nepokretna je i ne sadrži citokrom (Holzapfel i sur., 2001). Može se pronaći u različitim staništima poput fermentiranih i nefermentiranih mliječnih proizvoda, intestinalnog trakta ljudi i životinja i fermentiranih i nefermentiranih biljnih namirnica (Cai i sur., 2007). Optimalna pH vrijednost za rast *L. casei* je 5.5. *L. casei* proizvodi mliječnu kiselinu prilikom fermentacije što je važna stavka u proizvodnji sireva i jogurta, snižavanju razine kolesterola, podizanju imuniteta, kontroliranju dijareje, ublažavanja netolerancije na laktozu, sprječavanja razvoja patogena u ljudskom traktu (Mishra i Prasad, 2005). *L. casei* je fakultativno anaeroban mikroorganizam koji dobiva energiju putem fermentacije. Većina sojeva *L. casei* fermentira galaktozu, fruktozu, manozu, manitol, N-acetilglukozamin i tagatozu. Svojstvo fermentacije laktoze je uočeno kod sojeva izoliranih iz sireva i ljudskog gastrointestinalnog trakta u odnosu na sojeve izolirane sa biljnih

namirnica kod kojih svojstvo fermentacije laktoze nije učestalo (Cai i sur., 2007). Najvažnije svojstvo *L. casei* je sposobnost proizvodnje mliječne kiseline koja se u industrijskoj praksi koristi za proizvodnju organskih kiselina, kao pojačivač okusa, u proizvodnji kozmetičkih preparata i u proizvodnji biorazgradivih plastičnih materijala (Chan-Blanco i sur., 2003). U gastrointestinalnom traktu, *L. casei* se natječe za nutrijente i mjesta vezanja, proizvodi octenu, propionsku i mliječnu kiselinu čime dolazi do snižavanja pH vrijednosti, proizvodi vodikov peroksid i bakteriocine čineći tako nepovoljne uvjete za rast patogena (Millette i sur., 2007; Sauvageot i sur., 2006).

## 2.5. Probiotički sojin jogurt

Sojin jogurt se proizvodi s pomoću miješane starter kulture koja se sastoji od bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Dodatkom probiotičkih kultura poput bakterija *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. i *Lactobacillus casei* u fermentirane proizvode povoljno utječemo na kvalitetu proizvoda i na zdravlje potrošača. Mliječni i sojini proizvodi se smatraju idealnim medijima za distribuciju probiotičkih bakterija u ljudski gastrointestinalni trakt zbog toga što pružaju idealne uvjete koji potiču njihov rast i preživljavanje. Fermentacija poboljšava svojstva proizvoda djelujući pozitivno na biodostupnost izoflavona, probavljivost proteina, dostupnost kalcija, zdravlje intestinalnog trakta i podizanju imuniteta. Probiotički mikroorganizmi u sojinom jogurtu pokazuju proteolitičku aktivnost koja je razlog nastajanja ACE inhibitora. ACE inhibitori su bioaktivni peptidi koji imaju svojstvo snižavanja krvnog tlaka kod ljudi sa i bez dijabetesa. Sojini peptidi se istražuju u svrhu proizvodnje novih lijekova i funkcionalne hrane za zdravlje crijeva i povećanja apsorpcije nutrijenata. U odnosu na proteine animalnog porijekla, sojini proteini snižavaju koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida u serumu bez značajnog utjecaja na HDL kolesterol. S obzirom na hipertenzivna svojstva sojinih proteina, FDA je odobrila znanstvenu tvrdnju povezujući hranu koja je prirodno bogata sojinim proteinima sa smanjenjem koronarne bolesti srca. Antioksidansi genistein i daidzein spadaju u skupinu izoflavona koji se nalaze u sojinom jogurtu. Štite stanice od djelovanja slobodnih radikala koji uzrokuju starenje i koji su uključeni u nastanak brojnih bolesti kao što su ateroskleroza, upala zglobova i komplikacije u dijabetesu. Izoflavoni u sojinom mlijeku su u formi glukozida što ih u odnosu na aglikonsku formu čini slabije apsorbirajućima. Fermentacijom se glukozidna forma prevodi u aglikonsku i tako povećava svojstvo apsorpcije



izoflavona za gotovo 4 puta više u odnosu na nefermentirano sojino mlijeko. U fermentiranom sojinom napitku je također uočeno i antikancerogeno svojstvo sojinih proteina, peptida i izoflavona. Peptidi soje i izoflavoni utječu pozitivno na imunitet čovjeka. Polisaharidi soje reguliraju koncentraciju glukoze u krvi nakon obroka te time povoljno utječu na metabolizam glukoze kod ljudi sa narušenom tolerancijom glukoze. Sojini izoflavoni posjeduju estrogensku aktivnost čime povoljno utječu na postprandijalnu hiperglikemiju. Sojino zrno djeluje preventivno na dijabetes 2, te odgađa njegov progresivni napredak. Izoflavoni soje također pozitivno utječu na očuvanje koštanog tkiva djelujući preventivno na osteoporozu. Genistein i sojini proteini uspješno smanjuju udio adipoznog tkiva, ukupni i LDL kolesterol. Probiotički sojin jogurt ima brojne pozitivne nutritivne vrijednosti i time se otvara velika prilika za suradnju probiotičke industrije i industrije soje. U svrhu toga da se ovaj proizvod približi potrošačima provode se brojna istraživanja za proizvodnju na industrijskoj razini (Vij i sur., 2011).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Uzorci kravljeg mlijeka, sojinog napitka i bakterijske kulture**

Mješavina korištena za fermentaciju se sastojala od trajnog kravljeg mlijeka s 2,5% mliječne masti proizvođača Meggle (Osijek, Hrvatska) i sojinog napitka s 1,9% masti robne marke dmBio (GmbH + Co.KG, Njemačka). Za fermentaciju mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka korištena je termofilna jogurtna kultura YF-L811 (Christian Hansen, Horsholm, Danska), te probiotička kultura *Lactobacillus casei* LC-Y (Christian Hansen, Horsholm, Danska).

### **3.2. Metode rada**

#### **3.2.1. Postupak pripreme inokuluma**

2,5% probiotičke kulture se nacijepilo u sve pokuse mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka. Inokulum je pripremljen na način da se 0,1204 g probiotičke kulture (LC-Y, Christian Hansen, Horsholm, Danska) i 0,0751 g jogurtne kulture (YF-L811, Christian Hansen, Horsholm, Danska) nacijepilo u 100 ml mlijeka. Za svaki od pet uzoraka se načinio poseban inokulum koji se stavljen na inkubaciju 30 minuta na 43°C da bi se bakterije adaptirale na medij. Nakon inkubacije, inokulum se nacijepio u određene omjere uzoraka mlijeka i sojinog napitka. Omjeri su iznosili A 100%, B 100%, A:B 25:75%, A:B 50:50% i A:B 75:25% pri čemu A označava udio kravljeg mlijeka, a B udio sojinog napitka.

#### **3.2.2 Postupak pripreme uzoraka**

Kako bi se izbjegla naknadna kontaminacija, priprema za fermentaciju se provodila u aseptičnim uvjetima. U menzuru se odmjerilo 1200 ml uzoraka sastavljenog od kravljeg mlijeka i sojinog napitka u određenim omjerima koji se ulijevao u čašu od 2000 ml i promiješao staklenim štapićem. Nakon mješanja čaša se zatvorila aluminijskom folijom. Pripremljeno je pet različitih omjera kravljeg mlijeka i sojinog napitka (Tablica 3), a fermentacija mješavine je izvršena u tri pokusa.

Tablica 3. Prikaz korištenih omjera kravljeg mlijeka i sojinog napitka za fermentaciju

Uzorak	Omjeri kravljeg mlijeka (A) i sojinog napitka (B)	Količina kravljeg mlijeka i sojinog napitka (ml)
Uzorak 1	A 100%	1200
Uzorak 2	B 100%	1200
Uzorak 3	A:B 25:75%	300:900
Uzorak 4	A:B 50:50%	600:600
Uzorak 5	A:B 75:25%	900:300

### 3.2.3. Čuvanje fermentirane mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka

Nakon fermentacije, uzorci mješavine mlijeka i sojinog napitka su se ohladili i stavljali u hladnjak na temperaturu od 4°C u kojem su se čuvali 21 dan. Promjene pH, °SH, reoloških i senzorskih svojstava, te preživljavanje soja *L. casei* LC-Y su se pratile 1., 7., 14. i 21. dan čuvanja za sva tri pokusa.



Slika 2. Čuvanje fermentirane mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka (vlastita fotografija)

### 3.2.4. Određivanje kiselosti probiotičkog jogurta mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka različitih omjera

Kiselost fermentiranih proizvoda određuje se pH- metrom i titracijskom kiselosti.

### 3.2.4.1. Određivanje kiselosti pH- metrom

Elektroda pH- metra je isprana destiliranom vodom i posušena staničevinom. Provedena je kalibracija elektrode pH- metra prema uputama proizvođača nakon čega slijedi daljnje provođenje analize. Elektroda je uronjena u čašu s uzorkom i ustaljena pH vrijednost je očitana na zaslonu pH- metra. Postupak ispiranja i posušivanja elektrode se ponavlja prije svakog ispitivanja uzoraka. Čista elektroda se do slijedeće upotrebe čuvala uronjena u otopinu KCl (Božanić i sur., 2010.)

### 3.2.4.2. Određivanje kiselosti po Soxhlet-Henklu

Metoda po Soxhlet-Henklu predstavlja službenu (referentnu) i titracijsku metodu za određivanje stupnja kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda u Republici Hrvatskoj. Princip:

Uzorak mlijeka se titrira četvrtmolarnom NaOH, a rezultati se izražavaju u stupnjevima po Soxhlet-Henklu (°SH). Stupnjevi °SH odgovaraju broju mililitara 0,25 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz fenolftalein kao indikator.

$$1 \text{ mL } 0,25 \text{ mol/L} = 1 \text{ } ^\circ\text{SH}$$

Međutim, prema našem pravilniku postoji modifikacija te metode: Smjesa 20 mL mlijeka + 1 mL fenolftaleina se titrira sa 0,1 M NaOH do crvenkaste boje koja je stabilna 1 minutu. Pri tome se izračunava kiselost prema sljedećoj formuli:

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

Postupak:

20 g fermentiranog napitka se u dvije Erlenmeyerove tikvice razrijedilo sa 20 mL destilirane vode. Prva tikvica je služila kao standardna boja do koje se morao titrirati analizirani uzorak, a pripremljena je tako da je u nju otpipetirano 1 mL 5%-tne otopine kobaltova sulfata ( $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ). U drugu Erlenmeyerovu tikvicu je otpipetirano 2 mL otopine fenolftaleina i titriralo se s 0,1 M NaOH. Rezultat je očitana kada je postignuta boja otopine jednake onoj u prvoj tikvici, a koja je morala biti stabilna 1 minutu. Izračun kiselosti se provodi prema izrazu:

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

gdje je

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

f- faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M=1 (Sabadoš, 1998)

### **3.2.5. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda**

Mikrobiološka analiza se provodila za sva tri pokusa u ovom istraživanju, a pratilo se preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom 1., 7., 14., i 21. dana čuvanja u hladnjaku.

#### **3.2.5.1. Priprema hranjivih podloga**

Postupak:

MRS podloga je pripremljena u skladu s uputama proizvođača, te je određen ukupan broj probiotičkih bakterija. U 1000 mL destilirane vode je postupno otopljeno 70 g MRS agara u prahu. Otopina destilirane vode i MRS agara je zagrijana na magnetskoj mješalici do točke vrelišta. Podloga je razdijeljena i sterilizirana na temperaturi od 121°C u trajanju od 15 minuta. (Božanić i sur., 2010.)

#### **3.2.5.2. Priprema antibiotika klindamicina**

Klindamicin je antibiotik koji se koristi kako bi sprječavao (inhibirao) rast korištene jogurtne kulture tijekom procesa fermentacije. Dodaje se u steriliziranu MRS podlogu neposredno prije ulijevanja iste u Petrijevu zdjelicu.

Potrebni reagensi:

- Klindamicin hidroklorid likosamid, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Njemačka
- Destilirana voda, PBF, Zagreb

Postupak:

U sterilnoj čaši je otopljeno 2 mg antibiotika u 10 mL destilirane vode. Neposredno prije izlivanja podloge u Petrijeve zdjelice pomoću sterilne injekcije dodavalo se 0,5 mL otopine

klindamicina u MRS agar. Ako se tako pripremljena otopina antibiotika ne koristi odmah ulije se u sterilne kivete i čuva u hladnjaku na -20 °C u razdoblju od maksimalno šest tjedana (ISO 20128:2006).

### **3.2.5.3. Priprema fiziološke otopine za decimalna razrjeđenja**

Postupak:

Izvagano je 9 g NaCl-a i otopljeno u 1000 mL destilirane vode, te je na taj način pripremljena 0,9%-tna otopina natrijevog klorida. Po 9 mL pripremljene fiziološke otopine se pomoću akupensera raspodijelilo u epruvete koje su se potom začepile te poredale u košaru za sterilizaciju. Sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121°C kroz 20 minuta (Božanić i sur., 2010).

### **3.2.5.4. Sterilizacija posuda**

Za korišteno posuđe provedla se suha sterilizacija u sušioniku (Uniblok 3U1, Inko, Zagreb) pri temperaturi od 170°C kroz 20 minuta. Za kontrolu uspješnosti sterilizacije korištene su gotove indikatorske trake čija je promjena boje označila da je proces sterilizacije gotov.

### **3.2.5.5. Priprema uzoraka jogurta za mikrobiološku analizu**

U Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zncima je izvagano 20 g uzorka jogurta, dodano 180 mL fiziološke otopine, te homogenizirano mućkanjem. Na taj način je pripremljeno osnovno razrjeđenje.

### **3.2.5.6. Priprema decimalnih razrjeđenja**

U epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine je sterilnom pipetom preneseno 1 mL uzorka. Na taj način je nastalo razrjeđenje koje je homogenizirano pomoću *vortex* mješača. Iz epruvete je novim sterilnim nastavkom za mikropipetu preneseno 1 mL homogeniziranog razrjeđenja u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. Postupak prenošenja i razrjeđivanja se ponavljao dok nije dobiven željeni broj decimalnih razrjeđenja.

### 3.2.5.7. Nacjepljivanje i inkubacija ploča

Za svako razrjeđenje su rađene po dvije paralele u aseptičnim uvjetima uz dva plamenika kako ne bi došlo do kontaminacije ploča. Na sterilnu i označenu Petrijevu ploču mikropipetom je nanoseno po 1 mL decimalnog razrjeđenja uzorka. Hranjivi agar je rastopljen u vodenoj kupelji zagrijanoj na 100°C, te održavan na 43-45 °C. Na svaku ploču je ukapljavano 10-12 mL tako pripremljenog hranjivog agara. Nakon ukapljavanja miješanje je obavljeno kružnim i blagim pokretima, te slabim nagibanjem zatvorene ploče. Nakon 15 minuta podloga je u potpunosti kruta, te su ploče okrenute dnom prema gore i stavljene u termostat na temperaturu od 37 °C kroz 72 h.

### 3.2.5.8. Očitavanje rezultata

Nakon inkubacije u termostatu izbrojane su porasle kolonije kulture *Lactobacillus casei* LC-Y. Za brojanje su odabrane ploče na kojima je naraslo 30-300 kolonija. Brojao se broj kolonija na paralelnim pločama za isti uzorak i isto razrjeđenje pri čemu se odstupanje u broju kolonija nije smjelo razlikovati više od ±10%. Izračunata je aritmetička sredina broja naraslih kolonija i CFU (colony forming unit)/mL prema formuli:

$$CFU/mL = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nasađen volumen} * \text{decimalno razrjeđenje}^{-1}}$$

### 3.2.6. Određivanje reoloških svojstava fermentiranim mliječnim napicima

Viskoznost je svojstvo tekućine da se opire promjeni položaja svojih molekula, odnosno trenje koje djeluje unutar tekućine kao otpor tečenju. Deformacija izazvana djelovanjem sile može se izraziti kao gradijent brzine između dviju ploha, a izraz koji to opisuje je poznat kao Newtonov zakon:

$$\tau = \mu * \gamma$$

gdje je:

$\tau$  = smično naprezanje (Pa)

$\mu$  = viskoznost (Pa s)

$\gamma$  = brzina smicanja ( $s^{-1}$ ) (Lovrić, 2003).

Potrebni pribor:

- čaša od 100 mL
- rotacijski reometar (Rheometric Scientific RM-180, Rheometric, Inc., Piscataway, SAD)

Postupak:

Mjerenje viskoznosti provedeno je na rotacijskom reometru 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 stavi uzorak od 32 mL. Za tijelo uređaja pričvrsti se cilindrično vreteno s vanjskim plaštom u kojem se nalazi uzorak jogurta. Time se omogućí da tijekom rotiranja konstantnom brzinom vreteno bude uronjeno u uzorak. Za mjerenje obrnutog momenta koji se javlja na rotirajućem vretenu korišteno je relativno obrtanje mjerne osovine u odnosu na pogonsku osovinu. Uređaj potencijometar vezan je na dinometar, prima podatke o realativnom obrtanju, pri čemu se obrtni moment pretvara u električni signal koji se prevodi u digitalnu vrijednost koja se očitava na zaslonu uređaja. Mjerenje viskoznosti provedeno je prvi, sedmi, četrnaesti i dvadeset i prvi dan čuvanja u području brzine smicanja od 100 do 1290  $s^{-1}$ .

### **3.2.7. Senzorska ocjena mlijeka i mliječnih proizvoda**

Senzorski parametri koji su se određivali u ovom istraživanju su bili: izgled, boja, konzistencija, miris, te okus jogurta. Skupina sastavljena od 5 panelista je procjenjivala uzorke jogurta mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka 1., 7., 14., i 21. dan tijekom čuvanja u hladnjaku. U tablici 4 je prikazano ocjenjivanje svakog pojedinog uzorka jogurta.



Tablica 4. Primjer obrasca za senzorsku ocjenu fermentiranih mliječnih proizvoda (Pravilnik, 2004)

Osobine	Najviši broj bodova	Postignut broj bodova	Napomena
<b>Izgled</b>	1		
<b>Boja</b>	1		
<b>Konzistencija</b>	4		
<b>Miris</b>	2		
<b>Okus</b>	12		
<b>Ukupno</b>	20		

### 3.2.8. Prihvatljivost potrošača

Testiranje potrošača se provodi u svrhu ocjene prihvatljivosti novog proizvoda. Potrošači koji sudjeluju u ispitivanju su veće grupe ispitanika koji nemaju potrebnu izobrazbu niti su već prethodno testirani. Prilikom takvog ocjenjivanja koristi se hedonistička skala po Peryamu s devet mogućih odgovora, ima jednostavnu primjenu i omogućuje statističku obradu rezultata (Vahčić i sur., 1993; Lim i sur., 2009).

Cilj testiranja prihvatljivosti je bio vidjeti kako potrošači ocjenjuju uzorke (uzorak 1-5) kao novog probiotičkog proizvoda na tržištu. U ocjenjivanju prihvatljivosti uzoraka jogurta sudjelovali su studenti PBF-a u Zagrebu. Pet uzoraka jogurta različitih omjera kravljeg mlijeka i sojinog napitka je čuvano u hladnjaku pri 4 °C do početka analiza. Uzorci su bili označeni oznakom od 1 do 5, a analiza je provedena na PBF-u.

### 3.2.9. Statistička obrada podataka

Da bi se podaci statistički obradili potrebno ih je unesti u kompjuterski sustav, te obraditi (Windows 7, Excel, Descriptive Statistics). Obrada uključuje računanje srednje vrijednosti tri paralelnih mjerenja ispitivanih vrijednosti uzoraka, te standardne devijacije kao mjere raspršenosti rezultata oko srednje vrijednosti.

$$\text{Srednja vrijednost: } \bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$

$$\text{Standardna devijacija: } \sigma^2 = \sum \frac{(x-x_i)^2}{n-1}$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio proizvesti prehrambeni funkcionalni proizvod s probiotičkim svojstvima te ispitati zadovoljava li proizvod uvjete prihvatljivosti od strane potrošača. Pripremljeno se 5 uzoraka različitih omjera kravljeg mlijeka i sojinog napitka; uzorak 1 (100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak), uzorak 2 (0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak), uzorak 3 (25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak), uzorak 4 (50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak) i uzorak 5 (75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak). Pripremljeni uzorci su se podvrgnuli fermentaciji s pomoću probiotičke kulture *Lactobacillus casei* LC-Y i jogurtne kulture. Jogurtna kultura se koristi u svrhu skraćivanja vremena fermentacije. Sva ispitivanja su provedena u 3 pokusa, a prikazane vrijednosti u tablicama i slikama su srednje dobivene vrijednosti. Nakon fermentacije uzorci su razdijeljeni i spremljeni u hladnjak na temperaturu od 4°C čiji je period čuvanja bio 21 dan.

Preživljavanje soja *Lactobacillus casei* LC-Y se određivalo u svrhu praćenja broja stanica živih mikroorganizama u vremenskom slijedu od 1., 7., 14. i 21. dana čuvanja. Očitane vrijednosti se nalaze u tablici 5.

Fizikalno-kemijski parametri koji su se pratili su pH vrijednost i titracijska kiselost (°SH). Vrijednosti su očitavane 1., 7., 14. i 21. dan čuvanja, a očitani rezultati se nalaze u tablicama 6 i 7.

Reološke vrijednosti uzoraka su prikazane na slikama 3, 4, 5 i 6, a očitavane su 1., 7., 14. i 21. dan čuvanja u hladnjaku.

Senzorsko ocjenjivanje 1., 7., 14. i 21. dana čuvanja su vršili izučeni panelisti. Ocjenjivani su izgled, boja, konzistencija, miris i okus, a vrijednosti su zajedno sa ukupnom ocjenom prikazane u tablicama 8, 9, 10 i 11. Na slici 7 je prikazana usporedba prosječnih postignutih ocjena svih uzoraka.

Prihvatljivost proizvoda je ocjenjena nakon 21. dana čuvanja. Ocjene su grafički prikazane na slikama 8, 9, 10 i 11.

#### 4.1. Mikrobiološka analiza proizvedenih fermentiranih napitaka

Da bi se neki proizvod smatrao probiotičkim, mora sadržavati minimalno  $10^6$  CFU/mL (Ashraf i Shah, 2011). Mikroorganizmi koji mogu koristiti saharozu, rafinozu ili stahiozu kao izvor ugljika mogu značajno narasti u sojinom mlijeku te proizvesti velike količine kiseline. Takvi mikroorganizmi se mogu koristiti kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih proizvoda od soje (Garro i sur., 1999). Sojino mlijeko je dobar medij za rast nekih probiotičkih kultura poput *L. casei*. Probiotičke kulture koje posjeduju svojstvo proizvodnje  $\alpha$ -galaktozidaze mogu hidrolizirati oligosaharide rafinozu i stahiozu što im ide u korist vezano za njihov rast (Donkor i Shah, 2008). Rafinoza i stahioza su uzrok pojave nadutosti u čovjeka. Fermentacijom sa laktobacilima količina stahioze i rafinoze se smanjuju. Njihovim metaboliziranjem dolazi do povećanja količine saharoze, fruktoze i galaktoze u fermentiranom sojinom mlijeku (Abraham i sur., 2014).

U tablici 5 su prikazani rezultati broja poraslih kolonija probiotičkog soja *L. casei* LC-Y u pripremljenim uzorcima tijekom 21 dan čuvanja (n=3).

Tablica 5. Broj poraslih kolonija ( $\log$  CFU mL<sup>-1</sup>) probiotičkog soja *Lactobacillus casei* LC-Y u uzorcima (uzorak 1-5) jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka u različitim omjerima tijekom 21 dan čuvanja (n=3)

Uzorak	0. dan $\log$ CFU mL <sup>-1</sup>	1. dan $\log$ CFU mL <sup>-1</sup>	7. dan $\log$ CFU mL <sup>-1</sup>	14. dan $\log$ CFU mL <sup>-1</sup>	21. dan $\log$ CFU mL <sup>-1</sup>
Uzorak 1*	3,76 ± 0,93	5,49 ± 0,18	5,71 ± 0,69	5,04 ± 0,60	4,85 ± 0,43
Uzorak 2*	2,71 ± 0,65	5,70 ± 1,13	5,09 ± 1,16	4,94 ± 0,56	6,23 ± 0,74
Uzorak 3*	2,98 ± 1,27	4,97 ± 0,63	5,05 ± 0,58	5,78 ± 1,45	5,70 ± 1,72
Uzorak 4*	2,82 ± 0,73	5,68 ± 1,40	5,62 ± 1,24	4,57 ± 0,62	4,86 ± 1,52
Uzorak 5*	3,52 ± 1,20	4,84 ± 0,56	6,30 ± 0,61	6,45 ± 0,21	5,74 ± 0,08

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

Najveći porast *L. casei* LC-Y nakon 21. dana čuvanja je zabilježen u uzorku 2 koje se sastojalo od 0% kravljeg mlijeka i 100% sojinog napitka. Nakon 1. dana čuvanja u uzorku 2 je zabilježen visok porast. Garro i sur. (1999) u svom radu navode kako probiotička kultura *L. casei* pokazuje veliki afinitet prema iskorištenju saharoze u sojinom mlijeku u početnoj fazi rasta što se podudara sa dobivenim rezultatima za uzorak 5 u odnosu na uzorak 1 koji se sastoji od 100% kravljeg mlijeka. Prilikom 7. i 14. dana zabilježen je pad broja mikroorganizama. Nakon pada, broj mikroorganizama opet kreće rasti i 21. dan doseže svoj vrhunac te zadovoljava probiotički minimum.

Uzorci 1 i 4 imaju vrlo sličnu tendenciju rasta. Nakon 7. dana čuvanja broj mikroorganizama kreće opadati. U odnosu na uzorak 3, kod uzorka 4 nakon 14. dana čuvanja je zabilježen ponovni rast *L. casei* LC-Y. Kod uzoraka 1 i 4 zabilježene su najniže vrijednosti nakon 21. dana čuvanja.

Kod uzorka 5 se može očitati najveći broj živih stanica i to nakon 14. dana čuvanja pri čemu taj broj počinje opadati do 21. dana čuvanja. Između 7. i 14. dana čuvanja zabilježene vrijednosti su na najvišoj razini te zadovoljavaju probiotički minimum.

Uzorak 3 pokazuje rast tijekom cijelih 21 dan čuvanja. Nakon 21. dana čuvanja broj naraslih mikroorganizama ne zadovoljava probiotički minimum.

Nakon pikova, u uzorcima 1, 2, 4 i 5 je uočen pad rasta *L. casei* LC-Y. Uzrok pada je vjerojatno iskorištenje nutrijenata u mediju potrebnih za rast laktobacila poput *L. casei* (Donkor i Shah, 2008). Ponovni rast koji je uočen u uzorcima 2 i 4 je vjerojatno nastao uoči adaptacije *L. casei* LC-Y na novonastale nutrijente potrebne za njezin rast.

## **4.2. Aktivna i titracijska kiselost uzoraka fermentiranih napitaka tijekom 21 dan skladištenja**

U tablicama 6 i 7 su prikazane vrijednosti kiselosti probiotičkog jogurta kroz 21 dan čuvanja. Prvo je provedena fermentacija uzoraka, a izmjerene pH vrijednosti za sve uzorke se nisu znatno razlikovale (tablica 6). Za uzorak 2 (100% sojino mlijeko) je dobivena pH vrijednost 4,68. Nakon fermentacije, pH vrijednost za sve uzorke kroz 21 dan čuvanja je počela opadati. Autori Donkor i Shah (2008) navode kako prilikom fermentacije sojinog mlijeka nastaju organske kiseline kao glavni metabolički produkti. Nastale organske kiseline uzrokuju pad pH vrijednosti u sojinom mlijeku. Izmjerene pH vrijednosti za uzorke 1, 3, 4 i 5 nakon 21. dana

čuvanja se nisu bitno razlikovale. pH vrijednost za uzorak 1 (100% kravlje mlijeko) je iznosila 4,22. Uzorak 2 pokazuje najvišu pH vrijednost nakon 21. dana čuvanja u odnosu na ostale uzorke, a iznosi 4,51. Titracijska kiselost za uzorke 3, 4 i 5 pokazuje povećanje vrijednosti kroz čitavih 21 dan čuvanja, dok se kod uzoraka 1 i 2 nakon najviše vrijednosti može uočiti blagi pad između 14. i 21. dana čuvanja (tablica 7).

Nastajanje mliječne kiseline prilikom procesa fermentacije je proporcionalna katabolizmu šećera. Ukupna količina šećera koja se utroši u mediju prilikom fermentacije odgovara količini nastale mliječne kiseline. Varijacija pH vrijednosti stoga može poslužiti kao predstavljanje utroška šećera tijekom fermentacije (Abraham i sur., 2014).

Tablica 6. Praćenje pH vrijednosti probiotičkog jogurta mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka u različitim omjerima kroz 21 dan čuvanja na 4°C (n=3)

Uzorak	0. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
<b>Uzorak 1*</b>	4,65 ± 0,02	4,49 ± 0,04	4,33 ± 0,02	4,27 ± 0,03	4,22 ± 0,03
<b>Uzorak 2*</b>	4,68 ± 0,03	4,64 ± 0,03	4,65 ± 0,03	4,66 ± 0,06	4,51 ± 0,19
<b>Uzorak 3*</b>	4,66 ± 0,02	4,50 ± 0,02	4,36 ± 0,07	4,33 ± 0,05	4,26 ± 0,05
<b>Uzorak 4*</b>	4,67 ± 0,02	4,48 ± 0,02	4,30 ± 0,03	4,26 ± 0,06	4,21 ± 0,05
<b>Uzorak 5*</b>	4,63 ± 0,02	4,49 ± 0,02	4,37 ± 0,03	4,27 ± 0,06	4,24 ± 0,04

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

Tablica 7. Praćenje titracijske kiselosti ( $^{\circ}\text{SH}$ ) probiotičkog jogurta ješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka različitih omjera kroz 21 dan čuvanja na  $4^{\circ}\text{C}$  ( $n=3$ )

Uzorak	0. dan	1. dan	7. dan	14. dan	21. dan
Uzorak 1*	$34,27 \pm 1,33$	$37,53 \pm 1,30$	$41,93 \pm 1,68$	$45,60 \pm 1,74$	$44,27 \pm 0,31$
Uzorak 2*	$21,80 \pm 2,43$	$20,67 \pm 0,99$	$22,00 \pm 2,08$	$23,07 \pm 2,19$	$20,67 \pm 6,66$
Uzorak 3*	$24,67 \pm 1,42$	$26,80 \pm 2,23$	$31,73 \pm 4,47$	$34,73 \pm 3,03$	$35,87 \pm 2,84$
Uzorak 4*	$28,13 \pm 2,14$	$31,73 \pm 2,02$	$36,80 \pm 3,50$	$40,20 \pm 3,82$	$40,53 \pm 3,44$
Uzorak 5*	$32,20 \pm 1,25$	$33,73 \pm 1,62$	$38,87 \pm 1,10$	$41,87 \pm 2,39$	$42,73 \pm 1,79$

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

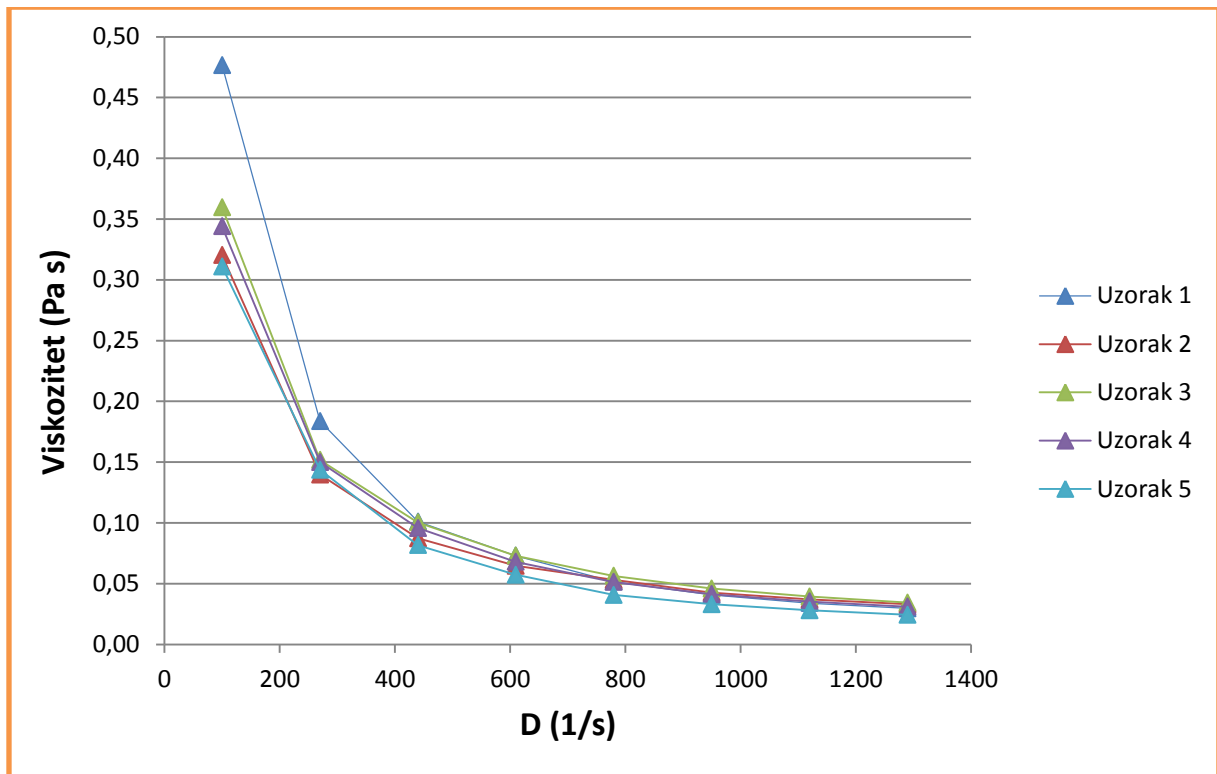
### 4.3. Reološka svojstva proizvedenih fermentiranih napitaka

Viskozitet je fizikalni parametar koji igra važnu ulogu u fermentiranim mliječnim proizvodima. Koristi se u svrhu određivanja konzistencije i osjećaja u ustima. Prilikom skladištenja jogurta stabilnost vrijednosti viskoznosti je vrlo važna kvalitativna karakteristika. *Streptococcus thermophilus* ima važnu ulogu u proizvodnji eksocelularnih tvari koje mogu vršiti interakciju sa proteinima mlijeka. Takve tvari se nazivaju eksopolisaharidi, a rezultat im je povećanje viskoznosti i reološke kvalitete proizvoda (Stijepić i sur., 2013).

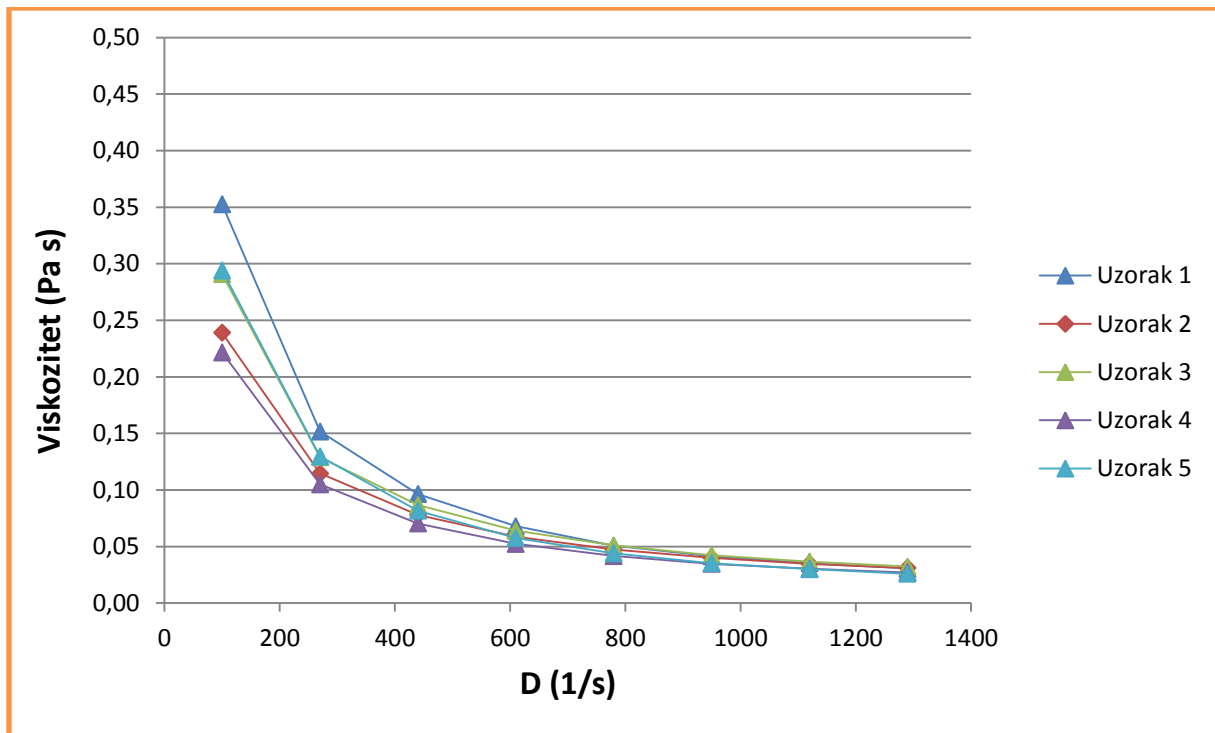
U ovom istraživanju se pratila promjena viskoznosti uzoraka probiotičkog jogurta tijekom pohrane u hladnjaku pri temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ , a rezultati su prikazani grafički na slikama 3, 4, 5 i 6. Određivala se promjena viskoznosti pri različitim brzinama smicanja: 100, 270, 440, 610, 780, 950, 1120 i  $1290\text{ s}^{-1}$ . Nakon 1. dana čuvanja vrijednost viskoznosti pri brzini smicanja od  $100\text{ s}^{-1}$  je bila između 0,25-0,56 Pa s. Vrijednost viskoznosti uzorka 2 (100% sojino mlijeko) je bila manja u odnosu na uzorak 1 (100% kravlje mlijeko) što je u skladu sa istraživanjem skupina autora Stijepić i sur. (2013). Kako se brzina smicanja povećavala, tako su se vrijednosti viskoznosti smanjivale. Postoje određena odstupanja pri manjim brzinama smicanja kod analiziranih uzoraka, no kako se brzina smicanja sve više povećava tako se

manjuju i odstupanja vrijednosti uzoraka. Značajan pad vrijednosti je uočen pri početnim promjenama brzine smicanja.

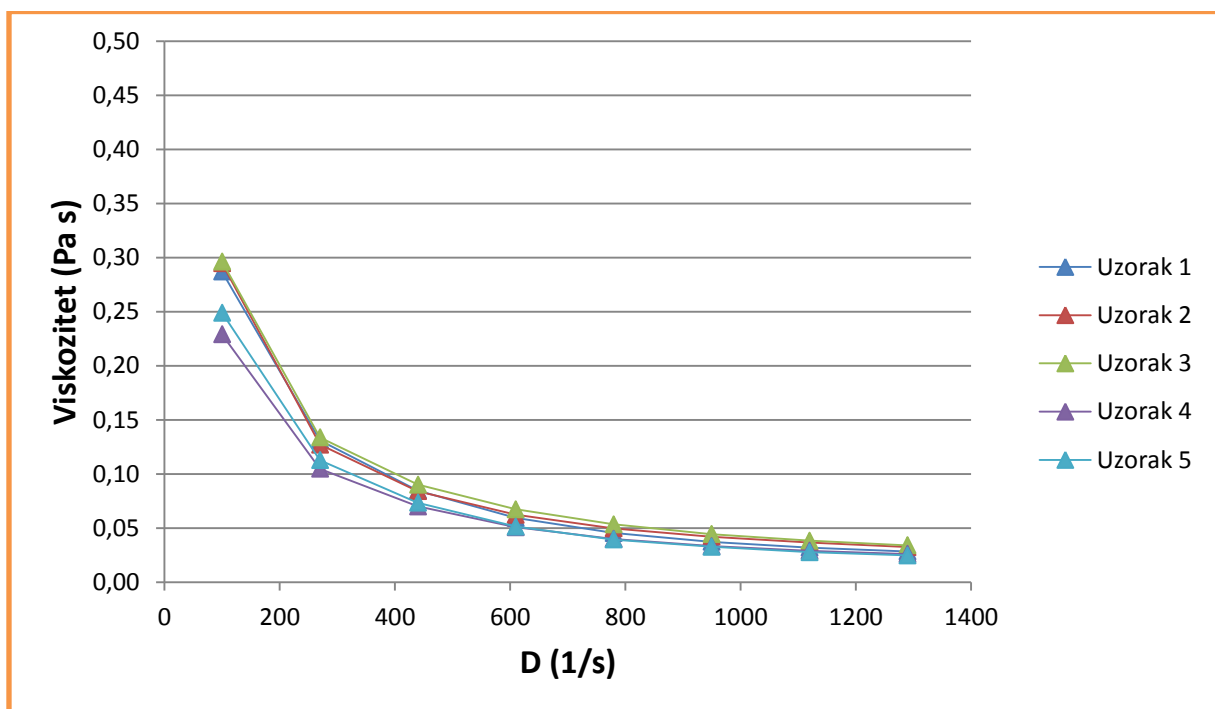
Vrijednosti viskoznosti su se mijenjale kroz period čuvanja. Zabilježena su smanjenja vrijednosti za sve uzorke sa sve većim brojem dana čuvanja.



Slika 3. Viskoznost (Pa s) uzoraka (1-5) jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka 1. dan nakon fermentacije

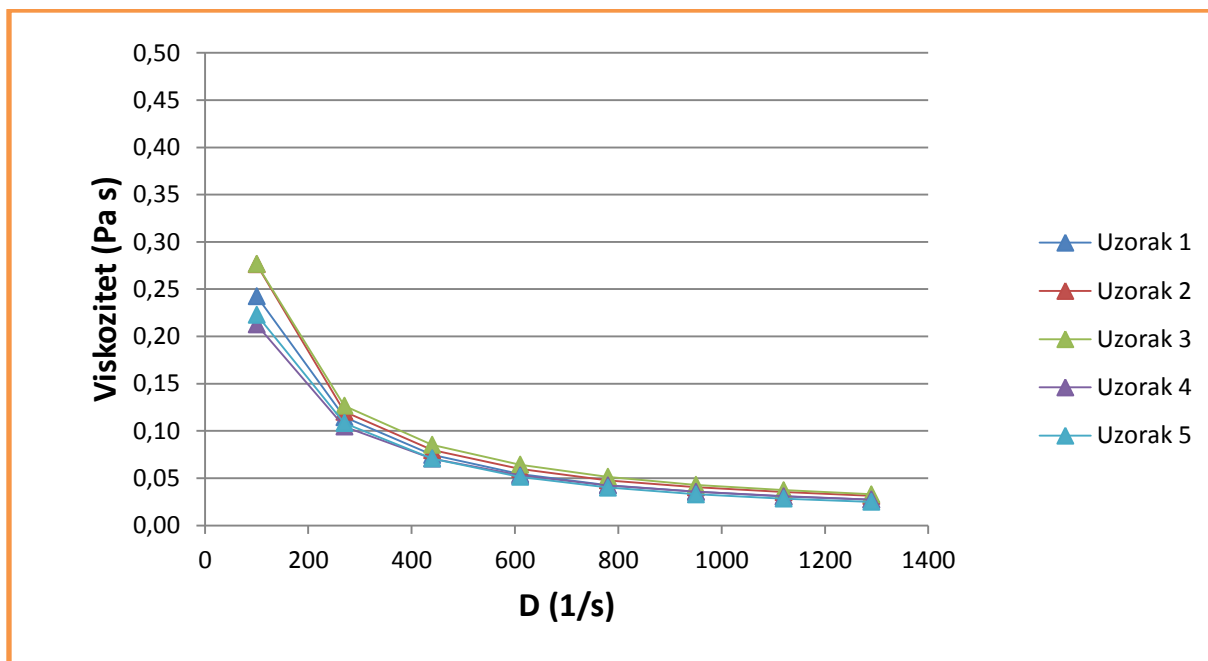


Slika 4. Viskoznost (Pa s) uzoraka (1-5) jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka 7. dan nakon fermentacije



Slika 5. Viskoznost (Pa s) uzoraka (1-5) jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka 14. dan nakon fermentacije





Slika 6. Viskoznost (Pa s) uzoraka (1-5) jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka 21. dan nakon fermentacije

#### 4.4. Senzorsko ocjenjivanje proizvedenih fermentiranih napitaka

Rezultati ocjenjivanja senzorskih karakteristika probiotičkog jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka su prikazani u tablicama 8, 9, 10 i 11. Usporedba prosječno postignutih ocjena različitih uzoraka (uzorak 1-5) probiotičkog jogurta je grafički prikazana na slici 7. Senzorsku analizu uzoraka su ocjenjivali izučeni panelisti. Ocjenjivao se izgled, boja, konzistencija, miris i okus proizvoda tijekom 21 dan čuvanja u hladnjaku na 4°C.

Tablica 8. Prosječne ocjene postignute pri senzorskoj analizi uzoraka probiotičkog jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka (uzorci 1-5) 1. dan čuvanja (n=3)

Uzorak	Izgled (max 1)	Boja (max 1)	Konzistencija (max 4)	Miris (max 2)	Okus (max 12)	Ukupno (max 20)
Uzorak 1*	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	3,64 ± 0,40	1,92 ± 0,10	10,86 ± 0,41	18,41 ± 0,72
Uzorak 2*	0,91 ± 0,09	0,93 ± 0,04	3,57 ± 0,37	1,74 ± 0,20	8,39 ± 0,54	15,54 ± 1,16
Uzorak 3*	0,92 ± 0,08	0,93 ± 0,04	3,66 ± 0,27	1,76 ± 0,15	8,74 ± 0,69	16,01 ± 1,12
Uzorak 4*	0,94 ± 0,07	0,97 ± 0,03	3,68 ± 0,02	1,83 ± 0,00	9,61 ± 0,32	17,03 ± 0,25
Uzorak 5*	0,96 ± 0,05	1,00 ± 0,00	3,76 ± 0,20	1,93 ± 0,06	9,75 ± 0,52	17,40 ± 0,74

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

Tablica 9. Prosječne ocjene postignute pri senzorskoj analizi uzoraka probiotičkog jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka (uzorci 1-5) 7. dan čuvanja (n=3)

Uzorak	Izgled (max 1)	Boja (max 1)	Konzistencija (max 4)	Miris (max 2)	Okus (max 12)	Ukupno (max 20)
Uzorak 1*	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,00	3,81 ± 0,20	1,93 ± 0,07	10,12 ± 0,47	17,85 ± 0,36
Uzorak 2*	0,88 ± 0,08	0,90 ± 0,11	3,28 ± 0,46	1,54 ± 0,24	8,09 ± 0,62	14,70 ± 1,33
Uzorak 3*	0,94 ± 0,03	0,94 ± 0,07	3,64 ± 0,37	1,85 ± 0,14	8,48 ± 0,57	15,85 ± 0,82
Uzorak 4*	0,96 ± 0,03	0,94 ± 0,04	3,47 ± 0,47	1,78 ± 0,06	8,52 ± 0,74	15,68 ± 0,78
Uzorak 5*	0,95 ± 0,06	0,97 ± 0,06	3,26 ± 0,64	1,88 ± 0,15	8,82 ± 1,02	15,88 ± 1,63

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

Tablica 10. Prosječne ocjene postignute pri senzorskoj analizi uzoraka probiotičkog jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka (uzorci 1-5) 14. dan čuvanja (n=3)

Uzorak	Izgled (max 1)	Boja (max 1)	Konzistencija (max 4)	Miris (max 2)	Okus (max 12)	Ukupno (max 20)
Uzorak 1*	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,03	3,48 ± 0,49	1,80 ± 0,24	9,89 ± 0,89	17,10 ± 1,66
Uzorak 2*	0,84 ± 0,06	0,87 ± 0,05	3,09 ± 0,59	1,41 ± 0,34	7,42 ± 0,44	13,63 ± 1,41
Uzorak 3*	0,88 ± 0,03	0,91 ± 0,05	3,28 ± 0,42	1,67 ± 0,20	7,73 ± 0,46	14,48 ± 1,08
Uzorak 4*	0,87 ± 0,02	0,92 ± 0,04	3,30 ± 0,33	1,71 ± 0,18	8,72 ± 0,03	15,51 ± 0,47
Uzorak 5*	0,86 ± 0,02	0,94 ± 0,01	3,29 ± 0,32	1,75 ± 0,24	9,10 ± 0,65	15,94 ± 1,18

\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak

Tablica 11. Prosječne ocjene postignute pri senzorskoj analizi uzoraka probiotičkog jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka (uzorci 1-5) 21. dan čuvanja (n=3)

Uzorak	Izgled (max 1)	Boja (max 1)	Konzistencija (max 4)	Miris (max 2)	Okus (max 12)	Ukupno (max 20)
Uzorak 1*	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,02	3,31 ± 0,70	1,64 ± 0,38	9,51 ± 0,78	16,37 ± 1,87
Uzorak 2*	0,68 ± 0,15	0,75 ± 0,10	2,23 ± 0,15	1,28 ± 0,31	6,91 ± 0,69	11,86 ± 1,20
Uzorak 3*	0,87 ± 0,07	0,90 ± 0,05	3,08 ± 0,43	1,55 ± 0,28	8,07 ± 0,90	14,46 ± 1,55
Uzorak 4*	0,89 ± 0,10	0,93 ± 0,04	3,27 ± 0,47	1,78 ± 0,05	9,19 ± 0,80	16,06 ± 1,36
Uzorak 5*	0,94 ± 0,02	0,95 ± 0,02	3,38 ± 0,47	1,86 ± 0,11	9,39 ± 0,74	16,53 ± 0,57

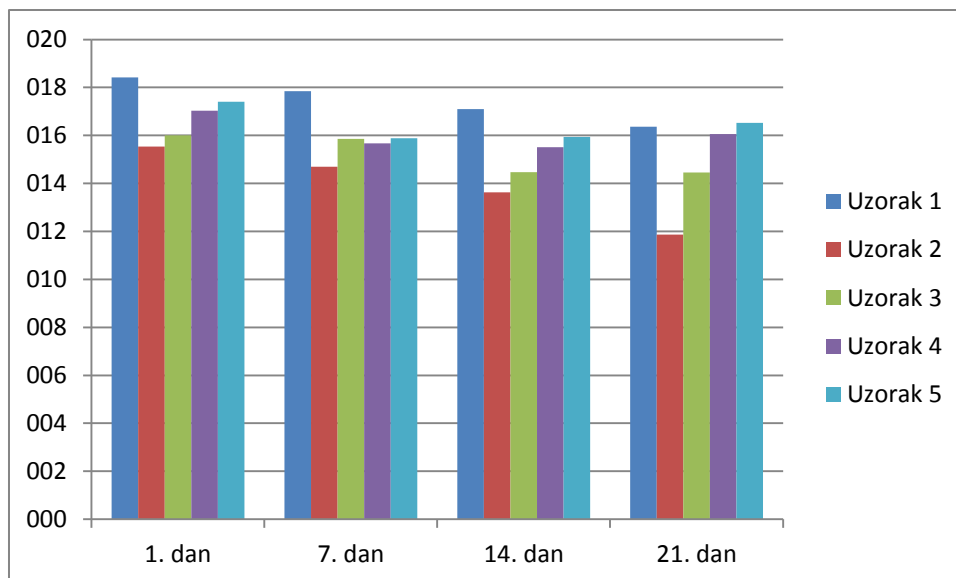
\*Uzorak 1= 100% kravlje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravlje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak



\*Uzorak 1= 100% kravljje mlijeko + 0% sojin napitak

\*Uzorak 2= 0% kravljje mlijeko + 100% sojin napitak

\*Uzorak 3= 25% kravljje mlijeko + 75% sojin napitak

\*Uzorak 4= 50% kravljje mlijeko + 50% sojin napitak

\*Uzorak 5= 75% kravljje mlijeko + 25% sojin napitak

Slika 7. Usporedba prosječnih ukupno postignutih ocjena prilikom senzorske analize različitih uzoraka (Uzorak 1-5) probiotičkih jogurta od mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka

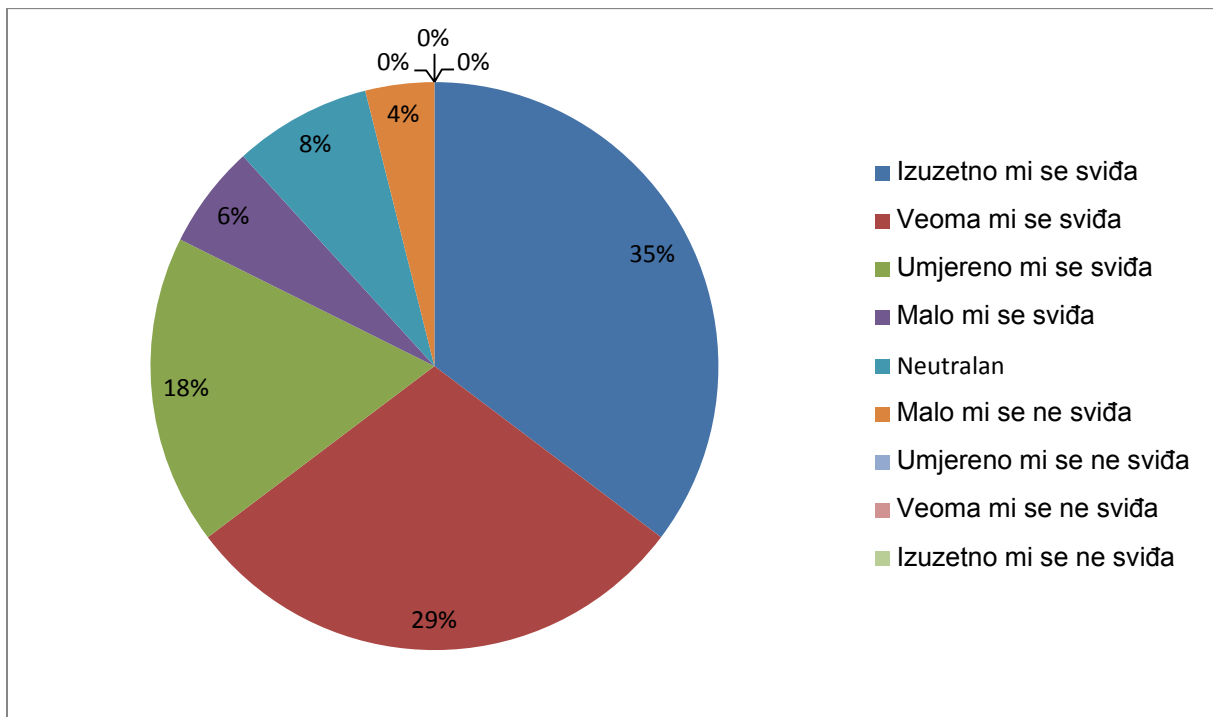
Pri ocjenjivanju izgleda, boje, konzistencije i mirisa ocjene se nisu značajno mijenjale kroz period čuvanja, osim za uzorak 2 (100% sojino mlijeko) u kojemu se sa porastom broja dana čuvanja znatno smanjuju ocijenjene vrijednosti. Ocjena mirisa proizvoda se smanjuje za sve uzorke kroz period čuvanja, dok je kod uzorka 2 zabilježena najniža vrijednost nakon 21. dana čuvanja (1,28/2). Ocjene okusa za uzorke 1 i 2 također opadaju kroz period čuvanja, dok je kod uzorka 2 zabilježena najniža vrijednost nakon 21. dana čuvanja (6,91/12). Kod ukupne ocjene senzorskih svojstava najniže vrijednosti su zabilježene za uzorak 2 koji kroz period čuvanja još više opada, te na kraju 21. dana čuvanja iznosi 11,86 (max 20). Najviše vrijednosti su zabilježene za uzorak 1 (100% kravljje mlijeko). Na kraju čuvanja vrijednost uzorka 1 iznosi 16,36.

Sojin jogurt ima loša organoleptička svojstva u odnosu na mliječne proizvode. Glavni uzrok tome je okus po grahoricama koji potječe od neprihvatljivih komponenata arome kao što su n-heksanal i pentanal koji su prisutni u sojinom mlijeku, a nastaju prilikom razgradnje

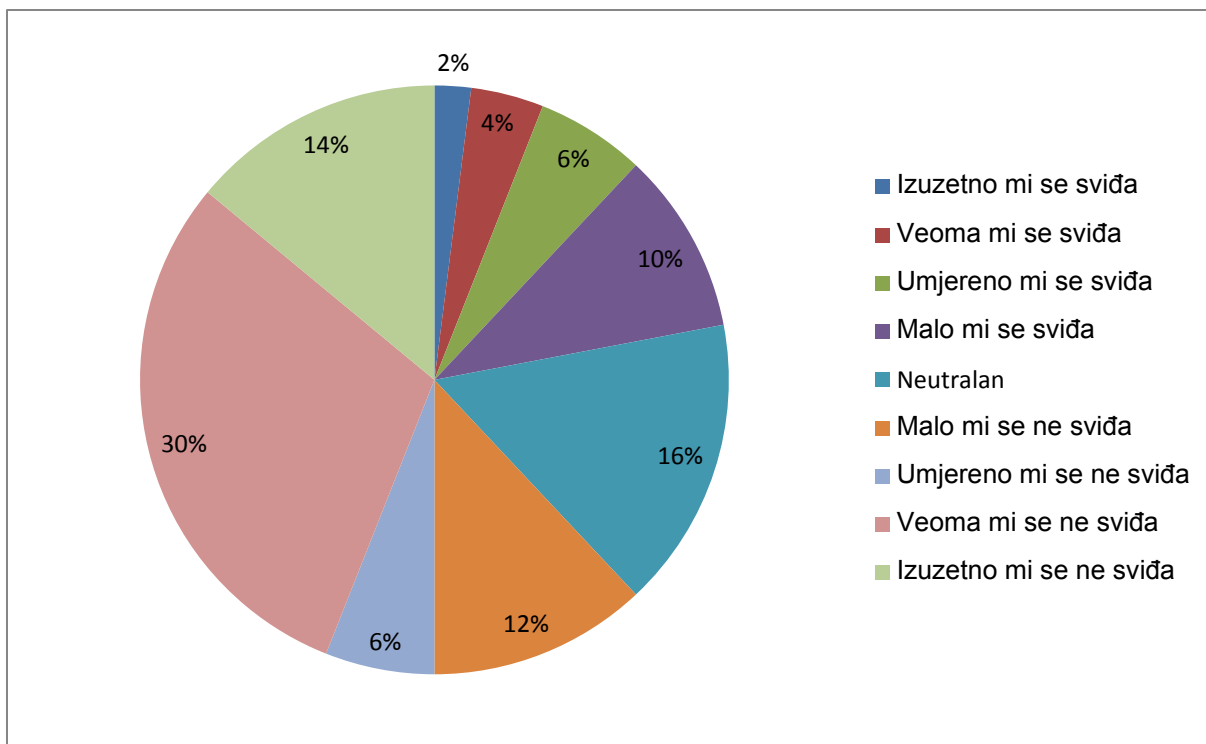
nezasićenih masnih kiselina. Da bi proizvod bio prihvatljiv od strane potrošača, on mora imati dobra senzorska svojstva. Senzorska svojstva se mogu poboljšati dodatkom različitih proizvoda od voća ili dodatnim okusima. Procjena senzorskih svojstava novih prehrambenih proizvoda je vrlo važan korak u razvoju prihvatljivosti i privlačnosti proizvoda. Proizvodi na tržištu koji su okarakterizirani kao novi poput sojinog jogurta mogu sadržavati nepoznate komponente okusa i arome što bi moglo odbiti potrošača. Suplementacijom okusa i arome sa poznatim komponentama okusa kao što su voćni okus i okus slatkog, možemo pozitivno utjecati na sveukupnu senzorsku kvalitetu jogurta (Dalev i sur., 2006). Današnji jogurti su obogaćeni aromom vanilije, jagode, čokolade, dok neke industrije dodaju voće u obliku konzerviranog voća, zamrznutog voća i nekih drugih proizvoda od voća. Voće je bogat izvor vitamina i minerala koji dodatno obogaćuju kravlje i sojino mlijeko prilikom njihovog dodavanja (Farinde i sur., 2010).

#### 4.5. Ocjena prihvatljivosti proizvedenih fermentiranih napitaka

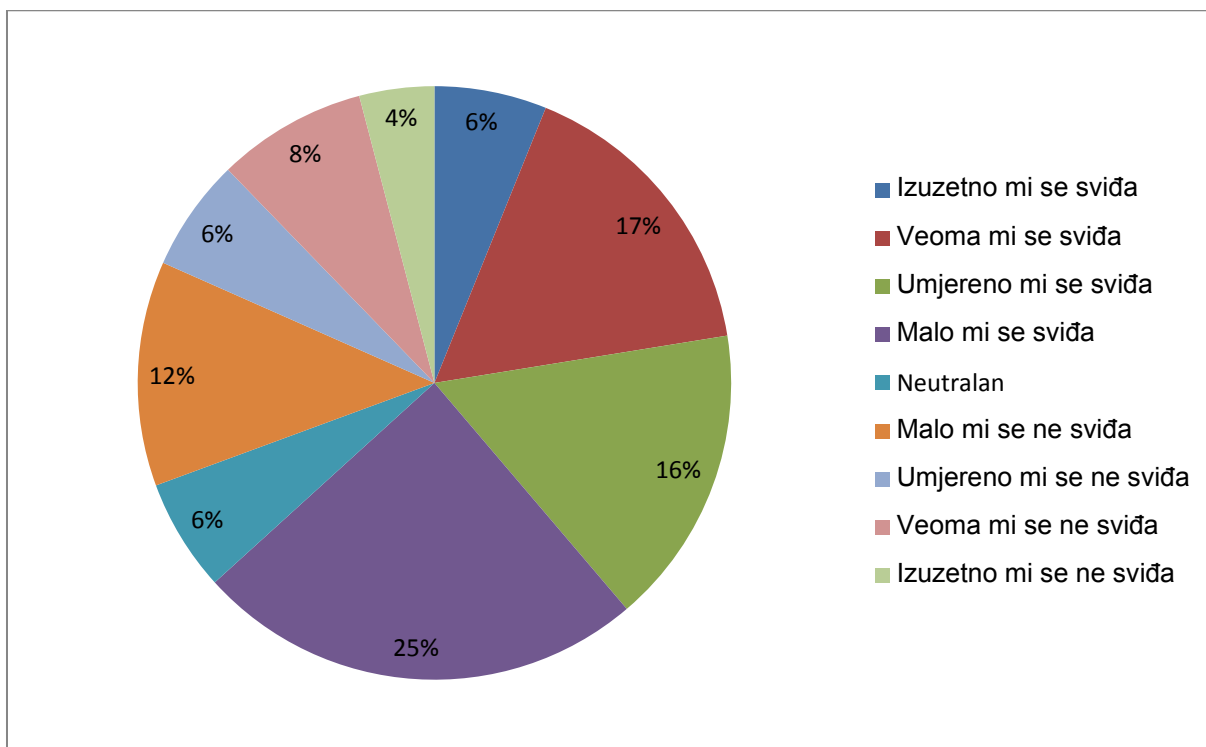
U ocjenjivanju prihvatljivosti uzoraka probiotičkog jogurta je sudjelovala 51 osoba (studenti PBF-a). Ocjene prihvatljivosti uzoraka su grafički prikazane na slikama 8, 9, 10, 11 i 12.



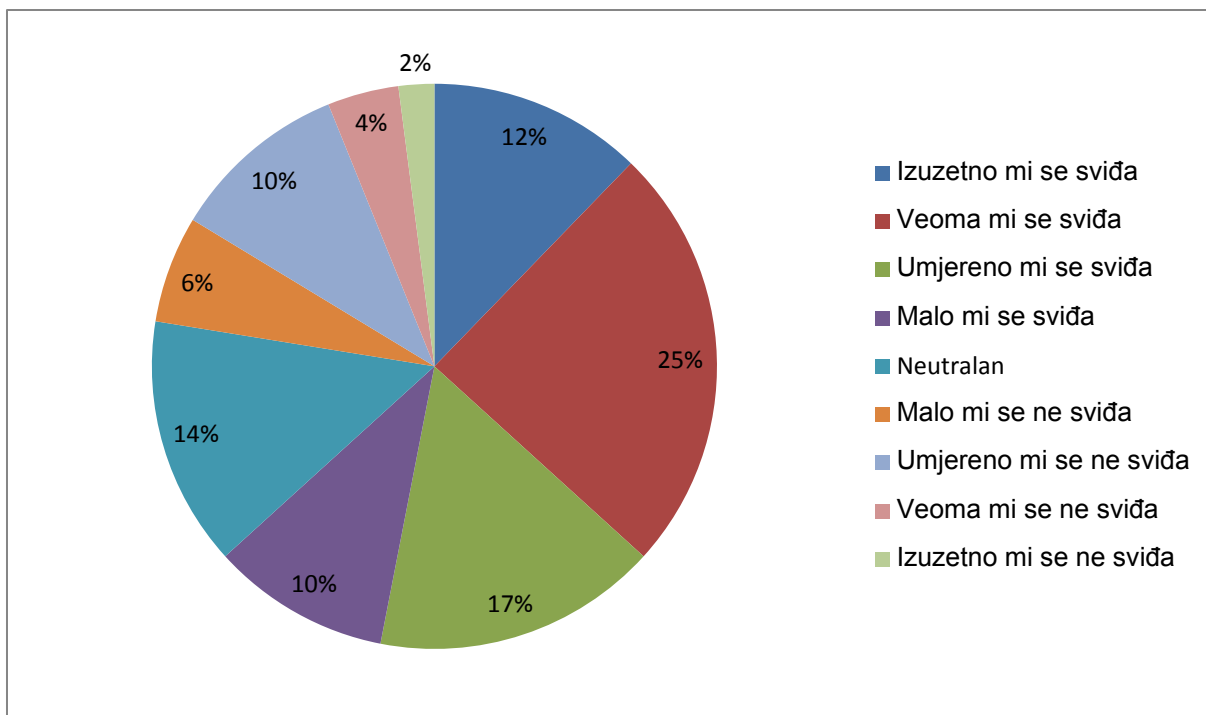
Slika 8. "Hedonistička skala" prihvatljivosti uzorka 1 (100% kravlje mlijeko)



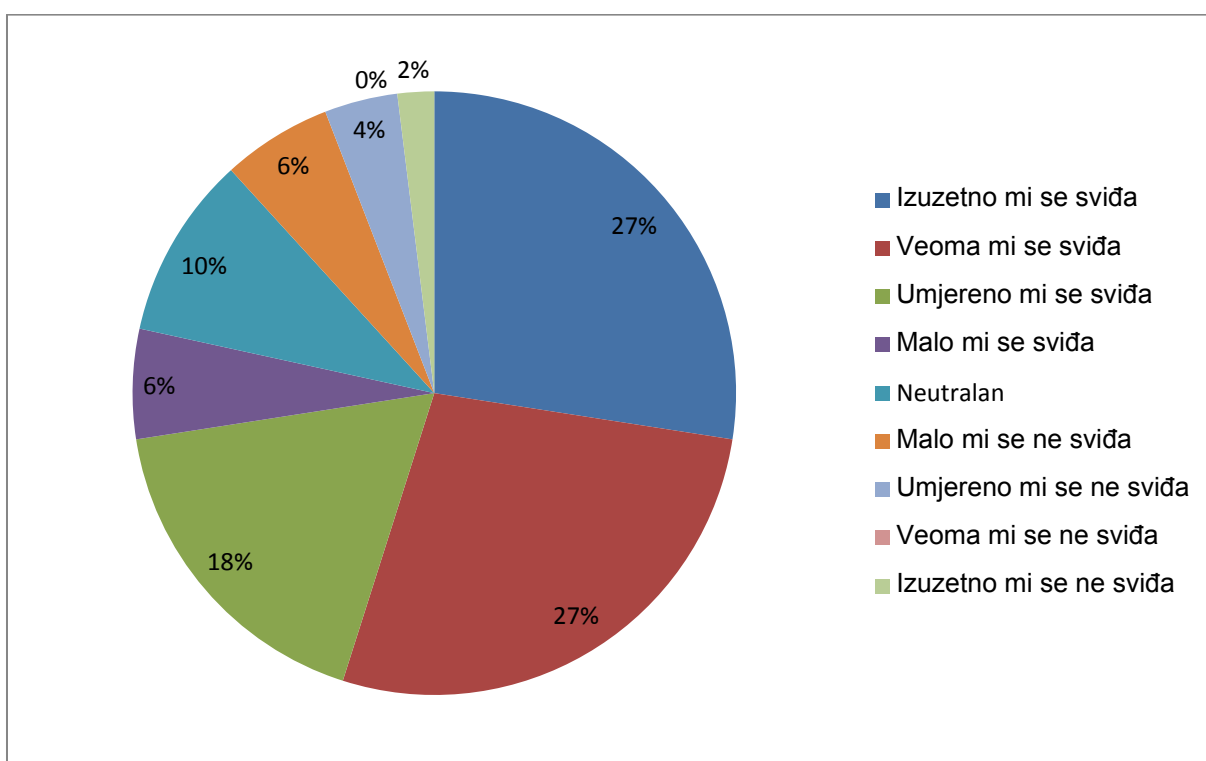
Slika 9. "Hedonistička skala" prihvatljivosti uzorka 2 (100% sojin napitak)



Slika 10. "Hedonistička skala" prihvatljivosti uzorka 3 (25% kravlje mlijeko + 75% sojin napitak)



Slika 11. "Hedonistička skala" prihvatljivosti uzorka 4 (50% kravlje mlijeko + 50% sojin napitak)



Slika 12. "Hedonistička skala" prihvatljivosti uzorka 5 (75% kravlje mlijeko + 25% sojin napitak)

Najbolje ocijenjeni uzorci su uzorak 1 i uzorak 5. Prema hedonističkoj skali, većina ispitanika je ocijenila uzorak 1 kao "izuzetno mi se sviđa". Uzorak 5 je većinski ocijenjen kao "izuzetno mi se sviđa" i "veoma mi se sviđa".

Uzorak 4 je većinski dobio ocjenu kao "veoma mi se sviđa", a uzorak 3 kao "malo mi se sviđa".

Uzorak 2 je dobio najnižu ocjenu prihvatljivosti proizvoda. Ocijenjen je kao "veoma mi se ne sviđa" te ne zadovoljava standarde potencijalnih kupaca.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja te dobivenih rezultata fizikalno-kemijskih, mikrobioloških i senzorskih analiza proizvedenog jogurta mješavine kravljeg mlijeka i sojinog napitka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Nakon fermentacije niti jedan uzorak nije zadovoljio probiotički minimum od  $10^6$  CFU/mL, stoga uzorci nemaju karakteristike probiotičkog proizvoda.
2. Najbolji rast probiotičke kulture *L. casei* LC-Y je zabilježen u uzorku 2 koji se sastoji od 0% kravljeg mlijeka i 100% sojinog napitka.
3. pH vrijednost opada u svim uzorcima kroz 21 dan čuvanja. U uzorku 2 (100% sojin napitak) je uočena najniža pH vrijednost u odnosu na druge uzorke.
4. Vrijednosti viskoznosti su se mijenjale kroz period čuvanja. Zabilježena su smanjenja vrijednosti za sve uzorke sa sve većim brojem dana čuvanja. Značajan pad vrijednosti je uočen pri početnim promjenama brzine smicanja.
5. Kod ukupne ocjene senzorskih svojstava najniže vrijednosti su zabilježene za uzorak 2 (100% sojino napitak) koji kroz period čuvanja još više opada. Najviše vrijednosti su zabilježene za uzorak 1 (100% kravlje mlijeko).
6. Uzorak 2 (100% sojin napitak) je dobio najnižu ocjenu prihvatljivosti proizvoda. Ocjenjen je kao "veoma mi se ne sviđa" te ne zadovoljava standarde potencijalnih kupaca. Uzorci sa većim udjelom kravljeg mlijeka pokazuju veću prihvatljivost ispitanika.

## 6. LITERATURA

Abraham, A., Giri, S. K., Tripathi, M. K., Singh, R., Devi, W. E., Shukla, V. (2014) Optimization of fermentation conditions for the development of probiotic soymilk using *Lactobacillus Paracasei* ssp. *Paracasei* 013 strain. *Int. J. Res. Eng. Adv. Tech.* **2 (3)**, 1-8.

Anonymus 1, Soja (*Glycine max* L.), <<https://www.finedininglovers.com/stories/soy-facts/>> Pristupljeno 1. rujna, 2017.

Anonymus 2, *Lactobacillus*, <<http://buffalobeerbiochemist.com/beer-science-lactobacillus-in-beer/>> Pristupljeno 1. rujna, 2017.

Anonymus 3, *Enterococcus*, <[https://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin-resistant\\_Enterococcus](https://en.wikipedia.org/wiki/Vancomycin-resistant_Enterococcus)> Pristupljeno 1. rujna, 2017.

Anonymus 4, *Bifidobacterium*, <[http://www.mysticalbiotech.com/portfolio\\_category/bifidobacterium/](http://www.mysticalbiotech.com/portfolio_category/bifidobacterium/)> Pristupljeno 1. rujna, 2017.

Ashraf, R., Shah, N. P. (2011) Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *Int. J. Food Microbiol.* **149 (3)**, 194-208.

Barbalho, S. M., Farinazzi-Machado, F. M. V. (2011) Soybean: food or remedy? U: Soybean and nutrition, (El-Shemy, H. A., ured.), InTech, [CC BY-NC-SA 3.0 license](#) str. 21-22.

Berk, Z. (1992) Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. FAO Agriculture Services Bulletin No **97**, Rome.

Bosnić, P. (2003) Svjetska proizvodnja i kvaliteta kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **53 (1)**, 37-50.

Božanić, R. (2006) Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. *Mljekarstvo* **56 (3)**, 233-254.

Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda- priručnik, Plejada, Zagreb.

- Cai, H., Rodriguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R., Steele, J. L. (2007) Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* **153**, 2655-2665.
- Chan-Blanco, Y., Bonilla-Leiva, A. R., Velazquez, A. C. (2003) Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. *Appl. Microbio. Biot.* **63** (2), 147-152.
- Čalić, S., Friganović, E., Maleš, V., Mustapić, A. (2011) Funkcionalna hrana i potrošači. *Praktični menadžment : stručni časopis za teoriju i praksu menadžmenta*, **2** (1), 51-57.
- Daley, D., Bielecka, M., Troszynska, A., Ziajka, S., Lamparski, G. (2006) Sensory quality of new probiotic beverages based on cheese whey and soy preparation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **15/56**, 71-77.
- Donkor, N. O., Shah, N. P. (2008) Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J. Food Sci.* **73** (1), M15-M20.
- Farinde, E. O., Obatolu, V. A., Oyarekua, M. A., Adeniran, H. A., Ejoh, S. I., Olanipekun, O. T. (2010) Physical and microbial properties of fruit flavoured fermented cowmilk and soy milk (yoghurt-like) under different temperature of storage. *Afr. J. Food Sci.* **1** (5), 120-127.
- Favaro- Trindade, C. S., Terzi, S. C., Trugo, L. C., Della Modesta, R. C., Couri, S (2001) Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. *Arch. Latinoam. Nutr.* **51** (1) 100-104.
- Folquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 1-24.
- Fox, P. F. (1995) Lactose, water, salts and vitamins, 2. izd., Chapman and Hall, New York.
- Friedman, M., Brandon, D. L. (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* **49** (3), 1069-1086.
- Garcia, M. C., Torre, M., Marina, M. L., Laborda, F., Rodriguez, A. R. (1997) Composition and characterization of soyabean and related products. *Crit. Rev. Food Sci.* **37** (4), 361-391.
- Garro, M. S., De Valdez, G. F., Oliver, G., De Giori, G. S. (1999) Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. *J. Food Protect.* **62** (7), 808-810.

Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* **1**, 139-157.

Grajek, W., Olejnik, A., Sip, A. (2005) Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim. Pol.* **52 (3)**, 665-671.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73 (2)**, 365S-373S.

ISO 20128:2006, Milk products - Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on selective medium- colony-count technique at 37 °C.

Liener, I. E. (1994) Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Food Sci.* **34 (1)**, 31-67.

Lim, J., Wood, A., Green, B., G. (2009) Derivation and evaluation of a labeled hedonic scale. *Chem. Senses* **34**, 739-751.

Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. HINUS, Zagreb.

Marenjak, T. S., Poljičak-Milas, N., Delaš, I. (2006) Biološki aktivne tvari u mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Mljekarstvo* **56 (2)**, 119-137.

Medic, J., Atkinson, C., Hurburgh Jr., C. R. (2014) Current knowledge in soybean composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91 (3)**, 363-384.

Messina, M. (2016) Soy and health update: evaluation of the clinical and epidemiologic literature. *Nutrients* **8**, 754.

Millette, M., Luquet, F. M., Lacroix, M. (2007) In vitro growth of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*- fermented milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **44 (3)**, 314-319.

Mishra, V., Prasad, D. N. (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **103 (1)**, 109-115.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **82**, 279-289.

Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (2007) *Narodne novine* **46**, Zagreb.

Pravilnik za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004): Interni pravilnik Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rogelj, I., Miklič-Anderlič, A., Bogovič-Matijašić, B. (1998) Preživljavanje *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. tijekom skladištenja fermentiranog mlijeka. *Mljekarstvo* **48 (1)**, 27-36.

Sabadoš, D. (1998): Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Sauvageot, N., Beaufils, S., Maze, A., Deutscher, J., Hartke, A. (2006) Cloning and characterization of a gene encoding a cold-shock protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **254 (1)**, 55-62.

Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- A review. *Appetite* **51 (3)**, 456-467.

Slover, C. M., Danziger, L. (2008) Lactobacillus: a review. *Clin. Microbiol. Newsl.* **30 (4)**, 23-30.

Soccol, C. R., Vanderberghe, L. P. D., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. (2010) The potential of probiotics: A review. *Food Technol. Biotech.* **48 (4)**, 413-434.

Stijepić, M., Glušac, J., Đurđević-Milošević, D., Pešić- Mikulec, D. (2013) Physicochemical characteristics of soy probiotic yoghurt with inulin addition during the refrigerated storage. *Rom. Biotech. Lett.* **18 (2)** 8077-8085.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47 (1)**, 57-73.

Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. (Volarić, V., ured.) Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2016. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Nutrient Data Laboratory Home Page <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4845?n1=%7Bn1%3D%7BQv%3D1%7D%2C+Qv%3D1%7D&fgcd=&sort=&offset=&format=Stats&new=&measureby=&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>> Pristupljeno 2. rujna 2017.

Vahčić, N., Ritz, M., Vojnović, V., Hruškar, M. (1993) Potrošačka ocjena prihvatljivosti komercijalnog jogurta primjenom hedonističke skale. *Mljekarstvo* **43** (2), 153-159.

Vij, S., Hati, S., Yadav, D. (2011) Biofunctionality of probiotic soy yoghurt. *Food Nutr. Sci.* **2**, 502-509.

Villares, A., Rostagno, M. A., Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Martiez, J. A. (2011) Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food Bioprocess Tech.* **4**, 27-38.