

Optimiranje proizvodnje i fermentacije zobenog napitka

Šifner, Marija

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:159:469103>

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.

Marija Šifner

1370/PI

**OPTIMIRANJE PROIZVODNJE I
FERMENTACIJE 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. Katarine Lisak Jakopović, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Katarini Lisak Jakopović na pruženoj prilici, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala na susretljivosti i uvijek ugodnoj atmosferi u prostorima laboratorija. Hvala doc.dr.sc. Ireni Barukčić na dodatnim savjetima i pomoći. Hvala dr.sc. Editi Juraga (Atera d.o.o.) za donaciju starter kultura nužnih za provođenje istraživanja.

Najviše hvala mojoj obitelji; roditeljima, sestri Eni i šogoru na neizmjerne podršci, strpljenju i motivaciji kada je bilo najteže. Hvala što ste mi sve omogućili.

Hvala mojim kolegicama i prijateljicama što su studentske dane učinile zanimljivijim i veselijim.

I posebno, hvala mom Eduardu na velikoj potpori i razumijevanju.

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

OPTIMIRANJE PROIZVODNJE I FERMENTACIJE ZOBENOG NAPITKA

Marija Šifner, 1370/PI

Sažetak: *Potražnja za biljnim napitcima i proizvodima na njihovoj bazi neprestano raste. Prvi su izbor zamjene mlijeka i mliječnih proizvoda pa stječu sve veću popularnost. Žitarice i orašasti plodovi najčešće su sirovine za proizvodnju ne-mliječnih alternativa. U prehrambenoj industriji, fermentacija biljnih napitaka još uvijek je izazov zbog nužnosti izbora mikrobne kulture koja će dovoljno brzo provesti fermentaciju te zbog dodatka funkcionalnih sastojaka kojima se postižu odlike svojstvene jogurtu i sličnim proizvodima. Cilj ovoga rada bio je optimirati proizvodnju i fermentaciju zobenog napitka uz dodatak prirodnih poboljšivača okusa i teksture. Svim uzorcima određena je aktivna kiselost, udio ugljikohidrata (maltoze), soli, suhe tvari i pepela te viskoznost, trajnost (praćenjem mikrobiološkog profila) te senzorska procjena. Upotreba mikrobne kulture namijenjene za fermentaciju biljnih napitaka rezultirala je fermentacijom u trajanju od 4 h. Trajnost zobenih napitaka je do 20 dana uz preporuku čuvanja na +4 °C. Najbolja kvaliteta i trajnost fermentiranog proizvoda postignuta je dodatkom 0,15 % soli, 1 % škroba i 1 % pektina uz provedeni postupak pasterizacije.*

Ključne riječi: *zob, biljni napitak, fermentacija, rok trajanja*

Rad sadrži: 60 stranica, 12 slika, 18 tablica, 41 literaturni navod, 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. Katarina Lisak Jakopović*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić*
2. Doc.dr.sc. *Katarina Lisak Jakopović*
3. Doc.dr.sc. *Marko Obranović*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 24. 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

OPTIMIZING THE PRODUCTION AND FERMENTATION OF OAT BASED BEVERAGE

Marija Šifner, 1370/PI

Abstract: *Demand for plant-based beverages and their derivated products is in constant growth. They are number one choice substituting milk and dairy products, and they are becoming more and more popular. Cereal grains and nuts are the most common base for such products. Their fermentation is still challenging, and the main reason is the necessity to choose adequate starter culture capable of quick fermentation, also certain additives are needed to produce qualities similar to yogurt and other related products. The aim of this thesis was to optimise production and fermentation of oat beverage, adding natural flavor and texture enhancers. In all samples, active acidity, content of carbohydrates (maltose) and salt, dry matter and ash content were determined, and also, viscosity, shelf life (by monitoring microbiological profile) and sensory evaluation. Use of the starter culture intended for fermentation of plant-based drinks, resulted with 4 hour fermentation. Oat beverages can last up to 20 days, while stored on the temperature of +4 °C. Best quality and sustainability was achieved by adding 0.15 % salt, 1 % starch and 1 % pectin with additional process of pasteurization.*

Keywords: *oat, plant-based beverage, fermentation, shelf life*

Thesis contains: 60 pages, 12 figures, 18 tables, 41 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. Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
2. PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor
3. PhD. *Marko Obranović*, Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 24 September 2021

| Sadržaj | stranica |
|--|-----------------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. ZOB | 2 |
| 2.1.1. Prerada zrna..... | 4 |
| 2.1.2. Nutritivna vrijednost..... | 5 |
| 2.2. ZOBENI NAPITAK | 7 |
| 2.3. FERMENTACIJA BILJNIH NAPITAKA | 10 |
| 2.4. UTJECAJ PROIZVODA BILJNOG PORIJEKLA NA ZDRAVLJE | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 14 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 14 |
| 3.2. PRELIMINARNI EKSPERIMENTI | 15 |
| 3.2.1. Fermentacija <i>Dennree</i> zobenog napitka | 15 |
| 3.2.2. Proizvodnja zobenog napitka iz zobenih pahuljica i njegova fermentacija | 15 |
| 3.2.3. Fermentacija zobenog napitka starter kulturom namijenjenom za zob..... | 17 |
| 3.3. PROIZVODNJA FERMENTIRANOG NAPITKA – NATUR ZOBENI DESERT | 19 |
| 3.4. ANALITIČKE METODE..... | 21 |
| 3.4.1. Određivanje pH vrijednosti | 21 |
| 3.4.2. Određivanje udjela ugljikohidrata | 21 |
| 3.4.3. Određivanje udjela soli..... | 23 |
| 3.4.4. Određivanje udjela suhe tvari | 25 |
| 3.4.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) | 25 |
| 3.4.6. Određivanje reoloških karakteristika | 26 |
| 3.4.7. Mikrobiološka analiza | 27 |
| 3.4.8. Senzorska analiza | 30 |
| 3.5. OBRADA REZULTATA | 32 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 33 |
| 4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA | 33 |
| 4.2. ODREĐIVANJE KISELOSTI | 38 |
| 4.3. ODREĐIVANJE UDJELA UGLJIKOHIDRATA | 40 |
| 4.4. ODREĐIVANJE UDJELA SOLI | 41 |
| 4.5. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI | 42 |
| 4.6. ODREĐIVANJE PEPELA (UDJELA MINERALNIH TVARI) | 43 |
| 4.7. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA | 44 |
| 4.8. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA | 47 |
| 4.9. SENZORSKA ANALIZA | 49 |
| 5. ZAKLJUČCI | 55 |
| 6. LITERATURA | 57 |

1. UVOD

Posljednjih nekoliko godina, zbog znatnog porasta broja onih koji su se okrenuli vegetarijanstvu, veganstvu i drugim srodnim načinima prehrane, sve je veća potražnja za proizvodima biljnog porijekla. Ono čemu se, posebno danas, teži je očuvanje sveukupnog zdravlja uravnoteženom i raznolikom prehranom bogatom hranjivim tvarima, makro- i mikronutrijentima, posebno važnim i potrebnim esencijalnim aminokiselinama i masnim kiselinama, prehrambenim vlaknima, vitaminima, mineralnim tvarima i fitokemikalijama. Shodno tome, sve su veći izazovi u prehrambenoj industriji za proizvodnjom tzv. *plant-based* proizvoda kojima bi se zadovoljili zahtjevi potrošača, a da su pritom osnovne sirovine – voće, povrće, žitarice, sjemenke ili orašasti plodovi. Takvi proizvodi često se nazivaju i funkcionalnim s obzirom da uz, visoku hranjivu vrijednost, imaju i pozitivan utjecaj na zdravlje. Najčešći tip proizvoda prema kojima se mogu formulirati veganske inačice su mliječni proizvodi čija je brojnost i raznolikost itekako vidljiva na svjetskom, ali i našem tržištu. Međutim, zbog osjetljivosti na pojedine komponente, kao što su alergije na mliječne proteine i intolerancija na mliječni šećer, ili samo zbog već istaknutih odabira prehrane, pribjegava se alternativama koje će potrošaču pružiti isto zadovoljstvo uz eliminiranje navedenih problema. To su biljni napitci i njihove fermentirane verzije, najčešće dobiveni iz žitarica i/ili orašastih plodova. U usporedbi s proizvodnjom biljnih napitaka, njihova fermentacija odabranim starter kulturama još uvijek predstavlja veliki pothvat s obzirom na otežano formiranje konzistencije svojstvene takvom tipu proizvoda. Dosadašnja istraživanja pokazala su niz mogućnosti i utjecaj različitih funkcionalnih dodataka kojima se postižu odgovarajuća fizikalno-kemijska svojstva, ali i željeni senzorski profil. Iako su na stranom tržištu zastupljeni dugi niz godina tijekom kojih su stekli znatnu popularnost, u Republici Hrvatskoj proizvodnja takvih proizvoda tek je u začetku.

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati proizvodnju i fermentaciju zobenog napitka, bez upotrebe sintetskih dodataka, s ciljem dobivanja proizvoda biljnog porijekla poželjnih fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava. Određivanjem kiselosti i utvrđivanjem udjela ugljikohidrata, soli, suhe tvari i mineralnih tvari te reoloških i mikrobioloških parametara praćena je stabilnost krajnjih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZOB

Zob, kao i sve druge vrste žitarica, svrstava se u porodicu pravih trava (lat. *Poaceae*) i rod *Avena* L. Poznato je oko 70 vrsta zobi diljem svijeta, a najčešće uzgajane su *Avena sativa* L., *Avena nuda* L. i *Avena byzantina* L. (Angelov i sur., 2018). Primarna kultivirana vrsta je *Avena sativa* ili obična zob, za koju se smatra da potječe od svojih predaka *A. sterilis* i *A. fauta*, divlje zobi koja se širila kao korov pšenice i ječma na području od Plodnog polumjeseca (regija od Izraela do zapadnog Irana) pa sve do Europe. Pripitomljena je prije otprilike 3 000 godina u vlažnijim i hladnijim uvjetima, na rubnim dijelovima Europe. Samostalno je postala vrlo važna žitarica tog područja (POWO, 2019).

U ukupnoj proizvodnji na svjetskoj razini, zauzima šesto mjesto i to iza kukuruza, riže, pšenice, ječma i sirka. Primarno raste u umjereno hladnoj klimi pa tako oko 67 % svjetske proizvodnje čine Rusija, Kanada, SAD, Finska i Poljska. Uzgaja se i na jugu gdje je vodeći proizvođač Australija, a slijede ju Argentina, Čile i Brazil.

Zob je jednogodišnja zeljasta biljka, visokog ili niskog rasta. Na svakoj biljci je otprilike pet stabljika, ovisno o sezoni rasta, a svaka stabljika ima oko pet do šest listova na niskim biljkama te osam do deset ukoliko je rast visoki. Svaka stabljika odnosno njezin vrh stvara terminalnu metlicu u kojoj se razvijaju zrna. Rastom biljke, veličina i težina zrna povećavaju se konverzijom šećera u škrob. Zrelo zrno zobi čvrsto je prekriveno ljuskom koja okružuje i štiti nezreli plod, a potječe od para listića nalik na pljevu, tzv. lemma i palea (Serna-Saldivar, 2010) te čini 30 – 40 % ukupne težine zrna (Zwer, 2004). Čine ju celuloza, hemiceluloza i lignin. Za razliku od drugih žitarica, zrno zobi je ispod ljuske prekriveno trihomima (grč. *trikhōma* = dlaka) (Zwer, 2004). Na unutarnjoj površini nalazi se brazda koja se proteže čitavom dužinom zrna. Postojanje brazdice i njezina dubina utječu na kompleksnost daljnje prerade zrna. Kao i većina žitarica, sastoji se od tri glavna dijela: omotača (perikarpa), endosperma i klice (embrio). Nekoliko slojeva tkiva i aleuronske stanice čine perikarp koji je smješten na vanjskim dijelovima zrna. Aleuronske stanice čine najveći dio ovog dijela i igraju važnu ulogu u klijanju sjemena. Endosperm čini najveći dio ukupnog zrna (oko 80 %), a sastoji se od škroba, proteina, lipida i osobito β -glukana te tako osigurava nutrijente za rast klice, biološki najvažnijeg dijela. Klica predstavlja važan dio zrna jer

omogućuje preživljavanje vrste. Sastoji se od rudimentarnog korjenčića i listića iz kojih se razvija mlada biljka te skuteluma koji, kao provodno tkivo, opskrbljuje klicu tijekom klijanja hranjivim tvarima iz endosperma.

Prema boji klasificira se na bijelu ili žutu zob, crvenu, sivu, crnu i kombiniranu zob. Bijela ili žuta zrna najčešće se dobiju iz vrste *Avena sativa* L. uzgajane tijekom proljeća dok crvena zrna potječu od vrste *Avena byzantina* L. koja se uglavnom uzgaja tijekom zime. Za prehrambenu industriju, najpoželjnija su bijela i crvena, najbolje kvalitete (Serna-Saldivar, 2010).

Zob se prvenstveno koristi kao stočna hrana (vrste *Avena byzantina* i *Avena strigosa*), ali i za ljudsku prehranu i u neprehrambene namjene. Stoljećima se tradicionalno koristila kao hrana konjske zaprege dok danas čak 50 – 90 % svjetske proizvodnje otpada isključivo na stočnu hranu. Zob za ljudsku potrošnju upotrebljava se za proizvodnju tradicionalnih, funkcionalnih proizvoda i lijekova. Njezina raznolikost od svih drugih žitarica očituje se u tome što se za proizvodnju upotrebljava cijelo zrno zobi, nakon uklanjanja ljuske, iz kojeg se potom dobivaju razni prehrambeni proizvodi kao što su kruh, konditorski i instant proizvodi, ali i zobeni napitak, jogurt i sladoled kao tzv. ne-mliječni proizvodi. Neprehrambeni i industrijski proizvodi zobi variraju od onih koji se primjenjuju u kozmetičke svrhe pa do proizvodnje furfurala i furana koji se koriste kao otapala, adhezivi, pomoćna sredstva za filtriranje i sl. (Zwer, 2004).



Slika 1. Zob (Anonymous, 2021)

2.1.1. Prerada zrna

Obradom zobi, za prehranu ljudi, uobičajeno se uklanja ljuska ili pljeva koja obavija zrno nakon berbe te se takvo dobiveno golo zrno konzumira kao cjelovito dok se kod ostalih žitarica uklanjaju i klica i perikarp (Zwer, 2004). *Avena nuda* L. je jedina sorta zobi koja daje zrno bez ljuske i zbog povećanog interesa njezinih povoljnih svojstava, očekuje se da će u bližoj budućnosti zauzeti tržište. Jedini izazov prerade cjelovitog zrna zobi i njezinih dijelova je visok udio masti sklon oksidaciji (Serna-Saldivar, 2010) te visoka aktivnost lipolitičkih enzima (Lehtinen i Laakso, 2004). Zbog toga zob ima drugačiji postupak prerade, od svih drugih žitarica.

Osnovne faze procesiranja zobi su: čišćenje, ljuštenje, toplinski tretman koji uključuje sušenje ili obradu na pari, prešanje ili mljevenje kako bi se dobila prešana zob ili brašno koji se pretežno koriste za proizvodnju žitarica za doručak, konditorskih proizvoda ili kruha.

U postupku čišćenja, upotrebom magnet, zraka, gravitacijskih stolova, sita ili disk separatora uklanjaju se prašina, pljeva, strana zrna, metal i druge nečistoće. Nakon toga se zrna klasificiraju prema širini ili debljini u rotirajućem horizontalom cilindru s perforacijama i tako se razdjele na dva toka: tanja i deblja zrna. Očišćena i klasificirana zrna se potom toplinski obrađuju s ciljem inaktivacije enzima lipaza i lipooksigenaza u svrhu sprječavanja nastanka nepoželjnih okusa i mirisa, ali i očuvanja stabilnosti krajnjeg proizvoda. Iako se primjenjuje sa svrhom inaktivacije enzima, termički tretman izaziva i druge fizikalno-kemijske promjene s posljedicom izmjene nutritivnog sastava i senzorskih karakteristika (Angelov i sur., 2018). Toplinska obrada je ključna faza prerade i uobičajeno se provodi na temperaturama između 88 °C i 93 °C pri čemu se uklanja vlaga (s 14 % na 7 – 9 %) i inaktivira oko 60 % lipaza, a ujedno se potpomaže boljem odvajanju ljuske tijekom sljedeće faze. Ovisno o vremenu toplinske obrade, lipaze mogu biti reverzibilno inhibirane ili trajno deaktivirane. Tretiranje toplinom mora biti tako učinkovito da se inaktiviraju lipolitički enzimi i dovoljno blago da se zaštite od degradacije svi prirodno prisutni i vrijedni bioaktivni spojevi (Angelov i sur., 2018; Lampi i sur., 2015). Nakon hlađenja, ljuštenje se provodi u brzo-rotirajućim uređajima (1400 – 2000 o/min) za ljuštenje koji potiskuju zrna zobi prema abrazivnom materijalu smještenom u kućištu stroja. Brzina rotora optimira se kako bi se zrno odvojilo od ljuske, a da se pritom minimizira samo lomljenje zrna. Ljuštenjem se dobiju oljuštena zrna, ljuska, neoljuštena zob, slomljena zrna i vrlo sitni dijelovi zrna. Ljuska i sitni dijelovi odvođe se zrakom dok se neoljuštena zrna uklanjaju i odvođe ponovno na uređaj za

ljuštenje. U pravilu, na kraju ljuštenja, omjer oljuštenih zrna i ljuske je 75:25. Zrna se potom usitnjavaju na dva ili četiri dijela pomoću rotacijskih granulatora s tim da se nastoji dobiti što manji udio vrlo sitnih dijelova zrna (koriste se kao stočna hrana) i valjaju kako bi se proizvela prešana zob koja predstavlja glavni krajnji proizvod ili se pak odvođe na jedinicu za mljevenje s ciljem dobivanja brašna (Serna-Saldivar, 2010).

2.1.2. Nutritivna vrijednost

Žitarice, uključujući i zob, prepoznate su kao funkcionalna hrana s obzirom na njihov blagotvoran učinak na zdravlje pojedinca te smanjenja rizika mnogih bolesti. Zbog toga se potražnja za zobi u svrhu prehrane ljudi neprestano povećava (Serna-Saldivar, 2010). Cijelo zrno zobi, nakon uklanjanja vanjske ljuske, sadrži sva tri dijela zrna – klicu, endosperm i perikarp – bogate svim vrijednim hranjivim tvarima. U usporedbi s drugim žitaricama, zrno zobi karakterizira značajan udio kvalitetnih proteina (15 – 17 %), ali i ugljikohidrata (59 – 70 %), lipida (~4,5 %), osobito prehrambenih vlakana (~12 %), jedinstvenih antioksidansa te vitamina i mineralnih tvari (Usman i sur., 2010). Visok udio proteina (albumina, globulina, prolamina, glutelina) i uravnotežen sastav aminokiselina, od kojih su najzastupljenije glutaminska i asparaginska kiselina, leucin, arginin, valin (Serna-Saldivar, 2010), daju zobi visoku hranjivu vrijednost. Za proteine koji se nalaze u zobi poznato je da su nutritivno dominantniji u odnosu na npr. pšenicu zbog višeg sadržaja lizina koji je limitirajuća aminokiselina u žitaricama općenito (Angleov i sur., 2018; Kedia i sur., 2009). Prema Uredbi Europske komisije (European Commission, EC) br. 41/2009 službeno je zaključeno da zob ne sadrži gluten pa je pogodna u prehrani osoba oboljelih od celijakije (Rasane i sur., 2015). Sadržaj ukupnih ugljikohidrata, uključujući celulozu i neškrobne polisaharide, može doseći 75 – 80 % na suhu tvar dok je primarna komponenta zobi škrob čiji sadržaj ipak ovisi o vrsti i uvjetima uzgoja (Khanna, 2016). Škrob zobi karakteriziraju granule male veličine ovalnog ili nepravilnog oblika, ugrađene u mrežu proteina i drugih neproteinskih komponenta endosperma (Angelov i sur., 2018; Shah i sur., 2016). Taj visok udio škroba predstavlja problem u pripremi stabilne emulzije te tijekom toplinske obrade zobenog napitka. Nadalje, zob odlikuje povoljan omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (Zwer, 2004), a posebno su dobar izvor esencijalnih (nezasićenih) masnih kiselina kao što je, primjerice, linolna masna kiselina (18:2) zastupljena u udjelu ~35,5 % (Rosentrater i Evers, 2018). Trigliceridi čine glavnu komponentu masti zobi, ali i fosfolipidi, glikolipidi i steroli također su prisutni u znatnim količinama (Khanna, 2016). Niz fenolnih spojeva u zobi i nusproduktima ima

neophodan antioksidativni potencijal, inhibicije reaktivnih kisikovih spojeva. Avenantramidi su jedinstveni i važni fenolni spojevi pronađeni samo u vanjskom dijelu zrna zobi, perikarpu. Njihova antioksidacijska aktivnost je 10 – 30 puta veća nego u uobičajenih antioksidansa pronađenih u drugim žitaricama, kao što su fenolne kiseline; ferulinska, gentizična, *p*-hidroksibenzojeva kiselina i dr. (Verardo i sur., 2011). Druga skupina bioaktivnih spojeva sa sposobnošću eliminacije slobodnih radikala su tokoli (skupina tokoferola i tokotrienola) poznati i kao vitamin E (Angelov i sur., 2018). Dominanti homolog je α -tokoferol kao glavna antioksidativna komponentna u zobi koja ostaje nepromijenjena tijekom prerade (Sterna i sur., 2016). Osim vitamina E, u zobi su od vitamina najviše zastupljeni pantotenska kiselina (vitamin B kompleksa), niacin i tiamin dok su kalij i fosfor najviše dostupni kao dio mineralnih tvari. U aleuronskom sloju endosperma, zob sadrži značajnu količinu antinutrijenta fitinske kiseline i fitata (soli fitinske kiseline) na koje je vezana većina esencijalnog fosfora, ali i drugih mineralnih tvari čime se smanjuje njihova bioraspoloživost. Aktivnost prirodno prisutnog enzima fitaze povećava se prilikom klijanja ili hidrotermičke obrade i fermentacije (Serna-Saldivar, 2010). U proizvodnji se uglavnom dodaju fitaze zbog poboljšanja mineralnog sastava konačnog proizvoda.

Ono što zob posebno odlikuje su, kombinacija u vodi topivih (β -glukan) i netopivih, prehrambenih vlakana (neškrobni polisaharidi) koja su najviše sadržana u vanjskom omotaču zrna i to u udjelu 14 – 15 % od kojih samo linearni polisaharid visokofunkcionalnih svojstava, β -glukan, zauzima 5 – 20 % (Usman i sur., 2010). Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) preporuča dnevni unos prehrambenih vlakana najmanje 25 g/dan kao dio uravnotežene prehrane s ciljem poboljšanja cjelokupnog zdravlja. Pokazalo se da unos vlakana doprinosi prevenciji kardiovaskularnih bolesti snižavanjem kolesterola u krvi i visokog krvnog tlaka. β -glukan opsežno je istražen i dokazano je da ima fiziološke učinke. Jedan je od samo nekoliko spojeva, koje su odobrile Europska agencija za sigurnost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) i Američka Agencija za hranu i lijekove (U.S. Food and Drug Administration, USFDA) sa svojstvom snižavanja kolesterola. Povećava luminalnu viskoznost što rezultira sporijom apsorpcijom ugljikohidrata (Angelov i sur., 2018). Time dolazi do snižavanja razine glukoze u krvi i regulacije inzulina čime se prevenira nastanak dijabetesa. Unos vlakana i njihov djelotvoran učinak očituje se i u smanjenju mogućnosti nastanka nekih oblika raka (posebno raka debelog crijeva), poboljšavanju kratkoročnih i dugoročnih funkcija pamćenja (Sterna i sur., 2016), pomoći u održavanju težine i preveniranju pretilosti, a svojim prebiotičkim djelovanjem održavaju zdravlje crijeva i raznolikost

autohtone mikroflore (Khanna, 2016). β -glukan je prebiotik, stimulira rast korisnih bakterija debelog crijeva, kao što su bifidobakterije, s obzirom da ostaje enzimski nepromijenjen prolaskom kroz probavni sustav (Angelov i sur., 2006). Shodno svemu tome, razlog sve veće zastupljenosti zobi u prehrani ljudi je neupitan, a to je uslijed njezinih zdravstvenih dobiti koja potječu od prvenstveno prehrambenih vlakana kao što je specifični β -glukan, ali i od funkcionalnih proteina, lipida, komponenti škroba i fitokemikalija (Syed i sur., 2020).

2.2. ZOBENI NAPITAK

Biljni napitci su pripravci koji nastaju smanjenjem veličine biljnog materijala (žitarica, pseudožitarica, mahunarki, orašastih plodova), ekstrakcijom u vodi uz daljnju homogenizaciju što rezultira raspodjelom veličine čestica u rasponu od 5 do 20 μm i tako izgledom i konzistencijom podsjećaju na kravlje mlijeko (Sethi i sur., 2016). Prema literaturi, nije još priznata utvrđena definicija biljnih alternativa no opća klasifikacija dijeli napitke u 5 kategorija, i to:

1. na bazi žitarica: napitak od zobi, riže, kukuruza, pira
2. na bazi mahunarki: napitak od soje, kikirikija, lupina, graha
3. na bazi orašida: napitak od badema, kokosa, lješnjaka, pistacija, oraha
4. na bazi sjemenki: napitak od sezama, lana, konoplje, suncokreta
5. na bazi pseudožitarica: napitak od kvinoje, tefa, amaranta.

Biljni napitci su jedna od skupina hrane koja je nezamjenjiva u proizvodnji veganskih proizvoda jer se koriste kao osnovni sastojak u mnogim drugim ne-mliječnim proizvodima; jogurtu, siru, kefiru, maslacu, sladoledu i dr., a osim toga posebno su prihvatljivi osobama intolerantnim na laktozu ili osobama osjetljivim na mliječne proteine (alergije).

Postoji nekoliko metoda za proizvodnju biljnih napitaka, ali s obzirom da su koraci identični, uobičajene glavne faze proizvodnje svih biljnih napitaka (zobi, badema, kokosa, soje, riže...) su: mokro mljevenje, filtracija, dodatak drugih sastojaka (stabilizatori, šećer, sol), sterilizacija, homogenizacija, aseptično pakiranje i hladno skladištenje.

U slučaju proizvodnje napitka od zobi, prvi korak je sušenje ukoliko je početni ulazni materijal sirova svježa zob bez ljuske, ili s ljuskom koja se uklanja prije samog procesiranja. Potom slijedi namakanje u deioniziranoj vodi čime se postiže bubrenje i mekšanje samog

zrna. Omjer zrna i vode je 1:2, a namakanje se provodi 8 h na 30 °C. Nakon što se ocijedi višak vode, zrna odlaze na mokro mljevenje. Na konačni proizvod utjecat će količina dodane vode pri mljevenju, temperatura, pH, brzina i način mljevenja. Istodobno, količina dodane vode definirat će koncentraciju zobu u dobivenom napitku. U ovom koraku, prilikom proizvodnje isključivo zobnog napitka, dodaju se enzimi α -amilaza i fitaza. Primjenom topline u daljnjim koracima, škrob želatinizira pa tekući napitak teži formiranju nepoželjne gel konzistencije, visoke viskoznosti. Da bi se riješio taj problem te da bi se dobio prihvatljiv proizvod, nužno je provesti enzimsku hidrolizu škroba, α -amilazom. Enzim fitaza dodaje se s ciljem poboljšanja nutritivne vrijednosti i mineralnog sastava proizvoda, oslobađanjem anorganskog fosfata iz fitinske kiseline, antinutrijenta (Sethi i sur., 2016). Slijedi filtracija kojom se postiže izdvajanje napitka od krutog zaostalog dijela zobu pri čemu se koriste različiti filterski materijali, npr. dvoslojna gaza, muslin tkanina (25 μ m), filter papir različitih veličina pora u izvedbi sa sitom. Moguće je kombiniranje različitih dodataka, ovisno o kojem tipu napitka se radi i ovisno o željenim karakteristikama krajnjeg proizvoda. U industrijskoj primjeni, lecitin suncokreta, karuba guma (brašno sjemenki rogača) i gelan guma koriste se kao stabilizatori dok se askorbinska kiselina dodaje kao sastojak koji prevenira oksidaciju. Dodatak ksantan gume od 0,05 g/100 mL prije toplinskih tretmana poslužit će kao zgušnjivač, spriječit će taloženje čestica na dno i povećat će se koloidna stabilnost konačnog proizvoda. Upotrebljavaju se razni poboljšivači okusa – šećer šećerne trske, saharoza ili šećerni sirup kao zaslađivači, morska sol, vanilija ili kakao. S ciljem dobivanja svilenkastog izgleda krajnjeg proizvoda, dodaje se ulje – suncokretovo ili maslinovo. S obzirom da su proteini te vitamini i mineralne tvari važan kriterij pri odabiru biljnih proizvoda, mogu se dodati. Da bi se povećao udio proteina, moguće je kombiniranje više različitih sirovina pa bi se u tom slučaju osim višeg unosa proteina, poboljšala i senzorska svojstva. Druga mogućnost za proizvodnju visokoproteinskog napitka je upotreba sirovine s visokim udjelom proteina kao što je leća čija su senzorska svojstva vrlo slična sojinom napitku. Kalcij (kalcijev citrat), vitamini A, B₁, B₂, B₁₂, D₂ i E mogu se također dodavati kako bi se poboljšao vitaminski i mineralni profil. Nakon dodatka odgovarajućih sastojaka, potrebno je provesti toplinski tretman kako bi se zadržala visoka kvaliteta proizvoda te kako bi se produžio sami vijek trajanja. Moguće je izvršiti pasterizaciju, sterilizaciju ili UHT sterilizaciju. Iako još uvijek nema istraživanja primjenjenih na napitke biljnog porijekla, mikrofiltracija, kao netermalna metoda sterilizacije, moguć je izbor za eliminaciju mikroorganizama i produljenja roka trajanja. Uobičajno se provodi sterilizacija pri 121 °C, 15 – 20 min. Homogenizacija se provodi nakon sterilizacije kako bi se poboljšala fizikalna stabilnost proizvoda. Može se provesti niskim, visokim ili

ultravisokim tlakom. Kako primjenjeni tlak raste, stabilnost, ujednačenost i indeks bjeline povećavaju se, a istodobno nema utjecaja na viskoznost i stabilnost samih proteina. Ukoliko se primjenjuje ultravisoki tlak, smanjuje se veličina zaostalih čestica. Osim homogenizacije, za duži rok trajanja i visoku stabilnost proizvoda, nužno je napitak puniti u ambalažu (najčešće višeslojna) pri aseptičnim uvjetima te skladištiti u hladnom. Temperatura skladištenja mora biti +4 °C (Aydar i sur., 2020). Općenito, cijena biljnih zamjena za mlijeko je veća nego u slučaju kravljeg mlijeka zbog viših troškova proizvodnje.

Tijekom proizvodnje biljnih napitaka, nužno je primjeniti metodu koja će očuvati primjerenu razinu makro- i mikronutrijenata te stabilnost krajnjeg proizvoda, što je uvijek jedan od glavnih problema u prehrambenoj industriji. Osim toga, nastoji se odabrati metoda koja će minimizirati upotrebu aditiva kao što su hidrokoloidi i emulgatori. Ponekad se, iz tih razloga, pribjegava primjeni novih tehnologija, a to su: ultrazvuk, pulsirajuće električno polje, omsko zagrijavanje i, već spomenuta, homogenizacija visokim i ultravisokim tlakom. Cilj upotrebe ovih tehnologija je inaktivacija mikroorganizama i njihovih enzima, smanjenje veličine čestica i viskoznosti kako bi se povećala sveukupna stabilnost. Preporuča se kombinacija tehnologija, primjerice omsko zagrijavanje i homogenizacija visokim tlakom s ciljem dobivanja bolje kvalitete konačnog proizvoda. Netoplinske tehnologije uvijek imaju prednost i povoljnije učinke na zaštitu nutritivnih i senzorskih svojstava, u odnosu na toplinske tehnologije (Aydar i sur., 2020).

Industrija, pa tako i prehrambena, ima mnoge utjecaje na okoliš, uključujući visoku potrošnju vode i iskorištavanje obradivih površina, izazivanje ekotoksičnosti i pojave eutrofikacije, smanjenje bioraznolikosti i posljedično ubrzanje klimatskih promjena. Prema istraživanju iz 2016. (Röös i sur.) i usporedbom proizvodnje zobenog napitka i prerade kravljeg mlijeka te njihovog utjecaja na okoliš, uvidjelo se da proizvodnja zobenog napitka ima vrlo velik potencijal u smanjenju negativnih utjecaja na okoliš, a u isto vrijeme osigurava resurse za očuvanje bioraznolikosti. Dokazano je da su proizvodnjom napitka na bazi zobi učinci na klimu smanjuju za 10 – 20 %. Izravna emisija stakleničkih plinova i potrošnja energije znatno je manja (16 – 41 %) nego u slučaju obrade i proizvodnje kravljeg mlijeka. Utjecaji na ekotoksičnost puno su niži u odnosu na kravlje zbog veće kultivacije, gospodarski važne, djeteline. Uz sve navedeno, biljni otpad pruža visoke razine bioaktivnih spojeva, antioksidansa, esencijalnih ulja i vlakana pa upravo takva reciklacija otpadnih proizvoda biljnog porijekla pomaže u smanjenju ekoloških problema (Aydar i sur., 2020).

2.3. FERMENTACIJA BILJNIH NAPITAKA

Razvoj fermentiranih proizvoda na bazi zobi započeo je u Europi prije 30 godina, porastom dostupnosti funkcionalne hrane na tržištu. Danas je tržište funkcionalne hrane u znatnom rastu zbog sve veće osvještenosti o općem zdravlju i sveukupnoj kvaliteti života. Da bi se proizveli funkcionalni fermentirani proizvodi, nužno je izabrati one starter kulture koje će biti sposobne rasti i dominirati mikroflorom konačnog proizvoda te razviti željena svojstva kao što su tekstura ili okus (Alcorta i Pilar Vaquero, 2021). Smatra se da funkcionalna hrana, pored svoje nutritivne vrijednosti, ima učinke na poboljšanje zdravlja koji se pripisuju sadržaju biološki aktivnih komponenata u odgovarajućim količinama (Angelov i sur., 2018).

Fermentacija je jedan od najstarijih procesa koji se koristi za konzerviranje hrane i uz nju vezuju se mnoge koristi kao što je niz biokemijskih promjena koje rezultiraju poboljšanom nutritivnom vrijednošću, poboljšanim senzorskim svojstvima i dužim vijekom trajanja (Angelov i sur., 2018). Tradicionalno se primjenjuje diljem svijeta za dobivanje brojnih pripravaka od različitih sirovina. Žitarice su posebno prikladne za fermentaciju zbog svojeg sastava i fermentabilnih tvari, pogodnih i iskoristivih za rast poželjnih mikroorganizama. Širom svijeta dostupna je raznolikost tradicionalnih pripravaka na bazi žitarica, a najviše se konzumiraju na afričkom kontinentu za prehranu opće populacije i dojenčadi. Pripremaju se iz kukuruza, prosa i/ili sirka uz spontanu fermentaciju miješanih mikrobnih kultura, bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Mikroorganizmi uključeni u fermentacije žitarica uglavnom pripadaju rodu *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. Acidophilus*, *Lb. brevis* i dr.), *Pediococcus*, *Bifidobacterium* te *Candida*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces* i *Trichosporon*.

Prvih nekoliko fermentiranih proizvoda na bazi zobi koji su se našli na tržištu Europe su: proizvod Proviva, švedske kompanije Skane Dairy, fermentiran starter kulturom *Lactobacillus plantarum* 299v, zatim finski proizvod Yosa fermentiran sojevima *Lactobacillus acidophilus* LA5 i *Bifidobacterium lactis* Bb12 te švedski, s jogurtom usporediv, proizvod Adavena M40 (Angelov i sur., 2018; Mårtensson i sur., 2001) formuliran na bazi zobi uz fermentaciju uobičajenom jogurtnom kulturom (*Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) upotpunjenom *Lactobacillus acidophilus* sojem (Öste Triantafyllou i sur., 2016).

Biljni napitci fermentiraju se kako bi se proizveli fermentirani ne-mliječni proizvodi, slični jogurtu ili kefiru, zadovoljavajući potrebe onih intolerantnih na laktozu, ali i onih koji ne konzumiraju hranu animalnog porijekla. Zbog znanstvenih spoznaja o nutritivnom sastavu zobi, koje je istaknuto u podpoglavlju 2.1.2., sve je veća potražnja proizvoda koji se baziraju na upravo toj žitarici. Zrno zobi ima visoki funkcionalni potencijal i za razliku od drugih žitarica, osigurava više proteina, vlakana, kalcija, željeza, cinka i esencijalnih aminokiselina. Sadržaj zobi u fermentiranom proizvodu čini proizvod prebiotičkim zbog zastupljenosti prehrambenih vlakana koja se ne metaboliziraju probavnim enzimima već ih intestinalna mikroflora koristi kao izvor energije (Sukhova i sur., 2020). Također, fermentirani zobeni napitci nazivaju se i funkcionalnim zbog simbiotičkog učinka probiotičkih starter kultura i prebiotika – β -glukana (El-Batawy i sur., 2019). Iako se napitak od zobi konzumira kao alternativa za mlijeko ili kao sastojak u drugim proizvodima na bazi zobi (kruh, keksi, žitarice, napitci) koji su sve više zastupljeni, proizvodnja fermentiranog zobenog proizvoda još uvijek je izazov. To je većinom iz razloga što fermentirani zobeni napitak ne može sam po sebi tvoriti mrežu gela koja je svojstvena tradicionalnom jogurtu, a to je ono što je zbog senzorskih i teksturalnih svojstava uvelike prihvaćeno i već očekivano kod potrošača. Najčešće korištene tehnike, kojima bi se nadvladala ta barijera s ciljem unaprijeđenja konzistencije i/ili teksture jogurta, uključuju povećanje ukupne suhe tvari u napitku ili dodatak funkcionalnih sastojaka koja djeluju kao sredstva za zgušnjavanje. Danas se koristi veliki broj dodataka koji pružaju stabilnost i poboljšavaju teksturu ne-mliječnih proizvoda. To su najčešće hidokoloidi od kojih svaka vrsta ima svoje prednosti i nedostatke (Raikos i sur., 2020). Fermentacija biljnih alternativa poboljšava senzorska svojstva s obzirom da smanjuje okus sirovog biljnog materijala i osigurava poželjene hlapive spojeve arome. Uz to, fermentacija s dvije ili više vrste mikroorganizama može poboljšati topivost biljnih proteina te sastav i raspoloživost aminokiselina. Za primjer, *Bifidobacterium* znatno povećava sadržaj proteina u sojinom napitku. Povrh toga, fermentacija soje s *Lactobacillus plantarum* rezultira povećanjem esencijalnih aminokiselina kao što je limitirajući lizin dok fermentacija napitka od kikirikija sa sojevima *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum* značajno povećava sadržaj ukupnih proteina i udio lizina, metionina i triptofana, uspoređujući s provedenim fermentacijama sa samo jednom vrstom bakterija (Alcorta i Pilar Vaquero, 2021). S druge strane, važno je istaknuti da proizvodni procesi i njihovo optimiranje imaju značajan utjecaj na funkcionalne učinke probiotičkih sojeva (Angelov i sur., 2018).

U industrijskoj proizvodnji, fermentacija se uglavnom provodi nakon pasterizacije, zagrijavanja zobenog napitka na 95 °C uz miješanje te njegovog hlađenja na 37 °C i inokulacije odabranom starter kulturom, bakterijama mliječne kiseline. Uz inokulaciju startera, prije ili poslije pasterizacije, dodaju se i drugi sastojci poput jednostavnih šećera, vitamina, enzima ili tvari arome. Studije su pokazale da je količina zobi i dodanog šećera faktor koji potpomaže rastu upotrebljene mikrobne kulture (Gupta i sur., 2010). U pravilu, vrijeme trajanja fermentacije nije definirano već ono ovisi o izabranoj starter kulturi.

Fermentacija bakterijama mliječne kiseline poboljšava nutritivnu vrijednost i senzorska svojstva obogaćivanjem medija mikrobnim metabolitima, a istodobno produljuje rok trajanja snižavanjem pH vrijednosti. Mikroorganizmi uključeni u fermentaciju produciraju enzime i druge bioaktivne spojeve; kratkolančane masne kiseline, vitamine, folate, aminokiseline, egzopolisaharide i bakteriocine. Utvrđeno je da se fermentacijom zobi povećava udio fenola, avenantramida i flavonoida koji imaju protektivnu ulogu, a ujedno se povećava i dostupnost antioksidansa i drugih mikroelemenata što za posljedicu ima smanjenje razine antinutrijenata (fitata i tripsin inhibitora). Fermentacija rezultira boljom teksturom, okusom i aromom zobnih napitaka (Angelov i sur., 2018).

2.4. UTJECAJ PROIZVODA BILJNOG PORIJEKLA NA ZDRAVLJE

U novije vrijeme, potrošači sve više teže načinu prehrane koji se bazira na namirnicama biljnog podrijetla (eng. *plant-based diet*) uključujući žitarice, mahunarke, sjemenke, orašaste plodove, voće i povrće, i to iz raznih razloga kao što su primjerice odbojnost zbog povrede životinja, ekološka svijest ili težnja za zdravim i uravnoteženim načinom života. Posljedica toga je nastanak niza trendova poput veganstva, vegetarijanstva, laktovegetarijanstva, ovovegetarijanstva koji su danas u sve većem porastu.

Namirnice i proizvodi biljnog podrijetla prvi su izbor odabira zbog pozitivnih utjecaja na opće zdravlje i smanjenja rizika od obolijevanja učestalih bolesti današnjice pa se kao takvi svrstavaju u funkcionalnu i nutraceutičku hranu. Ono pozitivno očituje se u bogatstvu i raznolikosti proteina, vitamina, mineralnih tvari, prehrambenih vlakana, sastavu masnih kiselina (posebno nezasićenih masnih kiselina) te ponajviše fenolnim spojevima i drugim fitokemikalijama. Antioksidativnom aktivnošću sprječavaju se lančane reakcije oksidacije nukleinskih kiselina, proteina i lipida slobodnim radikalima i posljedični upalni procesi.

Posebna važnost odražava se u tome da se visokim unosom biljnih namirnica u prehrani smanjuje rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, raznih oblika raka, ateroskleroze i dijabetesa, najčešćih bolesti modernog doba. Osim toga, prehrana bogata namirnicama biljnog podrijetla smanjuje rizik i od neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest te stimulira sveukupni imunološki sustav. Poblje, esencijalne masne kiseline pružaju neuroprotektivni učinak, uključujući podupiranje aksonskog i dendritičkog rasta neurona. Konkretno, oleinska masna kiselina inhibira aktivnost enzima prolil-endopeptidaze za koju se pokazalo da ima povišenu aktivnost u mozgu pojedinaca oboljelih od Alzheimerove bolesti. Dok konzumacija namirnica životinjskog podrijetla u velikim količinama uzrokuje povećanje kolesterola i bolesti srca i krvnih žila, u raznim biljnim namirnicama i proizvodima zastupljeni su glikozidni fitosteroli koji sprječavaju njegovu apsorpciju u tankom crijevu i time pridonose smanjenju LDL kolesterola. Uz to, fitosteroli pomažu u proizvodnji kolagena pa tako štite kožu od preuranjenog starenja. Najviša koncentracija β -sitosterola zastupljena je u zobenom napitku i to 5 mg/100 mL. Pretilost je neovisan čimbenik rizika za razvoj koronarnih bolesti. Klinički podaci sugeriraju da prehrambena vlakna mogu pomoći u održavanju tjelesne mase, a time i prevenciji pretilosti. Obroci bogati vlaknima povisuju koncentraciju hormona kolecistokinina u plazmi za kojeg se smatra da inducira osjećaj sitosti (Khanna, 2016).

S obzirom na dokazane pozitivne učinke namirnica biljnog porijekla na zdravlje, globalno raste potražnja pa prehrambene proizvode biljnog porijekla sa sigurnošću očekuje svijetla budućnost. Time prehrambena industrija podliježe sve većim izazovima proizvodnje alternativa poželjnih svojstava uzimajući u obzir sve veće zahtjeve potrošača.

Potrošnja svake vrste biljnih napitaka povećava se iz godine u godinu. U razdoblju od 6 godina (2009. – 2015.) prodaja se udvostručila. Konkretno, volumen prodaje od 2017. do 2018. za zobeni napitak povećao se za 71 %, za bademov napitak 10 %, a za napitak od kokosa 16 %. Prema uspoređivanim podacima o potrošnji iz 2018. i 2019. godine, konzumacija biljnih napitaka povećala se za 19 % u samo tri mjeseca. Zdravstvene tvrdnje koje se vezuju uz biljne napitke, koriste i mlađoj i starijoj populaciji pa je kao rezultat toga, konzumacija porasla sveukupno za 60 – 70 % dok su drugi proizvodi biljnog podrijetla (sladoled, jogurt, maslac, preljevi za salate), prema podacima iz 2018. ostvarili profit u iznosu od nekoliko stotina milijuna dolara (Aydar i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Početak eksperimentalnog dijela započeo je uporabom organskog napitka od zobi proizvođača Dennree (Njemačka) (slika 2) sljedećeg sastava: voda, zob cjelovitog zrna 12 %, suncokretovo ulje, morska sol. Nutritivna vrijednost napitka prikazana je u tablici 1. U nastavku eksperimenta pa sve do kraja glavnog pokusa koristile su se sitno mljevene zobene pahuljice grupe proizvoda Nutrigold.



Slika 2. Napitak od zobi
(vlastita fotografija)

Tablica 1. Nutritivna vrijednost napitka od zobi

| Energetska vrijednost | 179 kJ/42 kcal |
|----------------------------------|----------------|
| Masti | 0,8 g |
| od kojih zasićene masne kiseline | 0,1 g |
| Ugljikohidrati | 7,8 g |
| od kojih šećeri | 4,5 g |
| Bjelančevine | 0,7 g |
| Soli | 0,08 g |

Za fermentaciju napitka od zobi prvo je korištena liofilizirana jogurtna kultura YoMix (Danisco, Danska) 20, 25 i 30 DCU te potom starter kulture namijenjene za fermentaciju biljnih napitaka: VEGE 033, VEGE 053 i VEGE 081 (Danisco, Danska).

3.2. PRELIMINARNI EKSPERIMENTI

3.2.1. Fermentacija *Dennree* zobenog napitka

U prethodno toplinski sterilizirane četiri laboratorijske čaše odmjerilo se po 0,5 L napitka od zobi proizvođača *Dennree* kojemu je određena kiselost, mjerenjem pH vrijednosti. Napitak je zagrijan na grijaćoj ploči (Rotamix 550 MMH, Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija) na približno 40 °C. Potrebna količina starter kultura za fermentaciju, pažljivo je odvagana na analitičkoj vagi (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska). S obzirom da je po uzorku namijenjeno 0,5 L biljnog napitka, u manje laboratorijske čaše odvagano je 0,0098 g jogurtne kulture 20 DCU, 0,01225 g jogurtne kulture 25 DCU i 0,0147 g jogurtne kulture 30 DCU. Približno 20 mL napitka od zobi dodano je u svaku čašu s odvaganom kulturom s ciljem aktivacije mikroorganizama kroz vremenski period od 15 minuta, na 40 °C u termostatu (INKO 1935., Zagreb). Aktivirana mikrobna kultura dodana je u pripremljene čaše s 0,5 L napitka i dobro promiješana. S obzirom da se nastojalo uvidjeti utjecaj glukoze na aktivnost i rast upotrebene kulture, u četvrtu od pripremljenih čaša s napitkom dodana je odvaga jogurtne kulture 25 DCU i 1 % glukoze. Sadržaj svake čaše – napitak u kombinacijama s 20, 25 i 30 DCU jogurtne kulture te napitak s 25 DCU jogurtne kulture i 1 % glukoze raspodjeljen je u šest manjih steriliziranih bočica za fermentaciju. Pokrivene aluminijskom folijom, bočice su stavljene u termostat na 40 °C čime je započela fermentacija.

Tijekom fermentacije, prvi put nakon protekla 2 h, izuzimani su uzorci s ciljem mjerenja kiselosti i vremenskog trajanja fermentacije, mjerenjem pH vrijednosti na pH-metru. Kraj fermentacije označavao je vrijednost pH od 4,6, a fermentacija se prekinula naglim hlađenjem uzoraka koji su potom ostavljeni u hladnjaku preko noći na +4 °C.

3.2.2. Proizvodnja zobenog napitka iz zobenih pahuljica i njegova fermentacija

Zobeni napitak proizveden je iz sitno mljevenih zobenih pahuljica grupe proizvoda Nutrigold. Korišten je uređaj za proizvodnju različitih biljnih napitaka, Vegan Star, VR100 Perfect (slika 3), koji se sastoji od dva dijela: donji dio čini spremnik za dodavanje željenih sastojaka te gornjeg dijela na kojem se nalaze nož za obradu sadržaja povezan s kućištem

motora. Uređaj se spaja na izvor električne energije, a za pokretanje rada bira se, prema uputama o odabranoj sirovini, jedan od ukupno šest dostupnih programa.



Slika 3. Vegan Star, VR100 perfect – uređaj za proizvodnju biljnih napitaka (vlastita fotografija)

Proizvodnja napitka od zobi provela se na tri načina. U prvom postupku odvagano je (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka) 60 g zobenih pahuljica i odmjereno je 1400 mL vode. Nakon stavljanja u uređaj, za proizvodnju napitka iz suhih zobenih pahuljica, prema uputama proizvođača, odabran je program 5 koji usitnjavala i zagrijava sadržaj. Nakon otprilike 7 minuta, program završava s proizvodnjom. Dobiveni napitak procijeđen je kroz kuhinjsko cjedilo i postupak s procijeđenim napitkom ponovljen je još jednom. Drugi način proizvodnje obuhvaćao je odvagu zobenih pahuljica od 40 g i dodatak 1350 mL vode uz odabir istog programa. Ovoga puta cijedenje je provedeno dva puta: jednom kroz uobičajeno kuhinjsko cjedilo i drugi puta kroz tzv. svileno cjedilo za još finije izdvajanje sitnih dijelova zobi. Za treći postupak upotrebjeno je 40 g zobenih pahuljica koje su određeno vrijeme stajale u 300 mL vode. Za proizvodnju napitka iz namakanih pahuljica, dodano je još 1000 mL vode i uređaj je započeo s radom odabirom programa 6 kojim se postiže usitnjavanje sadržaja bez zagrijavanja. Nakon otprilike 1 minute i 40 sekundi, ciklus je završen i postupak

je ponovljen još jednom uz krajnje procjeđivanje napitka. Svi dobiveni napitci (slika 4) stavljeni su u hladnjak na +4 °C.



Slika 4. Zobeni napitci dobiveni različitim postupcima (vlastita fotografija)

Za fermentaciju proizvedenih napitaka korištena je jogurtna kultura 30 DCU. Za 0,5 L svakog napitka, odvagano je 0,0147 g mikrobne kulture i dodano u prethodno, na 40 °C, zagrijane napitke. Uz dobro miješanje, napitci su raspodijeljeni u pet sterilnih bočica za fermentaciju, za svaki uzorak. Prekriveni aluminijskom folijom, stavljeni su u termostat na 40 °C. Fermentacija se također pratila uzastopnim mjerenjem kiselosti.

3.2.3. Fermentacija zobenog napitka starter kulturom namijenjenom za zob

Za proizvodnju napitka odabrana je nova formulacija tako da omjer zobi i vode bude otprilike jednak omjeru 4:100. U uređaj za proizvodnju dodano je odvaganih 55 g zobenih pahuljica i odmjerenih 1400 mL vode. Rad je započeo odabirom programa 5 ponovljen u dva ciklusa. Preciznije, nakon završetka prvog ciklusa, napitak je procijeđen preko uobičajnog cjedila. Usitnjavanje i zagrijavanje ponovilo se još jednom (u opranom uređaju) i napitak je procijeđen kroz svileno cjedilo. Ovim postupkom dobilo se 1260 mL zobenog napitka iz početnih količina zobi i vode dok gubici predstavljaju krute ostatke zobi zaostale tijekom procijeđivanja.

Dobiveni zobeni napitak fermentiran je kombinacijom definiranih sojeva bakterija mliječne kiseline namijenjenih za izravno nacjepljivanje i fermentaciju namirnica i napitaka biljnog porijekla. Na raspolaganju su bile tri vrste mikrobnih kultura u obliku liofiliziranog praha:

1. DANISCO VEGE 033 LYO 100 DCU – *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
2. DANISCO VEGE 053 LYO 200 DCU – *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactic*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*
3. DANISCO VEGE 081 LYO 250 DCU – *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*

Napitak je zagrijan u loncu na 40 – 45 °C i u laboratorijske čaše je odmjereno po 500 mL napitka. Za svaku od tri čaše s napitkom odvagana je na analitičkoj vagi jedna vrsta starter kulture, i to: 0,005 g kulture oznake 033 LYO 100 DCU, 0,0065 g kulture 053 LYO 200 DCU te 0,03 g kulture 081 LYO 250 DCU. S napitkom su dobro promiješane i raspodjeljene u šest steriliziranih bočica za fermentaciju. Prekriveni aluminijskom folijom, uzorci su stavljeni u termostat na 40 °C za početak fermentacije (slika 5).



Slika 5. Uzorci prije početka fermentacije (vlastita fotografija)

3.3. PROIZVODNJA FERMENTIRANOG NAPITKA – NATUR ZOBENI DESERT

Zobeni napitak proizveden je prema omjeru zobnih pahuljica i vode 4:100 (potpoglavlje 3.2.3.). Za fermentaciju i proizvodnju natur zobenog deserta korištena je mikrobnna kultura VEGE 053 (Danisco, Danska) i dodatci za poboljšanje okusa i teksture. Udjeli dodanih sastojaka korigirani su kroz slijed od nekoliko formulacija:

| | |
|--------------|---|
| 1. receptura | 1 % škroba, 1 % pektina, 0,5 % soli |
| | 1 % škroba, 1 % pektina, 1 % soli |
| | 1 % brašna od sjemenki rogača, 1 % soli |
| 2. receptura | 1 % škroba, 1 % pektina, 0,1 % soli |
| | 1 % škroba, 1 % pektina, 0,25 % soli |
| 3. receptura | 1 % škroba, 1 % pektina, 0,2 % soli |
| 4. receptura | 1 % škroba, 1 % pektina, 0,15 % soli |

Zobeni napitak zagrijan je na 40 – 45 °C. Škrob (1 %), pektin (1 %) i sol (0,15 %) odvagani su u laboratorijske čaše i dodani u 2,5 L napitka. Korišten je štapni mikser radi lakšeg postizanja ujednačenosti i raspodjele sastojaka te razbijanja grudica. Homogena smjesa pasterizirana je na 73 °C, 15 sekundi uz neprestano miješanje po dnu. Nakon hlađenja na približno 40 °C dodano je 0,03225 g mikrobne kulture prethodno pažljivo odvagane na analitičkoj vagi. Napitak sa svim sastojcima i kulturom je dobro promiješan i raspodijeljen u 12 steriliziranih bočica za fermentaciju. Prekrivene aluminijskom folijom, bočice su stavljene u termostat na 40 °C čime je započela fermentacija. Prije i tijekom trajanja fermentacije uzorku je uzastopno mjerena kiselost do krajnje vrijednosti pH 4,6.

Fermentacija je prekinuta naglim hlađenjem natur zobenog deserta koji je ostavljen u hladnjaku na +4 °C.



Slika 6. Natur zoben desert (vlastita fotografija)

Potpuno isti postupak je ponovljen s ciljem dobivanja usporednog uzorka potrebnog za daljnje analize.

Na temperaturi hladnjaka, tijekom 28 dana, čuvana je serija natur zobenog deserta bez provedenog postupka pasterizacije tijekom proizvodnje te dvije serije usporednih pasteriziranih proizvoda. Osim toga, u steriliziranim bočicama čuvan je u hladnjaku i proizvedeni zoben napitak (prema potpoglavlju 3.2.3.) dok je dio istoga, čuvan na sobnoj temperaturi. Svim uzorcima su svakih 7 dana (1., 7., 14., 21., i 28.) mjereni sljedeći parametri kvalitete: kiselost, udio ugljikohidrata, udio soli, udio suhe tvari i pepela te reološki parametri, mikrobiološka analiza i senzorska procjena.

3.4. ANALITIČKE METODE

3.4.1. Određivanje pH vrijednosti

Određivanje kiselosti provedeno je mjerenjem pH vrijednosti uzorka pomoću laboratorijskog pH-metra (WTW-ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka) kalibriranog prije prvog korištenja, na način da se destiliranom vodom isprana elektroda pažljivo uroni u uzorak. Nakon ustaljenja, pH vrijednosti se očita na zaslonu uređaja.

3.4.2. Određivanje udjela ugljikohidrata

Udio ugljikohidrata određivan je metodom prema Loof-Schoorlu. Reducirajući ugljikohidrati, zbog slobodne aldehidne tj. keto-skupine, imaju sposobnost redukcije metala iz alkalnih otopina njihovih soli (Luffova otopina – alkalna otopina bakra). Kao posljedica te reakcije nastaje crveno-smeđi, netopljivi talog bakrenog oksidula (Cu_2O). Količina, konkretno, mliječnog šećera laktoze može se odrediti, nakon nastanka taloga, titracijom suviška nereduciranih iona bakra (Cu^{2+}) 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 koji se titrira otopinom natrijevog tiosulfata uz škrob kao indikator (Božanić i sur., 2010).

S obzirom da je po literaturi u zobi najviše zastupljena maltoza, krajnji rezultati analize uzoraka preračunavani su na udio tog disaharida.

Korišteni pribor:

1. laboratorijska vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka)
2. povratno hladilo
3. grijač
4. tikvica s okruglim dnom i brušenim grlom od 300 mL
5. pipete od 1 mL, 20 mL
6. trbušaste pipete od 25 mL

7. štoperica

Potrebni reagensi:

1. Luffova otopina

Priprema: 25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL destilirane vode. Zatim se 50 g limunske kiseline otopi u 50 mL destilirane vode, a 388 g kristalnog $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ u 300 – 400 mL tople destilirane vode. U odmjernu tikvicu od 1 L prvo se ulije otopina natrijevog karbonata kojoj se doda otopina limunske kiseline. Toj dobivenoj smjesi doda se otopina bakrenog (II) sulfata te se ostatak do oznake nadopuni destiliranom vodom.

2. 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
3. 20 % otopina kalijevog jodida
4. 25 % otopina sumporne kiseline
5. 2 % otopina škroba

Postupak:

U tikvicu s okruglim dnom i nekoliko staklenih kuglica, otpipetira se 1 mL uzorka zobenog napitka odnosno izvaže se 1 g fermentiranog natur deserta. U tikvicu se potom doda 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključi na povratno hladilo i kuha uz lagano vrenje točno 10 minuta, nakon što prva kap padne natrag u tikvicu. Nakon isteka vremena, tikvica se ohladi pod mlazom hladne vode i u smjesu se otpipetira 15 mL 20 %-tne otopine kalijevog jodida. Zatim se oprezno, uz miješanje, u smjesu otpipetira 25 mL 25%-tne otopine sumporne kiseline.

Izlučeni jod titrira se s $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Na-tiosulfatom dok boja uzorka ne prijeđe u tonove žute boje, a zatim se otpipetira 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i titracija se nastavi do prijelaza tamnoplave boje u putenastu koja se mora zadržati nekoliko minuta. U račun se uzima u obzir zbroj utrošenih mililitara u obje titracije.

Usporedno se radi i slijepa proba za koju se umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetira 25 mL destilirane vode, a dalje se ponavljaju koraci kao i s uzorkom.

Izračun:

Slijepa proba troši: $X \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Uzorak troši: $Y \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$$(X-Y) \cdot f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = Z \text{ mL } 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [1]$$

Iz tablice 2 se za Z mL Na₂S₂O₃ očitaju mg maltoze u 1 mL uzorka.

Tablica 2. Izračunavanje šećera po Loof-Schoorlu

| 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 |

3.4.3. Određivanje udjela soli

Određivanje udjela soli provedeno je metodom po Mohru koja određuje količinu kloridnih iona titracijom sa srebrovim (I) nitratom. Iz analitičkih podataka za titraciju utrošenog volumena otopine AgNO₃, izračuna se maseni udio natrijevog klorida u ispitivanom uzorku.

Korišteni pribor:

1. laboratorijska čaša od 100 mL
2. odmjerna tikvica od 100 mL
3. vodena kupelj
4. filter papir
5. lijevak
6. pH-metar (WTW-ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka)
7. Erlenmeyerova tikvica od 100 mL
8. trbušasta pipeta od 25 mL

Potrebni reagensi:

1. 0,1 M otopina srebrovog (I) nitrata, AgNO_3
2. zasićena otopina indikatora, K_2CrO_4
3. 0,1 M otopina natrijevog hidroksida, NaOH

Postupak:

U čašu od 100 mL izvaže se 2 g uzorka, doda se 2 – 3 mL tople vode i dobro se promiješa staklenim štapićem da se dobije homogena smjesa. Kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, uz ispiranje čaše vodom. Tikvica se dopuni destiliranom vodom do oznake, zatvori čepom, dobro promiješa i drži u ključaloj vodenoj kupelji 15 minuta od trena kada sadržaj tikvice zavrije. Tijekom ključanja, tikvica mora biti poklopljena uz povremeno otvaranje čepa. Nakon 15 minuta, tikvica s otopinom se djelomično ohladi, promiješa i filtrira preko filter papira. Dobivenom filtratu izmjeri se pH (mora biti oko 10) i ukoliko je potrebno, neutralizira otopinom natrijevog hidroksida. Otpipetira se 25 mL filtrata u Erlenmeyerovu tikvicu, dodaju se 2 do 3 kapi indikatora (K_2CrO_4) i titrira se 0,1 M otopinom AgNO_3 do prve promjene boje.

Izračun:

$$m_{100}(\text{NaCl}) = 4 \cdot c(\text{AgNO}_3) \cdot V(\text{AgNO}_3) \cdot M(\text{NaCl}) \quad [2]$$

$$w(\text{NaCl}) = [m_{100}(\text{NaCl}) / m(\text{uzorka})] \cdot 100 \quad [3]$$

3.4.4. Određivanje udjela suhe tvari

Ukupna suha tvar je masa koja ostane po završetku određenog postupka sušenja na konstantnoj temperaturi do konstantne mase, a izražava se kao maseni udio. Suhu tvar čine svi sastojci osim vode i plinova. Za određivanje suhe tvari u zobenom napitku i fermentiranom natur desertu provedena je direktna metoda – sušenje u sušioniku. Temelji se na isparavanju vode iz uzorka sušenjem pri konstantnoj temperaturi od 102 ± 2 °C.

Korišteni pribor:

1. analitička vaga (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska)
2. eksikator sa sredstvom za izvlačenje vlage
3. aluminijska posudica s poklopcem
4. hvataljka
5. sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb)

Postupak:

Aluminijska posudica i poklopac zagriju se jedno pored drugoga u sušioniku na temperaturi održavanoj na 102 ± 2 °C, barem 30 minuta. Posudica s poklopcem odmah se premjesti u eksikator, ohladi do sobne temperature te odvaži s točnošću od 0,1 mg.

U aluminijsku posudicu doda se kvarcni pijesak da prekrije dno i odmah se izvaži 3 do 5 g fermentiranog proizvoda odnosno otpipetira 10 mL zobenog napitka. Posudica s poklopcem pored nje, zagrijava se u sušioniku dva sata na konstantnoj temperaturi. Poklopac se stavi na posudicu, izvadi iz sušionika i ostavi u eksikatoru. Nakon hlađenja, izvaži se s točnošću od 0,1 mg.

Postupak sušenja ponavlja se dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg pri čemu se zabilježi ona najniža masa.

Izračun:

$$\% \text{ suhe tvari} = [(zadnja \text{ odvaga} - \text{prazna posudica}) / \text{odvaga uzorka}] \cdot 100 \quad [4]$$

3.4.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari)

Udio mineralnih tvari određuje se žarenjem (uparavanjem i mineralizacijom) uzorka do konstantne mase na 550 °C.

Korišteni pribor:

1. analitička vaga (Mettler Toledo, AB 104, Švicarska)
2. peć za žarenje (Mufova peć), (LP-08, Instrumentaria, Zagreb)
3. sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb)
4. porculanski lončić za žarenje
5. eksikator sa sredstvom za izvlačenje vlage
6. hvataljka

Postupak:

Porculanski lončić izari se u Mufovoj peći pri temperaturi od 550 °C i ohladi u eksikatoru do postizanja sobne temperature. Nakon hlađenja, izvaži se, a zatim se u lončić na analitičkoj vagi izvaži 10 g napitka odnosno fermentiranog proizvoda. Uzorak se stavi u sušionik na 102 ± 2 °C dok se sasvim ne osuši, a zatim se stavi na žarenje u Mufovu peć i temperaturu od 550 °C dok sav sadržaj ne pobijeli. Nakon hlađenja u eksikatoru, porculanski lončić s pepelom se važe. Postupak žarenja ponavlja se do postizanja konstantne mase.

Izračun:

$$\% \text{ pepela} = [(zadnja \text{ odvaga} - \text{prazan lončić}) / \text{odvaga uzorka}] \cdot 100 \quad [5]$$

3.4.6. Određivanje reoloških karakteristika

Reološka svojstva zobenog napitka i fermentiranog natur deserta ispitana su na rotacijskom reometru RM-180 tvrtke Rheometric Scientific (Rheometric, Inc., Piscataway, SAD) (slika 7). To je prijenosni, za upotrebu jednostavni viskozimetar koji se prvenstveno koristi za kontrolu kvalitete i/ili razvoj novog proizvoda, kao u ovom slučaju. Može se koristiti manualnim radom, tj. ručno pomoću jednostavnih gumba na tipkovnici ili pomoću osobnog računala i dodatne programske podrške.

Sastoji se od cilindričnog vretena koje se rotira unutar nepomičnog vanjskog plašta (u koji se stavlja uzorak do oznake, približno 32 mL) pričvršćenih s tijelom uređaja i kućištem motora. Pri brzinama (D) od 100, 270, 440, 610, 780, 950, 1120 i 1290 s⁻¹ i temperaturi

uzorka od približno 20 °C, reometar određuje vrijednosti napona smicanja, T (Pa) i prividne viskoznosti (μ) u Pa s očitane na zaslonu uređaja.



Slika 7. Rotacijski reometar RM-180, Rheometric Scientific (vlastita fotografija)

Primjenom metode linearne regresije i dobivene jednadžbe, iz odnosa logaritama izmjerenih vrijednosti, brzine ($\log D$) i napona smicanja ($\log T$), odrede se reološki parametri: indeks tečenja (n) – broj uz x tj. prvi član jednadžbe, koeficijent konzistencije u mPa s kao antilog drugog člana jednadžbe i koeficijent regresije (R^2) koji predstavlja točnost metode.

3.4.7. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza provodila se s ciljem određivanja trajnosti proizvoda praćenjem prisutnosti i rasta mikroorganizama (kvasci i plijesni, enterobakterije – posebno rod *Salmonella*, koagulaza pozitivni stafilokoki) na hranjivim podlogama.

Korišteni pribor:

1. Bunsenov plamenik
2. laboratorijska vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka)
3. Erlenmeyerova tikvica od 2000 mL
4. Erlenmeyerova tikvica od 1000 mL
5. grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija)
6. infuzijske boce s čepovima
7. autoklav (Inko, Zagreb)
8. vodena kupelj
9. epruvete i čepovi
10. sterilne Petrijeve ploče
11. vorteks mješač (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
12. termostat (INKO 1935., Zagreb)
13. mikropipeta i tipsevi
14. štapić po Drigalskom

Reagensi:

1. hranjive podloge za određivanje prisutnosti kvasaca i plijesni (Sabouraud Dextrose Agar CAF 50), enterobakterija (Violet red bile glucose agar), koagulaza pozitivnih stafilokoka (Baird Parker Agar Base + Egg Yolk) proizvođača Biolife (Italija) i gotova hranjiva podloga za detekciju bakterija iz roda *Salmonella* (*Salmonella Shigella* agar) proizvođača BD (Njemačka)
2. fiziološka otopina
3. 2 % otopina natrijevog citrata
4. 96 % etanol

Priprema:

Prema uputi proizvođača, odvagana količina hranjive podloge otopi se u destiliranoj vodi i zagrijava na magnetskom grijaču dok se sav sadržaj ne otopi. Ravnomjerno se raspodjeli u infuzijske boce s čepom.

Pripremljena 0,9 %-tna otopina natrijevog klorida akupenserom se otpipetira po 9 mL u epruvete s čepom.

Radi nužnosti sprječavanja kontaminacije, mikrobiološka analiza provodi se u sterilnim uvjetima. Potrebno laboratorijsko posuđe i pribor unaprijed se pripremi i sterilizira, uz samoljepljivu indikator traku, suhom sterilizacijom, a pripremljeni reagensi steriliziraju se u autoklavu, postupkom mokre sterilizacije. Analiza se provodi pod otvorenim plamenom Bunsenovih plamenika.

Postupak:

Za detektiranje prisutnosti ciljanih mikroorganizama provodila se direktna analiza nacjepljivanja decimalnih razrjeđenja. U Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim kuglicama, odvaži se 20 g fermentiranog proizvoda te doda 180 mL prethodno pripremljene i temperirane otopine natrijevog citrata. Uzorak se, zbog svoje guste konzistencije, razrijedi i homogenizira na vorteks mješaču. Zobeni napitak nije potrebno razrijediti. Iz homogeniziranog uzorka sterilnom mikropipetom prenese se 1 mL u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Razrjeđenje se dobro homogenizira te se čistim nastavkom mikropipete uzme 1 mL razrjeđenja i prenese u drugu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavlja do željenog decimalnog razrjeđenja.

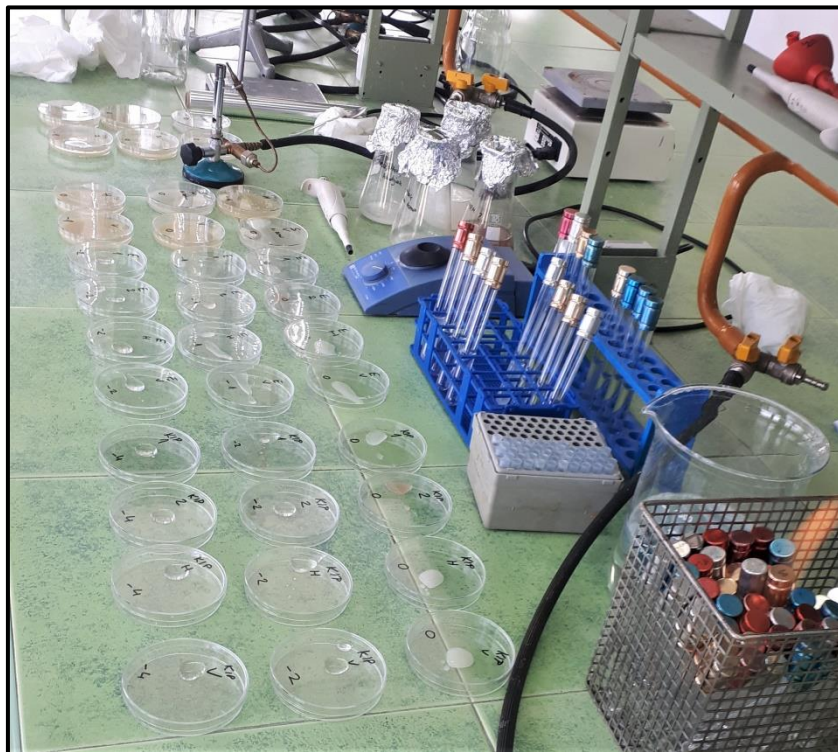
Mikropipetom uzme se 1 mL decimalnog razrjeđenja i pažljivo pod kutem od 45° otpusti u prethodno označenu Petrijevu ploču. Potom se u svaku ploču ulije prethodno otopljena hranjiva podloga odabrana za rast specifičnog mikroorganizma. Poklopljena ploča se jednolično promiješa kružnim pokretima i položi na vodoravnu podlogu dok se potpuno ne skrutne. Zatim se okrene poklopcem prema dolje i stavi u termostat na 37 °C. Podloge za analizu prisutnosti kvasaca i plijesni, čuvane su na sobnoj temperaturi. Mikrobiološka analiza kvasaca i plijesni te enterobakterija provodila se svakih 7 dana dok je za koagulaza pozitivne stafilokoke ona provedena samo 1. i 28. dan analiza.

Za analizu bakterija iz roda *Salmonella*, samo na 1. dan analize tj. na kraju proizvodnog procesa, korištena je gotova hranjiva podloga u Petrijevim pločama čuvana u hladnjaku na +4 °C. Nakon temperiranja, sterilnom mikropipetom uzme se 100 µL homogeniziranog uzorka i pažljivo prenese na podlogu. Štapićem po Drigalskom, prethodno uronjenim u etanol i spaljenim u plamenu, uzorak se ravnomjerno razmaže po podlozi te ostavi u termostatu pri temperaturi od 37 °C.

Porasle kolonije broje se na brojaču kolonija uz pomoć povećala, a rezultat se izražava kao broj kolonija u 1 mL (eng. Colony - forming Unit, CFU).

Izračun:

$$\text{CFU mL}^{-1} = \text{broj kolonija} / (\text{nacijepljen volumen} \cdot \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}) \quad [6]$$



Slika 8. Nacjepljivanje Petrijevih ploča (vlastita fotografija)

3.4.8. Senzorska analiza

Senzorsko ocjenjivanje proizvedenog zobenog napitka čuvanog u hladnjaku i sobnoj temperaturi te proizvedenog fermentiranog natur deserta provela su 3 ocjenjivača i to 1., 7., 14., 21. i 28. dan. Za svaki uzorak ocjenjivana su sljedeća svojstva: izgled, boja, konzistencija, miris i okus. Primjer obrasca za senzorsko ocjenjivanje prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Obrazac za senzorsko ocjenjivanje

| | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Datum: | | | | | | | | | |
| Ime i prezime | | | | | | | | | |
| Svojstvo i opis svojstva | Maksimalan broj bodova | | | | | | | | |
| Izgled (homogena površina, bez izdvajanja faza, bez vidljivih grudica, prljavo bijela do siva boja) | 1 | | | | | | | | |
| Boja (prljavo bijela do siva boja) | 1 | | | | | | | | |
| Konzistencija (homogena, glatka, bez grudica, bez razdvajanja faza) | 4 | | | | | | | | |
| Miris (blago i ugodno kiselkast, miris po žitaricama) | 2 | | | | | | | | |
| Okus (blago kiselo, po žitaricama i orašastim plodovima, bez grudica, fine konzistencije u ustima) | 12 | | | | | | | | |
| Ukupno | 20 | | | | | | | | |
| Komentari: | | | | | | | | | |

3.5. OBRADA REZULTATA

Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel 2010, a prikazani su kao aritmetička sredina usporednih serija uzoraka (napitak temperature hladnjaka, napitak sobne temperature, pasterizirani natur desert) s pripadajućim standardnim devijacijama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je optimiranje proizvodnje zobenog napitka i njegove fermentacije s krajnjim ciljem dobivanja proizvoda sličnog jogurtu, ali biljnog porijekla i bez upotrebe sintetskih dodataka. Kroz razdoblje od 28 dana bilo je potrebno pratiti i odrediti fizikalno-kemijske, reološke, mikrobiološke i senzorske karakteristike na sljedećim uzorcima: zobeni napitak temperature hladnjaka, zobeni napitak sobne temperature, fermentirani zobeni napitak (natur desert) te pasterizirani i fermentirani zobeni napitak (pasterizirani natur desert).

4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

Cilj preliminarnih eksperimenata bio je odrediti trajanje fermentacije zobenog napitka i dobivanje konačnog proizvoda, za potrošača, poželjnih senzorskih svojstava s obzirom na različite udjele upotrijebljenih poboljšivača okusa i teksture.

Prvi pripremni rezultati odnosili su se na fermentaciju organskog zobenog napitka proizvođača Dennree jogurnom kulturom YoMix 20, 25 i 30 DCU. Prema tablici 4 vidljivo je da je fermentacija većine uzoraka trajala u prosjeku 3 sata.

Tablica 4. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije organskog zobenog napitka proizvođača Dennree jogurnom kulturom YoMix 20 DCU (20), 25 DCU (25), 30 DCU (30) i 25 DCU uz dodatak 1 % glukoze (25 + 1 % glu)

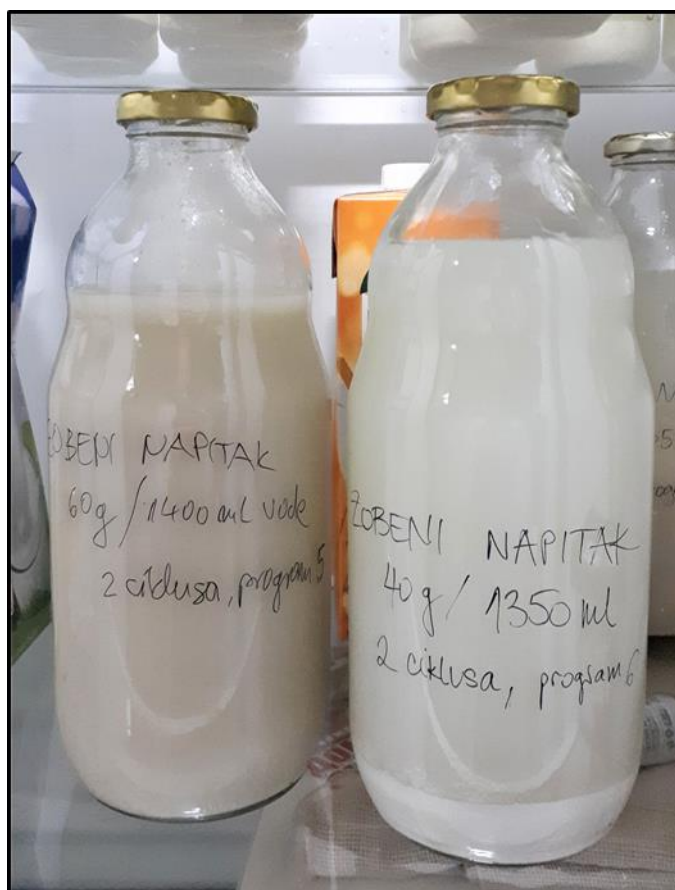
| vrijeme | pH | | | |
|---------|------|------|------|--------------|
| | 20 | 25 | 30 | 25 + 1 % glu |
| 1 h | - | - | - | - |
| 2 h | 5,97 | 5,71 | 5,09 | 5,81 |
| 3 h | 5,13 | 4,79 | 4,54 | 4,93 |
| 3,5 h | | 4,54 | | 4,64 |

Nakon prekida fermentacije i naglog hlađenja, uočeno je odvajanje faza; u uzorku oznake 30, ono je bilo najviše izraženo dok je u uzorku oznake 25, ono bilo najmanje primjetno. Nakon čuvanja u hladnjaku (slika 9) bilo je vrlo uočljivo odvajanje faza u svim uzorcima što bi kod potrošača bilo posebno neprihvatljivo.



Slika 9. Odvajanje faza u uzorcima nakon prekonocnog čuvanja u hladnjaku (vlastita fotografija)

Iz tog razloga, sljedeća faza eksperimentalnih ispitivanja odnosila se na proizvodnju vlastitog zobenog napitka korištenjem uređaja za proizvodnju biljnih napitaka te njihove fermentacije. Prvi način proizvodnje dao je vrlo gusti zobeni napitak iz čega je zaključeno da je upotrijebljeno previše zobениh pahuljica pa je postupak ponovljen, ali uz izmjenu količina sastojaka i načina cijedenja. Kao rezultat, dobiven je rjeđi napitak, svjetlije boje. Treći tip napitka proizveden je bez zagrijavanja iz namakanih zobениh pahuljica pa je time dobiven najbježi napitak. Nakon nekoliko dana čuvanja u hladnjaku, opaženo je odvajanje faza u napitcima (slika 10) što je ipak očekivano u takvoj vrsti proizvoda ukoliko se ne dodaju stabilizatori.



Slika 10. Odvajanje faza u zobenim napitcima nakon nekoliko dana čuvanja u hladnjaku (vlastita fotografija)

Proizvedeni zobeni napitci fermentirani su jogurtnom kulturom i prema mjerenim pH vrijednostima iz tablice 5 fermentacija nije išla očekivanim konstantnim padom pH ni nakon 4 dana od početka stavljanja uzoraka na fermentaciju.

Tablica 5. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije (jogurtnom kulturom) zobenih napitaka proizvedenih usitnjavanjem i zagrijavanjem (1C, P5), ponovljenim usitnjavanjem i zagrijavanjem (2C, P5) te usitnjavanjem sadržaja bez zagrijavanja (2C, P6)

| vrijeme | pH | | |
|-----------------|--------|--------|--------|
| | 1C, P5 | 2C, P5 | 2C, P6 |
| 0 h | 7,15 | 7,41 | 7,24 |
| 2 h | 6,90 | 7,05 | 7,17 |
| 4 dana od ferm. | 6,4 | 6,1 | 6,4 |

Senzorskim ocjenjivanjem fermentiranih uzoraka uočeno je odvajanje faza u uzorku oznake 1C, P5. Uzorak oznake 2C, P5 bio je vrlo rijedak uz prisustvo sluzavih tvari što se pripisuje svojstvu kulture dok je uzorak oznake 2C, P6 sadržavao najviše vodene faze i okusom bio je „najkiseliji“. S obzirom da fermentacija nije došla do kraja, odnosno, nije postignut pH od 4,6 ni nakon nekoliko dana, pretpostavlja se da mikroorganizmi nisu imali dovoljno raspoloživih ugljikohidrata pogodnih za metaboliziranje. Zbog toga ni jedan uzorak nije bio dovoljno kiseo. Zaključeno je da je mikrobnjoj kulturi, u ovom slučaju jogurtnoj kulturi, potreban jednostavniji izvor ugljika.

Shodno tome, sljedeći pokus bio je fermentacija odabirom druge starter kulture, ovoga puta onom koja je namijenjena fermentaciji biljnih napitaka. Prema rezultatima dobivenim mjerenjem pH vrijednosti (tablica 6), ali i senzorske procjene, odlučeno je da će se u nastavku ovih inicijalnih ispitivanja koristiti samo jedna vrsta starter kulture (VEGE 053). Po senzorskoj ocjeni, uzorci su bili ugodno kiseli, ali rijetki po konzistenciji pa je u ovoj fazi odlučeno da će se dodati škrob i pektin kao prirodna sredstva za ugušćivanje te sol radi poboljšanja okusa.

Tablica 6. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije proizvedenog zobenog napitka *Vege* kulturama namijenjenim za fermentaciju biljnog napitka

| vrijeme | pH | | |
|---------|----------|----------|----------|
| | Vege 033 | Vege 053 | Vege 081 |
| 0 h | 8,04 | 7,92 | 8,05 |
| 2 h | 7,34 | 7,22 | 7,58 |
| 4 h | 6,16 | 5,75 | 7,00 |
| 6 h | 5,68 | 5,61 | 5,84 |
| 8 h | 5,57 | 5,53 | 5,68 |
| 9 h | 5,57 | 5,54 | 5,61 |
| 22 h | 5,02 | 4,50 | 4,42 |
| 26 h | 4,96 | | |

Prva receptura pokazala je da dodatak ugušćivača i poboljšivača uvelike ubrzava vrijeme fermentacije (tablica 7). Uzorak 1 sadržavao je 1 % škroba, 1 % pektina i 0,5 % soli, uzorak 2 u svom sastavu imao je 1 % škroba, 1 % pektina te 1 % soli dok je za uzorak 3 odabrano brašno sjemenki rogača (1 %) kao sredstvo za zgušnjavanje i 1 % soli. Senzorskom

ocjenom zaključeno je da je uzorak 3 nezadovoljavajuć po izgledu i po okusu dok su uzorci 1 i 2 bili fine konzistencije, homogeni, ali preslani.

Tablica 7. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije za uzorak s 1 % škroba, 1 % pektina i 0,5 % soli (1), uzorak s 1 % škroba, 1 % pektina i 1 % soli (2) te uzorak s 1 % brašna sjemenki rogača i 1 % soli (3)

| vrijeme | pH | | |
|---------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 0 h | 5,60 | 5,30 | 6,42 |
| 2 h | 5,34 | 4,97 | 5,49 |
| 4 h | 5,00 | 4,75 | 4,76 |
| 5 h | 4,63 | 4,69 | 4,53 |
| 6 h | | 4,54 | |

U krajnjoj fazi eksperimentalnih ispitivanja, bilo je potrebno korigirati jedino udio soli u fermentiranom proizvodu. Definiralo se uz još dvije izmjene recepture dok se nije postigla ona konačna. U tablici 8 prikazane su vrijednosti mjerenja pH tijekom fermentacije uzorka s 0,1 % i 0,25 % koji su i dalje rezultirali preslanim okusom, a u tablici 9 prikazane su vrijednosti tijekom fermentacije za uzorak s 0,2 % soli.

Tablica 8. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije za uzorak s 0,1 (1) i 0,25 % (2) dodane soli

| vrijeme | pH | |
|---------|------|------|
| | 1 | 2 |
| 0 h | 5,88 | 5,80 |
| 2 h | 5,53 | 5,47 |
| 4 h | 4,62 | 4,63 |

Tablica 9. pH vrijednosti mjerene tijekom fermentacije za uzorak s 0,2 % soli (1)

| vrijeme | pH |
|---------|------|
| | 1 |
| 0 h | 5,99 |

| | |
|-----|------|
| 2 h | 5,66 |
| 4 h | 4,60 |

Iz dobivenih rezultata vidi se da je manji udio soli omogućio mikroorganizmima brže metaboliziranje fermentabilnih sastojaka, odnosno, vrijeme trajanja fermentacije ubrzalo se za 1 sat u slučaju kada je dodan udio soli ispod 0,5 % na količinu zobenog napitka.

Posljednju recepturu s udjelom soli od 0,2 % isprobali su potrošači koji u svakodnevnom životu konzumiraju slične proizvode pa je preporučeno dodatno smanjenje slanosti. Odlučeno je da konačni sastav natur fermentiranog deserta sadrži 1 % škroba, 1 % pektina i 0,15 % soli te da se njime ulazi u glavni pokus. Tablica 10 prikazuje pH vrijednosti dobivene tijekom fermentacije uzorka s 0,15 % soli (oznake 1) te usporednih uzoraka s 0,15 % soli uz provedeni postupak pasterizacije (oznake 1P i 1P/2). Korak pasterizacije (73 °C/15 s) uveden je zbog mikrobioloških rezultata (vidi poglavlje 4.8.) provedene analize na uzorku 1.

Tablica 10. pH vrijednosti uzoraka s 0,15 % soli (1) te usporednih uzoraka s 0,15 % soli uz provedeni postupak pasterzacije (1P i 1P/2)

| vrijeme | pH | | |
|---------|------|------|------|
| | 1 | 1P | 1P/2 |
| 0 h | 6,28 | 6,06 | 6,85 |
| 2 h | 5,95 | 5,72 | 6,20 |
| 4 h | 4,64 | 4,64 | 4,80 |
| 5 h | | | 4,62 |

4.2. ODREĐIVANJE KISELOSTI

Kiselost zobenog napitka i fermentiranog zobenog napitka određivana je, svakih 7 dana, mjerenjem tzv. aktivne kiselosti koja se izražava koncentracijom vodikovih iona tj. pH vrijednošću. Osim analiza provedenih na zobenim napitcima i fermentiranim proizvodima tijekom 28 dana, pH vrijednost mjerena je i tijekom samog postupka fermentacije, do postizanja vrijednosti 4,6. Rezultati istraživanja (Angelov i sur., 2006) fermentacije zobenog napitka bakterijama mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* uz dodatak saharoze i drugih

zaslađivača (saharin, aspartam) u različitim koncentracijama, pokazali su da je optimalno vrijeme formiranja mliječne kiseline 8 h. Fermentacija zobenog napitka prema Tsetsegmaa i Tsetsegee (2016), uz dodatak saharoze kao izvora energije za upotrijebljenu mješovitu starter kulturu (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus acidophilus*), trajala je također 8 h. Mårtensson i sur. (2002) inokulirali su zobeni napitak različitim probiotičkim sojevima (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*) u kombinaciji s jogurtnom kulturom što je rezultiralo trajanjem fermentacije od čak 16 h. U ovom radu, kraj fermentacije i pH vrijednost od 4,6 postignuti su za samo 4 h upotrebom kombinacije definiranih sojeva bakterija mliječne kiseline (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactic*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) i poboljšivača okusa i konzistencije. Prema inicijalnim ispitivanjima, dokazalo se da je dodatak soli, škroba i pektina utjecao na kraće trajanje fermentacije. Viši udio soli usporavao je fermentabilnu aktivnost dok je dodatak ispod 0,5 % u krajnjoj recepturi ubrzao fermentaciju za 1 h. S obzirom da rodovi *Lactobacillus* i *Streptococcus* imaju amilolitičku aktivnost (Panda i Ray, 2016) odnosno produciraju enzime amilaze koji konvertiraju škrob u jednostavnije šećere pogodnije za metaboliziranje, može se pretpostaviti da je dodatak škroba u recepturu krajnjeg proizvoda, pogodovao većoj dostupnosti jednostavnih ugljikohidrata, većoj aktivnosti mikroorganizama, što je rezultiralo bržom fermentacijom. Prema istraživanju Chatterjee i sur. (2016) utvrđeno je da pektin svojim prebiotičkim djelovanjem koristi bakterijama mliječne kiseline (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*) stimulirajući njihov rast i aktivnost. Iako su potrebna dodatna istraživanja utjecaja pektina na preostale sojeve bakterija mliječne kiseline korištenih u ovom radu (osim *Lactobacillus acidophilus*) može se pretpostaviti da je pektin, dodan u svrhu poboljšanja konzistencije zbog svoje sposobnosti tvorbe gela, pripomogao kraćem trajanju fermentacije.

Različite brzine fermentacije mogu se pripisati specifičnostima odabranih sojeva i različitih sastava polazišnog medija za fermentaciju. Poželjno je kratko vrijeme fermentacije kako bi se rizik kontaminacije proizvoda sveo na minimum.

Prema tablici 11 i rezultatima čuvanja tijekom 28 dana, vidljivo je da su oba uzorka proizvedenih zobenih napitaka, onaj čuvan u hladnjaku na +4 °C i onaj čuvan na sobnoj temperaturi (20 °C) održavali pH oko 8, tijekom prva dva tjedna. Nakon 14. dana analize došlo je do laganog zakiseljavanja uzoraka, odnosno snižavanja za jednu pH jedinicu. Time je potvrđeno da je u uzorcima došlo do promjena zbog kojih analiza 28. dana nije više bila

moгуća (kvarenje). Proizvedeni natur desert te pasterizirani natur desert, inokulirani mješavinom starter kultura namijenjenih za fermentaciju biljnih napitaka, tijekom svih 28 dana čuvanja zadržali su područje niskog pH, u rasponu 4,3 – 4,6 što je u korelaciji s provedenim istraživanjem Tsetsegmaa i Tsetsegee (2016) u kojem su rezultati mjerenja kroz 21 dan dali vrijednosti pH od $4,50 \pm 0,05$ za fermentirani zobeni proizvod inokuliran gotovo identičnom mješovitom starter kulturom (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus acidophilus*) kao i u ovom diplomskom radu.

Tablica 11. pH vrijednosti mjerene tijekom 28 dana čuvanja uzoraka

| dani čuvanja | pH | | | |
|--------------|-----------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | $8,16 \pm 0,15$ | $8,26 \pm 0,01$ | 4,51 | $4,29 \pm 0,08$ |
| 7. | $7,96 \pm 0,11$ | $8,17 \pm 0,14$ | 4,37 | $4,37 \pm 0,03$ |
| 14. | $6,97 \pm 1,15$ | $6,92 \pm 0,99$ | 4,56 | $4,38 \pm 0,06$ |
| 21. | $6,90 \pm 1,38$ | $7,68 \pm 0,64$ | 4,53 | $4,42 \pm 0,17$ |
| 28. | / | / | 4,61 | $4,37 \pm 0,25$ |

4.3. ODREĐIVANJE UDJELA UGLJIKOHIDRATA

Od sadržaja ugljikohidrata, svakih sedam dana u svim uzorcima određivan je udio disaharida maltoze. Prema rezultatima prikazanim u tablici 12 vidljivo je da je udio maltoze (%) za zobeni napitak čuvan u hladnjaku i na sobnoj temperaturi na početku analiza bio približno isti. U oba uzorka već nakon jednog tjedna udio maltoze smanjio se za 2 %, a smanjenje se nastavilo do kraja ispitivanja. U fermentiranim zobenim napitcima, udio maltoze na kraju fermentacije iznosio je oko 2 % što je očekivano s obzirom da je supstrat na metaboličkom putu do mliječne kiseline. Isti udio određen je i nakon protekla tri tjedna čuvanja. Kao i u slučaju napitaka, došlo je do smanjenja udjela maltoze, pri kraju čuvanja od ukupnih 28 dana. Može se pretpostaviti da je uzrok smanjenja daljnja aktivnost bakterija mliječne kiseline i mogućih drugih mikroorganizama koji jednostavne ugljikohidrate koriste kao izvor energije.

Mårtensson i sur. (2002) analizirali su udio mono- i disaharida u različitim fermentiranim proizvodima na bazi zobenog napitka, bez drugih dodataka, prije i poslije fermentacije. U maltozom bogatom proizvodu svi primjenjeni bakterijski sojevi bili su u

stanju iskoristiti značajnu količinu tog disaharida. Kontrolni uzorak sadržavao je oko 6,5 % dok je nakon fermentacije u većini uzoraka s definiranim mikrobnim sojevima udio maltoze iznosio 5,5 %. Slična količina fermentabilnih ugljikohidrata, u ovom slučaju maltoze i glukoze, utvrđena je u proizvodu druge zobene baze. Kontrolni uzorak tog proizvoda sadržavao je 7 % maltoze i glukoze, a raspon između 5 i 6 % odnosio se na uzorke nakon provedene fermentacije. Prema tim rezultatima mogu se usporediti rezultati ovog diplomskog rada uzimajući zobeni napitak kao uzorak prije fermentacije i natur desert kao uzorak dobiven poslije fermentacije. Kao i prema rezultatima Mårtensson i sur. (2002) za uzorak prije fermentacije, napitak od zobi čuvan u hladnjaku i napitak čuvan na sobnoj temperaturi, sadržavali su udio maltoze od približno 6 %. Nakon fermentacije udio fermentabilnih šećera smanjio se za 1 % u odnosu na kontrolni uzorak dok se u ovom istraživanju utvrdilo da je pad udjela maltoze otprilike 4 %, uspoređujući s ishodišnim zobenim napitkom. To odstupanje u rezultatima (3 %) ovih ispitivanja može se pripisati razlikama u samom odabiru sirovina, načinu proizvodnje i trajanju fermentacije, upotrijebljenim mikrobnim kulturama te dodanim poboljšivačima i konačnim formulacijama proizvoda koje se moguće utjecale na nutritivni profil.

Tablica 12. Udio maltoze (%) u uzorcima tijekom 28 dana čuvanja

| dani čuvanja | udio maltoze [%] | | | |
|--------------|------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | 5,55 ± 1,80 | 6,10 ± 0,45 | 2,16 | 1,60 ± 0,28 |
| 7. | 3,75 ± 0,00 | 4,09 ± 0,34 | 2,47 | 1,98 ± 0,53 |
| 14. | 3,81 ± 0,90 | 4,02 ± 1,31 | 2,12 | 1,41 ± 0,75 |
| 21. | 2,50 ± 0,74 | 2,05 ± 1,46 | 1,21 | 0,80 ± 0,29 |
| 28. | / | / | 1,52 | 0,21 ± 0,10 |

4.4. ODREĐIVANJE UDJELA SOLI

Udio soli određivan je u svim uzorcima 1. i 28. dan čuvanja, titracijskom metodom po Mohru. Prema tablici 13 dobiveni su rezultati koji potvrđuju očekivanje da je u fermentiranom zobenom napitku udio soli viši zbog dodatka natrijevog klorida kao poboljšivača okusa u udjelu od 0,15 % na količinu upotrijebljenog napitka. Tijekom perioda čuvanja od 28 dana nije došlo do značajne promjene % soli u natur desertima, ali ni u napitcima. U zobenom napitku čuvanom u hladnjaku i onom čuvanom na sobnoj temperaturi,

analizom je 1. dana utvrđen udio soli od, u prosjeku, 0,89 % koji se očuvao i kroz sljedeća četiri tjedna. U fermentiranom natur desertu, definiran je udio soli u rasponu 1,5 – 2,3 % na početku i na kraju provedenih analiza. Iz navedenog može se zaključiti da proizvod na bazi zobi ima neznatan udio soli, manji od 1 %, ukoliko se ne dodaje kao funkcionalni sastojak. To potvrđuju Grasso i sur. (2020) koji su usporedili nutritivni sastav nekoliko vrsta biljnih jogurta. Udio soli u proizvodu od soje iznosio je 0,07 %, indijskog oraščića 0,10 %, badema 0,36 %, konoplje 0,03 %. Za proizvode na bazi zobi i usporedbu sastava i konkretno udjela soli, potrebna su dodatna istraživanja.

Tablica 13. Udio soli (%) u uzorcima 1. i 28. dana čuvanja

| dani čuvanja | udio soli [%] | | | |
|--------------|---------------|---------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | 1,05 ± 0,12 | 0,81 ± 0,11 | 1,51 | 2,33 ± 0,35 |
| 28. | 0,82 ± 0,12 | 0,88 ± 0,05 | 1,63 | 1,52 ± 0,24 |

4.5. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI

Suha tvar je ostatak koji zaostane nakon izdvajanja vode odnosno postupka sušenja materijala. U ovom radu, udio suhe tvari (%) određivan je prvi i posljednji dan analiza, sušenjem u sušioniku na 102 ± 2 °C. Rezultati 1. dana za napitak čuvan u hladnjaku i napitak čuvan na sobnoj temperaturi bili su približno isti, 2,70 % odnosno 2,53 %. Nakon 28. dana čuvanja rezultati su pokazali blago smanjenje udjela suhe tvari, na 2,32 % odnosno 1,57 %. S druge strane, rezultati dobiveni sušenjem uzorka fermentiranih natur deserata dali su očekivane više vrijednosti za 1. dan analize što se pripisuje dodatku škroba, pektina i soli u sami zobeni napitak. Nakon četiri tjedna, udio suhe tvari za natur desert bio je također neznatno niži (4,49 %) dok je za pasterizirani uzorak iznosio 4,77 % (tablica 14).

Pregledom dosadašnjih radova, rezultati su se pokazali raznolikim. U radu Pacala i sur. (2012) ispitana su osnovna fizikalno-kemijska svojstva mješavina žitarica odnosno pripremljenih kaša više različitih kombinacija pšenice, prosa, ječma i zobi uz dodatak kristalnog šećera (saharoze). Takvim slatkim kašama određena je suha tvar prije i poslije fermentacije. Udio suhe tvari u svim kombinacijama prije fermentacije, iznosio je oko 12 %, a

nakon zabilježen je raspon 10 – 12 %. El-Batawy i sur. (2019) su u svojem istraživanju dobili udio suhe tvari u zobenom napitku, proizvedenom iz zobenog brašna, 21,51 % dok je u uzorku istog napitka, ali fermentiranog, iznosio $21,63 \% \pm 0,95$. Suha tvar prema Tsetsegmma i Tsetsegee (2016) za fermentirani proizvod od zobi uz dodatak saharoze, iznosi $10,0 \% \pm 0,1$.

Udjeli suhe tvari dosadašnjih istraživanja i ovog diplomskog rada nisu usporedivi, a razlikuju se zbog količina upotrijebljenih sirovina (zobi i/ili zobenog brašna i vode) i načinu proizvodnje te zbog drugih izabranih sastojaka poput škroba, saharoze ili koncentrata proteina čijim se dodatkom povećava suha tvar konačnog proizvoda. Prema dobivenom, u sastavu proizvoda ovog rada voda zauzima približno 95 %.

Tablica 14. Udio suhe tvari (%) u uzorcima 1. i 28. dan čuvanja

| dani čuvanja | udio suhe tvari [%] | | | |
|--------------|---------------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | $2,70 \pm 0,06$ | $2,53 \pm 0,08$ | 4,59 | $4,45 \pm 0,17$ |
| 28. | $2,32 \pm 0,60$ | $1,57 \pm 0,80$ | 4,49 | $4,77 \pm 0,01$ |

4.6. ODREĐIVANJE PEPELA (UDJELA MINERALNIH TVARI)

Udio mineralnih tvari određivan je spaljivanjem uzoraka na 550 °C na samo 1. i 28. čuvanja, a dobiveni ostatak tog postupka naziva se pepeo. Iz tablice 15 i dobivenih rezultata, može se uvidjeti da udio mineralnih tvari svih uzoraka ne prelazi 0,5 % što je u korelaciji s radovima drugih autora. El-Batawy i sur. (2019) navode da je udio pepela zobenog napitka u njihovom istraživanju iznosi 0,342 %, a u istom uzorku nakon fermentacije udio pepela iznosi $0,34 \pm 0,02$. Tsetsegmma i Tsetsegee (2016) su u svojem istraživanju procjenjivali svojstva fermentiranog zobenog napitka pa je kao rezultat dobiven udio pepela od 0,4 %.

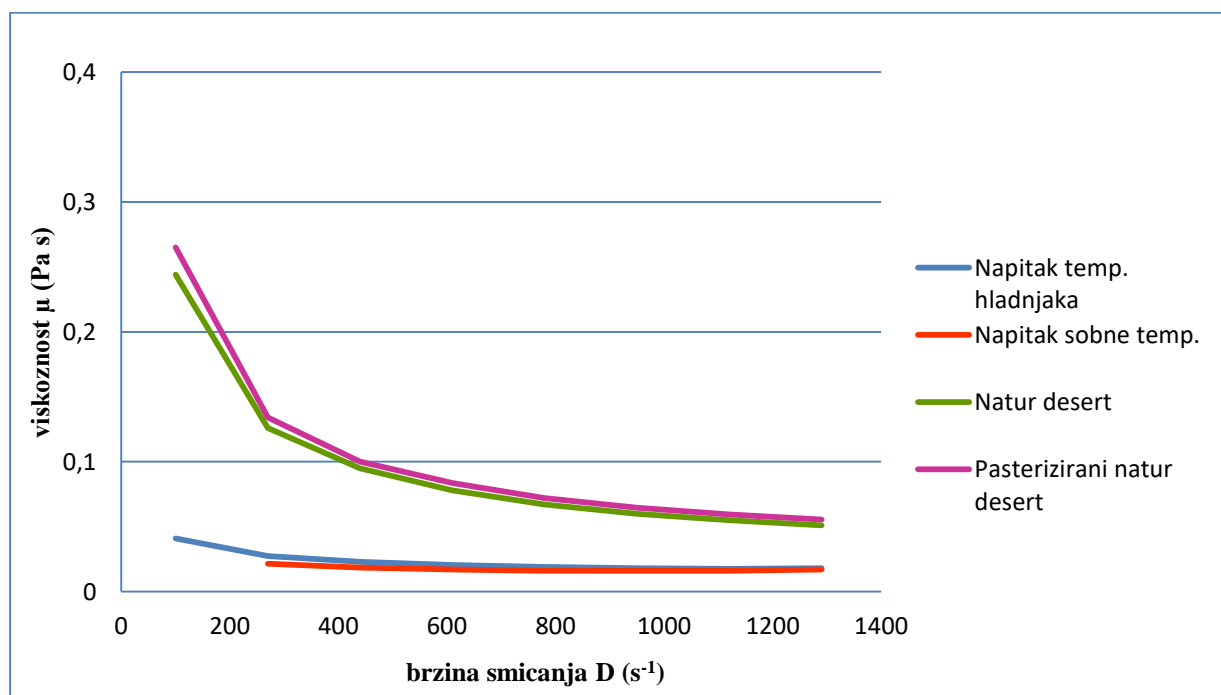
Tablica 15. Udio mineralnih tvari (%) u uzorcima 1. i 28. dan čuvanja

| dani čuvanja | udio mineralnih tvari [%] | | | |
|--------------|---------------------------|-----------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | $0,05 \pm 0,002$ | $0,04 \pm 0,01$ | 0,21 | $0,20 \pm 0,02$ |
| 28. | $0,05 \pm 0,02$ | $0,08 \pm 0,02$ | 0,18 | $0,22 \pm 0,01$ |

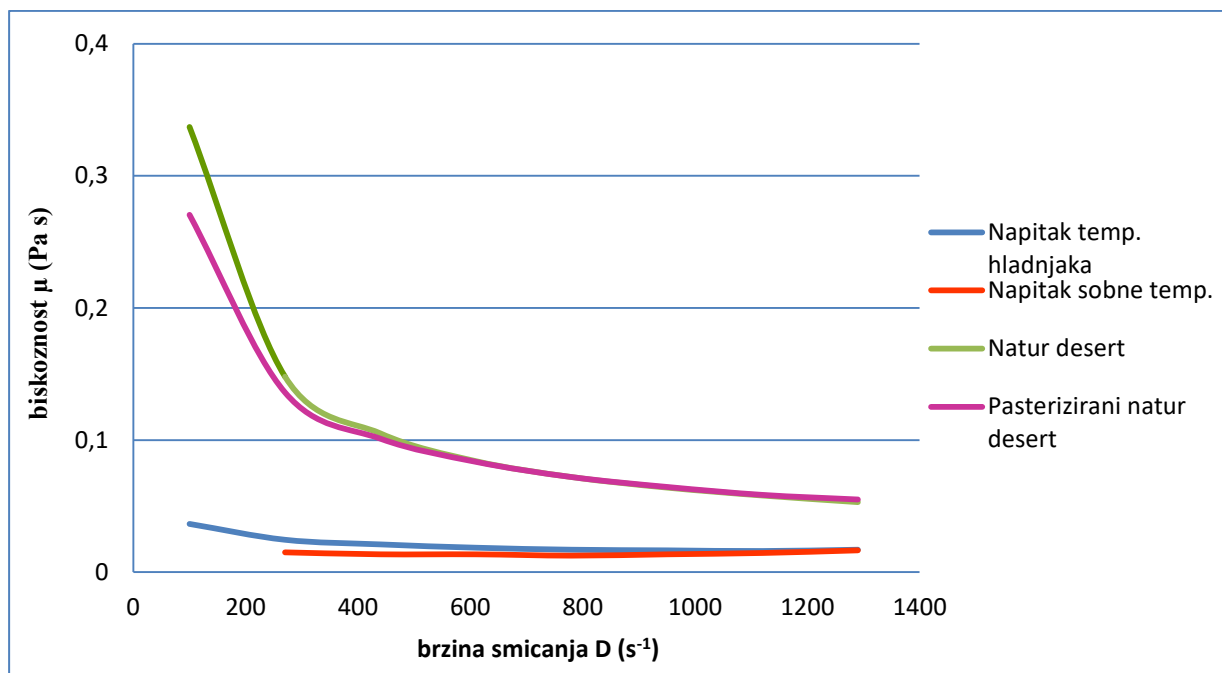
4.7. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA

Reološka svojstva materijala određivana su na rotacijskom reometru definiranjem vrijednosti viskoznosti (μ) u odnosu na brzinu smicanja (D) materijala. Viskoznost je fizikalna veličina koja opisuje otpor tekućine prema tečenju. Utjecajem međumolekularnih sila molekule tekućine međusobno se privlače i time opiru smicanju susjednih slojeva. Što je tekućina više pokretljiva, manje je viskozna i ima nižu vrijednost μ . Na slici 11 a-e prikazana je ovisnost viskoznosti (μ , Pa s) o brzini smicanja (D , s^{-1}) uzoraka zobenog napitka (čuvanih na temperaturi hladnjaka i sobnoj temperaturi) te uzoraka fermentiranih napitaka (čuvanih na temperaturi hladnjaka) za 1. (a), 7. (b), 14. (c), 21. (d) i 28. (e) dan čuvanja.

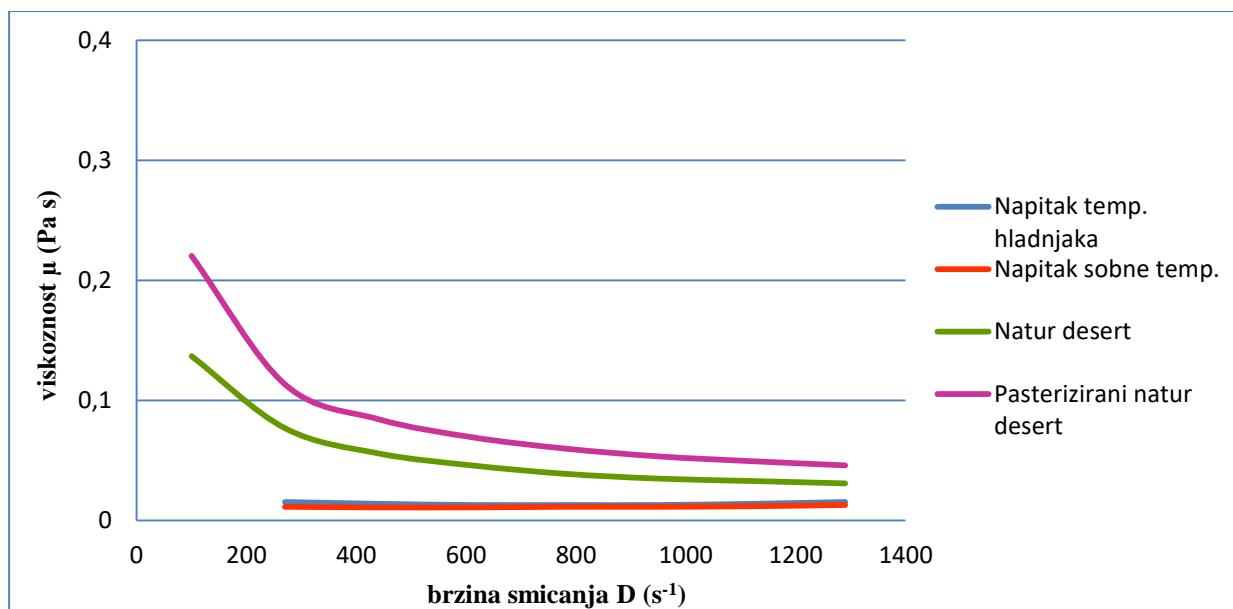
a)



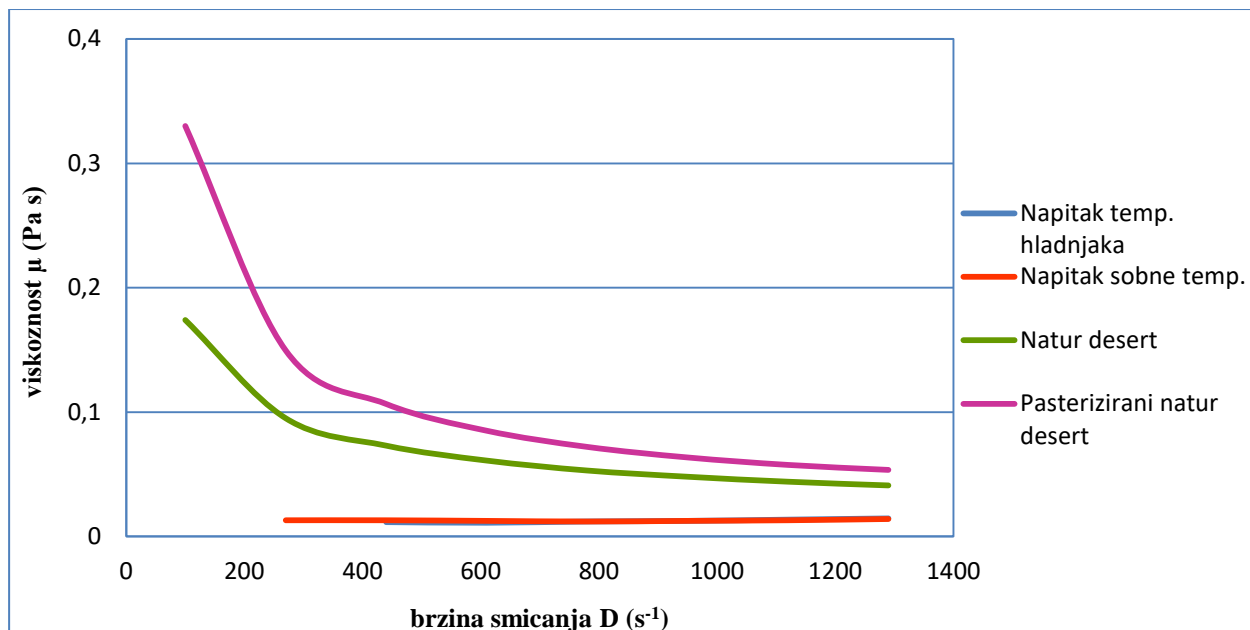
b)



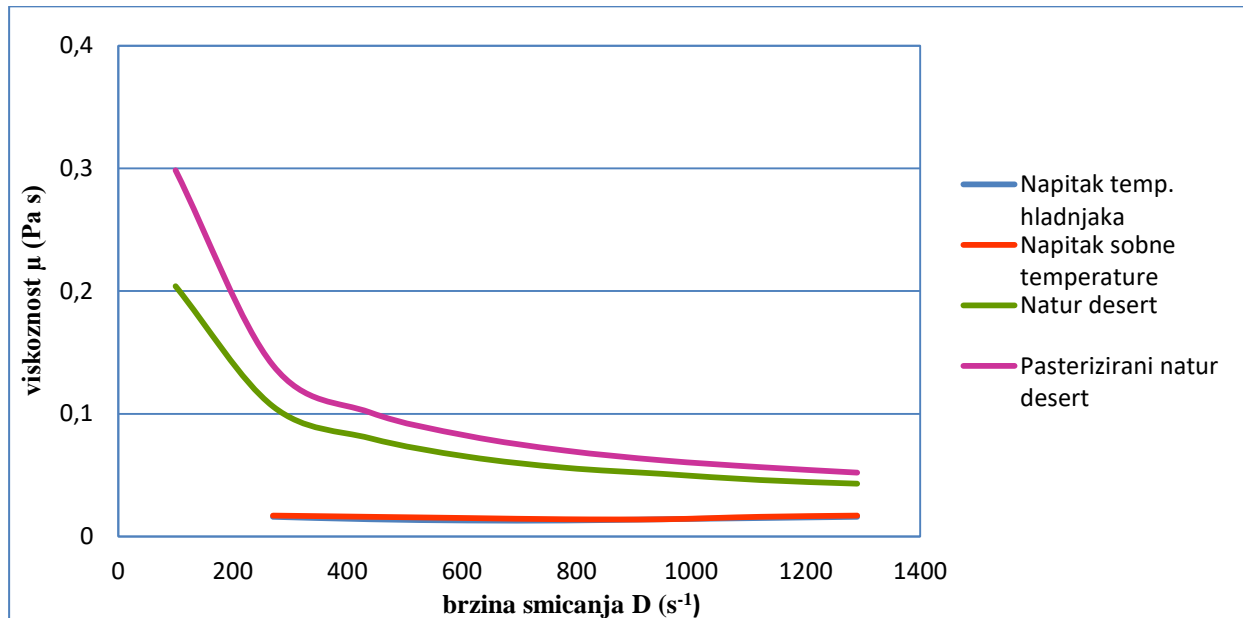
c)



d)



e)



Slika 11. Ovisnost viskoznosti (μ , Pa s) o brzini smicanja (D , s^{-1}) uzoraka zobenog napitka i fermentiranih zobenih napitaka 1. (a), 7. (b), 14. (c), 21. (d) i 28. (e) dan čuvanja

Na viskoznost uglavnom utječu temperatura, koncentracija i stupanj usitnjavanja izabranog materijala. Također, sirovine bogate vlaknima (β -glukan u zobi) pridonose

viskoznosti krajnjeg proizvoda zbog svoje sposobnosti stvaranja viskoznih otopina (Sobiechowska i sur., 2020; Zarzycki i sur., 2011). Tijekom razvoja novih proizvoda, viskoznost ima veliku ulogu u definiranju teksture i općenito postizanju željenih senzorskih svojstava. S obzirom da je zobeni napitak više tekući materijal, prije samog mjerenja i provođenja analiza mogla se očekivati niža vrijednost viskoznosti u odnosu na gotovi fermentirani proizvod. Početak analiza dao je rezultate mjerenja viskoznosti u prosjeku od 17 mPa s za napitke te 55 mPa s za fermentirane natur deserte pri najvećim brzinama od 1290 s⁻¹. Ono što vrijedi za sve mjerene uzorke i za sve dane čuvanja je smanjenje viskoznosti s povećanjem brzine s tim da se nagli pad postigao prvim porastom brzine, sa 100 na 270 s⁻¹. Dobiveni rezultati ne podudaraju se s dosadašnjim ispitivanjima u kojima su vrijednosti viskoznosti bile puno više. U radu Tsetsemaa i Tsetsegee (2016) nije bilo značajnih promjena u viskoznosti fermentiranog zobenog napitka tijekom 21 dan, a ona je iznosila 400 ± 30 mPa s dok su Gupta i sur. (2010) u svojem radu dobili još višu vrijednost fermentiranog zobenog napitka. Iznosila je 1000 mPa s i nije bilo značajnih promjena tijekom 21 dan hladnog čuvanja. Ove nepodudarnosti mogu se pripisati različitim količinama drugih dodanih sastojaka i posljedično različitim udjelima vode i suhe tvari tih proizvoda.

Uspoređujući napitke čuvane na različitim temperaturama, potvrđuje se ovisnost viskoznosti i temperature. Napitak čuvan u hladnjaku na +4 °C imao je na početku mjerenja višu viskoznost nego napitak čuvan na 20 °C. Nakon 14. dana čuvanja napitci su imali vrlo malu viskoznost (pri najnižoj brzini reometar nije bilježio vrijednost) koja je padala do posljednjeg dana čuvanja. To sniženje viskoznosti objašnjava se nastalim fizikalnim promjenama u uzorcima koji su potvrđeni mikrobiološkom analizom (poglavlje 4.8.). Viskoznost fermentiranih proizvoda razlikuje se između pojedinih zbog ključnog koraka toplinske obrade. Pasterizirani natur desert imao je višu viskoznost u odnosu na uzorak kod kojeg pasterizacija nije provedena. To se pripisuje svojstvu škroba (prirodno prisutnog i naknadno dodanog) koji želatinizira pri povišenoj temperaturi. Viskoznost raste kako škrob bubri pritom stvarajući pastu koja se hlađenjem pretvara u kruti gel (Serna-Saldivar, 2010).

4.8. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Dokazivanje prisutnosti pojedinih vrsta mikroorganizama predstavlja najsigurniji način za određivanje mikrobiološke i higijenske kvalitete krajnjeg proizvoda. Broj

mikroorganizama određen je indirektnim brojanjem kolonija naraslih iz uzorka napitka i fermentiranog napitka nacijepljenih na odabrane hranjive podloge, a prisutnost se određivala za kvasce i plijesni, koliformne bakterije (*Enterobacteriaceae*) i koagulaza pozitivne stafilokoke. Kvasci su od manjeg značaja u odnosu na bakterije. Dobro podnose niske temperature i niski pH, a posebno karakteristično je da proizvode velike količine enzima i vitamina B skupine. Plijesni razgrađuju ugljikohidrate, masti i neke proteine, a preferiraju vlažnu i kiselu sredinu. Njihova prisutnost je vrlo štetna. Koliformne bakterije (enterobakterije) su nepoželjne i njihova prisutnost najčešće ukazuje na nepravilnosti pri proizvodnji i nehigijenske uvjete (Božanić i sur, 2010). Namirnice u kojima se ustanovi prisutnost enterobakterija smatraju se zdravstveno neispravnima. Koagulaza pozitivni stafilokoki je zajednički naziv za bakterije roda *Staphylococcus* koje, kao i enterobakterije, u slučaju neadekvatne higijene u proizvodnom procesu otvaraju mogućnost kontaminacije hrane i izazivanje tzv. stafilokoknog trovanja.

Rezultati mikrobiološke analize prikazani su u tablicama 16, 17 i 18. U svim uzorcima identificirana je samo prisutnost kvasaca čiji se broj povećavao s danima skladištenja što je očekivano s obzirom da im uvjeti niske temperature pogoduju. Slični rezultati prikazani su za uzorke u radu Elsanhoty i Ramadan (2018). Svi uzorci jogurta pokazali su značajan porast kvasaca i plijesni tijekom razdoblja skladištenja. Također, slični rezultati objavljeni su u radovima Tamime i Robinson (2001) te Ifeanyi i sur. (2013) koji su ustanovili da početni broj kvasaca i plijesni nije bio veći od 1 CFU mL^{-1} , ali kako je vrijeme skladištenja odmicalo, broj kvasaca i plijesni se povećao. U uzorku napitka čuvanog na sobnoj temperaturi druge serije paralelnih uzoraka utvrđen je najviši broj kvasaca i pretpostavljeno drugih mikroorganizama koji su izazvali neugodan oštar miris 21. dan čuvanja. Za napitak čuvan u hladnjaku, također druge serije čuvanja 21. dana određen je neprihvatljivo velik broj enterobakterija čime je odlučeno da se taj proizvod više ne analizira kao ni napitak čuvan na sobnoj temperaturi.

Uzorak koji se posebno ističe u ovim analizama je natur desert, odnosno fermentirani zobeni napitak bez prethodno provedenog toplinskog tretmana. Nakon prvog dana mikrobiološke analize i inkubacije, na Petrijevim pločama je izbrojan velik broj kolonija enterobakterija (tablica 17) i posebno stafilokoka (tablica 18) te prisutne plijesni. Zaključak je bio da je došlo do kontaminacije ploča zrakom, dugim stajanjem ili pak dodanim sastojcima. Nakon toga je odlučeno da je formulaciju nužno pasterizirati. Toplinskom obradom osigurava se dulja trajnost proizvoda uništenjem patogenih mikroorganizama, što većeg broja drugih mikroorganizama i njihovih spora te inaktivacijom prisutnih enzima (Tratnik i Božanić,

2012). To je potvrđeno praćenjem trajnosti pasteriziranog natur deserta koji je imao najmanji broj kvasaca od prvog dana dok druge vrste mikroorganizama nisu opažene. Rod *Salmonella* nije identificiran ni u jednom uzorku nakon procesa proizvodnje.

Tablica 16. Broj kvasaca i plijesni poraslih na hranjivoj podlozi izražen kao log CFU mL⁻¹ u uzorcima napitka čuvanih na različitim temperaturama i fermentiranim natur desertima

| dani čuvanja | log CFU mL ⁻¹ | | | |
|--------------|--------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | 1,68 | 1,75 | 2,31 | 1,41 |
| 7. | 1,95 | 2,47 | 1,30 | 1,66 |
| 14. | 2,61 | 2,83 | 2,43 | 2,11 |
| 21. | 2,64 | 3,29 | 1,48 | 2,00 |
| 28. | 2,94 | 3,96 | 1,65 | 2,00 |

Tablica 17. Broj enterobakterija poraslih na hranjivoj podlozi izražen kao log CFU mL⁻¹ u uzorcima napitaka čuvanih na različitim temperaturama i fermentiranim natur desertima

| dani čuvanja | log CFU mL ⁻¹ | | | |
|--------------|--------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | 0 | 0 | 1,60 | 0 |
| 7. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21. | 2,93 | 0 | 0 | 0 |
| 28. | / | / | 0 | 0 |

Tablica 18. Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka na hranjivoj podlozi izražen kao log CFU mL⁻¹ u uzorcima napitaka čuvanih na različitim temperaturama i fermentiranim natur desertima

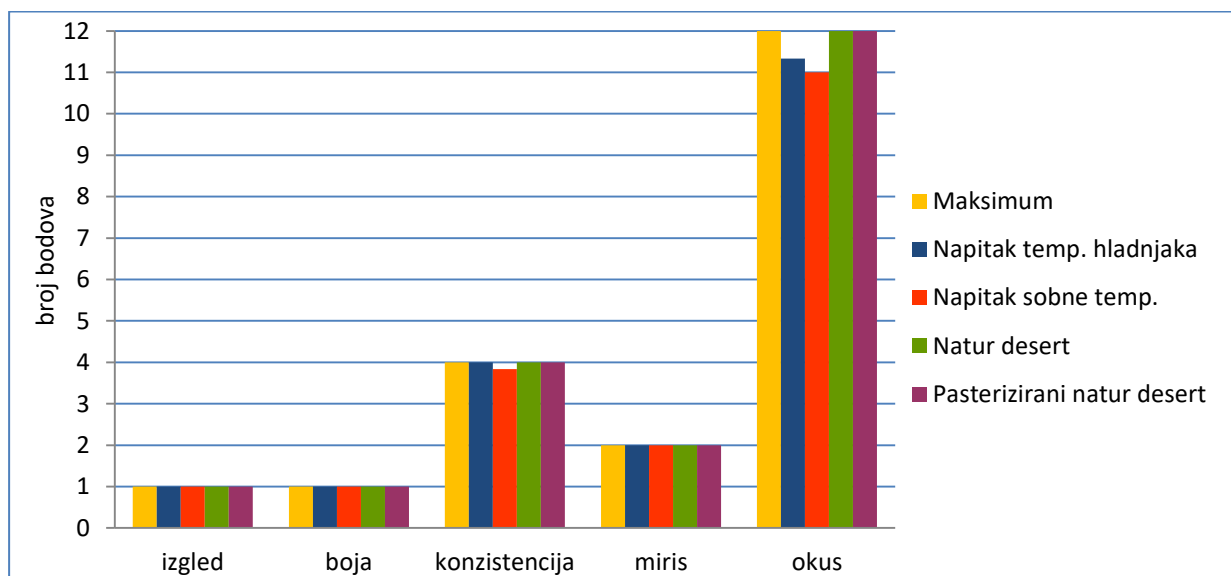
| dani čuvanja | log CFU mL ⁻¹ | | | |
|--------------|--------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
| | 4 °C napitak | 20 °C napitak | natur desert | pasterizirani natur desert |
| 1. | 0 | 0 | 1,87 | 0 |
| 28. | 0 | 0 | 0,30 | 0 |

4.9. SENZORSKA ANALIZA

U prehrambenoj industriji senzorska ocjena kvalitete proizvoda nalazi svoju primjenu prvenstveno u razvoju novih proizvoda, pri poboljšanju kvalitete postojećih proizvoda, pri procjeni kvalitete proizvoda tijekom skladištenja, pri ispitivanju ukusa potrošača. Od svih metoda ispitivanja najčešće se koriste metode bodovanja (Tratnik i Božanić, 2012). Za ocjenu zobenih napitaka i fermentiranih natur deserata korištena je bodovna skala s ukupnih 20 bodova koje proizvodi mogu dobiti ocjenjivanjem karakteristika izgleda, boje, konzistencije, mirisa i okusa.

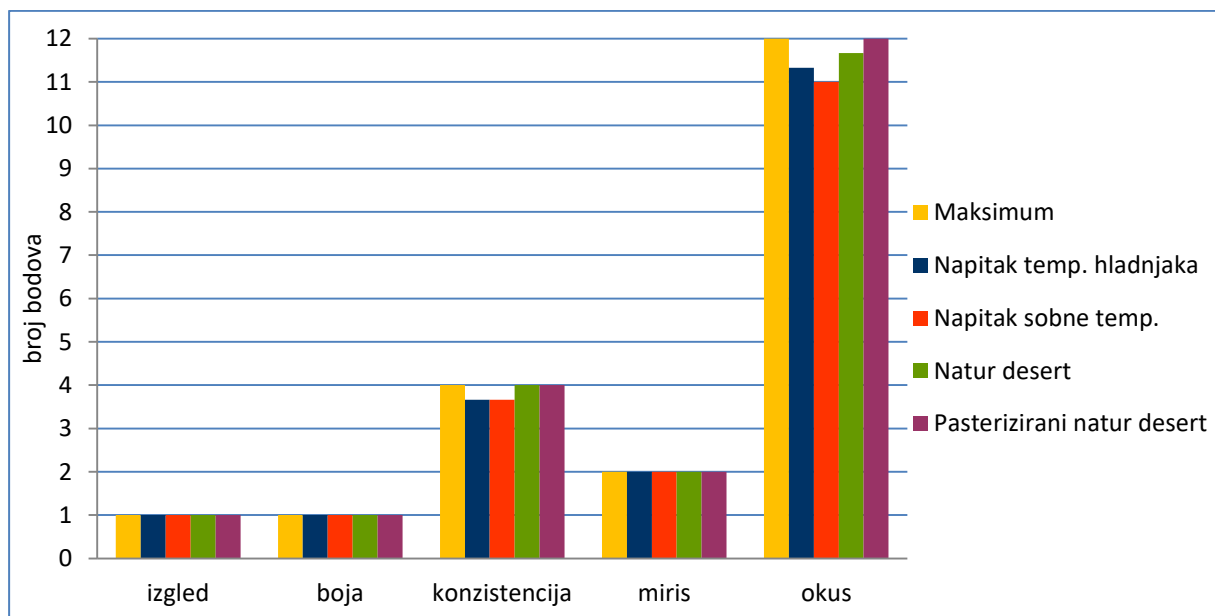
Na slici 12 a-e prikazani su svi ocijenjeni uzorci usporedni s maksimalnim mogućim brojem bodova, za 1. (a), 7. (b), 14. (c), 21. (d) i 28. (e) dan čuvanja. Tijekom svih 28 dana, ocjenjivana svojstva svih uzoraka postigla su najviši broj bodova za svojstvo izgleda (homogena sjajna površina, bez udubljenja ili pukotina), boje (bijela do blijedožuta) i mirisa (neutralan, blagi miris po zobi za napitak i blago kiseo miris za desert). Prvi dan senzorske procjene dao je nešto niži broj bodova za zobene napitke dok su fermentirani proizvodi postigli maksimalan broj bodova u svim kategorijama. Zobeni napitak čuvan na sobnoj temperaturi imao je najnižu ocjenu za okus i jedini je imao nešto nižu ocjenu za svojstvo konzistencije. Napitak čuvan u hladnjaku dobio je više ocjene za svojstvo okusa zbog punijeg okusa (po biljnom, po žitaricama) nego što je zapaženo u napitku sobne temperature. To se po komentarima ocjenjivača može pripisati upravo razlikama u temperaturi i subjektivnom očekivanju da se takav tip proizvoda konzumira hladan.

a)

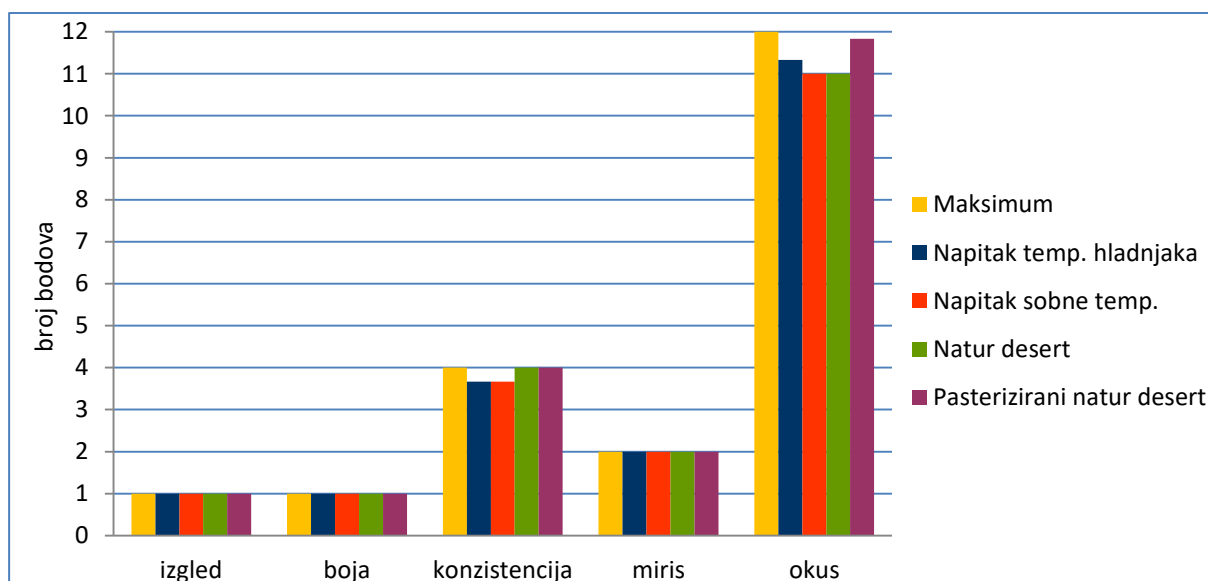


Čuvanjem uzoraka narednih 7 dana, u napitcima je uočeno odvajanje faza što je rezultiralo nižom ocjenom od maksimalne (4). Iako je razdvajanje faza u ovakom tipu proizvoda očekivano, ukoliko se ne dodaju stabilizatori, običnom potrošaču bi takav izgled moguće bio neprihvatljiv. U tom slučaju, „protresti prije upotrebe“ bi bilo potrebno istaknuti na ambalaži proizvoda. Što se tiče okusa, sedmi dan senzorske procjene dao je nižu sveukupnu ocjenu i za natur desert dok je pasterizirani natur desert po svim kategorijama dobio najviše ocjene; ugodno kiselkasti okus, homogene i glatke konzistencije. 14. dan čuvanja i ocjenjivanjem svojstva okusa, svi ocjenjivači dali su niži broj bodova za natur desert zbog značajnog smanjenja kiselosti u okusu dok su ostala svojstva svih uzoraka bila identična kao i sedam dana prije.

b)

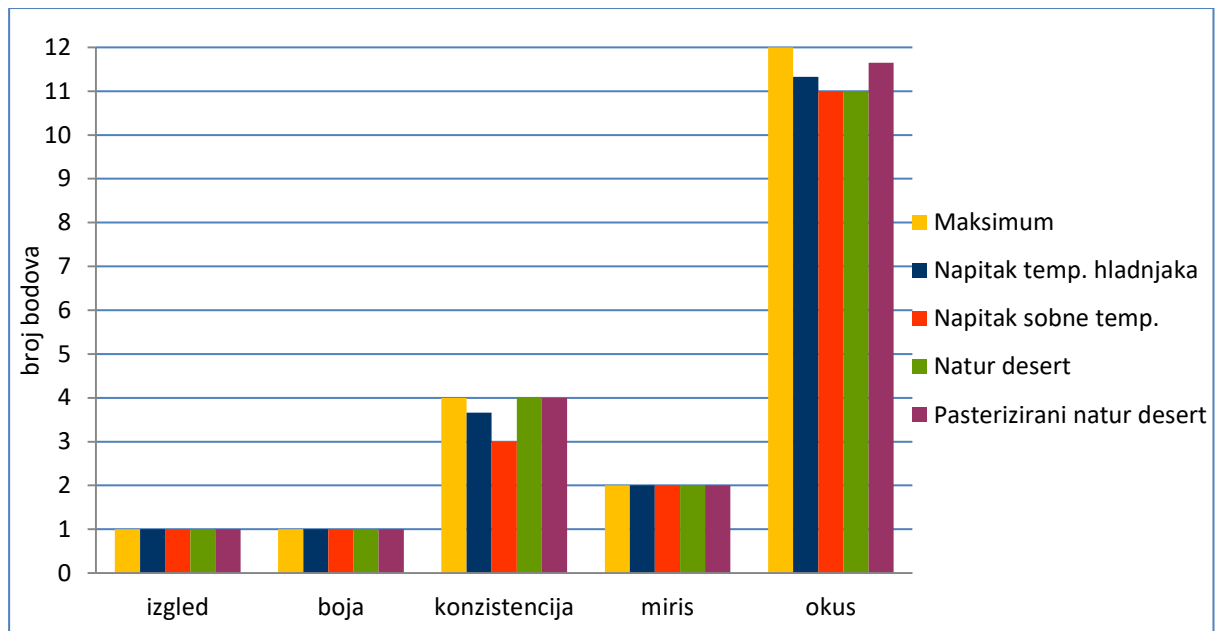


c)



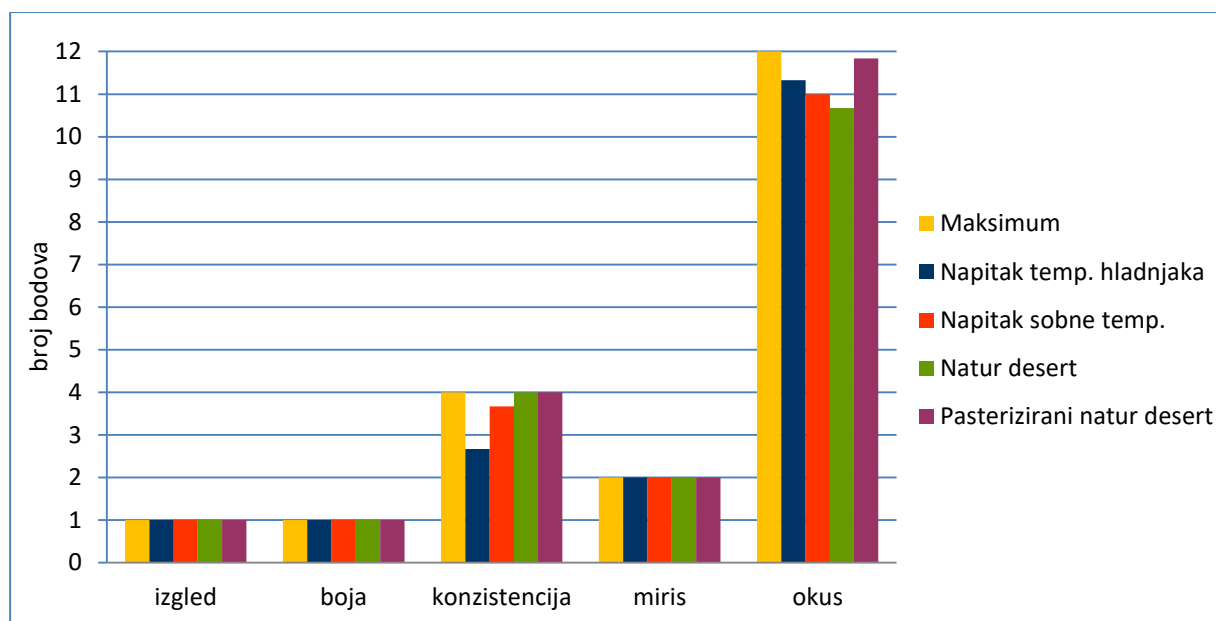
21. dan čuvanja došlo je do najvećih promjena. Paralelna serija napitka čuvanog na sobnoj temperaturi nije više bilo moguće ocijeniti. Zbog neugodnog mirisa ocijenjenog s 0 bodova, vrlo tekuće konzistencije s pahuljastim nakupinama na površini i ni ne ocijenjenog okusa, napitak je eliminiran iz daljnjih analiza. S obzirom da prva serija istog uzorka nije pokazala svojstva koja bi bila ocijenjena s 0 bodova, daljnji rezultati (28. dan čuvanja) prikazani su prema samo toj seriji. U napitku čuvanom u hladnjaku nije bilo takvih zapažanja. Po svojstvu okusa, zobeni napitci zadržali su ocjene dobivene prije tjedan dana dok je natur proizvod osim već smanjene kiselosti, izgubio i slanost. Ovaj 21. dan u pasteriziranom natur desertu je opaženo smanjenje kiselosti, dakle sedam dana kasnije nego u uzorku koji nije bio pasteriziran.

d)



Posljednji dan čuvanja u zobenim napitcima (temperature hladnjaka i sobne temperature) bilo je uočeno vrlo izraženo odvajanje faza (vidljiv vodeni dio) što je moguće upućivalo na početak promjena koje su rezultirale kvarenjem (potvrđeno drugom serijom uzorka čuvanog na sobnoj temperaturi). Fermentirani deserti, nepasterizirani i pasterizirani, nisu dali promjene u vidu mirisa i konzistencije što upućuje na njihovu dužu stabilnost. Do manjih promjena došlo je jedino u svojstvu okusa, zbog daljnjeg smanjenja kiselosti i slanosti.

e)



Slika 12. Senzorska ocjena kvalitete uzoraka zobenih napitaka i fermentiranih zobenih napitaka 1. (a), 7. (b), 14. (c), 21. (d) i 28. (e) dan čuvanja

Procjenom senzorskih svojstava utvrđeno je da se svojstva kvalitete okusa i konzistencije postupno smanjuju s dužim vremenom skladištenja proizvoda što su potvrdili i El-Batawy i sur. (2019) u istraživačkom radu usporedbe fermentiranog zobenog napitka i kravljeg mlijeka. To smanjenje može biti posljedica formiranja kiseline (u ovom slučaju u napitku) ili produkcije drugih mikrobnih produkata metabolizma koji mogu utjecati na senzorska svojstva, navode u istraživanju. Takvi rezultati potvrđeni su i u radu Wang i sur. (2017) u kojemu su od ukupnog broja bodova uzorci fermentirane zobene baze s različitim dodacima dobili ocjenu 9 na početku senzorske procjene dok je do 21. dana čuvanja ocjena pala na 7, a do kraja sedmog tjedna čuvanja broj bodova bio je 5 od ukupnih 10.

Prema svemu navedenom, trajnost zobenih napitaka svodi se na 21 dan s tim da je poželjno hladno skladištenje. Fermentirani zobeni napitci pokazali su puno bolju stabilnost koja se objašnjava samim sniženjem pH medija i prisustvu mliječne kiseline kao prirodnog konzervansa koja usporava aktivnost i rast drugih mikroorganizama. Prema sveukupnim ocjenama, pasterizirani natur desert pokazao je najbolju kvalitetu.

5. ZAKLJUČCI

1. Proizvodnjom zobenog napitka poželjnih fizikalnih svojstava potvrđeno je da optimalan omjer zobi i vode iznosi 4:100. Optimiranjem fermentacije dobivenog zobenog napitka s mikrobnom kulturom namijenjenom za fermentaciju biljnih napitaka utvrđeno je da se vrijeme fermentacije znatno skraćuje nego u slučaju upotrebe jogurtne kulture ili drugih definiranih kombinacija bakterija mliječne kiseline. Uz to, dodatak poboljšivača okusa (sol) i konzistencije (škrob, pektin) utječu na vrijeme trajanja fermentacije.
2. Aktivna kiselost zobenih napitaka (sobne temperature i temperature hladnjaka) izražena kao pH iznosila je oko 8 s blagim snižavanjem tijekom perioda čuvanja. Fermentirani natur deserti zadržali su istu vrijednost kiselosti (oko pH 4) bez znatnih promjena tijekom perioda čuvanja.
3. Udio maltoze u napitku i fermentiranom natur desertu smanjuje se tijekom vremena skladištenja što se pripisuje daljnjoj aktivnosti mikroorganizama. U zobenim napitcima udio maltoze je viši (5 – 6 %) s obzirom da se značajna količina utroši u procesu fermentacije na kraju koje proizvod sadrži oko 2 % maltoze.
4. Na udio soli ne utječe vrijeme čuvanja. U zobenim napitcima zabilježen je udio do 1 % dok je u fermentiranim natur desertima udio bio nešto viši (1,5 – 2 %) zbog namjernog dodatka soli kao poboljšivača okusa.
5. Udio suhe tvari ovisan je o dodatku drugih sastojaka. To potvrđuje udio suhe tvari napitka oko 2 % dok je u fermentiranom natur desertu dvostruko viši zbog poboljšivača konzistencije, škroba i pektina. Prema dobivenom, udio vode u ovim proizvodima je 95 % i više.
6. Udio mineralnih tvari i u zobenom napitku i u fermentiranom natur desertu je malen, ispod 0,5 % i ostaje nepromijenjiv tijekom vremena čuvanja.
7. Viskoznost svih uzoraka pada s vremenom čuvanja. Iako je, očekivano, viskoznost napitka manja nego fermentiranog deserta, viskoznost napitka čuvanog u hladnjaku je ipak bila nešto viša u početku u odnosu na napitak čuvan na sobnoj temperaturi, čime se potvrđuje ovisnost viskoznosti o temperaturi. Najviša viskoznost zabilježena je u fermentiranom natur desertu s provedenim postupkom pasterizacije koja je doprinijela bubrenju prirodnog i dodanog škroba i formiranja gel teksture.

8. Broj kvasaca raste u svim uzorcima tijekom svih 28 dana čuvanja. U zobnim napitcima zabilježen je porast broja enterobakterija 21. dan čuvanja čime se potvrđuje trajnost proizvoda do 20 dana. Za produljenje roka valjanosti, napitak je potrebno toplinski obraditi. Najbolju trajnost i mikrobiološku stabilnost ima pasterizirani fermentirani natur desert u kojem tijekom svih dana čuvanja nije identificirana ni jedna od ispitivanih vrsta bakterija.

9. Senzorskom procjenom utvrđeno je da se svojstva kvalitete okusa i konzistencije smanjuju s vremenom čuvanja. Sveukupno, zobeni napitci definirani su kao neutralni, ugodnog mirisa i blagog okusa „po biljnom“ dok su fermentirani natur deserti opisani kao ugodno slani, blago kiselog mirisa, homogene i glatke konzistencije. Od svih uzoraka, najbolju kvalitetu i najvišu senzorsku ocjenu ima pasterizirani natur desert.

6. LITERATURA

- Alcorta, A., Pilar Vaquero, M. (2021) Foods for Plant-Based diets, <<https://encyclopedia.pub/8609>>. Pristupljeno 29. lipnja 2021.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., Hristozova, T. (2006) Development of a new oat-based probiotic drink. *Int. J. Food Microbiol.* **112**, str. 75-80.
- Angelov, A., Yaneva-Marinova, T., Gotcheva, V. (2018) Oats as a matrix of choice for developing fermented functional beverages. *J. Food Sci. Technol.* **55(7)**, str. 2351-2360.
- Anonymous (2021), <<https://owlcation.com/agriculture/Oats-Oatmeal-and-Porridge-Plant-Facts-and-Culture>>. Pristupljeno 25. lipnja 2021.
- Aydar, E.F., Tutuncu, S., Ozcelik, B. (2020) Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *J. Funct. Foods.*, **70**.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda: priručnik, Zagreb:Plejada.
- Chatterjee, E., Manuel, S.G.A., Hassan, S.S. (2016) Effect of Fruit Pectin on Growth of Lactic Acid Bacteria. *J. Prob. Health.* **4(2)**.
- El-Batawy, O., Talaat, S., Mahdy, S. (2019) Development of Functional Fermented Oat Milk by Using Probiotic Strains and Whey Protein. *Int. J. Dairy Sci.* **14**, str. 21-28.
- Elsanhoty, R.M., Ramadan, M.F. (2018) Changes in the physicochemical and microbiological properties of probiotic-fermented low-fat yoghurt enriched with barley β -glucan during cold storage. *Mljekarstvo*, **68 (4)**, str. 295-309.
- Grasso, N., Alonso-Miravalles, L., O'Mahony, J.A. (2020) Composition, Physicochemical and Sensorial Properties of Commercial Plant-Based Yogurts. *Foods*, **9**, str. 252.
- Gupta, S., Cox, S., Abu-Ghannam, N. (2010) Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochem. Eng. J.* **52**, str. 199-204.

- Ifeanyi, V.O., Ihesiaba, E.O., Muomaife, O.M., Ikenga, C. (2013) Assessment of microbiological quality of yoghurt sold by Street Vendors in Onitsha Metropolis Anambra State, Nigeria. *Br. Microbiol. Res. J.* **3(2)**, str. 198-205.
- Kedia, G., Vazquez, J.A., Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. (2009) In vitro fermentation of oat bran obtained by debranning with a mixed culture of human fecal bacteria. *Curr. Microbiol.* **58**, str. 338-342.
- Khanna, P. (2016) Oats: Understanding the Science. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1**.
- Lampi, A.M., Damerou, A., Li, J., Moisis, T., Partanen, R., Forssell, P., Piironen, V. (2015) Changes in lipids and volatile compounds of oat flours and extrudates during processing and storage. *J. Cereal Sci.* **62**, str. 102-109.
- Lehtinen, P., Laakso, S. (2004) Role of lipid reactions in quality of oat products. *Agric. Food Sci.* **13**, str. 88-99.
- Mårtensson, O. Andersson, C., Andersson, K., Öste, R., Holst, O. (2001) Formulation of an oat based fermented product and its comparison with yoghurt. *J. Sci. Food Agric.* **81**, str. 1314-1321.
- Mårtensson, Öste, R., Holst, O. (2002) The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Res. Int.* **35**, str. 775-784.
- Öste Triantafyllou, A., Tollmar, C.J., Böök, C.O. (2016) Fermented product based on an oat suspension. European patent 2,143,335.
- Pacala, M.-L., Oprean, L. Tita, O., Brudiu, L., Begea, M., Sirbu, A. (2012) Basic physical-chemical and sensorial evaluation of some fermented mashes produced from wheat, husked millet, barley malt and oat. *Procedia Eng.* **42**, str. 197-205.
- Panda, S.H., Ray, R.C. (2016) Amylolytic Lactic Acid Bacteria Microbiology and Technological Interventions in Food Fermentations. U: Fermented foods. Part 1. Biochemistry & Biotechnology (Montet, D., Ray, R.C., ured.), CRC press, str. 148.- 165.
- POWO (2019). *Avena sativa* L. POWO - Plants of the World Online, Royal Botanic Gardens, Kew, <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:391732-1>>. Pristupljeno 22. lipnja 2021.

- Raikos, V., Juskaite, L., Vas, F., Hayes, H.E. (2020) Physicochemical properties, texture, and probiotic survivability of oat-based yogurt using aquafaba as a gelling agent. *Food Sci. Nutr.* **8**, str. 6426-6432.
- Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., Unnikrishnan, V.S. (2015) Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *J. Food Sci. Technol.* **52(2)**, str. 662-675.
- Röös, E., Patel, M., Spångberg, J. (2016) Producing oat drink or cow's milk on Swedish farm – Environmental impacts considering the service of grazing, the opportunity cost of land and the demand for beef and protein. *Agric. Syst.* **142**, str. 23-32.
- Rosentrater, K.A., Evers, A.D. (2018) Chemical components and nutrition. U: *Kent's Tehnology of Cereals*, 5. izd., str. 267-368.
- Serna-Saldivar, S.O. (2010) Grain Development, Morphology, and Structure. U: *Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes*, CRC Press, Boca Raton/London/New York, str. 109-128.
- 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)**, str. 3408-3423.
- Shah, A., Masoodi, F.A., Grani, A., Ashwar, B.A. (2016) Newly released oat varieties of himalayan region – techno-functional, rheological, and nutraceutical properties of flour. *LWT Food Sci. Technol.* **70**, str. 111-118.
- Sobiechowska, D.A., Pilat, B., Majewska, K., Banach, J.K. (2020) Effect of processing on selected quality parameters of oat beverages. *Pol. J. Natur. Sc.* **35(1)**, str. 75-85.
- Sterna, V., Zute, S., Brunava, L. (2016) Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agric. Agric. Sci. Procedia.* **8**, str. 252 – 256.
- Sukhova, I.V., Romanova, T.N., Korosteleva, L.A., Baimishev, R.H., Dolgosheva, E.V. (2020) The effect of hydrated oatmeal on quality of the symbiotic fermented milk product. *BIO Web Conf.* **17**.
- Syed, S.J., Gadhe, K.S., Katke S.D. (2020) Studies on physical, chemical and mineral evaluation of oats (*Avena sativa*), *J. Pharmacogn. Phytochem.* **9(5)**, str. 79-82.

Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2001) *Yoghurt Science and Technology*. CRC Press. New York, US.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Tsetsegmma, R., Tsetsegee, D. (2016) *Evaluation of a Fermented Oat Beverage*.

Usman, S., Nazir, S., Ali, S., Nasreen, Z., Najim, A. (2010) Determination of biochemical composition of *Avena sativa* (oat) and to estimate the effect of high fiber diet on hypercholesterolemic rats. *J. Publ. Res. Bangladesh*. **4**, str. 312-319.

Verardo, V., Serea, C., Segal, R., Caboni, M.F. (2011) Free and bound minor polar compounds in oats: Different extraction methods and analytical determinations. *J. Cereal Sci.* **54**, str. 211-217.

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

Zarzycki P., Sykut-Domańska E., Wilkowicz I. (2011) Ocena lepkości pozornej wodnych zawiesin całościarnowej mąki owsianej o zróżnicowanej zawartości błonnika pokarmowego. *Zywn-Nauk.Technol. Ja.* **2(75)**, str. 38–52.

Zwer, P.K. (2004) Oats. U: *Encyclopedia of Grain Science*, (Wrigley, C., Corke, H., Walker C.E., ured.), Elsevier Ltd., Adelaide, str. 365-375.

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.

Alenija Šifer

ime i prezime studenta