

# Razvoj recepture i karakterizacija običnog i fermentiranog zobenog napitka

---

**Novak, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:159:054872>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Marina Novak

1362/PI

**RAZVOJ RECEPTURE I  
KARAKTERIZACIJA OBIČNOG I  
FERMENTIRANOG ZOBENOG  
NAPITKA**

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 doc. dr. sc. Irene Barukčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović.

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ireni Barukčić na ukazanom povjerenju, vodstvu, strpljenju, stručnim savjetima, pomoći i razumijevanju tijekom izrade rada.*

*Veliko hvala i doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakobović na izdvojenom vremenu, stručnim uputama, ugodnoj atmosferi i velikoj pomoći kod izrade eksperimentalnog dijela rada. Zahvaljujem se i dr. sc. Editi Juraga, Atera d.o.o. za donaciju starter kultura.*

*Zahvaljujem se svim kolegicama i kolegama koji su mi uljepšali studiranje i na bilo koji način pomogli u fakultetskim obavezama.*

*Na kraju, najveće hvala mojim najbližima, mojim roditeljima, sestri, baki i dečku, koji su vjerovali u mene od početka studiranja te mi svojom emocionalnom i financijskom podrškom omogućili da doguram do ovdje.*

## 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

### RAZVOJ RECEPTURE I KARAKTERIZACIJA OBIČNOG I FERMENTIRANOG ZOBENOG NAPITKA

Marina Novak, 1362/PI

**Sažetak:** *Biljni napitci uživaju sve veći interes potrošača koji traže adekvatnu alternativu za mlijeko. Uz nedovoljno istražene načine proizvodnje, biljne napitke karakteriziraju smanjena nutritivna i senzorska kvaliteta u odnosu na mlijeko i mliječne prerađevine. Stoga su ciljevi ovog rada bili razviti recepturu za proizvodnju dva tipa senzorski i nutritivno prihvatljivih zobenih napitaka – nefermentiranog i fermentiranog, karakterizirati im osnovni sastav i svojstva te procijeniti trajnost. Optimalna receptura za proizvodnju nefermentiranog napitka podrazumijeva omjer zob:voda 4:100, a fermentiranog dodatak 1 % rogača u prahu, 2 % brašna sjemenki rogača, 3 % saharoze i 0,1 % vanilina te fermentaciju VEGE 053 LYO kulturom. Oba proizvoda su praćena tijekom 28 dana skladištenja. pH fermentiranog zobenog napitka bio je stabilniji i niži u odnosu na nefermentirani napitak. Udio suhe tvari (7,12 %) i pepela (0,12 %) bio je viši u fermentiranim zobenim napitcima, a opadao je u oba proizvoda tijekom skladištenja. Reološka mjerenja su pokazala da je riječ o ne-Newtonskim tekućinama, s tim da je fermentiranim zobenim napitcima utvrđena veća viskoznost. Udio soli u svim uzorcima je nizak (0,81-1,17 %) i skladištenjem se nije mijenjao, dok je udio glukoze (1,87 %) i maltoze (4,40 %) padao. Fermentirani zobeni napitak je senzorski bio bolje ocijenjen (19,33) u odnosu na nefermentirani napitak (18,00) te je imao veću trajnost (35 dana).*

**Ključne riječi:** *zobeni napitak, receptura, fermentacija, trajnost, rogač*

**Rad sadrži:** 78 stranica, 20 slika, 18 tablica, 76 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Irena Barukčić

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović
2. doc. dr. sc. Irena Barukčić
3. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
4. doc. dr. sc. Marko Obranović (zamjena)

**Datum obrane:** 23. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### FORMULATION DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ORDINARY AND FERMENTED OAT BEVERAGE

*Marina Novak, 1362/PI*

**Abstract:** *Plant-based beverages are gaining more interest of consumers looking for an adequate alternative to milk. In addition to insufficiently researched production methods, plant-based beverages are characterized by reduced nutritional and sensory quality compared to milk and dairy products. Accordingly, the aims of this thesis were to develop a formulation for the production of two types of sensory and nutritionally acceptable oat beverages – unfermented and fermented, to characterize their basic composition and properties and to assess shelf life. The optimal formulation for the production of unfermented beverage involves the ratio of oats:water 4:100, and for fermented addition of 1 % carob powder, 2 % carob seed flour, 3 % sucrose and 0.1 % vanilla, and fermentation with VEGE 053 LYO culture. Both beverages were monitored during the 28 days of storage. pH of the fermented beverage was more stable and lower when compared to the unfermented beverage. Dry matter (7.12 %) and ash (0.12 %) content was higher in fermented beverage, and decreased in both beverages during storage. Rheological measurements showed that these were non-Newtonian liquids, with a higher viscosity of the fermented beverage. The salt content was low (0.81-1.17 %) in all samples and didn't change during storage, while the content of glucose (1.87 %) and maltose (4.40 %) decreased. The fermented beverage was sensory rated better (19.33) compared to the unfermented beverage (18.00) and had a longer shelf life (35 days).*

**Keywords:** *oat beverage, formulation, fermentation, shelf life, carob*

**Thesis contains:** 78 pages, 20 figures, 18 tables, 76 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD, *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor
2. PhD. *Dubravka Novotni*, Associate professor
3. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
4. PhD. *Marko Obranović*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 23 September 2021

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. BILJNI NAPITCI .....	2
2.1.1. Proizvodnja biljnih napitaka .....	3
2.1.2. Usporedba biljnih napitaka i kravljeg mlijeka .....	4
2.2. ZOB .....	7
2.2.1. Morfologija zobi .....	7
2.2.2. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost zobi .....	9
2.2.3. Zobeni napitak.....	11
2.3. FERMENTACIJA.....	13
2.3.1. Starter kulture .....	13
2.3.2. Fermentacija zobenih napitaka .....	15
2.4. ROGAČ KAO FUNKCIONALNI DODATAK .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI.....	18
3.2. PROIZVODNJA ZOBENOG NAPITKA I FERMENTIRANOG ZOBENOG NAPITKA .....	19
3.2.1. Proizvodnja zobenog napitka .....	19
3.2.2. Proizvodnja fermentiranog zobenog napitka .....	21
3.3. METODE RADA .....	23
3.3.1. Određivanje pH vrijednosti .....	23
3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari .....	24
3.3.3. Određivanje udjela pepela .....	24
3.3.4. Određivanje reoloških svojstava .....	25
3.3.5. Određivanje udjela soli metodom po Mohr-u.....	25
3.3.6. Određivanje udjela maltoze i glukoze metodom po Loff-Schoorl-u .....	27
3.3.7. Mikrobiološke analize.....	29
3.3.8. Senzorske analize .....	30
3.4. OBRADA REZULTATA .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA .....	33
4.1.1. Proizvodnja zobenog napitka .....	33
4.1.2. Fermentacija zobenog napitka .....	35
4.2. GLAVNI POKUS.....	43
4.2.1. Fermentacija zobenog napitka odabrane recepture.....	43



4.3.	SVOJSTVA OBIČNOG I FERMENTIRANOG ZOBENOG NAPITKA TIJEKOM 28 DANA .....	44
4.3.1.	Kiselost proizvoda.....	45
4.3.2.	Udio suhe tvari i pepela.....	48
4.3.3.	Reološka svojstva .....	50
4.3.4.	Udio soli.....	55
4.3.5.	Udio glukoze i maltoze .....	56
4.3.6.	Rezultati mikrobiološke analize.....	59
4.3.7.	Senzorska svojstva.....	63
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>71</b>

# 1. UVOD

Potrošači su u današnje doba sve više svjesni sastava hrane koju unose u organizam te će stoga pratiti količinu i sastav masti, ugljikohidrata i proteina u određenom prehrambenom proizvodu, a također biraju onu hranu koju karakteriziraju funkcionalni učinci. U skladu s tim, sve je veći naglasak na hranu biljnog podrijetla, koja u određenim sastavnicama ima prednost pred hranom životinjskog podrijetla. Žitarice, mahunarke, orašasti plodovi i sjemenke već čine veliki dio svakodnevne prehrane ljudi, međutim, razvijaju se novi proizvodi na njihovoj bazi koji će biti alternativa hrani životinjskog podrijetla. Jedan od glavnih zahtjeva potrošača su alternative životinjskom mlijeku, bez laktoze i proteina mlijeka koji kod pojedinaca mogu izazvati netoleranciju i alergije. Takvi proizvodi se nazivaju biljnim napitcima te ih karakterizira prisustvo bioaktivnih sastojaka, veliki antioksidativni kapacitet, adekvatan sastav masnih kiselina te odsutnost kolesterola.

Međutim, unatoč povoljnim učincima na zdravlje, biljni napitci imaju određene nedostatke pred životinjskim mlijekom kao što su smanjena nutritivna vrijednost, najviše uslijed manjeg udjela proteina, manja bioraspoloživost mineralnih tvari, a jedan od najvećih nedostataka predstavlja manja senzorska kvaliteta. Da bi se ovi nedostaci uklonili, biljni napitci se mogu obogatiti dodavanjem raznih sastojaka kao što su tvari arome, šećer, mineralne tvari i slično, a mogu se dodati i starter kulture koje će provesti postupak fermentacije kako bi se dobio napitak sličan jogurtu. Mnoga istraživanja su već godinama dokazala zdravstvenu i prehrambenu vrijednost fermentiranih mliječnih napitaka, a u suvremeno vrijeme se fermentiraju i razni napitci na bazi biljaka čime se dobivaju proizvodi sa svim prednostima koje hrana biljnog podrijetla nosi uz poboljšanje senzorske kvalitete i nutritivne vrijednosti.

U skladu s tim, cilj ovog istraživanja je bio proizvesti napitak na bazi zobnih pahuljica, dodati mu sastojke tako da proizvod u konačnici bude adekvatnog izgleda, boje, konzistencije, mirisa i okusa te koji će biti pogodan supstrat za fermentaciju bakterijama mliječne kiseline. Uz to, cilj je bio odrediti fizikalno-kemijska svojstva tako dobivenog fermentiranog napitka kao što su aktivna kiselost, udio suhe tvari i pepela, reološka svojstva, udio soli, šećera te provesti mikrobiološku i senzorsku analizu temeljem čega će se procijeniti i trajnost ovih proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BILJNI NAPITCI

U posljednje vrijeme potrošači sve više teže biljnoj prehrani koja uključuje žitarice, mahunarke, sjemenke, orašaste plodove, voće i povrće iz razloga kao što su zaštita životinja, sve veća svijest o zdravoj prehrani i zdravom načinu života, tendencija nižem unosu kalorija, kao i povećana ekološka svijest. Iz istih je razloga prisutan veganski način prehrane kod određenog broja ljudi kojeg karakterizira nekonzumacija mesa, ribe, mlijeka ili mliječnih proizvoda, jaja, meda ili bilo kojih proizvoda koji sadrže i minimalnu količinu hrane životinjskog podrijetla. U svrhu nadoknade ove hrane, koriste se različite zamjene i dodaci prehrani biljnog podrijetla. Tako jedan važni dio veganske prehrane čine biljni napitci, često zvani i biljna mlijeka upravo zbog toga što služe kao zamjena kravljem, kozjem, ovčjem ili bilo kojem drugom životinjskom mlijeku. Osim što se konzumiraju samostalno, koriste se i kao baza za proizvodnju mnogih biljnih inačica jogurtu, siru, kefiru, maslacu, sladoledu i drugim. Osim vegana, često za biljnim napitcima posežu i ljudi koji inače konzumiraju namirnice životinjskog podrijetla, iz već navedenih razloga (Aydar i sur., 2020). Biljni napitci mogu se koristiti kao zamjena za mlijeko u zemljama gdje ponuda kravljeg, ili drugih vrsta mlijeka nije dovoljna za potrebe stanovništva. Svi ovi razlozi doveli su do toga da je proizvodnja zamjena za mlijeko i mliječne proizvode porasla za 61 % u razdoblju od 2012. do 2018. godine (Craig i Fresán, 2021).

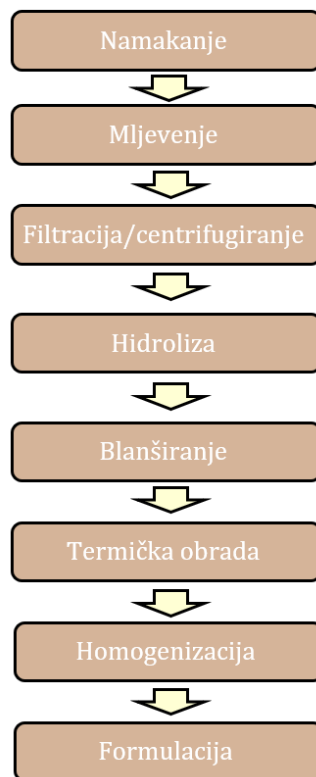
Prema Sethi i sur. (2016), biljna mlijeka, tj. biljni napitci definiraju se kao tekuća hrana nastala lomljenjem i redukcijom biljnog materijala (žitarica, pseudo-žitarica, mahunarki, uljarica, orašastih plodova) koji se potom ekstrahira u vodi i dalje homogenizira što rezultira imitacijom kravljeg mlijeka izgledom i konzistencijom. Svojstva dobivenog napitka ovise o sirovini, karakteristikama postupaka dezintegracije, homogenizacije, formulacije, emulgiranja i skladištenja.

Manasa i sur. (2020) prikazali su klasifikaciju biljnih napitaka na temelju korištenih sirovina. Prema njima postoje biljni napitci na bazi žitarica (zob, riža, kukuruz, pir), mahunarki (soja, kikiriki, lupina, mletački grah), orašastih plodova (badem, kokos, lješnjak, pistacija, orah), sjemenki (sezam, lan, konoplja, suncokret) i voća i povrća (brusnica, ananas, mango). Sojin napitak je bio prvi mliječni alternativni napitak koji je u početku bio vrlo popularan, međutim, njegova potrošnja smanjila se spoznajom o prisutnosti visokog sadržaja izoflavona i njihovoj

mogućoj povezanosti s razvojem tumora. Međutim, ta povezanost nije znanstveno dokazana. Nakon toga, sve je više rasla popularnost bademovog i kokosovog napitka. Danas je najveći naglasak stavljen na zobeni napitak, iako će odabir biljnih napitaka ovisiti o okusu, cijeni, pakiranju i funkcionalnosti (Craig i Fresán, 2021).

### 2.1.1. Proizvodnja biljnih napitaka

Proizvodnja biljnih napitaka moguća je na više načina, međutim, određeni postupci su zajednički što je prikazano na slici 1. Često je početni korak namakanje u svrhu mekšanja biljnog tkiva i olakšavanja daljnjih postupaka mljevenja. Nakon redukcije biljnog materijala, velike netopive čestice odvajaju se postupkom filtracije ili centrifugiranja. Nakon toga može slijediti hidroliza škroba, vlakna ili drugih sastojaka enzimskim ili kemijskim postupcima. Blanširanjem se inaktiviraju endogeni enzimi, a termičkom obradom mikroorganizmi kvarenja i patogene bakterije. Slijedi homogenizacija kojom se reduciraju zaostale čestice u svrhu mehaničke stabilizacije proizvoda. Posljednji korak je formulacija, tj. dodatak tvari arome, boje, zgušnjivača, konzervansa, stabilizatora, proteina, lipida, vitamina, mineralnih tvari i drugih (Manasa i sur., 2020).



Slika 1. Shema proizvodnje biljnih napitaka (Manasa i sur., 2020)

### 2.1.2. Usporedba biljnih napitaka i kravljeg mlijeka

Kravlje mlijeko se naširoko konzumira diljem svijeta i opskrbljuje organizam mastima, ugljikohidratima, proteinima i određenim mikronutrijentima, pa stoga pruža energiju za psihički i fizički napor, povećava moć koncentracije i osigurava mirniji, dublji i dulji san (Tratnik i Božanić, 2012). Međutim, uz mlijeko se vežu i određeni nedostaci zbog kojih potrošači radije odabiru biljni napitak kao alternativnu zamjenu. Prvi razlog predstavljaju alergije na kravlje mlijeko, najčešće na mliječne proteine. Alergije najčešće pogađaju djecu i novorođenčad, dok je odraslih pogođeno svega 0,3 %. Sljedeći problem predstavlja laktoza, mliječni šećer, prema kojem određeni broj ljudi pokazuje netoleranciju uslijed nedostatka enzima laktaze u probavnom sustavu koji razgrađuje laktozu na glukozu i galaktozu. Oko 33 % svjetske populacije je pogođeno ovim problemom, najviše u Africi. Također se smatra da pretjerana konzumacija hrane životinjskog podrijetla može uzrokovati kardiovaskularne bolesti, dok upravo biljna hrana igra veliku ulogu u prevenciji istih. Uz to, mliječna industrija je odgovorna za emisiju stakleničkih plinova što kod ljudi s ekološkom svijesti može uzrokovati odbijanje mlijeka i mliječnih proizvoda. Osim toga, između biljnih napitaka i kravljeg mlijeka je prisutna razlika u kemijskom sastavu što je detaljnije opisano u nastavku i prikazano u tablici 1 (Vanga i Raghavan, 2018). Iz tablice je vidljivo da rižin i sezamov napitak imaju najviše ugljikohidrata i najveću kalorijsku vrijednost, dok sojin i kvinojin napitak sadrže najveću količinu proteina.

Tablica 1. Usporedba nutritivne vrijednosti i funkcionalnih tvari kravljeg mlijeka i različitih biljnih napitaka (Munekata i sur., 2020)

tip mlijeka	kalorije (kcal)	proteini (g)	lipidi (g)	ugljikohidrati (g)	funkcionalne komponente
kravlje	61	3,15	3,25	4,8	-
zobeno	80	2,5	4	-	beta-glukan
rižino	130	1	2	27	fitosteroli
kvinojino	104	4,5	6	9	mangan, fosfor
sojino	80	7	4	4	izoflavoni, fitosteroli
bademovo	40	1	3	2	a-tokoferol, arabinoza
kokosovo	80	<1	5	7	laurinska kiselina, vitamin e
lješnjakovo	124	1,4	6	14	katehin
sezamovo	140	1,5	6	16,5	lignani
konopljino	70	2	6	1	omega 3 - masne kiseline

Žitarice, mahunarke, orašasti plodovi i sjemenke sadrže potrebne makro- i mikronutrijente, pozitivno utječu na zdravlje, pa su dio svakodnevne prehrane ljudi u različitim oblicima. Kao što je prikazano u tablici 1, bogate su bioaktivnim spojevima kojih u mlijeku nema.  $\beta$ -glukan povoljno utječe na razinu glukoze u krvi, fitosteroli, izoflavoni i omega-3 masne kiseline preveniraju nastanak kardiovaskularnih bolesti, a lignani imaju sposobnost smanjenja razine kolesterola u krvi (Munekata i sur., 2020). Zahvaljujući ovim pozitivnim svojstvima sirovina, biljne napitke također karakterizira niz pozitivnih učinaka na potrošače. Biljni napitci posjeduju veći antioksidativni kapacitet, iako je pokazano da se dio ovih sastojaka gubi tijekom procesiranja sirovina u biljni napitak (Aydar i sur., 2020). Sljedeća prednost je sastav masnih kiselina. Općenito se u orašastim plodovima i žitaricama nalazi veći udio mono- i polinezasićenih masnih kiselina nego zasićenih, pa tako vrijedi i za napitke. Od nezasićenih

masnih kiselina prevladavaju oleinska, linolna i linolenska, a od zasićenih palmitinska i stearinska masna kiselina. Za razliku od toga, u mliječnoj masti prevladavaju zasićene masne kiseline s oko 70 % i to palmitinska masna kiselina, a ostatak čine nezasićene od kojih je najviše oleinske, a polinezasićenih ima do 3 %. Biljni napitci ne sadrže kolesterol, već važnu ulogu zauzimaju fitosteroli koji su i inače prisutni u biljkama, dok ih u mlijeku prirodno nema. Fitosteroli su strukturom slični kolesterolu i natječu se s njim za otapanje u probavnom sustavu te tako smanjuju razinu kolesterola u krvi (Li i Hu, 2011).

Unatoč povoljnim učincima na zdravlje, biljni napitci imaju i određene nedostatke u usporedbi sa životinjskim mlijekom. Glavna razlika između biljnih i životinjskih mlijeka jest sadržaj proteina. U kravljem mlijeku, količina proteina se kreće između 2,6 i 4,2 %. Od biljnih napitaka, najviše proteina ima sojin čiji udio može biti i do 9 %, međutim, većina ostalih biljnih napitaka sadržava manje proteina i time manju hranjivu vrijednost (Vanga i Raghavan, 2018). Sljedeći nedostatak biljnih napitaka je manja bioraspoloživost vitamina i mineralnih tvari uslijed prisutnosti nekih antinutrijenata koji sprječavaju ili ograničavaju apsorpciju drugih sastojaka. Primjerice, u sezamovom mlijeku je snižena bioraspoloživost kalcija uslijed fitata i oksalata. Fitinska kiselina u zobenom i sojinom mlijeku sprječava apsorpciju cinka i željeza. Međutim, ovaj nedostatak može se poboljšati termičkom obradom ili fermentacijom s probiotičkim kulturama. Tako se primjerice fermentacijom razgrađuje oksalat u sezamu što poboljšava apsorpciju kalcija (Dubey i Patel, 2018). Također, proizvodnja biljnih napitaka može uključivati namakanje sirovine pri čemu se mogu izgubiti vitamini topljivi u vodi. Termička obrada može štetno djelovati na termolabilne vitamine i uzrokovati denaturaciju proteina (Silva i sur., 2020). Najveći nedostatak biljnih napitaka pred kravljim mlijekom predstavlja manjak kalcija, vitamina D i vitamina B12. Stoga je nužno da se biljni napitci obogate ovim spojevima, posebno za vegane koji ne konzumiraju mlijeko i mliječne proizvode (Craig i Fresán, 2021). Najvažniji faktor u odabiru namirnice jest okus. Kravlje mlijeko je ugodnijeg okusa zbog prirodno prisutne laktoze, pa se u svrhu imitacije okusa kravljeg mlijeka u biljne napitke dodaju šećeri koji negativno utječu na oralno zdravlje (Aydar i sur., 2020).

Iako, kao što je već opisano, žitarice, uljarice, orašaste plodove i mahunarke karakterizira niz pozitivnih učinaka, potrebno je usavršiti tehnologiju i recepturu proizvoda kako bi biljni napitak imao slične karakteristike mlijeku poput izgleda, okusa, arome, stabilnosti i hranjive vrijednosti (Sethi i sur., 2016).

## 2.2. ZOB

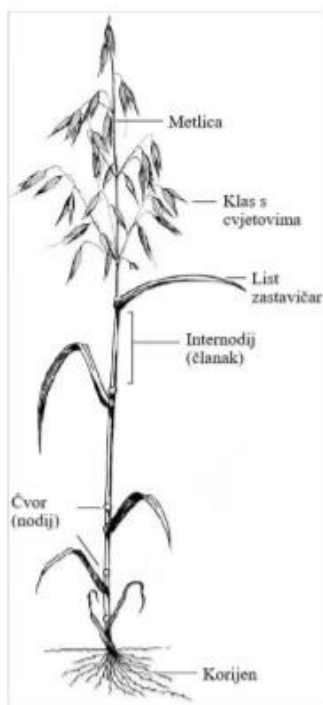
Zob (*Avena sativa* L.) je žitarica uzgajana zbog svog sjemena već oko dvije tisuće godina u raznim regijama širom svijeta. Ima niže potrebe za visokim ljetnim temperaturama i veću toleranciju na vlagu od ostalih žitarica što je posebno važno kod uzgoja u područjima s hladnim i vlažnim ljetima. Sjetva se može provesti u jesen te je u tom slučaju žetva krajem ljeta ili je sjetva u proljeće, a žetva u ranu jesen. Koristi se za prehranu ljudi i životinja, a sredinom 1980-ih je prepoznata kao zdrava namirnica jer je uočeno da sudjeluje u prevenciji razvoja bolesti srca. Trenutno, najveći proizvođači zobi su Rusija i Kanada. Ovisno o stupnju prerade, zob se klasificira u različite tipove. Cjelovita zob sadrži vanjsku ljusku koja mora biti uklonjena prije konzumacije. Krupne zobene pahuljice, poznate i kao „pinhead oats“ dobivaju se propuštanjem oljuštene zobi kroz čelične rezače koji sjeckaju zob na tri do četiri manja dijela te je kao takva vrlo hranjiva. Valjane zobene pahuljice pripremaju se pomoću vodene pare i valjka koji ih spljošti, a instant zob se proizvodi na sličan način, osim što je podvrgnuta duljem tretmanu na pari i valjana je na tanje komade. Zobeno brašno dobiva se mljevenjem zobi, a dijeli se na grubo, srednje i fino (Singh i sur., 2013; Zwer, 2004).

Zbog nedostatka glutena, zob nije prikladna za proizvodnju kruha, ali usprkos tome ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Zobene proizvode potrošači često odabiru za doručak, a to mogu biti zobene pahuljice ili granola, a zobena krupica i brašno mogu služiti za proizvodnju pekarskih proizvoda, kekisa, krekeri i ekstrudiranih žitarica za doručak. Osim toga, zob se zbog svojih prednosti sve više koristi i u drugim proizvodima, pa se može dodavati u hranu za dojenčad, jogurte, sladolede, a vrlo je poznato zobeno mlijeko, tj. zobeni napitak (Zwer, 2004).

### 2.2.1. Morfologija zobi

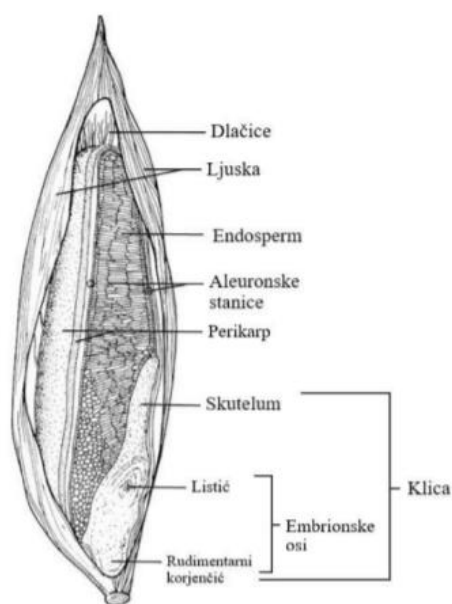
Zob (*Avena sativa* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka (*Plantae*) iz porodice trava (*Poaceae*), reda travolike (*Poales*), vjerojatno azijskog podrijetla. Sadrži korijen koji prodire duboko u tlo i ima veliku sposobnost upijanja nutrijenata iz tla, a sastoji se od dobro razvijenog primarnog i sekundarnog korijenovog sustava. Stabljika je šuplja, visoka 60 do 120 cm i sastavljena od 5 do 6 nodija. List se sastoji od lisnog rukavca i lisne plojke, na čijem se prijelazu nalazi jako razvijena opna što zob razlikuje od ostalih žitarica. Zob razvija metlicu koja se sastoji od glavne i postranih grana i grančica na čijim se krajevima razvijaju klasići sa zrnom (Butt i sur., 2008). Glavni dijelovi biljke zobi prikazani su na slici 2.





Slika 2. Glavni dijelovi biljke zobi (Zwer, 2004)

Detaljna građa zrna zobi prikazana je na slici 3. Zrno je tijekom rasta okruženo parom listića lemma i palea koji se mogu ukloniti ljuštenjem. Tri su glavna dijela zrna: klica (embrio) koja čini 3 % ukupne mase zrna, perikarp (ovojnica) koji čini 38-40 % mase zrna i endosperm koji čini glavninu s 58-60 % mase. Endosperm sadrži škrob, proteine, lipide i veći udio  $\beta$ -glukana, a vanjski dio endosperma čine aleuronske stanice. Na površini zrna vidljive su dlačice koje mogu biti guste i rasprostranjene po cijeloj površini (Delcour i Hosoney, 2010).



Slika 3. Građa zrna zobi (Young, 1986)

### 2.2.2. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost zobi

Potrošači pokazuju sve veći interes za zob zbog njezina sastava koji je bogat prehranbenim vlaknima i fitokemikalijama, dobar je izvor ugljikohidrata i proteina s uravnoteženim sastavom aminokiselina, sadrži visok postotak lipida, posebice nezasićenih masnih kiselina pa ima visoku hranjivu vrijednost te hipokolesterolična i antikancerogena svojstva.

Kao i u svim žitaricama, tako i u zobi najveći udio čine ugljikohidrati od kojih glavina otpada na škrob, nešto manje na neškrobne polisaharide, a najmanje na oligosaharide i šećere. Škrob čini oko 60 % sastava zrna zobi i nalazi se uglavnom u endospermu. Uočena su različita fizikalno-kemijska svojstva škroba kako između zobi i drugih žitarica, tako i među različitim sortama zobi. Zobeni škrob karakteriziraju male granule s dobro razvijenom površinom i visokim udjelom lipida. Također, u istraživanju Hoover i Vasanthan (1992) utvrđeno je da zobeni škrob ima veći faktor bubrenja, veću viskoznost, stvara manje čvrsti gel, više je osjetljiv na kiselinsku hidrolizu, ima veću otpornost na djelovanje  $\alpha$ -amilaze i visoku stabilnost pri odmrzavanju. Škrob se u odnosu na brzinu probave klasificira u tri frakcije, brzo probavljivi škrob, polako probavljivi škrob i otporan škrob. Sporo probavljanje važno je za ljudsko zdravlje radi održavanja ravnoteže razine glukoze u krvi. Stoga se otporan škrob smatra funkcionalnim vlaknom koje ima i veliku ulogu u probavnoj fiziologiji. Naime, ova frakcija škroba osigurava fermentabilne ugljikohidrate mikroflori debelog crijeva te nastanak poželjnih metabolita s terapijskim učincima. Osim toga, pruža bolji izgled, teksturu i osjećaj u ustima, ali se često uništi tijekom procesiranja namirnice. Zob je vrlo dobar izvor otpornog škroba koji čini 25 % ukupnog škroba, polako probavljivi škrob čini 22 %, a brzo probavljivi tek 7 % ukupne količine škroba (Rasane i sur., 2013).

Prehrambena vlakna podrazumijevaju neškrobne polisaharide i predstavljaju važan dio ljudske prehrane, a nalaze se u staničnoj stjenki zrna zobi. Prema AACCC (American Association of Cereal Chemists), prehrambena vlakna su jestivi biljni ili analogni ugljikohidrati koji se ne probavljaju i ne apsorbiraju u tankom crijevu čovjeka, a u debelom crijevu potpuno ili djelomično fermentiraju pomoću crijevne mikroflore. Uključuju polisaharide, oligosaharide, lignin i pripadajuće biljne tvari. Dije se na frakcije topive i netopive u vodi, a ukupni udio vlakana u zobi varira između 10,9 i 13,9 %. Najznačajniji sastojak prehranbenih vlakana u zobi jest  $\beta$ -glukan, biljni polisaharid otporan na probavu u tankom crijevu koji čini više od polovice ukupnih prehranbenih vlakana zobi. Spada u linearne polimere glukoze povezanih  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -

1,3 glikozidnim vezama. Ove veze čine  $\beta$ -glukan fleksibilnijim, topljivijim u vodi i viskoznijim od celuloze. Poželjni je sastojak s obzirom na to da potiče korisne fiziološke učinke, tj. djeluje antikancerogeno, snižava razinu kolesterola u krvi, djeluje na smanjenje krvnog tlaka, regulira brzinu probave i apsorpcije hranjivih tvari te regulira količinu šećera u krvi. FDA (Food and Drug Administration) i EFSA (European Food Safety Authority) su zaključile da je potrebna minimalna doza od 3 grama  $\beta$ -glukana iz zobi ili ječma na dan za korisno smanjenje razine kolesterola u krvi i prevenciju nastanka kardiovaskularnih bolesti. U zobi je prisutno 2,3-8,5 %  $\beta$ -glukana (Fuller i sur., 2016).

Proteini čine 11-15 % sadržaja zobi. Zob nadmašuje ostale žitarice svojim aminokiselinskim sastavom, kao i najvećom koncentracijom proteina. Proteini žitarica se klasificiraju u četiri vrste ovisno o topivosti: albumini (topivi u vodi), globulini (topivi u otopinama soli), prolamini (topivi u razrijeđenoj otopini alkohola) i glutelini (topivi u kiselinama ili bazama). Iako većina žitarica sadrži najviše prolamina, kod zobi to nije slučaj. Najveći dio proteina zobi otpada na frakciju globulina s oko 80 % ukupnih proteina, prolamin zauzima tek oko 15 %, glutelin može zauzeti 5-66 %, a albumin 1-12 %. Zbog manjeg udjela prolamina, a većeg udjela globulina, u zobi je prisutna bolja ravnoteža aminokiselinskog sastava. Općenito, albumin i globulin imaju veći sadržaj lizina što zob čini vrjednijom žitaricom od ostalih. U pšenici su prolamini, točnije glijadini, zaslužni za stanje celijakije koje zob ne sadrži, međutim, zob u svom sastavu ima avenin koji je vrlo sličan glijadinima. Postoje brojna istraživanja koja ukazuju na to da većina ljudi koja boluje od celijakije mogu tolerirati zob, pa bi se prema tome zob mogla koristiti u bezglutenskoj prehrani (Klose i Arendt, 2012). Kvaliteta zobenih proteina je gotova jednaka sojinim proteinima, koji su prema WHO (World Health Organization) gotovo jednaki po kvaliteti proteinima mesa, mlijeka i jaja (Singh i sur., 2013).

Zob predstavlja i vrlo dobar izvor lipida te sadrži mnogo više lipida, pa tako i masnih kiselina u odnosu na ostale žitarice. Količina lipida u zobi varira između 5 i 9 %, a većina se nalazi u endospermu (Rasane i sur., 2013). Dobar je izvor esencijalne linolenske masne kiseline, a sadrži vrlo malo zasićenih masti čime može pomoći u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti. Također, u usporedbi s ostalim žitaricama, zob ima najveću količinu nezasićenih masnih kiselina. U sastavu masnih kiselina prevladavaju oleinska te već spomenuta linolenska masna kiselina, a od zasićenih je najviše palmitinske masne kiseline. Iako je prisutan visoki udio lipida, zahvaljujući prirodnim antioksidansima zobi kao što je vitamin E, oni su stabilni i ne oksidiraju. Međutim, mogu predstavljati problem kod prerade zobi, a u nepravilnim uvjetima skladištenja

dolazi i do aktivacije lipaze koja uzrokuje užeglost zobi i proizvoda te kratak vijek skladištenja (Van den Broeck i sur., 2015).

Udio mineralnih tvari u zobi se kreće oko 3 %, a dominiraju kalij i fosfor kao i kod drugih žitarica. Od vitamina, u zobi ima najviše vitamina E koji djeluje antioksidativno, a u odnosu na druge žitarice, zob je bogatija tiaminom (B1) i pantotenskom kiselinom (B5) (Singh i sur., 2013).

Osim spomenutih makronutrijenata, zob je bogata brojnim bioaktivnim sastojcima s pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, a vrlo važnu ulogu u tome ima već spomenuti  $\beta$ -glukan. Zob karakterizira velika antioksidativna aktivnost uslijed prisutnih tokoferola, tokotrienola, fitinske kiseline, flavonoida i neflavonoidnih fenola. Vitamin E štiti organizam od slobodnih radikala i sudjeluje u prevenciji nastanka tumora, artritisa, ateroskleroze i drugih bolesti. Zob je poznata po jedinstvenoj skupini antioksidansa avenantramidi (AVA) za koje se smatra da imaju i do trideset puta jače antioksidativno djelovanje od drugih fenolnih spojeva. Također, imaju protuupalno i antialergeno djelovanje, a zbog otpuštanja dušikovog oksida koji širi krvne žile, uključeni su u kontrolu krvnog tlaka (Rasane i sur., 2013).

### 2.2.3. Zobeni napitak

Zobeni napitak zauzima veliki dio tržišta među ostalim biljnim napitcima. Kao i samu sirovinu zob, i zobeni napitak karakterizira visoka antioksidativna aktivnost. Također, zobeni napitak sadrži prehrambena vlakna od kojih je najznačajniji  $\beta$ -glukan s brojnim fiziološkim učincima, a ujedno i povećava osjećaj sitosti nakon konzumacije zobenog napitka (Silva i sur., 2020).  $\beta$ -glukan se ne probavlja i ne hidrolizira u gornjem gastrointestinalnom traktu, već služi kao hrana crijevnoj mikroflori uz oslobađanje masnih kiselina kratkog lanca kao što su butirac, acetat i propionat koji zakiseljavaju crijevni trakt i pozitivno utječu na metaboličku energiju (Charalampopoulos i sur., 2002). Osim toga, zobeni napitak ima nizak udio masti s povoljnim sastavom masnih kiselina i kvalitetni sadržaj proteina s dobrim balansom aminokiselina (Paul i sur., 2019). Iako veći sadržaj nezasićenih masnih kiselina pogoduje zdravlju, tehnološki predstavlja problem zbog veće mogućnosti oksidacije lipida i pojave užeglosti. U sastavu zobi, najveći udio zauzima škrob koji djelomično predstavlja problem u proizvodnji stabilnog zobenog napitka. Naime, toplinskom obradom, škrob započinje želatinizirati i rezultira napitkom visoke viskoznosti što čini napitak senzorski manje prihvatljivim. Jedan od postupaka

koji se provodi kako bi se to izbjeglo jest enzimska hidroliza škroba koja ujedno stabilizira zobeni napitak. Također se prije proizvodnje zobenog napitka, zob može tretirati enzimom fitazom kako bi se iz fitinske kiseline oslobodio anorganski fosfor i na taj način povećala hranjiva vrijednost. U svrhu dobivanja čestica jednakih veličina i stabilizacije napitka, može se provesti homogenizacija (Tangyu i sur., 2019). Veliki nedostatak zobenog napitka pred kravljim mlijekom jest nedostatak kalcija i lošija senzorska svojstva. Da bi se ovaj nedostatak uklonio, u zobeni napitak mogu se dodati razni dodaci kao što su mineralne tvari, zaslađivači i arome.

Proizvodnja zobenog napitka se može bazirati na enzimskim reakcijama ili ekstrakcijskim tehnikama. Može uključivati dodatak različitih aditiva, postupak dekantiranja u svrhu stabilizacije i termičku obradu u svrhu održivosti. U nastavku je navedeno nekoliko primjera. Bernat i sur. (2015) proizveli su zobeni napitak iz namočene, mljevene i oljuštene zobi uz dodatak vode u omjeru 8:100. Ekstrakciju su provodili u *Starsoja* uređaju dizajniranog za proizvodnju biljnih mlijeka uz 3 ciklusa na 90 °C u trajanju od 20 minuta, a na kraju su proveli homogenizaciju. Demir i sur. (2020) proizveli su zobeni napitak iz pahuljica koje su se namakale u vrućoj pitkoj vodi na 95 °C tijekom 15 minuta u omjeru 1:2. Zatim su dodali još vode u omjeru 1:1, a dobivenu smjesu su homogenizirali i filtrirali. Zhang i sur. (2007) koristili su zobene pahuljice koje su prolazile postupak mokrog mljevenja, hidrolize amilazom, dekantiranja, formulacije, a napitak se u konačnici tretirao na ultra visokoj temperaturi (UHT) i aseptično pakirao. Oni napominju da je od velike važnosti kvaliteta pakirnog materijala kako bi napitak imao što dulji rok trajanja, odnosno kako bi se spriječio ulazak kisika koji može ubrzati oksidaciju nezasićenih masnih kiselina i na taj način dovesti do neugodnog mirisa i okusa. Deswal i sur. (2013) su također koristili zobene pahuljice, pomiješane s vodom tako da se dobije zobena kaša, tretirali su nastalu smjesu amilazom uz kalcijev klorid kao katalizator na 75°C te u konačnici filtrirali smjesu kako bi izdvojili zobeni napitak. U proizvodnji zobenog napitka poželjna je mehanička i termička predobrada kao što je pečenje, ljuštenje, blanširanje, namakanje i kuhanje za smanjenje antinutrijenata (Tangyu i sur., 2019).

Komercijalno dostupni zobeni napitci poznati su pod nazivima „Oatly“ iz Švedske, „Pureharvest“ iz Australije, „Alpro“ iz Velike Britanije, „Pacifik“ iz SAD-a itd. Dostupni su u višeslojnoj kartonskoj ambalaži i tretirani visokim temperaturama (Sethi i sur., 2016).

## 2.3. FERMENTACIJA

Fermentacija ili vrenje definira se kao proces koji dovodi do biokemijskih promjena organskih sastojaka djelovanjem enzima mikroorganizama koji kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije, najčešće bez kisika, uz oslobađanje energije. Pritom organski supstrat i spojevi dobiveni iz supstrata služe kao primarni elektron-donori i krajnji elektron-akceptori tijekom metabolizma u mikrobnjoj stanici (Tratnik i Božanić, 2012). Stoga je mikroorganizmima potreban izvor ugljika za proizvodnju energije te izvor dušika za proizvodnju staničnog materijala. Također, potrebni su im određeni mikronutrijenti kao što su fosfor i sumpor za proizvodnju fosfolipida i nukleinskih kiselina, kalij i magnezij za aktivnost enzima te kalcij za izgradnju stanične stjenke (Yatmaz i Turhan, 2018). Razgradnja šećera i proteina rezultira proizvodnjom velikog broja spojeva koji doprinose okusu, trajnosti i izgledu fermentiranog proizvoda. Dominantni mikroorganizam u procesu fermentacije određuje tijek i konačne produkte, pa će tako *Saccharomyces cerevisiae* usmjeriti reakcije prema nastajanju etanola, *Lactobacillus plantarum* će uzrokovati zakiseljavanje proizvoda mliječnom kiselinom, a *Propionibacterium* će uzrokovati specifičan okus proizvodnjom propionske i octene kiseline (Hugenholtz, 1999).

### 2.3.1. Starter kulture

Starter kultura definira se kao mikrobnji pripravak sastavljen od velikog broja stanica barem jednog mikroorganizma koji se dodaje sirovini u svrhu proizvodnje fermentirane hrane, pri čemu starter kultura omogućava brzu i kontroliranu fermentaciju. Bakterije mliječne kiseline (BMK) zauzimaju središnju ulogu u procesima fermentacije, a karakterizira ih duga i sigurna povijest uporabe u proizvodnji fermentirane hrane i pića (Leroy i De Vuyst, 2004). BMK su gram-pozitivne bakterije, okruglog ili štapićastog oblika, nesporogene, anaerobne ili mikroaerofilne. Imaju sposobnost fermentacije heksoza u mliječnu kiselinu, acidotolerantne su, a u molekuli DNA posjeduju nizak udio gvanina i citozina. Poznati rodovi BMK su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* kao predstavnici bakterija štapićastog oblika, a svi ostali rodovi BMK su okruglog oblika, a neki od njih su rodovi *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus*. Rod *Bifidobacterium* nije filogenetski srodan ostalim BMK te ga karakterizira specifičan način fermentacije šećera, ali se također ubraja u ovu skupinu (Salminen i sur., 2004). Svojim metabolizmom utječu na okus, aromu, teksturu i trajnost fermentiranog proizvoda. Proizvode razne antimikrobne tvari koje onemogućavaju rast neželjenih mikroorganizama. Tu spadaju

organske kiseline kao što su mliječna, octena i mravlja, vodikov peroksid, antifungalni peptidi, bakteriocini, ugljikov dioksid, diacetil i etanol. S obzirom na to da metaboliziraju šećer u mliječnu kiselinu preko piruvata, piruvat se može prevesti u niz produkata koji su zaslužni za specifičnu aromu, a to su acetati, etanol, diacetid, acetaldehid i ostali hlapivi spojevi. Na teksturu najveći utjecaj ima nastanak egzopolisaharida koji povećava viskoznost i čvrstoću fermentiranih proizvoda (Leroy i De Vuyst, 2004).

U razvoju fermentiranog proizvoda važnu ulogu ima odabir starter kulture o kojoj će ovisiti karakteristike gotovog proizvoda. Glavni rodovi koji se mogu koristiti za fermentaciju ne mliječnih proizvoda su *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Streptooccus*, *Pediococcus* i *Propionibacterium* (Panghal i sur., 2018).

*Streptococcus termophilus* se smatra drugom najvažnijom BMK, nakon *Lactococcus lactis*. Posjeduje GRAS (Generally Regarded As Safe) i QPS (Qualified Presumption of Safety) status zbog duge povijesti sigurne uporabe u hrani. Ima ograničeni kapacitet preradbe ugljikohidrata, a najvažnija uloga *S. termophilus* u mliječnoj fermentaciji jest pretvorba laktoze u mliječnu kiselinu pri povišenim temperaturama. Za razliku od drugih gram-pozitivnih bakterija, preferirani izvor ugljika joj je laktoza umjesto glukoze. Ima sposobnost stvaranja egzopolisaharida koji poboljšavaju teksturu fermentiranih proizvoda. Djeluje i antimikrobno stvarajući bakteriocine koji su termostabilni i aktivni u širokom rasponu pH (Iyer i sur., 2010). *Lactobacillus delbrueckii* je nepatogena, gram-pozitivna bakterija koja se nalazi u raznim ekološkim nišama, od mliječnih proizvoda, biljaka do ljudskog gastrointestinalnog trakta, a vrlo često se koristi kao starter kultura u fermentiranim proizvodima. Uključuje tri podvrste, *delbrueckii*, *bulgaricus* i *lactis* (Dan i sur., 2019). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zajedno sa *Streptococcus termophilus* čini jogurtu kulturu. Djelujući zajedno, u omjeru 1:1, uzrokuju brži nastanak mliječne kiseline u većim količinama. Razlog tome jest što jedna bakterija stimulira drugu. Naime, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* stimulira rast *S. termophilus* pomoću aminokiselina koje proizvodi tijekom svog rasta, a *S. termophilus* proizvodi ugljikov dioksid i mravlju kiselinu koja stimulira rast laktobacila. Termofilne su pa najbolje djeluju na 42 °C (Tratnik i Božanić, 2012). *Bifidobacterium lactis* je gram-pozitivna, nesporogena, katalaza-negativna bakterija sa sposobnošću tvorbe organskih kiselina iz glukoze, laktoze, rafinoze i riboze, ali može metabolizirati i škrob, ksilozu i arabinozu. Smatra se probiotikom budući da je sigurna, nepatogena, imunostimulirajuća te posjeduje sposobnost kolonizacije gastrointestinalnog trakta i preživljavanja pri uvjetima niskog pH (Sanders, 2006).

*Lactobacillus acidophilus* je nesporogena štapićasta bakterija s homofermentativnim metabolizmom što znači da joj je glavni produkt mliječna kiselina, a u vrlo maloj količini stvara ostale kiseline i tvari arome. Također se vrlo često koristi kao starter kultura, a prirodno se nalazi u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Koristi se kao probiotik zbog pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi i sposobnosti preživljavanja u uvjetima niskog pH i prisustvu žučnih soli (Horackova i sur., 2020).

### 2.3.2. Fermentacija zobnih napitaka

Da bi se dodatno povećao interes za konzumacijom zobi, kao i da bi se zadovoljili zahtjevi trenutnih potrošača zobnih napitaka, razvijaju se novi proizvodi uključujući zobene fermentirane napitke, tzv. ne mliječne jogurte. Fermentacija žitarica pomoću BMK je postupak koji se već dugo koristi u Aziji i Africi za proizvodnju raznih fermentiranih napitaka i kaša. Osim zobi, kao sirovina za ove proizvode koriste se riža, soja, mahunarke, kokos i druge žitarice. Tijekom fermentacije žitarica, dolazi do smanjenja pH na vrijednosti između 3 i 4,5 te povećanja kiselosti uslijed nastale mliječne i ostalih organskih kiselina zbog mikrobne aktivnosti. Istovremeno se smanjuje količina ugljikohidrata, poli- i oligosaharida, a dostupnost nekih aminokiselina i vitamina B skupine je povećana. Dokazano je da fermentacija napitaka na bazi žitarica pomoću BMK poboljšava probavljivost proteina zbog proteolize, povećava bioraspoloživost mineralnih tvari razgradnjom fitinske kiseline, smanjuje glikemijski indeks, produžuje rok trajanja i poboljšava organoleptička svojstva proizvoda (Coda i sur., 2017). Najčešće se u tu svrhu koriste laktobacili i bifidobakterije koje imaju nutritivne zahtjeve za ugljikohidratima, aminokiselinama, peptidima, esterima masnih kiselina, solima, derivatima nukleinske kiseline i vitaminima. Kao što je već prije spomenuto, zob je bogata topivim vlaknima, lipidima, proteinima, oligosaharidima i polisaharidima čija dostupnost omogućava mikrobni rast i aktivnost (Asadzadeh i sur., 2020). Već su Marklinder i Lonner (1992) te Johansson i sur. (1998) utvrdili da je zob prikladan supstrat za fermentaciju pomoću BMK. Upravo je prvi ne mliječni fermentirani proizvod bila fermentirana zobena kaša pomoću *Lactobacillus plantarum*, uz dodatak sladnog ječma i raznih voćnih napitaka za poboljšanje okusa u Švedskoj 1994. Od onda je proizvodnja ove vrste proizvoda u usponu, a fermentacija se smatra poželjnim postupkom budući da povećava hranjivu vrijednost i kvalitetu zobnih napitaka. Tako fermentacijom žitarica, nastali diacetil, octena i maslačna kiselina čine fermentirani proizvod ukusnijim i privlačnijim. Problem predstavlja dobiti proizvod koji je svojim izgledom, teksturom i senzorskim karakteristikama sličan jogurtu. Najveća mana biljnih



inačica jogurtu jest nepoželjan, brašnjava okus, manja punoća okusa i aroma po grahu. Stoga, u svrhu poboljšanja biljnih inačica jogurtu, postoje brojna rješenja kao što su korištenje mješavine biljnih supstrata koji se koriste kao baza za fermentirani napitak te dodatak mliječnih sastojaka kao što su laktoza i kazein. Međutim, dodatak mliječnih sastojaka nije preporučljiv budući da će većina potrošača odabrati ovaj proizvod kako ne bi konzumirali sastojke životinjskog, tj. mliječnog podrijetla (Mårtensson i sur., 2001). Sposobnost određenih BMK da stvaraju egzopolisaharide je vrlo poželjna kod proizvodnje fermentiranih zobnih napitaka. Egzopolisaharidi nastaju polimerizacijom šećernih podjedinica, a uzrokuju poboljšanje teksture i povećanje viskoznosti proizvoda čime on više nalikuje na mliječni proizvod.

#### 2.4. ROGAČ KAO FUNKCIONALNI DODATAK

Rogač (*Ceratonia siliqua*, L.) je drvo, zimzelena biljka iz porodice mahunarki, tolerantna na sušu i visoke temperature. Uzgaja se u većini mediteranskih zemalja, pa su tako najveći proizvođači rogača i njegovih proizvoda Španjolska, Italija, Portugal, Maroko, Turska, Grčka, Cipar i Libanon. Plod rogača je u obliku mahune s mesnatim vanjskim dijelom i tvrdim sjemenkama. Mesnati dio rogača karakterizira visoki udio suhe tvari (91 – 92 %), posebice visoki udio šećera (48 - 56 %) koji su uglavnom saharoza (34-42 %), fruktoza (10-12 %) i glukoza (7-10 %). Sadrži 3-4 % proteina i samo 0,2-0,6 % masti, nizak udio alkaloida i visoki udio prehrambenih vlakana. Zbog visokog udjela šećera je pogodan za fermentaciju, pa se može dodavati u fermentirane proizvode, ali i može služiti kao jeftiniji izvor ugljika u hranjivim podlogama. Iz ovog se dijela proizvodi i brašno rogača koje se zbog bogatog hranjivog sadržaja često koristi kao zamjena za kakao. Osim toga, dobar je izvor vitamina C, D, E, niacina, B6 i folne kiseline, dok vitamina A, B2 i B12 ima u manjim količinama. Sadrži 17 masnih kiselina od kojih je najviše oleinske, linolne, palmitinske i stearinske. S druge strane, sjemenke su bogate prehrambenim vlaknima, proteinima, polifenolima i mineralima. Endosperm rogača sadrži u vodi topivu sluz, poznatu kao „guma rogača“, koja je polisaharid sačinjen od galaktoze i manoze. Ova guma se dobiva procesiranjem sjemena i koristi se kao zgušnjivač, stabilizator i sredstvo za želiranje u prehrambenoj industriji uz obvezno označavanje E-brojem (Papaefstathiou i sur., 2018; Yatmaz i Turhan, 2018).

Mnoga istraživanja su pokazala da rogač i njegovi proizvodi mogu pozitivno djelovati na zdravlje ljudi i pomoći u prevenciji kroničnih bolesti. Tako su Youssef i sur. (2013) proučavali sastav rogača u prahu te smatraju da zbog visokog udjela topljivih vlakana, rogač ima

preventivnu ulogu protiv srčanih bolesti, a zbog visokog udjela fenola visoku antioksidativnu aktivnost. Tsatsaragkou i Gounaropoulos (2014) smatraju da su brašno od rogača i brašno od sjemenki rogača adekvatna zamjena pšeničnom brašnu za osobe oboljele od celijakije budući da ne sadrže gluten. Ruiz-Roso i sur. (2010) su pokazali da je grupa ljudi koja je konzumirala rogač u trajanju od 4 tjedna, imala smanjenu koncentraciju ukupnog i LDL kolesterola u krvi u usporedbi s placebo skupinom. Custódio i sur. (2011) su utvrdili antikancerogeno i antioksidativno djelovanje ekstrakta plodova rogača uslijed visokog udjela galne kiseline.



Slika 4. Mahuna, sjemenke i brašno rogača (Shreeves, 2018)

Uz brašno rogača i brašno sjemenki rogača, postoje brojni proizvodi od rogača kao što su sirup, čokolada, praline punjene sirupom od rogača, kava, med, vrhnje i drugi. Smatra se da će se ovi proizvodi dalje razvijati, kao i nastajati novi, uslijed pozitivnog utjecaja rogača na zdravlje ljudi i nedostatka kaka (Papaefstathiou i sur., 2018).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U prvoj fazi ovog istraživanja su se provodili preliminarni postupci proizvodnje zobnog napitka u svrhu određivanja adekvatnog omjera zob:voda i optimalne recepture, tj. određivanja količine i vrste dodataka kako bi se dobio napitak koji je senzorski prihvatljiv, ali i pogodan za fermentaciju.

Preliminarni postupci uključivali su i pokušaje fermentacije na različitim uzorcima u svrhu pronalaska optimalne koncentracije i vrste kulture koja će se koristiti za fermentaciju. Također, cilj preliminarne fermentacije bio je dobiti fermentirani proizvod adekvatnih senzorskih svojstava. Fermentacija se najprije provela na komercijalno dostupnom zobnom napitku, a kasnije na samostalno proizvedenom.

Nakon utvrđivanja adekvatne recepture je proizveden zobeni napitak, koji je dalje korišten za fermentaciju pomoću odabrane kulture. Obični i fermentirani zobeni napitak skladišteni su tijekom 28 dana pri čemu se prvi i svaki sedmi dan mjerio pH te su se određivala reološka svojstva i mikrobiološki parametri. Također se kod svakog uzorkovanja provodila senzorska analiza, a prvi i posljednji dan su određeni količina suhe tvari, pepela i soli.

#### 3.1. MATERIJALI

Za proizvodnju zobnog napitka su korištene sitno mljevene zobene pahuljice iz ekološkog uzgoja kupljene u Tvornici Zdrave Hrane, proizvođača Nutrigold (Zagreb, Hrvatska) u čijem sastavu je 7,1 % masti, 56 % ugljikohidrata od kojih su šećeri 1,1 %, 9,6 % vlakana, 11 % proteina i <0,01 % soli. U dio proizvedenog zobnog napitka dodao se rogač u prahu iz ekološkog uzgoja u čijem sastavu je 0,65 % masti, 49,1 % ugljikohidrata od kojih su šećeri 40,5 %, 39,8 % vlakna, 4,6 % proteina, također iz Tvornice Zdrave Hrane proizvođača Nutrigold (Zagreb, Hrvatska), brašno sjemenki rogača (OPG Goravica, otok Šipan), bijeli kristal šećer proizvođača Viro (Virovitica, Hrvatska) i vanilin u prahu (Danisco, Danska). U preliminarnim postupcima isproban je i dodatak glukoze (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska).

U preliminarnim postupcima, fermentacija je isprobana pomoću jogurtne kulture (YoMix, Danisco, Danska) te pomoću tri različite starter kulture koje su sadržavale bakterije mliječne

kiseline za inokulaciju i fermentaciju biljne hrane i napitaka (Danisco, Kopenhagen, Danska). Sve kulture su korištene u obliku smrznutog i osušenog praha.

VEGE 033 LYO sadržava:

- *Streptococcus thermophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

VEGE 053 LYO sadržava:

- *Streptococcus thermophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
- *Bifidobacterium lactis* (HN019™)
- *Lactobacillus acidophilus* (NCFM®)

VEGE 081 LYO sadržava:

- *Lactobacillus plantarum*
- *Pediococcus penthosaceus*

## 3.2. PROIZVODNJA ZOBENOG NAPITKA I FERMENTIRANOG ZOBENOG NAPITKA

### 3.2.1. Proizvodnja zobenog napitka

Proizvodnja zobenog napitka provedena je pomoću Vegan Star VR100 Perfect, višenamjenskog uređaja za pripremu napitaka od riže, soje, badema, žitarica i sezama, povrtnih juha, dječje hrane, hladnih napitaka i raznih namaza. Uređaj može raditi na 6 različitih programa, ovisno o sirovini, a u uputama proizvođača navodi se da je za proizvodnju zobenog napitka moguć program broj 5 i 6. U skladu s tim, isprobana su oba programa s različitim omjerima zob:voda i s različitim brojem ciklusa.

#### *Postupak:*

Prema uputama proizvođača, u navedeni uređaj VR100 Perfect (Vegan Star, Hallein, Austrija) se stavi određena količina, prethodno izvaganih (digitalna vaga KB-3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) zobenih pahuljica i određena količina pitke vode. Moguće je

koristiti suhe ili prethodno namakane zobene pahuljice. Pažnju treba posvetiti tome da je ukupna količina smjese u uređaju između oznaka za minimum i maksimum što odgovara količini između 1,3 i 1,5 L. Nakon toga, uređaj se zatvori i pokrene određeni program. Ovisno o programu, proizvodnja zobenog napitka traje određeno vrijeme, nakon čega uređaj zvukom signalizira kraj. Slijedi otvaranje uređaja i po potrebi cijedenje dobivenog napitka kroz obično ili svileno sito. Po potrebi je moguće ponoviti 2 ciklusa. Uređaj je potrebno obavezno prati između ciklusa, jer u suprotnom, zob se zbog svojih svojstava zapeče na stijenke uređaja što senzorski loše utječe na napitke koji se proizvode sljedeći.



Slika 5. Proizvedeni zobeni napitak u staklenim bocama (vlastita fotografija)

Dio proizvedenog zobenog napitka je prebačen u manje bočice za čuvanje koje su pokrivene parafinom. Od tog dijela, neke bočice s napitkom čuvane su u hladnjaku na 4 °C, a ostatak je čuvan na sobnoj temperaturi radi usporedbe na koji način uvjeti čuvanja utječu na svojstva napitka. Obje paralele praćene su kroz 28 dana. Ostatak proizvedenog zobenog napitka čuvan je u hladnjaku u staklenim bocama do fermentacije, a neposredno prije fermentacije dodani su još neki sastojci kao što je opisano u točki 3.2.2.1.



a)



b)

Slika 6. Vegan Star VR100 Perfect uređaj: cijeli uređaj (a) i sučelje za izbor programa rada (b) (vlastite fotografije)

### 3.2.2. Proizvodnja fermentiranog zobenog napitka

Prije započinjanja samog postupka fermentacije, potrebno je da su aparatura i pribor koji se koriste sterilni. Laboratorijske čaše, bočice za fermentaciju i stakleni štapići sterilizirani su prije svake fermentacije suhom sterilizacijom na 200 °C kako ne bi drugi mikroorganizmi poremetili tijekom fermentacije te kako bi dobili mikrobiološki prihvatljiv proizvod. Fermentacija je u preliminarnim postupcima provedena na komercijalno dostupnom i samostalno proizvedenim zobenim napitcima pomoću jogurtne kulture (YoMix, Danisco, Danska) te pomoću VEGE 033 LYO, VEGE 053 LYO i VEGE 081 LYO starter kultura namijenjenih za fermentaciju hrane i napitaka na bazi biljaka (Danisco, Kopenhagen, Danska). Nakon definiranja recepture je fermentiran i konačni zoben napitak, a ukupno je provedeno 9 pokusa fermentacije.

#### 3.2.2.1. Formulacija zobenog napitka

Neposredno prije fermentacije, a nakon proizvodnje zobenog napitka po postupku iz točke 3.2.1, dodani su ostali sastojci za poboljšanje senzorskih svojstava konačnog proizvoda, prvenstveno konzistencije i okusa. U preliminarnim postupcima isprobane su različite recepture, s različitim dodacima i količinama sve dok nije pronađena optimalna receptura koja je senzorski najprihvatljivija, ali i koja daje proizvod pogodnog za fermentaciju.

*Postupak:*

Zobeni napitak se raspodijelio u nekoliko laboratorijskih čaša, ovisno o tome koliko je različitih uzoraka fermentiralo. Nakon toga, u zobene napitke dodani su, ovisno o uzorku, različiti dodaci, prethodno izvagani u određenim količinama na digitalnoj vagi (KB-3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka). Nakon dodatka, sastojci su se izmiješali staklenim štapićem, a tamo gdje je topljenje bilo otežano, smjesa se zagrijavala na električnom grijaču uz magnetsku miješalicu (Rotamix SHP-10, Tehnica, Železniki, Slovenija). Uzorci u kojima se nalazilo brašno od sjemenki rogača su homogenizirani štapnim mikserom radi teškog otapanja i dispergiranja brašna. Na taj način dobio se stabilan zobeni napitak sa svim potrebnim sastojcima. U konačnici, zobeni napitak je pasteriziran na 73 °C/15 sekundi u svrhu mikrobiološke stabilizacije proizvoda, a što se pokazalo potrebnim nakon prve mikrobiološke analize u preliminarnim postupcima.

*3.2.2.2. Fermentacija zobenog napitka*

*Postupak:*

S obzirom na to da se napitak koristio za fermentaciju odmah nakon pasterizacije, bilo ga je potrebno ohladiti na 40 °C kako se ne bi inaktivirala starter kultura. Nakon dodatka odgovarajuće količine kulture, smjesa je dobro homogenizirana kako bi se ravnomjerno rasporedila i jednako djelovala u cijelom volumenu. Potom se sadržaj iz laboratorijske čaše prebacio u manje bočice za fermentaciju koje su se poklopile aluminijskom folijom. Bočice su se prebacile u termostat (3u1, INKO, Zagreb, Hrvatska) na fermentaciju na 40 °C (slika 7). Tijek fermentacije praćen je u intervalima od 1 ili 2 sata, ovisno o potrebi, mjerenjem pH vrijednosti (WTW-ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Weilheim, Njemačka) na način kao što je opisano u točki 3.2.3. Kada je pH postigao vrijednost 4,6 fermentacija je zaustavljena naglim hlađenjem napitaka, nakon čega su napitci čuvani u hladnjaku na 4 °C tijekom 28 dana.



Slika 7. Fermentacija zobnih napitaka u termostatu (vlastita fotografija)

### 3.3. METODE RADA

#### 3.3.1. Određivanje pH vrijednosti

pH je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona kao što je prikazano u jednadžbi 1, te predstavlja aktivnu kiselost uzorka (Tratnik i Božanić, 2012).

$$pH = -\log [H^+] \quad [1]$$

#### *Postupak:*

Elektroda pH-metra (WTW-ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Weilheim, Njemačka) se kalibrira prema uputama proizvođača te se prije početka mjerenja ispiru destiliranom vodom i suši staničevinom. Da bi se izmjerila pH vrijednost, elektroda se uranja u čašu s uzorkom napitka, lagano promiješa te se očitava pH vrijednost na ekranu nakon što se ona ustali. Između svakog mjerenja elektroda se ispiru destiliranom vodom, suši staničevinom, a na kraju mjerenja se uranja u otopinu KCl-a i tako čuva do iduće upotrebe (Božanić i sur., 2010).



### 3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari

Metoda se temelji na isparavanju vode iz uzorka za analizu sušenjem u sušioniku pri  $102 \pm 2$  °C do konstantne mase (Božanić i sur., 2010).

#### *Postupak:*

U prethodno posušenu, ohlađenu i odvagnutu aluminijsku posudicu napunjenu izžarenim pijeskom (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska) se odvagne 3-5 g fermentiranog zobenog napitka, tj. oko 10 g običnog zobenog napitka (analitička vaga, AB104, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska). Posudica s uzorkom se potom stavi u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) i suši 1-2 sata pri  $102 \pm 2$  °C. Potom se posudica izvadi iz sušionika u eksikator, ohladi i izvažuje na analitičkoj vagi. Sušenje se ponavlja tako dugo dok se u dvije uzastopne odvage ne postigne razlika manja od 1 mg (Božanić i sur., 2010).

Postotak suhe tvari računa se prema formuli:

$$\left( \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \right) \times 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [2]$$

### 3.3.3. Određivanje udjela pepela

Udio pepela određen je žarenjem uzorka u porculanskom lončiću u Mufovoj peći. Porculanski lončići za žarenje se izare u Mufovoj peći (LP-08 1200, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) pri temperaturi od 650 °C, ohlade u eksikatoru i izvažuju (analitička vaga, AB104, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska). U izvagane lončiče dodaje se oko 10 g uzorka te se oni stavljaju u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na temperaturu od 158 °C dok se uzorak sasvim ne osuši. Zatim se lončići stave na žarenje u Mufovu peć na temperaturu od 550 °C dok sadržaj ne pobijeli. Potom se lončići hlade u eksikatoru, važu i ponovno žare do konstantne mase (Božanić i sur., 2010).

Izračun udjela pepela je sljedeći:

$$\left( \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} \right) \times 100 = \% \text{ pepela} \quad [3]$$

### 3.3.4. Određivanje reoloških svojstava

Viskoznost jogurta mjerena je na rotacijskom reometru prikazanom na slici 8 (RM-180 Rheomat, Rheometric Scientific, Piscataway, SAD) koji se sastoji od cilindričnog vretena (br. 1  $\phi$  30 mm,  $l = 45$  mm) i vanjskog plašta (br. 1,  $\phi$  32,54 mm). Vanjski plašt se razdvoji i u njega se stavlja 32 mL uzorka tako da je cilindrično vreteno konstantno uronjeno u uzorak tijekom rotacije, nakon čega se ponovno pričvrsti za tijelo uređaja. Za mjerenje obrtnog momenta koji se javlja na rotirajućem vretenu korišteno je relativno obrtanje mjerne osovine u odnosu na pogonsku osovinu. Uređaj potencijometar vezan je na dinamometar i prima podatke o relativnom obrtanju, pri čemu se obrtni moment pretvara u električni signal koji se prevodi u digitalnu vrijednost koja je očitana sa zaslona uređaja. Reometar određuje napon smicanja te prividnu viskoznost pri 8 različitih brzina koje određuje on sam. Temperatura uzorka je oko 20 °C.



Slika 8. Rotacijski reometar za mjerenje viskoznosti: sučelje (vlastita fotografija)

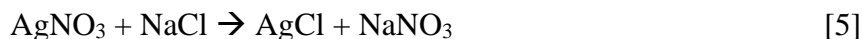
### 3.3.5. Određivanje udjela soli metodom po Mohr-u

Dokazivanje i određivanje natrijevog klorida vrši se pri ispitivanju kemijskog sastava prehrambenih proizvoda kod njihove kontrole. Najčešće se koriste modificirane titracijske metode određivanja klorida po Vohlaru i po Mohru. Metodom po Mohru se određuje koncentracija kloridnih iona u otopini titracijom sa srebrovim nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ). Kod ove

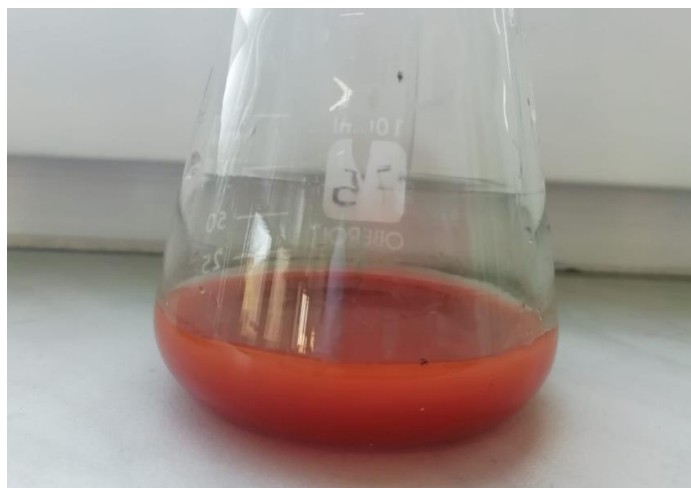
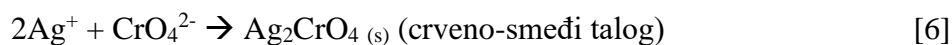
metode se postepeno dodaje otopina srebrovog nitrata u ispitivanu otopinu, pri čemu nastaje bijeli talog srebrovog klorida (AgCl) prema jednadžbi:



točnije:



Završna točka titracije očitava se kada se istalože svi kloridni ioni, a detektira se na način da naknadno dodani ioni srebra reagiraju s kromatnim ionima iz indikatora, kalijevog kromata ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ), pri čemu nastaje crveno-smeđi talog srebrovog kromata ( $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$ ) prema jednadžbi (Korkmaz, 2001):



Slika 9. Crveno-smeđi talog nastao nakon titracije uzorka srebrovim nitratom uz kalijev kromat kao indikator (vlastita fotografija)

#### *Postupak:*

U čašu od 100 mL se izvaže (digitalna vaga, KB-3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) oko 2 g dobro homogeniziranog uzorka, doda se 2-3 mL tople destilirane vode i miješa se staklenim štapićem da se dobije homogena smjesa. Dobivena smjesa se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL uz ispiranje čaše destiliranom vodom. Tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake, zatvori čepom, dobro promiješa i drži u ključaloj vodenoj kupelji 15 minuta od trena kad zakipi sadržaj tikvice. Tikvica treba biti poklopljena tijekom ključanja uz povremeno dizanje čepa. Nakon toga, otopina u tikvici se ohladi, ali ne do

kraja. Ako je potrebno, vodom se nadopuni do oznake i promiješa. Slijedi filtracija sadržaja iz tikvice preko filter papira u Erlenmeyerovu tikvicu. Nakon filtracije, ispituje se pH vrijednost filtrata pH metrom (pH3110, WTW, Weilheim, Njemačka) koji mora biti oko 10. Ukoliko filtrat reagira kiselo, potrebno ga je neutralizirati 0,1 M otopinom natrijevog hidroksida. Od dobivenog filtrata se otpipetira 25 mL u Erlenmeyerovu tikvicu, doda se 2-3 kapi indikatora – zasićene otopine  $K_2CrO_4$  i titrira se 0,1 M otopinom  $AgNO_3$  do prve promjene boje. Izračun mase natrijevog klorida je sljedeći:

$$m_{100} (NaCl) (g) = 4 \times c(AgNO_3) \times Vs (AgNO_3) \times M (NaCl) \quad [7]$$

gdje  $c (AgNO_3)$  označava koncentraciju srebrovog nitrata,  $Vs (AgNO_3)$  količinu utrošenog srebrovog nitrata, a  $M (NaCl)$  molarnu masu natrijevog klorida,

a udio natrijevog klorida u ispitanom uzorku prema formuli:

$$w (NaCl) (\%) = \frac{m_{100} (NaCl)}{m (uzorka)} \times 100 \quad [8]$$

### 3.3.6. Određivanje udjela maltoze i glukoze metodom po Loff-Schoorl-u

Metoda za određivanje šećera metodom prema Loff-Schoorlu se temelji na sposobnosti reducirajućih ugljikohidrata (laktoza, glukoza, maltoza) da reduciraju metale iz alkalnih otopina njihovih soli zahvaljujući slobodnoj aldehidnoj, odnosno keto skupini. Dodatkom Luffove otopine (alkalna otopina bakra), nastaje crveno-smeđi, netopljivi talog bakrenog oksidula, a količina šećera nakon nastanka taloga se može odrediti titracijom suviška nereduciranih iona bakra ili titracijom istaloženog i otopljenog bakrenog oksidula.

Dodatkom otopine kalijevog jodida u suvišku, u kiseloj sredini koja se postiže dodatkom sumporne kiseline, dolazi do reakcije joda i suviška bakrenih iona pri čemu se oslobađa molekularni jod. Oslobođeni jod titrira se otopinom natrijevog tiosulfata uz škrob kao indikator do prijelaza u boju puti (Božanić i sur., 2010).

*Postupak:*

U tikvicu s brušenim grlom se otpipetira 1 mL napitka. Potom se otpipetira 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključi na povratno hladilo i kuha uz lagano vrenje točno 10 minuta. Tada se tikvica skine, ohladi pod mlazom tekuće vode te se u smjesu otpipetira 15 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida. Nakon toga se oprezno, uz miješanje, u smjesu otpipetira 25 mL 25 %-tne otopine sumporne kiseline.

Izlučeni jod se titrira 0,1 M Na-tiosulfatom dok boja uzorka ne prijeđe u žutu, a zatim se otpipetira 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i lagano se nastavi titracija Na-tiosulfatom sve do prijelaza tamnoplave u putenastu boju koja se treba zadržati nekoliko minuta. U račun se uzima u obzir zbroj utrošenih mililitara tiosulfata u obje titracije.

Usporedno se radi slijepa proba gdje se umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetira 25 mL destilirane vode, a daljnji postupak je identičan kao i s uzorkom (Božanić i sur., 2010).

Izračun se provodi na sljedeći način:

Slijepa proba troši X mL 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Uzorak troši Y mL 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

$$(X - Y) \times f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = Z \text{ mL } 0,1 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [9]$$

Iz tablice 2 se za Z mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> očitaju mg maltoze i glukoze u 1 mL uzorka.

Tablica 2. Tablica za izračunavanje šećera prema Schoorl-Loff-u (Božanić i sur., 2010)

0,1 N-tiosulfat	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Laktoza		Maltoza	
	ml	razlika	mg	razlika	mg	razlika
1	2,4		3,6		3,9	
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,2	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9

5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	43,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1
16	41,5	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	75,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

### 3.3.7. Mikrobiološke analize

Mikrobiološka analiza provedena je 1., 7., 14., 21. i 28. dan na svim običnim i fermentiranim zobenim napitcima, a praćen je broj kvasaca i plijesni te enterobakterija. Prvi dan analizirana je prisutnost bakterija roda *Salmonella* sp., a prvi i posljednji dan analizirana je prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Određivanje broja mikroorganizama u napitcima je provedeno metodom nacjepljivanja decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge. Broj mikroorganizama ustanovljen ovom metodom ne predstavlja pravi broj živih mikroorganizama u pojedinom uzorku, nego samo broj onih koji su se mogli razviti u vidljive kolonije pod uvjetima rasta koji ponajviše ovise o sastavu supstrata, temperaturi i trajanju inkubacije. Određuje se broj živih bakterija, uz pretpostavku da se iz svake pojedine stanice na čvrstom hranjivom supstratu u Petrijevim pločama razvila po jedna odvojena kolonija (Božanić i sur., 2010).

Za određivanje broja kvasaca i plijesni je korišten Sabourad dextrose agar CAF 50, za enterobakterije Violet red bile glucose agar, za koagulaza pozitivne stafilokoke Baird Parker agar base (sve Biolife, Italija), a za određivanje bakterija roda *Salmonella* sp. Salmonella Shigella agar (BD, Njemačka). Obični zobeni napitak se koristio kao osnovno razrjeđenje, dok se fermentirani zobeni napitak pripremao na način da se 20 g uzorka otopi u 180 mL zagrijane (45 °C) i prethodno pripremljene 2%-tne otopine natrij citrata u Erlenmeyerovoj tikvici sa staklenim zrcima. Sadržaj u Erlenmeyerovoj se snažno promućka čime se dobilo osnovno razrjeđenje. Petrijeve ploče za utvrđivanje enterobakterija, koagulaza pozitivnih stafilokoka i bakterija roda *Salmonella* sp. inkubirane su u termostatu (3U1, Inkolab, Zagreb) na 37 °C kroz 48 sati, a Petrijeve ploče za utvrđivanje kvasaca i plijesni na 30 °C kroz 48 sati (Božanić i sur., 2010).

Nakon inkubacije je provedeno brojanje poraslih mikroorganizama na čitaču bakterijskih kolonija tvrtke Funke Gerber, Njemačka. Broj poraslih kolonija po mL (eng. *Colony-forming Unit*, CFU) izračunat je prema jednadžbi [10]:

$$CFU \text{ mL}^{-1} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nacijepljen volumen}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [10]$$

### 3.3.8. Senzorske analize

Senzorska analiza je provedena od strane posebno obučениh ocjenjivača na svim napitcima. Uzorci su ocjenjivani 1., 7., 14., 21. i 28. dan skladištenja, osim ako su neki uzorci senzorskom analizom upućivali na to da su pokvareni, senzorska analiza je prekinuta prije 28. dana. Po uzoru na senzorsko ocjenjivanje fermentiranih mliječnih napitaka navedeno u radu Mandić i Perl (2006), praćeni su izgled, boja, konzistencija, miris i okus te se na kraju uzela u obzir srednja ocjena svih ocjenjivača za svako pojedino svojstvo. Primjer obrasca za senzorsko ocjenjivanje nalazi se u tablici 3.

Termini koji određuju kvalitetu fermentiranih mliječnih proizvoda su:

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

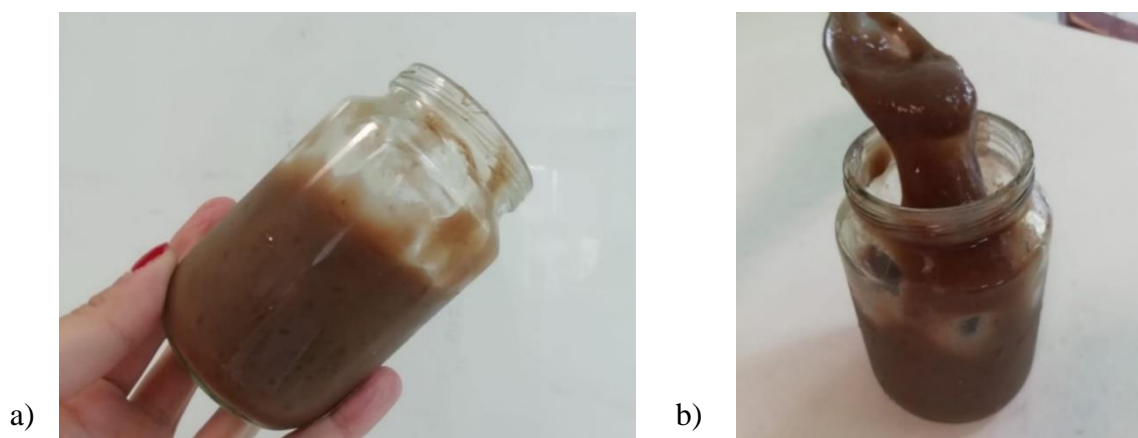
2. Konzistencija – grudice ili pahuljice, kapljice, nejednak, pjeskovit, ljepljiv, prejak, gust, previše tekući, vlaknast ili ljepljiv, suha, želatinozna
3. Okus - vodenast, jednoličan, gorak, kuhan, izgoren, dimljen, uljast, kemijski okus, hranjiv, stran okus, loše aromatiziran, loši sastojci, sirast, po sladu, metalik, pljesniv, oksidiran, kiseo, oštar, hrapav, mastan, pjenušav, užežen, pokvaren, koji se skuplja, nečist, presladak, preslan, sapunast.

Tablica 3. Obrazac za senzorsko ocjenjivanje zobnih napitaka

<b>Datum:</b>				
<b>Ime i prezime:</b>				
<b>Svojstvo i opis svojstva</b>	Maksimalan broj bodova	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
<b>Izgled</b> (homogena površina, bez izdvajanja faza, bez vidljivih grudica, prljavo bijela do siva boja)	1			
<b>Boja</b> (prljavo bijela do siva boja)	1			
<b>Konzistencija</b> (homogena, glatka, bez grudica, bez razdvajanja faza)	4			
<b>Miris</b> (blago i ugodno kiselkasti, miris po žitaricama)	2			
<b>Okus</b> (blago kiselo, po žitaricama i orašastim plodovima, bez grudica, fine konzistencije u ustima)	12			



<b>Ukupno</b>	20			
<b>Komentari</b>				



Slika 10. Senzorska analiza fermentiranog zobenog napitka: ocjena izgleda (a) i ocjena konzistencije (b) (vlastite fotografije)

### 3.4. OBRADA REZULTATA

Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel verzija 2016, a prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio optimiranje proizvodnje zobenog napitka i njegove fermentacije, tj. dobivanje biljnog proizvoda koji je vrlo sličan jogurtu po konzistenciji, ali koji će okusom biti sladak, kojeg će moći konzumirati široka skupina potrošača uključujući i vegane te koji će sadržavati samo prirodne sastojke. U skladu s tim, provedena su najprije preliminarna ispitivanja proizvodnje zobenog napitka, njegove formulacije i fermentacije. Na temelju preliminarnih ispitivanja odabran je program proizvodnje te vrsta i količina dodataka koji su uključivali rogač u prahu, brašno od sjemenki rogača, saharozu i vanilin u prahu. Nakon odabrane formulacije, provedena je i fermentacija pomoću starter kultura, također odabranih preliminarnim ispitivanjima. Rezultati koji su doveli do odabira kulture i recepture prikazani su tablicama 4-14.

Nakon proizvodnje običnog i fermentiranog zobenog napitka, provedene su analize tijekom 28 dana u cilju praćenja svojstava i roka trajanja proizvoda čiji su rezultati prikazani tablicama 16-18 te slikama 13-20. Analizirani su obični zobeni napitak čuvan u hladnjaku (N\_H), obični zobeni napitak čuvan na sobnoj temperaturi (N\_V), fermentirani nepasterizirani zobeni napitak (FN\_NP) te fermentirani pasterizirani zobeni napitak (FN\_P).

### 4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

#### 4.1.1. Proizvodnja zobenog napitka

Isprobane su tri proizvodne serije za proizvodnju zobenog napitka kao što je navedeno u tablici 4. Sve proizvodne serije su uspoređene s komercijalno dostupnim zobnim napitkom kako bi se proizveo napitak njemu sličan. Redosljed proizvodnih serija je proveden kao što je prikazano u tablici te je svaki sljedeći bio proveden tako da se poprave nedostaci uočeni u prethodnom.

Tablica 4. Proizvodnja zobenog napitka

<b>Proizvodna serija</b>	<b>Zobene pahuljice (g)</b>	<b>Voda (L)</b>	<b>Program i broj ciklusa</b>	<b>Komentar</b>
<b>1</b>	60 g suhих	1,40	P5 (kuhanje na 70 °C, 7 minuta), 2 ciklusa (nakon prvog procijeđeno kroz obično sito)	Previše gusto, nakon 2. ciklusa pahuljice su bolje usitnjene, ali je napitak pregust. Potrebno je manje zobenih pahuljica, a preporuča se procijediti i kroz svileno sito.
<b>2</b>	40 g suhих	1,35	P5 (kuhanje na 70 °C, 7 minuta), 1 ciklus (nakon kuhanja procijeđeno kroz obično i svileno sito)	Svjetlija boja napitka nego onog u 1. proizvodnoj seriji, manje je gusto. Ovim omjerom se dobiva napitak koji je više sličan komercijalno dostupnom.
<b>3</b>	40 g prethodno namočenih	1,35 (0,3 L od namakanja + 1,05 L)	P6 (samo usitnjava zob, ne kuha, traje 100 sekundi), 2 ciklusa	Najviše svijetli napitak, vrlo rijedak nakon 1. ciklusa

Nakon nekoliko dana čuvanja u hladnjaku, primijećeno je odvajanje faza što upućuje na to da se napitak mora promućkati prije upotrebe, kao što je navedeno i na pakiranju komercijalno dostupnog zobenog napitka. Također, u preliminarnim ispitivanjima fermentacije ovih napitaka, utvrđeno je najveće razdvajanje faza te najlošija senzorska svojstva kod uzorka iz proizvodne serije broj 3, tako da je program proizvodnje 6 eliminiran. Lošiji okus napitka proizvedenog programom 6 je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je za razvoj arome zobi potreban odgovarajući termički tretman (Klensporf i Jeleń, 2008; Pescuma i sur., 2014).

Na temelju komentara iz tablice 4, zaključuje se da je najbolji napitak dobiven proizvodnom serijom 2, te se odabire omjer zob:voda 4:100 što je jednako 55 g zobenih pahuljica i 1400 mL vode. Odabran je program 5 koji omogućava kuhanje napitka. Prednost ovog programa jest i pasterizacija proizvoda koji se vruć puni u staklene boce te se kao takav zatvara što mikrobiološki stabilizira napitak. Također, radi boljeg usitnjavanja zobenih pahuljica, odabrana su 2 ciklusa uz cijedenje kroz obično sito nakon prvog te kroz svileno sito nakon drugog ciklusa. Na taj način, iz 55 g zobenih pahuljica i 1400 mL vode je dobiveno 1260 mL napitka gdje gubici predstavljaju ostatke zobenih pahuljica nakon prolaska kroz sita te ostatke u samom uređaju na njegovim stijenkama koji se ispiru.

Luana i sur. (2014) su proizveli zobeni napitak od brašna zobenih pahuljica te su utvrdili da je optimalna količina brašna 25 %. 20 % zobenog brašna dalo je prerijedak napitak, dok više od 30 % zobenog brašna daje proizvod sličan polučvrstom tijestu. To je puno više zobi uspoređujući s napitkom u ovom radu (4 %), međutim, njihov cilj bio je već na početku dobiti teksturu koja je slična jogurtu. Bernat i sur. (2014) su koristili nešto manji omjer zob:voda (8:100) te tvrde da je taj omjer pogodan za osiguravanje dovoljne količine  $\beta$ -glukana za naknadni proces fermentacije.

#### 4.1.2. Fermentacija zobenog napitka

##### 4.1.2.1. *Fermentacija komercijalno dostupnog zobenog napitka pomoću jogurtne kulture*

Da bi se procijenilo vrijeme trajanja fermentacije te isprobala mogućnost fermentacije zobenog napitka pomoću jogurtne kulture, najprije je provedena fermentacija komercijalno dostupnog

zobenog napitka, Hafer drink natur proizvođača Dennree. Korištene su tri različite koncentracije jogurtne kulture, a ukupno je bilo 4 kombinacija kao što je navedeno u tablici 5. Rezultati fermentacije prikazani su u tablici 6.

Tablica 5. Uzorci za fermentaciju komercijalno dostupnog zobenog napitka (formulacija 1)

Oznaka napitka	Količina napitka (L)	Količina kulture (g)	Količina dodataka	Koncentracija dodataka
1	0,5	0,00980	0	20 DCU kulture
2		0,01225	0	25 DCU kulture
3		0,01470	0	30 DCU kulture
4		0,01225	5 g glukoze	25 DCU kulture + 1% glukoze

Tablica 6. Tijek fermentacije komercijalno dostupnog zobenog napitka pomoću jogurtne kulture (formulacija 1)

Vrijeme fermentacije	pH			
	1	2	3	4
0 h	6,88			
2 h	5,97	5,71	5,09	5,81
3 h	5,13	4,79	<b>4,54</b>	4,93
3,5 h	5,13	<b>4,54</b>		<b>4,64</b>

Iz podataka u tablici 6, vidljivo je da se pH brzo spušta tijekom fermentacije. Najkraće vrijeme trajanja fermentacije je zabilježeno kod 30 DCU, a koncentracija od 20 DCU je preniska da bi se fermentacija provela do kraja. Također, fermentacija traje jednako kod koncentracije kulture od 25 DCU sa i bez glukoze, tako da glukoza u ovom slučaju nema utjecaj na brzinu fermentacije. U skladu s tim, Gallo i sur. (2020) su utvrdili da dodatak 2 % glukoze u rižino brašno prije fermentacije ne rezultira značajnom razlikom u pH vrijednosti, mikrobnom rastu i proizvodnji mliječne kiseline u odnosu na fermentaciju rižinog brašna bez dodatka glukoze. Također, Gallo i sur. (2020) su fermentirali zobeno brašno uz dodatak 2 % glukoze te bez dodatka glukoze te je tijekom 24 sata utvrđen sličan pad pH vrijednosti između ova dva uzorka. Međutim, dodatkom 7 i 10 % glukoze u zobeno brašno je došlo do značajnijeg sniženja pH

vrijednosti u odnosu na fermentaciju uz 0 i 2 % glukoze. Iz toga se može pretpostaviti da je razlog istom trajanju fermentacije kod koncentracije od 25 DCU sa i bez dodatka glukoze premala količina dodane glukoze koja može utjecati na brzinu fermentacije i rast bakterija mliječne kiseline. Suprotno tome, Liu i Lin (2000) su utvrdili da dodatak 1 % glukoze u sojin napitak utječe na povećanje koncentracije mliječne kiseline i razine mikroorganizama u zrnu kefira, a Charalampopoulos i sur. (2002) su utvrdili da veće količine fermentabilnih šećera kao što su glukoza, fruktoza, maltoza i saharoza stimuliraju rast bakterija mliječne kiseline na ječmenom sladu.

Nakon nekoliko dana stajanja u hladnjaku je vidljivo odvajanje faza kao i kod nefermentiranog zobenog napitka što je prikazano na slici 11 .



Slika 11. Razdvajanje faza u fermentiranom zobenom napitku nakon par dana čuvanja u hladnjaku (vlastita fotografija)

#### 4.1.2.2. Fermentacija samostalno proizvedenog zobenog napitka pomoću jogurtne kulture

Na temelju fermentacije komercijalno dostupnog zobenog napitka, odabrana je koncentracija jogurtne kulture od 30 DCU, a korišteni su uzorci iz sve tri proizvodne serije koji su objašnjeni u točki 4.1.1. bez dodataka. Tijek fermentacije prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Fermentacija samostalno proizvedenog zobenog napitka pomoću jogurtne kulture

Trajanje fermentacije	pH		
	Proizvodna serija 1	Proizvodna serija 2	Proizvodna serija 3
0 h	7,41	7,15	7,24

<b>2 h</b>	7,05	6,90	7,17
<b>96 h</b>	6,10	6,40	6,40

Iz tablice 7 vidljivo je da fermentacija nije dovršena, što upućuje na to da se dodaju neki dodaci i koriste kulture pogodne za fermentaciju biljnih materijala. Razlog nedovršene fermentacije jest vjerojatno taj da se u zobenom napitku nalaze složeni i dugolančani ugljikohidrati (škrob) koji nisu pogodni za jogurtu kulturu koja zahtjeva jednostavniji izvor ugljika. Osim toga, senzorskom analizom utvrdilo se da tako dobiveni fermentirani napitci nisu adekvatni. Osim što je pH visok, senzorskom ocjenom se također utvrdila nedostatna kiselost ovih napitaka. Konzistencija nije kao kod jogurta, tako da to upućuje na dodatak zgušnjivača. Senzorskom analizom je primijećena blaga sluzavost, što je u skladu s očekivanim budući da jogurtna kultura stvara egzopolisaharide koji tome doprinose. Dolazi i do razdvajanja faza, najviše u uzorku iz proizvodne serije broj 3, a najmanje u uzorku iz proizvodne serije broj 2. Mårtensson i sur. (2001) su razvijali fermentirani zobeni napitak pomoću 2 različite jogurtne kulture. Za razliku od fermentacije u ovom radu prikazane u tablici 7, Mårtensson i sur. (2001) su dodali ksantan gumu za poboljšanje teksture, različite tvari arome od bobičastog voća i biljnu mast kao alternativu mliječnoj masti. U njihovom eksperimentu je obična jogurtna kultura fermentacijom spustila pH napitka do 4,50 nakon 8 sati, dok je jogurtna kultura koja je imala dodanu *Bifidobacterium* spp. spustila pH do 4,50 nakon 5 sati. Oni navode da se kraće trajanje fermentacije u drugom slučaju javlja zbog mogućnosti *Bifidobacterium* spp. da fermentira maltozu te je to, uz ubrzavanje fermentacije, rezultiralo boljom aromom i većom kiselošću u odnosu na napitak fermentiranog običnom jogurtu kulturom. Također, utvrdili su da dodatak ksantan gume, tvari arome i masti ima pozitivan utjecaj na senzorska svojstva napitka. Takvi rezultati su u skladu s pretpostavkom u ovom radu, a to je da se koriste kulture pogodnije za fermentaciju biljnih materijala kao i dodaci za poboljšanje senzorske kvalitete i brzine fermentacije.

#### *4.1.2.3. Fermentacija samostalno proizvedenog zobenog napitka pomoću VEGE starter kultura*

Nakon utvrđivanja optimalnog programa proizvodnje zobenog napitka, isti je proizveden na takav način te čuvan u hladnjaku do fermentacije. S obzirom na to da je iz točke 4.1.2.2. utvrđeno da napitak zahtjeva dodatke, u ovom pokušaju je dodan rogač u prahu u svrhu poboljšanja konzistencije i okusa napitka te glukoza u svrhu osiguranja jednostavnijeg izvora

ugljika mikroorganizmima. Također, ovdje su korištene VEGE starter kulture, namijenjene za fermentaciju biljnih materijala u koncentraciji od 20 DCU prema uputama proizvođača. Korišteno je ukupno 9 kombinacija prikazanih u tablici 8, dok je tijekom fermentacije prikazan u tablici 9.

Tablica 8. Uzorci za fermentaciju samostalno proizvedenog zobenog napitka pomoću 3 vrste VEGE kultura (formulacija 2)

Oznaka napitka	Količina napitka (L)	Vrsta kulture	Količina kulture (g)	Rogač (%)	Glukoza (%)
1	0,5	033	0,0050	0	0
2		053	0,0065	0	0
3		081	0,0300	0	0
4		033	0,0050	1	0
5		053	0,0065	1	0
6		081	0,0300	1	0
7		033	0,0050	1	1
8		053	0,0065	1	1
9		081	0,0300	1	1

Tablica 9. Tijek fermentacije samostalno proizvedenog zobenog napitka pomoću 3 vrste VEGE starter kultura (formulacija 2)

Trajanje fermentacije	pH								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0 h	8,04	7,92	8,05	6,97	6,91	6,92	6,79	6,87	6,92
2 h	7,34	7,22	7,58	6,60	6,51	6,54	6,48	6,49	6,53
4 h	6,16	5,75	7,00	6,13	5,91	6,37	5,92	5,93	6,19
6 h	5,68	5,61	5,84	5,35	5,22	5,73	5,05	4,86	5,74
7 h								4,83	4,75
8 h	5,57	5,53	5,68	4,71	<b>4,59</b>	5,35	<b>4,61</b>	<b>4,45</b>	5,32
9 h	5,57	5,54	5,61	<b>4,60</b>		5,17			5,14
22 h	5,02	<b>4,50</b>	<b>4,42</b>			<b>4,10</b>			<b>4,10</b>



Kao što je vidljivo iz tablice 9, fermentacija se u svim uzorcima odvijala do poželjnog pH osim kod uzorka 1. Fermentacija je najkraće trajala kod uzoraka fermentiranih kulturama 053. Najdulja fermentacija je zabilježena kod napitaka bez dodataka. Dodatak glukoze ponovno nije pokazao značajan utjecaj na trajanje fermentacije, kao ni na okus. Primjerice, uzorci 6 i 9 fermentirani su istim kulturama, oba sadrže rogač, ali uzorak 9 ima dodanu glukozu. Međutim, tijekom fermentacije ova dva uzorka gotovo je jednak. Isto je primijećeno između uzoraka 5 i 8, a kod uzoraka 4 i 7 je kod uzorka s glukozom fermentacija trajala kraće samo sat vremena. Stoga se izbacuje dodatak glukoze, a uvodi se dodatak drugog jednostavnog izvora ugljika koji će ujedno poboljšati okus proizvoda kao što je saharoza. Senzorskom analizom utvrđeno je da su napitci prekiseli, pa se pretpostavilo da će se dodatkom saharoze to ublažiti te da će dovedena slatkoća dobro korelirati s kiselošću. Vrlo negativno svojstvo ovih dobivenih fermentiranih zobenih napitaka jest njihova konzistencija koja je bila prerijetka i nije ličila konzistenciji jogurta.

Na temelju ovih rezultata, odlučeno je da se u nastavku koristi i dalje rogač u prahu, ali se dodaje i brašno od sjemenki rogača za ugušćivanje napitka te saharoza za poboljšanje okusa i dobivanje slatkog fermentiranog zobenog napitka. Kultura koja se dalje koristi je VEGE 053 LYO budući da najbrže fermentira napitak u koncentraciji od 20 DCU.

M'hir i sur. (2021) su utvrdili da dodatak rogača u proizvodnji napitka nalik kefiru značajno utječe na poboljšanje rasta bakterija mliječne kiseline. Međutim, utvrdili su i da ako se koristi rogač kao jedini izvor ugljika i dušika, rast bakterija mliječne kiseline je ograničen. Stoga su uz rogač koristili zobeno brašno i permeat sirutke. Wang i sur. (2017) su proizvodili fermentirani zobeni napitak te su također dodali saharozu kao glavni izvor ugljika mikroorganizmima. Taj dodatak pokazao se povoljnim budući da je u količini od 4 % povećao populaciju korištenog *L.plantarum* za skoro 2 log jedinice. Također, utvrdili su da zobeni napitak nema adekvatnu teksturu pa su u svrhu ugušćivanja i stabilizacije dodali pektin i κ-karagenan.

U tablici 10 je prikazana količina i vrsta dodataka koja se koristila dalje u preliminarnim ispitivanjima.

Tablica 10. Uzorci za fermentaciju samostalno proizvedenog zobenog napitka (formulacija 3)

Uzorak	Količina napitka (L)	Vrsta kulture	Količina kulture (g)	Rogač u prahu (%)	Brašno od sjemenki rogača (%)	Saharoza (%)
<b>1</b>	0,5	053	0,0065	1	1	1
<b>2</b>				1	2	1
<b>3</b>				1	2	2

Tablica 11. Tijek fermentacije samostalno proizvedenog zobenog napitka (formulacija 3)

Trajanje fermentacije	pH		
	1	2	3
<b>0 h</b>	6,15	6,00	5,93
<b>2 h</b>	5,63	5,62	5,63
<b>4 h</b>	<b>4,64</b>	4,89	4,75
<b>5 h</b>		<b>4,62</b>	<b>4,51</b>

Trajanje fermentacije je zadovoljavajuće i ona traje 4-5 sati što znači da dodaci povoljno djeluju na fermentaciju, a kultura je u mogućnosti brzo fermentirati takav napitak. Senzorskom analizom je utvrđena poboljšana konzistencija fermentiranih napitaka, a bolja je u uzorcima 2 i 3, dakle uz dodatak 2 % brašna od sjemenki rogača. Okusom se najboljim pokazao uzorak broj 3 s 2 % saharoze te je u tom slučaju utvrđeno da najbolje korelira s kiselošću napitka. Stoga je, sveukupno gledano, najbolji uzorak broj 3.

Na temelju dobivenih rezultata, ostavlja se rogač u prahu u koncentraciji od 1 %, brašno sjemenki rogača koristit će se u koncentraciji od 2 %, povećat će se udio saharoze, a dodat će se i vanilin u prahu u svrhu poboljšanja arome.

Tablica 12. Uzorci za fermentaciju samostalno proizvedenog zobnog napitka (formulacija 4)

Uzorak	Količina napitka (L)	Vrsta kulture	Količina kulture (g)	Rogač u prahu (%)	Brašno od sjemenki rogača (%)	Saharoza (%)	Vanilin (%)
1	0,5	053	0,0065	1	2	2,5	0,1
2				1	2	3	0,1

Tablica 13. Tijek fermentacije samostalno proizvedenog zobnog napitka (formulacija 4)

Trajanje fermentacije	pH	
	1	2
0 h	6,02	6,01
2 h	5,74	5,67
4 h	5,03	5,05
5 h	<b>4,64</b>	<b>4,63</b>

Senzorskom analizom utvrđeno je da je uzorak broj 2 optimalan te se nastavlja s tom recepturom. Tako dobiveni napitak je zadovoljavajućeg izgleda, boje, mirisa, okusa i konzistencije, a u svrhu provjere ponovljivosti postupka prije početka glavnog dijela istraživanja, fermentacija napitka odabrane recepture ponovljena je još jednom što je prikazano u tablici 14.

Tablica 14. Tijek fermentacije samostalno proizvedenog zobnog napitka konačne recepture

Trajanje fermentacije	pH
0 h	6,23
2 h	5,89
4 h	5,05
5 h	4,63

## 4.2. GLAVNI POKUS

### 4.2.1. Fermentacija zobenog napitka odabrane recepture

Preliminarnim ispitivanjima je utvrđen način proizvodnje zobenog napitka, receptura za formulaciju te uvjeti fermentacije. Prema tome, proveden je glavni pokus proizvodnje fermentiranog zobenog napitka. Fermentacija je ponovljena u 3 paralele koje su u tablici 15 označene kao fermentacija 1, fermentacija 2 i fermentacija 3. Fermentacijom 1 su se proizveli napitci koji nisu pasterizirani, dok su napitci nastali fermentacijom 2 i 3 pasterizirani.

Tablica 15. Tijek fermentacije kojom je proizveden konačni napitak za daljnje analize

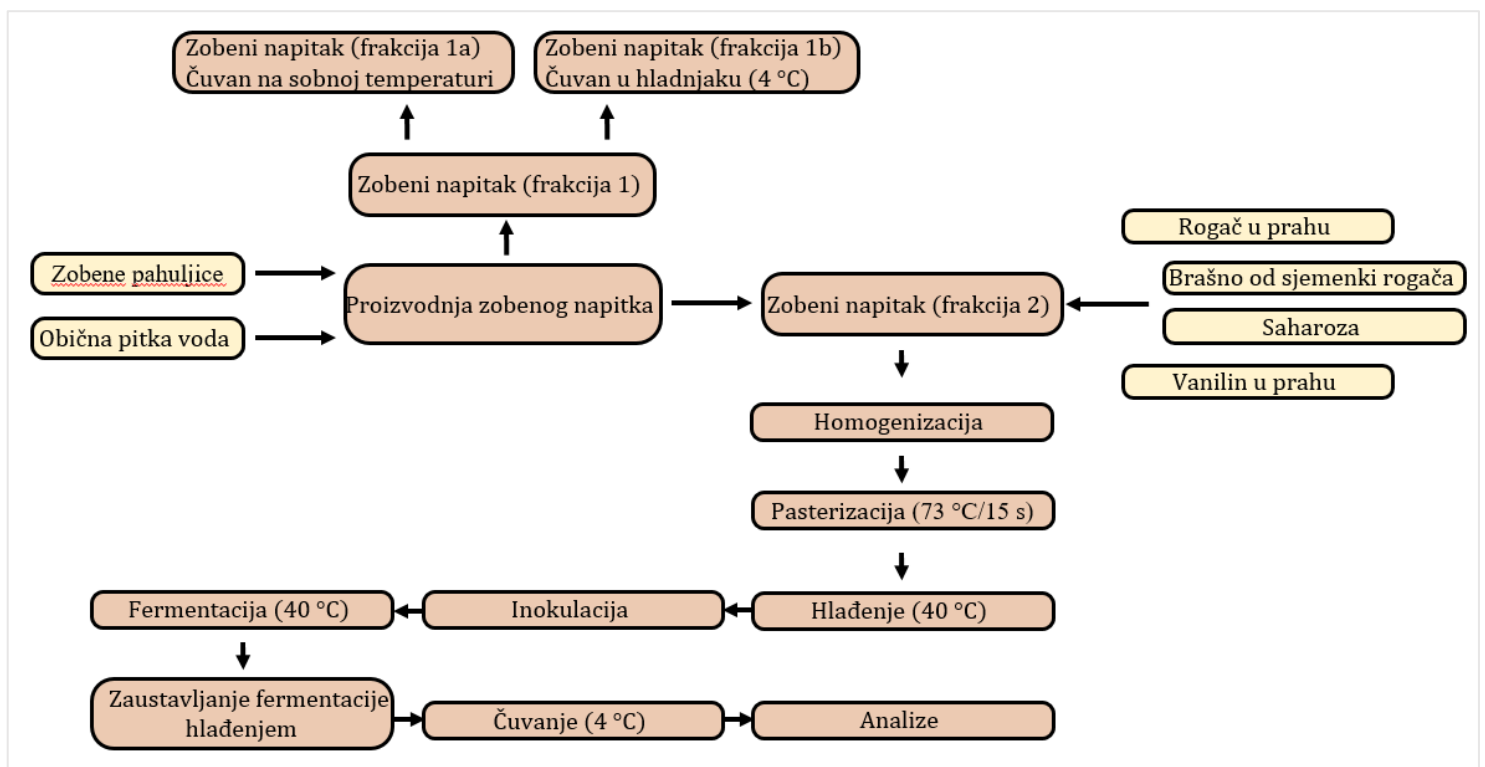
Trajanje fermentacije	pH				
	0 h	2 h	4 h	5 h	6,5 h
Fermentacija 1	6,42	6,03	5,00	<b>4,63</b>	
Fermentacija 2	6,07	5,84	5,05	<b>4,58</b>	
Fermentacija 3	6,42	6,29	5,73	5,07	<b>4,66</b>

Ovim fermentacijama je potvrđeno da su preliminarni postupci uspješno izvršeni, točnije, dobiven je napitak čija je fermentacija vremenski prihvatljiva (5-6,5 sati), koji je zadovoljavajućeg izgleda, boje, mirisa i okusa te koji je konzistencijom sličan jogurtu.

Grasso i sur. (2020) su proizveli različite fermentirane biljne napitke u svrhu proizvodnje proizvoda sličnog jogurtu te su dobili slične pH vrijednosti. One su se kretale od 3,99 do 4,56 i napominju kako je kiselost bitna u proizvodnji takvog proizvoda u cilju postizanja što veće sličnosti s jogurtom. Vidljivo je iz rezultata da se pH fermentiranih napitaka u ovom radu kreće između 4,58 i 4,66 što je blisko vrijednostima napitaka Grasso i sur. (2020). Masiá i sur. (2020) su provodili fermentaciju različitih biljnih napitaka te su za zoben napitak koristili sličnu starter kulturu koja je sadržavala *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* uz dodatak *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* i *Bifidobacterium* te je fermentacija trajala 7,38 h do spuštanja pH vrijednosti do 4,50. Od dodataka su imali samo saharozu i škrob. Trajanje fermentacije od 7,38 h u radu Masiá i sur. (2020) u usporedbi s trajanjem fermentacije od 5-6 sati u ovom radu još jednom potvrđuje činjenicu da rogač sadrži sastojke koji pogoduju ubrzavanju fermentacije. Još jedan primjer dulje fermentacije zobenog napitka je u istraživanju Luana i sur. (2014) koja je trajala 12 sati za vrijeme čega se pH spustio od 6,45 do 4,23.

Međutim, oni nisu dodavali nikakve hranjive sastojke već su u svrhu ubrzanja fermentacije koristili pripravak ksilanaze i  $\alpha$ -amilaze. Masić i sur. (2020) su primijetili da unatoč nižem početnom pH od sojinog, zobeni napitak zahtijeva ipak duže vrijeme fermentacije. Razlog tome se pripisuje većem puferskom kapacitetu zobenih napitaka zbog većeg udjela proteina te je u skladu s tim potrebno proizvesti veće količine kiseline da bi pH pao do 4,50.

Fermentacijom je u potpunosti završena proizvodnja fermentiranog zobenog napitka, a cijeli postupak prikazan je shemom na slici 12.



Slika 12. Dijagram tijeka proizvodnje običnog i fermentiranog zobenog napitka (vlastita shema)

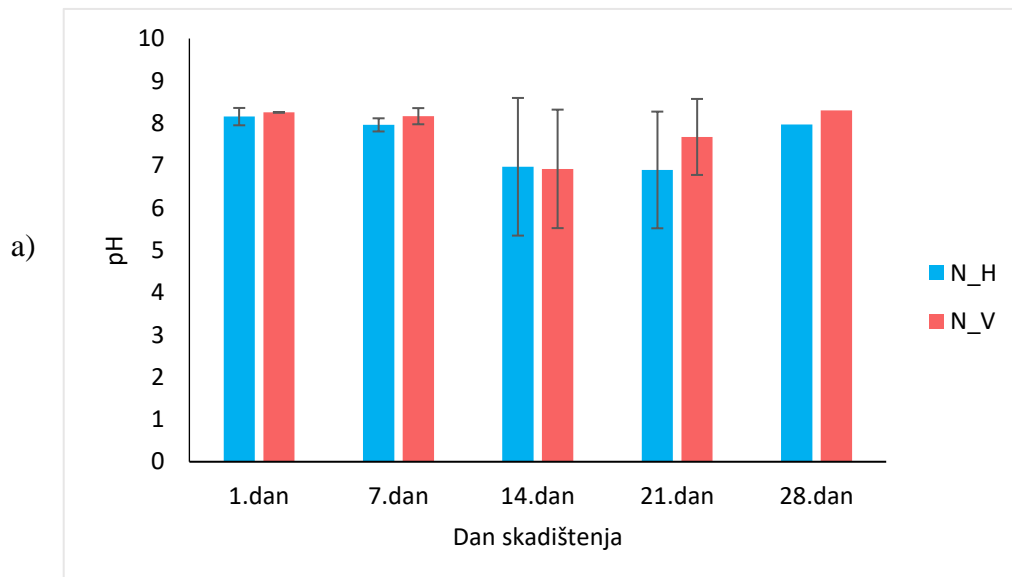
#### 4.3. SVOJSTVA OBIČNOG I FERMENTIRANOG ZOBENOG NAPITKA TIJEKOM 28 DANA

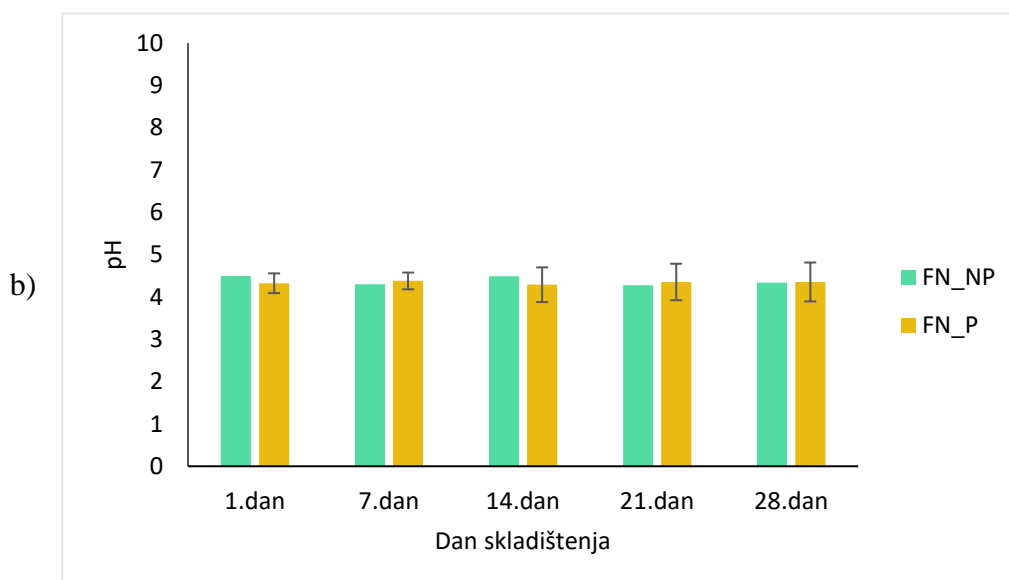
Tijekom 28 dana čuvanja provedene su analize mikrobioloških, kemijskih, reoloških i senzorskih svojstava običnog zobenog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi i običnog zobenog napitka čuvanog u hladnjaku u 2 paralelna mjerenja. Fermentirani pasterizirani zobeni napitak je također analiziran tijekom 28 dana u 2 paralelna mjerenja, dok je nepasterizirani ispitan u samo jednom paralelnom mjerenju. Izmjerene promjene pH vrijednosti su prikazane grafovima na slici 13, 1. i 28. dan skladištenja je izmjeren udio suhe tvari i pepela čiji su rezultati

prikazani tablicom 16, dok su reološka svojstva prikazana slikama 14 i 15, udio soli 1. i 28. dana prikazan je tablicom 17, udio glukoze i maltoze je prikazan grafovima na slici 16, rezultati mikrobioloških analiza su prikazani tablicom 18, a senzorskih analiza slikama 18 i 19.

#### 4.3.1. Kiselost proizvoda

pH vrijednost je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona i predstavlja aktivnu kiselost proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012). Na slici 13 prikazana je promjena pH vrijednosti za sve uzorke s obzirom na dane čuvanja. Više pH vrijednosti i veće varijacije u njima tijekom skladištenja su uočene u običnim nefermentiranim zobnim napitcima. U fermentiranim zobnim napitcima je zabilježen niži pH koji se značajno ne mijenja tijekom skladištenja.





Slika 13. Promjena pH vrijednosti u proizvedenom zobenom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H) i čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V) (a) te u fermentiranom nepasteriziranom zobenom napitku (FN\_NP) i u fermentiranom pasteriziranom zobenom napitku (FN\_P) (b) tijekom 28 dana skladištenja (n=2)

Iz slike 13 a) je vidljivo da se pH vrijednosti za oba obična nefermentirana napitka mijenjaju istim trendom. Njihov pH na početku iznosi 8,16 za N\_H, tj. 8,26 za N\_V. Slijedećih 14 dana skladištenja njihov pH pada kada je zabilježena i najniža pH vrijednost tijekom čuvanja koja iznosi 6,97 za N\_H, tj. 6,92 za N\_V. Sniženje pH može se objasniti mikrobiološkom kontaminacijom napitaka budući da je početni pH povoljan za većinu mikroorganizama koji zakiseljavaju napitak. Primijećeno je da je za napitak čuvan na sobnoj temperaturi izmjerena nešto niža pH vrijednost, vjerojatno stoga što su u hladnjaku mikroorganizmi djelomično inhibirani niskom temperaturom, dok na sobnoj nisu. Nakon 14. dana je zabilježen ponovni rast pH vrijednosti skoro do početnih vrijednosti (7,97-8,30). Taj rast mogao bi se objasniti time da mikroorganizmi nisu dalje zakiseljavali proizvod budući da bi ih kiseli uvjeti inhibirali. Sličan trend kretanja pH vrijednosti zabilježen je u istraživanju Achouri i sur. (2007) koji su pratili promjene na sojinom napitku tijekom 3 mjeseca skladištenja u različitim uvjetima. U njihovim je napitcima najprije zabilježen blagi rast pH, a onda su također zabilježili pad pH u uzorcima koji su bili skladišteni na 22, 38 i 4 °C za 0,6-0,8 jedinica, slično kao kod napitaka u ovom radu. Nakon toga, pH je ponovno počeo rasti, kao i kod napitaka u ovom radu te je ostao stabilan tijekom ostatka skladištenja. Achouri i sur. (2007) objašnjavaju pad pH vrijednosti kao posljedicu kemijskih interakcija u sojinom napitku kao što su lipoliza i proteoliza, Coda i sur. (2012) su utvrdili pad pH u nefermentiranom biljnom napitku nakon 30 dana skladištenja od 4,40-5,34 na 4,15-5,12. Kod njih je prisutan niži početni pH s obzirom na to da su dodavali

koncentrirano crveno grožđe. Sidhu i Singh (2016) su mjerili pH sojinog napitka tijekom 28 dana skladištenja na 4 °C te su također zabilježili pad pH od 7,10 do 5,94. Također, usporedili su promjenu pH tijekom skladištenja s toplinski tretiranim uzorcima gdje je pH počeo padati tek nakon 3 tjedna, a u konačnici je njihov pH bio viši od kontrolnog uzorka te tvrde da je do promjene pH došlo vjerojatno zbog interakcije među proteina i lipida, agregacije proteina i rasta mikroorganizama.

U istraživanju Masiá i sur. (2020) početni pH nefermentiranog zobenog napitka od 30 % zobenog koncentrata iznosio je 6,16, a u istraživanju Bernat i sur. (2015) je pH iznosio 6,41 što je za oko 1-2 pH jedinice niže od nefermentiranih napitaka u ovom radu iz čega se zaključuje da udio i oblik u kojem se zob nalazi utječu na početni pH napitaka. Mäkinen i sur. (2015) su izmjerili pH komercijalno dostupnog zobenog napitka koji je najbliži vrijednostima napitaka u ovom radu, a iznosio je 7,16. pH komercijalno dostupnog zobenog napitka koji se koristio u ovom radu u preliminarnim ispitivanjima imao je početni pH 6,88.

Iz slike 13 b) je vidljivo da je pH fermentiranih zobenih napitaka stabilan tijekom 28 dana hladnog skladištenja kako za pasterizirani tako i za nepasterizirani napitak. Poznato je da završetkom fermentacije, ovi napitci imaju pH vrijednost oko 4,60. Međutim, već je prvi dan skladištenja pH blago spušten do 4,50 za nepasterizirani, odnosno do 4,33 za pasterizirani fermentirani zobeni napitak. Tijekom daljnjeg skladištenja nije zabilježen kontinuiran pad ili rast pH vrijednosti već one variraju između 4,28 i 4,50 za FN\_NP, tj. između 4,29 i 4,38 za FN\_P. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem Masiá i sur. (2020) koji su fermentaciju provodili sličnom kulturom do 4,50 pH vrijednosti te se tijekom 21 dana skladištenja pH spustio tek blago ispod 4,50. Slične rezultate su dobili Chen i sur. (2020) koji su fermentirali zobeni napitak uz dodatak meda pomoću *Lactobacillus fermentum* PC1 gdje je također utvrđen najveći pad pH vrijednosti od 6,26 do 4,12 u prvih 24 sata te na 3,93 u 72 sata nakon čega je tijekom skladištenja na 4 °C pH bio stabilan. Oni objašnjavaju da je stabilnost pH prisutna vjerojatno uslijed puferskog kapaciteta ostalih proizvedenih spojeva te polifenola. U istraživanju Wang i sur. (2017) također nije bilo značajne promjene pH vrijednosti tijekom skladištenja fermentiranog zobenog napitka, ali je taj pH bio niži od pH napitaka u ovom radu, a kretao se oko 3,50. M'hir i sur. (2021) su proizvodili napitak nalik kefiru uz dodatak rogača, te su se pH vrijednosti tog proizvoda kretale od 4,25 do 4,39 što je također blisko vrijednostima napitaka u ovom radu. Neki drugi istraživači (Asadzadeh i sur., 2020; Aparicio- Garcíá i sur., 2021) su provodili fermentaciju u točno određenom vremenskom trajanju, bez obzira na postignutu



krajnju pH vrijednost koja je stoga često bila poprilično visoka (5,60-5,65, tj. 6,96). To je uzrokovalo dodatno zakiseljavanje tijekom skladištenja, te se pH u konačnici spustio do oko 4.

Ako se usporede pH vrijednosti nefermentiranog i fermentiranog zobenog napitka (slika 13), vidljivo je da je pH vrijednost značajno niža kod fermentiranog napitka, što je i u skladu s očekivanim budući da fermentacijom nastaju organske kiseline koje snižavaju pH vrijednost proizvoda. Također je vidljivo da je pH stabilniji tijekom skladištenja fermentiranog napitka nego kod nefermentiranog. Razlog tome bi mogla biti veća mikrobiološka stabilnost fermentiranih napitaka budući da starter kulture snižavaju pH koji je nepogodan za neke mikroorganizme kvarenja, a također proizvode i neke druge antimikrobne tvari i na taj način čuvaju proizvod. Ako bi se pH dodatno snizio, to bi inhibiralo i bakterije mliječne kiseline čime one ne bi više bile aktivne.

#### 4.3.2. Udio suhe tvari i pepela

Jedan od osnovnih postupaka u analitici hrane i prehrambenih proizvoda predstavlja određivanje vode dok ostatak predstavlja udio suhe tvari. Dakle, što je više vode u proizvodu, manje je suhe tvari. Određivanje vode, tj. suhe tvari ima veliki značaj s obzirom na to da utječe na fizikalna, kemijska i nutritivna svojstva proizvoda. Udio vode u prehrambenim proizvodima uvijek je prisutan i obuhvaća široki raspon od 0,05 do 97 %.

Svaka namirnica biljnog ili životinjskog podrijetla sadrži mineralne tvari. U analitici prehrambenih proizvoda ukupne mineralne tvari se određuju spaljivanjem, a dobiveni ostatak naziva se pepeo. Određenim propisima o hrani utvrđena je dozvoljena količina pepela u pojedinim namirnicama. Spaljivanjem uzorka se potpuno uklanja organska supstanca koja obuhvaća veći dio suhe tvari, pa odabir temperature mora biti takav da se uklone organske tvari, a ne izgube mineralne (Marković i sur., 2017)

Tablica 16 prikazuje dobivene rezultate za oba svojstva u svim uzorcima.

Tablica 16. Udio suhe tvari i pepela prvi i posljednji dan skladištenja u proizvedenom zobenom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H), proizvedenom zobenom napitku čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V), fermentiranom nepasteriziranom zobenom napitku (FN\_NP) te u fermentiranom pasteriziranom zobenom napitku (FN\_P) (n=2)

Dan skladištenja	Udio suhe tvari (%)				Udio pepela (%)			
	N_H	N_V	FN_NP	FN_P	N_H	N_V	FN_NP	FN_P
<b>1.dan</b>	2,70±0,09	2,53±0,11	8,20	6,04±3,15	0,05±0,00	0,04±0,01	0,11	0,11±0,02
<b>28.dan</b>	2,32±0,85	1,57±1,13	8,09	8,32±0,15	0,05±0,03	0,08±0,03	0,10	0,12±0,02

Iz tablice je vidljivo kako fermentirani napitci imaju puno veći udio suhe tvari (oko 8 %) nego obični nefermentirani napitci (oko 2 %) što je i u skladu s očekivanim budući da suhu tvar nefermentiranog napitka čini samo suha tvar zobenih pahuljica, dok su u fermentirane napitke dodavani i drugi sastojci poput rogača u prahu, brašna sjemenki rogača, saharoze i vanilina.

Ako se uspoređi suha tvar uzoraka između prvog i posljednjeg dana skladištenja, vidljivo je da ona blago pada kod svih uzoraka osim za FN\_P, međutim, za taj uzorak je vidljiva velika vrijednost standardne devijacije pa se radi vjerojatno o većoj pogrešci mjerenja. Blagi pad suhe tvari u skladu je s padom količine šećera tijekom skladištenja prikazanim grafovima na slici 16. Također, reološkim mjerenjima čiji su rezultati prikazani grafovima na slikama 14 i 15, je utvrđen pad viskoznosti koji se može pripisati blagom padu količine  $\beta$ -glukana što je sukladno blagom padu udjela suhe tvari. Asadzadeh i sur. (2020) su također u fermentiranom zobenom napitku utvrdili pad suhe tvari tijekom skladištenja od 21 dan na 4 °C što su pripisali potrošnji šećera od strane korištene bakterije *Bifidobacterium lactis*.

U tablici 16 je također prikazan udio pepela te je također vidljivo da je udio pepela veći kod fermentiranih nego kod nefermentiranih napitaka. To je u skladu i s većim udjelom suhe tvari kod ovih uzoraka, a razlog je isti, tj. dodatak sastojaka. Tako se udio pepela kod nefermentiranih napitaka kreće između 0,04 i 0,08 %, dok je kod fermentiranih taj udio između 0,10 i 0,12 %.

Ako se uspoređi udio pepela između prvog i posljednjeg dana skladištenja, vidljivo je da nema značajne razlike te da taj udio ostaje stabilan.

Wang i sur. (2017) su izmjerili 11,65 % suhe tvari u svom zobenom napitku. Međutim, njihov napitak sadrži i veći postotak zobene baze (10,00 %) u usporedbi s napitcima u ovom radu (4,00 %) te oni koriste zobeno brašno. Također, sadrže više dodanog šećera (6,00 %) u usporedbi s napitkom u ovom radu (3,00 %). Što se tiče ostalih sastojaka, dodali su inulin (1,00 %), vitamin C (0,06 %), pektin (0,40 %), κ-karagenan (0,20 %) te limunsku kiselinu (0,15 %). Također, izmjeren je nešto viši udio pepela koji je iznosio 0,14 %. Bernat i sur. (2015) su proizveli zobeni napitak s omjerom zob:voda 8:100 te izmjerili 6,50 % ukupne suhe tvari i 0,10 % pepela.

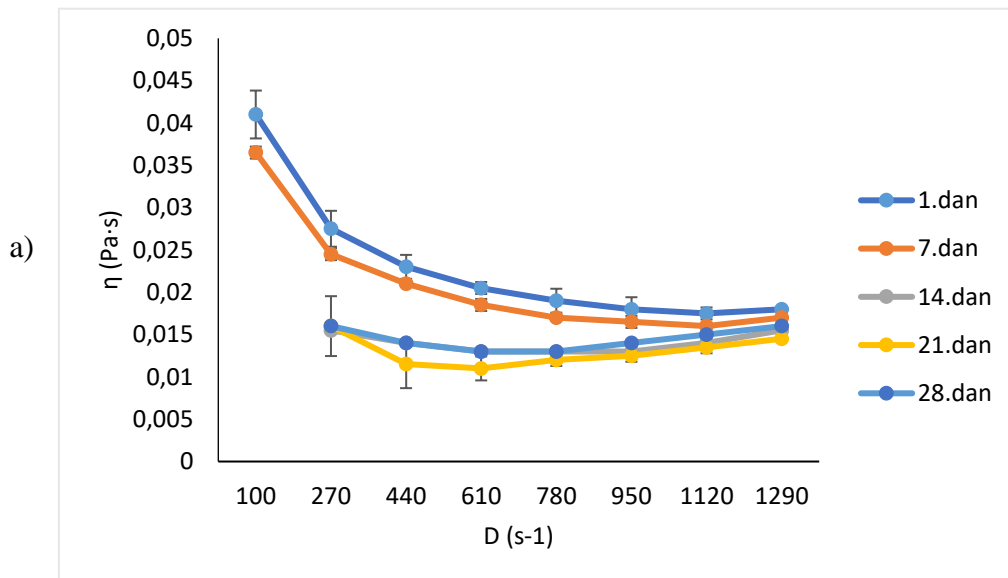
Prema Aydar i sur. (2020), zobeni nefermentirani napitak je po udjelu suhe tvari najbližiji bademovom (3,36-8,11 %), dok ostale biljne napitke karakterizira nešto viši udio. Tako kokosov sadrži 14,00 % suhe tvari, lješnjakov 5,30-9,60 %, sezamov 10,19-13,91 %, sojin 8,11 %, a rižin 12,90 %. Međutim, ovi udjeli ovise o postupku proizvodnje i udjelu sirovine koja se koristi. Što se tiče udjela pepela, oni navode da je u zobenom napitku prisutan u udjelu od 0,48 %. Isti udio je izmjeren i u ovom radu u zobenom napitku čuvanog u hladnjaku 1. dan skladištenja, dok su ostale vrijednosti pepela za nefermentirani zobeni napitak bliske toj vrijednosti. Ostale biljne napitke također karakterizira niži udio pepela. Bademov sadrži 0,09-3,04 %, kokosov 1,20 %, lješnjakov 0,20 %, sezamov 0,22-0,48 %, sojin 0,81-0,84 %, a rižin 0,13-0,42 %.

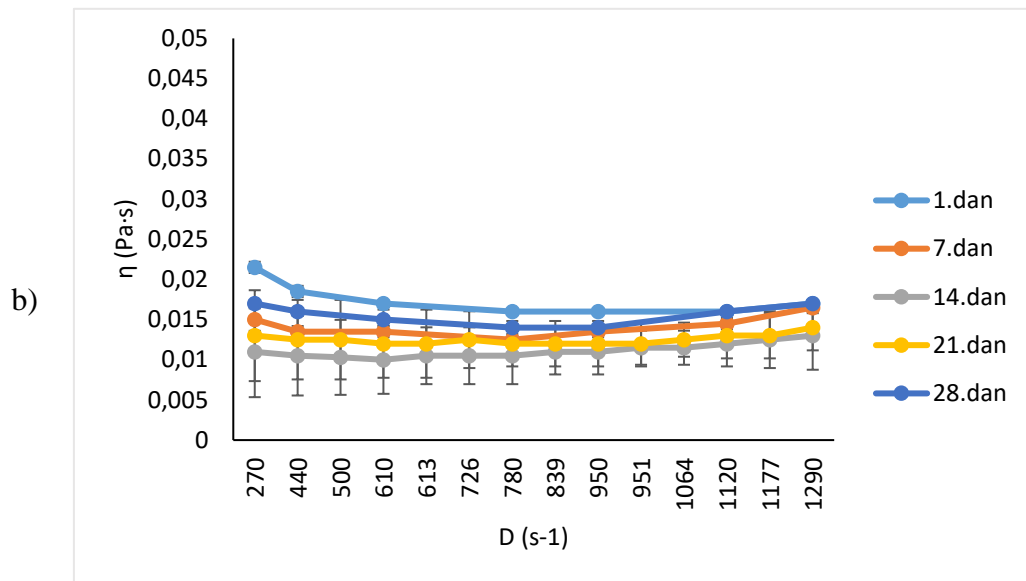
#### 4.3.3. Reološka svojstva

Reologija se bavi proučavanjem deformacija i protjecanja krutih i tekućih tvari podvrgnutih djelovanju sile. U prehrambenoj industriji reologija ima veliki značaj jer definira i opisuje teksturalna svojstva prehrambenih proizvoda. Na teksturalna svojstva fermentiranih napitaka utječe čitav niz faktora kao što su upotrijebljena starter kultura, sastav i početna viskoznost napitka, kinetika fermentacije, toplinski tretman prije fermentacije, homogenizacija itd. Reološke osobine fermentiranih napitaka jedan su od najbitnijih parametara njihove senzorske kvalitete, a igraju i važnu ulogu kod projektiranja i optimiranja samog tehnološkog procesa proizvodnje. Potrošačka prihvaćenost proizvoda uvelike ovisi o njegovoj konzistenciji koja je usko povezana s viskoznošću i svojstvima tečenja proizvoda. U skladu s tim, viskoznost se smatra važnim reološkim svojstvom tekućih prehrambenih proizvoda. To je svojstvo koje se

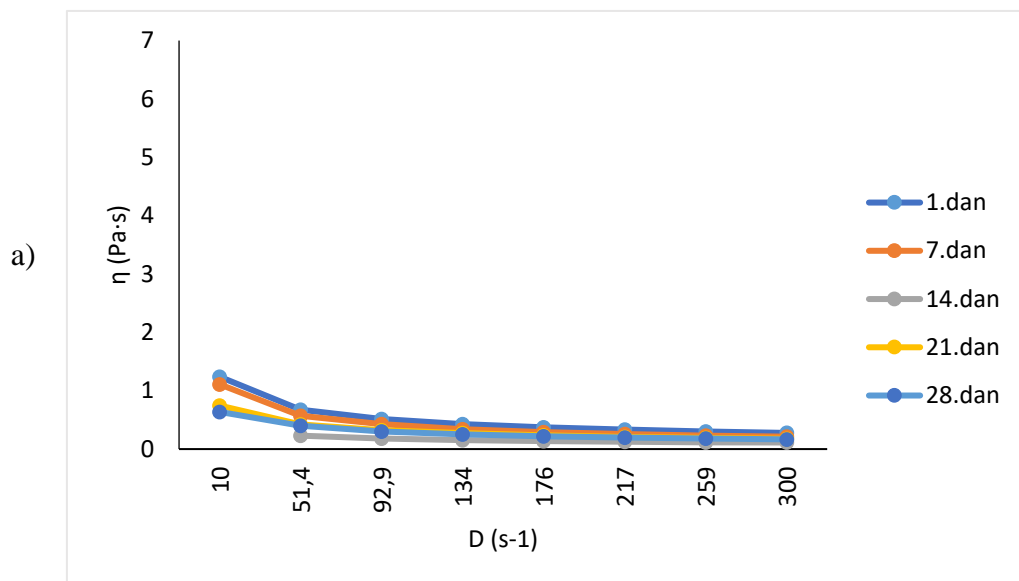
teoretski ne može predvidjeti u hrani zbog složene fizikalne i kemijske strukture (Hardi i Slačanac, 2000).

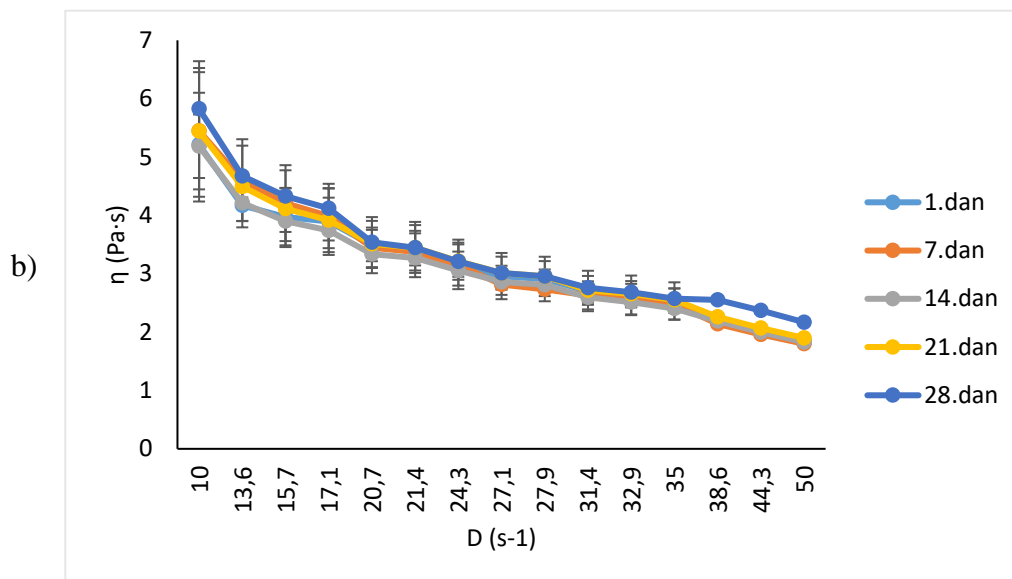
Iako veliki broj tekućina, kao i nešto hrane, pokazuju Newtonovo ponašanje, većina se prehrambenih proizvoda ponaša kao ne-Newtonova tekućina što znači da veza između smičnog naprezanja i brzine smicanja nije linearna. Viskoznost ne-Newtonovskih tekućina mijenja se s promjenom brzine smicanja (Deswal i sur., 2014). Na grafovima na slikama 14 i 15 je prikazan odnos viskoznosti o brzini smicanja te je vidljivo da napitci proizvedeni u ovom radu također pripadaju ne-Newtonovskim tekućinama.





Slika 14. Promjena viskoznosti zobenog napitka čuvanog u hladnjaku (N\_H) (a) i zobenog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V) (b) tijekom 28 dana skladištenja (n=2)





Slika 15. Promjena viskoznosti fermentiranog nepasteriziranog zobenog napitka (FN\_NP) (a) te fermentiranog pasteriziranog zobenog napitka (FN\_P) (b) tijekom 28 dana skladištenja (n=2)

Iz grafova na slici 14 i 15 je vidljivo da uglavnom viskoznost pada s povećanjem brzine smicanja uz par iznimaka. Ovo svojstvo karakteristično je za pseudoplastične sustave. Kod ovih sustava smično naprezanje mnogo brže raste pri nižim brzinama smicanja nego pri višim. U većini slučajeva se ponašanje ovog tipa ne-Newtonskih fluida pripisuje prisustvu visokomolekularnih tvari u otopini ili dispergiranih čvrstih čestica u tekućoj hrani (Lovrić, 2003).

Iz slike 14 a), vidljivo je da obični napitak čuvan u hladnjaku ima najveću viskoznost 1. i 7. dan, te ona najviše pada između 100 i 270 s<sup>-1</sup>. Već 14.-og dana uzorku pada viskoznost tako da uređaj nije bio u mogućnosti izmjeriti ju pri 100 s<sup>-1</sup>. Također, 14., 21. i 28. dana je primijećeno da kod brzine 780 s<sup>-1</sup> viskoznost ponovno blago raste. Povećanje smičnog naprežanja, tj. viskoznosti pri povećanju brzine smicanja je karakteristika dilatantnih sustava (Lovrić, 2003). Iz slike 14 b), vidljivo je da je kod običnog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi viskoznost manja nego kod onog čuvanog u hladnjaku. Budući da je napitak čuvan na sobnoj temperaturi, njegova temperatura u trenutku mjerenja bila je nešto viša pa je to u skladu s utvrđenim u radu Deswal i sur. (2014) koji su izmjerili manju viskoznost napitaka pri višim temperaturama. Mäkinen i sur. (2015) navode kako viskoznost zobenog napitka iznosi 6,09 mPas, a za ostale biljne napitke, ona se kreće između 2,02 mPas (rižin) do 23,80 mPas (kvinoinj). Deswal i sur.

(2014) su pri  $100 \text{ s}^{-1}$  izmjerili viskoznost od 74,00 mPas za zobeni napitak koncentracije 20 °Brixa te 16,00 mPas za zobeni napitak koncentracije 15 °Brixa što je blisko vrijednostima viskoznosti napitaka u ovom radu (21,50-41,00 mPas). Iz ovog je vidljivo da viskoznost napitaka, osim o temperaturi, ovisi i o koncentraciji mjenog uzorka. Tako je u tom radu za napitak od 5 °Brix izmjerena viskoznost od samo 3,00 mPas. Deswal i sur. (2014) su također utvrdili da je zobeni napitak pseudoplastična tekućina obzirom da su zabilježili pad viskoznosti s povećanjem brzine smicanja te ovu pojavu objašnjavaju na način da hidrodinamičke sile koje nastaju, razgrađuju strukturu komponenata zobenog napitka kao što su masti, škrob i proteini. Oni također mjere najveći pad viskoznosti na početku mjerenja, tj. pri najmanjim brzinama.

S druge strane, fermentirani napitci (slika 15) pokazuju pravilniji trend opadanja viskoznosti s povećanjem brzine smicanja. Prema tome, fermentirani zobeni napitci spadaju u pseudoplastične ne-Newtonske tekućine. Međutim, fermentirani napitci su znatno viskozniji, te uređaj nije mogao izmjeriti ovisnost viskoznosti o brzini smicanja u intervalima brzine kao za obične napitke ( $100\text{-}1290 \text{ s}^{-1}$ ), već u puno nižim vrijednostima. Tako je za fermentirani nepasterizirani napitak izmjeren između  $10$  i  $300 \text{ s}^{-1}$ , a za pasterizirani između  $10$  i  $50 \text{ s}^{-1}$ . Iz toga se zaključuje kako pasterizacija utječe na povećanje viskoznosti napitka što je bilo vidljivo i senzorskom procjenom tijekom pasterizacije. Također je u fermentiranim zobenim napitcima prisutan najveći pad viskoznosti na početku mjerenja pri prijelazu iz najmanjih brzina prema većim. Pad prividne viskoznosti s povećanjem brzine smicanja, tj. pseudoplastično ponašanje je zabilježeno i u istraživanju Grasso i sur. (2020) za razne fermentirane biljne napitke s najvećim padom viskoznosti između  $0$  i  $50 \text{ s}^{-1}$ . Također, oni su utvrdili da viskoznost jogurta pri  $200 \text{ s}^{-1}$  iznosi 0,24 Pas. Ako se usporedi to s napitcima u ovom radu, fermentirani nepasterizirani napitak 1. dana skladištenja ima veću viskoznost koja iznosi oko 0,35 Pas pri  $200 \text{ s}^{-1}$ , dok je pasterizirani fermentirani zobeni napitak još viskozniji. Pseudoplastična svojstva fermentiranog zobenog i sojinog napitka dokazali su i Masiá i sur. (2020).

Kod nepasteriziranih fermentiranih napitaka je također došlo do smanjenja viskoznosti tijekom razdoblja skladištenja. Npr., pri brzini smicanja od  $10 \text{ s}^{-1}$  viskoznost pala s 1,24 Pas na 0,64 Pas. Sličan trend kretanja viskoznosti tijekom skladištenja je zabilježen u istraživanju Wang i sur. (2017) u fermentiranom zobenom napitku gdje je viskoznost u prvih 3 tjedna značajno padala, od otprilike 0,06 Pas do 0,05 Pas, a 4. tjedan je viskoznost ponovno rasla te je u konačnici, u 7. tjednu iznosila 0,07 Pas. Mårtensson i sur. (2001) su izmjerili pad količine  $\beta$ -glukana u fermentiranom zobenom napitku koji također utječe na viskoznost proizvoda uslijed

korištenih starter kultura koje ga troše. Ovim navodom se može djelomično objasniti činjenica smanjenja viskoznosti tijekom skladištenja. To je potvrđeno i u istraživanju Russo i sur. (2016) gdje je tijekom skladištenja na 4 °C fermentiranog i nepasteriziranog zobenog napitka razina  $\beta$ -glukana padala uz opadanje viskoznosti. Pad količine  $\beta$ -glukana može se javiti uslijed njegove hidrolize i depolimerizacije od strane mikroorganizama u trenutku kada im šećeri više nisu dostupni u dovoljnoj mjeri. Međutim, za pasterizirane uzorke nisu utvrdili pad koncentracije  $\beta$ -glukana, ali tvrde da je smanjenje viskoznosti moguće radi amilolitičke aktivnosti preostalih živih mikroorganizama. Također, moguće je da tijekom dulje inkubacije, bakterije mliječne kiseline smanjenim intenzitetom proizvode egzopolisaharide (Pham i sur. 2000).

Iz svih dobivenih rezultata se može zaključiti kako fermentirane napitke karakterizira znatno veća viskoznost. Iz toga se može zaključiti da fermentacijom i dodatkom sastojaka dolazi do promjene reoloških karakteristika te povećanja viskoznosti. Na povećanje viskoznosti utjecaj imaju i egzopolisaharidi kojeg sintetiziraju određene bakterije mliječne kiseline (Russo i sur. 2016). U istraživanju Mårtensson i sur. (2001) je utvrđena veća viskoznost sa većim udjelom ksantan gume koji je u njihovom istraživanju dodan kao zgušnjivač i stabilizator. U ovom radu, tu ulogu je najviše imalo brašno od sjemenki rogača što odgovara rezultatima veće viskoznosti napitaka koji sadrže dodano brašno.

#### 4.3.4. Udio soli

Udio soli određen je u svim napitcima 1. i 28. dan skladištenja metodom po Mohr-u čiji je princip objašnjen u točki 3.3.5. Rezultati udjela soli prikazani su u tablici 17.

Tablica 17. Udio soli u proizvedenom zobenom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H), proizvedenom zobenom napitku čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V), fermentiranom nepasteriziranom zobenom napitku (FN\_NP) te u fermentiranom pasteriziranom zobenom napitku (FN\_P) (n=2)

Dan skladištenja	Udio soli (%)			
	N_H	N_V	FN_NP	FN_P
Uzorak				
<b>1.dan</b>	1,05±0,16	0,81±0,16	1,17	0,99±0,08
<b>28.dan</b>	0,82±0,16	0,88±0,07	1,17	0,99±0,08

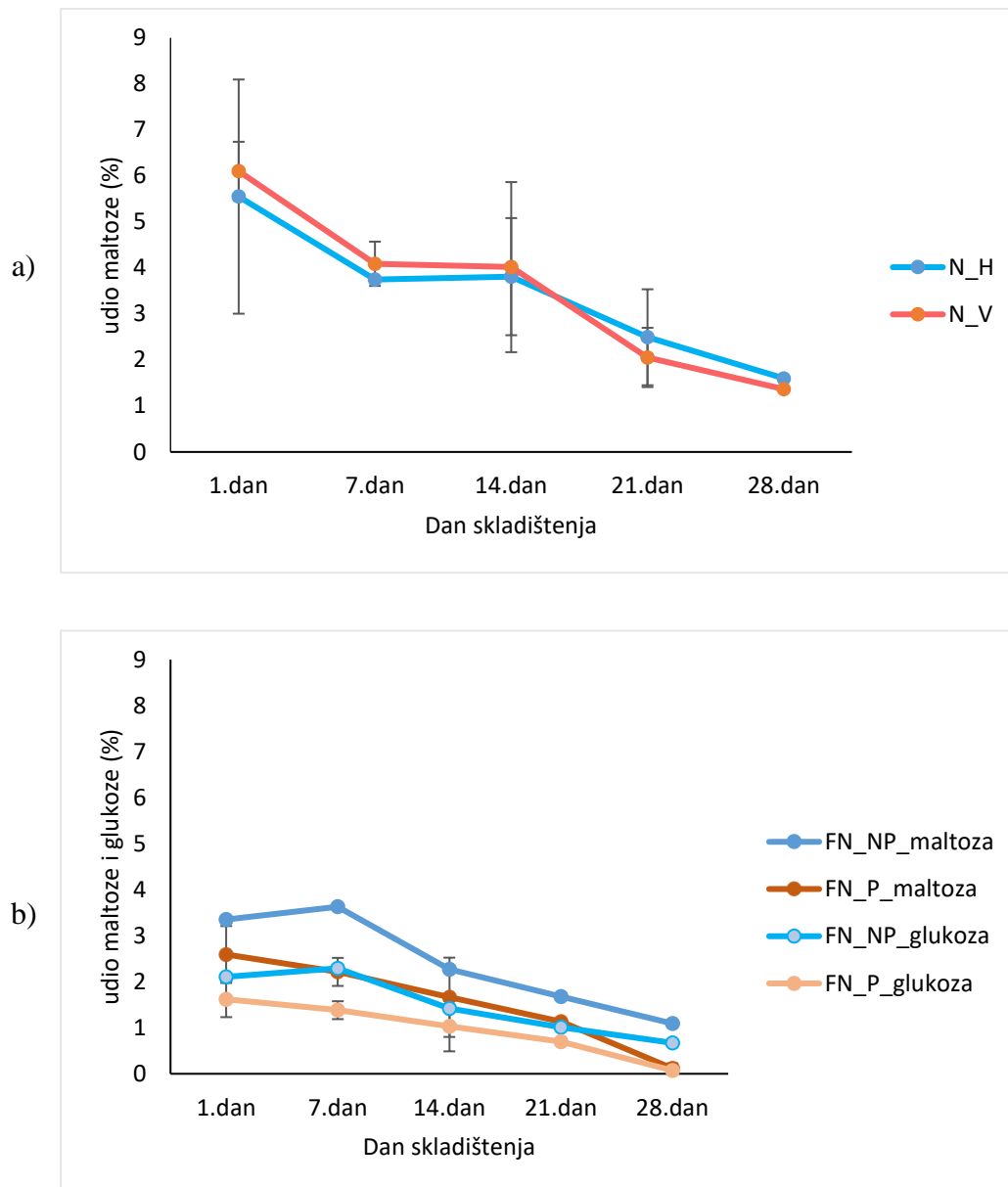


Iz tablice 17 je vidljivo da je udio soli u svim uzorcima vrlo mali. Udio soli u običnim nefermentiranim zobenim napitcima kreće se od 0,81 do 1,05 %, dok se u fermentiranim zobenim napitcima kreće od 0,99 do 1,17 %. Dakle, u fermentiranim zobenim napitcima koji sadrže dodane sastojke je prisutan veći udio soli u odnosu na one nefermentirane. Ako se uspoređi udio soli 1. i 28. dan skladištenja, vidljivo je da u nefermentiranim zobenim napitcima blago varira, dok je kod fermentiranih napitaka je udio soli nepromijenjen.

Grasso i sur. (2020) su izmjerili još manji udio soli u raznim fermentiranim biljnim napitcima na bazi soje, kokosa, badema, indijskog oraha i konoplje, a koji se kretao od 0,07 do 0,40 % što potvrđuje da biljne napitke ne karakterizira visoki udio soli. U usporedbi s jogurtom (0,18 %), fermentirani napitci u ovom radu imaju viši udio. Međutim, sol se često dodaje u ovakve napitke radi poboljšanja okusa što može izazvati zabrinutost kod potrošača (Mäkinen i sur., 2016).

#### 4.3.5. Udio glukoze i maltoze

Glukoza je monosaharid, najrasprostranjeniji šećer u biljnom i životinjskom svijetu te je često osnovna strukturna jedinica polisaharida poput škroba, celuloze i glikogena. Maltoza je disaharid sastavljen od dviju molekula glukoze povezanih  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidnom vezom. Dobiva se nepotpunom hidrolizom škroba pomoću enzima amilaze ili diastaze (Honig, 2013). Glukoza i maltoza čine sastav ugljikohidrata zobi i zobenih napitaka kao posljedica razgradnje škroba, polisaharida sastavljenog od glukoznih jedinica (Masiá i sur. 2020). Promjena koncentracije maltoze ispitana je u nefermentiranim i fermentiranim zobenim napitcima, dok je promjena koncentracije glukoze ispitana samo u fermentiranim zobenim napitcima. Rezultati promjene koncentracije ovih 2 šećera prikazani su na slici 16.



Slika 16. Udio maltoze (%) u proizvedenom zobenom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H) i čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V) (a) te udio maltoze i glukoze (%) u fermentiranom nepasteriziranom zobenom napitku (FN\_NP) te u fermentiranom pasteriziranom zobenom napitku (FN\_P) (b) tijekom 28 dana skladištenja (n=2)

Vidljivo je da je količina šećera veća u nefermentiranim nego u fermentiranim zobnim napitcima, a koncentracije oba šećera se smanjuje tijekom 28 dana skladištenja u svim uzorcima. Udio maltoze je pao s 5,55 na 1,60 % kod nefermentiranog napitka čuvanog u hladnjaku, tj. s 6,10 na 1,37 % kod nefermentiranog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi. Najveći pad udjela maltoze je zabilježen između 1. i 7. dana skladištenja kod oba nefermentirana nakon čega stagnira do 14. dana, a 21. dana je ponovno zabilježen veći pad. Iz grafa se može primijetiti da temperatura skladištenja nema značajan utjecaj na kretanje udjela maltoze u napitcima jer je isti trend opadanja zabilježen kod oba uzorka. Općenito, kako navode

Chalupa-Krebdak i sur. (2018) udio ugljikohidrata u biljnim napitcima kreće se od 0,42 do 11,05 %. Mäkinen i sur. (2015) odredili su 2,75 % maltoze u kupovnom zobenom napitku. Mårtensson i sur. (2001) su odredili 4,20 % maltoze u zobenom napitku s 20 % suhe tvari što je bliže vrijednostima maltoze napitcima u ovom radu. Viši udio maltoze u nefermentiranim zobnim napitcima u ovom radu bi se mogao objasniti pretpostavkom da je već 1.dan skladištenja došlo do razgradnje škroba na jednostavnije šećere tijekom proizvodnje ili uslijed prisutnih kvasaca koji su detektirani mikrobiološkom analizom.

U fermentiranim zobnim napitcima je prisutno više maltoze nego glukoze. Ako se usporede pasterizirani i nepasterizirani napitci, vidljivo je da pasterizirane karakterizira niži udio šećera te je 28.dan udio maltoze i glukoze gotovo jednak nuli. Tako je u nepasteriziranom fermentiranom zobnom napitku udio maltoze pao s 3,35 na 1,11 %, a udio glukoze s 2,11 na 0,67 %. U pasteriziranom fermentiranom zobnom napitku je udio maltoze pao s 2,60 na 0,12 %, a udio glukoze s 1,62 na 0,07 %. Najveći pad udjela maltoze i glukoze u nepasteriziranom fermentiranom zobnom napitku zabilježen je između 7. i 14. dana skladištenja, a u pasteriziranom fermentiranom zobnom napitku između 21. i 28. dana.

Ako se uspoređi udio maltoze u nefermentiranim i fermentiranim zobnim napitcima, vidljivo je da je na početku, veći udio maltoze prisutan u nefermentiranim što je i u skladu s očekivanjem, budući da dodane starter kulture koriste šećer kao izvor ugljika. Tako je fermentacijom udio maltoze pao s 5,55-6,10 % na 2,60-3,35 %. Međutim, treba uzeti u obzir i dodane sastojke u napitke prije fermentacije, posebice na saharozu kojeg su mikroorganizmi također koristili kao izvor ugljika. Stoga se može zaključiti kako bi pad udjela maltoze bio i veći da nije bilo dodanih sastojaka. U istraživanju Chen i sur. (2020) je također zabilježen pad šećera, točnije glukoze i fruktoze uz istovremeni rast mliječne kiseline tijekom fermentacije. Međutim, u njihovom istraživanju nije zabilježen toliko nagli pad šećera tijekom skladištenja. Udio glukoze je tijekom fermentacije pao s 9,82 na 5,61 %, a nakon 14 dana skladištenja je udio bio 5,38 %. Ono što se razlikuje jest da su koristili samo jednu vrstu bakterije, *Lactobacillus fermentum* PC1 uz dodatak meda, dok je u ovom radu korištena miješana kultura od više vrsta bakterija mliječne kiseline te više dodataka. Smanjenje udjela šećera, točnije glukoze i fruktoze zabilježen je i u istraživanju Coda i sur. (2012) gdje je udio šećera u fermentiranom jogurtu od žitarica, soje i mošta grožđa pao za 90-92 % od početne vrijednosti nakon 4 tjedna skladištenja, dok u kontrolnom, nefermentiranom napitku nije bilo značajne promjene u količini šećera. Bernat i sur. (2015) su također izmjerili postepeni pad udjela šećera tijekom skladištenja fermentiranog

zobenog napitka što objašnjavaju činjenicom da je starter kultura aktivna i tijekom skladištenja. Kod njih je udio glukoze 1. dan nakon fermentacije iznosio 0,12 % te je 28. dana skladištenja pao na 0,00 %, udio fruktoze je pao s 0,35 na 0,23 %, a saharoze s 0,02 na 0,01 %. Gupta i Bajaj (2017) su utvrdili pad razine šećera s 0,45 do 0,05 %, tj. od 0,47 do 0,06 % u fermentiranom zobenom napitku od zobenog brašna pomoću *L. plantarum* M-13 koja je, kao što se vidi iz rezultata, gotovo potpuno apsorbirala šećer.

Mikrobiološkom analizom, čiji rezultati slijede u nastavku, je utvrđena prisutnost kvasaca i plijesni od prvog dana skladištenja nefermentiranih i fermentiranih napitaka, koji također troše šećere kao izvor ugljika, pa se smanjenje količine maltoze u nefermentiranim zobenim napitcima može pripisati aktivnosti i rastu kvasaca i plijesni. U fermentiranim zobenim napitcima smanjenje udjela glukoze i maltoze može uzrokovati dodana starter kultura koja tijekom skladištenja ostaje aktivna, te uz prisutne kvasce i plijesni, troši šećere kao izvor ugljika.

#### 4.3.6. Rezultati mikrobiološke analize

Tijekom perioda čuvanja od 28 dana je u uzorcima provedena mikrobiološka analiza. Svaki se tjedan određivao broj poraslih kvasaca i plijesni te broj enterobakterija. Prvog dana je određena prisutnost bakterija roda *Salmonella* sp., a prvog i posljednjeg dana je određen broj koagulaza pozitivnih stafilocoka. Tablica 18 prikazuje dobivene vrijednosti broja bakterija, kvasaca i plijesni izražene kao  $\log_{10}$  (CFU mL<sup>-1</sup>).

Tablica 18. Broj mikroorganizama ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) u proizvedenom zobenom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H), proizvedenom zobenom napitku čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V), fermentiranom nepasteriziranom zobenom napitku (FN\_NP) te u fermentiranom pasteriziranom zobenom napitku (FN\_P) (n=2) tijekom 28 dana skladištenja

Dan	Mikroorganizam	N_H	N_V	FN_NP	FN_P
		$\log \text{CFU g}^{-1}$			
1.	Kvasci i plijesni	1,68±0,00	1,75±0,01	1,04	1,74±0,36
	Enterobakterije	0,00±0,00	0,00±0,00	1,60	0,00±0,00
	KPS	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	Salmonela	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
7.	Kvasci i plijesni	1,95±0,07	2,47±0,67	1,00	1,88±1,54
	Enterobakterije	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	KPS	-	-	-	-
	Salmonela	-	-	-	-
14.	Kvasci i plijesni	2,61±0,14	2,83±0,14	2,51	2,48±0,21
	Enterobakterije	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	KPS	-	-	-	-
	Salmonela	-	-	-	-
21.	Kvasci i plijesni	2,64±0,81	3,29±0,42	2,30	1,95±0,49
	Enterobakterije	2,62±2,07	0,00±0,00	0,00	0,00±0,00
	KPS	0,00±0,00	0,00±0,00	-	-
	Salmonela	-	-	-	-
28.	Kvasci i plijesni	-	-	1,60	3,07±0,67
	Enterobakterije	-	-	0,00	0,00±0,00
	KPS	-	-	0,60	0,00±0,00
	Salmonela	-	-	-	-

Iz tablice 18 je vidljivo da kod običnih nefermentiranih napitaka broj kvasaca i plijesni konstantno raste tijekom skladištenja. Tako je na početku prisutno 1,68-1,75  $\log \text{CFU g}^{-1}$ , a na kraju 2,64-3,23  $\log \text{CFU g}^{-1}$ . Ako se usporede napitak čuvan vani i u hladnjaku, primijećen je malo veći broj kvasaca i plijesni u napitku koji je čuvan na sobnoj temperaturi, pa se može zaključiti da temperatura ima utjecaj na mikrobiološku stabilnost proizvoda te da ga je stoga bolje čuvati u hladnjaku što je i u skladu s očekivanim. Međutim, u napitku koji je čuvan u

hladnjaku zabilježena je prisutnost enterobakterija 21. dana skladištenja, dok ih u napitku čuvanog na sobnoj temperaturi nije bilo. Bakterije roda *Salmonella* sp. te koagulaza pozitivnih stafilocoka nije bilo ni u jednom nefermentiranom uzorku što je zadovoljavajuće.

Kod fermentiranih zobenih napitaka nije prisutan konstantan trend rasta kvasaca i plijesni svakog tjedna skladištenja kao što je to bio slučaj kod nefermentiranih. Na početku je taj broj također oko 1 log jedinice, točnije između 1,04 i 1,74 log CFU g<sup>-1</sup>. Tek je 14. dana skladištenja taj broj porastao do otprilike 2 log jedinice te se on zadržava i 21. dan skladištenja. Na kraju je kod pasteriziranog fermentiranog zobenog napitka taj broj dosegao do 3 log jedinice, dok je kod nepasteriziranog iznosio 1,60 log CFU g<sup>-1</sup>. Ono što je bilo nezadovoljavajuće jest da je u nepasteriziranom fermentiranom zobenom napitku već 1. dan skladištenja zabilježena prisutnost enterobakterija. To je bio i razlog proizvodnje novog tipa napitka, pasteriziranog. Međutim, u kasnijim danima skladištenja enterobakterija nije bilo pa se može zaključiti da je došlo do pogreške u provođenju analize. U ostalim uzorcima nije više bilo enterobakterija, međutim, 28. dana skladištenja je kod nepasteriziranog utvrđena prisutnost koagulaza pozitivnih stafilocoka u količini od 0,60 log CGU g<sup>-1</sup>. U ostalim ispitanim uzorcima nije bilo koagulaza pozitivnih stafilocoka kao ni bakterija roda *Salmonella* sp.

Ako se usporedi mikrobiološka stabilnost fermentiranih i nefermentiranih napitaka, vidljivo je da su fermentirani napitci stabilniji. To je u skladu s očekivanjem, budući da su kod njih dodane starter kulture koje svojom prisutnošću i metabolizmom inhibiraju rast neželjenih mikroorganizama. Rok trajanja nefermentiranih napitaka je do 21. dana budući da je broj kvasaca i plijesni narastao iznad 3 log CFU g<sup>-1</sup>, a utvrđena je i prisutnost enterobakterija. Također je u nefermentiranim zobenim napitcima, senzorskom analizom, čiji rezultati su prikazani u nastavku, utvrđeno kvarenje 21. dana skladištenja. Mikrobiološka stabilnost fermentiranih napitaka se odražava i u trendu rasta broja kvasaca i plijesni koji je nešto sporiji nego kod nefermentiranih napitaka. Jedini nedostatak fermentiranih napitaka naspram nefermentiranih je prisutnost koagulaza pozitivnih stafilocoka 28. dana skladištenja u nepasteriziranom napitku.

U istraživanju Aparicio-García i sur. (2021) također nisu utvrđene bakterije roda *Salmonella* sp. u fermentiranom zobenom napitku, dok je enterobakterija bilo manje od 1 log CFU mL<sup>-1</sup> tijekom 20 dana skladištenja. Napitak je bio zadovoljavajuće mikrobne stabilnosti što se pripisuje rastu bakterija mliječne kiseline tijekom fermentacije (u tom istraživanju *L.plantarum*)

koje zakiseljavaju proizvod tijekom skladištenja kao i hladnom skladištenju. Coda i sur. (2012) su utvrdili pad broja bakterija mliječne kiseline u fermentiranim biljnim napitcima tijekom skladištenja u trajanju od 30 dana s otprilike  $9,00 \log \text{CFU g}^{-1}$  na  $8,30\text{-}8,90 \log \text{CFU g}^{-1}$ . Taj pad bio je naglašen nakon 15. dana skladištenja. Može se pretpostaviti da se slično dogodilo i u napitcima u ovom radu budući da rezultati smanjenja količine šećera upućuju na nedostatak hranjivih tvari. Smanjenjem broja bakterije mliječne kiseline je došlo do manje zaštite proizvoda čime su se počeli razmnožavati kvasci i plijesni. U skladu s tim, u istraživanju Coda i sur. (2012) je također utvrđeno da je tijekom skladištenja fermentiranog i nefermentiranog biljnog napitka rastao broj kvasaca i plijesni te je u konačnici skladištenja njihov broj iznosio oko  $3,00 \log \text{CFU g}^{-1}$ , dok enterobakterija nije bilo. Takvi rezultati su u skladu s rezultatima mikrobioloških ispitivanja u ovom radu. Gupta i Bajaj (2017) su u svom fermentiranom napitku na bazi zobnog brašna također već prvi tjedan skladištenja utvrdili prisutnost kvasaca, a nakon 4. tjedna više ih je bilo u napitku čuvanog na sobnoj temperaturi. Oni također nisu utvrdili prisutnost enterobakterija što pripisuju kiselim uvjetima koji su nepovoljni za njih što je konzistentno rezultatima u ovom radu budući da su se enterobakterije javile jedino u nefermentiranom zobnom napitku. U radu Paul i sur. (2019) se navodi kako je rok trajanja kikirikijevog i kokosovog napitka 30 dana na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nakon 35 dana je, bez provedene mikrobiološke analize, vidljiva pojava plijesni na fermentiranom zobnom napitku kao što je prikazano na slici 17.

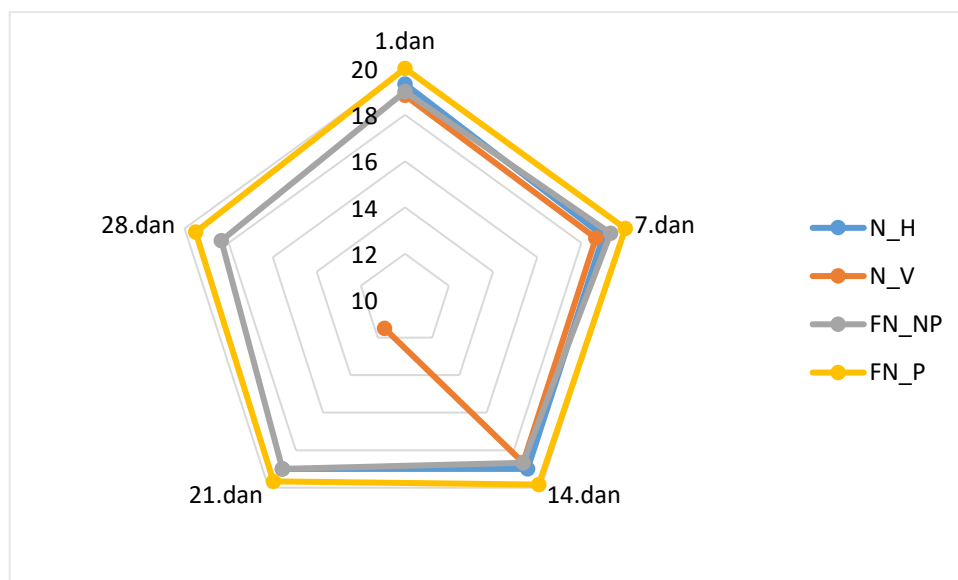


Slika 17. Kontaminacija fermentiranog zobnog napitka plijesnima nakon 35 dana skladištenja (vlastita fotografija)

#### 4.3.7. Senzorska svojstva

Senzorska (organoleptička) analiza je znanstvena disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica, a određuju se uz pomoć osjetila mirisa, okusa, njuha, dodira i sluha. Prednosti senzorske analize su brzina i mogućnost rane detekcije mane proizvoda, točnost u procjeni kvalitete proizvoda, jednostavnost, niski troškovi i mnogostruka primjena, dok se nedostaci ove metode odnose uglavnom na probleme pri interpretaciji rezultata i odabiru što objektivnijih metoda. Senzorska svojstva namirnice uključuju tri osnovne karakteristike: izgled, okus i miris te teksturu, a čovjek posjeduje oko 30 različitih svojstava osjeta koji se detektiraju putem osjetila za vid, njuh, okus, dodir i sluh. Senzorska analiza je jedina metoda kojom se može predvidjeti prihvatljivost proizvoda od strane potrošača. U senzorskoj analizi je potrebno poštivati određena pravila koja se uvijek koriste, a koja podrazumijevaju odabir panelista, pripremu okoline za testiranje, uspostavljanje eksperimenta, pripremu uzorka i posluživanje uzoraka (Tratnik i Božanić, 2012).

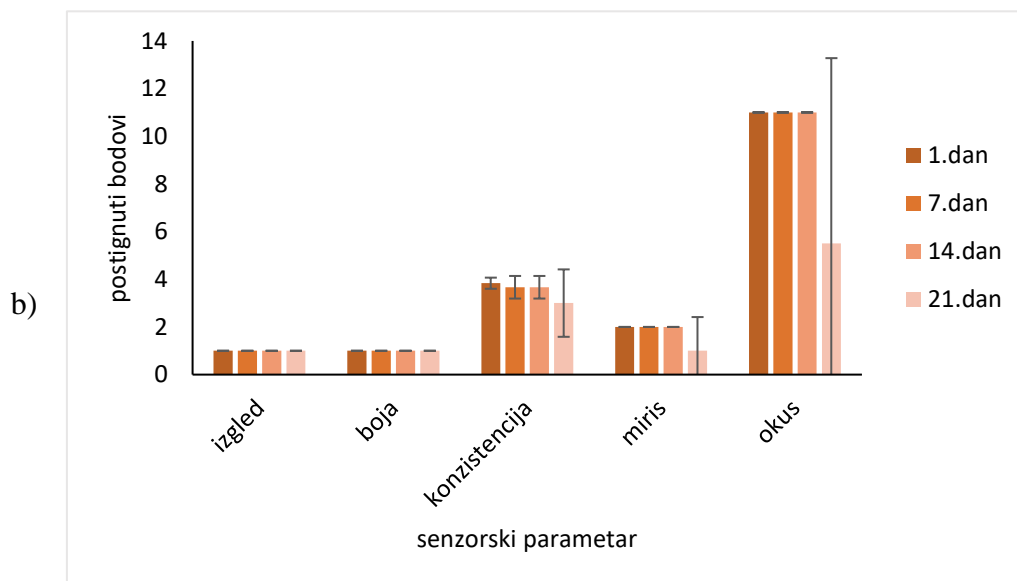
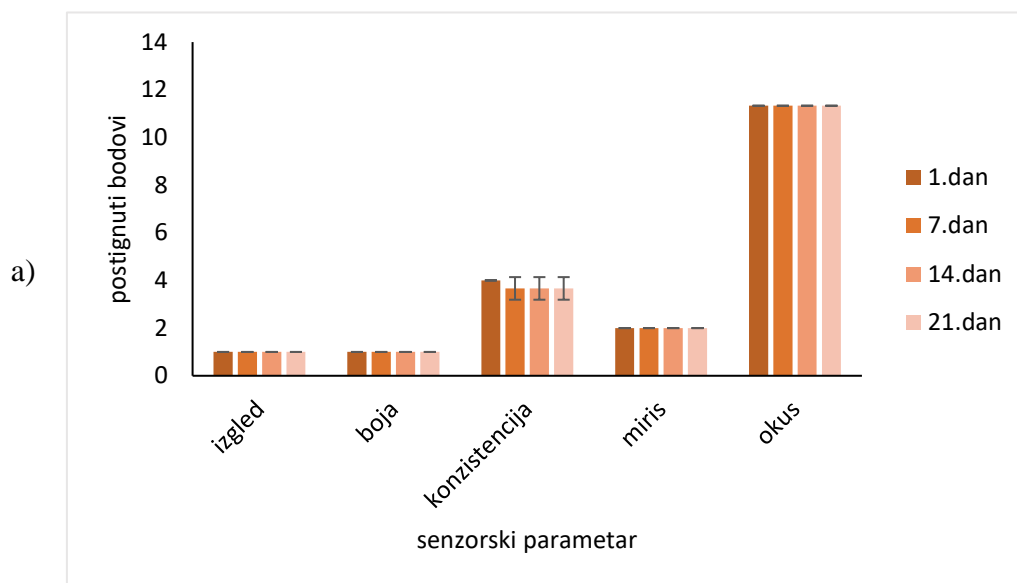
Senzorska analiza je na svim uzorcima provedena svakih 7 dana tijekom 21 dana čuvanja za nefermentirane te tijekom 28 dana za fermentirane napitke. Ukupni bodovi postignuti senzorskom ocjenom prikazani su na slici 18, a bodovi po pojedinim senzorskim parametrima su prikazani na slici 19.

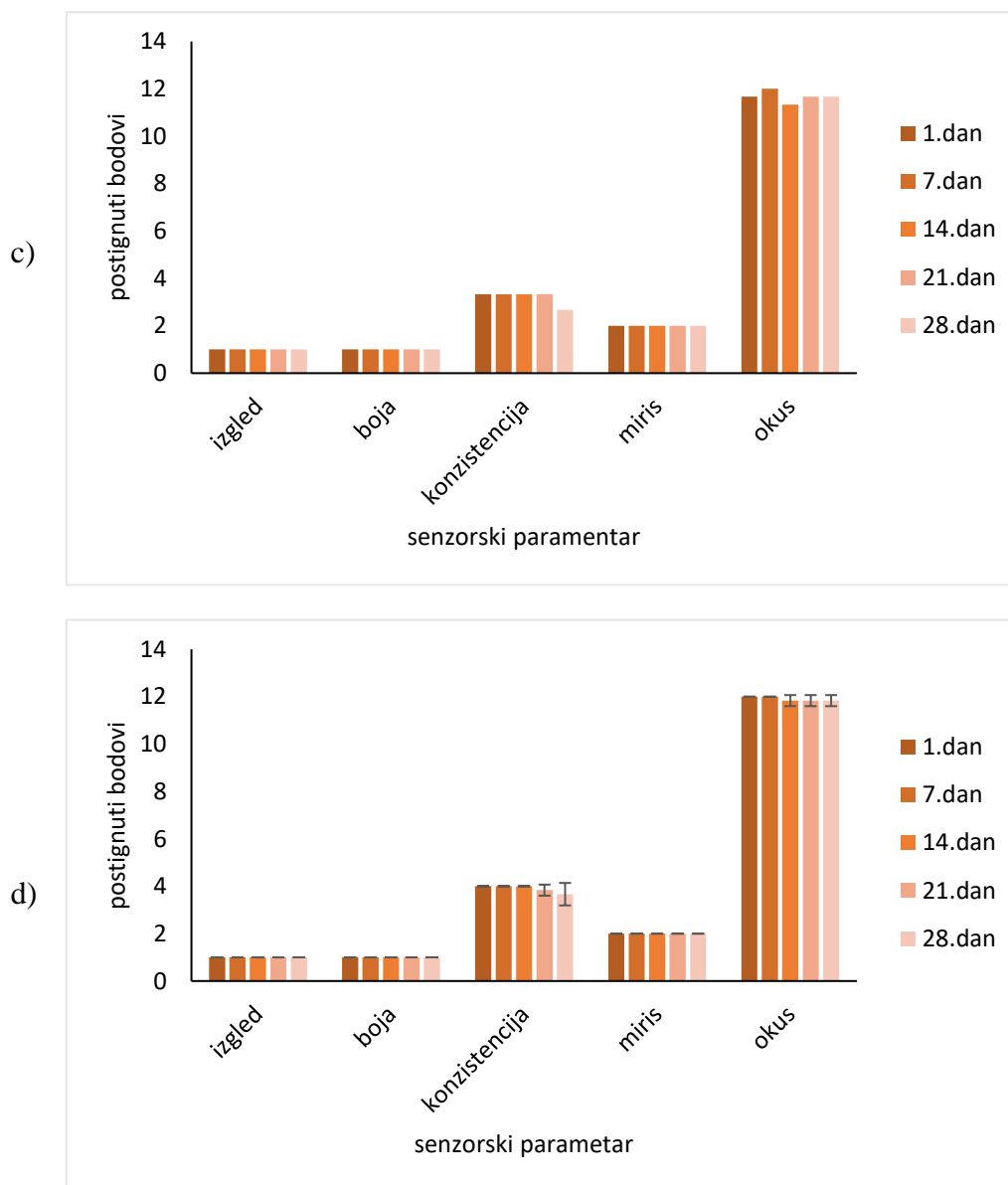


Slika 18. Ukupni bodovi postignuti senzorskom ocjenom nefermentiranog zobenog napitka čuvanog u hladnjaku (N\_H), nefermentiranog zobenog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V), fermentiranog nepasteriziranog zobenog napitka (FN\_NP) te fermentiranog pasteriziranog zobenog napitka (FN\_P) tijekom 28 dana skladištenja (n=2)



Iz slike 18 je vidljivo da najveći ukupni broj bodova ima fermentirani pasterizirani napitak. Ovaj napitak je maksimalni broj bodova zadržao do 14. dana skladištenja kada mu je ocjena smanjena na samo 19,84. U konačnici, 28. dana mu je ocjena pala samo za 0,50 tako da je posljednji broj bodova iznosio 19,50. Suprotno tome, najniže ukupne ocjene dobio je nefermentirani napitak čuvan na sobnoj temperaturi. Najniži bodovi za ovaj napitak zabilježeni su već 1. dan skladištenja (18,84), dok je posljednjeg dana ocjenjen sa samo 11,50 bodova od maksimalnih 20,00. Nefermentirani napitak čuvan u hladnjaku te fermentirani nepasterizirani napitak dobili su gotovo podjednake bodove tijekom svih dana skladištenja. Njihova ukupna ocjena pala je s 19,00-19,33 na 19,00 bodova.





Slika 19. Promjena senzorskih parametara tijekom perioda čuvanja od 28 dana u proizvedenom zobnom napitku čuvanog u hladnjaku (N\_H) (a), proizvedenom zobnom napitku čuvanog na sobnoj temperaturi (N\_V) (b), fermentiranom nepasteriziranom zobnom napitku (FN\_NP) (c) te fermentiranom pasteriziranom zobnom napitku (FN\_P) (d)

### *Izgled i boja*

Iz slike 19 je vidljivo da su izgled i boja bili maksimalno ocijenjeni svih 28 dana skladištenja za sve ispitane uzorke. Boja nefermentiranih napitaka bila je prljavo bijela do žućkasta, dok je boja fermentiranih napitaka potekla uglavnom od rogača u prahu te je napitak bio tamnosmeđi.

### *Konzistencija*

Konzistencija kakva je poželjna za ove proizvode jest homogena, glatka, bez grudica i izdvajanja faza. Glavni problem radi kojih su se snizile ocjene konzistencije bio je razdvajanje faza koje je prikazano na slici 20. Kod nefermentiranog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi te kod nepasteriziranog fermentiranog napitka je već prvi dan pala ocjena konzistencije, točnije, bilo je vidljivo razdvajanje faza i izdvajanje vode na površini. Kod nefermentiranih napitaka su se na površini izdvojili proteini u obliku bijelih nakupina. Ocjene konzistencije su padale s trajanjem skladištenja, međutim, za pasterizirani fermentirani zobeni napitak, tek je 21. dana zabilježena niža ocjena, što znači da je ovaj napitak najstabilniji glede konzistencije. Već je prilikom proizvodnje tog napitka tijekom same pasterizacije primijećeno ugušćivanje i promjena konzistencije. Na kraju su se ocjene konzistencije kretale između 3,00 i 3,67 za nefermentirane napitke, odnosno između 2,67 i 3,67 od maksimalnih 4,00 za fermentirane napitke. Osim razdvajanja faza, problem je bio smanjenje gustoće što je u skladu s manjim vrijednostima viskoznosti tijekom perioda skladištenja u ispitivanju reoloških karakteristika. Na kraju su uzorci bili sve vodenastiji i sve manje nalik jogurtu po konzistenciji. U fermentiranim zobenim napitcima koji su sadržavali dodani rogač u prahu te brašno od sjemenki rogača su u posljednja 2 tjedna primijećene grudice što je također narušilo ocjenu za konzistenciju. Najbolje ocjenjena konzistencija kod pasteriziranog fermentiranog napitka može se povezati s najvećom viskoznošću koja je dobivena ispitivanjem reoloških karakteristika (slika 15). U istraživanju Mårtenson i sur. (2001) je utvrđen manji stupanj sinereze kod zobenih napitaka koji sadrže dodan stabilizator (ksantan gumu). Kao što je već poznato, u ovom radu tu ulogu ima brašno sjemenki rogača te je vidljivo da ono pozitivno utječe kako na viskoznost, tako i na konzistenciju fermentiranog zobenog napitka.



Slika 20. Razdvajanje faza u fermentiranom zobenom napitku (vlastita fotografija)

### *Miris*

Miris je, nakon izgleda i boje, senzorski parametar s najstabilnijim ocjenama tijekom 28 dana skladištenja. Svi uzorci postizali su maksimalni broj bodova (2,00) osim nefermentiranog zobenog napitka čuvanog na sobnoj temperaturi. Naime, 21. dana skladištenja je utvrđen miris pokvarenih jaja koji je upućivao na pokvareni proizvod. Nakon toga, odlučeno je da se nefermentirani napitci više neće ispitivati jer je njihov rok trajanja završio. Prethodne dane čuvanja, nefermentirani uzorci imali su blagi i ugodan miris po žitaricama, dok su fermentirani imali blagi kiselkasto-slatki i ugodan miris.

### *Okus*

Maksimalnu ocjenu za okus je prvog dana dobio samo FN\_P, dok je kod ostalih ta ocjena bila samo malo niža od maksimalnog broja bodova (12,00). Smanjenje broja bodova okusa za FN\_P je zabilježen tek 14. dan na 11,84 te je taj broj bodova zadržan do 28. dana što ga čini okusom najboljim. 1. dana skladištenja je najslabije okusom ocijenjen N\_V. Iako su nefermentirani napitci proizvedeni istim postupkom i istom recepturom, vidljivo je da temperatura konzumacije utječe na okus te je poželjnije da je napitak hladniji. FN\_NP imao je niži broj bodova od FN\_P (11,67), ali viši od nefermentiranih napitaka. Daljnjim skladištenjem su bodovi za okus blago padali. Kod fermentiranih napitaka problem je bio gubitak kiselosti i punoće okusa, dok je kod nefermentiranih okus postao bljutav, s manje naglašenim okusom na zob. Međutim, broj bodova za okus je pao samo na 11,33-11,84 što nije značajno manje od maksimalnog broja bodova. Jedini izuzetak tome bio je utvrđen za N\_V. Naime, nagli pad ocjene okusa za taj napitak je zabilježen 21. dana iz razloga što je miris upućivao na to da je proizvod pokvaren, pa se okus nije ni ocjenjivao.

Fermentirani zobeni napitak kojeg su proizveli Wang i sur. (2017) je također bio senzorski dobro ocijenjen tijekom 21 dana skladištenja. Okus je s početne ocjene 9 pao na samo 7 te je bio još prihvatljiv nakon 21. dana. Aparicio-García i sur. (2021) su također dobili pozitivne ocjene za fermentirani zobeni napitak koji je bio dobro prihvaćen zbog kiselog okusa i arome vezane uz zob. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da bi 73 % panelista konzumiralo više biljne hrane ako imaju dokazane pozitivne zdravstvene učinke (Mäkinen i sur., 2015), a 84 % njih se usudi jesti proizvode koje nikada prije nisu jeli (Grasso i sur., 2020). Mäkinen i sur. (2015) su usporedili ocjene senzorske analize kravljeg mlijeka i ostalih biljnih napitaka. Kravlje mlijeko imalo je najbolje ocjene za sve ocjenjivane parametre (izgled, miris, osjećaj u ustima i okus) što upućuje na to da biljni napitci bez dodataka,

senzorskom kvalitetom nisu adekvatna zamjena životinjskom mlijeku. Najsličnije ocjene zobenom napitku su u tom radu dodijeljene za sojin i rižin napitak, međutim, zobeni je među njima imao najmanje ocjene za izgled. Niske ocjene izgleda pripisuju se žućkastoj boji zobenog napitka što je bilo primijećeno i u napitcima u ovom radu.

Sveukupno gledano, senzorski su bolje ocjenjeni fermentirani napitci što je u skladu s očekivanim budući da su dodaci dodani kako za olakšavanje fermentacije tako i radi poboljšanja senzorske kvalitete, a ocjene upućuju na to da je cilj postignut. Luana i sur. (2014) su također senzorski kvalitetnijim smatrali fermentirani zobeni napitak od nefermentiranog.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Optimalna receptura za proizvodnju običnog zobenog napitka podrazumijeva omjer zob:voda 4:100, 2 ciklusa toplinske obrade i usitnjavanja uz prosijavanje kroz obično sito nakon prvog ciklusa te kroz svileno sito nakon drugog. Time se dobiva zobeni napitak zadovoljavajućeg izgleda, boje, konzistencije, mirisa i okusa.
2. Jogurtna kultura nije se pokazala pogodnom za fermentaciju dobivenog zobenog napitka, budući da nije bilo moguće postići željeni pH kao ni odgovarajuća senzorska svojstva krajnjeg proizvoda.
3. Od korištenih VEGE starter kultura (VEGE 033 LYO, VEGE 053 LYO i VEGE 081 LYO), VEGE 053 LYO najbrže fermentira napitak, ali ne rezultira proizvodom željene konzistencije i okusa. Dodatak 1 % rogača u prahu, 2 % brašna od sjemenki rogača, 3 % saharoze i 0,1 % vanilina poboljšava senzorska svojstva zobenog napitka te značajno ubrzava fermentaciju pomoću VEGE 053 LYO kulture koja traje tri do četiri puta kraće (5-6,5 h) naspram fermentacije zobenog napitka bez dodataka (22 h).
4. Tijekom 28 dana skladištenja nefermentiranog zobenog napitka dolazi do blage promjene pH vrijednosti (6,90-8,26), neovisno o temperaturi skladištenja. Fermentirani zobeni napitci po završetku fermentacije imaju pH vrijednost oko 4,6 koja se prvi dan skladištenja blago spušta do 4,30-4,50 te tijekom 28 dana hladnog skladištenja ostaje stabilna.
5. Zobene napitke karakterizira nizak udio suhe tvari i pepela koji ovise o početnom omjeru zob:voda, postupku proizvodnje i dodanim sastojcima. Udio suhe tvari u nefermentiranom zobenom kreće se između 2,53 i 2,70 %, dok je u fermentiranim zobenim napitcima viši uslijed dodanih sastojaka te se kreće između 6,04 i 8,20 %. Tijekom skladištenja dolazi do blagog pada u udjelu suhe tvari sukladno padu viskoznosti i udjelu šećera. Udio pepela se kreće između 0,04 i 0,08 % za nefermentirane, odnosno između 0,11 i 0,12 % za fermentirane zobene napitke.
6. Nefermentirani i fermentirani zobeni napitak spadaju u ne-Newtonske tekućine budući da im se viskoznost mijenja s promjenom brzine smicanja. Za većinu je uzoraka tijekom 28 dana skladištenja izmjeren pad viskoznosti s povećanjem brzine smicanja što je

karakteristično za pseudoplastične sustave. Fermentacijom i dodavanjem sastojaka dolazi do promjena reoloških svojstava i povećanja viskoznosti. Fermentirani pasterizirani zobeni napitak je imao najveću viskoznost (5,21 Pas pri  $10 \text{ s}^{-1}$ ) te je i jedini uzorak kojem se viskoznost ne smanjuje tijekom razdoblja skladištenja. Puno manju viskoznost imaju nefermentirani napitci (0,02-0,04 Pas pri  $100 \text{ s}^{-1}$ ) koja krajem skladištenja pada na 0,01-0,02 Pas pri  $270 \text{ s}^{-1}$ .

7. Zobene napitke karakterizira nizak udio soli koji se kreće oko 1 % i ne mijenja se tijekom 28 dana, bez obzira na temperaturni režim skladištenja.
8. Tijekom razdoblja skladištenja u trajanju od 28 dana u nefermentiranom i fermentiranom zobenom napitku dolazi do smanjenja udjela maltoze i glukoze uslijed aktivnosti mikroorganizama. Nefermentirane napitke karakterizira viši udio šećera koji se kreće između 5,55 i 6,10 % 1. dana skladištenja, a na kraju skladištenja pada do 1,37-1,60 %.
9. Nefermentirani i fermentirani zobeni napitci sadrže kvasce i plijesni ( $1 \log \text{ CFU g}^{-1}$ ) u prihvatljivim razmjerima. Tijekom skladištenja u nefermentiranom i fermentiranom zobenom napitku dolazi do povećanja tog broja s tim da fermentirani zobeni napitci pokazuju veću mikrobiološku stabilnost uslijed prisutnih starter kultura koje djeluju inhibicijski. Osim kvasaca i plijesni, u nefermentiranim zobenim napitcima je zabilježena prisutnost enterobakterija, a u fermentiranom nepasteriziranom je utvrđena prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka.
10. Sukladno mikrobiološkim i senzorskim analizama, procijenjeni rok trajanja nefermentiranih napitaka je 21 dan, dok je u fermentiranim nakon 35 dana došlo do pojave okom vidljivih nakupina plijesni.
11. Nefermentirani i fermentirani zobeni napitci su senzorski prihvatljivi od strane ocjenjivača. Najniži broj bodova (16,92) postigao je nefermentirani zobeni napitak skladišten na sobnoj temperaturi, ponajviše uslijed pojave neugodnog mirisa 21. dan skladištenja. Najvišim brojem bodova (19,80) ocijenjen je fermentirani pasterizirani zobeni napitak uz dodatak 1 % rogača u prahu, 2 % brašna od sjemenki rogača, 3 % saharoze i 0,1 % vanilina. Napitci su mirisom, bojom i izgledom adekvatni, a najveći nedostatak jest razdvajanje faza tijekom skladištenja uz gubitak kiselosti i punoće okusa u fermentiranim zobenim napitcima.

## 6. LITERATURA

AACC (2001) The definition of dietary fibre. Report of the dietary fibre definition committee to the board of directors of the American association of cereal Chemists. *Cereal Foods World* **46**, 112-129.

Achouri, A., Boye, J.I., Zamani, Y. (2007) Changes in Soymilk Quality as a Function of Composition and Storage, *J. Food Quality*, **30**, 731-744.

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Penas, E. (2021) Production and Characterization of a Novel Gluten-Free Fermented Beverage Based on Sprouted Oat Flour. *Foods*, **10**, 139.

Asadzadeh, A., Jalali, H., Azizi, M.H., Mohammadi Nafchi, A. (2020) Production of oat bran functional probiotic beverage using *Bifidobacterium lactis*. *J Food Meas Charact*, **15**, 1301-1309.

Aydar, E.F., Tutuncu, S., Ozelik, B. (2020) Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies and health effects. *J. Funct. Food*. **70**, 1-15.

Bernat, N., Cháfer, M., González-Martínez, C., Rodríguez-García, J., Chiralt, A. (2015) Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Sci. Technol. Int.* **21(2)**, 145-157.

Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M.K.I., Shabir, R., Butt, M.S. (2008) Oat: unique among the cereals. *Eur. J. Nutr.* **47**, 68-79.

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

Chalupa-Krebzdak, S., Long, C.J., Bohrer, B.M. (2018) Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives, *Int. Dairy J.* **87**, 84-92.



Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. (2002) Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *J. Appl. Microbiol.* **92**(5), 851-859.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C. (2002) Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int. J. Food Microbio.* **79**, 131-141.

Chen, L., Wu, D., Schlundt, J., Conway, P.L. (2020) Development of a Dairy-Free Fermented Oat-Based Beverage With Enhanced Probiotic and Bioactive Properties, *Front Microbiol.* **11**, 3140.

Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2012) Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties, *Int. J. Food Microbiol.* **155** (3), 120-127.

Coda, R., Montemurro, M., Rizzello, C.G. (2017) Yogurt-like beverages made with cereals. U: *Yogurt in Health and Disease Prevention*, (Shah, N.P., ured.), Academic Press, London/San Diego, str. 183-201.

Dan, T., Ren, W.Y., Liu Y., Tian, J.L., Chen, H.Y., Li, T., Liu, W.J. (2019) Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front Microbiol*, **10**, 2183.

Delcour, J.A., Hosney, R.C. (2010) Principles of cereal science and technology, AACC International, St.Paul.

Demir, H., Simsek, M., Yildirm, G. (2020) Effect of oat milk pasteurization type on the characteristics of oat milk yogurts. *LWT – Food Sci Technol*, **135**, 110271.

Deswal, A., Deora, N.S., Mishra, H.N. (2013) Optimization of Enzymatic Production Process of Oat Milk Using Response Surface Methodology. *Food Bioprocess Technol.* **7**, 610-618.

Deswal, A., Deora, N.S., Mishra, H.N. (2014) Effect of Concentration and Temperature on the Rheological Properties of Oat Mlik, *Food Bioprocess Tech.* **7**(8), 2451-245

Craig, W.J., Fresán U. (2021) International Analysis of the Nutritional Content and a Review of Health Benefits of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Nutrients*, **13**, 842.

Custódio, L., Fernandes, E., Escapa, A.L., Fajardo, A., Aligue, R., Alberício, F., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Romano, A. (2011) Antioxidant and Cytotoxic Activities of Carob Tree Fruit Pulps Are Strongly Influenced by Gender and Cultivar. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7005-7012.

Dubey, M.R., Patel, V.P. (2018) Probiotics: A promising Tool for Calcium Absorbtion. *The Open Nutrition Journal* [online], **12**, 59-69, <<https://opennutritionjournal.com/index.php>.> Pristupljeno 7.lipnja 2021.

Fuller, S., Beck, E., Salman H., Tapsell, L. (2016) New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **71(1)**, 1-12.

Gallo, M., Passannanti, F., Cante, R.C., Nigro, F., Salameg, D., Schiattarella, P., Schioppa, C., Budelli, A., Nigro, R. (2020) Effects of the Glucose Addition during Lactic Fermentation of Rice, Oat and Wheat Flours, *Applied Food Biotechnology*, **7(1)**, 21-30.

Grasso, N., Alonso-Miravalles, L., O'Mahony, J.A. (2020) Composition, Physicochemical and Sensorial Properties of Commercial Plant-Based Yogurts. *Foods*, **9**, 252.

Gupta, M., Bajaj, B.K. (2017) Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle, *Food Bioscience*, **20**, 104-109.

Hardi, J., Slačanac, V. (2000) Ispitivanje kinetike koagulacije i reoloških svojstava fermentiranih mliječnih napitaka: utjecaj starter kulture, udjela mliječne masti i dodatka inulina. *Mljekarstvo* **50(3)**, 217-226.

Honig, P. (2013) *Principles of sugar technology*, Elsevier, New York, str. 75-110.

Hoover, R., Vasanthan, T. (1992) Studies on isolation and characterization of starch from oat (*Avena nuda*) grains. *Carbohydr. Polym.* **19(4)**, 285-297.

Horackova, S., Vesela, K., Klojdova, I., Bercikova, M., Plockova, M. (2020) Bile salt hydrolase activity, growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *Eur Food Res Technol*, **246**, 1627-1636.

Hugenholtz, J. (1999) Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr Opin Biotech*, **10(5)**, 492-497.

Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T., Singh, R. (2010) *Streptococcus termophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, **20(3)**, 133-141.

Johansson, M.L., Nobaek, S., Berggren, A., Nyam, M., Bjorck, I., Ahrne, S., Jeppsson, A., Molin, G. (1998) Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int J Food Microbiol*, **42**, 29-38.

Klensporf, D., Jeleń, H. (2008) Effect of heat treatment on the flavor of oat flakes, *J. Cereal Sci.* **48**, 656-661.

Klose, C., Arendt, E.K. (2012) Protein in Oats: their Synthesis and Changes during Germination: A Review. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* **52(7)**, 629-639.

Korkmaz, D. (2001) Precipitation titration: „determination of chloride by the Mohr method“. *Methods*, **2(4)**, 1-6.

Leroy F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Tech.* **15(2)**, 67-78.

Li, D., Hu, X. (2011) Fatty acid content of commonly available nuts and seeds. U: Nuts and seeds in health and disease prevention, (Preedy, V.R., Watson, R.R., Patel, V.B., ured), Academic Press, str. 35-42.

Liu, J.R., Lin, C.W. (2000) Production of Kefir from Soymilk With or Without Added Glucose, Lactose, or Sucrose. *J. Food Sci.* **65(4)**, 716-719.

Lovrić, T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji*, Hinus, Zagreb, str. 35-37.

Luana, N., Rossana, C., Curiel, J.A., Kaisa, P., Marco, G., Rizzelo, C.G. (2014) Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **185**, 17-26.

M'hir, S., Filannino, P., Mejri, A., Tlais, AZA, Di Cagno, R., Ayed, L. (2021) Functional Exploitation of Carob, Oat Flour, and Whey Permeate as Substrates for a Novel Kefir-Like Fermented Beverage: An Optimized Formulation, *Foods*, **10**(2), 294.

Manasa, R., Harshita, M., Prakruthi, M., Shekahara Naik, R., Mhesh, S. (2020) Non-dairy plant based beverages: A comprehensice review. *The Pharma Innovation Journal* [online], **9**(10), 258-271, <<https://www.thepharmajournal.com/>>. Pristupljeno 9.lipnja 2021.

Mandić, M., Perl, A. (2006) *Osnove senzorske procjene hrane*. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska.

Marklinder, I., Lonner, C. (1992) Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food Microbiol*, **9**, 197-205.

Marković, K., Vahčić, N., Hruškar, M. (2017) *Interna skripta iz Analitike prehrambenih proizvoda*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Masiá, C., Jensen, P.E., Buldo, P. (2020) Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on Physicochemical Properties of Fermented Plant-Based Raw Materials. *Foods*, **9**, 1182.

Mårtensson, O., Andersson, C., Andersson, K., Öste, R., Holst., O. (2001) Formulation o fan oat-based fermented product and its comparison with yoghurt. *J Sci Food Agric*, **81**, 1314-1321.

Mäkinen, O.E., Uniacke-Lowe, T., O'mahony, J.A., Arendt, E.K. (2015) Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chem.* **68**, 630-638.

Munekata, P.E.S., Domínguez, R., Budaraju, S., Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Mallikarjunan, K., Roohinejad, S., Lorenzo, J.M. (2020) Effect of Innovative Food Processing Technologies on the Physicochemical and Nutritional Properties and Quality of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Foods*, **9(3)**, 288.

Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., Chhikara, N. (2018) Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*, **21**, 80-89.

Papaefstathiou E., Agapiou, A., Giannopoulos, S., Kokkinofa, R. (2018) Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Sci. Nutr.* [online] 1-11, <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/20487177>>. Pristupljeno 9.lipnja 2021.

Paul, A.A., Kumar, S., Kumar, V., Sharma, R. (2019) Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* 1-19.

Pham, P.L., Dupont, L., Roy, D., Lapointe, G., Cerning, J. (2000) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiob.* **66**, 2302-2310.

Pescuma, M., Hébert, E.M., Font de Valdet, G., Mozzi, F. (2014) Functional Fermented Whey Foods: Their Role in Human Health. U: *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, (Ravishankar, R.V., Jamuna, A.B., ured.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, str. 95-111.

Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., Unnikrishnan, V.S. (2013) Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods – a review. *J.Food Sci. Technol.* **52(2)**, 662-675.

Ruiz-Roso, B., Quintela, J.C., de la Fuente, E., Haya, J., Pérez-Olleros, L. (2010) Insoluble Carob Fiber Rich in Polyphenols Lowers Total and LDL Cholesterol in Hypercholesterolemic Subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* **65**, 50-65.

Russo, P., de Chiara, M.L.V., Capozzi, V., Arena, M.P., Amodio, M.L., Rascón, A., Duenas, M.T., López, P., Spano, G. (2016) *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. *LWT – Food Sci. Technol.* **68**, 288-294.

Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (2004) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3.izd., CRC Press, str. 1-5.

Sanders, M.E. (2006) Summary of Probiotic Activities of *Bifidobacterium lactis* HN019. *J Clin Gastroenterol*, **40(9)**, 776-783.

Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K. (2016) Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J. Food Sci. Technol.* **53(9)**, 3408-3423.

Sidhu, J.S., Singh, R.K. (2016) Ultra High Pressure Homogenization of Soy Milk: Effect on Quality Attributes during Storage, *Beverages*, **2(2)**, 15.

Silva, A.R.A., Silva, M.M.N., Ribeiro, R.D. (2020) Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Res. Int.* **131**, 108972.

Singh, R., De, S., Belkheir, A. (2013) *Avena sativa* (Oat), A Potential Nutraceutical and Therapeutic Agent: An Overview. *Crit. Rev. Food Sci.* **53(2)**, 126-144.

Shreeves, R. (2018) Why Isn't Carob More Popular? *Treehugger* [online] <<https://www.treehugger.com/>>. Pristupljeno 11.lipnja 2021.

Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C.J., Wittmann, C. (2019) Fermentation on plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Appl. Microbiol. Biot.* **103**, 9263-9275.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) *Mlijeko i mliječni proizvodi*, HMU, Zagreb.

Tsatsaragkou, K., Gounaropoulos, G. (2014) Development of gluten free bread containing carob flour and resistant starch. *LWT-Food Sci.Technol.* **58**, 124–129.

Van den Broeck, H.C., Londono, D.M., Timmer, R., Smulders, M.J.M., Gilissen, L.J.W.J., Van der Meer, I.M. (2015) Profiling of Nutritional and Health-Related Compounds in Oat Varieties. *Foods*. **5(4)**, 1-11.

Vanga, S.K., Raghavan, V. (2018) How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk?, *J. Food Sci. Tech.* **55**, 10-20.

Wang, C., Liang, S., Wang, H., Guo, M. (2017) Physiochemical properties and probiotic survivability of symbiotic oat-based beverage, *Food Sci. Biotechnol.* **27(3)**, 735-743.

Yatmaz, E., Turhan, I. (2018) Carob as a Carbon Source for Fermentation Technology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **16**, 200-208.

Young, V.L. (1986) Oat lipids and lipid-related enzymes. U: Oats: Chemistry and Technology, (Webster, F.H., ured.), American Assosiation of Cereal Chemists, St.Paul, str. 205-226.

Youssef, M. K. E., El-Manfaloty, M. M., Ali, H. M. (2013) Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.), *Food and Public Health*, **3**, 304–308.

Zhang, H., Önning, G., Triantafyllou, A.Ö., Öste, R. (2007) Nutritional properties of oat-based beverages as affected by processing and storage. *J. Sci. Food Agric.* **87**, 2294-2301.

Zwer, P.K. (2004) Oats. U: Encyclopedia of Grain Science, (Wrigley, C., Corke, H., Walker, C.E., ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Novak

Ime i prezime studenta