

INoZ. 5100. 1. 2024



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

mgr inż. Patrycja Malinowska

**Skład i właściwości biochemiczne
fermentowanych napojów z nasion roślin
strączkowych**

The composition and biochemical properties of fermented
legume-based beverages

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

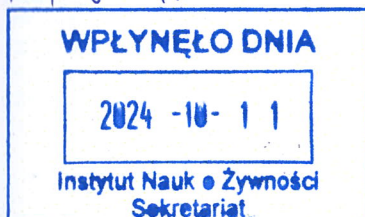
dr. hab. Małgorzaty Ziarno, prof. SGGW

Katedra Technologii i Oceny Żywności

Instytut Nauk o Żywności

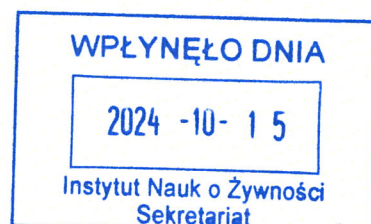
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RPH/28304/2024



INoZ/41/2024 fcd
1 szt. dla promotora

Warszawa, rok 2024



INoZ/44/2024 fcd
4 szt. + wnioski wraz
z załącznikami

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 20.09.2024

Czytelny podpis promotora G. Ziarno

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 20.09.2024

Czytelny podpis autora Patrycja Malinowska

Streszczenie

Skład i właściwości biochemiczne fermentowanych napojów z nasion roślin strączkowych

Celem prezentowanej pracy było opracowanie fermentowanych napojów roślinnych z fasoli białej i soczewicy brązowej, z zastosowaniem wybranych procesów technologicznych, poprawiających ich wartość odżywczą i zawartość składników bioaktywnych. Sformułowano cztery hipotezy badawcze, które zweryfikowano poprzez realizację badań podzielonych na etapy. Badania rozpoczęto od produkcji napojów roślinnych z fasoli białej i soczewicy brązowej. Następnie dobrano optymalne parametry procesów kiełkowania i fermentacji. Proces fermentacji analizowano z wykorzystaniem trzech przemysłowych kultury starterowych (YO-MIX 207, ABY-3 i Beaugel Soja 1), zawierających bakterie z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*, oceniając ich wpływ na pH i populację mikroflory w napojach fermentowanych. Następnie przeprowadzono charakterystykę wartości odżywczej, właściwości fizycznych i właściwości biochemicznych badanych produktów, analizując wpływ procesów kiełkowania i fermentacji na badane parametry. Wartość odżywczą określono na podstawie analizy zawartości białka, tłuszczu, wybranych węglowodanów, witamin z grupy B i błonnika, a także analizę profilu i rozmieszczenia kwasów tłuszczowych w cząsteczkach triacylogliceroli i indeksu glikemicznego. Charakterystykę właściwości fizycznych przeprowadzono analizując parametry barwy, stabilność, wielkość cząstek i właściwości reologiczne. Właściwości biochemiczne analizowano poprzez oznaczenie zawartości fenoli, zdolności do inhibicji rodnika DPPH, zawartości aglikonów izoflawonów i profilu lotnych związków. Dokonano również analizy wpływu kiełkowania, fermentacji i dodatku smakowego na charakterystykę sensoryczną badanych napojów roślinnych.

Badanie wykazało, że proces fermentacji z wykorzystaniem analizowanych kultur starterowych pozwolił na uzyskanie produktów o pH charakterystycznym dla mlecznych napojów fermentowanych (około 4,5) i wysokiej liczebności żywych komórek mikroorganizmów ($> 10^7$ jtk/cm³) w całym okresie przechowywania. Wskazuje to, że napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej stanowią odpowiednią matrycę do procesu fermentacji. Najkorzystniejsza okazała się fermentacja

z kulturami starterowymi o jak najbardziej zróżnicowanym składzie gatunkowym mikroorganizmów (YO-MIX 207 i ABY-3), co wynika z synergistycznego działania bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Przedstawione badania dowodzą, że zarówno proces kiełkowania, jak i fermentacji ma wpływ na właściwości napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej. Mikroorganizmy odpowiadające za fermentację badanych napojów produkowały wybrane witaminy z grupy B i inicjowały przemiany enzymatyczne prowadzące do zwiększenia zawartości wybranych izoflawonów, modyfikacji profilu lotnych związków i zmniejszenia zawartości wybranych oligosacharydów. Proces kiełkowania nasion fasoli i soczewicy prowadził do aktywacji enzymów modyfikujących strukturę surowca i inicjujących syntezę nowych składników komórkowych, co prowadziło do modyfikacji profilu węglowodanowego i profilu lotnych związków, a także zwiększenia zawartości białka, wybranych izoflawonów i witamin z grupy B w otrzymanych napojach roślinnych. Badane napoje z fasoli białej scharakteryzowano jako ciecze lepkosprężyste o strukturze zawiesiny koloidalnej. Kiełkowanie wpłynęło na zmiany wielkości cząstek, co bezpośrednio determinuje wartości wybranych parametrów reologicznych i stabilność układu. Właściwości fizyczne napojów z fasoli były jednak kształtowane głównie w wyniku zastosowanych procesów technologicznych, a przede wszystkim homogenizacji wysokociśnieniowej, która umożliwia otrzymanie produktu o wysokiej stabilności. Napoje bazowe z fasoli białej i soczewicy brązowej charakteryzowały się dość niską ogólną jakością sensoryczną. Zastosowanie procesu kiełkowania nie wpłynęło negatywnie na ten parametr, zaś fermentacja wpłynęła na jego istotne obniżenie. Dodatek wsadu owocowego okazał się najkorzystniejszą strategią zwiększania atrakcyjności sensorycznej, a w szczególności zmniejszania wyczuwalności niekorzystnych zapachów i smaków (m.in. strączkowych i skrobiowych). Połączenie różnorodnych procesów biotechnologicznych, takich jak fermentacja i kiełkowanie, stanowi optymalne rozwiązanie w produkcji napojów na bazie fasoli i soczewicy. Pozwala to na kompleksową poprawę właściwości odżywczych otrzymanych produktów, które jednocześnie pełnią funkcję nośnika bakterii probiotycznych.

Słowa kluczowe: napoje roślinne, rośliny strączkowe, fermentacja, kiełkowanie, substytuty mleka

Abstract

The composition and biochemical properties of fermented legume-based beverages

The presented study aimed to develop fermented bean-based and lentil-based beverages, using selected technological processes that improve their nutritional value and content of bioactive compounds. Four research hypotheses were formulated and verified by conducting research divided into stages. The research commenced with the production of plant-based beverages utilizing white beans and brown lentils. Subsequently, optimal parameters for germination and fermentation processes were determined. The fermentation was analyzed using three industrial starter cultures (YO-MIX 207, ABY-3 and Beaugel Soja 1), containing bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium*, assessing their effect on pH and the population of microflora in fermented beverages. Then, the nutritional value, physical properties and biochemical properties of the tested products were characterized, analyzing the effect of the germination and fermentation processes on the analyzed parameters. "The nutritional value was determined based on an analysis of protein, fat, selected carbohydrates, B vitamins, and fiber content, as well as an analysis of the profile and distribution of fatty acids in triacylglycerol molecules and the glycemic index. The physical properties were characterized by analyzing the color, stability, particle size and rheological properties. Biochemical properties were analyzed by determining the content of phenols, the ability to inhibit the DPPH radicals, the content of isoflavone aglycones and the profile of volatile compounds. The effect of germination, fermentation and flavoring on the sensory characteristics of the plant-based beverages was also analyzed.

The study showed that the fermentation using the analyzed starter cultures allowed obtaining products with a pH characteristic of fermented milk beverages (approx. 4.5) and a high number of microorganisms ($>10^7$ cfu/cm³) throughout the storage period. This indicates that plant-based beverages from white beans and brown lentils are a suitable matrix for the fermentation process. The most beneficial was fermentation with starter cultures with the most diverse species composition of microorganisms (YO-MIX 207 and ABY-3), which results from the synergistic action of bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium*. The

presented studies show that the germination and fermentation affect the properties of bean-based and lentil-based beverages. The microorganisms responsible for the fermentation of the investigated beverages produced selected B vitamins and initiated enzymatic transformations leading to an increase in the content of selected isoflavones, modification of the volatile compound profile, and a decrease in the content of selected oligosaccharides. The germination of bean and lentil seeds led to the activation of enzymes modifying the structure of the raw material and initiating the synthesis of new cellular components, which led to the modification of the carbohydrate profile and the profile of volatile compounds, as well as an increase in the content of protein, selected isoflavones and B vitamins in the obtained plant-based beverages. The bean-based beverages were characterized as viscoelastic liquids with a colloidal suspension structure. Germination influenced changes in particle size, which directly determines the values of selected rheological parameters and the stability of the product. However, the physical properties of bean-based beverages was mainly shaped by the applied technological processes, especially by high-pressure homogenization, which allows obtaining a product with high stability. The base bean-based and lentil-based beverages were characterized by a relatively low overall sensory quality. The application of the germination did not negatively affect the sensory quality, while fermentation significantly reduced it. The addition of fruit pulp proved to be the most beneficial strategy for increasing sensory quality, primarily by reducing the perceptibility of unfavorable odors and flavors (including leguminous and starchy ones). The combination of various biotechnological processes, such as fermentation and germination, is an optimal solution in the production of bean-based and lentil-based beverages. This allows for a comprehensive improvement of the nutritional properties of the obtained products, which at the same time act as a carrier of probiotic bacteria.

Key words: plant-based beverages, legumes, fermentation, germination, milk substitutes

Spis treści

Wykaz skrótów i oznaczeń	10
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	13
1. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU PRACY DOKTORSKIEJ	14
1.1. Popularność zamienników produktów odzwierzęcych na rynku	14
1.2. Charakterystyka napojów roślinnych.....	15
1.3. Napoje z nasion roślin strączkowych	17
1.4. Ograniczenia w spożyciu produktów z nasion roślin strączkowych i metody ich eliminacji.....	19
1.5. Możliwe kierunki rozwoju napojów roślinnych z nasion roślin strączkowych	23
2. CEL I ZAKRES PRACY DOKTORSKIEJ	25
3. HIPOTEZY BADAWCZE.....	26
4. ORGANIZACJA DOŚWIADCZENIA.....	27
5. MATERIAŁ BADANY I METODYKA.....	29
5.1. Materiał badany	29
5.2. Metodyka badań	30
5.3. Opracowanie danych i analiza statystyczna	35
6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	36
6.1. Analiza procesu fermentacji	36
6.2. Charakterystyka wartości odżywczej	39
6.3. Charakterystyka właściwości fizycznych.....	59
6.4. Charakterystyka właściwości biochemicznych	75
6.5. Charakterystyka sensoryczna.....	87
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	94
8. SPIS LITERATURY	97
9. DOROBEK NAUKOWY	115
10. PUBLIKACJE STANOWIĄCE PRACĘ DOKTORSKĄ WRAZ Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓŁAUTORÓW	121

Wykaz skrótów i oznaczeń

- $|\eta^*|$ – lepkość zespolona
- a^* – barwa czerwona/zielona
- b^* – barwa niebieska/żółta
- BS – rozproszenie wsteczne
- C^* – nasycenie
- DPPH – rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowy
- G' – moduł sprężystości
- G'' – moduł lepkości
- GC-FID – chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
- GC/MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
- h^* – odcień
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- IG – indeks glikemiczny
- k – współczynnik konsystencji
- L^* – jasność
- LAB – bakterie kwasu mlekowego
- MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe
- n – współczynnik płynięcia
- NF – napój z fasoli
- NF+ABY-3 – napój z fasoli fermentowany z kulturą ABY-3
- NF+BS – napój z fasoli fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1
- NF+owoc – napój z fasoli z dodatkiem wsadu malinowo-żurawinowego
- NF+YO-MIX – napój z fasoli fermentowany z kulturą YO-MIX 207
- NFK – napój z fasoli skielkowanej
- NFK+ABY-3 – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą ABY-3
- NFK+BS – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1
- NFK+YO-MIX – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą YO-MIX 207
- NFKp – napój z fasoli skielkowanej, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFKp+ABY-3 – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą ABY-3, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C

- NFKp+BS – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFKp+YO–MIX – napój z fasoli skielkowanej, fermentowany z kulturą YO–MIX 207, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFp – napój z fasoli, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFp+ABY–3 – napój z fasoli fermentowany z kulturą ABY–3, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFp+BS – napój z fasoli fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NFp+YO–MIX – napój z fasoli fermentowany z kulturą YO–MIX 207, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NS – napój z soczewicy
- NS+ABY–3 – napój z soczewicy fermentowany z kulturą ABY–3
- NS+BS – napój z soczewicy fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1
- NS+owoc – napój z soczewicy z dodatkiem wsadu malinowo–żurawinowego
- NS+YO–MIX – napój z soczewicy fermentowany z kulturą YO–MIX 207
- NSK – napój z soczewicy skielkowanej
- NSK+ABY–3 – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą ABY–3
- NSK+BS – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1
- NSK+YO–MIX – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą YO–MIX 207
- NSKp – napój z soczewicy skielkowanej, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSKp+ABY–3 – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą ABY–3, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSKp+BS – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSKp+YO–MIX – napój z soczewicy skielkowanej, fermentowany z kulturą YO–MIX 207, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSp – napój z soczewicy, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C

- NSp+ABY-3 – napój z soczewicy fermentowany z kulturą ABY-3, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSp+BS – napój z soczewicy fermentowany z kulturą Beaugel Soja 1, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- NSp+YO-MIX – napój z soczewicy fermentowany z kulturą YO-MIX 207, przechowywany przez 21 dni w temp. 6 °C
- PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- QDA – ilościowa analiza opisowa
- SFA – nasycone kwasy tłuszczowe
- TAG – triacyloglicerole
- TSI – wskaźnik stabilności Turbiscan
- UFA – nienasycone kwasy tłuszczowe
- ΔE – całkowita różnica barwy
- η – lepkość

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

[P1] **Cichońska P.***, Ziarno M. (2022). Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms*, 10, 91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010091>

40 pkt MNiSW; IF = 4,5¹

[P2] **Cichońska P.***, Domian E., Ziarno M. (2022). Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages. *Sensors*, 22, 8348. <https://doi.org/10.3390/s22218348>

100 pkt MNiSW; IF = 3,9

[P3] **Cichońska P.***, Bryś J., Ziarno M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, 13, 16976. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44239-8>

140 pkt MNiSW; IF = 4,9

[P4] **Cichońska P.***, Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M. (2024). Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination. *LWT – Food Science and Technology*, 199, 116140. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116140>

100 pkt MNiSW; IF = 6,0

* autor korespondencyjny

¹ Wartości współczynników Impact Factor poszczególnych publikacjach podano w oparciu o dane udostępnione na InCites Journal Citation Reports 2024; punktację czasopism podano w oparciu o „Wykaz czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów”, stanowiące załączniki do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 grudnia 2021 r. i 17 lipca 2023 r. (według roku publikacji). Sumaryczny IF publikacji wynosi 19,3. Liczba punktów ministerialnych wynosi 380 pkt.

1. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU PRACY DOKTORSKIEJ

Do opracowania niniejszego rozdziału posłużyła pierwsza publikacja z cyklu publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej: **Cichońska P., Ziarno M. (2022). Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms*, 10, 91.** W publikacji przedstawiono charakterystykę napojów roślinnych z nasion roślin strączkowych jako odpowiednich matryc do procesu fermentacji i nośników probiotyków.

1.1. Popularność zamienników produktów odzwierzęcych na rynku

Na rynku spożywczym z roku na rok obserwuje się rosnącą popularność różnego rodzaju roślinnych zamienników produktów odzwierzęcych. Konsumenci coraz częściej sięgają po roślinne substytuty mięsa (np. burgerów, kiełbasek, wędlin) i produktów mleczarskich, w tym przede wszystkim mleka, jogurtów i serów [Boukid, 2021; Pua i wsp., 2022]. Powodem tego jest przede wszystkim występowanie alergii i nietolerancji pokarmowych, takich jak nietolerancja laktozy, rosnąca popularność diet roślinnych, a także względy etyczne i zwiększająca się świadomość konsumentów dotycząca negatywnego wpływu hodowli przemysłowej zwierząt na środowisko naturalne [Sethi i wsp., 2016; Alcorta i wsp., 2021].

Najpopularniejszymi produktami w grupie roślinnych zamienników produktów mleczarskich są napoje roślinne, które przez konsumentów traktowane są przede wszystkim jako substytuty mleka krowiego. Jest to bardzo różnorodna grupa, ze względu na mnogość surowców, z których mogą być wytwarzane [Mäkinen i wsp., 2016]. Napoje roślinne projektowane są w taki sposób, aby miały podobny wygląd, smak i właściwości do mleka krowiego, aby można było je stosować w podobny sposób. W praktyce jednak każdy rodzaj napoju roślinnego ma swoją unikalną charakterystykę, która wynika głównie z jego składu i operacji jednostkowych towarzyszących produkcji [McClements, 2020].

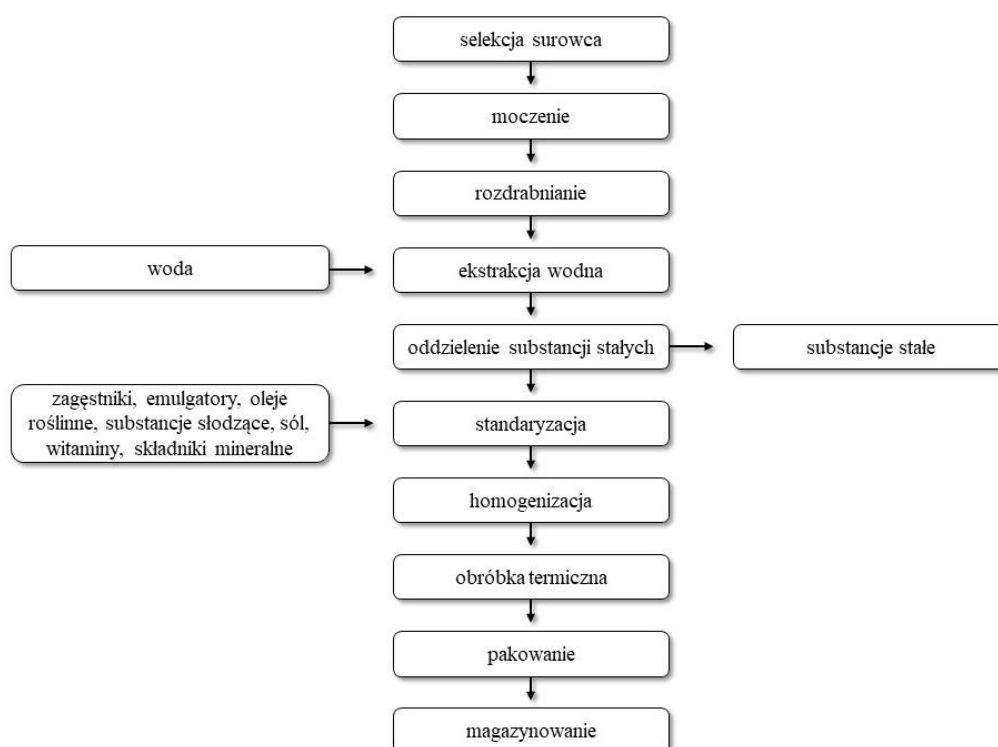
Wzrastające zainteresowanie substytutami mleka krowiego powoduje, że producenci żywności stają przed koniecznością ciągłego udoskonalania oferty napojów roślinnych. Konsumenci oczekują produktów nie tylko smacznych, ale przede wszystkim wartościowych odżywczo. Dlatego też istotnym zadaniem jest opracowanie innowacyjnych rozwiązań technologicznych, które umożliwią stworzenie napojów

roślinnych o bogatym profilu żywieniowym i atrakcyjnych właściwościach sensorycznych [Nawaz i wsp., 2022].

1.2. Charakterystyka napojów roślinnych

Napoje roślinne nie mają określonej definicji i klasyfikacji w literaturze, jednak najczęściej charakteryzuje się je jako produkty otrzymywane w wyniku wodnej ekstrakcji rozdrobnionych surowców roślinnych, w postaci zawiesin lub emulsji koloidalnych [Alcorta i wsp., 2021].

Technologia produkcji napojów roślinnych różni się w zależności od surowca, z którego są wytwarzane, jednak ogólny zarys procesu jest zazwyczaj podobny. Na rysunku 1 przedstawiono schemat ogólnej technologii produkcji napojów roślinnych. Proces rozpoczyna się od przygotowania surowców do dalszej obróbki poprzez ich czyszczenie i sortowanie. Następnie surowce poddaje się procesom moczenia, mielenia i ekstrakcji wodą. Otrzymaną zawiesinę filtruje się i/lub odwirowuje w celu usunięcia substancji stałych. Przefiltrowany płyn poddawany jest procesom standaryzacji, podczas których ujednociniany jest skład napojów oraz dodawane są składniki poprawiające właściwości technologiczne i funkcjonalne [Mäkinen i wsp., 2016; Jeske i wsp., 2017].



Rysunek 1. Ogólna technologia produkcji napojów roślinnych

Źródło: Opracowanie własne

W produkcji napojów roślinnych najczęściej stosuje się dodatki stabilizatorów i emulatorów (np. celulozy, tapioki, karagenu, mączki chleba świętojańskiego), olejów roślinnych (np. arachidowego, słonecznikowego), substancji słodzących i soli. Dodatkowo napoje roślinne wzbogacane są wapniem i witaminami (np. A i D). Zabiegi te są niezbędne w celu zbliżenia wartości odżywczej i właściwości sensorycznych napojów do mleka krowiego. Po procesie standaryzacji napoje są homogenizowane w celu zmniejszenia wielkości cząstek i ujednoczenia struktury. Powstały produkt poddaje się obróbce termicznej, najczęściej w formie pasteryzacji lub sterylizacji, w celu poprawy stabilności zawiesiny i dezaktywacji mikroorganizmów [Jeske i wsp., 2017; Walczak i wsp., 2017].

Napoje roślinne wytwarzane są z różnych surowców, w tym [Mäkinen i wsp., 2016; McClements, 2020]:

- zbóż (np. owies, ryż, proso);
- roślin strączkowych (np. soja, łubin, groch, fasola);
- orzechów (np. orzechy laskowe, migdały, orzechy nerkowca);
- nasion (np. sezam, konopie);
- pseudozbóż (np. komosa ryżowa, kasza gryczana);
- i innych materiałów (np. kokos).

Wartość odżywcza napojów roślinnych w większości przypadków istotnie różni się od mleka i jest uzależniona przede wszystkim od surowca, z którego są wytwarzane i stosowanej technologii produkcji [Aydar i wsp., 2020]. Porównanie wartości odżywczej mleka krowiego i wybranych napojów roślinnych przedstawiono w Tabeli 1. Większość z napojów roślinnych dostępnych na rynku charakteryzuje się wysoką zawartością węglowodanów i nawet kilkudziesięciokrotnie niższą zawartością białka w porównaniu do mleka krowiego [Fructuoso i wsp., 2021]. Ponadto w białkach roślinnych występują aminokwasy ograniczające (np. lizyna w zbożach, metionina w roślinach strączkowych), które wpływają na ich niższą jakość i przyswajalność w porównaniu do białek odzwierzęcych [Mäkinen i wsp., 2016]. Napoje roślinne przeważnie charakteryzują się niską naturalną zawartością tłuszczu, która jest zwiększana poprzez dodatek olejów roślinnych. W związku z tym w profilu kwasów tłuszczowych napojów roślinnych dominują nienasycone kwasy tłuszczowe głównie w postaci kwasu oleinowego, linolenowego i linolowego. Jest to kolejny czynnik

odróżniający je od mleka krowiego, w którym dominują nasycone kwasy tłuszczowe [Craig i Fresan, 2021].

Tabela 1. Porównanie wartości odżywczej mleka krowiego i wybranych napojów roślinnych

Rodzaj produktu	Zawartość składnika (g/100 g)			
	białko	tłuszcz	węglowodany	błonnik
Mleko krowie	3,3	3,9	4,6	–
Napój sojowy	2,9–8,7	1,7–4,3	0,2–5,0	0,5–0,9
Napój owsiany	0,4–1,0	0,7–1,5	6,5–12,7	0,0–0,8
Napój ryżowy	0,1–0,8	1,0–2,3	9,4–25,2	0,0–0,1
Napój migdałowy	0,5–1,6	1,1–2,7	1,3–3,0	0,6–1,6
Napój sezamowy	0,6	2,4–2,5	6,7–6,9	0,0–0,2
Napój kokosowy	< 1	4,4–5	1,1–7,0	0,0–0,2

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Mäkinen i wsp., 2016, Sethi i wsp., 2016, Vanga i Raghavan, 2018

Napoje roślinne charakteryzują się również odmienną zawartością mikroskładników w porównaniu do mleka krowiego. Substytuty mleka są przeważnie ubogie w wapń, którego źródłem w diecie człowieka jest mleko krowie (120 mg/100 g produktu). Ponadto mleko jest źródłem fosforu, potasu, cynku i magnezu [Walczak i wsp., 2017]. Z drugiej jednak strony napoje roślinne są bogate w szereg prozdrowotnych składników bioaktywnych, takich jak polifenole, fitosterole, czy β -glukany [Fructuoso i wsp., 2021]. Produkty te nie zawierają laktozy i cholesterolu, które bywają przyczyną rezygnacji konsumentów ze spożywania produktów odzwierzęcych [Aydar i wsp., 2020]. Czynniki te sprawiają, że napoje roślinne mogą być traktowane nie tylko jako zamienniki mleka, ale również jako odrębna grupa produktów, charakteryzująca się unikalnymi właściwościami prozdrowotnymi.

1.3. Napoje z nasion roślin strączkowych

Rośliny strączkowe stanowią podstawowe pożywienie dla ludzi w wielu krajach na świecie. Najczęściej spożywanymi odmianami są fasola, ciecierzycy, groch, soczewica, wspięga, łubin i soja [Kamboj i Nanda, 2018]. Nasiona roślin strączkowych mogą stanowić odpowiednie surowce do wytwarzania napojów roślinnych, przede

wszystkim ze względu na wysoką zawartość białka (w zakresie 19–36%), węglowodanów (30–60%) i błonnika pokarmowego (9–25%) [Kan i wsp., 2018]. Zwykle charakteryzują się niską zawartością tłuszczu, a w ich profilu kwasów tłuszczowych dominują nienasycone kwasy tłuszczowe. Są dobrym źródłem żelaza, wapnia, cynku, selenu, magnezu, fosforu, miedzi, potasu i witamin z grupy B, a jednocześnie są ubogie w witaminę C i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach [Ferreira i wsp., 2021]. Zawierają również szereg składników bioaktywnych, takich jak fitosterole o działaniu obniżającym cholesterol LDL we krwi, czy polifenole i aminokwasy (głównie tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan i cysteina) o działaniu przeciwutleniającym [Singh i wsp., 2017]. Dane epidemiologiczne wskazują, że spożycie przeciwutleniaczy roślin strączkowych zapewnia działanie ochronne przed niektórymi chorobami przewlekłymi związanymi ze stresem oksydacyjnym, takimi jak choroby układu krążenia, nowotwory, otyłość, cukrzyca i hipercholesterolemia [Petchiammal i Hopper, 2014; Singh i wsp., 2017].

Ze względu na swoje walory odżywcze i prozdrowotne, nasiona roślin strączkowych stanowią odpowiednią matrycę do wytwarzania substytutów mleka. Napoje z roślin strączkowych mają najbardziej zbilansowany skład spośród wszystkich rodzajów tego typu produktów [Lopes i wsp., 2020]. Charakteryzują się zawartością białka na poziomie 3,0–4,0%, podobnie jak w mleku krowim, podczas gdy inne rodzaje napojów (np. na bazie zbóż i orzechów) zawierają poniżej 2,0% białka [Qamar i wsp., 2020]. Jak dotąd najpowszechniej wykorzystywana do przemysłowej produkcji napojów roślinnych jest soja i to napój sojowy jest najszerzej opisywany w literaturze. Doniesienia literaturowe wskazują jednak, że również inne rodzaje roślin strączkowych mogą być odpowiednią matrycą do produkcji napojów roślinnych [Nawaz i wsp., 2020]. W przypadku napojów na bazie roślin strączkowych innych niż soja większość technologii produkcji nie została jeszcze całkowicie dopracowana, natomiast ich skład i właściwości są zmienne i bezpośrednio determinowane przez stosowane procesy technologiczne [Chen i wsp., 2019].

Podstawowa technologia produkcji napojów z nasion roślin strączkowych obejmuje selekcję surowca, namaczanie, mielenie, hydrolizę wodną, filtrację, homogenizację i obróbkę cieplną [Lopes i wsp., 2020]. Oprócz środków technologicznych w procesie produkcji napojów na bazie roślin strączkowych wykorzystuje się także słodziki, sól, aromaty i inne dodatki do żywności w celu zwiększenia ich ogólnej akceptacji sensorycznej [Nawaz i wsp., 2020]. Napoje na bazie

roślin strączkowych stanowią złożony układ koloidalny, w którym zawieszono są liczne cząstki, m.in. białka i tłuszcze. Taka budowa sprawia, że trudno jest uzyskać produkty o długotrwałej stabilności [Xia i wsp., 2019]. Białka roślin strączkowych, takich jak soja, ciecierzycyca, groch czy fasola, wykazują zdolność emulgowania dzięki adsorpcji na granicy faz olej-woda i tworzeniu stabilizujących filmów białkowych wokół kropelek oleju. Ta właściwość czyni je potencjalnymi stabilizatorami emulsji [Qamar i wsp., 2020].

1.4. Ograniczenia w spożyciu produktów z nasion roślin strączkowych i metody ich eliminacji

Pomimo bogactwa składników odżywczych i prozdrowotnych w roślinach strączkowych, wśród konsumentów w wielu rejonach świata obserwuje się pewne ograniczenia w ich włączaniu do codziennej diety. Wynika to przede wszystkim z obecności posmaków warzywnych/strączkowych, nieumiejętności ich odpowiedniego przygotowania przez konsumentów i obecności składników antyodżywczych [Nawaz i wsp., 2022]. Do głównych składników antyodżywczych roślin strączkowych należą: oligosacharydy z grupy rafinoz, inhibitory proteaz, fityniany oraz saponiny. Choć substancje te mogą mieć negatywny wpływ na organizm, często wykazują także korzystne działanie, co rodzi pytania o celowość ograniczania ich zawartości w tych roślinach [Mazquiz i wsp. 2012].

Jednym ze sposobów rozwiązania problemu niskiego spożycia roślin strączkowych w diecie może być wytworzenie z nich napojów roślinnych. Taka forma produktu sprawia, że konsumenci nie są zmuszeni do jego dalszego samodzielnego przetwarzania, jak w przypadku suchych nasion roślin strączkowych. W takiej sytuacji mają bezpośredni dostęp do pełnowartościowego produktu roślinnego, niezawierającego niekorzystnych składników ograniczających spożycie. Aby to osiągnąć konieczne jest jednak zastosowanie odpowiednich zabiegów technologicznych w produkcji napojów roślinnych, które pozwolą na eliminację czynników antyodżywczych występujących w surowcu.

Oligosacharydy są to węglowodany z rodziny rafinoz, do których należą m.in. rafinoza, stachioza i werbaskoza [Singh i wsp., 2017]. Są dobrze znane jako składniki, które powodują wzdęcia i dyskomfort po spożyciu roślin strączkowych w wyniku niedoboru enzymu α -galaktozydazy w organizmie człowieka [Campos-Vega i wsp., 2010]. Po spożyciu przedostają się do jelita grubego, gdzie ulegają fermentacji

beztlenowej przez bakterie jelitowe, w wyniku czego powstają wodór, dwutlenek węgla i metan [Mazquiz i wsp. 2012]. Oligosacharydy są jednocześnie uważane za składnik błonnika pokarmowego i mogą wykazywać działanie prebiotyczne poprzez stymulację wzrostu korzystnych dla jelit bakterii kwasu mlekowego (LAB – ang. *lactic acid bacteria*) i bifidobakterii oraz ograniczanie rozwoju gnilnych enterobakterii w okrężnicy [Singh i wsp., 2017].

Inhibitory proteaz w roślinach strączkowych hamują działanie enzymów trawiennych, takich jak trypsyna i chymotrypsyna, poprzez wiązanie konkurencyjne [Aviles–Gaciola i wsp., 2018]. Mogą zmniejszać strawność białka i wchłanianie składników odżywczych. Z drugiej strony uważa się je za naturalne substancje bioaktywne, które mogą wykazywać działanie przeciwnowotworowe [Nkhata i wsp., 2018]. Fityniany są to sole kwasu fitynowego, które spożywane w połączeniu z roślinami strączkowymi, mogą zmniejszać biodostępność składników mineralnych (np. wapnia, żelaza, cynku) i ograniczać enzymatyczne trawienie skrobi i białek. Istnieją jednak pewne korzystne skutki spożywania kwasu fitynowego, takie jak zmniejszenie biodostępności i toksyczności metali ciężkich (np. kadmu i ołowiu) z żywności. Fityniany wykazują również działanie przeciwutleniające i przeciwnowotworowe [Mazquiz i wsp. 2012; Kamboj i Nanda, 2018]. Saponiny działają drażniąco na żołądek i mogą hamować wchłanianie składników odżywczych w jelitach. Potencjalne korzyści wynikające z ich spożywania obejmują zmniejszone ryzyko rozwoju chorób układu krążenia i niektórych nowotworów [Kamboj i Nanda, 2018].

Spożycie surowych nasion roślin strączkowych, w tym fasoli i soczewicy, jest również niebezpieczne ze względu na obecność fitohemaglutynin. Fitohemaglutyniny mogą wywoływać objawy zatrucia pokarmowego, takie jak nudności, wymioty, biegunka i ból brzucha, jeśli zostaną spożyte w dużych ilościach. Aby zniszczyć znajdujące się w roślinach strączkowych fitohemaglutyniny, konieczna jest obróbka w wysokiej temperaturze: należy zastosować np. gotowanie w temperaturze 97 °C przez 35 minut lub sterylizację w temperaturze 121 °C przez 15 minut. W przeciwnym razie toksyczność nasion może nawet zwiększyć się [Nciri i wsp., 2015].

Składniki antyodżywcze z nasion roślin strączkowych mogą być eliminowane poprzez zastosowanie szeregu zabiegów technologicznych, takich jak m.in. moczenie, gotowanie, prażenie, ogrzewanie mikrofalowe, modyfikację skrobi, kiełkowanie i fermentacja [Lal i wsp., 2017; Margier i wsp., 2018]. Według literatury zabiegi te mogą również poprawiać smak tych surowców, zwiększać biodostępność składników

odżywczych, a także zwiększać strawność skrobi i białka [Kamboj i Nanda, 2018]. Niektóre składniki antyodżywcze w roślinach strączkowych są eliminowane już podczas wstępnego przetwarzania, tj. moczenia surowców i obróbki cieplnej. Wykazano wyższy poziom oligosacharydów w roślinach strączkowych, które nie były moczone przed obróbką cieplną [Han i Baik, 2006]. W nasionach soczewicy obróbka termiczna prawie całkowicie eliminuje inhibitory trypsyny – garbniki i kwas fitynowy. Zmniejsza jednak jednocześnie zawartość niektórych składników mineralnych i aminokwasów (lizyny, tryptofanu i aminokwasów siarkowych) [Hefnawy, 2011]. Obróbka cieplna może przyczyniać się również do eliminacji tzw. strączkowych posmaków, związanych z obecnością endogennych lipooksygenaz, które utleniają nienasycone kwasy tłuszczowe [Rincon i wsp., 2020]. Udowodniono, że strączkowe posmaki napoju sojowego mogą zostać ograniczone poprzez zastosowanie obróbki ziaren parą wodną w wysokiej temperaturze (ok. 130 °C) lub tradycyjnie poprzez ich gotowanie przed procesem mielenia lub zastosowanie kiełkowania [Lopes i wsp., 2020].

Obiecującymi technikami zmniejszenia zawartości składników antyodżywczych w nasionach roślin strączkowych są fermentacja i kiełkowanie. Procesy te mogą zwiększać biodostępność związków fenolowych oraz stymulować uwalnianie bioaktywnych peptydów [Abbas i Ahmad, 2018]. Proces kiełkowania jest aktywowany poprzez wchłanianie wody przez nasiono, co uruchamia szereg reakcji biochemicznych. Kiełkowanie roślin strączkowych zwiększa zawartość białka i błonnika pokarmowego, zmniejsza zawartość termostabilnych garbników i saponin oraz poprawia biodostępność składników mineralnych [Nkhata i wsp., 2018; Agrahar–Murugka i wsp., 2020]. Jedną z kluczowych reakcji jest także biosynteza białek, która zachodzi w zarodku. W czasie kiełkowania nasiona wykorzystują zapasy białka zgromadzone w nasieniu, ale również rozpoczynają biosyntezę nowych białek z aminokwasów. Aminokwasy te pochodzą z rozkładu białek zapasowych, a także z nowo syntetyzowanych węglowodanów. Warto podkreślić, że kiełkowanie nasion roślin strączkowych wiąże się ze znacznymi zmianami w ich profilu białkowym. Proces ten prowadzi do rozkładu niektórych białek zapasowych oraz syntezy nowych. Aktywacja enzymów proteolitycznych dodatkowo wpływa na przekształcanie białek. W efekcie, zarówno skład białkowy kiełkujących nasion, jak i napojów z nich otrzymywanych ulega modyfikacji. Badania z wykorzystaniem soi potwierdziły ten fakt, wykazując zwiększenie zawartości białka i równoczesną redukcję zawartości tłuszczu oraz szkodliwych substancji, takich jak

inhibitory trypsyny, saponiny i kwas fitynowy, po procesie kiełkowania [Lopes i wsp., 2020].

Badania wykazały, że różne metody przetwarzania, w tym moczenie i kiełkowanie, zmniejszają zawartość niestrawnych oligosacharydów z rodziny rafinoz, do których należą stachioza, rafinoza i werbaskoza [Silva i Braga, 1982; Vidal-Val Verde i wsp., 1992; Kannan i wsp., 2018]. Nazywa się je oligosacharydami galaktozylosacharozowymi lub α -galaktozydami, gdyż posiadają charakterystyczne wiązanie α -galaktozydowe pomiędzy sacharozą i galaktozą. Wiązanie to jest niezwykle ważne, gdyż człowiek nie posiada enzymu α -galaktozydazy niezbędnego do jego hydrolizy, dlatego oligosacharydy w rodziny rafinoz nie mogą zostać strawione po spożyciu. Nienaruszone oligosacharydy docierają do okrężnicy, gdzie są metabolizowane przez LAB i bifidobakterie [Dostálová i wsp., 2009]. Obecność tych oligosacharydów w diecie jest przyczyną nadmiernego tworzenia się gazów i dyskomfortu trawiennego u większości ssaków.

Większość napojów roślinnych opisanych w literaturze jest fermentowana przy użyciu monokultur LAB, bakterii z rodzajów *Streptococcus* lub *Bifidobacterium*, a także mikroflory grzybków kefirowych [Bernat i wsp., 2014; Verni i wsp., 2020]. Bardzo nieliczne są publikacje dotyczące wykorzystania komercyjnych kultur starterowych przeznaczonych do otrzymywania mlecznych i niemlecznych napojów fermentowanych. Dane literaturowe potwierdzają, że bakterie LAB i bifidobakterie wykazują wysoką aktywność enzymów, takich jak α - i β -galaktozydaza [Asmahan, 2010; Panesar, 2011]. Wykazano także zdolność tych szczepów do hydrolizy oligosacharydów z rodziny rafinoz [Mechai i wsp., 2014]. Wiadomo już, że wyniku procesu fermentacji dochodzi m.in. do obniżenia zawartości oligosacharydów, garbników, inhibitorów proteaz i kwasu fitynowego, co zwiększa biodostępność wapnia, żelaza i cynku [Akeem i wsp., 2019; Hati i wsp., 2013]. Ponadto kwasy organiczne wytwarzane podczas fermentacji przyczyniają się do zwiększania wchłaniania żelaza i cynku poprzez tworzenie rozpuszczalnych ligandów [Kumari i wsp., 2018]. Fermentacja napojów na bazie roślin strączkowych prowadzi również do zwiększenia właściwości przeciwutleniających [Zhang i wsp., 2021]. Ponadto, napój sojowy fermentowany z *Pediococcus pentosaceus* i *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* wykazał działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko wybranym patogenom przenoszonym przez żywność, np. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* [Olaniyi i wsp., 2019]. Stosowanie procesu kiełkowania

nasion przed fermentacją napojów roślinnych okazuje się korzystne, ponieważ w napojach z nasion skielkowanych obserwuje się przyspieszone tempo wzrostu szczepów probiotycznych. Zjawisko to wynika ze zwiększonej zawartości monosacharydów i aminokwasów [Ziarno i wsp., 2020].

1.5. Możliwe kierunki rozwoju napojów roślinnych z nasion roślin strączkowych

Wartość odżywcza nasion roślin strączkowych wpływa na ich wysoki potencjał do wykorzystania jako surowce do produkcji napojów roślinnych [Nawaz i wsp., 2022]. Rosnące wymagania konsumentów sprawiają, że konieczne jest poszerzanie rynku o produkty prozdrowotne, które sprostają ich wymaganiom [Topolska i wsp., 2021]. Jak dotąd w tym celu wykorzystywana była przede wszystkim soja, jednak korzystne może okazać się zastosowanie innych surowców z tej grupy, takich jak fasola, soczewica, groch czy łubin, których potencjał zdaje się być wciąż niewykorzystany. W celu wytworzenia napojów z roślin strączkowych, które będą cieszyły się akceptacją konsumentów, konieczny jest jednak dobór i optymalizacja procesów technologicznych stosowanych w czasie produkcji.

Równoległe ze zwiększeniem zapotrzebowania na roślinne zamienniki mleka obserwuje się zwiększone zainteresowanie roślinnymi produktami fermentowanymi [Rasika i wsp., 2021]. Rośliny strączkowe stanowią potencjalne matryce jako nośniki probiotyków, ponieważ zawierają nieulegające trawieniu oligosacharydy i skrobię oporną, które mogą być metabolizowane przez mikroorganizmy. Właściwości roślin strączkowych pozwalają na wykorzystanie ich do tworzenia żywności symbiotycznej, będącej źródłem probiotyków i prebiotyków [Mohanty i wsp., 2018]. Fermentacja może prowadzić do produkcji nowej gamy produktów, o lepszym profilu sensorycznym, właściwościach odżywczych i zapewnionym bezpieczeństwie [Tangyu i wsp., 2019; Verni i wsp., 2020]. Produkty wytwarzane metodą fermentacji roślinnej z probiotykami mogą sprostać zapotrzebowaniu konsumentów na bezmleczne produkty prozdrowotne [Aduol i wsp., 2020; Kumari i wsp., 2018]. Rozwój produktów fermentowanych, nadających się do komercjalizacji, wymaga jednak starannego opracowania technologii i parametrów przetwarzania.

Dotychczas w literaturze pojawiło się niewiele publikacji dotyczących właściwości napojów na bazie roślin strączkowych innych niż te z nasion soi. Obiecującymi surowcami do produkcji tego typu produktów wydają się fasola i

soczewica, które charakteryzują się wysoką zawartością białka, błonnika, witamin, składników mineralnych i bioaktywnych [Qamar i wsp., 2020]. W dostępnej literaturze naukowej istnieje wyraźny deficyt badań nad właściwościami fizykochemicznymi i sensorycznymi omawianych produktów, doбором optymalnych kultur starterowych do ich fermentacji oraz charakterystyką fizycznych właściwości tego typu układów. Ponadto, brakuje systematycznych badań nad sposobami poprawy jakości napojów z fasoli i soczewicy, zmierzających do zwiększenia ich wartości odżywczej i atrakcyjności sensorycznej, co mogłoby przyczynić się do zwiększenia ich konsumpcji.

2. CEL I ZAKRES PRACY DOKTORSKIEJ

Celem głównym pracy doktorskiej było opracowanie fermentowanych napojów roślinnych z fasoli białej i soczewicy brązowej z zastosowaniem wybranych procesów technologicznych, poprawiających ich wartość odżywczą i zawartość składników bioaktywnych.

Wyodrębniono następujące cele szczegółowe:

- Opracowanie receptury napojów roślinnych z fasoli białej i soczewicy brązowej;
- Określenie drobnoustrojów odpowiednich do fermentacji opracowanych napojów;
- Zbadanie zmian zawartości wybranych składników odżywczych i biochemicznych na różnych etapach przetwarzania opracowanych napojów fermentowanych;
- Wskazanie etapów przetwarzania badanych napojów roślinnych, w których dochodzi do zmniejszenia bądź zwiększenia zawartości i/lub dostępności wybranych składników biochemicznych.

Zakres pracy obejmował:

- Wytworzenie napojów roślinnych z fasoli białej i soczewicy brązowej, wraz z doбором parametrów procesów kiełkowania i fermentacji;
- Charakterystykę wartości odżywczej, właściwości fizycznych i właściwości biochemicznych napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej;
- Ocenę wpływu procesów kiełkowania i fermentacji na zmiany wartości odżywczych, właściwości fizycznych i właściwości biochemicznych napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej;
- Analizę wpływu kiełkowania, fermentacji i dodatku smakowego na charakterystykę sensoryczną napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej.

3. HIPOTEZY BADAWCZE

Hipoteza 1: Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej są odpowiednimi matrycami do procesu fermentacji.

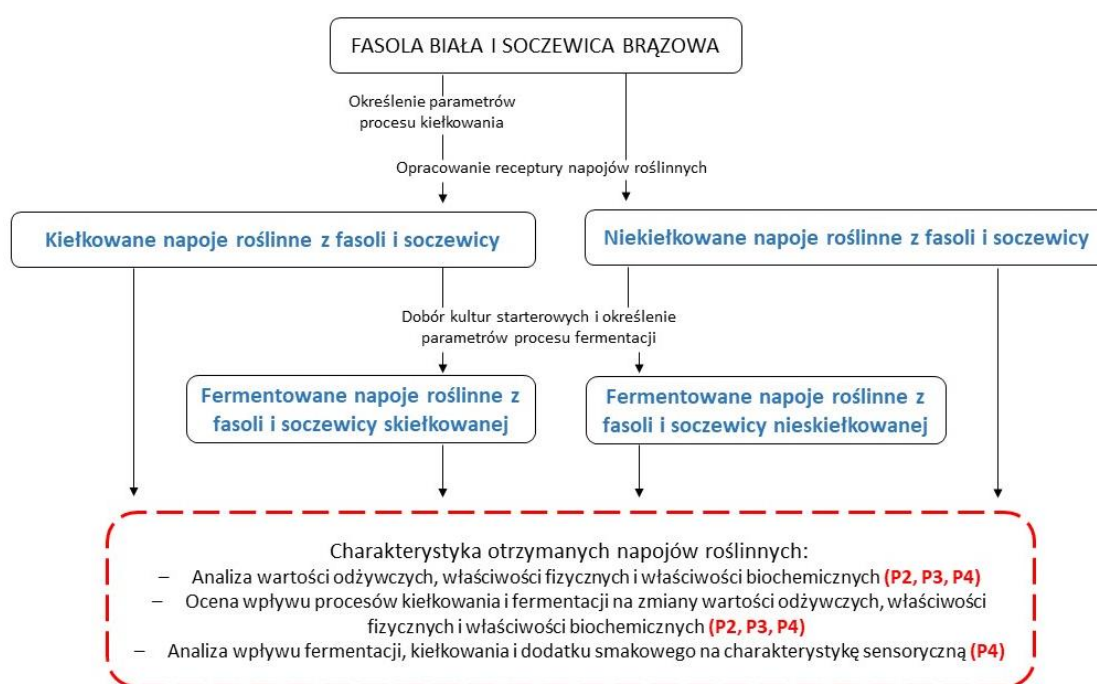
Hipoteza 2: Zastosowanie procesu fermentacji w produkcji napojów na bazie fasoli białej i soczewicy brązowej wpływa na zmiany ich wartości odżywczej, właściwości fizycznych i biochemicznych, w zależności od rodzaju zastosowanych kultur starterowych.

Hipoteza 3: Proces kiełkowania nasion fasoli białej i soczewicy brązowej wpływa na zmiany właściwości biochemicznych i wartości odżywczej napojów roślinnych przygotowanych z tych surowców, w porównaniu do napojów przygotowanych z nasion nieskiełkowanych.

Hipoteza 4: Zastosowanie fermentacji, kiełkowania i dodatku smakowego wpływa na poprawę właściwości sensorycznych napojów roślinnych na bazie fasoli białej i soczewicy brązowej.

4. ORGANIZACJA DOŚWIADCZENIA

Przedstawione w cyklu publikacyjnym badania zrealizowano zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 1. Badania rozpoczęto od określenia optymalnych parametrów do procesu kiełkowania fasoli białej i soczewicy brązowej. Następnie opracowano recepturę i parametry wytwarzania napojów roślinnych z badanych surowców. Dla opracowanych napojów przeprowadzono analizy mające na celu określenie przydatności badanych kultur starterowych do zastosowania w procesie fermentacji.



Rysunek 1. Schemat przeprowadzonych badań

Otrzymane napoje, zarówno z nasion skiełkowanych jak i nieskiełkowanych, fermentowano z zastosowaniem wybranych kultur starterowych, otrzymując po cztery podstawowe warianty każdego z analizowanych napojów roślinnych:

- Napoje z fasoli białej/soczewicy brązowej nieskiełkowane
- Napoje z fasoli białej/soczewicy brązowej skiełkowane
- Napoje z fasoli białej/soczewicy brązowej nieskiełkowane, fermentowane
- Napoje z fasoli białej/soczewicy brązowej skiełkowane, fermentowane.

Tak przygotowane warianty napojów scharakteryzowano poprzez określenie wartości odżywczej, właściwości fizycznych i właściwości biochemicznych. Analizy wykonano

dla napojów bazowych, jak również określono wpływ procesów kiełkowania i fermentacji na badane parametry. Ponadto dokonano charakterystyki sensorycznej napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej w wariantach: bazowym, skiełkowanym, fermentowanym i z dodatkiem smakowym. Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono z zastosowaniem kodów próbek przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2. Objasnienie kodów próbek badanych napojów z fasoli białej (NF) i soczewicy brązowej (NS)

Kod próbki	Kiełkowanie	Fermentacja	Przechowywanie w 6°C	Dodatek wsadu smakowego
NF/NS	–	–	–	–
NF/NS+BS	–	Beaugel Soja 1	–	–
NF/NS+YO–MIX	–	YO–MIX 207	–	–
NF/NS+ABY–3	–	ABY–3	–	–
NF/NSp	–	–	–	–
NF/NSp+BS	–	Beaugel Soja 1	21 dni	–
NF/NSp+YO–MIX	–	YO–MIX 207	21 dni	–
NF/NSp+ABY–3	–	ABY–3	21 dni	–
NF/NSK	+	–	–	–
NF/NSK+BS	+	Beaugel Soja 1	–	–
NF/NSK+YO–MIX	+	YO–MIX 207	–	–
NF/NSK+ABY–3	+	ABY–3	–	–
NF/NSKp	+	–	–	–
NF/NSKp+BS	+	Beaugel Soja 1	21 dni	–
NF/NSKp+YO–MIX	+	YO–MIX 207	21 dni	–
NF/NSKp+ABY–3	+	ABY–3	21 dni	–
NF/NS+owoc	–	–	–	+

5. MATERIAŁ BADANY I METODYKA

5.1. Materiał badany

Materiał badany stanowiły napoje roślinne z fasoli białej odmiany Piękny Jaś Karłowy (Lestello Sp. z o.o., Cmolas, Polska) i soczewicy brązowej (Natural Expert, Białystok, Polska), wytworzone w następujących wariantach:

- z fasoli białej/soczewicy brązowej nieskiełkowane
- z fasoli białej/soczewicy brązowej skiełkowane
- z fasoli białej/soczewicy brązowej nieskiełkowane, fermentowane
- z fasoli białej/soczewicy brązowej skiełkowane, fermentowane.

Wartość odżywcza suchych nasion fasoli białej i soczewicy brązowej, deklarowaną przez producenta, przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Wartość odżywcza suchych nasion fasoli białej i soczewicy brązowej

Wartość odżywcza w 100 g produktu		Fasola biała	Soczewica brązowa
Wartość energetyczna	[kcal]	295	353
	[kJ]	1237	1477
Tłuszcz	[g]	2,3	1,1
– w tym kwasy tłuszczowe nasycone	[g]	0,5	0,2
Węglowodany	[g]	37	28,6
– w tym cukry	[g]	9,7	2,0
Białko	[g]	19	25,8
Sól	[g]	<0,05	<0,05

Materiał badany stanowiły również trzy przemysłowe, liofilizowane kultury starterowe, które wykorzystano do procesu fermentacji, w tym:

- Beaugel Soja 1 (Ets Coquard, Villefranche-sur-Saône, Francja), zawierająca *Lacticaseibacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;
- YO-MIX 207 LYO 500 DCU (DuPont™ Danisco, Kopenhaga, Dania), zawierająca *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis*;

- ABY-3 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dania), zawierająca *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

5.2. Metodyka badań

Proces kiełkowania

Nasiona fasoli białej i soczewicy brązowej, przeznaczone do wytworzenia napojów z fasoli skiełkowanej, poddano procesowi kiełkowania w kiełkownicy w temperaturze 28 °C przez 72 godziny (wymieniając wodę co 24 godziny).

Wytworzenie napojów roślinnych

Skiełkowane lub nieskiełkowane nasiona fasoli białej/soczewicy brązowej poddano procesowi sterylizacji w temperaturze 121 °C przez 15 minut, zmieszano z wodą pitną w stosunku 1:9 (w/w) i zblendowano do uzyskania jednorodnej masy. Uzyskaną masę przecedzono przez sito o wielkości oczek 0,1 mm, a otrzymane napoje homogenizowano z wykorzystaniem miksera laboratoryjnego i poddano procesowi sterylizacji w temperaturze 121 °C przez 15 minut. Próbkę przeznaczoną do oznaczeń właściwości fizycznych została dodatkowo poddana procesowi homogenizacji dwustopniowej przy ciśnieniu 50 MPa/5 MPa w homogenizatorze wysokociśnieniowym NS 1001 L2 PANDA, GEA Niro Soavi (GEA, Parma, Włochy). Zabieg homogenizacji przeprowadzono przed końcową sterylizacją.

Proces fermentacji

Próbki napojów o objętości 100 cm³ zaszczepiono inokulum każdej z badanych kultur starterowych (1,0% w/w, gęstość komórek 6–7 log jtk/cm³). Inokulum przygotowano poprzez rozpuszczenie liofilizowanych kultur starterowych w sterylnym roztworze soli fizjologicznej. Proces fermentacji prowadzono w temperaturze 45 °C przez 6 godzin.

Wytworzenie napoju z dodatkiem smakowym

Na potrzeby przeprowadzenia charakterystyki sensorycznej badanych napojów otrzymano ich warianty smakowe poprzez dodanie do napoju z fasoli nieskiełkowanej wsadu malinowo-żurawinowego (Eurohansa, Toruń, Polska) w ilości 15% (w/w).

Analiza procesu fermentacji

W celu analizy procesu fermentacji napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej skielkowanych i nieskielkowanych, przed i po fermentacji z wykorzystaniem trzech badanych kultur starterowych, dokonano oznaczeń:

- Kwasowości czynnej: metodą potencjometryczną z wykorzystaniem cyfrowego pH–metru, w dwóch powtórzeniach [P3];
- Populacji mikroflory: metodą hodowli na szalkach Petriego w podłożach agarowych De Mana, Rogosy i Sharpe'a (MRS) dla LAB, M17 dla *Streptococcus thermophilus* i Bifidus Selective Medium (BSM) dla bifidobakterii. Płytki Petriego inkubowano w temperaturze 37 °C przez 72 godziny w warunkach tlenowych dla *Streptococcus thermophilus* i w warunkach beztlenowych dla bifidobakterii i pałeczek kwasu mlekowego. Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, a wynik wyrażono jako logarytm liczby jednostek tworzących kolonie (log jtk/g). Analizowano próbki bezpośrednio po fermentacji i po 21 dniach przechowywania w temperaturze 6 °C [P3].

Charakterystyka wartości odżywczej

W celu dokonania analizy wartości odżywczej napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej dokonano następujących oznaczeń:

- Zawartości tłuszczu: metodą butyrometryczną, w trzech powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych [P3];
- Zawartości białka: metodą Kjeldahla, w trzech powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych [P3];
- Suchej masy: metodą suszarkową, w trzech powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych [P3];
- Profilu kwasów tłuszczowych: zgodnie z metodą opisaną przez Ziarno i wsp. [2020], wykorzystując chromatografię gazową z detektorem płomieniowo–jonizacyjnym (GC–FID) i kolumną kapilarną. Udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w profilu ustalono poprzez obliczenie udziału powierzchni każdego pików w całkowitej powierzchni pików. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych [P3];

- Rozmieszczenia kwasów tłuszczowych w cząsteczkach triacylogliceroli (TAG) w pozycjach sn-1, sn-2 i sn-3: zgodnie z metodą opisaną przez Ziarno i wsp. [2020] wykorzystując CG-FID z kolumną kapilarną. Hydrolizę TAG wykonano z zastosowaniem świńskiej lipazy trzustkowej i chromatografii cienkowarstwowej, z żelem krzemionkowym jako faza stacjonarna. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skiełkowanych i nieskiełkowanych [P3];
- Zawartości węglowodanów: metodą opisaną przez Ziarno i wsp. [2019], wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detektorem refraktometrycznym. Zawartość poszczególnych węglowodanów oszacowano poprzez określenie powierzchni pików na chromatogramie w odniesieniu do pól powierzchni otrzymanych dla roztworów wzorcowych. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skiełkowanych i nieskiełkowanych [P3];
- Błonnika pokarmowego: metodą AOAC 991.43:1994, pozwalającą na oznaczenie błonnika całkowitego, w trzech powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skiełkowanych i nieskiełkowanych [P4];
- Indeksu glikemicznego (IG): metodą *in vitro* zgodnie z U.S. Pat. 2009/0004642 A1 autorstwa Magaletta i DiCataldo [2009] z pewnymi modyfikacjami. W celu imitacji procesu trawienia próbki napojów wytrawiano z wykorzystaniem mieszaniny enzymów: 10 000 IU lipazy, 8000 IU amylazy i 600 IU proteazy. W celu określenia zawartości poszczególnych węglowodanów po procesie trawienia *in vitro* próbki poddano analizie z wykorzystaniem HPLC. Kalkulacji indeksu glikemicznego dokonano z wykorzystaniem równania:

$$\text{IG} = 63,080214 - 0,974313 \text{ Białko}(\%) - 0,67442 \text{ Tłuszcz}(\%) + 367,97478 \\ \text{Glukoza}(\%) - 452,5341 \text{ Fruktioza}(\%) - 191,8138 \text{ Laktoza}(\%) - 437,3615 \\ \text{Galaktoza}(\%) - 298,0102 \text{ Maltitol}(\%)$$
 Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skiełkowanych i nieskiełkowanych [P4];
- Zawartości witamin z grupy B: metodą HPLC z detektorem absorpcyjnym UV-VIS, zgodnie z metodyką Agostini-Costa et al. [2007]. Witaminy B zidentyfikowano przez porównanie ich czasów retencji z czasami retencji roztworów standardów witamin (w tym tiaminy, ryboflawiny, niacyny, kwasu

pantotenowego, pirydoksyny, biotyny, kwasu foliowego i cyjanokobalaminy). Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując fermentowane napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych [P4].

Charakterystyka właściwości fizycznych

W celu dokonania analizy właściwości fizycznych napojów z fasoli białej dokonano następujących oznaczeń:

- Barwy: z zastosowaniem kolorymetru Minolta CR-400, zgodnie z systemem pomiarowym CIEL*a*b* (L^* – jasność, a^* – udział barwy czerwonej/zielonej, b^* – udział barwy niebieskiej/żółtej). Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, porównując napoje skielkowane, nieskielkowane i fermentowane. Wyznaczono całkowitą różnicę barwy ΔE napojów przed fermentacją (L_1^* , a_1^* , b_1^*) i po fermentacji (L_2^* , a_2^* , b_2^*), używając wzoru:

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2} \text{ [P2];}$$

- Stabilności napojów roślinnych: z wykorzystaniem analizatora stabilności Turbiscan Lab Expert, w oparciu o wskaźnik stabilności Turbiscan (TSI – ang. turbiscan Stability Index), zgodnie z metodyką Wang i wsp. [2018]. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane i po 21 dniach przechowywania w temperaturze 6 °C [P2];
- Wielkości cząstek: z wykorzystaniem laserowego analizatora CILAS 1190, zgodnie z metodyką Domian i wsp. [2020]. Średnią średnicę cząstek rejestrowano jako średnią średnicę objętościową $d_{4,3}$. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane [P2];
- Właściwości reologicznych: z wykorzystaniem reometru Haake MARS 40, w temperaturze 20 °C. Analizy szybkości ścinania próbek wykonano przy liniowo rosnącej szybkości ścinania wynoszącej od 0 do 100 s⁻¹. W ramach badań oscylacyjnych wykonano testy przemiatania odkształceniem i przemiatania częstotliwością, charakteryzując parametry lepkość przężyste próbek, tj. moduł sprężystości (G'), moduł lepkości (G'') i lepkość zespoloną ($|\eta^*|$). Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane [P2].

Charakterystyka właściwości biochemicznych

W celu dokonania analizy właściwości biochemicznych napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej dokonano następujących oznaczeń:

- Zawartości fenoli: metodą Folina–Ciocalteu’a. Próbki przygotowano i przeanalizowano zgodnie z metodyką przedstawioną przez Zhao i Shah [2014]. Całkowitą zawartość fenoli wyrażono w miligramach kwasu galusowego GAE/cm³ napoju. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane **[P3]**;
- Właściwości przeciwutleniających: poprzez oznaczenie zdolność inhibicji rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego (DPPH), według metodyki przedstawionej przez Zhao i Shah [2014]. Zdolność inhibicji rodnika DPPH wyrażono jako procent hamowania DPPH, stosując następujące równanie.

$$\text{DPPH RSA (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100,$$

gdzie A_0 to absorbancja metanolowego roztworu rodnika DPPH, a A_s to absorbancja analizowanej próbki. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane **[P3]**;

- Zawartości aglikonów izoflawonów: metodą HPLC z detektorem diodowym, zgodnie z metodyką da Costa Cesar i wsp., [2006], na materiale poddanym procesowi liofilizacji i hydrolizie kwasowej. Zawartość daidzeiny, genisteiny i glicyteiny identyfikowano na podstawie czasu retencji, porównywanego z czasem retencji roztworów wzorców. Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane **[P4]**;
- Profilu lotnych związków: metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS), zgodnie z metodyką Sokołowskiej i wsp. [2020]. Próbki do oznaczeń przygotowano metodą mikroekstrakcji do fazy stałej, z wykorzystaniem włókien SPME, pokrytych filmem diwinylobenzen/carboxen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS). Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, porównując napoje z nasion skielkowanych i nieskielkowanych oraz napoje fermentowane **[P4]**.

Charakterystyka sensoryczna

Podobieństwa i różnice w jakości sensorycznej napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej przeanalizowano metodą ilościowej analizy opisowej (QDA – ang. *Quantitative Descriptive Analysis*), zgodnie z normą PN–EN ISO 13299:2016. Charakterystykę sensoryczną próbek przeprowadził 9-osobowy zespół oceniających posiadający kwalifikacje oceniających – ekspertów. Oceny realizowano w Pracowni Analizy Sensorycznej, Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie. Do analizy profilowej napojów roślinnych wybrano 32 atrybuty wyglądu zewnętrznego, zapachu, konsystencji oraz smaku. Intensywność wyróżników, odczuwanych w produktach, zaznaczano na 10-centymetrowej skali liniowej. Każda próbka analizowana była w dwóch niezależnych powtórzeniach, a podstawą otrzymanych wyników średnich było 18 ocen jednostkowych [P4]. Niniejsze badanie uzyskało akceptację Rektorskiej Komisji ds. Etyki Badań Naukowych z Udziałem Człowieka SGGW, która dokonała przeglądu i zatwierdzenia procedur sensorycznych (12/RKE/2023/U, 20 kwietnia 2023).

5.3. Opracowanie danych i analiza statystyczna

Otrzymane wyniki zgromadzono i opracowano z wykorzystaniem programu Microsoft Excel. Do analizy danych uzyskanych w przeprowadzonych badaniach wykorzystano program Statistica w wersji 13.1 (StatSoft, Kraków, Polska). W celu określenia wpływu kiełkowania, fermentacji i przechowywania na uzyskane wyniki przeprowadzono analizę wariancji ANOVA. Istotność otrzymanych różnic analizowano z zastosowaniem testu Tukeya, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki analizy sensorycznej analizowano z zastosowaniem programu XLSTAT 2021 (Addinsoft, Paryż, Francja). Do określenia podobieństw i różnic w charakterystyce sensorycznej napojów wykorzystano Analizę Składowych Głównych.

6. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

6.1. Analiza procesu fermentacji

Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej poddano procesowi fermentacji z zastosowaniem trzech komercyjnych kultur starterowych. Fermentacji poddano napoje w wariacie bazowym, napoje z nasion poddanych procesowi kiełkowania oraz napoje po 21 dniach przechowywania w temperaturze 6 °C. Wyniki analiz kwasowości czynnej i populacji mikroflory napojów przedstawiono w trzecim artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P., Bryś J., Ziarno M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, 13, 16976.**

Fermentacja napojów roślinnych zazwyczaj wymaga dłuższego czasu procesu (około 12–48 godzin) w porównaniu z fermentacją mleczarską (około 4–6 godzin) [Cichońska i Ziarno, 2022; Shafiee i wsp., 2010]. Podczas fermentacji zarówno mleka, jak i jego substytutów, korzystne jest utrzymywanie pH w zakresie 4,3–4,7. Kwaśne pH chroni produkt przed skażeniem mikrobiologicznym i nadaje korzystne właściwości organoleptyczne, związane ze stężeniem kwasów organicznych i innych składników smakowo-zapachowych, takich jak np. diacetyl [Sfakianakis i Tzia, 2014; Fazilah i wp., 2018].

W Tabeli 4 przedstawiono wartości pH oraz populację LAB i bifidobakterii w napojach z fasoli i soczewicy. W tabelach przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania). We wszystkich fermentowanych próbkach napojów wykazano istotne zmniejszenie wartości pH, co wskazuje na aktywność metaboliczną mikroorganizmów w badanych kulturach starterowych. We wszystkich badanych próbkach napojów nie zaobserwowano istotnych zmian pH po okresie 21 dni przechowywania w warunkach chłodniczych. Głównym czynnikiem mającym wpływ na uzyskane wartości była fermentacja ($\eta^2 \approx 0,925\text{--}0,989$).

Tabela 4. Populacja LAB i bifidobakterii oraz pH napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbki ¹	pH	populacja bakterii [log ₁₀ CFU/mL]		
		pałeczki kwasu mlekowego	<i>S. thermophilus</i>	bifidobakterie
Napoje z fasoli białej				
NF	6,03 ± 0,32 ^b	nw	nw	nw
NF+BS	4,79 ± 0,17 ^a	5,99 ± 0,05 ^b	9,60 ± 0,07 ^d	nw
NF+YO-MIX	4,59 ± 0,36 ^a	7,17 ± 0,06 ^{cd}	8,16 ± 0,13 ^{cd}	8,07 ± 0,22 ^b
NF+ABY-3	4,39 ± 0,25 ^a	7,50 ± 0,02 ^{de}	9,53 ± 0,18 ^d	7,86 ± 0,08 ^{ab}
NFp	5,96 ± 0,38 ^b	nw	nw	nw
NFp+BS	4,73 ± 0,25 ^a	5,25 ± 0,21 ^a	6,87 ± 0,11 ^b	nw
NFp+YO-MIX	4,39 ± 0,55 ^a	7,28 ± 0,09 ^{cd}	8,18 ± 0,23 ^{cd}	7,52 ± 0,13 ^a
NFp+ABY-3	4,38 ± 0,26 ^a	7,49 ± 0,04 ^{de}	7,72 ± 0,09 ^c	7,43 ± 0,24 ^a
NFK	6,35 ± 0,06 ^b	nw	nw	nw
NFK+BS	4,74 ± 0,24 ^a	5,86 ± 0,11 ^b	7,72 ± 0,18 ^c	nw
NFK+YO-MIX	4,30 ± 0,07 ^a	7,17 ± 0,18 ^{cd}	8,08 ± 0,20 ^{cd}	7,76 ± 0,13 ^{ab}
NFK+ABY-3	4,27 ± 0,22 ^a	7,73 ± 0,11 ^{de}	7,72 ± 0,17 ^c	7,72 ± 0,18 ^{ab}
NFK	6,30 ± 0,02 ^b	nw	nw	nw
NFKp+BS	4,72 ± 0,06 ^a	5,15 ± 0,07 ^a	6,14 ± 0,19 ^a	nw
NFKp+YO-MIX	4,40 ± 0,18 ^a	7,47 ± 0,09 ^{de}	8,32 ± 0,18 ^d	7,74 ± 0,14 ^{ab}
NFKp+ABY-3	4,31 ± 0,13 ^a	7,03 ± 0,08 ^c	7,71 ± 0,11 ^c	7,42 ± 0,13 ^a
Statystyka ANOVA. η ² [-]				
Kiełkowanie	ns	ns	ns	ns
Fermentacja	0,925	0,995	0,969	0,999
Przechowywanie	ns	0,211	0,265	0,261
Napoje z soczewicy brązowej				
NS	6,36 ± 0,08 ^e	nw	nw	nw
NS+BS	4,36 ± 0,04 ^{cd}	5,73 ± 0,10 ^{ab}	8,60 ± 0,08 ^e	nw
NS+YO-MIX	4,43 ± 0,02 ^{abcd}	6,15 ± 0,17 ^{bc}	7,65 ± 0,19 ^{cd}	6,89 ± 0,06 ^a
NS+ABY-3	4,38 ± 0,01 ^{abcd}	6,34 ± 0,10 ^{cd}	8,62 ± 0,11 ^e	6,75 ± 0,14 ^a
NSp	6,27 ± 0,03 ^e	nw	nw	nw
NSp+BS	4,67 ± 0,08 ^d	5,87 ± 0,18 ^{abc}	7,28 ± 0,18 ^c	nw
NSp+YO-MIX	4,46 ± 0,08 ^{abcd}	7,23 ± 0,15 ^{ef}	7,69 ± 0,13 ^{cd}	8,02 ± 0,12 ^{bc}
NSp+ABY-3	4,37 ± 0,11 ^{abcd}	7,30 ± 0,16 ^{fg}	5,82 ± 0,29 ^a	7,69 ± 0,11 ^{bc}
NSK	6,39 ± 0,03 ^e	nw	nw	nw
NSK+BS	4,51 ± 0,21 ^{abcd}	6,78 ± 0,17 ^{de}	7,75 ± 0,14 ^{cd}	nw
NSK+YO-MIX	4,19 ± 0,01 ^a	7,75 ± 0,08 ^{gh}	7,62 ± 0,17 ^{cd}	7,52 ± 0,13 ^b
NSK+ABY-3	4,21 ± 0,21 ^{ab}	7,80 ± 0,15 ^h	7,88 ± 0,04 ^d	7,47 ± 0,20 ^b
NSK	6,26 ± 0,05 ^e	nw	nw	nw
NSKp+BS	4,58 ± 0,07 ^{bcd}	6,67 ± 0,16 ^d	7,49 ± 0,01 ^{cd}	nw
NSKp+YO-MIX	4,25 ± 0,07 ^{abc}	5,59 ± 0,16 ^a	6,74 ± 0,21 ^b	6,83 ± 0,12 ^a
NSKp+ABY-3	4,14 ± 0,04 ^a	7,66 ± 0,06 ^{fgh}	7,25 ± 0,12 ^{bc}	6,64 ± 0,09 ^a
Statystyka ANOVA. η ² [-]				
Kiełkowanie	0,347	ns	ns	ns
Fermentacja	0,989	0,969	0,978	0,992
Przechowywanie	ns	ns	0,358	ns

a, b, c, d, e, f, g, h – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$); nw – nie wykryto; ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

W momencie spożycia produkty probiotyczne muszą zawierać odpowiednią liczbę żywych komórek bakterii probiotycznych, wahającą się od co najmniej 10^6 do 10^7 jtk/cm³, aby mogły wywierać korzystne działanie na organizm [Fazilah i wp., 2018]. W tym badaniu, stosując kultury starterowe YO-MIX 207 (NF/NS/NFK/NSK+YO-MIX) i ABY-3 (NF/NS/NFK/NSK+ABY-3), zalecaną liczbę żywotnych komórek z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* uzyskano po fermentacji wszystkich badanych próbek. Co niezwykle istotne, w większości analizowanych próbek nie zaobserwowano redukcji populacji bakterii poniżej 10^7 jtk/cm³ po okresie przechowywania. Próbki NF, NFK i NS poddane fermentacji z kulturą starterową Beaugel Soja 1 nie osiągnęły zalecanej liczby komórek LAB, osiągając wartości odpowiednio 5,99, 5,86 i 5,73 log₁₀ jtk/cm³. We wszystkich badanych próbkach napojów nie wykazano istotnego wpływu kiełkowania na populację LAB i bifidobakterii. Okres przechowywania również nie miał istotnego wpływu na pH wszystkich badanych próbek; wykazano jednak niewielki wpływ ($\eta^2 \approx 0,211-0,358$) na zmiany w populacji badanych bakterii.

W przeprowadzonym badaniu w większości analizowanych próbek uzyskano wymagany poziom populacji LAB i bifidobakterii oraz wartości pH zalecane dla napojów fermentowanych. Ponadto wartości te uzyskano w wyniku fermentacji prowadzonej przez 6 godzin. Większość napojów roślinnych opisywanych w literaturze wykazuje niższe tempo ukwaszania, powolny wzrost bakterii probiotycznych i wydłużony czas fermentacji [Fazilah i wsp., 2018; Rasika i wsp., 2021]. Skrócenie czasu fermentacji jest rezultatem odpowiedniej obróbki technologicznej zwiększającej dostępność rozpuszczalnych węglowodanów oraz optymalizacji parametrów procesu. Zastosowanie złożonych kultur starterowych i podwyższenie temperatury fermentacji umożliwiło znaczne skrócenie czasu trwania procesu. Krótszy czas fermentacji przekłada się na wyższą wydajność i korzystniejszy aspekt ekonomiczny w produkcji na dużą skalę.

Fermentacja napojów z fasoli i soczewicy, zarówno skiełkowanych, jak i nieskiełkowanych, z kulturą Beaugel Soja 1 wykazała niższą skuteczność w uzyskiwaniu zalecanego pH i poziomu populacji bakterii w porównaniu do pozostałych kultur. Ta kultura starterowa była najmniej zróżnicowana pod względem gatunkowym drobnoustrojów i zawierała jedynie bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Pozostałe badane kultury starterowe (YO-MIX 207 i ABY-3) zawierały również bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Wyniki te wskazują, że większa różnorodność

mikroflory w kulturze starterowej sprzyja bardziej efektywnej fermentacji badanych napojów. Zjawisko to może wynikać z synergistycznego działania mikroorganizmów w złożonych kulturach starterowych oraz metabolizmu węglowodanów w roślinach strączkowych. Zdaniem Adamberga i wsp. [2014], równowaga szczepów i aktywność mikroorganizmów są determinowane przez wzajemne oddziaływania różnych czynników pomiędzy członkami konsorcjum, takich jak antagonizm, konkurencja o substraty i symbioza poprzez krzyżowe odżywanie. Autorzy wykazali, że wzrost *L. paracasei* F8 był stymulowany w obecności *B. breve* 46. Podobnie, w niniejszym badaniu obniżone stężenie komórek *Lactobacillus* zaobserwowano jedynie w próbkach fermentowanych przy użyciu startera Beaugel Soja 1, czyli kultury niezawierającej bifidobakterii.

Próbki fermentowane przy użyciu kultury Beaugel Soja 1 charakteryzowały się najwolniejszym tempem zmniejszania wartości pH. Według Pokusaeva i wsp. [2011] bifidobakterie metabolizują węglowodany wydajniej niż LAB. Szlak fermentacji bifidobakterii daje 2,5 mola ATP, 1,5 mola octanu i 1 mol mleczanu z 1 mola sfermentowanej glukozy. Homofermentatywne LAB wytwarzają 2 mole ATP i 2 mole kwasu mlekowego, podczas gdy heterofermentatywne LAB wytwarzają 1 mol kwasu mlekowego, etanolu i ATP z 1 mola glukozy. Efektywną fermentację mleka można osiągnąć stosując klasyczną kulturę jogurtową, która charakteryzuje się protosymbiozą pomiędzy *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Heller, 2001]. Niniejsze badanie pokazuje, że w fermentacji napojów roślinnych najskuteczniejsze jest stosowanie kultur starterowych wzbogaconych bifidobakteriami, które mogą zwiększać szybkość procesu i proliferację drobnoustrojów.

6.2. Charakterystyka wartości odżywczej

Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej w wariantach bazowych, z nasion skielkowanych i po procesie fermentacji przebadano pod względem charakterystyki wartości odżywczej. Wyniki analiz zawartości białka, tłuszczu, suchej masy, węglowodanów, profilu kwasów tłuszczowych i pozycjonowania kwasów tłuszczowych w cząsteczkach TAG napojów przedstawiono w trzecim artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P., Bryś J., Ziarno M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, 13, 16976.** Wyniki analiz zawartości wybranych witamin z grupy B, błonnika pokarmowego i IG

napojów przedstawiono w czwartym artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P.*, Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M. (2024). Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination. *LWT – Food Science and Technology*, 199, 116140.**

6.2.1. Analiza zawartości białka, tłuszczu i suchej masy

Napoje roślinne dostępne na rynku charakteryzują się bardzo zróżnicowaną wartością odżywczą, w zależności od surowca, z którego zostały wytworzone. Produkty te zwyczajowo stosowane są jako substytuty mleka, dlatego też korzystne jest, aby podczas ich produkcji stosować takie procesy technologiczne i surowce, które pozwolą na otrzymanie wyrobu charakteryzującego się wartością odżywczą zbliżoną do mleka krowiego [Chalupa–Krebdak i wsp., 2018]. Wysoki potencjał do tego celu wykazują nasiona roślin strączkowych, w przypadku których konieczne jest jednak zastosowanie procesów, które przyczynią się do zmniejszenia zawartości obecnych w nich składników antyodżywczych, które zmniejszają dostępność wybranych składników odżywczych [Samtiya i wsp., 2020].

W Tabeli 5 przedstawiono zawartość białka, tłuszczu i suchej masy w badanych napojach. Bazowe napoje z fasoli charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością białka w porównaniu do napoju z soczewicy, jednak wartości te wykazywały podobny rząd wielkości (2,24 g/100 g dla NF i 2,09 g/100 g dla NS). W przypadku obu rodzajów napojów zaobserwowano istotny wpływ zastosowania procesu kiełkowania nasion na zwiększenia zawartości białka – o 15,6% w NFK i 13,4% w NSK. Napój z fasoli charakteryzował się 4-krotnie wyższą zawartością tłuszczu w porównaniu do napoju z soczewicy. Znaczne różnice w tym parametrze zaobserwowano również pomiędzy surowymi nasionami roślin strączkowych, z których wytworzono napoje (Tabela 3). Kiełkowanie nasion nie miało istotnego wpływu na zawartość tłuszczu w badanych próbkach. Nie wykazano istotnych różnic w zawartości suchej masy pomiędzy bazowymi napojami z fasoli i soczewicy, a kiełkowanie wpłynęło na istotne obniżenie tego parametru o 10,6% dla NF i 21,1% dla NS.

Tabela 5. Zawartość białka, tłuszczu i suchej masy w napojach z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbki	Zawartość białka [g/100 g]	Zawartość tłuszczu [g/100 g]	Zawartość suchej masy [g/100 g]
Napoje z fasoli białej			
NF	2,24 ± 0,13 ^b	0,60 ± 0,0 ^b	7,63 ± 0,24 ^c
NFK	2,59 ± 0,24 ^c	0,60 ± 0,0 ^b	6,82 ± 0,50 ^b
Napoje z soczewicy brązowej			
NS	2,09 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,0 ^a	7,21 ± 0,65 ^c
NSK	2,37 ± 0,21 ^b	0,15 ± 0,0 ^a	5,69 ± 0,42 ^a

^{a, b, c} – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$);

¹ Opis jak w Tabeli 2

Obecnie na rynku napojem roślinnym o wartości odżywczej najbardziej zbliżonej do mleka krowiego jest napój sojowy. Ma on najdłuższą historię rozwoju i badań nad jego właściwościami jako analogu mleka. Napój ten charakteryzuje się zawartością białka na poziomie około 3 g/100 g [Sethi i wsp., 2016]. Otrzymane napoje bazowe z fasoli i soczewicy charakteryzowały się nieco niższą zawartością białka, na poziomie 2,09–2,24 g/100 g, jednak proces kiełkowania przyczyniał się do istotnego zwiększenia jego zawartości. W nasionach roślin strączkowych białko jest syntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym, a następnie magazynowane jako białko zapasowe w wakuolach w zarodkach nasion lub komórkach wegetatywnych, przede wszystkim w postaci białek wicyliny i leguminy. W wyniku zastosowania procesu kiełkowania, białka zapasowe ulegają remobilizacji do postaci aminokwasów i energii niezbędnej do syntezy nowych białek. Proces ten prowadzi do zwiększenia zawartości białka, w porównaniu do nasion niepoddawanych kiełkowaniu [Ohaneneye i wsp, 2020]. Zastosowanie kiełkowania jest więc bardzo korzystne w celu zwiększenia wartości odżywczej napojów z nasion roślin strączkowych.

Zawartość tłuszczu w napojach roślinnych, podobnie jak w przypadku białka, jest bardzo zróżnicowana i zależy przede wszystkim od surowca, z którego wytwarzany jest produkt. Najwyższą zawartością tego makroskładnika charakteryzują się napoje z nasion (np. sezamu w zakresie 6,69–7,26 g/100 g) i orzechów (np. orzechów nerkowca w zakresie 1,04–5,29 g/100 g), a najmniejszym z ryżu (w zakresie 0,00–1,95 g/100 g) [Fructuoso i wsp., 2021]. Napoje roślinne dostępne na rynku są często dodatkowo wzbogacane w oleje (głównie olej słonecznikowy). Oleje dodaje się nie tylko w celu

zwiększenia zawartości tłuszczu w produkcie, tak aby był na poziomie zbliżonym do mleka krowiego, ale również w celu uzyskania gładkiej konsystencji i poprawy odczucia w ustach w trakcie spożywania produktu [Fructuoso i wsp., 2021]. Napoje z fasoli i soczewicy, analizowane w niniejszej pracy, charakteryzują się niską zawartością tłuszczu ze względu na ich niską zawartość w surowcach, tj. na poziomie 2,3 g/100 g dla fasoli i 1,1 g/100 g dla soczewicy (Tabela 3). Ze względu na brak dodatku olejów roślinnych do receptury badanych napojów z fasoli i soczewicy możliwe było szczegółowe zbadanie profilu kwasów tłuszczowych oraz ich rozmieszczenia w cząsteczkach triacylogliceroli (TAG), występujących naturalnie w analizowanych produktach.

W niniejszym badaniu zaobserwowano również istotne obniżenie zawartości suchej masy w wyniku zastosowania procesu kiełkowania. Jednocześnie zaobserwowano istotne obniżenie zawartości glukozy w NF (z 6,53 do 2,58 mg/kg) i NS (z 12,49 do 8,21 mg/kg), a także sacharozy w NS (z 3,40 do 2,47 mg/kg) w porównaniu do napojów z nasion skiełkowanych (Tabela 6). W czasie procesu kiełkowania dochodzi do enzymatycznej hydrolizy skrobi, zaś glukoza jest wykorzystywana jako substrat w procesach syntezy nowych składników komórkowych [Nkhata i wsp., 2018]. Można zatem wysnuć wniosek, że redukcja suchej masy w napojach skiełkowanych jest bezpośrednią konsekwencją zmniejszenia zawartości wybranych węglowodanów.

6.2.2. Analiza zawartości węglowodanów

Węglowodany są głównym składnikiem roślin strączkowych (55–65%) i składają się na nie przede wszystkim skrobia, monosacharydy, disacharydy i α -galaktozydy [Sanchez i wsp., 2015]. Ludziom i zwierzętom jednożołądkowym brakuje enzymu α -galaktozydazy wymaganej do hydrolizy wiązań $\alpha(1 \rightarrow 6)$ glikozydowych. W wyniku tego oligosacharydy obecne w roślinach strączkowych pozostają niestrawione w górnym odcinku przewodu pokarmowego i ulegają fermentacji w jelicie grubym, powodując dyskomfort trawienny [Kannan i wsp., 2018]. Podczas wytwarzania produktów na bazie roślin strączkowych pożądanym jest więc usunięcie tych składników.

W tabeli 6 przedstawiono zawartość wybranych węglowodanów w badanych napojach roślinnych. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania).

Tabela 6. Zawartość wybranych węglowodanów w napojach z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbek ¹	Zawartość węglowodanów [mg/kg]				
	glukoza	sacharoza	rafinoza	stachioza	werbaskoza
Napoje z fasoli białej					
NF	6,53 ± 0,10 ^f	3,40 ± 0,24 ^f	0,60 ± 0,11 ^a	0,62 ± 0,04 ^a	1,62 ± 0,03 ^{bc}
NF+BS	4,73 ± 0,29 ^e	2,67 ± 0,10 ^{ef}	0,58 ± 0,12 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	1,56 ± 0,09 ^{bc}
NF+YO-MIX	4,33 ± 0,17 ^e	2,11 ± 0,33 ^{cde}	0,58 ± 0,11 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	1,47 ± 0,05 ^{bc}
NF+ABY-3	4,29 ± 0,12 ^e	2,16 ± 0,45 ^{cde}	0,50 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,01 ^a	1,59 ± 0,11 ^{bc}
NFp	6,93 ± 0,28 ^f	2,99 ± 0,03 ^{ef}	0,59 ± 0,04 ^a	0,65 ± 0,08 ^{ab}	1,51 ± 0,02 ^{bc}
NFp+BS	6,37 ± 0,53 ^f	2,20 ± 0,12 ^{cde}	0,74 ± 0,16 ^a	0,64 ± 0,07 ^{ab}	1,41 ± 0,01 ^b
NFp+YO-MIX	5,97 ± 0,13 ^f	2,16 ± 0,23 ^{cde}	0,57 ± 0,05 ^a	0,56 ± 0,08 ^a	1,69 ± 0,12 ^c
NFp+ABY-3	4,87 ± 0,41 ^e	1,59 ± 0,37 ^{bcd}	0,55 ± 0,09 ^a	0,40 ± 0,08 ^a	1,55 ± 0,08 ^{bc}
NFK	2,58 ± 0,42 ^{cd}	2,47 ± 0,17 ^{de}	0,61 ± 0,02 ^a	1,68 ± 0,29 ^f	0,25 ± 0,08 ^a
NFK+BS	2,25 ± 0,31 ^{bcd}	0,91 ± 0,18 ^{ab}	0,33 ± 0,06 ^a	1,18 ± 0,09 ^{cd}	0,27 ± 0,09 ^a
NFK+YO-MIX	1,40 ± 0,02 ^{ab}	1,45 ± 0,14 ^{bc}	0,48 ± 0,09 ^a	1,55 ± 0,13 ^{cdef}	0,21 ± 0,01 ^a
NFK+ABY-3	2,21 ± 0,07 ^{bcd}	1,02 ± 0,31 ^{ab}	0,59 ± 0,22 ^a	1,22 ± 0,02 ^{cde}	0,22 ± 0,01 ^a
NFK	3,03 ± 0,13 ^d	2,46 ± 0,16 ^{de}	0,62 ± 0,05 ^a	1,67 ± 0,09 ^{ef}	nw
NFKp+BS	2,94 ± 0,10 ^d	0,79 ± 0,06 ^{ab}	0,55 ± 0,12 ^a	1,59 ± 0,03 ^{def}	nw
NFKp+YO-MIX	1,09 ± 0,25 ^a	0,79 ± 0,01 ^{ab}	0,61 ± 0,04 ^a	1,09 ± 0,05 ^{bc}	0,19 ± 0,07 ^a
NFKp+ABY-3	1,89 ± 0,05 ^{abc}	0,32 ± 0,11 ^a	0,53 ± 0,14 ^a	1,30 ± 0,22 ^{cdef}	nw
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kielkowanie	0,918	0,825	ns	0,899	0,984
Fermentacja	0,619	0,836	ns	0,394	ns
Przechowywanie	0,266	0,321	ns	ns	0,254
Napoje z soczewicy brązowej					
NS	12,49 ± 0,65 ^h	1,20 ± 0,91 ^c	0,25 ± 0,06 ^a	1,15 ± 0,16 ^e	2,65 ± 0,16 ^h
NS+BS	11,53 ± 0,52 ^{gh}	1,22 ± 0,01 ^c	0,25 ± 0,04 ^a	0,87 ± 0,10 ^{abcd}	2,24 ± 0,14 ^{fgh}
NS+YO-MIX	8,48 ± 0,49 ^f	0,50 ± 0,05 ^b	0,19 ± 0,01 ^a	0,86 ± 0,19 ^{abcd}	2,45 ± 0,15 ^{gh}
NS+ABY-3	4,68 ± 0,14 ^b	0,40 ± 0,03 ^{ab}	0,18 ± 0,01 ^a	0,89 ± 0,12 ^{abcd}	2,24 ± 0,08 ^{fgh}
NSp	10,29 ± 0,25 ^g	1,08 ± 0,04 ^c	0,23 ± 0,03 ^a	1,09 ± 0,07 ^e	1,78 ± 0,06 ^{efg}
NSp+BS	6,33 ± 0,28 ^{bcd}	0,33 ± 0,08 ^{ab}	0,25 ± 0,02 ^a	1,00 ± 0,03 ^e	1,40 ± 0,05 ^{cde}
NSp+YO-MIX	2,57 ± 0,64 ^a	0,31 ± 0,01 ^{ab}	0,14 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,07 ^{cd}	1,64 ± 0,07 ^{ef}
NSp+ABY-3	2,53 ± 0,57 ^a	0,35 ± 0,07 ^{ab}	0,12 ± 0,03 ^a	0,97 ± 0,09 ^{bcd}	1,60 ± 0,14 ^{def}
NSK	8,21 ± 0,24 ^{ef}	1,21 ± 0,05 ^c	0,91 ± 0,12 ^{de}	1,19 ± 0,07 ^e	0,90 ± 0,03 ^{bcd}
NSK+BS	6,19 ± 0,08 ^{bcd}	0,21 ± 0,08 ^a	0,68 ± 0,06 ^{bcd}	1,08 ± 0,03 ^e	nw
NSK+YO-MIX	5,86 ± 0,16 ^{bc}	0,52 ± 0,03 ^b	0,71 ± 0,08 ^{bcd}	0,98 ± 0,08 ^{cd}	0,31 ± 0,01 ^{ab}
NSK+ABY-3	6,76 ± 0,33 ^{cdef}	0,38 ± 0,08 ^{ab}	0,73 ± 0,12 ^{bcd}	0,61 ± 0,03 ^{abc}	nw
NSK	7,79 ± 0,60 ^{def}	1,07 ± 0,04 ^c	0,99 ± 0,02 ^e	1,01 ± 0,02 ^e	0,78 ± 0,06 ^{abc}
NSKp+BS	6,25 ± 0,31 ^{bcd}	0,36 ± 0,08 ^{ab}	0,61 ± 0,03 ^{bc}	1,13 ± 0,09 ^e	0,43 ± 0,06 ^{ab}
NSKp+YO-MIX	6,49 ± 0,42 ^{cde}	0,49 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,05 ^b	0,55 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,06 ^a
NSKp+ABY-3	6,79 ± 0,62 ^{cdef}	0,39 ± 0,03 ^{ab}	0,78 ± 0,08 ^{cde}	0,59 ± 0,08 ^{ab}	nw
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kielkowanie	ns	ns	0,905	ns	0,901
Fermentacja	0,487	0,714	0,440	0,468	0,389
Przechowywanie	0,219	ns	ns	ns	0,312

a, b, c, d, e, f, g, h, i – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); nw – nie wykryto; ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

W przypadku napojów z fasoli w największym stężeniu występowała glukoza, zarówno w napoju bazowym ($6,53 \pm 0,10$ mg/kg), jak i skiełkowanym ($2,58 \pm 0,42$ mg/kg). Głównym czynnikiem wpływającym na zmiany stężeń analizowanych węglowodanów było kiełkowanie ($\eta^2 > 0,825$). Zastosowanie procesu znacznie obniżyło zawartość glukozy, sacharozy i werbaskozy, podnosząc jednocześnie poziom stachiozy. Fermentacja z różnymi kulturami starterowymi również wpłynęła na skład węglowodanowy napojów, głównie poprzez redukcję glukozy i sacharozy. Ten efekt jest wynikiem aktywności metabolicznej mikroorganizmów.

W napojach z soczewicy również zaobserwowano najwyższą zawartość glukozy spośród wszystkich testowanych węglowodanów, jednak w porównaniu z NF i NFK zawartość glukozy była prawie dwukrotnie wyższa dla NS (12,49 mg/kg) i ponad trzykrotnie wyższa dla NSK (8,21 mg/kg) (Tabela 6). Fermentacja z różnymi kulturami starterowymi była głównym czynnikiem wpływającym na zawartość glukozy ($\eta^2 = 0,487$) i sacharozy ($\eta^2 = 0,487$) w NS i prowadziła do istotnego zmniejszenia zawartości tych węglowodanów. W napojach z soczewicy zastosowanie kiełkowania spowodowało istotne obniżenie zawartość werbaskozy i zwiększenie zawartość stachiozy, natomiast fermentacja istotnie obniżyła zawartość wszystkich badanych oligosacharydów. We wszystkich badanych napojach roślinnych okres przechowywania w warunkach chłodniczych miał najmniejszy wpływ na modyfikację zawartości analizowanych węglowodanów ($\eta^2 \approx 0,219-0,321$) i wpływał przede wszystkim na istotne obniżenie zawartości glukozy w fermentowanych napojach z fasoli i soczewicy bazowej i skiełkowanej.

Według Nkhaty i wsp. [2018] wpływ kiełkowania na węglowodany jest w dużej mierze zależny od aktywacji enzymów hydrolitycznych i amylolitycznych. Działanie tych enzymów wpływa na zmniejszenie zawartości skrobi i zwiększenie zawartości cukrów prostych. Kiełkowanie znacznie wpływa na węglowodany poprzez aktywację enzymów hydrolitycznych i amylolitycznych, takich jak α -amylaza. W niniejszym badaniu zaobserwowano istotne zmniejszenie zawartości glukozy w napojach z fasoli i soczewicy. Warto zaznaczyć, że obecność glukozy w napojach może być również wynikiem innych etapów przetwarzania, np. rozdrabniania.

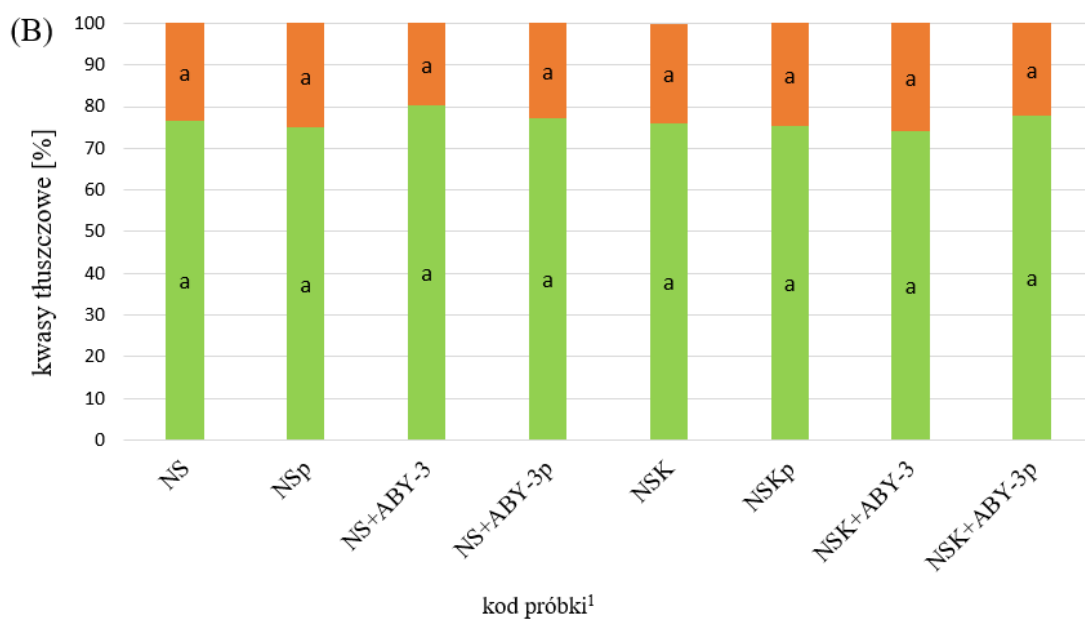
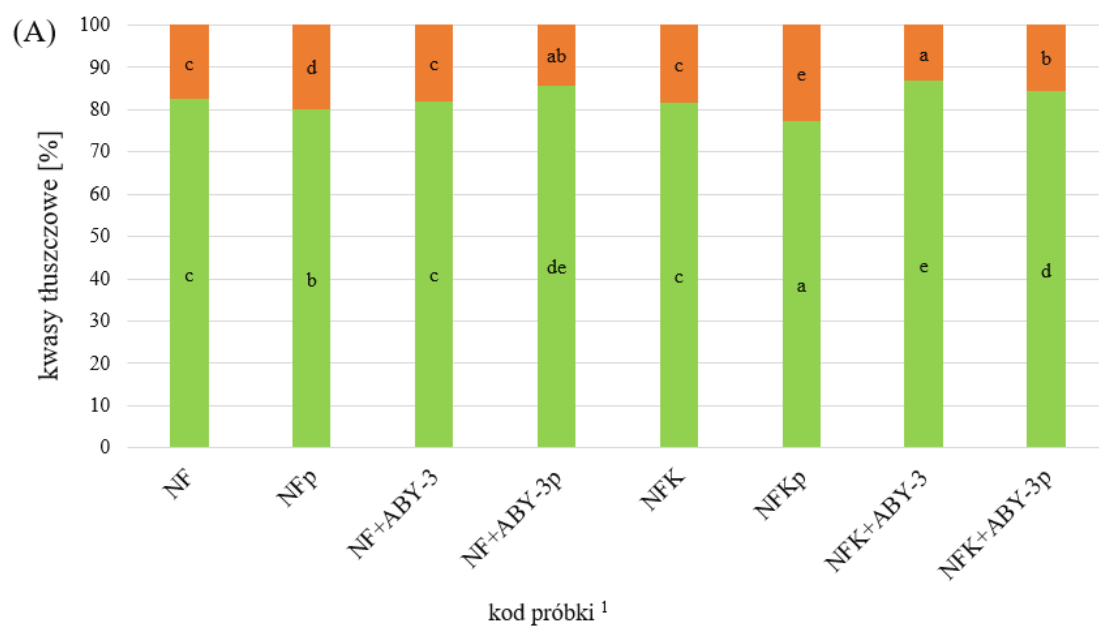
Niedostateczna dyspersja roślin strączkowych prowadzi do obecności makrocząsteczek, które podczas procesu filtracji są zatrzymywane na przesiewach, co skutkuje zmniejszeniem wydajności ekstrakcji. W efekcie otrzymany napój charakteryzuje się niższą zawartością suchej masy, w tym cukrów [Vishwanathan i

wsp., 2011; Kinnarinen i wsp., 2017]. Badania przedstawione w drugim artykule stanowiącym niniejszą pracę doktorską wykazały, że napoje z nasion skiełkowanych mają wyższy współczynnik Span i średnią średnicę cząstek $d_{4,3}$ (Span $\approx 2,24$ – $2,35$, $d_{4,3} \approx 76,8$ – $84,2$) niż napoje z nasion nieskiełkowanych (Span $\approx 1,90$ – $2,00$, $d_{4,3} \approx 38,2$ – $47,0$) (Tabela 13). Wskazuje to na obecność w napojach z nasion skiełkowanych większych cząstek lub agregatów, co może być bezpośrednio powiązane z niższą efektywnością procesu filtracji. Tworzenie agregatów białkowych obserwuje się głównie w roztworach przygotowanych z roślin strączkowych [Tang i wsp., 2009]. Kiełkowanie prowadzi do zwiększenia dostępności białek, co może skutkować intensywniejszym tworzeniem się agregatów, a w konsekwencji mniej efektywnymi procesami rozdrabniania i filtracji [Ohanenye i wsp., 2022]. Zahir i wsp. [2021] również zaobserwowali najintensywniejsze tworzenie się agregatów białkowych w próbkach soi poddawanych kiełkowaniu w porównaniu z próbkami nieskiełkowanymi.

6.2.3. Analiza profilu kwasów tłuszczowych

Udział procentowy poszczególnych kwasów tłuszczowych w całkowitej puli kwasów tłuszczowych, a także stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA – ang. unsaturated fatty acids) do nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA – ang. saturated fatty acids), są ważnymi parametrami określającymi wartość odżywczą tłuszczów [Baum i wsp., 2012]. Do analizy profilu kwasów tłuszczowych oraz pozycjonowania kwasów tłuszczowych w TAG wykorzystano napoje bazowe, z nasion skiełkowanych, przechowywane w warunkach chłodniczych oraz fermentowane z kulturą starterową ABY–3, która wykazała najefektywniejszą zdolność do ukwaszania badanych napojów we wcześniejszych badaniach.

Na Rysunku 2 przedstawiono udział UFA i SFA w całkowitej puli kwasów tłuszczowych badanych napojów roślinnych. We wszystkich próbkach dominowały UFA, stanowiące 77,3–86,7% w NF/NFK i 74,1–80,3% w NS/NSK. Fermentacja z kulturą starterową ABY–3 miała istotny wpływ na udział UFA i SFA jedynie w NFK, gdzie spowodowała istotne zwiększenie udziału UFA z 81,5% do 86,7% przy jednoczesnym obniżeniu udziału SFA. Przechowywanie wpłynęło istotnie jedynie na NF i NFK, w których doprowadziło do istotnego obniżenia UFA, z jednoczesnym zwiększeniem udziału SFA. W pozostałych próbkach napojów z fasoli i soczewicy fermentacja, kiełkowanie i przechowywanie nie miały wpływu na całkowity udział SFA i UFA.



■ nienasycone kwasy tłuszczowe
 ■ nasycone kwasy tłuszczowe

Rysunek 2. Łączny udział kwasów tłuszczowych nienasyconych i nasyconych w całkowitej puli kwasów tłuszczowych badanych napojów z fasoli białej (A) i soczewicy brązowej (B)

a, b, c, d, e – średnie wartości w grupach kwasów tłuszczowych (nasycone/nienasycone) oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$);

¹ Opis jak w Tabeli 2

W Tabeli 7 przedstawiono profil kwasów tłuszczowych napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej. W tabeli przedstawiono wartości średnie udziału procentowego poszczególnych kwasów tłuszczowych w całkowitej puli kwasów tłuszczowych, odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania). W profilu kwasów tłuszczowych badanych napojów dominował kwas linolenowy (C18:2 n-6c). Pozostałymi UFA, które miały znaczny udział w tym profilu były kwas α -linolenowy i oleinowy. Jedynie dwa SFA miały istotny udział w profilu kwasów tłuszczowych badanych napojów, tj. kwas palmitynowy i stearynowy. Pozostałe kwasy tłuszczowe miały udział na poziomie około 0,1% lub mniej.

Tabela 7. Profil kwasów tłuszczowych napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej.

Kod próbki ¹	kwasy tłuszczowe [%]				
	palmitynowy C16:0	stearynowy C18:0	oleinowy C18:1 n9-c	linolowy C18:2 n-6c	α -linolenowy C18:3 n-3c
Napoje z fasoli białej					
NF	14,45 ± 0,35 ^c	3,00 ± 0,00 ^c	12,95 ± 0,21 ^b	44,00 ± 0,14 ^d	25,55 ± 0,35 ^b
NF+ABY-3	15,65 ± 0,35 ^{cd}	2,15 ± 0,07 ^a	13,00 ± 0,00 ^b	40,70 ± 0,14 ^a	27,70 ± 0,14 ^c
NFp	16,90 ± 0,42 ^d	2,95 ± 0,07 ^c	12,10 ± 0,28 ^a	43,15 ± 0,49 ^d	24,90 ± 0,28 ^{ab}
NFp+ABY-3	11,30 ± 0,00 ^b	2,50 ± 0,00 ^b	13,70 ± 0,00 ^c	41,85 ± 0,07 ^{abc}	29,25 ± 0,07 ^d
NFK	15,15 ± 0,35 ^c	3,25 ± 0,07 ^d	12,80 ± 0,00 ^b	43,75 ± 0,07 ^d	25,05 ± 0,21 ^{ab}
NFK+ABY-3	9,60 ± 0,14 ^a	2,55 ± 0,07 ^b	12,75 ± 0,07 ^b	42,95 ± 0,07 ^{cd}	29,30 ± 0,14 ^d
NFK	19,40 ± 0,57 ^d	3,25 ± 0,07 ^d	11,80 ± 0,00 ^a	41,25 ± 0,64 ^{ab}	24,30 ± 0,00 ^a
NFKp+ABY-3	11,85 ± 0,07 ^b	2,50 ± 0,00 ^b	12,90 ± 0,00 ^b	41,95 ± 0,07 ^{bc}	28,45 ± 0,07 ^c
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kiełkowanie	ns	0,613	ns	ns	ns
Fermentacja	0,550	0,929	0,452	0,306	0,914
Przechowywanie	ns	ns	ns	ns	ns
Napoje z soczewicy brązowej					
NS	17,50 ± 0,84 ^a	5,75 ± 0,92 ^c	26,15 ± 0,49 ^d	39,90 ± 0,71 ^{ab}	10,65 ± 1,06 ^{ab}
NS+ABY-3	15,70 ± 0,99 ^a	2,15 ± 0,07 ^a	24,70 ± 0,14 ^{bcd}	42,35 ± 0,49 ^{abc}	11,05 ± 0,07 ^b
NSp	18,40 ± 0,85 ^a	6,65 ± 1,06 ^c	25,35 ± 0,07 ^{cd}	39,20 ± 1,13 ^a	10,40 ± 0,85 ^{ab}
NSp+ABY-3	18,75 ± 0,92 ^a	1,95 ± 0,07 ^a	23,20 ± 0,28 ^{bc}	41,30 ± 0,57 ^{abc}	11,30 ± 0,14 ^b
NSK	19,20 ± 0,14 ^a	4,75 ± 1,20 ^{abc}	23,30 ± 0,71 ^{bc}	43,85 ± 0,35 ^c	8,80 ± 0,14 ^a
NSK+ABY-3	18,45 ± 0,78 ^a	2,75 ± 0,07 ^{ab}	19,65 ± 0,49 ^a	42,35 ± 0,78 ^{abc}	10,60 ± 0,14 ^{ab}
NSK	19,45 ± 1,20 ^a	5,10 ± 0,71 ^{bc}	23,10 ± 0,00 ^b	43,60 ± 0,42 ^{bc}	8,75 ± 0,07 ^a
NSKp+ABY-3	16,55 ± 1,46 ^a	2,20 ± 0,28 ^a	19,35 ± 1,20 ^a	45,10 ± 1,12 ^c	11,35 ± 0,49 ^b
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kiełkowanie	ns	ns	0,872	0,626	0,426
Fermentacja	ns	0,843	0,807	ns	0,613
Przechowywanie	ns	ns	ns	ns	ns

Pozostałe kwasy tłuszczowe, o nieistotnym udziale w profilu kwasów tłuszczowych, obejmują: 14:0, 15:0, 16:1, 17:0, 17:1, 20:0, 20:1, 20:3 n-3, 22:2, 24:0, 20:5 n-3;

a, b, c, d – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$); ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

Głównym czynnikiem wpływającym na profil kwasów tłuszczowych NF i NFK była fermentacja z kulturą starterową ABY-3 ($\eta^2 \approx 0,306-0,929$). Zastosowanie tego procesu istotnie zmodyfikowało profil kwasów tłuszczowych n-3 i n-6, zwiększając udział kwasu α -linolenowego n-3 i zmniejszając udział kwasu linolowego n-6. Ponadto fermentacja istotnie obniżyła zawartość kwasu palmitynowego w NFK i obniżyła zawartość kwasu stearynowego w NF i NFK. Kiełkowanie wpłynęło wyłącznie na istotne zwiększenie udziału kwasu stearynowego w NFK (z 3,0 do 3,25%).

Zarówno fermentacja, jak i kiełkowanie znacznie wpłynęły na profil kwasów tłuszczowych w NS. Fermentacja spowodowała istotne zmniejszenie zawartości kwasu stearynowego i oleinowego oraz zwiększenie zawartości kwasu α -linolenowego. Kiełkowanie natomiast doprowadziło do istotnego zmniejszenia zawartości kwasu oleinowego i α -linolenowego oraz zwiększenia zawartości kwasu linolowego. Przechowywanie w warunkach chłodniczych nie wykazało istotnego wpływu na profil kwasów tłuszczowych żadnej z badanych próbek.

W badanych napojach profil kwasów tłuszczowych był zdominowany przez nienasycone kwasy tłuszczowe (UFA), co potwierdza, że fasola i soczewica są wartościowymi surowcami do produkcji żywności o wysokiej wartości odżywczej. Analogiczny rozkład UFA zaobserwowano w niefermentowanych napojach roślinnych na bazie roślin strączkowych, w szczególności w napojach fasolowych [Ziarno i wsp., 2020; Aydar i wsp., 2023] i z soi [Martinez-Padilla i wsp., 2020].

Podczas wytwarzania napojów na bazie roślin strączkowych korzystne jest zastosowanie procesów, które przyczynią się do zwiększenia udziału UFA n-3 i/lub zmniejszenia udziału SFA w profilu kwasów tłuszczowych. W badanych napojach roślinnych zastosowanie fermentacji do modyfikacji profilu kwasów tłuszczowych było bardziej efektywne niż zastosowanie kiełkowania. Fermentacja z użyciem kultury starterowej ABY-3 istotnie zwiększyła udział kwasu α -linolenowego i zmniejszyła udział kwasu stearynowego w NF/NFK i NS/NSK. We wszystkich badanych próbkach zaobserwowano również wielokierunkową modyfikację udziału pozostałych analizowanych kwasów tłuszczowych w całkowitej puli kwasów tłuszczowych. Według Adebo i wsp. [2021] zaobserwowane zwiększenie i zmniejszenie udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych w całkowitej puli kwasów tłuszczowych po fermentacji sugeruje selektywne działanie lipaz. Z jednej strony enzymy lipolityczne mogły przyczynić się do dysocjacji lipidów i zwiększyć ekstrakcję składników

związanych z tłuszczem, a z drugiej strony te same enzymy mogły wywierać selektywne działanie redukcyjne, wykorzystując składniki związane z tłuszczami jako źródła węgla.

W badanych napojach proces kiełkowania wpłynął przede wszystkim na modyfikację udziału UFA w profilu kwasów tłuszczowych NS i NSK, poprzez zmniejszenie udziału kwasu oleinowego i α -linolenowego. Obserwowane zmniejszenie zawartości tych kwasów tłuszczowych może być efektem hydrolizy zachodzącej podczas kiełkowania nasion. W procesie tym kwasy tłuszczowe mogą być wykorzystywane jako źródło energii niezbędnej do zachodzących przemian biochemicznych i fizykochemicznych składników nasion [Pal i wsp., 2016]. Istotną modyfikację profilu kwasów tłuszczowych podczas kiełkowania zaobserwowano również wcześniej w surowych nasionach soczewicy [Pal i wsp., 2016; Alkaltham i wsp., 2022].

6.2.4. Analiza pozycjonowania kwasów tłuszczowych w cząsteczkach TAG

Wewnątrzcząsteczkowa struktura TAG pod względem pozycjonowania kwasów tłuszczowych w szkielecie glicerolu (pozycje sn-1, sn-2 i sn-3) wpływa na trawienie i wchłanianie kwasów tłuszczowych w organizmie [Dima i wsp., 2020]. Lipaza trzustkowa, która jest odpowiedzialna za hydrolizę TAG, hydrolizuje kwasy tłuszczowe w pozycjach sn-1 i sn-3, wytwarzając w ten sposób wolne kwasy tłuszczowe i 2-monogliceryd. Podczas trawienia może nastąpić strukturalne przegrupowanie 2-monoglicerydów, co skutkuje całkowitą degradacją do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych [Golding i Wooster, 2010]. W tłuszczach roślinnych TAG są syntetyzowane w specyficznym układzie: SFA znajdują się głównie w pozycjach zewnętrznych (sn-1, sn-3), podczas gdy UFA znajdują się w pozycji sn-2 [Gerbig i Takats, 2010]. Istnieje bardzo niewiele doniesień naukowych na temat wpływu procesów fermentacji i kiełkowania na rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w TAG w żywności, a doniesienia te są przede wszystkim związane z lipidami w tłuszczu mleka zastępczego dla niemowląt [Zhang i wsp., 2020].

Tabele 8 i 9 pokazują odpowiednio procentowy rozkład kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2 w TAG i rozkład kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1,3 w TAG w badanych napojach roślinnych. W tabelach przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania).

Tabela 8. Rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2 w TAG napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbki ¹	kwasy tłuszczowe [%]					
	myristynowy C14:0	palmitynowy C16:0	stearynowy C18:0	oleinowy C18:1 n9-c	linolowy C18:2 n-6c	α -linolenowy C18:3 n-3c
Napoje z fasoli białej						
NF	nw	52,66 ± 1,29 ^d	nw	39,42 ± 1,10 ^c	4,62 ± 0,47 ^a	3,30 ± 0,16 ^a
NF+ABY-3	nw	5,72 ± 0,64 ^a	10,84 ± 0,64 ^a	26,71 ± 1,00 ^b	32,20 ± 0,14 ^d	24,53 ± 1,09 ^d
NFp	nw	52,25 ± 1,39 ^d	nw	40,33 ± 0,49 ^c	4,40 ± 0,16 ^a	3,02 ± 0,18 ^a
NFp+ABY-3	nw	20,56 ± 1,46 ^c	39,19 ± 1,36 ^c	21,21 ± 1,09 ^a	11,59 ± 0,47 ^b	7,45 ± 0,55 ^b
NFK	nw	51,20 ± 1,58 ^d	nw	40,63 ± 1,60 ^c	4,74 ± 0,17 ^a	3,43 ± 0,21 ^a
NFK+ABY-3	nw	14,55 ± 0,61 ^b	17,43 ± 0,72 ^b	24,72 ± 1,20 ^{ab}	25,50 ± 0,99 ^c	17,80 ± 0,83 ^c
NFK	nw	52,55 ± 0,92 ^d	nw	39,99 ± 1,05 ^c	4,42 ± 0,15 ^a	3,05 ± 0,09 ^a
NFKp+ABY-3	nw	6,71 ± 0,35 ^a	8,58 ± 0,86 ^a	27,97 ± 1,27 ^b	33,15 ± 1,34 ^d	23,59 ± 0,91 ^d
Statystyka ANOVA. η^2 [-]						
Kiełkowanie	–	ns	ns	ns	ns	ns
Fermentacja	–	0,958	0,592	0,941	0,782	0,745
Przechowywanie	–	ns	ns	ns	ns	ns
Napoje z soczewicy brązowej						
NS	nw	34,10 ± 1,43 ^c	13,60 ± 0,62 ^c	30,80 ± 1,30 ^b	16,20 ± 0,83 ^a	5,30 ± 0,23 ^b
NS+ABY-3	3,70 ± 0,28 ^a	12,80 ± 0,99 ^a	4,40 ± 0,28 ^a	27,70 ± 1,53 ^{ab}	42,10 ± 1,39 ^d	9,30 ± 0,31 ^d
NSp	nw	34,44 ± 1,16 ^c	14,19 ± 0,69 ^c	30,53 ± 1,45 ^{ab}	15,93 ± 0,25 ^a	4,93 ± 0,22 ^b
NSp+ABY-3	6,50 ± 0,42 ^c	19,60 ± 1,13 ^b	6,20 ± 0,47 ^a	26,80 ± 1,06 ^{ab}	33,30 ± 1,13 ^c	7,60 ± 0,18 ^c
NSK	nw	31,60 ± 1,98 ^c	12,90 ± 0,82 ^c	29,80 ± 0,98 ^{ab}	20,60 ± 0,78 ^b	5,10 ± 0,23 ^b
NSK+ABY-3	10,90 ± 0,35 ^d	33,10 ± 1,84 ^c	10,10 ± 0,37 ^b	25,50 ± 1,40 ^a	16,80 ± 0,64 ^{ab}	3,60 ± 0,13 ^a
NSK	nw	33,63 ± 0,98 ^c	12,69 ± 0,52 ^c	29,33 ± 1,10 ^{ab}	19,47 ± 0,96 ^{ab}	4,88 ± 0,18 ^b
NSKp+ABY-3	5,40 ± 0,42 ^b	17,50 ± 1,27 ^{ab}	4,60 ± 0,20 ^a	25,40 ± 1,43 ^a	39,40 ± 1,24 ^d	7,70 ± 0,66 ^c
Statystyka ANOVA. η^2 [-]						
Kiełkowanie	ns	ns	ns	0,370	ns	ns
Fermentacja	0,792	0,608	0,819	0,799	0,543	0,372
Przechowywanie	ns	ns	ns	ns	ns	ns

a, b, c, d – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); nw – nie wykryto; ns – nieistotnie statystycznie; ¹ Opis jak w Tabeli 2

Tabela 9. Rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycji sn-1,3 w TAG napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbki ¹	kwasы tłuszczowe [%]					
	myristynowy C14:0	palmitynowy C16:0	stearynowy C18:0	oleinowy C18:1 n9-c	linolowy C18:2 n-6c	α -linolenowy C18:3 n-3c
Napoje z fasoli białej						
NF	nw	2,93 ± 0,20 ^a	nw	6,52 ± 0,55 ^a	56,80 ± 1,40 ^d	33,75 ± 0,96 ^{bc}
NF+ABY-3	nw	21,94 ± 0,85 ^e	2,83 ± 0,18 ^a	12,68 ± 0,99 ^c	34,31 ± 1,10 ^a	28,24 ± 0,91 ^a
NFp	nw	2,75 ± 0,20 ^a	nw	6,00 ± 0,18 ^a	56,59 ± 1,58 ^d	34,66 ± 0,92 ^c
NFp+ABY-3	nw	8,35 ± 0,59 ^b	nw	9,79 ± 0,72 ^b	45,40 ± 0,98 ^c	36,41 ± 0,82 ^c
NFK	nw	3,92 ± 0,48 ^a	nw	6,32 ± 0,47 ^a	56,61 ± 1,44 ^d	33,15 ± 1,00 ^c
NFK+ABY-3	nw	11,60 ± 0,66 ^c	2,90 ± 0,16 ^a	12,20 ± 0,93 ^{bc}	40,26 ± 1,16 ^b	33,04 ± 0,95 ^{bc}
NFK	nw	3,68 ± 0,18 ^a	nw	5,70 ± 0,52 ^a	56,30 ± 1,54 ^d	34,32 ± 0,81 ^{bc}
NFKp+ABY-3	nw	16,79 ± 0,92 ^d	3,45 ± 0,24 ^b	12,64 ± 0,69 ^c	36,67 ± 0,82 ^{ab}	30,45 ± 0,61 ^{ab}
Statystyka ANOVA. η^2 [-]						
Kiełkowanie	–	ns	0,613	ns	ns	ns
Fermentacja	–	0,722	0,862	0,917	0,898	ns
Przechowywanie	–	ns	ns	ns	ns	ns
Napoje z soczewicy brązowej						
NS	nw	9,20 ± 0,27 ^a	1,90 ± 0,13 ^c	23,80 ± 1,05 ^d	51,80 ± 1,57 ^{cd}	13,30 ± 0,58 ^{bcd}
NS+ABY-3	3,90 ± 0,17 ^c	12,80 ± 0,79 ^b	3,20 ± 0,14 ^d	28,50 ± 1,27 ^e	42,30 ± 1,19 ^a	9,30 ± 0,54 ^a
NSp	nw	9,02 ± 0,33 ^a	1,60 ± 0,56 ^{bc}	23,18 ± 0,92 ^{cd}	52,56 ± 0,80 ^{cd}	13,65 ± 0,83 ^{cd}
NSp+ABY-3	1,90 ± 0,07 ^a	18,30 ± 0,91 ^c	0,20 ± 0,00 ^a	21,40 ± 0,89 ^{bcd}	45,00 ± 1,00 ^{ab}	13,20 ± 0,61 ^{bcd}
NSK	nw	13,00 ± 0,69 ^b	0,70 ± 0,06 ^{ab}	20,10 ± 0,74 ^{bc}	55,50 ± 1,68 ^d	10,70 ± 0,51 ^{ab}
NSK+ABY-3	2,50 ± 0,23 ^b	11,10 ± 0,85 ^b	0,90 ± 0,10 ^{ab}	16,20 ± 0,47 ^a	54,10 ± 1,40 ^{cd}	15,20 ± 0,58 ^d
NSK	nw	12,52 ± 0,59 ^{ab}	0,53 ± 0,08 ^a	19,37 ± 0,54 ^{ab}	56,45 ± 1,60 ^d	11,14 ± 0,83 ^{abc}
NSKp+ABY-3	2,30 ± 0,17 ^{ab}	16,10 ± 0,82 ^c	1,00 ± 0,30 ^{abc}	16,60 ± 0,38 ^a	49,80 ± 1,17 ^{bc}	14,20 ± 0,99 ^d
Statystyka ANOVA. η^2 [-]						
Kiełkowanie	ns	ns	0,340	0,703	0,703	ns
Fermentacja	0,898	0,443	ns	ns	0,718	ns
Przechowywanie	ns	ns	0,293	ns	ns	ns

a, b, c, d, e – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); nw – nie wykryto; ns – nieistotnie statystycznie; ¹ Opis jak w Tabeli 2

We wszystkich niefermentowanych napojach z fasoli i soczewicy największy udział w pozycji sn-2 w TAG spośród SFA stwierdzono dla kwasu palmitynowego, zaś spośród UFA dla kwasu oleinowego. W pozycjach sn-1,3 w TAG największy udział miały wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA – ang. polyunsaturated fatty acids), czyli kwasy linolowy i α -linolenowy.

Fermentacja była głównym czynnikiem wpływającym na zmiany w rozmieszczeniu kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-2 i sn-1,3 w TAG. Zastosowanie tego procesu wpłynęło istotnie na zmniejszenie udziału SFA i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA – ang. monounsaturated fatty acids) w pozycji sn-2, zwiększenie udziału PUFA w pozycji sn-2, a także zwiększenie udziału SFA i MUFA przy jednoczesnym zmniejszeniu PUFA w pozycji sn-1,3 w TAG NF i NFK. W próbkach po fermentacji zaobserwowano pojawienie się w pozycjach sn-2 i sn-1,3 w TAG wcześniej nieobecnego kwasu stearynowego w NF i NFK oraz kwasu mirystynowego w NS i NSK. Przechowywanie w warunkach chłodniczych oraz kiełkowanie nie miało wpływu na pozycjonowanie kwasów tłuszczowych w TAG w większości badanych próbek.

Do chwili obecnej nie zostało w pełni wyjaśnione, w jaki sposób fermentacja z wykorzystaniem złożonych kultur starterowych wpływa na zmiany w profilu kwasów tłuszczowych TAG napojów roślinnych. Ziarno i wsp. [2020] analizowali wpływ fermentacji napoju z fasoli na rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w TAG, stosując monokultury pałeczek mlekowych. Po fermentacji w próbkach zaobserwowano przede wszystkim zmniejszenie udziału kwasu palmitynowego i stearynowego, a także zwiększenie udziału kwasu oleinowego w pozycji sn-2. Napoje fermentowane charakteryzowały się wyższym udziałem PUFA w porównaniu z niefermentowanymi próbkami. Niniejsze badanie wykazało podobne wyniki dla SFA i PUFA.

Uzyskane wyniki wskazują, że fermentacja napojów z fasoli i soczewicy zwiększa udział PUFA w pozycji sn-2 w TAG i jednocześnie zwiększa udział SFA i MUFA w pozycjach sn-1,3 w TAG. Jest to korzystne z żywieniowego punktu widzenia, ponieważ w trakcie trawienia SFA i MUFA zostaną najpierw zhydrolizowane przez lipazę trzustkową i oddzielone od TAG. Te kwasy tłuszczowe będą mniej skutecznie wchłaniane w jelicie, ponieważ mogą reagować z wolnymi jonami wapnia, tworząc nierozpuszczalne sole, które są następnie wydalane z kałem [Bryś i Wirkowska, 2010]. PUFA zlokalizowane głównie w pozycji sn-2 w TAG będą wchłaniane głównie w postaci monoacylogliceroli. Spożywanie PUFA wraz z dietą jest niezwykle istotne,

ponieważ ludzki organizm nie jest w stanie samodzielnie syntetyzować tych cząsteczek, a mają one duże znaczenie w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania układu krwionośnego [Lee i wsp. 2016].

6.2.5. Analiza zawartości wybranych witamin z grupy B

Rośliny strączkowe są naturalnym źródłem witamin z grupy B, w tym ryboflawiny, tiaminy, niacyny, pirydoksyny i kwasu foliowego [Rebello i wsp.,]. Ich zawartość w produktach spożywczych może być jednak naturalnie zmieniana poprzez procesy takie jak fermentacja i kiełkowanie [Singh i wsp., 2015]. W Tabeli 10 przedstawiono zawartość wybranych witamin z grupy B w analizowanych próbkach. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania i fermentacji). Pod względem zawartości witamin z grupy B, błonnika pokarmowego i IG analizowano próbki napojów bazowe, z nasion skiełkowanych oraz fermentowane z kulturami starterowymi Beaugel Soja 1 i ABY-3 w celu porównania wpływu zastosowania kultury mleczarskiej (ABY-3) i wegańskiej (Beaugel Soja 1) na analizowane wartości.

W NS zaobserwowano wyższą zawartość biotyny, ryboflawiny, niacyny, pirydoksyny i kwasu foliowego w porównaniu do NF, co wynika z charakterystyki surowców [Rebello i wsp., 2014]. Kiełkowanie było głównym czynnikiem wpływającym na zwiększenie zawartości biotyny, niacyny i kwasu pantotenowego, jednocześnie zmniejszającym zawartość kwasu foliowego w próbkach. Zastosowanie fermentacji spowodowało ponad 3-krotne i 11-krotne zwiększenie zawartości tiaminy, ponad 150-krotne i 2-krotne zwiększenie zawartości ryboflawiny i ponad 3-krotne i 2-krotne zwiększenie zawartości pirydoksyny, odpowiednio w NF i NS. Zaobserwowano, że spożycie porcji 250 cm³ napojów jednocześnie fermentowanych i skiełkowanych (NFK+BS, NFK+ABY-3, NSK+BS, NSK+ABY-3) spełnia zalecane dzienne spożycie (RDA – ang. *Recommended Daily Allowance*) dla zdrowego dorosłego człowieka w odniesieniu do biotyny, przy RDA wynoszącym 30 µg [Kennedy, 2016].

Tabela 10. Zawartość wybranych witamin z grupy B w napojach z fasoli białej i soczewicy brązowej

Kod próbek ¹	zawartość witamin [mg/100 g]							
	B1 tiamina	B2 ryboflawina	B3 niacyna	B5 kwas pantotenowy	B6 pirydoksyna	B7 biotyna	B9 kwas foliowy	B12 kobalamina
Napoje z fasoli białej								
NF	0,044 ± 0,002 ^a	nw	0,091 ± 0,004 ^a	0,004 ± 0,000 ^a	0,033 ± 0,008 ^b	0,029 ± 0,006 ^a	0,165 ± 0,026 ^a	0,015 ± 0,001 ^b
NF+BS	0,133 ± 0,001 ^b	0,283 ± 0,037 ^c	0,267 ± 0,008 ^{bc}	0,010 ± 0,002 ^a	0,102 ± 0,011 ^d	0,035 ± 0,002 ^a	0,151 ± 0,020 ^a	nw
NF+ABY-3	0,134 ± 0,041 ^b	0,156 ± 0,015 ^{ab}	0,251 ± 0,007 ^b	0,016 ± 0,004 ^{ab}	0,193 ± 0,008 ^e	0,039 ± 0,006 ^a	nw	0,002 ± 0,000 ^a
NFK	0,012 ± 0,001 ^a	nw	0,339 ± 0,026 ^c	0,058 ± 0,001 ^{bc}	0,013 ± 0,002 ^a	0,159 ± 0,005 ^b	nw	nw
NFK+BS	0,162 ± 0,006 ^b	0,207 ± 0,015 ^b	0,335 ± 0,021 ^c	0,057 ± 0,003 ^{bc}	0,075 ± 0,002 ^c	0,218 ± 0,029 ^b	nw	nw
NFK+ABY-3	0,155 ± 0,003 ^b	0,107 ± 0,015 ^a	0,344 ± 0,035 ^c	0,078 ± 0,008 ^c	0,080 ± 0,018 ^c	0,225 ± 0,055 ^b	nw	0,005 ± 0,001 ^a
Statystyka ANOVA. η^2 [-]								
Kiełkowanie	ns	0,512	0,723	0,903	ns	0,932	0,650	ns
Fermentacja	0,886	0,960	ns	ns	0,575	ns	ns	ns
Napoje z soczewicy brązowej								
NS	0,029 ± 0,008 ^a	0,022 ± 0,00 ^a	0,147 ± 0,027 ^a	0,019 ± 0,003 ^a	0,012 ± 0,004 ^{ab}	0,034 ± 0,008 ^a	0,342 ± 0,002 ^d	0,007 ± 0,000 ^a
NS+BS	0,312 ± 0,009 ^{cd}	0,055 ± 0,012 ^c	0,152 ± 0,008 ^a	0,035 ± 0,007 ^a	0,025 ± 0,004 ^{bc}	0,037 ± 0,002 ^a	0,095 ± 0,015 ^c	0,010 ± 0,000 ^a
NS+ABY-3	0,340 ± 0,034 ^{cd}	0,028 ± 0,001 ^{ab}	0,153 ± 0,001 ^a	0,022 ± 0,001 ^a	0,045 ± 0,002 ^d	0,046 ± 0,005 ^{ab}	0,018 ± 0,002 ^{ab}	0,019 ± 0,001 ^{bc}
NSK	0,029 ± 0,008 ^a	0,022 ± 0,00 ^a	0,147 ± 0,027 ^a	0,019 ± 0,003 ^a	0,012 ± 0,004 ^{ab}	0,034 ± 0,008 ^a	0,342 ± 0,002 ^d	0,007 ± 0,000 ^a
NSK+BS	0,312 ± 0,009 ^{cd}	0,055 ± 0,012 ^c	0,152 ± 0,008 ^a	0,035 ± 0,007 ^a	0,025 ± 0,004 ^{bc}	0,037 ± 0,002 ^a	0,095 ± 0,015 ^c	0,010 ± 0,000 ^a
NSK+ABY-3	0,340 ± 0,034 ^{cd}	0,028 ± 0,001 ^{ab}	0,153 ± 0,001 ^a	0,022 ± 0,001 ^a	0,045 ± 0,002 ^d	0,046 ± 0,005 ^{ab}	0,018 ± 0,002 ^{ab}	0,019 ± 0,001 ^{bc}
Statystyka ANOVA. η^2 [-]								
Kiełkowanie	ns	ns	0,751	0,693	ns	0,953	0,500	ns
Fermentacja	0,791	0,739	ns	ns	0,567	0,694	0,616	ns

a, b, c, d, e – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); nw – nie wykryto; ns – nieistotnie statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

Analiza wyników badań wykazała, że proces kiełkowania miał istotny wpływ na zwiększenie zawartości biotyny, niacyny i kwasu pantotenowego w próbkach napojów z fasoli i soczewicy. Zwiększenie zawartości witamin z grupy B podczas kiełkowania przypisuje się ich endogennej syntezie, niezbędnej dla prawidłowego rozwoju i wzrostu kiełkujących nasion [Lemmens i wsp., 2019]. W tym badaniu zaobserwowano jednak również istotne zmniejszenie zawartości tiaminy, pirydoksyny i cyjanokobalaminy w NF po procesie kiełkowania. Według Lemmensa i wsp. [2019] zmniejszenie zawartości niektórych witamin z grupy B może wynikać z ich przeniesienia do wody wykorzystywanej w procesie moczenia, a także ich transportu do korzonków i akrospir w trakcie kiełkowania.

Niektóre szczepy LAB posiadają zdolność do syntezy witamin z grupy B przy użyciu dostępnych prekursorów lub wykorzystując inne witaminy obecne w surowcach [LeBlanc i wsp., 2013]. W niniejszym badaniu fermentacja przy użyciu obu kultur starterowych spowodowała zwiększenie zawartości tiaminy, ryboflawiny i pirydoksyny w NF i NS. Poprzednie badania również wykazały zwiększoną zawartość tiaminy i pirydoksyny w fermentowanych napojach sojowych [Champagne i wsp., 2010; Li i wsp., 2012]. Kompletny szlak syntezy tiaminy przez drobnoustroje został opisany wyłącznie dla *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 55730 [Saulnier i in., 2011]. Przeprowadzono również obszerne badania nad szlakami syntezy najważniejszej formy pirydoksyny, pirydoksal-5'-fosforanu, dla *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* [Rosenberg i wsp., 2017]. W przyszłości konieczne będzie przeprowadzenie dalszych badań w celu pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów zaangażowanych w syntezę tiaminy i pirydoksyny przez różne szczepy LAB.

W LAB geny odpowiedzialne za syntezę ryboflawiny są zorganizowane jako pojedynczy operon o określonej kolejności genów: ryboflawina-specyficzna deaminaza i reduktaza (*ribG*), podjednostka alfa syntazy ryboflawiny (*rib*), dwufunkcyjny enzym odpowiadający za tworzenie 3,4-dihydroxy-2-butanonu-4-fosforanu z rybulozo-5-fosforanu (*ribA*) i podjednostka beta syntazy ryboflawiny (*ribH*) [Capozzi i wsp., 2012]. W *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, obecnym w obu kulturach startowych wykorzystanych w tym badaniu, obecny jest cały operon *rib*, co umożliwia mu syntezę ryboflawiny i prawdopodobnie przyczynia się do zwiększenia zawartości tej witaminy w fermentowanych napojach z fasoli i soczewicy. Jednak *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nie jest w stanie syntetyzować folianów i potrzebuje zewnętrznych jej źródeł

do wzrostu [Hugenholtz i Smid, 2002; LeBlanc i wsp., 2013], co może to wyjaśniać istotne zmniejszenie zawartości folianów we wszystkich fermentowanych próbkach.

6.2.6. Analiza zawartości błonnika pokarmowego

Suche nasiona roślin strączkowych są bogate w błonnik pokarmowy (21–47 g/100 g), przez co stanowią idealne źródło tego składnika w diecie [Trinidad i wsp., 2010]. Regularne spożywanie błonnika wspomaga prawidłowe funkcjonowanie jelit i pomaga zmniejszyć ryzyko wystąpienia wielu chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca, otyłość, nowotwory i choroby układu krążenia [Dahl i Stewart, 2015]. W związku z tym podejmowane są prace związane z tworzeniem nowych zamienników mleka na bazie roślin strączkowych zawierających błonnik pokarmowy [Sethi i wsp., 2016]. W Tabeli 11 przedstawiono zawartość błonnika i IG analizowanych napojów roślinnych. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania i fermentacji).

Tabela 11. Zawartość błonnika pokarmowego i IG napojów z fasoli białej i soczewicy brązowej.

Kod próbki ¹	Błonnik [g/100g]	Indeks glikemiczny [-]
Napoje z fasoli białej		
NF	1,30 ± 0,10 ^{ab}	60,70 ± 0,0052 ^c
NF+BS	1,20 ± 0,20 ^{ab}	60,65 ± 0,0069 ^b
NF+ABY-3	0,90 ± 0,00 ^a	60,63 ± 0,0081 ^b
NFK	1,60 ± 0,20 ^b	60,19 ± 0,0100 ^a
NFK+BS	1,40 ± 0,00 ^{ab}	60,20 ± 0,0109 ^a
NFK+ABY-3	1,50 ± 0,10 ^b	60,20 ± 0,0095 ^a
Statystyka ANOVA. η^2 [-]		
Kiełkowanie	0,738	0,994
Fermentacja	ns	ns
Napoje z soczewicy brązowej		
NS	0,60 ± 0,00 ^a	61,29 ± 0,0132 ^c
NS+BS	0,70 ± 0,20 ^{ab}	61,27 ± 0,0101 ^c
NS+ABY-3	0,80 ± 0,10 ^b	61,05 ± 0,0284 ^b
NSK	1,10 ± 0,00 ^{de}	60,87 ± 0,0247 ^a
NSK+BS	0,90 ± 0,10 ^{bc}	60,82 ± 0,0085 ^a
NSK+ABY-3	1,00 ± 0,20 ^{cd}	60,82 ± 0,0012 ^a
Statystyka ANOVA. η^2 [-]		
Kiełkowanie	0,604	0,921
Fermentacja	ns	ns

a, b, c, d, e, f, g, h – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2.

Analiza zawartości rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego błonnika w testowanych napojach wykazała, że bazowe NF miały ponad dwukrotnie większą zawartość błonnika w porównaniu do NS (1,3 g/100 g dla NF i 0,6 g/100 g dla NS). Otrzymane napoje roślinne można uznać za produkty prozdrowotne, ponieważ zawartość błonnika na porcję 250 ml produktu przekracza 1,5 g, zarówno w napojach z nasion skielkowanych, jak i nieskielkowanych (2,25–4,0 g/250 ml dla NF i 1,5–2,75 g/250 ml dla NS) [Craig i Fresan, 2021].

Kielkowanie było jedynym czynnikiem istotnie wpływającym na otrzymane wyniki. Zastosowanie tego procesu doprowadziło do istotnego zwiększenia zawartości błonnika zarówno w NF ($\eta^2 = 0,738$), jak i NS ($\eta^2 = 0,604$). Choć wpływ kielkowania na zawartość błonnika w napojach roślinnych nie był dotychczas szeroko zbadany przez innych autorów, podobne zależności zaobserwowano dla kielkowania suchych nasion roślin strączkowych, takich jak soja [Megat Rusydi i wsp., 2011], fasola, soczewica i ciecierzycy [Ghavidel i Prakash, 2007]. Autorzy wskazują, że wpływ kielkowania na zawartość błonnika różni się w zależności od rodzaju rośliny strączkowej i występuje w fazie moczenia, przed faktycznym kielkowaniem [Megat Rusydi i wsp., 2011]. Uwodnienie polisacharydów (hemicelulozy, pektyny, celulozy), znajdujących się w ścianach komórkowych komórek liścienia podczas początkowej fazy kielkowania, prowadzi do zwiększenia dostępności błonnika, co przejawia się zwiększeniem jego całkowitej zawartości [Njoumi i wsp., 2019].

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnych zmian zawartości błonnika w badanych napojach pod wpływem procesu fermentacji. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych badaczy, którzy analizowali zmiany zawartości błonnika podczas fermentacji różnych napojów roślinnych, w tym tych na bazie roślin strączkowych, z wykorzystaniem różnych kultur starterowych. Przykładowo, w badaniach nad fermentacją NS przez *L. fermentum* DSM 20052 [Verni i wsp., 2020], zielonego groszku, soczewicy i mąki sojowej przez *L. plantarum* [Byanju i wsp., 2021], a także łubinu i soi przez *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* [Kaczmarska i wsp., 2017] przedstawiono podobne wyniki, wykazując minimalny wpływ lub brak wpływu na zawartość błonnika pokarmowego w wyniku zastosowania fermentacji.

6.2.7. Analiza IG

IG mierzy odpowiedź glikemiczną wywołaną przez spożycie porcji pożywienia zawierającego 50 gramów węglowodanów przyswajalnych i jest wyrażony jako procent odpowiedzi glikemicznej wywołanej przez węglowodan referencyjny, taki jak np. roztwór glukozy. Pokarmy są klasyfikowane na podstawie ich wartości IG, jako pokarmy o wysokim IG (> 70 , tj. pokarmy zawierające węglowodany, które są trawione, wchłaniane i metabolizowane szybko), pokarmy o średnim IG ($55 - 70$) i pokarmy o niskim IG (< 55 , tj. pokarmy trawione, wchłaniane i metabolizowane powoli) [Augustin i wsp., 2015]. W tym badaniu wszystkie analizowane próbki napojów z fasoli i soczewicy można było sklasyfikować do kategorii żywności o średnim IG, z wartościami pomiędzy 60,19–60,70 dla NF i 60,82–61,29 dla NS (Tabela 11). Zastosowanie procesu kiełkowania istotnie zmniejszyło IG, zarówno NF ($\eta^2 = 0,994$), jak i NS ($\eta^2 = 0,921$), jednak nie spowodowało przesunięcia tych produktów do kategorii żywności o niskim IG. Fermentacja nie wpłynęła istotnie na otrzymane wyniki.

Zwykle rośliny strączkowe mają średni IG wynoszący około 34, co klasyfikuje je jako żywność o niskim IG [Atkinson i wsp., 2021]. Jednak w tym badaniu przetwarzanie roślin strączkowych w celu wytworzenia napojów roślinnych zwiększyło ich IG ze względu na zwiększoną dostępność łatwo przyswajalnych węglowodanów. Badanie Oboh i Agu [2010], wykazało, że różne metody obróbki termicznej, takie jak gotowanie i smażenie, zwiększyły IG fasoli od 46,63 do 53,42.

Obniżenie IG obserwowane w badanych napojach w wyniku zastosowania kiełkowania nasion można przypisać równoczesnemu zwiększeniu zawartości błonnika (Tabela 11). Ponadto w podrozdziale 6.2.2. (Tabela 6) zaobserwowano istotne zmniejszenie zawartości glukozy w badanych napojach po procesie kiełkowania, z 6,53 mg/kg dla NF do 2,58 mg/kg dla NFK i z 12,49 mg/kg dla NS do 8,21 mg/kg dla NSK. Zarówno zawartość glukozy, jak i obecność błonnika pokarmowego bezpośrednio wpływają na IG żywności [Øverby i wsp., 2013; Świeca i wsp., 2013]. Kiełkowanie okazało się być korzystną metodą zwiększania właściwości substytutów mleka na bazie fasoli i soczewicy. Błonnik pokarmowy obecny w żywności przyczynia się do zwiększonego rozdęcia żołądka po spożyciu żywności, co prowadzi do zwiększonego uczucia sytości i wolniejszego wchłaniania składników odżywczych. W szczególności błonnik rozpuszczalny zmniejsza wchłanianie glukozy w jelicie cienkim, co skutkuje niższą odpowiedzią glikemiczną po spożyciu pokarmu [Scazzina i wsp., 2013]. Należy

zauważyć, że w tym badaniu GI oszacowano teoretycznie metodą *in vitro*, a przyszłe badania powinny również określić ten parametr poprzez badania *in vivo*.

6.3. Charakterystyka właściwości fizycznych

Napoje roślinne z fasoli białej poddane homogenizacji wysokociśnieniowej, w wariantach bazowych, z nasion skielkowanych i po procesie fermentacji przebadano pod względem charakterystyki właściwości fizycznych. Wyniki analiz barwy, stabilności, wielkości cząstek i właściwości reologicznych próbek napojów przedstawiono w drugim artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P., Domian E., Ziarno M. (2022). Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal–Suspension Products: Yogurt–Type Bean–Based Beverages. *Sensors*, 22, 8348.**

6.3.1. Analiza barwy

Właściwości optyczne żywności, w tym ich barwa, mają bezpośredni wpływ na jej percepcję przez konsumenta [Sliburyte i Skeryte, 2014]. Wartości parametrów barwy (L^* , a^* , b^* , C^* i h^*) napojów fasolowych przedstawiono w Tabeli 12. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kielkowania, fermentacji i przechowywania). Istotnie ($p < 0,05$) wyższe wartości L^* i h^* oraz niższe wartości a^* (tj. w zakresie barwy czerwonej), b^* (tj. w zakresie barwy żółtej) i C^* obserwowano w przypadku niefermentowanych i fermentowanych napojów z fasoli skielkowanej NFK ($L^* \approx 71,70\text{--}72,69$, $h^* \approx 81,46\text{--}81,50$, $a^* \approx 1,25\text{--}1,94$, $b^* \approx 16,78\text{--}17,03$ i $C^* \approx 16,88\text{--}17,04$) w porównaniu do napojów bazowych NF ($L^* \approx 69,81\text{--}70,49$, $h^* \approx 81,43\text{--}81,44$, $a^* \approx 2,66\text{--}2,84$, $b^* \approx 19,97\text{--}20,28$ i $C^* \approx 20,16\text{--}20,46$). Pomimo, że uzyskane wyniki różniły się istotnie, to wykazywały wartości w podobnym rzędzie wielkości, dlatego barwa zarówno NF, jak i NFK została zidentyfikowana jako jasnożółta. W próbkach napojów bazowych i skielkowanych różnice w barwie (ΔE) między próbkami fermentowanymi i niefermentowanymi nie były większe niż 1,22 (Tabela 12). Oznacza to, że różnice te nie są łatwo wykrywalne gołym okiem ludzkim. Różnice te są zauważalne dopiero, gdy wartości ΔE są większe niż 3,0 [Aliakbarian i wsp., 2016].

Tabela 12. Zmiany parametrów barwy (L*, a*, b*, C*, h*) napojów z fasoli białej i różnice barwy (ΔE) pomiędzy próbkami przed i po fermentacji

Kod próbki ¹	Parametry barwy					
	L*	a*	b*	C*	h*	ΔE
Napoje z fasoli białej						
NF	70,49 ± 0,01 ^c	2,66 ± 0,02 ^c	20,28 ± 0,03 ^e	20,46 ± 0,02 ^e	81,44 ± 0,00 ^b	–
NF+BS	69,81 ± 0,01 ^a	2,79 ± 0,02 ^{cd}	19,97 ± 0,02 ^c	20,16 ± 0,03 ^c	81,43 ± 0,00 ^{ab}	0,77 ± 0,02 ^b
NF+YO–MIX	70,18 ± 0,01 ^b	2,84 ± 0,00 ^d	20,11 ± 0,01 ^d	20,31 ± 0,01 ^d	81,43 ± 0,00 ^a	0,41 ± 0,03 ^a
NF+ABY–3	70,22 ± 0,01 ^b	2,84 ± 0,02 ^d	20,18 ± 0,01 ^{de}	20,45 ± 0,01 ^e	81,44 ± 0,00 ^b	0,35 ± 0,02 ^a
NFK	71,70 ± 0,07 ^d	1,25 ± 0,17 ^a	17,03 ± 0,11 ^b	17,04 ± 0,12 ^b	81,50 ± 0,01 ^d	–
NFK+BS	72,50 ± 0,04 ^e	1,93 ± 0,01 ^b	16,89 ± 0,03 ^{ab}	16,99 ± 0,02 ^{ab}	81,46 ± 0,00 ^c	1,07 ± 0,16 ^{bc}
NF+YO–MIX	72,69 ± 0,02 ^f	1,91 ± 0,01 ^b	16,78 ± 0,01 ^a	16,88 ± 0,01 ^a	81,46 ± 0,00 ^c	1,22 ± 0,14 ^c
NFK+ABY–3	72,65 ± 0,04 ^f	1,94 ± 0,02 ^b	16,89 ± 0,06 ^{ab}	16,97 ± 0,07 ^{ab}	81,46 ± 0,00 ^c	1,18 ± 0,17 ^c
Statystyka ANOVA. η^2 [–]						
Kielkowanie	0,933	0,945	0,998	0,999	0,777	0,813
Fermentacja	ns	0,688	0,661	0,568	0,604	ns

a, b, c, d, e, f – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

Różnice w parametrach barwy między NF i NFK mogą wynikać z różnej zawartości składników bioaktywnych w badanych próbkach. W trakcie kiełkowania nasion roślin strączkowych obserwuje się obniżenie poziomu substancji antyodżywczych, co prowadzi do zwiększenia dostępności związków bioaktywnych. Badania wcześniejsze wskazują, że związki bioaktywne, takie jak fenole, karotenoidy, i chlorofile, mogą wpływać na zmianę parametrów barwy produktów żywnościowych [Sant’Anna i wsp., 2013]. Ponadto napoje z fasoli skielkowanej charakteryzowały się istotnie większą średnią średnicą cząstek (Tabela 14), co mogło prowadzić do większej jasności i mniejszego nasycenia koloru. Wpływ kiełkowania na zmiany parametrów barwy zaobserwowali również inni badacze dla ryżu brązowego [Patil i Khan, 2012], napojów ryżowych [Beaulieu i wsp., 2020] i mąki z ciecierzycy [Sofi i wsp., 2020].

6.3.2. Analiza stabilności i wielkości cząstek

Napoje roślinne zawierają cząstki stałe o różnej gęstości. Ze względu na działanie grawitacji, cząstki te mają tendencję do rozwarstwiania się. Lżejsze składniki,

takie jak tłuszcze, unoszą się na powierzchni, podczas gdy cięższe – np. fragmenty komórek roślinnych czy białka – opadają na dno [McClements, 2020]. Stabilność napojów roślinnych można poprawić poprzez zmniejszenie wielkości cząstek, zwiększenie lepkości fazy wodnej, zmniejszenie różnic gęstości, czy dodatek różnego rodzaju hydrokoloidów [Mäkinen i wsp., 2016; McClements, 2020]. Poprzednie badania wskazują, że homogenizacja wysokociśnieniowa wpływa na zmniejszenie i ujednoczenie wielkości cząstek [Wang i wsp., 2018], co może mieć bezpośredni wpływ na jakość produktu.

Wartości TSI i kategorie stabilności badanych napojów z fasoli i soczewicy przedstawiono w Tabeli 13. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania).

Tabela 13. Wyniki stabilności i wielkości cząstek napojów z fasoli białej

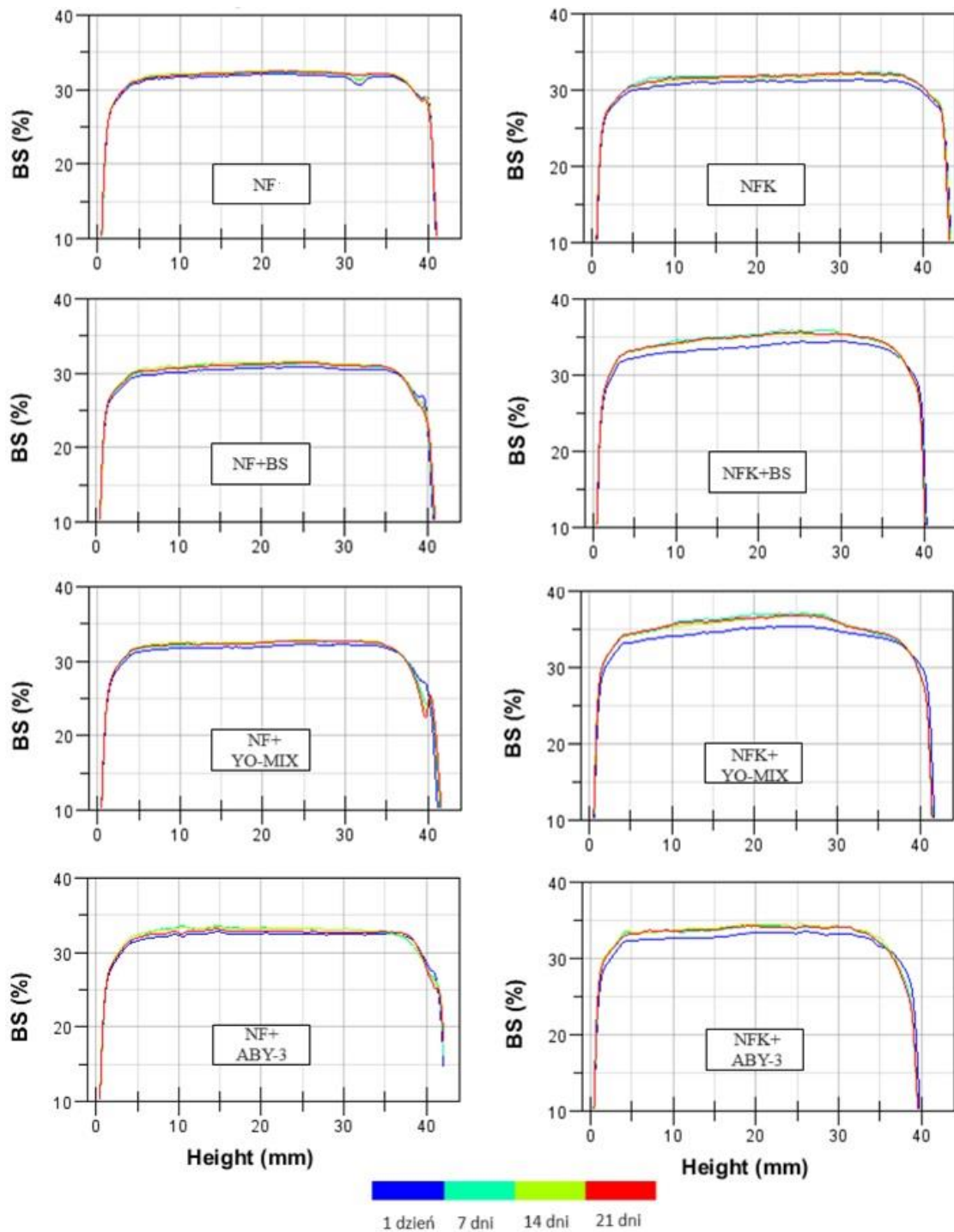
Kod próbki ¹	Parametry barwy			TSI	Kategoria stabilności ²
	d _{4,3} [μm]	d _{0,9} [μm]	Span [-]		
Napoje z fasoli białej					
NF	43,0 ± 0,1 ^{ab}	84,3 ± 0,5 ^{ab}	2,00 ± 0,04 ^a	0,65 ± 0,10 ^a	A
NF+BS	38,2 ± 0,2 ^a	74,1 ± 0,5 ^a	1,94 ± 0,01 ^a	0,65 ± 0,10 ^a	A
NF+YO–MIX	44,9 ± 0,3 ^{ab}	87,4 ± 0,5 ^b	1,96 ± 0,01 ^a	0,85 ± 0,20 ^a	A
NF+ABY–3	47,0 ± 0,1 ^b	92,0 ± 0,4 ^b	1,98 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,10 ^a	A
NFp	46,6 ± 0,3 ^b	90,1 ± 0,1 ^b	1,92 ± 0,03 ^a	–	–
NFp+BS	41,6 ± 0,1 ^{ab}	81,2 ± 0,1 ^{ab}	1,97 ± 0,01 ^a	–	–
NFp+YO–MIX	45,0 ± 0,1 ^{ab}	86,4 ± 0,1 ^{ab}	1,90 ± 0,02 ^a	–	–
NFp+ABY–3	46,2 ± 0,2 ^b	89,2 ± 0,4 ^b	1,91 ± 0,01 ^a	–	–
NFK	81,5 ± 1,6 ^c	169,8 ± 5,5 ^d	2,35 ± 0,06 ^b	1,40 ± 0,30 ^{ab}	B
NFK+BS	76,8 ± 0,2 ^c	156,8 ± 0,6 ^c	2,25 ± 0,01 ^b	1,45 ± 0,10 ^{ab}	B
NF+YO–MIX	78,3 ± 1,2 ^c	160,8 ± 3,1 ^{cd}	2,27 ± 0,01 ^b	2,00 ± 0,20 ^b	B
NFK+ABY–3	82,9 ± 0,1 ^{cd}	171,3 ± 1,7 ^d	2,29 ± 0,04 ^b	1,30 ± 0,10 ^{ab}	B
NFKp	79,3 ± 0,2 ^c	161,9 ± 0,1 ^{cd}	2,25 ± 0,01 ^b	–	–
NFKp+BS	80,1 ± 0,1 ^c	163,5 ± 0,4 ^{cd}	2,24 ± 0,01 ^b	–	–
NFKp+YO–MIX	84,2 ± 0,1 ^d	173,9 ± 0,1 ^{cd}	2,28 ± 0,01 ^b	–	–
NFKp+ABY–3	82,9 ± 0,6 ^{cd}	169,1 ± 1,4 ^d	2,23 ± 0,01 ^b	–	–
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kiełkowanie	0,983	0,989	0,960	0,701	–
Fermentacja	0,446	0,469	ns	ns	–
Przechowywanie	0,177	ns	0,279	–	–

a, b, c, d, e, f – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ns – nieistotne statystycznie; ¹ Opis jak w Tabeli 2;

² Kategoria stabilności; A+ — doskonała stabilność (TSI < 0,5), A — dobra stabilność (TSI 0,5–1,0), B — zadowalająca stabilność (TSI 1,0–3,0), C — słaba stabilność (TSI 3,0–10,0), D — niezadowalająca stabilność (TSI > 10,0)

Stabilność badanych napojów z fasoli oceniono przy użyciu narzędzia Turbiscan, które umożliwia identyfikację niestabilności układu w skoncentrowanych dyspersjach cieczy, poprzez analizę światła rozproszonego przez cząstki zawieszone w płynie, nie uszkadzając badanego materiału [Liu i wsp., 2014]. Badanie pozwoliło wykazać, że zarówno niefermentowane, jak i fermentowane NF i NFK, niezależnie od rodzaju użytej kultury starterowej, wykazywały odpowiednio dobrą (kategoria A) i zadowalającą (kategoria B) stabilność.

Profile rozproszenia wstecznego (BS – ang. *backscattering*) napojów fasolowych uzyskane w ciągu 21 dni przechowywania w temperaturze 6 °C przedstawiono na Rysunku 3, na którym stabilność niefermentowanych i fermentowanych NF i NFK oznaczono nachodzącymi na siebie liniami. Dla wszystkich analizowanych napojów zaobserwowano podobną intensywność BS na całej wysokości próbki. Na powierzchniowej części próbki zauważono redukcję BS, co może wskazywać na zjawisko niewielkiej synerezy podczas przechowywania. Wraz ze zmniejszaniem temperatury napojów po procesie fermentacji, zjawisko synerezy może występować ze względu na zwiększenie upakowania ziaren skrobi [Onyango i wsp., 2020]. Zwiększenie BS zaobserwowano dla fermentowanego NFK po 7 dniach przechowywania. W dalszym okresie przechowywania nie zaobserwowano żadnych zmian w BS, co wskazuje, że próbka została ustabilizowana. W pierwszym tygodniu przechowywania pH fermentowanych próbek mogło ulegać stabilizacji, co powodowało zmiany w ich profilu BS. Większa dostępność cukrów prostych w NFK, wynikająca z zastosowania procesu kiełkowania nasion, mogła wydłużyć czas stabilizacji komórek bakteryjnych, biorących udział w fermentacji. Mniejszy rozmiar cząstek i wyższa lepkość NF, zaobserwowane w niniejszym badaniu (Tabela 13 i 14), skutkowały nieznacznie wyższą stabilnością, co jest zgodne z wynikami badań przeprowadzonych na innych układach [Fernández-Ávila i wsp., 2015; Hebishy i wsp., 2015; Li i wsp., 2018; Wang i wsp., 2018].

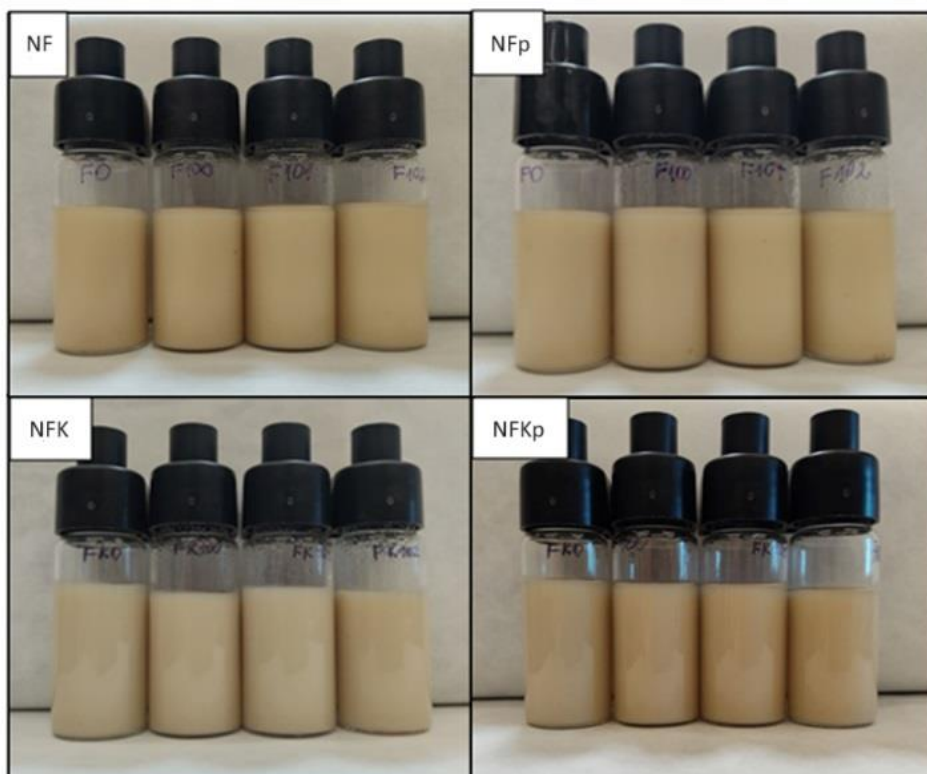


Rysunek 3. Profile rozproszenia wstecznego (BS) w funkcji wysokości próbki (w czasie 21 dni w temperaturze 6 °C) napojów z fasoli białej

NF/NFK, NF/NFK+BS, NF/NFK+YO-MIX, NF/NFK+ABY-3 – Opis jak w tabeli 2

Zdjęcia analizowanych napojów fasolowych, niefermentowanych i fermentowanych, przed i po procesie przechowywania przez 21 dni w temperaturze 6 °C przedstawiono na Rysunku 4. Podczas przechowywania nie zaobserwowano

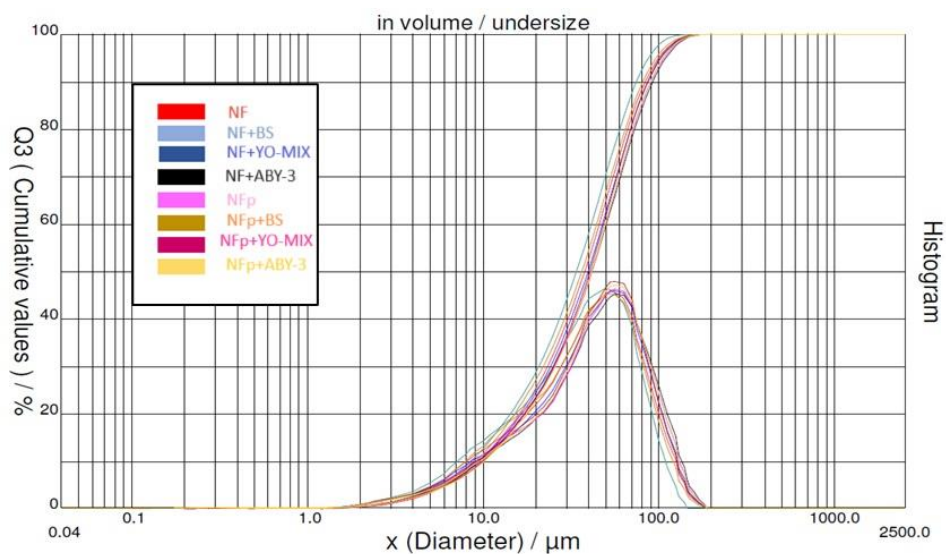
rozwarstwienia się próbek, co świadczy o wysokiej stabilności układów. Należy podkreślić, że tak wysoką stabilność uzyskano wyłącznie dzięki zastosowaniu zaawansowanych technologii, głównie homogenizacji wysokociśnieniowej. Badane napoje nie zawierają dodatków hydrokoloidowych, powszechnie stosowanych przez producentów napojów roślinnych. Jest to korzystne z perspektywy konsumentów, którzy często negatywnie oceniają obecność tego typu dodatków w produktach spożywczych [Varela i Fiszman, 2013; Zhong i wsp., 2018].



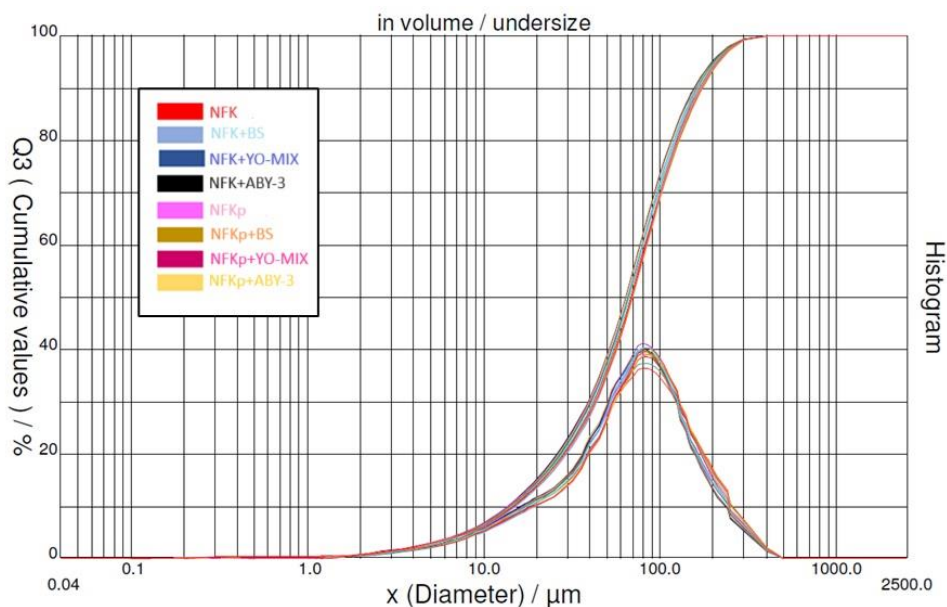
Rysunek 4. Napoje z fasoli białej przed i po procesie przechowywania NF/NFK, NF/NFKp, – Opis jak w tabeli 2

Wartości rozkładu wielkości cząstek napojów z fasoli przedstawiono w Tabeli 13. Zastosowanie homogenizacji wysokociśnieniowej podczas wytwarzania badanych napojów spowodowało otrzymaniem układów o monomodalnym rozkładzie cząstek (Rysunek 5 i Rysunek 6) i cząstkami mniejszymi niż $d_{0,9} \sim 84 \mu\text{m}$ dla NF i $d_{0,9} \sim 170 \mu\text{m}$ dla NFK (Tabela 13). Kielkowanie było głównym czynnikiem wpływającym na otrzymane wartości ($\eta^2 = 0,983$). W niefermentowanych i fermentowanych NFK zaobserwowano wyższy Span i średnią średnicę cząstek $d_{4,3}$ (Span $\approx 2,24\text{--}2,35$, $d_{4,3} \approx 76,8\text{--}84,2$) w porównaniu z NF (Span $\approx 1,90\text{--}2,00$, $d_{4,3} \approx 38,2\text{--}47,0$). Wartości Span zostały użyte do wskazania szerokości rozkładów, a $d_{4,3}$ jako wskaźnik obecności

większych cząstek lub agregatów. Fermentacja miała mniejszy wpływ ($\eta^2 = 0,446-0,469$) na rozkład wielkości cząstek w porównaniu do kiełkowania ($\eta^2 = 0,960-0,989$). W napojach fermentowanym z kulturą starterową ABY-3 (NF/NFK+ABY-3) zaobserwowano niewielkie zwiększenie $d_{4,3}$ z $43,0 \mu\text{m}$ do $47,0 \mu\text{m}$ dla NF i z $81,5 \mu\text{m}$ do $82,9 \mu\text{m}$ dla NFK.



Rysunek 5. Rozkład wielkości cząstek bazowych napojów z fasoli białej NF/NFp, NF/NFp+BS, NF/NFp+YO-MIX, NF/NFp+ABY-3 – Opis jak w tabeli 2



Rysunek 6. Rozkład wielkości cząstek napojów ze skiełkowanej fasoli białej NFK/NFKp, NFK/NFKp+BS, NFK/NFKp+YO-MIX, NFK/NFKp+ABY-3 – Opis jak w tabeli 2

Najdrobniejsza frakcja cząstek napojów fasolowych składała się prawdopodobnie głównie z białek i ciał oleistych, podczas gdy na największe cząstki składają się pozostałości tkanki komórkowej i agregaty cząstek [Bernat i wsp., 2015]. Nieskiełkowane ziarna mają twardą i suchą strukturę, co pozwala na skuteczniejsze mielenie podczas przetwarzania i homogenizacji wysokociśnieniowej. W rezultacie powstaje produkt o małym rozmiarze cząstek i małej różnorodności cząstek. Proces kiełkowania indukuje modyfikacje struktury polisacharydów ścian komórkowych roślin strączkowych, prawdopodobnie związane z uszkodzeniem tkanek roślinnych i zaburzeniem interakcji białek z węglowodanami. To z kolei stymuluje biosyntezę nowych ścian komórkowych, prowadząc do powstania nowego rodzaju błonnika pokarmowego. Jak wykazano w poprzednich badaniach, modyfikacje ścian komórkowych nasion poddanych kiełkowaniu wpływają na wiele ich właściwości fizykochemicznych [Martín–Cabrejas i wsp., 2003]. Po procesie kiełkowania ziarna mają bardziej włóknistą strukturę, co zmniejsza wydajność mielenia i skutkuje produktem o znacznie większym rozmiarze cząstek.

Fermentacja indukuje zmiany w wielkości cząstek produktów, co jest związane ze zmniejszeniem wartości pH. Kwaśne środowisko powoduje przegrupowanie cząsteczek, szczególnie białek, na różnych poziomach strukturalnych. Obserwuje się fuzję cząstek i powstawanie większych agregatów. Ten proces, nasilający się podczas przechowywania, prowadzi do tworzenia dużych klastrów białkowych i redukcji liczby mniejszych cząstek [Jian i wsp., 2009; Hahn i wsp., 2011].

W niemniejszym badaniu wartości Span różniły się istotnie między NF i NFK, ale dla obu rodzajów napojów wykazywały podobny rząd wielkości (~2). Wskazuje to, że rozkład wielkości cząstek napojów z fasoli kształtował się przede wszystkim podczas procesu technologicznego, szczególnie z w wyniku zastosowania homogenizacji wysokociśnieniowej. Inni badacze również donosili, że proces ten zwiększa stabilność napojów roślinnych poprzez rozbijanie agregatów i kropelek lipidów, a tym samym zmniejszanie rozkładu wielkości cząstek. Taki efekt zaobserwowano wcześniej w przypadku napojów sojowych [Poliseli–Scopel i wsp., 2012; Ferragut i wsp., 2014], konopnych [Wang i wsp., 2018], migdałowych i orzechowych [Bernat i wsp., 2015].

6.3.3. Analiza właściwości reologicznych

Struktura pierwotna, czynniki zewnętrzne i czas obserwacji to parametry określające charakter reologiczny układu [Moelants i wsp., 2014]. Badane napoje z

fasoli mają strukturę zawiesiny, na którą składają się woda, cząstki stałe tkanki roślinnej o różnych rozmiarach i komórki bakteryjne pochodzące z kultur starterowych. Badania stabilności z wykorzystaniem analizy światła rozpraszanego przez cząstki zawieszone w płynie wykazały, że siły oddziaływania między składnikami układu zawiesiny koloidalnej napojów stabilizowały ich strukturę i utrzymywały ją w stanie nienaruszonym wbrew słabym siłom zewnętrznym, takim jak siła grawitacji. Wraz ze zwiększeniem odkształcenia (np. podczas mieszania lub pompowania przez rurociągi w warunkach produkcyjnych) siły ścinające mogą jednak przekroczyć siły oddziaływania tworzącego strukturę, co może doprowadzić do reorganizacji pierwotnej struktury napojów.

W niniejszym badaniu w ocenie ustalonych krzywych przepływu ścinającego przyjęto, że każda szybkość ścinania odpowiada określonej strukturze równowagowej i lepkości równowagowej, co pozwoliło określić związek między strukturą wewnętrzną wielofazowych układów ciekłych napojów z fasoli a ich właściwościami przepływu. Przepływ lepki (w zakresie szybkości ścinania od 1 do 100 s⁻¹) dyspersji ciekłych NF i NFK został dobrze opisany równaniem Ostwalda–de Waele, co wskazało, że wszystkie badane napoje z fasoli to płyny rozrzedzane ścinaniem ($n < 1,0$) bez granicy płynięcia.

Parametry modelu Ostwalda–de Waele określone przez dopasowanie eksperymentalnych krzywych przepływu (r^2 w zakresie od 0,994 do 0,999) przedstawiono w Tabeli 14. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania). Kiełkowanie i fermentacja miały istotny wpływ na otrzymane wartości n i k . Bazowe i fermentowane NFK charakteryzowały się istotnie niższym współczynnikiem konsystencji k , w zakresie od 21,9 do 28,2 Pa·sn, w porównaniu z NF (33,0–51,9 Pa·sn). Po fermentacji zaobserwowano istotne zwiększenie wartości parametru k dla napojów fermentowanych z kulturą starterową ABY–3 (NF/NFK+ABY–3) (B: od 36,9 Pa·sn do 49,6 Pa·sn; BG: od 25,7 Pa·sn do 28,2 Pa·sn). Fermentacja z kulturą ABY–3 wpłynęła również na istotne obniżenie współczynnika płynięcia n w NFK, (z 0,12 do 0,07), podczas gdy dla NF nie zaobserwowano istotnych zmian tego parametru.

Tabela 14. Podsumowanie wartości parametrów związanych z przepływem (parametry modelu Ostwalda–de–Waele k i n oraz lepkość η przy szybkości ścinania 25, 50 i 75 s⁻¹) dla napojów z fasoli przed i po fermentacji oraz po 21 dniach przechowywania

Kod próbki ¹	k [Pa·s ⁿ]	n [-]	η at 25 s ⁻¹ [Pa·s]	η at 50 s ⁻¹ [Pa·s]	η at 75 s ⁻¹ [Pa·s]
Napoje z fasoli białej					
NF	36,9 ± 1,4 ^d	0,08 ± 0,01 ^{abc}	1,94 ± 0,01 ^d	1,03 ± 0,02 ^e	0,71 ± 0,01 ^e
NF+BS	33,0 ± 2,1 ^{cd}	0,08 ± 0,01 ^{ab}	1,70 ± 0,06 ^c	0,89 ± 0,03 ^d	0,62 ± 0,02 ^d
NF+YO–MIX	50,0 ± 2,8 ^{ef}	0,07 ± 0,01 ^a	2,50 ± 0,09 ^{gh}	1,31 ± 0,04 ^{ghi}	0,90 ± 0,03 ^{gh}
NF+ABY–3	49,6 ± 2,1 ^{ef}	0,08 ± 0,01 ^{ab}	2,56 ± 0,04 ^{gh}	1,35 ± 0,02 ^{hi}	0,93 ± 0,01 ^{hi}
NFp	45,1 ± 1,2 ^e	0,08 ± 0,00 ^{ab}	2,34 ± 0,05 ^f	1,24 ± 0,03 ^g	0,85 ± 0,02 ^g
NFp+BS	36,9 ± 0,9 ^d	0,07 ± 0,00 ^a	1,86 ± 0,03 ^d	0,98 ± 0,01 ^e	0,67 ± 0,01 ^{de}
NFp+YO–MIX	47,1 ± 1,0 ^{ef}	0,08 ± 0,01 ^{ab}	2,43 ± 0,04 ^{fg}	1,28 ± 0,02 ^{gh}	0,88 ± 0,02 ^{gh}
NFp+ABY–3	51,9 ± 0,3 ^{ef}	0,07 ± 0,00 ^{ab}	2,63 ± 0,02 ^h	1,38 ± 0,01 ⁱ	0,95 ± 0,01 ⁱ
NFK	25,7 ± 2,3 ^{ab}	0,12 ± 0,01 ^c	1,48 ± 0,10 ^e	1,12 ± 0,05 ^f	0,56 ± 0,04 ^f
NFK+BS	22,4 ± 0,8 ^a	0,10 ± 0,00 ^{bc}	1,25 ± 0,05 ^a	0,67 ± 0,02 ^{abc}	0,53 ± 0,02 ^{abc}
NF+YO–MIX	25,9 ± 1,0 ^{ab}	0,08 ± 0,01 ^{ab}	1,33 ± 0,05 ^{ab}	0,70 ± 0,03 ^{bc}	0,48 ± 0,02 ^{bc}
NFK+ABY–3	28,2 ± 1,9 ^{bc}	0,07 ± 0,01 ^a	1,42 ± 0,06 ^b	0,75 ± 0,03 ^c	0,51 ± 0,02 ^c
NFKp	21,9 ± 0,3 ^a	0,10 ± 0,00 ^{bc}	1,23 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,01 ^{ab}	0,46 ± 0,00 ^{ab}
NFKp+BS	24,3 ± 0,6 ^{ab}	0,08 ± 0,00 ^{ab}	1,27 ± 0,02 ^{ab}	0,67 ± 0,01 ^{abc}	0,46 ± 0,00 ^{abc}
NFKp+YO–MIX	23,2 ± 0,8 ^a	0,09 ± 0,01 ^{abc}	1,25 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,01 ^{ab}	0,46 ± 0,01 ^{ab}
NFKp+ABY–3	24,2 ± 0,5 ^{ab}	0,07 ± 0,00 ^a	1,20 ± 0,05 ^a	0,63 ± 0,00 ^a	0,43 ± 0,00 ^a
Statystyka ANOVA. η^2 [-]					
Kielkowanie	0,876	0,217	0,739	0,733	0,729
Fermentacja	0,500	0,347	0,307	0,302	0,299
Przechowywanie	ns	ns	ns	ns	ns

a, b, c, d, e, f, g, h, i – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ns – nieistotne statystycznie; ¹ Opis jak w Tabeli 2

Na podstawie właściwości napojów fasolowych, jako płynów rozrzedzanych ścinaniem, można wnioskować, że ich struktura charakteryzuje się stosunkowo niską odpornością na odkształcenia i przepływ. Zastosowanie zmian szybkości ścinania spowodowało, że NF i NFK przyjęły nowe struktury równowagowe, zgodnie z kierunkiem i czasem działania sił ścinających. Wraz ze zwiększeniem szybkości ścinania z 25 do 50 i 75 s⁻¹, lepkość badanych próbek zmniejszyła się z 2,24 Pa·s do 1,18 Pa·s i 0,81 Pa·s dla NF i z 1,30 Pa·s do 0,69 Pa·s i 0,47 Pa·s dla NFK (Tabela 14). Niższe wartości lepkości i rozrzedzenia ścinaniem NF można wyjaśnić większym rozkładem wielkości cząstek i wyższą wartością współczynnika Span w porównaniu do NF (Tabela 13). Ponadto badania układów w postaci zawiesin wskazują, że duże cząstki mają orientację kierunkową przepływu [Zheng i wsp., 2020].

Układy rozproszone, w których obserwuje się trójwymiarową sieć faz, wykazują właściwości lepkosprężyste jako funkcję rozmiarów cząstek [McClements, 2007].

Analiza charakteru reologicznego napojów fasolowych w warunkach dynamicznego ścinania pozwoliła uzyskać informacje na temat ich natury i zachowania pod wpływem niewielkich odkształceń. Długość LVR modułu sprężystości (G') można wykorzystać jako miarę stabilności struktury próbki, ponieważ właściwości strukturalne dobrze korelują z elastycznością. Jak wskazują inne badania, słabo flokulowane i stabilne dyspersje mają dłuższe obszary liniowe, podczas gdy skoagulowane i silnie flokulowane dyspersje mają stosunkowo krótkie obszary liniowe [Tabilo–Munizaga i Barbosa–Canovas, 2004].

Wartości LVR określone w naszym badaniu przedstawiono w Tabeli 15. W tabeli przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania, fermentacji i przechowywania). Struktura badanych napojów fasolowych była stabilna przy niskich odkształceniach. Niefermentowany i fermentowany NF miał wyższe plateau G' niż NFK, które wynosiło 191–250 Pa dla NF i 86–163 Pa dla NFK. W wyniku fermentacji z kulturą starterowych YO–MIX 207 (NF+YO–MIX) i ABY–3 (NF+ABY–3) plateau G' istotnie zwiększyło się w nieprzechowywanych NF (ze 193 do 205–261 Pa) i istotnie obniżyło się we wszystkich fermentowanych (NFK+BS, NFK+YO–MIX, NFK+ABY–3) i nieprzechowywanych NFK (z 163 do 98–138 Pa).

Przemiatanie częstotliwością jest użytecznym parametrem określającym właściwości lepkosprężyste próbki w funkcji czasu. Służy również do oszacowania innych parametrów, takich jak moduł sprężystości (G') i moduł lepkości (G''). G' odzwierciedla sprężystą odpowiedź materiału poprzez pomiar energii zmagazynowanej w próbce podczas procesu ścinania, a G'' odzwierciedla lepką odpowiedź materiału poprzez pomiar energii rozproszonej jako ciepła [Tabilo–Munizaga i Barbosa–Canovas, 2004]. Krzywa przemiatania częstotliwością daje dobry opis reologiczny tego, jak produkt będzie się zachowywał podczas przechowywania i przetwarzania.

Tabela 15. Parametry reologiczne w badaniu oscylacyjnym w temperaturze 20 °C napojów z fasoli białej

Kod próbki ¹	LVR		Frequency Sweep. Values at 1 Hz				log(η^*) = a + b log(Hz) at f < 10 Hz		
	G' Plateau (Pa)	γ (%)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa·s)	tan(δ) [-]	a	b	r ²
Napoje z fasoli białej									
NF	193 ± 25 ^{cde}	2,3 ± 0,4 ^{ab}	203 ± 15 ^{abcd}	24 ± 1 ^{ab}	33 ± 2 ^{abcd}	0,120 ± 0,004 ^a	1,52 ± 0,03 ^{bc}	-0,888 ± 0,004 ^{abc}	1,000 ± 0,000 ^a
NF+BS	183 ± 11 ^{cde}	2,1 ± 0,2 ^{ab}	159 ± 43 ^{abcd}	20 ± 4 ^{ab}	26 ± 6 ^{abcd}	0,126 ± 0,007 ^{abc}	1,42 ± 0,11 ^{abc}	-0,889 ± 0,009 ^{abc}	0,998 ± 0,003 ^a
NF+YO-MIX	205 ± 10 ^{def}	2,8 ± 0,3 ^{ab}	198 ± 16 ^{abcd}	24 ± 2 ^{ab}	32 ± 3 ^{abcd}	0,120 ± 0,001 ^a	1,52 ± 0,03 ^{bc}	-0,897 ± 0,006 ^{bc}	0,998 ± 0,002 ^a
NF+ABY-3	261 ± 20 ^g	2,5 ± 0,3 ^{ab}	229 ± 37 ^{bcd}	26 ± 3 ^{ab}	37 ± 6 ^{bcd}	0,113 ± 0,004 ^a	1,58 ± 0,07 ^d	-0,898 ± 0,005 ^{bc}	0,999 ± 0,002 ^a
NFp	191 ± 16 ^{cde}	2,0 ± 0,1 ^a	193 ± 45 ^{abcd}	24 ± 4 ^{ab}	31 ± 6 ^{abcd}	0,124 ± 0,006 ^{ab}	1,50 ± 0,09 ^{bc}	-0,902 ± 0,009 ^c	0,996 ± 0,004 ^a
NFp+BS	176 ± 5 ^{cd}	2,0 ± 0,1 ^a	159 ± 7 ^{abcd}	20 ± 1 ^{ab}	25 ± 1 ^{abcd}	0,125 ± 0,001 ^{ab}	1,42 ± 0,02 ^{abc}	-0,873 ± 0,004 ^{abc}	0,999 ± 0,000 ^a
NFp+YO-MIX	231 ± 14 ^{efg}	2,3 ± 0,1 ^{ab}	260 ± 32 ^d	29 ± 3 ^b	42 ± 6 ^d	0,112 ± 0,002 ^a	1,63 ± 0,05 ^d	-0,895 ± 0,007 ^{bc}	1,000 ± 0,000 ^a
NFp+ABY-3	250 ± 27 ^{fg}	2,3 ± 0,2 ^{ab}	246 ± 51 ^{cd}	28 ± 5 ^b	39 ± 7 ^{cd}	0,116 ± 0,003 ^a	1,60 ± 0,08 ^d	-0,889 ± 0,001 ^{abc}	1,000 ± 0,000 ^a
NFK	163 ± 17 ^{bcd}	2,9 ± 0,2 ^{ab}	178 ± 25 ^{abcd}	22 ± 5 ^{ab}	29 ± 7 ^{abcd}	0,126 ± 0,005 ^{abc}	1,56 ± 0,09 ^{bc}	-0,889 ± 0,001 ^{bc}	1,000 ± 0,000 ^a
NFK+BS	98 ± 22 ^a	3,0 ± 0,1 ^b	147 ± 37 ^{abc}	19 ± 4 ^{ab}	24 ± 8 ^{abc}	0,137 ± 0,013 ^{bcd}	1,24 ± 0,06 ^a	-0,850 ± 0,005 ^a	0,998 ± 0,001 ^a
NF+YO-MIX	112 ± 18 ^{ab}	2,5 ± 0,1 ^{ab}	113 ± 23 ^a	16 ± 3 ^{ab}	18 ± 4 ^a	0,144 ± 0,004 ^d	1,27 ± 0,09 ^a	-0,875 ± 0,005 ^{abc}	0,997 ± 0,002 ^a
NFK+ABY-3	138 ± 10 ^{abc}	2,7 ± 0,5 ^{ab}	135 ± 27 ^{ab}	19 ± 3 ^{ab}	22 ± 4 ^{ab}	0,143 ± 0,003 ^{cd}	1,34 ± 0,09 ^{ab}	-0,876 ± 0,009 ^{abc}	0,999 ± 0,000 ^a
NFKp	86 ± 3 ^a	2,8 ± 0,5 ^{ab}	108 ± 20 ^a	16 ± 3 ^a	17 ± 3 ^a	0,145 ± 0,005 ^d	1,26 ± 0,07 ^a	-0,851 ± 0,008 ^{ab}	0,998 ± 0,001 ^a

Kod próbki ¹	LVR		Frequency Sweep. Values at 1 Hz				$\log(\eta^*) = a + b \log(\text{Hz})$ at $f < 10 \text{ Hz}$		
	G' Plateau (Pa)	γ (%)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa·s)	tan(δ) [-]	a	b	r ²
NFKp+BS	109 ± 7 ^{ab}	2,7 ± 0,1 ^{ab}	111 ± 7 ^a	16 ± 1 ^a	18 ± 1 ^a	0,142 ± 0,002 ^{cd}	1,28 ± 0,03 ^a	-0,853 ± 0,004 ^{abc}	0,998 ± 0,000 ^a
NFKp+YO-MIX	110 ± 10 ^{ab}	2,5 ± 0,5 ^{ab}	105 ± 24 ^a	15 ± 4 ^a	17 ± 5 ^a	0,149 ± 0,011 ^d	1,25 ± 0,09 ^a	-0,857 ± 0,008 ^{abc}	0,996 ± 0,003 ^a
NFKp+ABY-3	108 ± 10 ^a	2,8 ± 0,2 ^{ab}	108 ± 8 ^a	16 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a	0,145 ± 0,005 ^d	1,27 ± 0,01 ^a	-0,847 ± 0,003 ^a	0,998 ± 0,000 ^a
Statystyka ANOVA. η^2 [-]									
Kiełkowanie	0,792	0,350	0,509	0,425	0,508	0,715	0,714	0,456	ns
Fermentacja	0,328	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Przechowywanie	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

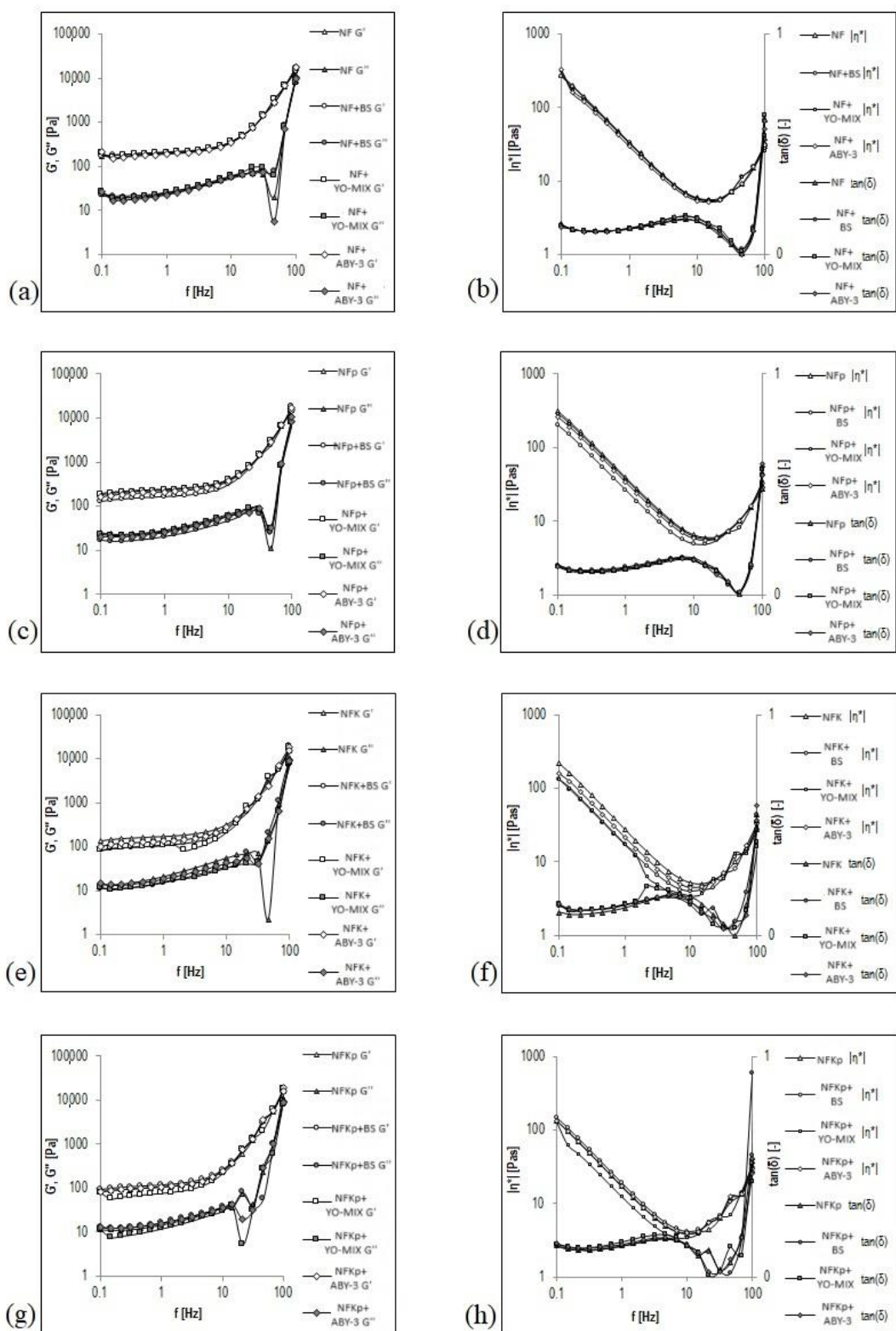
a, b, c, d, e, f, g – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$);

ns – nieistotne statystycznie;

¹ Opis jak w Tabeli 2

Rysunek 7 przedstawia przebiegi widm mechanicznych G' , G'' , $|\eta^*|$ i $\tan\delta$ dla niefermentowanych i fermentowanych NF i NFK przed przechowywaniem (Rysunek 7a, b, e, f) i po 21 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych (Rysunek 7c, d, g, h). Liczby te przedstawiono w podwójnym logarytmicznym układzie współrzędnych i obejmują zakres trzech dekad częstotliwości oscylacji od $f = 0,1$ do 100 Hz ($\omega \approx 0,63$ – 628 rad/s). Widma mechaniczne uzyskano w zakresie liniowej lepkości (1% odkształcenia), w którym pierwotna struktura napojów była nienaruszona. Typ struktury napojów fasolowych został jednoznacznie scharakteryzowany przez widmo mechaniczne przedstawione jako wykres G' , $G'' = f$ (Hz). Zarówno niefermentowane, jak i fermentowane NF i NFK wykazywały charakter cieczy lepkościowych o strukturze zawiesiny koloidalnej. Jako dyspersji o strukturze sieci splątania, szczególną cechą tych cieczy lepkościowych jest występowanie plateau w pośrednim zakresie częstotliwości (do $f \approx 10$ Hz), w którym G' przyjmuje przejściowo stałą wartość, charakterystyczną dla sprężystego stanu usieciowanego. W literaturze dotyczącej reologii jest to nazywane plateau sprężystym [Genovese i wsp., 2007].

W zakresie częstotliwości obejmującym plateau sprężyste krzywa G'' pojawia się poniżej krzywej G' . Natomiast w stosunkowo wyższych zakresach częstotliwości oscylacji (trzecia dekada częstotliwości od $f > 10$ Hz), na prawo od plateau sprężystego, wartości modułów G' i G'' stają się bardziej zależne od częstotliwości oscylacji, a krzywe G' i G'' dążą do przecięcia przy częstotliwości oscylacji ≥ 100 Hz. Ten punkt przecięcia jest uważany za granicę plateau sprężystego, poza którą — tj. gdy krzywa przekroczy zakres jeszcze wyższych częstotliwości oscylacji — krzywa G'' najprawdopodobniej przebiegnie powyżej krzywej G' [Ewoldt i wsp., 2009]. Ten stan wielofazowego układu badanych napojów może odzwierciedlać oddziaływanie między dużymi cząstkami obecnymi w fazie rozproszonej lub dodatkowe procesy rozpraszania energii wynikające z lokalnych ruchów elementów lub fragmentów struktury.



Rysunek 7. Widma mechaniczne badanych napojów z fasoli białej przedstawione graficznie jako zależności funkcyjne G' , G'' , $|\eta^*|$ i $\tan\delta = f(\text{Hz})$.

NF/NFp, NF/NFp+BS, NF/NFp+YO-MIX, NF/NFp+ABY-3, NFK/NFKp, NFK/NFKp+BS, NFK/NFKp+YO-MIX, NFK/NFKp+ABY-3 – Opis jak w Tabeli 2.

W zakresie częstotliwości, w którym pojawiają się sprężyste plateau, małe wartości tangensa kąta straty $\tan(\delta)$ od 0,112 do 0,149 (Rysunek 7b, d, f, h) charakteryzują stosunkowo niski udział właściwości lepkich we właściwościach lepko-sprężystych napojów fasolowych. Właściwości lepkie zaczynają pojawiać się w obszarach o wyższych częstotliwościach oscylacji, co prowadzi do szybkiego zwiększenia zależności $\tan(\delta)$ –częstotliwość. Dominująca rola właściwości lepkich w tworzeniu właściwości lepko-sprężystych badanego układu będzie najprawdopodobniej obserwowana przy $f > 10$ Hz (zakres częstotliwości nieobjęty tymi testami), gdy wartości $\tan(\delta)$ są > 1 .

Lepkość zespolona $|\eta^*|$ maleje wraz ze zwiększaniem częstotliwości w zakresie częstotliwości plateau sprężystego (Rysunek 7b, d, f, h), co oznacza, że badane napoje wykazują właściwości płynów rozrzedzanych ścinaniem. Wartości współczynników a i b linii $|\eta^*| = f(\text{Hz})$ na wykresie logarytmicznym w zakresie częstotliwości plateau sprężystego (Tabela 15) korelują z wartościami k (współczynnikiem spójności) i n (wskaźnikiem przepływu) — parametrami równania Ostwalda–de Waele, opisującymi krzywą przepływu (Tabela 14). Wartości zarówno k , jak i a są istotnie wyższe dla NF ($k \approx 33\text{--}52$, $a \approx 1,42\text{--}1,63$) w porównaniu do NFK ($k \approx 22\text{--}28$, $a \approx 1,24\text{--}1,56$). Podobnie, n , jak i b są istotnie niższe dla NF ($n \approx 0,07\text{--}0,08$, $b \approx -0,087\text{--}0,090$) w porównaniu do NFK ($n \approx 0,07\text{--}0,10$; $b \approx -0,085\text{--}0,089$).

Zauważono istotny wpływ kiełkowania na widma mechaniczne G' , G'' , $|\eta^*|$ i $\tan\delta$ dla 1 Hz w plateau sprężystym (Tabela 15). Wartości G' , G'' i $|\eta^*|$ były istotnie wyższe dla niefermentowanych i fermentowanych NF ($G' \approx 159\text{--}246$ Pa, $G'' \approx 20\text{--}29$ Pa, $|\eta^*| \approx 25\text{--}39$ Pa·s) w porównaniu do NFK ($G' \approx 105\text{--}178$ Pa, $G'' \approx 15\text{--}22$ Pa, $|\eta^*| \approx 17\text{--}29$ Pa·s). Na to zjawisko może mieć wpływ rozkład wielkości cząstek badanych próbek. NF, który miał niższą średnią średnicę cząstek $d_{4,3}$ (Tabela 14), wykazywał istotnie wyższe moduły G' i G'' oraz wyższą lepkość zespoloną $|\eta^*|$ w porównaniu do NFK.

W odniesieniu do właściwości reologicznych, niefermentowane i fermentowane NF i NFK można scharakteryzować jako zawiesiny koloidalne o charakterze płynu lepko-sprężystego z elastycznym plateau, rozrzedzane ścinaniem w przepływie lepkim. Doniesienia innych badaczy wykazały podobny charakter reologiczny dla innych ciekłych produktów roślinnych [Tizani i Vodovotz, 2005; Wan i wsp., 2019] i dyspersji, takich jak węgiel roślinny i węglan wapnia zawieszzone w mieszaninach woda–glicerol

[Domian i wsp., 2020], zawiesiny gluteniny [Xu i wsp., 2007] i zawiesiny celulozy [Jia i wsp., 2014].

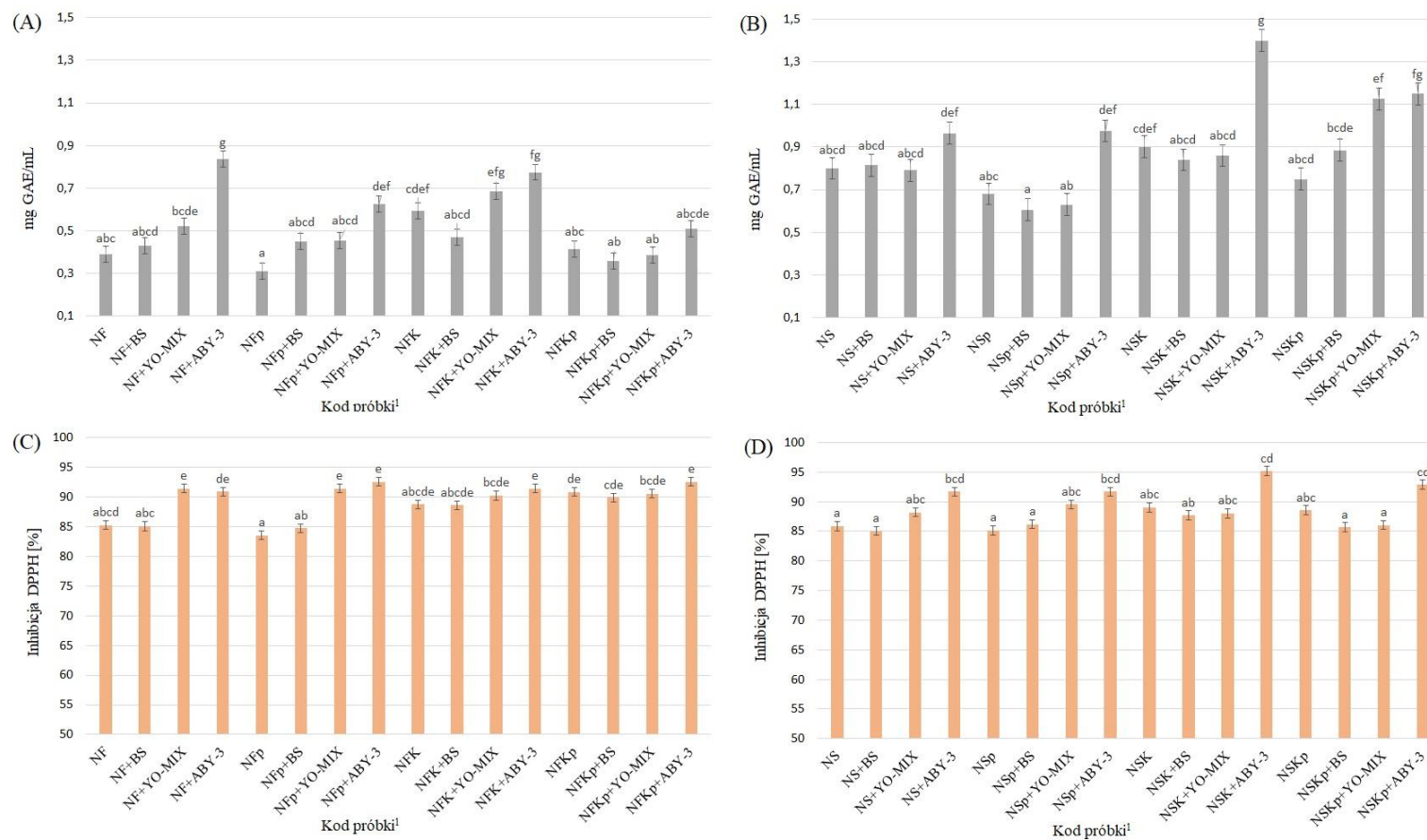
6.4. Charakterystyka właściwości biochemicznych

Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej w wariantach bazowych, z nasion skielkowanych i po procesie fermentacji przebadano pod względem charakterystyki właściwości biochemicznych. Wyniki analiz zawartości fenoli i zdolności do inhibicji rodnika DPPH napojów przedstawiono w trzecim artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P., Bryś J., Ziarno M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, 13, 16976.** Wyniki analiz zawartości izoflawonów i profilu lotnych związków napojów przedstawiono w czwartym artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P.*, Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M. (2024). Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination. *LWT – Food Science and Technology*, 199, 116140.**

6.4.1. Analiza zawartości fenoli i zdolności do inhibicji rodnika DPPH

Wolne rodniki, reaktywne formy tlenu i reaktywne formy azotu są generowane przez nasz organizm poprzez układy endogenne, w wyniku narażenia na różnego rodzaju czynniki fizykochemiczne lub biologiczne [Lobo i wsp., 2010]. Zastosowanie wybranych technik przetwarzania, w tym kiełkowania i fermentacji, może zwiększyć zawartość fenoli i właściwości antyoksydacyjne roślin strączkowych, przede wszystkim w wyniku zmniejszenia zawartości składników antyodżywczych i wytwarzania nowych składników o właściwościach antyoksydacyjnych [Vaz Patto i wsp., 2015].

Rysunek 8 przedstawia całkowitą zawartość fenoli i zdolność do inhibicji rodnika DPPH w analizowanych napojach. Wyniki wskazują, że fermentacja, kiełkowanie i przechowywanie w czasie 21 dni w warunkach chłodniczych mają istotny wpływ na analizowane parametry. Całkowita zawartość fenoli bazowych napojów z soczewicy była dwukrotnie wyższa niż bazowych napojów z fasoli, co potwierdza wyniki innych autorów, wskazujące, że soczewica naturalnie zawiera wyższy poziom związków fenolowych niż fasola [Djordjevic i wsp., 2011; Zhao i wsp., 2014].



Rysunek 8. Całkowita zawartość fenoli w napojach z fasoli (A) i soczewicy (B) oraz zdolność do inhibicji rodnika DPPH przez napoje z fasoli (C) i soczewicy (D)

a, b, c, d, e, f, g – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ¹ Opis jak w Tabeli 2

Fermentacja z trzema różnymi kulturami starterowymi była głównym czynnikiem wpływającym na zawartość fenoli w analizowanych napojach ($\eta^2 = 0,652$ dla NF i $0,651$ dla NS). Fermentacja z kulturą starterową ABY-3 (NS/NSK/NF/NFK+ABY-3) w największym stopniu wpływała na zwiększenie tego parametru. Przechowywanie w warunkach chłodniczych istotnie zmniejszyło całkowitą zawartość fenoli w napoju z fasoli ($\eta^2 = 0,505$), jednak nie wpłynął istotnie na ten parametr dla napoju z soczewicy, co wskazuje na wyższą ich stabilność w tej matrycy.

Wszystkie analizowane napoje wykazywały stosunkowo wysoką zdolność do inhibicji rodnika DPPH (> 83%) (Rysunek 8). Bazowe napoje z fasoli i soczewicy wykazywały podobną zdolność wychwytywania rodników DPPH (~85%). Fermentacja z trzema różnymi kulturami startowymi była głównym czynnikiem wpływającym na analizowany parametr ($\eta^2 = 0,601$ i $0,752$, odpowiednio dla NF i NS). Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych dla zawartości fenoli, fermentacja z kulturą startową ABY-3 była najskuteczniejszą metodą zwiększenia zdolności do inhibicji rodnika DPPH. Kiełkowanie istotnie wpłynęło na uzyskane wyniki tylko dla NF ($\eta^2 = 0,285$).

Przechowywanie w warunkach chłodniczych nie miało istotnego wpływu na zdolność do inhibicji rodnika DPPH, w przeciwieństwie do zawartości fenoli. Może to wynikać z obecności mikroorganizmów i ich aktywności metabolicznej, która występuje również podczas przechowywania. LAB i bifidobakterie mogą wytwarzać bioaktywne peptydy, które zwiększają zdolność antyoksydacyjną produktu [Rahmawati i Suntornsuk, 2016; Amiri i wsp., 2021]. Bioaktywne peptydy to krótkie sekwencje aminokwasów uwalniane z białek przez proteolizę, które są generowane przez enzymy wytwarzane przez mikroorganizmy [Chaves-López i wsp., 2014]. Heydari i wsp. [2023] badali wpływ szczepów probiotycznych i komercyjnych, w tym *B. lactis*, *L. acidophilus* i *L. casei*, na właściwości funkcjonalne ekstraktu peptydowego. Badane mikroorganizmy wykazywały aktywność proteolityczną w trakcie 28-dniowego okresu przechowywania w niskiej temperaturze, co skutkowało istotną produkcją peptydów o działaniu antyoksydacyjnym, antymutagennym i antybakteryjnym.

W niniejszym badaniu analizowane napoje z fasoli i soczewicy wykazywały właściwości antyoksydacyjne wynikające z zawartości fenoli i zdolności do inhibicji rodnika DPPH. W porównaniu z zawartością fenoli, zdolność do inhibicji DPPH wskazywała większą stabilność po zastosowaniu fermentacji, kiełkowania i przechowywania. Wyniki te wskazują, że nie tylko związki fenolowe są odpowiedzialne

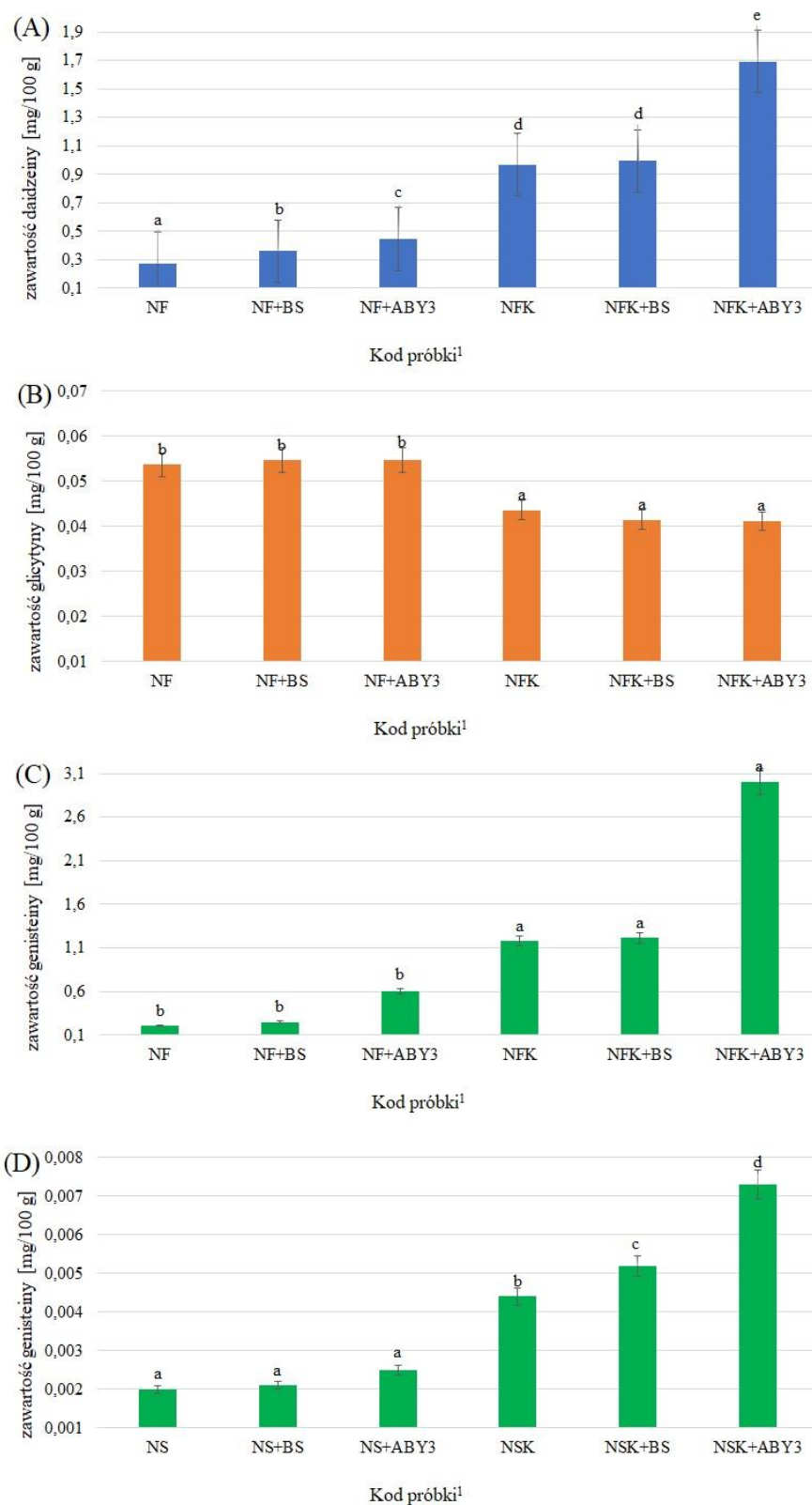
za zdolność inhibicji rodnika DPPH, ale także inne składniki, takie jak askorbinian, tokoferole czy karotenoidy [Kebede i Admassu, 2019].

Fermentacja była głównym czynnikiem zwiększającym badane właściwości antyoksydacyjne. Fermentacja z wykorzystaniem kultury ABY-3 wykazała największą zdolność do zwiększenia właściwości antyoksydacyjnych badanych napojów. Kultura ta zawierała największą różnorodność mikroorganizmów (*L. acidophilus* La-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *S. thermophilus* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) spośród analizowanych kultur startowych. Większa różnorodność mikroorganizmów może przedstawiać szerszy zestaw enzymów, co może poprawiać dostępność składników antyoksydacyjnych, np. poprzez rozkład składników antyodżywczych [Sakandar i wsp., 2021]. Ponadto kultura startowa ABY-3 zawiera szczep *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, który jest najlepiej udokumentowanym na świecie szczepem probiotycznym z rodzaju *Bifidobacterium* [Jungersen i wsp., 2014]. Te mikroorganizmy wytwarzają znaczną ilość bioaktywnych peptydów, które mogą również wykazywać właściwości antyoksydacyjne (np. wiążące żelazo białko antyoksydacyjne podobne do ferrytyny) [Gilad i wsp., 2011]. Poprzednie badania wskazują również, że szczep ten ma wyższą aktywność antyoksydacyjną niż LAB [Okoń i wsp., 2017; Bujna i wsp., 2018].

Wpływ kiełkowania na badane właściwości antyoksydacyjne okazał się zależny od rodzaju analizowanego napoju. Badanie to stanowi nowatorskie podejście, ponieważ dotychczasowe analizy koncentrowały się na wpływie kiełkowania na surowe nasiona roślin strączkowych. Otrzymane wyniki były zróżnicowane w zależności od rodzaju surowca [Chon, 2013; MinYing i wsp., 2013; Khang i wsp., 2016]. W związku z tym można stwierdzić, że połączenie kiełkowania i fermentacji jest najefektywniejszą strategią zwiększenia właściwości antyoksydacyjnych napojów z fasoli i soczewicy.

6.4.3. Analiza zawartości izoflawonów

Izoflawony są to bioaktywne związki fitoestrogenowe, występujące obficie w roślinach strączkowych, szczególnie w soi. Wykazują one łagodne działanie estrogenne, które wiąże się z wieloma korzyściami zdrowotnymi. Regularne spożywanie produktów bogatych w izoflawony może przyczynić się do złagodzenia objawów menopauzy, zmniejszenia ryzyka zachorowania na raka piersi i prostaty, a także zapobiec rozwojowi chorób układu krążenia, osteoporozy i cukrzycy typu 2 [Zaheer i Akhtar, 2017]. Zawartość wybranych izoflawonów w badanych napojach z fasoli i soczewicy przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Zawartość izoflawonów w badanych napojach: daidzeiny (A), glicyiny (B) i genisteiny (C) w napojach z fasoli oraz genisteiny (D) w napojach z soczewicy.

a, b, c, d, e – średnie wartości w kolumnach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ¹ Opis jak w Tabeli 2.

W niniejszym badaniu wszystkie trzy analizowane aglikony izoflawonów wykryto w napoju fasolowym, a daidzeina i genisteina były obecne w największych ilościach (Rysunek 9). W napoju z soczewicy wykryto obecność jedynie genisteiny, w ponad 100 razy niższym stężeniu w porównaniu do napoju fasolowego. Ograniczoną zawartość izoflawonów w suchych nasionach soczewicy zaobserwowali wcześniej też inni badacze [Budryn i wsp., 2019].

Zastosowanie kiełkowania i fermentacji istotnie wpłynęło na zwiększenie zawartości daidzeiny i genisteiny zarówno w NF, jak i NS. W przypadku glicytyny w NF, zastosowanie kiełkowania doprowadziło do istotnego zmniejszenia jej zawartości. Co ciekawe, fermentacja z kulturą starterową ABY-3 (NF/NS+ABY-3, NFK/NSK+ABY-3) wpłynęła na istotne zwiększenie zawartości daidzeiny i genisteiny w badanych napojach w przeciwieństwie do kultury Beaugel Soja 1 (NF/NS+BS, NFK/NSK+BS). Większa różnorodność mikrobiologiczna kultury ABY-3, wynikająca z obecności bifidobakterii, potencjalnie odpowiada za tę różnicę w porównaniu do kultury Beaugel Soja 1.

Do tej pory wpływ kiełkowania i fermentacji na zawartość izoflawonów w napojach roślinnych nie został szeroko zbadany, chociaż podobne badania zostały wykonane z wykorzystaniem suchych nasion roślin strączkowych. Poprzednie badania różnych autorów wskazywały na zwiększenie zawartości aglikonów i glikozydów daidzeiny i genisteiny w skiełkowanych nasionach soi [Zhu i wsp., 2005; Yoshiara i wsp., 2018]. Sugeruje się, że zwiększenie zawartości tych składników podczas kiełkowania jest spowodowany szlakami metabolicznymi chalkonu naryngeny i izolikwirytygeniny, które są prekursorami izoflawonoidów [Zhu i in., 2005]. Niniejsze badanie wykazało istotne zmniejszenie zawartości glicytyny po zastosowaniu procesu kiełkowania. Zjawisko to może być związane z działaniem β -glukozydazy, enzymu katalizującego hydrolizę izoflawonów. To działanie enzymatyczne może zależeć od stężenia enzymu, temperatury i pH podłoża [Yoshiara i wsp., 2018]. Zwiększenie zawartości izoflawonów po fermentacji, który również zaobserwowano w niniejszym badaniu, można przypisać aktywności glikozydaz wytwarzanych przez mikroorganizmy z kultur starterowych. Enzymy te katalizują hydrolizę β -glukozydów izoflawonów, co prowadzi do wyższego stężenia ich odpowiednich bioaktywnych aglikonów [Budryn i wsp., 2019].

6.4.3. Profilu lotnych związków

Analiza smaku stanowi integralną część procesów rozwoju żywności, umożliwiającą dogłębne zrozumienie i optymalizację jej właściwości. Dzięki zastosowaniu metod sensorycznych i instrumentalnych możliwe jest precyzyjne zidentyfikowanie składników, w tym związków lotnych, odpowiedzialnych za poszczególne atrybuty produktu. Ocena smaku pozwala również na określenie okresu przydatności do spożycia oraz utrzymanie wysokiej jakości żywności [Chambers i Koppel, 2013]. Jednak obecność tych związków w żywności może zostać zmieniona ze względu na zastosowane procesy technologiczne.

W profilu lotnych związków suchych nasion roślin strączkowych aldehydy występują w największym stężeniu, a następnie estry, alkany, alkohole, ketony, laktony, fenole, fenony, alkeny i węglowodory [Rajhi i wsp., 2021]. Podobne wyniki zaobserwowano w badanych napojach z fasoli i soczewicy, gdzie dominowały aldehydy, a następnie alkohole, ketony, terpeny, estry, związki siarkoorganiczne, kwasy i kwasy tłuszczowe. Zawartość poszczególnych związków lotnych w badanych napojach z fasoli i soczewicy przedstawiono odpowiednio w Tabeli 16 i Tabeli 17. W tabelach przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe oraz statystykę ANOVA (współczynnik η^2 wskazujący wpływ kiełkowania i fermentacji).

W bazowych napojach z fasoli (NF) najwyższe stężenia wśród obecnych związków lotnych zaobserwowano dla furan-3-ylometanolu, 2-etyloheksan-1-olu, hept-1-en-3-onu, pentan-1-olu i kwasu 2-metylopropanowego. W bazowych napojach z soczewicy (NS) najwyższe stężenia zaobserwowano dla linalolu, estrów (butanianu butylu i mrówczanianu heksylu), (2E,4E)-nona-2,4-dienalu, i kwasu 2-metylopropanowego. Różnice te wynikają z unikalnych cech surowców i obecności związków specyficznych dla niektórych gatunków roślin strączkowych [Khrisanapant i wsp., 2019].

Tabela 16. Zawartość lotnych związków [mg/kg] w napojach z fasoli białej

Związek lotny	Kod próbki ¹						Statystyka ANOVA. η ² [-]	
	NF	NF+BS	NF+ABY3	NFK	NFK+BS	NFK+ABY3	Kielkowanie	Fermentacja
Alkohole								
butan-1-ol	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0005 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0110 ± 0,0012 ^b	0,0143 ± 0,0003 ^c	0,0134 ± 0,0010 ^c	ns	0,983
furan-3-ylometanol	0,0102 ± 0,0009 ^c	0,0079 ± 0,0007 ^b	0,0061 ± 0,0004 ^a	0,0060 ± 0,0003 ^a	0,0083 ± 0,0003 ^b	0,0062 ± 0,0002 ^a	ns	0,411
2-etyloheksan-1-ol	0,0100 ± 0,0004 ^e	0,0066 ± 0,0005 ^d	0,0011 ± 0,0001 ^a	0,0033 ± 0,0001 ^c	0,0014 ± 0,0002 ^a	0,0024 ± 0,0002 ^b	ns	0,595
pentan-1-ol	0,0051 ± 0,0005 ^a	0,0055 ± 0,0001 ^a	0,0059 ± 0,0005 ^{ab}	0,0076 ± 0,0005 ^c	0,0093 ± 0,0006 ^d	0,0153 ± 0,0018 ^e	0,806	0,663
3-metylobutan-1-ol	0,0008 ± 0,0000 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0067 ± 0,0006 ^b	0,0204 ± 0,0012 ^d	0,0104 ± 0,0004 ^c	0,0317 ± 0,0017 ^e	0,893	0,769
etanol	0,0022 ± 0,0002 ^a	0,0014 ± 0,0001 ^a	0,0018 ± 0,0001 ^a	0,0124 ± 0,0008 ^{bc}	0,0135 ± 0,0014 ^c	0,0115 ± 0,0007 ^b	0,978	ns
Związki siarkoorganiczne								
disiarczek dimetylu	0,0017 ± 0,0001 ^a	0,0153 ± 0,0010 ^c	0,0093 ± 0,0001 ^b	0,0022 ± 0,0001 ^a	0,0074 ± 0,0003 ^b	0,0088 ± 0,0004 ^b	ns	0,736
trisiarczek dimetylu	nw	0,0177 ± 0,0011 ^d	0,0122 ± 0,0009 ^c	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0012 ± 0,0001 ^a	0,0106 ± 0,0004 ^b	ns	0,630
Terpeny								
limonen	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0006 ± 0,0001 ^b	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0008 ± 0,0000 ^b	0,0042 ± 0,0004 ^d	0,0014 ± 0,0000 ^c	0,689	0,653
izoeugenol	0,0008 ± 0,0000 ^c	nw	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^b	0,0013 ± 0,0000 ^d	ns	ns
linalol	0,0001 ± 0,0000 ^a	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0009 ± 0,0001 ^b	0,0030 ± 0,0002 ^c	0,0040 ± 0,0001 ^d	0,792	0,494
Estry								
butanian butylu	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0009 ± 0,0001 ^a	0,0044 ± 0,0004 ^b	0,0337 ± 0,0023 ^d	0,0174 ± 0,0008 ^c	0,0205 ± 0,0013 ^c	0,876	ns
mrówczan heksylu	0,0033 ± 0,0003 ^a	0,0112 ± 0,0010 ^b	0,0047 ± 0,0002 ^a	0,0033 ± 0,0003 ^a	0,0165 ± 0,0015 ^c	0,0216 ± 0,0019 ^d	0,512	0,640
Kwasy tłuszczowe								
kwas 2-metyloheksanowy	0,0019 ± 0,0001 ^a	0,0045 ± 0,0001 ^b	0,0119 ± 0,0005 ^c	0,0038 ± 0,0002 ^b	0,0117 ± 0,0008 ^c	0,0192 ± 0,0003 ^d	0,817	0,942
Ketony								
2-acetylo-tiazol	0,0001 ± 0,0000 ^a	nw	0,0007 ± 0,0000 ^b	0,0031 ± 0,0002 ^d	0,0022 ± 0,0001 ^c	0,0019 ± 0,0001 ^c	0,882	ns
acetoina	nw	0,0413 ± 0,0028 ^b	0,0562 ± 0,0006 ^c	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0718 ± 0,0012 ^d	0,0797 ± 0,0071 ^d	ns	0,947
hept-1-en-3-on	0,0050 ± 0,0003 ^c	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0039 ± 0,0001 ^b	0,0081 ± 0,0005 ^e	nw	0,0059 ± 0,0002 ^d	0,587	0,938
pentano-2,3-dion	0,0006 ± 0,0001 ^a	0,0734 ± 0,0026 ^e	0,0392 ± 0,0007 ^c	0,0005 ± 0,0000 ^a	0,0600 ± 0,0051 ^d	0,0103 ± 0,0005 ^b	0,565	0,951
diacetyl	0,0011 ± 0,0001 ^a	0,0698 ± 0,0046 ^d	0,0471 ± 0,0025 ^{bc}	0,0019 ± 0,0001 ^a	0,0559 ± 0,0055 ^c	0,0438 ± 0,0030 ^b	ns	0,975
Aldehydy								
(E)-okt-2-enal	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0020 ± 0,0001 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^b	ns	ns
nonanal	0,0030 ± 0,0001 ^b	0,0004 ± 0,0000 ^a	0,0046 ± 0,0005 ^{bc}	0,0058 ± 0,0002 ^{cd}	0,0077 ± 0,0005 ^d	0,0219 ± 0,0016 ^e	0,687	0,659
(Z)-hept-2-enal	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0004 ± 0,0000 ^a	0,0023 ± 0,0002 ^d	0,0010 ± 0,0001 ^b	0,0019 ± 0,0002 ^c	0,0037 ± 0,0002 ^e	0,922	0,972
oktanal	0,0014 ± 0,0001 ^a	0,0057 ± 0,0003 ^c	0,0030 ± 0,0002 ^b	0,0030 ± 0,0002 ^b	0,0068 ± 0,0004 ^d	0,0107 ± 0,0004 ^e	0,559	0,649

Związek lotny	Kod próbki ¹						Statystyka ANOVA. η^2 [-]	
	NF	NF+BS	NF+ABY3	NFK	NFK+BS	NFK+ABY3	Kielkowanie	Fermentacja
(2E,4E)-nona-2,4-dienal	0,0004 ± 0,0000 ^a	0,0009 ± 0,0000 ^a	0,0049 ± 0,0003 ^b	0,0357 ± 0,0013 ^e	0,0177 ± 0,0006 ^c	0,0206 ± 0,0021 ^d	0,859	ns
heksanal	0,0034 ± 0,0003 ^a	0,0026 ± 0,0000 ^a	0,0263 ± 0,0026 ^c	0,0080 ± 0,0005 ^b	0,0051 ± 0,0003 ^{ab}	0,0253 ± 0,0011 ^c	ns	0,977
pentanal	0,0009 ± 0,0001 ^a	0,0772 ± 0,0054 ^c	0,0051 ± 0,0003 ^b	0,0018 ± 0,0002 ^a	0,0054 ± 0,0006 ^b	0,0046 ± 0,0002 ^b	ns	0,528
2-metylobutanal	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^a	0,0003 ± 0,0000 ^a	0,0027 ± 0,0002 ^c	0,0042 ± 0,0003 ^d	0,0015 ± 0,0000 ^b	0,835	0,488
Kwasy								
kwaskwas 2-metylopropionowy	0,0268 ± 0,0015 ^d	0,0116 ± 0,0001 ^c	0,0046 ± 0,0002 ^a	0,0267 ± 0,0006 ^d	0,0065 ± 0,0002 ^{ab}	0,0074 ± 0,0004 ^b	ns	0,966
kwaskwas octowy	0,0170 ± 0,0015 ^a	0,0382 ± 0,0024 ^{ab}	0,2816 ± 0,0262 ^c	0,0363 ± 0,0010 ^{ab}	0,0751 ± 0,0028 ^b	0,4132 ± 0,0337 ^d	ns	0,962

a, b, c, d, e – średnie wartości w wierszach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$)

ns – nieistotne statystycznie; nw – nie wykryto

¹ Opis jak w Tabeli 2

Tabela 17. Zawartość lotnych związków [mg/kg] w napojach z soczewicy brązowej

Związek lotny	Kod próbki ¹						Statystyka ANOVA. η ² [-]	
	NF	NF+BS	NF+ABY3	NFK	NFK+BS	NFK+ABY3	Kielkowanie	Fermentacja
Alkohole								
butan-1-ol	nw	nw	nw	nw	nw	nw	–	–
furan-3-ylometanol	0,0035 ± 0,0001 ^{ab}	0,0056 ± 0,0004 ^{de}	0,0047 ± 0,0003 ^{cd}	0,0033 ± 0,0002 ^a	0,0043 ± 0,0001 ^{bc}	0,0063 ± 0,0005 ^e	ns	0,667
2-etyloheksan-1-ol	0,0021 ± 0,0001 ^a	0,0106 ± 0,0006 ^d	0,0026 ± 0,0001 ^{ab}	0,0119 ± 0,0002 ^e	0,0031 ± 0,0001 ^b	0,0060 ± 0,0005 ^c	ns	ns
pentan-1-ol	0,0015 ± 0,0001 ^a	0,0034 ± 0,0002 ^c	0,0082 ± 0,0006 ^e	0,0006 ± 0,0000 ^a	0,0024 ± 0,0002 ^b	0,0065 ± 0,0005 ^d	0,776	0,986
3-metylobutan-1-ol	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0041 ± 0,0004 ^b	0,0060 ± 0,0004 ^c	0,0116 ± 0,0008 ^d	0,0056 ± 0,0005 ^c	0,0221 ± 0,0007 ^e	0,715	0,542
etanol	nw	0,0031 ± 0,0002 ^b	0,0019 ± 0,0001 ^a	0,0133 ± 0,0011 ^c	0,0116 ± 0,0007 ^c	0,0268 ± 0,0011 ^d	0,831	ns
Związki siarkoorganiczne								
disiarczek dimetylu	nw	nw	nw	nw	nw	nw	–	–
trisiarczek dimetylu	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0069 ± 0,0001 ^c	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0019 ± 0,0001 ^b	ns	0,757
Terpeny								
limonen	0,0027 ± 0,0002 ^{bc}	0,0030 ± 0,0002 ^c	0,0217 ± 0,0021 ^d	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0005 ± 0,0001 ^b	0,0005 ± 0,0001 ^b	0,485	0,477
izoeugenol	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0009 ± 0,0001 ^b	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0045 ± 0,0000 ^c	ns	ns
linalol	0,0070 ± 0,0006 ^{ab}	0,0144 ± 0,0011 ^d	0,0248 ± 0,0024 ^e	0,0052 ± 0,0003 ^a	0,0045 ± 0,0005 ^a	0,0085 ± 0,0001 ^c	0,688	0,665
Estry								
butanian butylu	0,0062 ± 0,0006 ^c	nw	0,0018 ± 0,0000 ^a	0,0168 ± 0,0016 ^d	0,0036 ± 0,0003 ^b	0,0074 ± 0,0008 ^c	0,807	0,865
mrówczan heksylu	0,0056 ± 0,0004 ^b	0,0160 ± 0,0005 ^c	0,0195 ± 0,0016 ^d	0,0026 ± 0,0002 ^a	0,0047 ± 0,0004 ^{ab}	0,0211 ± 0,0018 ^d	0,366	0,851
Kwasy tłuszczowe								
kwas 2-metyloheksanowy	0,0019 ± 0,0001 ^a	0,0040 ± 0,0002 ^c	0,0063 ± 0,0003 ^d	0,0031 ± 0,0003 ^b	0,0064 ± 0,0004 ^d	0,0163 ± 0,0003 ^e	0,570	0,779
Ketony								
2-acetylo-tiazol	0,0015 ± 0,0001 ^a	0,0018 ± 0,0000 ^a	0,0015 ± 0,0000 ^a	0,0040 ± 0,0004 ^c	0,0029 ± 0,0002 ^b	0,0058 ± 0,0001 ^d	0,795	ns
acetoina	nw	0,0327 ± 0,0022 ^a	0,0434 ± 0,0025 ^b	0,0402 ± 0,0034 ^b	0,0287 ± 0,0029 ^a	0,0528 ± 0,0033 ^c	ns	0,596
hept-1-en-3-on	0,0033 ± 0,0002 ^b	0,0061 ± 0,0004 ^c	0,0094 ± 0,0008 ^d	0,0011 ± 0,0001 ^a	0,0018 ± 0,0001 ^a	0,0068 ± 0,0002 ^c	0,886	0,954
pentano-2,3-dion	0,0002 ± 0,0000 ^a	0,0547 ± 0,0038 ^c	0,0314 ± 0,0021 ^b	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0032 ± 0,0002 ^a	0,0034 ± 0,0002 ^a	0,609	0,554
diacetyl	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0594 ± 0,0056 ^e	0,0447 ± 0,0045 ^d	0,0008 ± 0,0001 ^a	0,0077 ± 0,0000 ^b	0,0288 ± 0,0016 ^c	ns	0,682
Aldehydy								
(E)-okt-2-enal	nw	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0027 ± 0,0002 ^b	0,0001 ± 0,0000 ^a	0,0021 ± 0,0001 ^b	0,0069 ± 0,0005 ^c	0,600	0,846
nonanal	0,0011 ± 0,0000 ^{ab}	0,0064 ± 0,0005 ^c	0,0052 ± 0,0003 ^c	nw	0,0039 ± 0,0001 ^{bc}	0,0312 ± 0,0030 ^d	ns	0,558
(Z)-hept-2-enal	0,0016 ± 0,0001 ^a	0,0051 ± 0,0002 ^b	0,0091 ± 0,0004 ^c	nw	0,0074 ± 0,0003 ^c	0,0161 ± 0,0015 ^d	0,329	0,875
oktanal	0,0007 ± 0,0000 ^a	0,0016 ± 0,0001 ^a	0,0077 ± 0,0004 ^b	0,0012 ± 0,0001 ^a	0,0060 ± 0,0002 ^b	0,0194 ± 0,0020 ^c	0,569	0,833

Związek lotny	Kod próbki ¹						Statystyka ANOVA. η^2 [-]	
	NF	NF+BS	NF+ABY3	NFK	NFK+BS	NFK+ABY3	Kielkowanie	Fermentacja
(2E,4E)-nona-2,4-dienal	0,0065 ± 0,0001 ^c	0,0012 ± 0,0001 ^a	0,0033 ± 0,0002 ^b	0,0170 ± 0,0013 ^d	0,0031 ± 0,0002 ^b	0,0061 ± 0,0005 ^c	0,617	0,807
heksanal	0,0007 ± 0,0001 ^a	0,0042 ± 0,0003 ^c	0,0059 ± 0,0005 ^d	0,0008 ± 0,0000 ^a	0,0027 ± 0,0001 ^b	0,0190 ± 0,0009 ^e	ns	0,701
pentanal	nw	0,0072 ± 0,0001 ^d	0,0050 ± 0,0004 ^c	0,0003 ± 0,0000 ^a	0,0020 ± 0,0001 ^b	0,0068 ± 0,0006 ^d	ns	0,724
2-metylobutanal	0,0007 ± 0,0000 ^a	0,0012 ± 0,0001 ^b	0,0012 ± 0,0001 ^b	0,0019 ± 0,0001 ^c	0,0029 ± 0,0002 ^d	0,0050 ± 0,0002 ^e	0,777	0,607
Kwasy								
kwaskwas 2-metylopropanowy	0,0113 ± 0,0006 ^a	0,0243 ± 0,0014 ^c	0,0113 ± 0,0003 ^a	0,0149 ± 0,0010 ^b	0,0103 ± 0,0008 ^a	0,0114 ± 0,0013 ^a	ns	ns
kwaskwas octowy	0,0010 ± 0,0000 ^a	0,0314 ± 0,0017 ^b	0,1225 ± 0,0064 ^c	0,0292 ± 0,0014 ^b	0,0177 ± 0,0008 ^{ab}	0,2232 ± 0,0179 ^d	ns	0,897

a, b, c, d, e – średnie wartości w wierszach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$)

ns – nieistotne statystycznie; nw – nie wykryto

¹ Opis jak w Tabeli 2

Największy wpływ na otrzymane wyniki miało zastosowanie procesu fermentacji, ale wpływ ten różnił się w zależności od rodzaju lotnych związków. W grupie aldehydów zastosowanie fermentacji istotnie zwiększyło ich zawartość w większości testowanych NF i NS. Zjawisko to może być wynikiem procesów utleniania lipidów i/lub reakcji chemicznych katalizowanych przez aktywne bakterie fermentacyjne. Aldehydy takie jak heksanal, (Z)-hept-2-enal i nonanal są prawdopodobnie powiązane z procesami utleniania lipidów, generowanymi przez szlak lipooksygenazy. Ta ścieżka obejmuje konwersję wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do aldehydów i alkoholi poprzez sekwencyjne działanie lipooksygenazy, hydroperoksydazy liazy i dehydrogenazy alkoholowej [Fu i wsp., 2009; Lorn i wsp., 2021]. Co więcej, kultury starterowe mogą indukować biosyntezę oktantu w trakcie fermentacji alkoholowej, inicjowanej dekarboksylacją pirogronianu. Powstające w tym procesie etanol i kwas octowy są produktami działania dehydrogenazy alkoholowej oraz dehydrogenazy aldehydowej. W niniejszym badaniu stwierdzono podwyższoną aktywność tych związków w większości analizowanych próbek [Park i Kim, 2021].

Fermentacja również istotnie zwiększyła zawartość wybranych alkoholi, związków siarki, estrów, kwasów tłuszczowych i ketonów w badanych próbkach (Tabela 16 i Tabela 17). Te związki lotne mogą powstawać podczas fermentacji poprzez degradację aminokwasów na drodze szlaku Ehrlicha i degradacji kwasów tłuszczowych [Hazelwood i wsp., 2008]. Obecność aldehydów w profilu lotnych związków jest często wiązana z zielonymi lub trawiastymi aromatami w owocach i warzywach, a także z nutami tłustymi i cytrusowymi [Chambers o Koppel, 2013]. W fermentowanej żywności estry powszechnie nadają owocowy i kremowy aromat, podczas gdy kwasy przyczyniają się do kwaśnego smaku. Wysokie stężenia ketonów jest często wiązane z kremowym, owocowym i ostrym smakiem [Zhang i in., 2023]. Zastosowanie odpowiednich procesów technologicznych może istotnie zmieniać cechy sensoryczne produktu, na które wpływają zmiany w profilu lotnych związków.

Zastosowanie procesu kiełkowania było kolejnym czynnikiem istotnie wpływającym na zawartość związków lotnych w badanych napojach (Tabela 16 i Tabela 17). Zastosowanie tego procesu spowodowało istotne zwiększenie zawartości dwóch badanych alkoholi, tj. 3-metylobutan-1-olu (ponad 25 razy dla NFK i 116 razy dla NSK) i etanolu (ponad 5 razy dla NFK i 130 razy dla NSK) w porównaniu do nieskiełkowanych NF i NS. Zaobserwowano również istotne zwiększenie zawartości estrów (butanianu butylu i mrówczanu heksylu) oraz kwasu tłuszczowego (kwas 2-

metyloheksanowy) w większości badanych próbek. Proces kiełkowania nasion przyczynił się również do zwiększenia zawartości wybranych aldehydów i ketonów, szczególnie w przypadku 2-acetylo-tiazolu, (2E,4E)-nona-2,4-dienalu, oktanalu i 2-metylobutanalu.

Jednym z głównych wyzwań dotyczących spożycia produktów strączkowych jest obecność zapachów i posmaków strączkowych, które konsumenci zazwyczaj opisują jako fasolowe, zielone, trawiaste, ziemiste, zjełczałe i błotniste [Bott i Chambers, 2006]. Kluczowe związki odpowiedzialne za aromaty strączkowe obejmują heksan-1-ol, heksanal, (2E,4E)-nona-2,4-dienal, pentylo-2-furan, 3-metylobutan-1-ol, (2E,4E)-deka-2,4-dienal, pentan-1-ol, 1-okten-3-ol, hepta-2,4-dienal i 1-okten-3-on [Suwonsichon i wsp., 2004; Xu i wsp., 2020]. W niniejszym badaniu, spośród wyżej wymienionych związków, zidentyfikowano heksanal, (2E,4E)-nona-2,4-dienal i pentan-1-ol. W wyniku kiełkowania nastąpiło istotne zwiększenie zawartości tych związków w NF. W NS zawartość (2E,4E)-nona-2,4-dienalu istotnie zwiększyła się, podczas gdy zawartość heksanal i pentan-1-olu nie zmieniła się istotnie. Zwiększenie poziomu tych związków może być spowodowane degradacją lipidów zachodzącą podczas kiełkowania z udziałem lipooksygenazy. Nienasycone kwasy tłuszczowe są podatne na utlenianie podczas kiełkowania, co prowadzi do wytwarzania lotnych substancji odpowiedzialnych za specyficzne atrybuty zapachowe nasion. Ponadto reakcje biologiczne aktywowane podczas kiełkowania, takie jak rozpad lipidów i puryn oraz czynności oddechowe, powodują powstawanie wolnych rodników. Rodniki te mogą wpływać na pękanie łańcuchów lipidowych, co prowadzi do wytwarzania związków uznawanych za odoranty, takich jak heksanal [Xu i in., 2020]. Analiza przeprowadzonych badań wykazała, że zarówno proces kiełkowania, jak i fermentacji wywierają istotny wpływ na profil lotnych związków obecnych w badanych napojach. To z kolei może znacząco wpływać na percepcję sensoryczną tych produktów.

6.5. Charakterystyka sensoryczna

Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej w wariantach bazowych, z nasion skiełkowanych, po procesie fermentacji i z dodatkiem wsadu owocowego (malinowo-żurawinowego) przeanalizowano pod względem charakterystyki sensorycznej. Wyniki analiz przedstawiono w czwartym artykule z cyklu publikacji stanowiących niniejszą pracę doktorską: **Cichońska P.*, Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M. (2024). Enhancing the Sensory and Nutritional**

Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination. *LWT – Food Science and Technology*, 199, 116140.

Analiza sensoryczna odgrywa kluczową rolę w rozwoju produktu i ocenie jego jakości [Chambers i Koppel, 2013]. Spożywanie produktów z roślin strączkowych, pomimo ich bogatej wartości odżywczej, bywa ograniczone ze względu na właściwości sensoryczne [Vaz Patto i wsp., 2015]. Istnieje możliwość ograniczenia niekorzystnych dla konsumentów zapachów i posmaków strączkowych poprzez zastosowanie wybranych operacji technologicznych, łączenie ich z innymi produktami, czy zastosowanie dodatków smakowych [Nawaz i wsp., 2022].

Charakterystykę sensoryczną napojów z fasoli i soczewicy przedstawiono odpowiednio w Tabeli 18 i Tabeli 19. Wyniki wskazują, że NF+owoc charakteryzował się istotnie ciemniejszą barwą w porównaniu z innymi napojami fasolowymi, podczas gdy wśród napojów z soczewicy to bazowy NS charakteryzował się najciemniejszą barwą. Cechy zapachu badanych próbek istotnie różniły się, szczególnie w przypadku NF/NFK i NS/NSK, które charakteryzowały się istotnie większą intensywnością zapachów strączkowych i skrobiowych, w porównaniu z NF/NS+ABY3 i NF/NS+owoc. Co ciekawe, proces kiełkowania wydawał się zmniejszać percepcję zapachu strączkowego. Napoje fermentowane (NF/NS+ABY3) charakteryzowały się istotnie większą intensywnością zapachów kwaśnych, fermentowanych, alkoholowych i ostrych w porównaniu do pozostałych próbek, podczas gdy NF/NS+owoc wykazywały najbardziej intensywny słodki i owocowy zapach. W przypadku cech konsystencji, istotne różnice między analizowanymi próbkami zaobserwowano tylko w przypadku napojów fasolowych, wśród których NFK charakteryzował się najwyższą mączystością w porównaniu z innymi próbkami.

Analiza cech smaku badanych napojów wykazała, że NF/NS i NFK/NSK charakteryzowały się największą intensywnością smaku strączkowego i skrobiowego w porównaniu z pozostałymi próbkami. Smak warzywny był szczególnie wyczuwalny w NFK i NS+owoc. Podobnie jak w przypadku cech zapachu, napoje fermentowane (NF/NS+ABY3) były postrzegane jako te o największej intensywności smaków fermentowanych i kwaśnych, podczas gdy NF/NS+owoc charakteryzowały się najbardziej intensywnym owocowym i słodkim smakiem w porównaniu z innymi próbkami. Napoje z dodatkiem wsadu malinowo–żurawinowego otrzymały najwyższe oceny ogólnej jakości sensorycznej, na poziomie 5,40 dla NF+owoc i 5,02 dla NS+owoc. Napoje bazowe (NF/NS) i skiełkowane (NFK/NSK) były nieco mniej

preferowane, podczas gdy napoje fermentowane (NF/NS+ABY3) zostały scharakteryzowane jako te o najniższej ogólnej jakości sensorycznej otrzymując notę na poziomie 1,72.

Tabela 18. Charakterystyka jakości sensorycznej napojów z fasoli białej

Wyróżniki jakościowe	Kod próbki ¹				Statystyka wartość <i>p</i>
	NF	NF+ABY3	NFK	NF+owoc	
Cechy wizualne					
barwa	3.37b	2.85b	3.19b	7.36a	<0,0001
gęstość wizualnie	6.28b	6.38ab	6.64ab	6.82a	0,137
Cechy zapachu					
skrobiowy	4.16a	2.07b	4.33a	1.81b	<0.0001
strączkowy	5.52a	2.02c	4.13b	1.33c	<0.0001
warzywny	3.07a	1.88b	3.13a	0.91c	<0.0001
fermentacyjny	1.41b	6.97a	1.71b	0.76b	<0.0001
kwaśny	1.59b	6.49a	1.49b	2.31b	<0.0001
słodki	1.63b	0.40c	1.29b	6.03a	<0.0001
owocowy	0.86b	0.13b	0.29b	6.57a	<0.0001
orzechowy	1.05ab	0.09c	1.13a	0.34bc	0.021
przypalony	1.33a	0.84c	1.23ab	0.36d	0.177
alkoholowy	0.27b	1.87a	0.12b	0.08b	<0.0001
ziemisty	1.53a	1.25ab	2.10a	0.63b	0.154
ostry	1.09b	4.07a	1.19b	0.92b	<0.0001
Cechy konsystencji					
gęstość doustnie	6.11bc	6.02c	6.76a	6.63ab	0.021
oblepianie	4.22b	4.57ab	4.94ab	5.17a	0.138
mączystość	4.47b	3.96b	6.41a	4.33b	<0.0001
Cechy smaku/smakowości					
skrobiowy	5.33a	2.47b	5.62a	2.97b	<0.0001
strączkowy	5.72a	2.19b	5.09a	2.53b	<0.0001
warzywny	2.89ab	1.94bc	3.56a	1.13c	0.000
fermentacyjny	1.41b	6.68a	1.41b	0.43b	<0.0001
kwaśny	1.02b	7.51a	1.27b	3.07b	<0.0001
słodki	1.30b	0.69b	1.18b	6.18a	<0.0001
owocowy	0.39b	0.52b	0.16b	6.81a	<0.0001
orzechowy	1.07a	0.14b	0.72ab	0.29b	0.027
przypalony	1.42a	0.64ab	1.16a	0.07b	0.017
gorzki	1.55a	1.41a	1.66a	0.59b	0.052
słony	1.07a	0.76ab	0.61ab	0.23b	0.084
ziemisty	2.80a	1.84a	2.62a	0.29b	0.002
alkoholowy	0.14b	1.97a	0.08b	0.07b	<0.0001
piekący	0.80ab	1.42a	0.96ab	0.43b	0.028
sensoryczna ocena ogólna	3.68b	1.72c	3.69b	5.40a	<0.0001

a, b, c, d – średnie wartości w wierszach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ¹ Opis jak w Tabeli 2

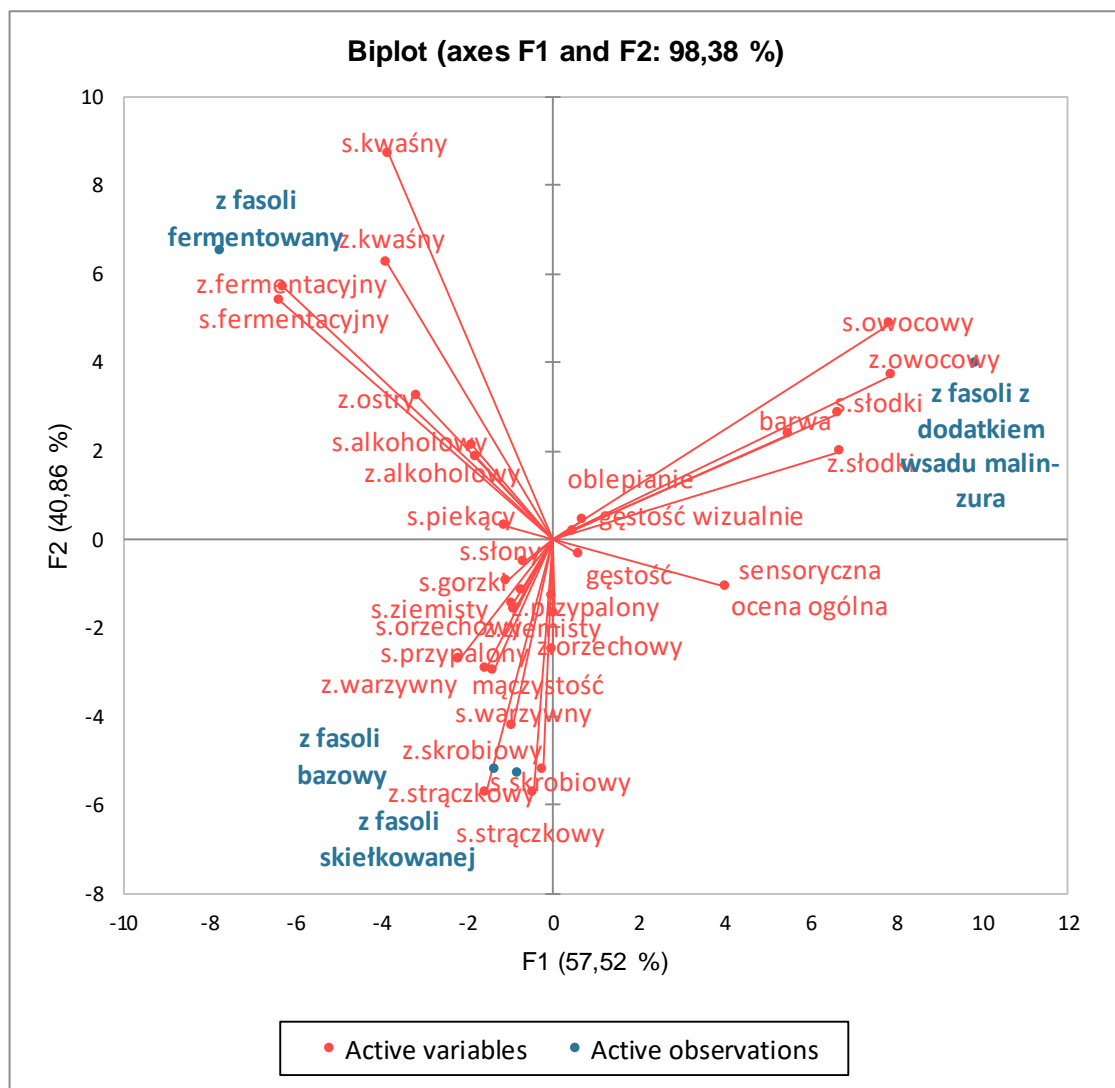
Tabela 19. Charakterystyka jakości sensorycznej napojów z soczewicy brązowej

Wyróżniki jakościowe	Kod próbki ¹				Statystyka wartość <i>p</i>
	NS	NS+ABY3	NSK	NS+owoc	
Cechy wizualne					
barwa	7.51a	4.48c	6.02b	6.68ab	<0.0001
gęstość wizualnie	6.32a	5.46b	6.39a	6.54a	0.007
Cechy zapachu					
skrobiowy	2.78a	1.72b	2.59a	2.09ab	0.033
strączkowy	3.96a	1.60b	3.44a	2.01a	0.000
warzywny	2.61a	1.93ab	2.37a	1.12b	0.052
fermentacyjny	2.16b	6.87a	2.85b	1.19c	<0.0001
kwaśny	2.32b	5.64a	3.02b	2.55b	<0.0001
słodki	2.59b	1.15c	3.48b	5.71a	<0.0001
owocowy	2.44bc	1.48c	3.32b	6.71a	<0.0001
orzechowy	0.64a	0.32b	0.84a	0.44b	0.269
przypalony	1.11a	0.93ab	1.36a	0.29b	0.046
alkoholowy	0.83b	1.94a	0.75b	0.19b	0.007
ziemisty	1.17a	0.91b	1.36a	0.43c	0.244
ostry	1.16b	4.92a	1.69a	1.39a	<0.0001
Cechy konsystencji					
gęstość doustnie	6.29ab	5.43c	5.56bc	6.88a	0.002
oblepianie	5.18a	4.73a	4.97a	5.31a	0.228
mączystość	5.11a	4.43b	5.11a	4.37b	0.272
Cechy smaku/smakowości					
skrobiowy	3.78a	3.20b	3.77a	2.94b	0.188
strączkowy	4.66a	3.37b	4.79a	2.24b	<0.0001
warzywny	3.29a	2.14a	3.08a	0.77b	0.001
fermentacyjny	2.10b	6.58a	2.66b	0.83c	<0.0001
kwaśny	2.82b	5.77a	2.84b	2.72b	<0.0001
słodki	1.27bc	0.63c	1.74b	5.90a	<0.0001
owocowy	1.19b	2.16b	1.53b	6.94a	<0.0001
orzechowy	0.63b	0.34b	1.24a	0.46b	0.008
przypalony	0.87ab	0.83ab	1.43a	0.10b	0.013
gorzki	1.92a	1.77a	1.29a	0.43b	0.002
słony	0.66b	1.28a	0.78ab	0.20b	0.011
ziemisty	1.88a	0.90b	1.63a	1.08b	0.284
alkoholowy	0.57b	1.71a	0.68b	0.17b	0.015
piekący	1.04a	1.09a	1.06a	0.73ab	0.422
sensoryczna ocena ogólna	3.37b	1.72c	3.34b	5.02a	<0.0001

a, b, c – średnie wartości w wierszach oznaczonych różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0.05$); ¹ Opis jak w Tabeli 2

Na Rysunku 10 i Rysunku 11 przedstawiono różnice i podobieństwa w jakości sensorycznej, odpowiednio napojów z fasoli w układzie dwóch pierwszych składowych głównych: F1 (51,52%) oraz F2 (40,66%) stanowiących 98,38% zmienności ogólnej oraz napojów z soczewicy w układzie dwóch pierwszych składowych głównych: F1 (79,30%) oraz F2 (18,28%) stanowiących 97,58% zmienności ogólnej. Zarówno w

przypadku napojów z fasoli, jak i z soczewicy, próbki napojów z dodatkiem wsadu malinowo–żurawinowy (NF/NS+owoc) znalazły się w pobliżu sensorycznej oceny ogólnej, a także zapachu i smaku słodkiego i owocowego. W pewnym dystansie do niej ulokowały się napoje bazowe (NF/NS) i skiełkowane (NFK/NSK), zajmując podobne pozycje w układzie PCA, co wskazuje na porównywalny profil sensoryczny charakteryzujący się zapachami i smakami skrobiowymi, strączkowymi i warzywnymi. Próbki fermentowane (NF/NS+ABY3) ulokowały się po przeciwnej stronie układu PCA, odzwierciedlając cechy sensoryczne związane z intensywnym fermentacyjnym i kwaśnym zapachem i smakiem, które negatywnie korelowały z ogólną jakością sensoryczną.



Rysunek 10. Podobieństwa i różnice w jakości sensorycznej napojów z fasoli białej

aromatów strączkowych. Proces kiełkowania nie przyniósł oczekiwanego efektu w postaci istotnego zmniejszenia zawartości badanych związków w skiełkowanych próbkach. Fakt ten można wytłumaczyć obecnością większości związków odpowiadających za posmaki strączkowe w formie nietlotnych i bezwonných glikozydów. Związki te mogą ulec reaktywacji sensorycznej w wyniku hydrolizy wiązania cukrowego, co prowadzi do uwolnienia lotnego aglikonu odpowiedzialnego za smak [Lorn i in. 2021].

Ocena ogólnej jakości sensorycznej pozwoliła wskazać, że napoje fermentowane były najmniej preferowane, pomimo mniej wyczuwalnych atrybutów aromatu i smaku strączkowych, warzywnych i skrobiowych. Negatywne oceny wydają się być związane przede wszystkim z obecnością cech fermentacyjnych, kwaśnych i alkoholowych. Te specyficzne atrybuty mogą być powiązane z wybranymi lotnymi związkami, których zawartość zwiększyła się po procesie fermentacji, takimi jak 3-metylobutan-1-ol, związki siarkoorganiczne, acetoina, wybrane ketony (pentano-2,3-dion, diacetyl), większość badanych aldehydów i kwas octowy. Co ciekawe, wysoka zawartość niektórych związków, takich jak heksanal, oktanal i diacetyl w fermentowanych produktach mlecznych, zazwyczaj powiązana jest z pozytywnymi ocenami w testach sensorycznych i kształtuje ich charakterystyczny profilu aromatyczny [Moineau-Jean i wsp., 2020]. Niekorzystne postrzeganie fermentowanych napojów z fasoli i soczewicy może wynikać z braku harmonizacji proporcji tych lotnych związków. Przewaga aldehydów w tych napojach może przyczyniać się do obecności nieprzyjemnych, trawiastych i ostrych aromatów, wpływających na ogólne wrażenia sensoryczne [Xu i in., 2020]. Dodatek wsadu owocowego okazał się najkorzystniejszą strategią zwiększania atrakcyjności sensorycznej napojów z fasoli i soczewicy, a w szczególności zmniejszania wyczuwalności niekorzystnych zapachów i smaków strączkowych, skrobiowych, warzywnych, gorzkich, fermentacyjnych i alkoholowych.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Analiza wyników zrealizowanych badań, opublikowanych w formie cyklu publikacji naukowych, pozwoliła na zweryfikowanie założonych hipotez badawczych. Na tej podstawie sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Napoje roślinne z fasoli białej i soczewicy brązowej stanowią odpowiednią matrycę do procesu fermentacji, co stanowi potwierdzenie **Hipotezy 1**. Zastosowanie badanych kultur starterowych pozwala na uzyskanie produktów o pH charakterystycznym dla mlecznych napojów fermentowanych (około 4,5) i wysokiej liczebności mikroorganizmów ($>10^7$ jtk/cm³) w całym okresie przechowywania.
2. Fermentując napoje roślinne z fasoli i soczewicy korzystne jest stosowanie zespolonych kultur starterowych o jak najbardziej zróżnicowanym składzie gatunkowym mikroorganizmów. Synergistyczne działanie bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* w kulturach starterowych YO-MIX 207 i ABY-3 pozwoliło na uzyskanie największej efektywności procesu fermentacji badanych matryc.
3. Mikroorganizmy odpowiadające za fermentację badanych napojów wykazują zdolność do syntezy wybranych witamin z grupy B i inicjowania przemian enzymatycznych prowadzących do zwiększenia zawartości wybranych izoflawonów, modyfikacji profilu lotnych związków i zmniejszenia zawartości wybranych oligosacharydów. Zastosowanie kultur starterowych zawierających bakterie z rodzajów *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* (YO-MIX 207 i ABY-3), w procesie fermentacji napojów z fasoli i soczewicy, wpływa na większą intensywność modyfikacji ich właściwości, w porównaniu do zastosowania kultury starterowej zawierającej wyłącznie bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Streptococcus* (Beugel Soja 1). Większa różnorodność gatunkowa mikroorganizmów gwarantuje szersze portfolio enzymatyczne, wpływające bezpośrednio na właściwości produktu. Stanowi to potwierdzenie **Hipotezy 2**, która wskazuje, że zastosowanie procesu fermentacji w produkcji napojów na bazie fasoli białej i soczewicy brązowej wpływa na zmiany ich wartości odżywczej, właściwości fizycznych i biochemicznych, w zależności od rodzaju zastosowanych kultur starterowych.

4. Proces kiełkowania nasion fasoli i soczewicy prowadzi do aktywacji enzymów modyfikujących strukturę surowca i inicjujących syntezę nowych składników komórkowych, co wpływa na właściwości napojów z nich wytworzonych. Powoduje to do modyfikację profilu węglowodanowego i profilu lotnych związków, a także zwiększenia zawartości białka, wybranych izoflawonów i witamin z grupy B w napojach z fasoli i soczewicy. Stanowi to potwierdzenie **Hipotezy 3**, która wskazuje, że proces kiełkowania nasion fasoli białej i soczewicy brązowej wpływa na zmiany właściwości biochemicznych i wartości odżywczej napojów roślinnych przygotowanych z tych surowców w porównaniu do napojów przygotowanych z nasion nieskiełkowanych.
5. Napoje z fasoli scharakteryzowano jako ciecze lepkosprężyste o strukturze zawiesiny koloidalnej. Kiełkowanie wpływa na zmiany wielkości cząstek, co bezpośrednio determinuje wartości wybranych parametrów reologicznych i stabilność układu. Właściwości fizyczne napojów z fasoli są jednak kształtowane głównie w wyniku zastosowanych procesów technologicznych, a przede wszystkim homogenizacji wysokociśnieniowej. Zastosowanie tego procesu zapobiega rozwarstwianiu się produktu, co stanowi klucz do otrzymania stabilnych napojów z nasion roślin strączkowych, atrakcyjnych wizualnie dla konsumentów.
6. Napoje bazowe z fasoli białej i soczewicy brązowej charakteryzują się dość niską ogólną jakością sensoryczną. Zastosowanie procesu kiełkowania nie wpłynęło negatywnie na ten parametr, co jest pożądane ze względu na pozytywny wpływ tego procesu na właściwości odżywcze analizowanych napojów. Fermentacja wpływa na istotne obniżenie jakości sensorycznej badanych napojów, co może wynikać z braku harmonizacji proporcji lotnych związków, odpowiadających za kształtowanie się właściwości sensorycznych. Dodatek wsadu owocowego okazał się najkorzystniejszą strategią zwiększania atrakcyjności sensorycznej napojów z fasoli i soczewicy, a w szczególności zmniejszania wyczuwalności niekorzystnych zapachów i smaków strączkowych, skrobiowych, warzywnych, gorzkich, fermentacyjnych i alkoholowych. Pozwala to na częściowe potwierdzenie **Hipotezy 4**, która wskazuje, że zastosowanie fermentacji, kiełkowania i dodatku smakowego wpływa na poprawę właściwości sensorycznych napojów roślinnych na bazie fasoli białej i soczewicy brązowej.

7. Połączenie różnorodnych procesów biotechnologicznych, takich jak fermentacja i kiełkowanie, stanowi optymalne rozwiązanie w produkcji napojów na bazie fasoli i soczewicy. Pozwala to na kompleksową poprawę właściwości odżywczych otrzymanych produktów, które jednocześnie pełnią funkcję nośnika bakterii probiotycznych.

8. SPIS LITERATURY

1. Abbas Y., Ahmad A. (2018). Impact of processing on nutritional and antinutritional factors of legumes: A review. *Annals. Food Science and Technology*, 19, 199–215.
2. Adamberg S., Sumeri I., Uusna R., Ambalam P., Kondepudi K.K., Adamberg K., Wadström T., Ljungh A. (2014). Survival and synergistic growth of mixed cultures of bifidobacteria and lactobacilli combined with prebiotic oligosaccharides in a gastrointestinal tract simulator. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 25, 23062.
3. Adebo J.A., Njobeh P.B., Gbashi S., Oyedeji A.B., Ogundele O.M., Oyeyinka S.A., Adebo O.A. (2021). Fermentation of cereals and legumes: Impact on nutritional constituents and nutrient bioavailability. *Fermentation*, 8, 63.
4. Aduol K.O., Onyango A.N., Imathiu S.M. (2020). Proximate, Microbial and Sensory Characteristics of Cowpea Milk Fermented with Probiotic Starter Cultures. *European Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2, 1–7.
5. Agostini–Costa T.S., Teixeira–Filho J., Scherer R., Kowalski C.H., Prado M.A., Godoy H. (2007). Determination of B–group vitamins in enriched flavored milk mixes. *Alimentos e nutricao*, 18, 351–356.
6. Agrahar–Murugka D., Bajpai–Dixit P., Kotwaliwale N. (2020). Rheological, nutritional, functional and sensory properties of millets and sprouted legume based beverages. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 1671–1679.
7. Akeem S.A., Kolaole F.L., Joseph J.K., Kayode R.M., Akintayo O.A. (2019). Traditional food processing techniques and micronutrients bioavailability of plant and plant–based foods: A Review. *Annals. Food Science and Technology*, 20, 30–41.
8. Alcorta A., Porta A., Tarrega A., Alvarez M.D., Vaquero M. (2021). Foods for Plant–Based Diets: Challenges and Innovations. *Foods*, 10, 293.
9. Aliakbarian B., Bagnasco L., Perego P., Leardi R., Casale M. (2016). UV–VIS spectroscopy for monitoring yogurt stability during storage time. *Analytical Methods*, 8, 5962.
10. Alkaltham M.S., Özcan M.M., Uslu N., Salamatullah A.M., Hayat, K. (2022). Changes in antioxidant activity, phenolic compounds, fatty acids, and mineral

- contents of raw, germinated, and boiled lentil seeds. *Journal of Food Science*, 87, 1639–1649.
11. Amiri S., Moghanjoughi Z.M., Bari M.R., Khaneghah A.M. (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry: An overview of current and future applications. *Italian Journal of Food Science*, 33, 55–68.
 12. Asmahan A.A. (2010). Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health. *Research Journal of Microbiology*, 5, 1213–1221.
 13. Atkinson F.S., Brand–Miller J.C., Foster–Powell K., Buyken A.E., Goletzke J. (2021). International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114, 1625–1632.
 14. Augustin L.S.A., Kendall C.W.C., Jenkins D.J.A., Willett W.C., Astrup A., Barclay A.W., Björck I., Brand–Miller J.C., Brighenti F., Buyken A.E., Ceriello A., La Vecchia C., Livesey G., Liu S., Riccardi G., Rizkalla S.W., Sievenpiper J.L., Trichopoulou A., Wolever T.M.S., Baer–Sinnott S., Poli A. (2015). Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 25, 795–815.
 15. Aviles–Gaciola S., Chuck–Hernandez C., Salvador S. (2018). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *Journal of Food Science*, 83, 17–29.
 16. Aydar E.F., Metdinc Z., Demiracan E., Cetinkaya S.K., Ozcelik B. (2023). Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk substitute as a novel plant–based drink: Fatty acid profile, antioxidant activity, in–vitro phenolic bio–accessibility and sensory characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 83, 103254.
 17. Aydar E.F., Tutuncu S., Ozcelik B. (2020). Plant–based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *Journal of Functional Foods*, 70, 103975.
 18. Baum S.J., Kris–Etherton P.M., Willett W.C., Lichtenstein A.H., Rudel L.L., Maki K.C., Whelan J., Ramsden C.E., Block R.C. (2012). Fatty acids in

- cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *Journal of Clinical Lipidology*, 6, 216–234.
19. Beaulieu J.C., Reed S.S., Obando-Ulloa J.M., McClung A.M. (2020) Green processing protocol for germinating and wet milling brown rice for beverage formulations: Sprouting, milling and gelatinization effects. *Food Science & Nutrition*, 8, 2445–2457.
 20. Bernat N., Chafer M., Chiralt A., Gonzalez-Martinez C. (2014). Vegetable milks and their fermented derivative products. *International Journal of Food Studies*, 3, 93–124.
 21. Bernat N., Chafer M., Rodríguez-García J., Chiralt A., Gonzalez-Martínez C. (2015). Effect of high-pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT*, 62, 488–496.
 22. Bott L., Chambers E. (2006). Sensory characteristics of combinations of chemicals potentially associated with beany aroma in foods. *Journal of Sensory Studies*, 21(3), 308–321.
 23. Boukid F. (2021). Plant-based meat analogues: from niche to mainstream. *European Food Research and Technology*, 247, 297–308.
 24. Bryś J., Wirkowska M. (2010). Knowledge of the structure of triacylglycerols in designing structured lipids. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2, 86–89.
 25. Budryn G., Klewicka E., Grzelczyk J., Gałazka-Czarnecka I., Mostowski, R. (2019). Lactic acid fermentation of legume seed sprouts as a method of increasing the content of isoflavones and reducing microbial contamination. *Food Chemistry*, 285, 478–484.
 26. Bujna E., Farkas N.A., Tran A.M., Dam M.S., Nguyen, Q.D. (2018). Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food Science and Biotechnology*, 27, 633–641.
 27. Byanju B., Hojilla-Evangelista M.P., Lamsal B.P. (2021). Fermentation performance and nutritional assessment of physically processed lentil and green pea flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 5792–5806.
 28. Campos-Vega R., Loarca-Pina G., Oomah D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43, 461–482.

29. Capozzi V., Russo P., Dueñas M.T., López P., Spano G. (2012). Lactic acid bacteria producing B–group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1383–1394.
30. Chalupa–Krebdak S., Long C.J., Bohrer B.M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant–based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84–92.
31. Chambers IV E., Koppel K. (2013). Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules*, 18, 4887–4905.
32. Champagne C.P., Tompkins T.A., Buckley N.D., Green–Johnson J.M. (2010). Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B–vitamin content of a fermented soy beverage. *Food microbiology*, 27, 968–972.
33. Chaves–López C., Serio A., Paparella A., Martuscelli M., Corsetti A., Tofalo R., Suzzi G. (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, 42, 117–121.
34. Chen Y., Zhang H., Liu R., Mats L., Zhu H., Pauls K.P., Deng Z., Tsao R. (2019). Antioxidant and anti–inflammatory polyphenols and peptides of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk and yogurt in Caco–2 and HT–29 cell models. *Journal of Functional Foods*, 53, 125–135.
35. Chon S. (2013). Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6112–6124.
36. Cichońska P., Ziarno M. (2022). Legumes and Legume–Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms*, 10, 91.
37. Craig W., Fresan U. (2021). International Analysis of the Nutritional Content and a Review of Health Benefits of Non–Dairy Plant–Based Beverages. *Nutrients*, 13, 842.
38. da Costa César I., Braga F.C., Soares C.D.V., de Aguiar Nunan E., Pianetti G.A., Condessa F.A., Barbosa T.A. Campos L.M.M. (2006). Development and validation of a RPHPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal of Chromatography*, 836, 74–78.

39. Dahl W.J., Stewart M.L. (2015). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115, 1861–1870.
40. Dima C., Assadpour E., Dima S., Jafari, S. M. (2020). Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 954–994.
41. Djordjevic T.M., Šiler–Marinkovic S.S., Dimitrijevic–Brankovic S.I. (2011). Antioxidant activity and total phenolic content in some cereals and legumes. *International Journal of Food Properties*, 14, 175–184.
42. Domian E., Marzec A., Kowalska H. (2020). Assessing the effectiveness of colloidal microcrystalline cellulose as a suspending agent for black and white liquid dyes. *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 2504–2515.
43. Dostálová J., Kadlec P., Bernášková J., Houška M., Strohalm J. (2009). The changes of α -galactosides during germination and high pressure treatment of legume seeds. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 76–79.
44. Ewoldt R.H., Winter, P., Maxey J., McKinley G.H. (2009). Large amplitude oscillatory shear of pseudoplastic and elastoviscoplastic materials. *Rheologica Acta*, 49, 191–212.
45. Fazilah N.F., Ariff A.B., Khayat M.E., Rios–Solis L., Halim M. (2018). Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *Journal of Functional Foods*, 48, 387–399.
46. Fernández–Ávila C., Escriu R., Trujillo A.J. (2015). Ultra–High Pressure Homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate–stabilized emulsions. *Food Research International*, 75, 357–366.
47. Ferragut V., Hernández–Herrero M., Veciana–Nogués M.T., Borrás–Suarez M., González–Linares J., Vidal–Carou M.C., Guamis B. (2014). Ultra–high–pressure homogenization (UHPH) system for producing high–quality vegetable–based beverages: Physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 953–961.

48. Ferreira H., Vasconcelos, M., Gil, A.M., Pinto E. (2021). Benefits of pulse consumption on metabolism and health: A systematic review of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61, 85–96.
49. Fructuoso I., Romao B., Han H., Raposo A., Ariza–Montes A., Arya–Castillo L., Zandonadi R.P. (2021). An Overview on Nutritional Aspects of Plant–Based Beverages Used as Substitutes for Cow’s Milk. *Nutrients*, 13, 2650.
50. Fu X., Xu S., Wang Z. (2009). Kinetics of lipid oxidation and off–odor formation in silver carp mince: The effect of lipoxygenase and haemoglobin. *Food Research International*, 42, 85–90.
51. Genovese D.B., Lozano J.E., Rao M.A. (2007). The Rheology of Colloidal and Noncolloidal Food Dispersions. *Journal of Food Science*, 72, 11–20.
52. Gerbig S., Takats Z. (2010). Analysis of triglycerides in food items by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2186–2192.
53. Ghavidel R.A., Prakash J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT*, 40, 1292–1299.
54. Gilad O., Viborg A.H., Stuer–Lauridsen B., Jacobsen S. (2011). The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB–12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics*, 11, 2503–2514.
55. Golding M., Wooster T.J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 90–101.
56. Hahn C., Sramek M., Nöbel S., Hinrichs J. (2011). Post–processing of concentrated fermented milk: Influence of temperature and holding time on the formation of particle clusters. *Dairy Science and Technology*, 92, 91–107.
57. Han I.H., Baik B. (2006). Oligosaccharide Content and Composition of Legumes and Their Reduction by Soaking, Cooking, Ultrasound, and High Hydrostatic Pressure. *Cereal Chemistry*, 83, 428–433.
58. Hati S., Vij S., Mandal S., Malik R.K., Kumar V., Khetra Y. (2013). α –galactosidase activity and oligosaccharides utilization by Lactobacilli during fermentation of soy milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1065–1071.

59. Hazelwood L.A., Daran J.M., van Maris A.J., Pronk J.T., Dickinson J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2259–2266.
60. Hebishy E., Buffa M., Guamis B., Blasco–Moreno A., Trujillo A.J. (2015). Physical and oxidative stability of whey protein oil–in–water emulsions produced by conventional and ultra high–pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 79–90.
61. Hefnawy T.H. (2011). Effect of processing methods on nutritional composition and anti–nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Annals of Agricultural Sciences*, 56, 57–61.
62. Heller K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 374–379.
63. Heydari S., Hosseini S.E., Mortazavian A.M., Taheri S. (2023). Extraction of bioactive peptides produced in probiotic yoghurt and determination of their biological activities. *International Dairy Journal*, 139, 105544.
64. Hugenholtz J., Smid E.J. (2002). Nutraceutical production with food–grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 497–507.
65. Jeske S., Zannini E., Arendt E.K. (2017). Evaluation of Physicochemical and Glycaemic Properties of Commercial Plant–Based Milk Substitutes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72, 26–33.
66. Jia X., Chen Y., Shi C., Ye Y., Abid M., Jabbar S., Wang P., Zeng X., Wu T. (2014). Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. *Food Hydrocolloids*, 39, 27–33.
67. Jiang J., Chen J., Xiong Y.L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH–shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7576–7583.
68. Jungersen M., Wind A., Johansen E., Christensen J.E., Stuer–Lauridsen B., Eskesen D. (2014). The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB–12[®]. *Microorganisms*, 2, 92–110.
69. Kaczmarska K.T., Chandra–Hioe M.V., Zabaras D., Fran, D., Arcot J. (2017). Effect of Germination and Fermentation on Carbohydrate Composition of

- Australian Sweet Lupin and Soybean Seeds and Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 10064–10073.
70. Kamboj R., Nanda V. (2018). Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes—A review. *Legume Research*, 41, 325–332.
71. Kan L., Nie S., Hu J., Wang S., Bai Z., Wang J., Zhou Y., Jiang J., Zeng Q., Song K. (2018). Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*, 260, 317–326.
72. Kannan U., Sharma R., Gangola M.P., Chibbar R.N. (2018). Improving grain quality in pulses: Strategies to reduce raffinose family oligosaccharides in seeds. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*. 4, 70–88.
73. Kebede M., Admassu S. (2019). Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences*, 5, 38–49.
74. Kennedy D.O. (2016). B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients*, 8, 68.
75. Khang D.T., Dung T.N., Elzaawely A.A., Xuan T. D. (2016). Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods*, 5, 27.
76. Khrisanapant P., Kebede B., Leong S.Y., Oey I. (2019). A Comprehensive Characterisation of Volatile and Fatty Acid Profiles of Legume Seeds. *Foods*, 8, 651.
77. Kinnarinen T., Tuunila R., Häkkinen A. (2017). Reduction of the width of particle size distribution to improve pressure filtration properties of slurries. *Minerals Engineering*, 102, 68–74.
78. Kumari A., Angmo K., Monika S., Bhalla T.C. (2018). Functional and technological application of probiotic *L. casei* PLA5 in fermented soymilk. *International Food Research Journal*, 25, 2164–2172.
79. Lal N., Barcciaya J., Raypuriy N., Shiurkar G. (2017). Anti–nutrition in legumes: Effect in human health and its elimination. *Innovative Farming*, 2, 32–36.
80. LeBlanc J.G., Milani C., De Giori G.S., Sesma F., Van Sinderen D., Ventura M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 160–168.

81. Lee J.M., Lee H., Kang S., Park, W.J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8, 23.
82. Lemmens E., Moroni A.V. Pagand J., Heirbaut P., Ritala A., Karlen Y., Le K.–A., Van den Broeck H.C., Brouns F.J., De Brier N., Delcour J.A. (2019). Impact of Cereal Seed Sprouting on Its Nutritional and Technological Properties: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 305–328.
83. Li H., Yan L., Wang J., Zhang Q., Zhou Q., Sun T., Chen W., Zhang H. (2012). Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. *Annals of microbiology*, 62, 1473–1483.
84. Li Y., Wu C., Liu J., Zhu Y., Zhang X., Jiang L., Qi B., Zhang X., Wang Z., Teng F. (2018). Soy Protein Isolate–Phosphatidylcholine Nanoemulsions Prepared Using High–Pressure Homogenization. *Nanomaterials*, 8, 307.
85. Liu Z.Q., Yang X., Zhang Q. (2014). TURBISCAN: History, development, application to colloids and dispersions. *Advanced Materials Research*, 936, 1592–1596.
86. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118–126.
87. Lopes M., Pierrepont C., Duarte C.M., Filipe A., Medronho B., Sousa I. (2020). Legume Beverages from Chickpea and Lupin, as New Milk Alternatives. *Foods*, 9, 1458.
88. Lorn Da., Nguyen T.–K.–C., Ho P.–H., Tan R., Licandro H., Wache Y. (2021). Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 350, 109242.
89. Magaletta R.L., DiCataldo S.N. (2009). Invitro method for the determination of glycemic index of food products (U.S. Patent No. US 2009/0004642 A1). U.S. Patent and Trademark Office.
90. Mäkinen O., Wanhalinna V., Zannini E., Arendt E.K. (2016). Foods for Special Dietary Needs: Non–Dairy Plant Based Milk Substitutes and Fermented Dairy Type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 339–349.

91. Margier M., George S., Hafnaoui N., Remond D., Nowicki M., Du Chaffaut L., Amiot M., Reboul E. (2018). Nutritional Composition and Bioactive Content of Legumes: Characterization of Pulses Frequently Consumed in France and Effect of the Cooking Method. *Nutrients*, 10, 1668.
92. Martín–Cabrejas M.A., Ariza N., Esteban R., Mollá E., Waldron K., López–Andréu F.J. (2003). Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1254–1259.
93. Martinez–Padilla E., Li K., Frandsen H.B., Joehnke M.S., Vargas–Bello–Perez E., Petersen I.L. (2020). In vitro protein digestibility and fatty acid profile of commercial plant–based milk alternatives. *Foods*, 9, 1784.
94. Mazquiz M., Varela A., Burbano C., Cuadrado C., Guillamon E., Pedrosa M. (2012). Bioactive compounds in legumes: Pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry Reviews*, 11, 227–244.
95. McClements D.J. (2020). Development of Next–Generation Nutritionally Fortified Plant–Based Milk Substitutes: Structural Design Principles. *Foods*, 9, 421.
96. McClements, D.J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 611–649.
97. Mechai A., Debabza M., Menasria T., Kirane D. (2014). Enzymatic and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian fermented milk products. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 8, 141–150.
98. Megat Rusydi M.R., Noraliza C.W., Azrina A., Zulkhairi A. (2011). Nutritional Changes in Germinated Legumes and Rice Varieties. *International Food Research Journal*, 18, 705–713.
99. MinYing C., Azlan A., Al–Sheraji S.H., Hassan F.A., Prasad K.N. (2013). Antioxidant activities and total phenolic content in germinated and non–germinated legume extracts following alkaline–acid hydrolysis. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12, 1036–1041.
100. Moelants K.R., Cardinaels R., Van Buggenhout S., Van Loey A.M., Moldenaers P., Hendrick M.E. (2014). A Review on the Relationships between Processing, Food Structure, and Rheological Properties of Plant–Tissue–Based

- Food Suspensions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 241–260.
101. Mohanty D., Misra S., Mohapatra S., Sahu P. (2018). Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience*, 26, 152–160.
102. Moineau–Jean A., Raymond Y., Sabik H., Graveline N., Champagne C.P., Roy D., LaPointe, G. (2020). Effect of manufacturing processes and storage on aroma compounds and sensory properties of yoghurt. *International Dairy Journal*, 105, 104662.
103. Nawaz M.A., Tan M., Øiseth S., Buckow R. (2022). An emerging segment of functional legume–based beverages: A review. *Food Reviews International*, 38, 1064–1102.
104. Nciri N., Cho N., El Mhamdi F., Ben Ismail H., Ben Mansour A., Sassi F.H., Ben Aissa–Fennira F. (2015). Toxicity Assessment of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Widely Consumed by Tunisian Population. *Journal of Medicinal Food*, 18(9), 1049–1064.
105. Njoumi S., Amiot M. J., Rochette I., Bellagha S., Mouquet–Rivier C. (2019). Soaking and cooking modify the alpha–galacto–oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 70, 551–561.
106. Nkhata S.G., Ayua E., Kamau E., Shingiro J. (2018). Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Science & Nutrition*, 6, 2446–2458.
107. Oboh H.A., Agu K. (2010). The effects of various traditional processing methods on the glycemic index and glycemic load of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Biochemistry*, 34, 1332–1342.
108. Ohaneneye I.C., Tsopmo A., Ejike C.E., Udenigwe C.U. (2020). Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 213–222.
109. Ohanenye I.C., Ekezie F.–G., Sarteshnizi R.A., Boachie R.T., Emenike C.U., Sun X., Nwachukwu I.D., Udenigwe C.C. (2022). Legume seed protein digestibility as influenced by traditional and emerging physical processing technologies. *Foods*, 11, 2299.
110. Okoń A., Stadnik J., Dolatowski Z.J. (2017). Effect of *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 on

- proteolytic changes in dry-cured loins. *Food Science and Biotechnology*, 26, 633–641.
111. Olaniyi O.I., Adeniran H.A., Abiose S.H. (2019). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria in African yam bean-based drink. *International Food Research Journal*, 26, 1733–1740.
112. Onyango C., Luvitaa S.K., Unbehend G., Haase N. (2020). Nutrient composition, sensory attributes and starch digestibility of cassava porridge modified with hydrothermally-treated finger millet. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100021.
113. Øverby N.C., Sonestedt E., Laaksonen D.E., Birgisdottir B.E. (2013). Dietary fiber and the glycemic index: a background paper for the Nordic Nutrition Recommendations 2012. *Food & Nutrition Research*, 57, 20709.
114. Pal R.S., Bhartiya A., Yadav P., Kant L., Mishra K.K., Aditya J.P., Pattanayak A. (2016). Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients, anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Food Science and Technology*, 54, 909–920.
115. Panesar P.S. (2011). Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 47–51.
116. Park M.K., Kim Y.-S. (2021). Mass spectrometry based metabolomics approach on the elucidation of volatile metabolites formation in fermented foods: A mini review. *Food Science and Biotechnology*, 30, 881–890.
117. Patil S.B., Khan K. (2012). Some cooking properties of germinated brown rice of Indian varieties. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 14, 156–162.
118. Petchiammal C., Hopper W. (2014). Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 476–479.
119. PN-EN ISO 13299:2016: Analiza sensoryczna – Metodyka – Ogólne wytyczne ustalenia profilu sensorycznego.
120. Pokusaeva K., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. (2011). Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6, 285–306.
121. Poliselí-Scopel F.H., Hernández-Herrero M., Guamis B., Ferragut V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal

- treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT*, 46, 42–48.
122. Pua A., Tang V., Goh R., Sun J., Lassabliere B., Liu S. (2022). Ingredients, Processing, and Fermentation: Addressing the Organoleptic Boundaries of Plant-Based Dairy Analogues. *Foods*, 11(6), 875.
123. Qamar S., Manrique Y.J., Parekh H., Falconer J.R. (2020). Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2742–2762.
124. Rahmawati I.S., Suntornsuk W. (2016). Effects of fermentation and storage on bioactive activities in milks and yoghurts. *Procedia Chemistry*, 18, 53–62.
125. Rajhi I., Baccouri B., Rajhi F., Mhadhbi H., Flamini, G. (2021). Monitoring the volatile compounds status of whole seeds and flours of legume cultivars. *Food Bioscience*, 41, 101105.
126. Rasika D., Vidanarachchi J.K., Silva Rocha R., Balthazar, C.F., Cruz A.G., Sant’Ana A.S., Ranadheera C.S. (2021). Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Current Opinion in Food Science*, 38, 8–20.
127. Rebello C.J., Freenway F.L., Finley J.W. (2014). A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obesity Reviews*, 15, 392–407.
128. Rincon L., Assuncao, R.B., Rodrigues de Alencar E. (2020). Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. *LWT*, 128, 109479.
129. Rosenberg J., Ischebeck T., Commichau F.M. (2017). Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnology Advances*, 35, 31–40.
130. Sakandar H.A., Chen Y., Peng C., Chen X., Imran M., Zhang H. (2021). Impact of fermentation on antinutritional factors and protein degradation of legume seeds: A review. *Food Reviews International*, 39, 1227–1249.
131. Samtiya M., Aluko R.E., Dhewa T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2, 6.
132. Sanchez-Chino X., Jimenez-Martinez C., Davila-Ortiz G., Alvarez-Gonzalez I., Madrigal-Bujaidar E. (2015). Nutrient and nonnutrient components of

- legumes, and its chemopreventive activity: A review. *Nutrition and Cancer*, 67, 401–410.
133. Sant'Anna V., Gurak P.D., Marczak L.D., Tessaro I. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98, 601–608.
134. Saulnier D.M., Santos F., Roos S., Mistretta T.–A., Spinler J.K., Molenaar D., Teusink B., Versalovic J. (2011). Exploring metabolic pathway reconstruction and genome–wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One*, 6, 18783.
135. Scazzina F., Siebenhandl–Ehn S., Pellegrini N. (2013). The effect of dietary fibre on reducing the glycaemic index of bread. *British Journal of Nutrition*, 109, 1163–1174.
136. Sethi S., Tyagi, S.K., Anurag R.K. (2016). Plant–based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 3408–3423.
137. Sfakianakis P., Tzia, C. (2014). Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: A review. *Foods*, 3, 176–193.
138. Shafiee G., Mortazavian A.M., Mohammadifar M.A., Koushki M., Mohammadi A., Mohammadi R. (2010). Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological, characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*. 4, 1265–1274.
139. Silva H.C., Braga G.L. (1982). Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 47, 924–925.
140. Singh A.K., Rehal J., Kaur A., Jyot G. (2015). Enhancement of Attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1575–1589.
141. Singh B., Singh J.P., Shevkani K., Singh N., Kaur A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 858–870.
142. Sliburyte L., Skeryte I. (2014). What We Know about Consumers' Color Perception. *Procedia – Social and Behavioral Sciences*, 156, 468–472.

143. Sofi S.A., Singh J., Muzaffar K., Mir S.A., Dar B.N. (2020). Effect of germination time on physico–chemical, functional, pasting, rheology and electrophoretic characteristics of chickpea flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2380–2392.
144. Sokołowska B., Połaska M., Dekowska A., Woźniak Ł., Roszko M. (2020). Degradation of preservatives with the formation of off–odor volatile compounds – the case of strawberry–flavored bottled water. *Beverages*, 6, 67.
145. Suwonsichon S., Chambers E., Chambers, D. (2004). Sensory characteristics of chemical compounds potentially associated with beany aroma. *Journal of Sensory Studies*, 19, 15–26.
146. Świeca M., Baraniak B., Gawlik–Dzik U. (2013). In vitro digestibility and starch content predicted glycemic index and potential in vitro antidiabetic effect of lentil sprouts obtained by different germination techniques. *Food Chemistry*, 138, 1414–1420.
147. Tabilo–Munizaga G., Barbosa–Canovas G.V. (2004). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67, 147–156.
148. Tang C.–H., Chen L., Ma C.–Y. (2009). Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin–rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *Food Chemistry*, 113, 957–963.
149. Tangyu M., Muller J., Bolten C.J., Wittmann C. (2019). Fermentation of plant–based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 9263–9275.
150. Tiziani S., Vodovotz Y. (2005). Rheological effects of soy protein addition to tomato juice. *Food Hydrocolloids*, 19, 45–52.
151. Topolska K., Florkiewicz A., Filipiak–Florkiewicz A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5327.
152. Toroszyńska A., Estrella I., Lamparski G., Hernandez T., Amarowicz R., Pegg, R.B. (2011). Relationship between the sensory quality of lentil (*Lens culinaris*) sprouts and their phenolic constituents. *Food Research International*, 44, 3195–3201.
153. Trinidad T.P., Mallillin A.C., Loyola A.S., Sagum R.S., Encabo R.R. (2010). The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103, 569–574.

154. Uwaegbute A.C., Iroegbu C.U., Eke, O. (2000). Chemical and sensory evaluation of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*) and their products. *Food Chemistry*, 68, 141–146.
155. Vanga S.K., Raghavan V. (2008). How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *Journal of Food Science and Technology*, 55, 10–20.
156. Varela P., Fiszman S.M. (2013). Exploring consumers' knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients. *Food Hydrocolloids*, 30, 477–484.
157. Vaz Patto M.C., Amarowicz R., Aryee A.N.A., Boye J.I., Chung H.-J., Cabrejas M.A., Domoney C. (2015). Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105–143.
158. Verni M., Demarinis C., Rizzello C.G., Baruzzi F. (2020). Design and characterization of a novel fermented beverage from lentil grains. *Foods*, 9, 893.
159. Vidal-Val Verde C., Frías J., Val Verde S. (1992). Effect of processing on the soluble carbohydrates content of lentil. *Journal of Food Protection*, 55, 301–304.
160. Vishwanathan K.H., Singh V., Subramanian, R. (2011). Wet grinding characteristics of soybean for soymilk extraction. *Journal of Food Engineering*, 106, 28–34.
161. Walczak Z., Florowska A., Krygier K. (2017). Napoje roślinne mlekopodobne – charakterystyka i analiza dostępności w Polsce. *Przemysł Spożywczy*, 71, 14–18.
162. Wan Y., Xu M., Gilbert R.G., Yin J., Huang X., Xiong T., Xie M. (2019). Colloid chemistry approach to understand the storage stability of fermented carrot juice. *Food Hydrocolloids*, 89, 623–630.
163. Wang Q., Jiang J., Xiong L. (2018). High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk. *Food Research International*, 106, 487–494.
164. Xia X., Dai Y., Wu H., Liu X., Wang Y., Cao J., Zhou, J. (2019). Effects of pressure and multiple passes on the physicochemical and microbial

- characteristics of lupin-based beverage treated with high-pressure homogenization. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, 13912.
165. Xu J., Bietz J.A., Carriere C.J. (2007). Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chemistry*, 101, 1025–1030.
166. Xu M., Jin Z., Gu Z., Rao J., Chen, B. (2020). Changes in odor characteristics of pulse protein isolates from germinated chickpea, lentil, and yellow pea: Role of lipoxygenase and free radicals. *Food Chemistry*, 314, 126184.
167. Yang M., Li L. (2010). Physicochemical, Textural and Sensory Characteristics of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybean. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 490–496.
168. Yoshiara L.Y., Mandarino J., Carrão-Panizzi M.C., Madeira T.B., da Silva J.B., de Camargo A.C., Shahidi F., Ida, E.I. (2018). Germination changes the isoflavone profile and increases the antioxidant potential of soybean. *Journal of Food Bioactives*, 3, 144–150.
169. Zaheer K., Akhtar M.H. (2017). An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1280–1293.
170. Zahir M., Fogliano V., Capuano E. (2021). Soybean germination limits the role of cell wall integrity in controlling protein physicochemical changes during cooking and improves protein digestibility. *Food Research International*, 143, 110254.
171. Zhang K., Zhang T.-T., Guo R.-R., Ye Q., Zhao H.-L., Huang, X.-H. (2023). The regulation of key flavor of traditional fermented food by microbial metabolism: A review. *Food Chemistry: X*, 19, 100871.
172. Zhang L., Chu M., Zong M., Yang J., Lou, W. (2020). Facile and green production of human milk fat substitute through *rhodococcus opacus* fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 9368–9376.
173. Zhang X., Zhang S., Xie B., Sun Z. (2021). Influence of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chickpea Yam Milk. *Journal of Food Quality*, 5523356.
174. Zhao D., Shah N.P. (2014). Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk-tea beverage. *Food Chemistry*, 158, 262–269.
175. Zhao Y., Du S., Wang H., Cai, M. (2014). In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chemistry*, 152, 462–466.

176. Zheng E., Rudman M., Kuang S., Chryss A. (2020). Turbulent coarse–particle suspension flow: Measurement and modelling. *Powder Technology*, 373, 647–659.
177. Zhong Y., Wu L., Chen X., Huang Z., Hu W. (2018). Effects of Food–Additive–Information on Consumers’ Willingness to Accept Food with Additives. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15, 2394.
178. Zhu D., Hettiarachchy N.S., Horax R., Chen P. (2005). Isoflavone Contents in Germinated Soybean Seed. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 147–151.
179. Ziarno M., Bryś J., Parzyszek M., Veber, A. (2020). Effect of lactic acid bacteria on the lipid profile of bean–based plant substitute of fermented milk. *Microorganisms*, 8, 1348.
180. Ziarno M., Zaręba D., Maciejak M., Veber A.L. (2019). The impact of dairy starter cultures on selected qualitative properties of functional fermented beverage prepared from germinated White Kidney Beans. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2, 167–176.

9. DOROBEK NAUKOWY

Wykształcenie:

- 10/2016 – 07/2020 **studia inżynierskie** na kierunku Technologia żywności i żywienie człowieka, Wydział Technologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- 10/2016 – 07/2018 **studia magisterskie** na kierunku Dietetyka, Wydział Żywnienia Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- 10/2013 – 07/2016 **studia licencjackie** na kierunku Dietetyka, Wydział Żywnienia Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Cichońska P.**, Ziarno M. (2022). Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms*, 10, 91. 40 pkt MNiSW; IF = 4,5
2. **Cichońska P.**, Domian E., Ziarno M. (2022). Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages. *Sensors*, 22, 8348. 100 pkt MNiSW; IF = 3,9
3. **Cichońska P.**, Bryś J., Ziarno M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, 13, 16976. 140 pkt MNiSW; IF = 4,9
4. **Cichońska P.**, Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M. (2024). Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination. *LWT – Food Science and Technology*, 199, 116140. 100 pkt MNiSW; IF = 6,0

Pozostały dorobek publikacyjny (chronologicznie):

1. Ziarno M., **Cichońska P.**, Kowalska E., Zaręba D. (2024). Probiotic-Enriched Ice Cream with Fermented White Kidney Bean Homogenate: Survival, Antioxidant Activity, and Potential for Future Health Benefits. *Molecules*, 29(13), 3222. 140 pkt MNiSW; IF = 4,2

2. Ziarno M., Bryś J., Kowalska E., **Cichońska P.** (2023). Effect of metabolic activity of lactic acid bacteria and propionibacteria on cheese protein digestibility and fatty acid profile. *Scientific Reports*, 13, 15363. 140 pkt MNiSW; IF = 4,6
3. **Cichońska P.**, Kowalska E., Ziarno M. (2023). The Survival of Psychobiotics in Fermented Food and the Gastrointestinal Tract: A Review. *Microorganisms*, 11, 996. 40 pkt MNiSW; IF = 4,5
4. **Cichońska P.**, Kowalska E., Ziarno M. (2022). Fermentation of plant-based beverages using lactic acid bacteria – a review. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 32/61 (2), 86–97. 20 pkt MNiSW; IF = 0
5. **Cichońska P.**, Ziębicka A., Ziarno M. (2022). Properties of rice-based beverages fermented with lactic acid bacteria and Propionibacterium. *Molecules*, 27, 2558. 140 pkt MNiSW; IF = 4,6
6. **Cichońska P.**, Domian E., Ziarno M. (2022). The effect of high-pressure homogenization on the texture of fermented bean-based beverages. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, vol. 32/60, nr 1, s.37–45. 20 pkt MNiSW; IF = 0
7. **Cichońska P.**, Ziarno M. (2021). Choices and preferences of young women on plant-based beverages. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, vol. 31/58, nr 1, s.22–28. 20 pkt MNiSW; IF = 0
8. **Cichońska P.**, Pudło E., Wojtczak A., Ziarno M. (2021). Effect of the Addition of Whole and Milled Flaxseed on the Quality Characteristics of Yogurt. *Foods*, 10, 2140. 100 pkt MNiSW; IF = 5,5
9. **Cichońska P.**, Ziarno M. (2021). Wpływ kiełkowania na zawartość wybranych węglowodanów i polifenoli ogółem w napojach z fasoli białej. *ŻYWNOSĆ – Nauka Technologia Jakość*, 28, 86–94. 20 pkt MNiSW; IF = 0
10. Ziarno M., **Cichońska P.** (2021). Lactic Acid Bacteria–Fermentable Cereal– and Pseudocereal–Based Beverages. *Microorganisms*, 9, 2532. 40 pkt MNiSW; IF = 4,9

Rozdziały w monografiach naukowych:

- Cichońska P., Ziarno M., (2021). Production and Consumer Acceptance of Millet Beverages, (W:) Milk Substitutes – Selected Aspects; Ziarno M. (red.), IntechOpen, s.1–14. 5 pkt MNiSW; IF = 0

Doniesienia konferencyjne:

- **Cichońska P.**, Ziarno M. The effect of propionic fermentation on the content of carbohydrates and B vitamins in plant-based beverages. PREVEDA – Interactive Conference of Young Scientists. On-line 10.05–31.05.2021 (poster);
- **Cichońska P.**, Ziarno M. Wpływ kiełkowania na zawartość wybranych węglowodanów i polifenoli ogółem w napojach z fasoli białej. XLV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN. Żywność w strategii Zielonego Ładu. Gdańsk, 1–2.07.2021 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Ziarno M. The opinion of Polish women on selected aspects of plant-based beverages: results of a survey. ELLS Scientific Student Conference 2021. Green (r)evolution – from molecules to ecosystem. On-line, 19–20.11.2021 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Kosk A., Ziarno M. Ocena zdolności wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* do fermentacji napoju z fasoli białej. Konferencja Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu. On-line, 14.12.2021 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Ziarno M. Wpływ homogenizacji wysokociśnieniowej na proces fermentacji napojów z fasoli białej. Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców. Analiza Zagadnienia, Analiza Wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca – Edycja IV. On-line, 05–06.03.2022 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Ziarno M. The antioxidant properties of fermented lentil-based beverages. 1st International PhD Student's Conference: ENVIRONMENT–PLANT–ANIMAL–PRODUCT (ICDSUPL). On-line, 26.04.2022 (poster);
- **Cichońska P.**, Ziarno M., Domian E. Stabilność fermentowanych napojów fasolowych przechowywanych w warunkach chłodniczych. XLVI Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN. Żywność dzisiaj. Lokalna czy globalna? Tradycyjna czy innowacyjna? Poznań, 19–20.05.2022 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Kosk A., Ziarno M. Wpływ fermentacji z wykorzystaniem wybranych szczepów bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* na profil kwasów tłuszczowych analogów mleka na bazie fasoli. II Konferencja Młodych

- Naukowców. Nowoczesne rolnictwo dla biogospodarki. On–line 01.06. 2022 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Kowalska E., Włodarczyk K. Ziarno M., Survival of yoghurt bacteria in model digestive juices. PREVEDA – Interactive Conference of Young Scientists. On–line 06.06–31.06.2022 (poster);
 - Kowalska E., **Cichońska P.**, Tomczuk A., Ziarno M., Characterization of fermented milk and plant beverages with the Vitessence Pulse preparations addition. PREVEDA – Interactive Conference of Young Scientists. On–line 06.06–31.06.2022 (poster);
 - **Cichońska P.**, Sakwa I., Ziarno M. Wpływ ekstraktów roślinnych i olejków eterycznych na właściwości antagonistyczne bakterii probiotycznych w stosunku do bakterii z rodzaju *Clostridium*. V konferencja doktorantów "Cztery żywioły–współczesne problemy w naukach o życiu". On–line 14.12.2022 (prezentacja);
 - **Cichońska P.**, Ziarno M. Trends and challenges in the production of milk substitutes. 6th International ICONTECH Conference on innovative surveys in positive sciences. On–line 4–5.12.2022 (prezentacja);
 - **Cichońska P.**, Ziarno M. The effect of germination and fermentation on the properties of lentil–based milk substitutes. Food Symposium 3.0 – LSU AgCenter / MENDELU / SGGW. USA, On–line 20–24.03.2023 (prezentacja);
 - **Cichońska P.**, Ziarno M. Factors affecting the fermentation of bean–based milk substitutes. 2nd International PhD Student’s Conference at the University of Life Sciences in Lublin, Poland: ENVIRONMENT– PLANT–ANIMAL–PRODUCT (ICDSUPL). On–line 19–20.04.2023 (poster);
 - **Cichońska P.**, Ziarno M. Wpływ fermentacji na właściwości odżywcze substytutów mleka z nasion roślin strączkowych. Nowe trendy w badaniach naukowych – wystąpienie młodego naukowca, Edycja VII. On–line 20–22.10.2023 (prezentacja);
 - **Cichońska P.**, Roszko M., Ziarno M. Effect of fermentation on the volatile compounds of lentil–based beverages. Microorganisms and their metabolites – a microworld of great opportunities and dangers. On–line 29–30.11.2023 (prezentacja);

- **Cichońska P.**, Ziarno M. Wpływ kiełkowania na profil węglowodanowy napoju z fasoli białej. VI konferencja doktorantów "Cztery żywioły– współczesne problemy w naukach o życiu". On–line 14.12.2023 (prezentacja);
- **Cichońska P.**, Ziarno M. Kostyra E., Piotrowska A. Wpływ wybranych zabiegów technologicznych na właściwości sensoryczne napoju z fasoli. XXVIII Sesja Naukowej Sekcji Młodej Kadry Naukowej pt. „Żywność wobec wyzwań współczesnego świata”. Gdańsk, 16–17.05.2024 (prezentacja);

Staż naukowy:

- Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego w Warszawie, w terminie 17.05.2021 r. – 15.06.2021 r., w wymiarze 168 godzin. Zakres merytoryczny stażu obejmował badania nad izolacją i charakterystyką drobnoustrojów wykorzystywanych do ukwaszania mleka.

Nagrody i wyróżnienia:

- Wyróżnienie wydane przez Polskie Towarzystwo Technologów Żywności w kategorii publikacje badawcze, jako najlepsza praca opublikowana w 2021 roku (Artykuł pt. „Wpływ kiełkowania na zawartość wybranych węglowodanów i polifenoli ogółem w napojach z fasoli”, ŻNTJ, 2021, 28, 3 (128), 86–94.);
- Nagroda za jedno z najczęściej cytowanych artykułów w czasopiśmie *Microorganisms* w 2022 roku dla publikacji: Cichońska P., Ziarno M. 2022. Legumes and Legume–Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms* 2022, 10(1), 91;
- Dyplom uznania Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – nagroda zespołową III stopnia za osiągnięcia badawcze, wrzesień 2022, Warszawa, Polska;
- Dyplom uznania Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – nagroda zespołową III stopnia za osiągnięcia badawcze, wrzesień 2023, Warszawa, Polska;
- Wyróżnienie za wygłoszony referat (Cichońska P., Ziarno M. Wpływ fermentacji na właściwości odżywcze substytutów mleka z nasion roślin

- strączkowych) podczas konferencji „Nowe trendy w badaniach naukowych – wystąpienie młodego naukowca, Edycja VII”. On–line 20–22.10.2023;
- Wyróżnienie za wygłoszony referat (Cichońska P., Ziarno M. Wpływ kiełkowania na profil węglowodanowy napoju z fasoli białej) podczas VI konferencji doktorantów "Cztery żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu". On–line 14.12.2023.

Pozostały dorobek naukowy i organizacyjny:

- Szkolenia i webinaria tematyczne obejmujące zakres pracy doktorskiej, w tym m.in. jakości mikrobiologicznej żywności wegańskiej, technik pipetowania, badania rynku i testowania produktów, analiz chromatograficznych GC i HPLC, materiałów do kontaktu z żywnością;
- Szkolenia i webinaria z zakresu doskonalenia umiejętności miękkich, w tym m.in. tworzenia prezentacji multimedialnych, pisanie artykułów naukowych, wyboru czasopism naukowych, komunikacji w miejscu pracy, umiejętności interpersonalnych, zarządzania projektami, wystąpień publicznych;
- Czynny udział w dniach otwartych SGGW i w dniach SGGW w latach 2021–2024;
- Opieka nad pracami dyplomowymi (magisterskimi i inżynierskimi) pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Ziarno, prof. SGGW;
- Członkostwo w Polskim Towarzystwie Technologów Żywności (Oddział Warszawski) w latach 2021–2024;
- Pisanie artykułów popularnonaukowych do czasopism Forum Mleczarskie i Przegląd Mleczarski.

**10. PUBLIKACJE STANOWIĄCE PRACĘ DOKTORSKĄ WRAZ Z
OŚWIADCZENIAM I WSPÓLAUTORÓW**



Review

Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics

Patrycja Cichońska * and Małgorzata Ziarno

Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW (WULS-SGGW), 02-787 Warsaw, Poland; malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl

* Correspondence: patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

Abstract: Fermentation is widely used in the processing of dairy, meat, and plant products. Due to the growing popularity of plant diets and the health benefits of consuming fermented products, there has been growing interest in the fermentation of plant products and the selection of microorganisms suitable for this process. The review provides a brief overview of lactic acid bacteria (LAB) and their use in fermentation of legumes and legume-based beverages. Its scope also extends to prebiotic ingredients present in legumes and legume-based beverages that can support the growth of LAB. Legumes are a suitable matrix for the production of plant-based beverages, which are the most popular products among dairy alternatives. Legumes and legume-based beverages have been successfully fermented with LAB. Legumes are a natural source of ingredients with prebiotic properties, including oligosaccharides, resistant starch, polyphenols, and isoflavones. These compounds provide a broad range of important physiological benefits, including anti-inflammatory and immune regulation, as well as anti-cancer properties and metabolic regulation. The properties of legumes make it possible to use them to create synbiotic food, which is a source of probiotics and prebiotics.

Keywords: lactic acid bacteria; fermentation; legumes; plant-based beverages; legume-based beverages; bioactive metabolites; probiotics; prebiotics



Citation: Cichońska, P.; Ziarno, M. Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics.

Microorganisms **2022**, *10*, 91.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10010091>

Academic Editor: Stefan Junne

Received: 28 November 2021

Accepted: 29 December 2021

Published: 31 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fermentation is a natural food preservation method that has been used for centuries. Initially, this process was carried out spontaneously with microorganisms naturally present in food, whereas currently, selected starter cultures with specific compositions are used to this end [1]. The fermentation process is done by lowering the pH of the food, using microorganisms that convert the sugars present in the product into acid. It is most often accomplished with lactic acid bacteria (LAB), which produce lactic acid as the major product of carbohydrate metabolism [2–6]. Some microorganisms in this group also exhibit probiotic properties, and their consumption is beneficial to selected aspects of human health (e.g., gastrointestinal function, immunity) [7,8]. Fermentation is widely used in the processing of dairy, meat, and plant products [7,9]. In fermented foods, LAB shape the taste, texture, nutritional value, and produce of beneficial metabolites that affect the functional and healthy properties of food products [2]. Due to the growing popularity of plant diets and the health benefits of consuming fermented products, there has been growing interest in the fermentation of plant products and the selection of microorganisms suitable for this process. The expanding range of alternatives to dairy products has spurred new research into plant products as matrices for the production of fermented and probiotic products [10–12].

The global dairy alternatives market was valued at USD 20.50 billion in 2020 and is expected to expand at a compound annual growth rate (CAGR) of 12.5% from 2021 to 2028 [13]. A global survey conducted in 2019 showed that 40% of the surveyed consumers try to limit their consumption of animal proteins, which resulted from concerns about

climate change [14]. Plant-based beverages are among the most popular dairy alternatives, usually treated as analogues of cow's milk. The milk-based dairy alternatives product segment led the market and accounted for a revenue share of more than 67.0% in 2020 [13].

The main drivers of the plant-based beverage boom are the growing popularity of the plant-based diets and the growing concern for the environment among consumers [15,16]. Plant-based beverages are also consumed by people who are lactose intolerant, allergic to cow's milk proteins, and interested in low-cholesterol foods [15,16]. With the growing number of consumers choosing alternatives to cow's milk, the demand for non-dairy probiotic foods (both fermented and unfermented) is increasing. However, so far, probiotics have been used for enrichment mainly in dairy products due to their natural occurrence, properties, and widespread availability [17,18].

The most popular among the alternatives to cow's milk are beverages made from soybeans, which are a type of legume [19,20]. However, there are also other legumes highly suitable for the production of plant-based beverages, e.g., beans, peas, and chickpeas [21]. Legumes are a source of carbohydrates, dietary fiber, and proteins, and they are rich in bioactive ingredients (including, e.g., polyphenols and phytosterols) [22]. Legumes are also a potentially suitable matrix for the fermentation process [23]. The development of legume-based beverages, subject to additional fermentation, can help expand and enrich the range of milk alternatives available [24]. With that in mind, the aim of this review was to evaluate legumes and legume-based beverages fermented with LAB as a potential carrier of probiotics and prebiotics. The review provides a brief overview of lactic acid bacteria (LAB) and their use in the fermentation of legumes and legume-based beverages. Its scope also extends to prebiotic ingredients present in legumes and legume-based beverages that can support the growth of LAB.

2. Lactic Acid Bacteria (LAB)

2.1. Characteristics of LAB

Lactic acid bacteria (LAB) are a phylogenetically heterogeneous group of Gram-positive bacteria that share metabolic and physiological characteristics [25]. These bacteria ferment carbohydrates into lactic acid (homofermentation), or into lactic acid, ethanol, and CO₂ (heterofermentation) [7,9]. Sugars are fermented mainly under anaerobic conditions, but some species produce more lactic acid in the presence of a small amount of oxygen, e.g., *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*, and *Leuconostoc mesenteroides*. They are non-sporulating cocci or bacilli, low in guanine and cytosine in chromosomal DNA (not more than 53 mole% of G + C pairs). LAB do not produce catalase, instead synthesizing superoxide dismutase, which removes reactive oxygen species [9,26–28]. The majority of LAB belongs to the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* [7,9,25,27]. LAB are generally associated with the order of Lactobacillales (phylum Firmicutes); however, bacteria of the genus *Bifidobacterium* (phylum Actinobacteria) are often grouped together with them. *Bifidobacterium* are strictly anaerobic Gram-positive bacteria that also produce lactic acid as a major product of carbohydrate metabolism [2,29].

Lactic bacteria have the ability to regulate intracellular pH and thus survive in a relatively low pH environment [9]. LAB grow until the carbohydrates, amino acids, and other substances necessary for life are consumed in the medium; until toxic or growth inhibitory substances (e.g., hydrogen peroxide) accumulate; or until the concentration of hydrogen ions drops below the tolerance limits of the bacteria. For example, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Streptococcus thermophilus* are grown in milk until the pH of the environment drops to 4.5, even if the nutrient stock is unlimited [3,9,30].

Due to the limited biosynthetic capacity of some compounds (called auxotrophy), LAB occur in environments rich in amino acids, vitamins, purines, and pyrimidines [9]. In laboratory conditions, LAB cultures are grown in media containing tryptone, yeast extract, and lactose. Lactose-free strains are cultured in glucose-containing media. Some of them

are free living organisms, while others live in association with vertebrate animals and can also be found in humans and animals as potential pathogens (e.g., *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*) [9,30]. Although most LAB are vitamin auxotrophs, some strains have the ability to synthesize water soluble vitamins, mainly B vitamins (including folates, riboflavin, and vitamin B12). For example, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* have the ability to produce folates, while *Lactococcus reuteri* have the ability to biosynthesize cobalamin [31].

LAB play an important role in many industrial sectors, including agricultural, food, and clinical [7,9]. In nature, these microorganisms occur in fermented dairy, meat, and vegetable products, in the digestive and urogenital tracts of humans and animals, as well as in soil and water [7,9,25,27]. LAB are generally considered safe for human consumption. Most of them are classified as GRAS (generally recognized as safe). Currently, the most common use of LAB is as starter cultures for the production of fermented foods. Some LAB have been classified as probiotic [2]. In addition, they are widely used in the industrial production of lactic acid, polyols, vitamins, and food ingredients due to their resistance to environmental stress and their versatile metabolic properties. In fermented foods, LAB shape the taste, texture, and nutritional value of products, mainly by performing glycolysis (sugar fermentation), lipolysis (fat breakdown), and proteolysis (protein breakdown) [2,28]. Their use as starter cultures is motivated not only by their production of lactic acid, but also the production of beneficial metabolites that affect the taste and properties of food products, including organic acids, alcohols, aldehydes, esters, sulfur compounds, polyols, exopolysaccharides, and antimicrobial compounds. The starter cultures used in the food industry most often include LAB from the genera *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* [2,32].

2.2. Fermentation with LAB

LAB are widely used in the fermentation of animal and plant products [9,18,33,34]. Their main application is in the fermentation of dairy products (e.g., yoghurt, kefir, buttermilk, koumiss, cheese) [35,36], meat [37], fish [38], fruit [39], vegetables [40], and cereal products [41]. LAB fermentation is one of the main forms of food preservation that does not require the use of chemical food additives [7]. LAB lower the pH of food, inhibit the growth of putrefactive bacteria, improve the organoleptic properties of food, enhance the nutrient profile, and optimize health benefits. LAB enzymes (including amylases, proteases, and lipases) hydrolyze polysaccharides, proteins, and lipids into flavors, fragrances, and texture modifiers and confer properties attractive to consumers [18,42].

LAB grow in the temperature range of 10 to 45 °C, salinity of 6.5% NaCl, and pH between 4 and 9.6. The fastest LAB-mediated fermentation and biomass production processes take place at a temperature of 26 to 42 °C, whereas the bacteria themselves are mostly grown at a temperature of 35–37 °C [9]. LAB can be classified as homofermentative or heterofermentative organisms, based on their ability to ferment carbohydrates. Homofermentative LAB (e.g., *Lactococcus*, *Streptococcus*) use the EM glucose degradation pathway (Embden–Meyerhof) and produce two lactate molecules from one glucose molecule. Heterofermentative bacteria (e.g., *Leuconostoc*, *Wiessella*) catabolize glucose along the 4PP (pentose phosphate) pathway and produce lactate, ethanol, and carbon dioxide from a single glucose molecule [7,9,25].

Traditionally, fermentation was carried out mainly by inoculating the food with a sample of a previously fermented product, which is known as backslopping. However, the products obtained via this process were of heterogeneous quality [2]. Currently, LAB are predominantly added to products in the form of commercial, freeze-dried starter cultures, which enables the production of homogeneous, high quality products on a large scale. The starter cultures are divided into defined- and mixed-strain cultures. Strain-defined cultures are pure cultures with known physiological and technological characteristics. They consist of two to six strains, used in rotation either as paired single strains or as multiple strains, and can be used to make high quality products on an industrial scale. Mixed

strain cultures contain an unknown number of strains of the same species and may also contain bacteria from different LAB species or genera [2]. The most common use of starter cultures is in dairy production. The bacteria associated with fermented milk products are the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, and *Bifidobacterium*. In the production of fermented dairy products, LAB are used as primary starter cultures involved in the acidification of the product (e.g., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp.) and also as secondary starter cultures responsible for shaping aroma, taste, and texture (e.g., *Propionibacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Debaryomyces* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Enterococcus* sp.) [7,42].

In addition to the ability to bio-serve food, LAB can also synthesize other substances that affect the organoleptic characteristics of food and its properties [7,32]. LAB require essential amino acids and peptides to grow, which are released in the process of proteolysis of proteins present in the raw material. They are capable of degrading the fats in dairy products, turning them into methyl ketones, lactones, thioesters, and hydroxy acids, which give dairy products their ultimate flavor. The products of these conversions help develop the characteristic organoleptic features of fermented products [7,9,32]. The fermentation process has also been found to elicit a beneficial effect on reducing the content of anti-nutritional factors (ANFs), e.g., phytates and protease inhibitors, in plant products [18]. In addition, LAB have the ability to produce antimicrobial substances called bacteriocins, which are ribosome-synthesized peptides that exhibit antimicrobial activity, can inhibit pathogenic microflora in food [7,43,44], and are usually secreted outside the bacterial cell. Bacteriocins synthesized by LAB strains, including those of the genera *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Carnobacterium* sp., or *Leuconostoc* sp., are considered safe to be used in food production [32,45,46].

LAB also include bacteria recognized as probiotic [8]. Probiotics were originally defined as microorganisms that promoted the growth of other microorganisms [8,29]. In recent years, they have been more precisely defined as mono- or mixed cultures of living microorganisms which, when administered to an animal or a human, are beneficial for the host, improving the properties of the native microflora. In the context of food, probiotics are defined as preparations or dietary supplements that improve human and animal health [8,29]. Their function is to restore the natural state of the human microflora that has been disturbed by improper nutrition, disease, or the healing process. The main purpose of consuming probiotics—whether as food and pharmaceutical preparations—is for their beneficial effect on the colonic microflora [18]. Probiotics can be consumed in fermented foods or in the form of capsules, pills, and tablets [17]. In order for a probiotic strain to be considered for human use, it should be isolated from the human microflora, which grants it a high capacity for adhesion to the human intestinal cell walls. The strain must also be safe and not pose a threat to the host. The probiotic microorganisms most extensively isolated from fermented foods and from the animal/human digestive systems include *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, and *Leuconostoc* [7,47].

Various mechanisms underlying the action of probiotics have been considered. In general, probiotics elicit a positive effect on the human body, e.g., by competing with pathogenic bacteria to bind to the cells of the intestinal epithelium; enhancing the function of the intestinal epithelial barrier; inhibiting the growth of pathogens by secreting antimicrobial peptides; stimulating the production of immunoglobulins; enhancing phagocytosis; increasing the activity of NK (Natural Killer) cells; promoting cellular immunity against pathogens; and preventing inflammation [7]. In addition to lactic acid, probiotic LAB produce several bioactive metabolites (antimicrobial and shelf-life extending), such as organic acids, short-chain fatty acids, carbohydrates, antimicrobial peptides, enzymes, vitamins, cofactors, or immune signaling compounds—these substances are also known as postbiotics [48].

Consuming probiotics is beneficial to many aspects of health, especially in the prevention and treatment of infections and gastrointestinal diseases. The therapeutic uses of probiotics also include the prevention of genitourinary diseases, constipation relief, protec-

tion against traveler’s diarrhea, management of hypercholesterolemia, protection against colon and bladder cancer, as well as prevention of osteoporosis and food allergies [7,8,49]. Additionally, the consumption of probiotic bacteria prevents obesity, type II diabetes and cardiovascular diseases, while also stimulating the immune system. Probiotics help relieve the symptoms of lactose intolerance by producing the enzyme galactosidase (lactase), which breaks down lactose into simple sugars [7,8,29,49,50]. The health benefits of consuming probiotic LAB may result from the combination of viable microorganisms contained in fermented foods and bioactive ingredients released into the food as by-products of the fermentation process [51]. Healthy benefits of foods fermented with probiotic LAB are summarized in Table 1.

Table 1. Healthy benefits of foods fermented with probiotic LAB.

Type of Food Product	Probiotic Microorganisms Used for Fermentation	Healthy Effects	References
Milk	<i>Lactocaseibacillus casei</i> Shirota	<ul style="list-style-type: none"> improvement of stool quality and frequency, lower water content in stools; increase in the intrinsic <i>Bifidobacteria</i> 	Matsumoto et al., 2010 [52]
Dairy drink	<i>Lactocaseibacillus casei</i> DN-114 001	<ul style="list-style-type: none"> reduction of the average duration and of common infectious diseases 	Guillemard et al., 2009 [53]
Milk	<i>Bifidobacterium breve</i> YIT 12272, <i>Lactococcus lactis</i> YIT 2027, <i>Streptococcus thermophilus</i> YIT 2021.	<ul style="list-style-type: none"> increase in the hydration levels of the stratum corneum, defecation frequency, feces quantity, and clearness of the skin 	Mori et al., 2016 [54]
Milk	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> influence activity of brain regions that control central processing of emotion and sensation 	Tillisch et al., 2013 [55]
Milk	<i>Lactocaseibacillus casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> reduction in the incidence of antibiotic associated diarrhea and <i>Clostridium difficile</i> associated diarrhea 	Hickson et al., 2007 [56]
Milk	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> reduction in the arterial stiffness in hypertensive subjects 	Jauhiainen et al., 2010 [57]
Mung and adzuki bean sprouts	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 299v	<ul style="list-style-type: none"> cytostatic and cytotoxic activity 	Świeca et al., 2020 [58]
Soybean	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> var. <i>plantarum</i> C29	<ul style="list-style-type: none"> ameliorating effect against memory impairments 	Yoo and Kim, 2015 [59]
Grape	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> increase in the release and the intracellular content of inflammatory and anti-inflammatory cytokines; potential therapeutic measure to mitigating neuroinflammation in pathologies such as Parkinson’s disease and Alzheimer’s disease 	Marzulli et al., 2012 [60]
Litchi juice	<i>Lactocaseibacillus casei</i> CICC 6117	<ul style="list-style-type: none"> enhance the immune organs indexes and the antioxidant capacity; increase in the secretions of cytokines and immunoglobulins; protection of the intestinal tract; alleviation of immune dysfunction and beneficial modification of gut microbiota structure 	Wen et al., 2020 [61]

3. Characteristics of Legumes

Legumes are a staple food in many countries around the world. The most commonly eaten varieties are beans, faba beans, chickpeas, peas, lentils, cowpeas, lupins, and soybeans [62–64]. Legumes are suitable for growing under adverse environmental conditions and in a variety of growing systems due to their low input requirements, short growing season, and nitrogen fixation capacity [64]. As shown in Table 2, legumes are a rich source of carbohydrates (30–60% of total content), dietary fiber (9–25%), and protein (19–36%) containing the necessary amino acids such as lysine, leucine, and arginine [22,65,66]. The carbohydrates include monosaccharides, oligosaccharides, other polysaccharides, and starch. In legumes, starch is the main source of available carbohydrates (22–45% of total content) along with oligosaccharides (1.8–18%) and dietary fiber (4.3–25%). Legumes are usually low in fat and contain no cholesterol, with a favorable fatty acid profile dominated by unsaturated fatty acids (Table 2). They are also a good source of iron, calcium, zinc, selenium, magnesium, phosphorus, copper, potassium, and B-group vitamins; however, they

are poor in vitamin C and fat-soluble vitamins. The moisture content of all dry legumes varies between 9 and 3%, which makes them suitable for long-term storage [64,67].

Table 2. The nutritional value of selected raw legumes, according to FoodData Central Search Results by U.S. Department of Agriculture [65].

Type of Legumes	Energy (kcal/100 g)	Protein (g/100 g)	Total Lipid (g/100 g)	Fatty Acids, Total Saturated (g/100 g)	Fatty Acids, Total Mono- and Polyunsaturated (g/100 g)	Carbohydrate (g/100 g)	Fiber (g/100 g)
Soybean	446.0	36.5	19.9	2.88	15.7	30.2	9.3
Bean, white	333.0	23.4	0.85	0.2	0.4	60.3	15.2
Bean, black	341.0	21.6	1.42	0.3	0.7	62.4	15.5
Bean, adzuki	329.0	19.9	0.53	0.2	0.2	62.9	12.7
Faba bean	341.0	26.1	1.53	0.2	0.9	58.3	25.0
Chickpea	378.0	20.5	6.0	0.6	4.1	63.0	12.2
Pea, pigeon	343.0	21.7	1.5	0.3	0.8	62.8	15.0
Lentil, red	358.0	23.9	2.2	0.4	1.6	63.1	10.8
Lupin	371.0	36.2	9.7	1.1	6.4	40.4	18.9
Cowpea, catjang	343.0	23.8	2.1	0.5	1.1	59.6	10.7

Legumes contain bioactive substances that play a significant metabolic role in the human body. Their action can be considered positive, negative, or in some cases, both. Dietary fiber, resistant starch, polyphenols, and phytosterols are referred to as health-promoting ingredients [63,68,69]. Legumes are rich in both soluble and insoluble fiber. The seed coat is rich in water-insoluble polysaccharides, while the cotyledon fiber consists of hemicelluloses, pectin, and cellulose with varying degrees of solubility. Resistant starch is a non-digestible fraction of starch, which, after passing into the large intestine, functions physiologically similarly to dietary fiber [68,70]. Consuming fiber as part of one's daily diet is essential for nominal intestine function, which is implied in lowering the risk of development of many chronic diseases, including colon cancer, heart disease, and diabetes [68,70]. Resistant starch and fiber pass through the stomach and small intestine in undigested form until they reach the colon, where they play a prebiotic role. Fiber and resistant starch also help reduce body weight, increase stool volume, and decrease colon pH, while also lowering serum cholesterol and triglycerides. In addition, they reduce the glycemic index of legumes, regulating postprandial glycemia and insulin sensitivity [64,68,70].

The polyphenols present in legumes are bioactive compounds that have a broad therapeutic potential due to their antioxidant activity. They work by delaying or preventing the oxidation of lipids, proteins, and DNA by reactive oxygen species [68,71]. The amino acids of legume proteins (mainly tyrosine, phenylalanine, tryptophan, and cysteine) also exhibit antioxidant properties that result from their ability to donate protons to free radicals [72]. Epidemiological evidence shows that dietary intake of legume antioxidants provides a protective effect against certain chronic diseases associated with oxidative stress such as cardiovascular disease, cancer, obesity, diabetes, and hypercholesterolemia [67,68,72].

Phytosterols are plant sterols with a structure similar to cholesterol. These compounds belong to the group of steroid alcohols that occur naturally in legumes. As a natural component of plant structures, phytosterols contribute to the regulation of the fluidity and permeability of cell membranes [73,74]. The most common phytosterols are β -sitosterol, campesterol, and stigmasterol [73,74]. Phytosterols are well known for a wide range of health benefits, the most important of which are lowering blood LDL cholesterol and reducing its absorption in the intestine [64,68].

Certain bioactive substances of legumes have been found to be ANFs. Some of them play an important role in the mechanisms used by plants to protect themselves against predators or environmental conditions, while others are storage compounds, accumulated in seeds as an energy reserve [62,75,76]. The major ANFs of legumes include oligosaccharides from the raffinose family, protease inhibitors, phytates, and saponins. These factors, apart from their negative impact on the body, often also have a positive and health-promoting effect, which has provoked some debate as to whether it is necessary to reduce their content in legumes [62,75].

Oligosaccharides are carbohydrates from the raffinose family, including, i.e., raffinose, stachyose, and verbascose [62,68]. They are well known as ANFs that cause gas and discomfort upon consumption of legumes as a result of α -galactosidase depletion in the human body [62,77]. When ingested, they pass into the large intestine, where they are anaerobically fermented by intestinal bacteria to produce hydrogen, carbon dioxide, and methane [75]. However, these oligosaccharides are also considered a component of dietary fiber and may show prebiotic effects by stimulating the growth of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* beneficial for the intestines and limiting the development of putrefactive *Enterobacteria* in the colon [62,68,75].

Protease inhibitors in legumes inhibit the action of digestive enzymes, such as trypsin and chymotrypsin, through competitive binding [22,75]. These inhibitors can reduce protein digestibility and nutrient absorption. On the other hand, they are considered to be natural bioactive substances that may have anti-cancer effects [62,75,78].

Phytates are salts of phytic acid, which, when consumed in tandem with legumes, may reduce the bioavailability of minerals and limit enzymatic digestion of starch and proteins [62,64]. Excess phytic acid forms insoluble complexes with copper, zinc, iron, and calcium, limiting their availability in the intestine [64,78]. However, there are some beneficial effects of phytic acid, such as reducing bioavailability and toxicity of heavy metals (e.g., cadmium and lead) present in food. Phytates also elicit antioxidant, anti-cancer, and DNA-protective effects [64,75].

Saponins are irritating to the stomach and can also inhibit the absorption of nutrients in the intestine [64,75]. The potential benefits of consuming saponins include reduced risk of development of cardiovascular disease and certain cancers. Some research suggests that saponins may lower cholesterol by forming insoluble complexes with it in the intestine [75].

ANFs in legumes are usually removed by applying a number of technological treatments such as soaking, microwaving, extrusion, steaming, boiling, roasting, infrared, starch modification, germination, and fermentation [22,69,75,76]. These treatments also improve the taste of these raw materials, increase the bioavailability of nutrients, and increase the digestibility and absorption of starch and protein [64,75]. Modification of starch (total or partial gelatinization) not only contributes to reducing the content of ANFs in legumes but also affects the technological properties by improving emulsifying, foaming, water retention capacity, and thickening [79,80]. Some of the ANFs in legumes are reduced during initial processing—heat treatment and soaking of the raw materials. Soaking partially reduces the oligosaccharide content. Higher levels of oligosaccharides have been demonstrated in legumes that have not been soaked before the heat treatment [77]. For example, in lentils, heat treatment almost completely eliminates the trypsin inhibitors—tannins and phytic acid. However, it also reduces the content of minerals and some amino acids (lysine, tryptophan, and sulfur-containing amino acids) [81]. Some of the ANFs (e.g., tannins and saponins) are thermally stable, but their content can be reduced by sprouting and/or fermentation [75]. Fermentation reduces the content of thermostable ANFs in legumes, which leads directly to an increase in digestibility of proteins and bioavailability of certain nutrients [77,78].

4. Fermentation of Legumes Using LAB

Fermented legumes have been consumed by humans for centuries [82]. Currently, legume fermentation is widely used in the production of intermediate bakery products (e.g., cookies, pasta, bread), ingredients for Asian cuisine, substitutes for dairy products, and as

an ingredient of animal feed [83–86]. The addition of fermented legumes to food products may improve their technological properties and nutritional value, e.g., by increasing the protein digestibility and mineral availability, reducing the ANFs content, and improving the viscosity of the final product [87–98]. The use of legumes fermented with LAB as ingredients of various types of food is summarized in Table 3.

Table 3. The use of legumes fermented with LAB as ingredients of various types of food.

Type of Food	Type of Legume Used as A Food Ingredient	Microorganisms Used for Fermentation	Effect of the Addition of Fermented Legumes	References
Bread	Lupin	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> C48, <i>Levilactobacillus brevis</i> AM7	<ul style="list-style-type: none"> increase in the concentrations of free amino acids, soluble fiber, γ-aminobutyric acid (GABA) and total phenols; increase in the antioxidant activity 	Curiel et al., 2015 [91]
Bread	Faba bean	<i>Weissella confusa</i> VTT E–143403 (E3403)	<ul style="list-style-type: none"> increase in the viscoelastic properties and specific volume; decrease in the crumb hardness 	Wang et al., 2018 [92]
Bread	Chickpea	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the oligosaccharide content; increase in the free amino acids, lysine, and total phenolic content 	Galli et al., 2019 [87]
Cookies	Lupin	<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the asparagine and sugar contents; decrease in the acrylamide content 	Bartkiene et al., 2016 [93]
Pasta	Faba bean	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DPPMAB24W	<ul style="list-style-type: none"> increase in the protein digestibility, nutritional indexes, and resistant starch content; decrease in the starch hydrolysis rate, without adversely affecting technological and sensory features 	Rizzello et al., 2017 [94]
Tempeh	White bean	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM 20174	<ul style="list-style-type: none"> increase in the protein, in vitro protein bioavailability, and antioxidant capacity; decrease in the stachyose, verbascose, and condensed tannins content 	Starzyńska-Janiszewska et al., 2013 [95]
Ogi	Soybean	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<ul style="list-style-type: none"> increase in the protein, fat, iron and calcium content; decrease in the raffinose content; improvement of organoleptic attributes 	Adeyemo and Onilude, 2018 [96]
Yogurt-style snack	Chickpea, lentil	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM33326, <i>Levilactobacillus brevis</i> DSM33325	<ul style="list-style-type: none"> increase in the concentration of free amino acids and in vitro protein digestibility; decrease in the ANFs (i.e., phytic acid, condensed tannins, saponins and raffinose) content; 	Pontonio et al., 2020 [97]
Camel milk and cow milk yogurt	Soybean	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium</i> Bb-12, <i>Lactocaseibacillus casei</i> LC-01, <i>Streptococcus thermophilus</i> Th-4 and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<ul style="list-style-type: none"> increase in the antioxidant activity; increase in the viability of LAB 	Shori, 2013 [98]

LAB often represent the indigenous microflora of legumes. Therefore, in the production of fermented legumes, fermentation is induced not only by inoculation of raw material with LAB but also through spontaneous fermentation [84]. The use of LAB induces changes in the organoleptic, functional, and technological properties of legumes. The type and extent of these changes depend on the raw material, the bacterial species used, and the fermentation parameters. LAB are characterized by a variety of pathways to produce acids and other metabolites [99]. The fermentation of plant matrices is dependent upon their ability to adapt rapidly and metabolize the available nutrients. Adaptation is species- and strain-specific, as well as determined by the plant material. This is due to the diversity of plant environments and inherent chemical/physical parameters, such as phenols, fermentable carbohydrates, and environmental pH, which determine whether conditions are optimal for bacterial growth. The same microorganisms can behave differently in plant and animal matrices. Not all strains are endowed with an optimal portfolio of enzymes and metabolic traits, and therefore it is necessary to properly adapt the plant matrix and microorganisms for fermentation [100].

The selection of suitable microorganisms is based on whether they improve or impair the properties of the raw material. Poorly chosen microorganisms may negatively

affect functional properties, e.g., by reducing protein solubility and emulsifying capacity [99]. Strain-specific metabolic features of the LAB, in synergy with the activity of plant enzymes, can improve the bioavailability and bioactivity of phytochemicals while also significantly boosting functional microbial metabolites, with beneficial consequences for human health [100–102]. Landete et al. (2015) [103] fermented flours from yellow soy beans and Mung beans. Fermentation with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* promoted bioactivity due to conversion of glycosylated isoflavones into bioactive aglycones. Moreover, an increase in the content of the bioactive vitexin tryptophan was observed [103].

In the production of fermented foods, optimization of the process parameters is crucial. Excessive fermentation time may result in compounds with undesirable properties. For example, fermenting pea protein isolate for 24 h yielded more acceptable products compared to the 48 h fermented samples [99]. Longer fermentation time induced the production of metabolites unappealing to consumers. In another study, by Shi et al. (2021) [104], the fermentation parameters influenced the properties of fermented legumes. The soluble protein levels in pea protein isolate (PPI) decreased at longer fermentation times, and the protein profile changed after 15 h of fermentation. A 10-hour fermentation process was found to be optimal for *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* in terms of removing off-flavor while maintaining protein functionality. About 42% of the aldehydes and 64% of the ketones were removed and a small amount of alcohol was produced. This change in the aroma profile was found desirable for PPI products that would be used in the production of yoghurt substitutes [104].

Legumes subjected to fermentation are often of higher nutritional value than unfermented seeds [82]. Legume fermentation may improve protein digestibility and related nutritional values while increasing the biological availability of total fiber and phenols [84,105]. Fermentation can increase the levels of vitamins, amino acids, minerals, and short-chain fatty acids [106]. The improvement in the nutritional profile of legumes upon LAB fermentation is mainly due to the release of amino acids and bioactive compounds, reducing the amount of ANFs through direct (activation of microbial enzymes) and indirect action (activation of endogenous enzymes), while also enhancing in vitro protein digestibility and antioxidant potential [107,108].

Soybean fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* has been shown to improve protein digestibility and the total phenolic content by the end of fermentation [109]. In addition to increasing the nutritional value of legumes, fermentation also facilitates biological preservation of food by action of the various antimicrobial compounds produced by LAB, including bacteriocins, H₂O₂, CO₂, and organic acids that inhibit the growth of harmful microorganisms [106,110].

Consumption of selected fermented legumes has been linked to a reduction in the incidence and severity of chronic diseases such as cardiovascular disease, breast and prostate cancer, menopausal symptoms, and bone loss [82,111–114]. Fermentation of bean extracts with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* may have a potential antihypertensive effect due to the high content of GABA (gamma-aminobutyric acid) and the activity of ACEI (angiotensin converting enzyme) [114]. Likewise, fermentation of pea seeds with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* resulted in potentially antihypertensive peptides being released during in vitro digestion [115]. Sweet lupine flour fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* and *Limosilactobacillus reuteri* has shown noticeable antiproliferative activity against Caco-2 and MCF-7 cancer cell lines [116].

Fermentation increases the content of antioxidant components such as phenolic compounds, peptides, protein derivatives, and vitamins that are released or produced by a complex microbial enzyme system [117–119]. The metabolic activity of microorganisms varies across species and strains, which is why the exact increase in antioxidant activity in the fermented material is determined by the starter culture used [118]. Polyphenols are the main natural antioxidants present in food; however, they are often bound to the cell wall, glycosylated or in polymeric form, which affects their bioavailability [118]. The metabolic

activity of LAB may induce their release or conversion into more active forms. Fermentation also influences the bioavailability of other compounds, such as vitamins and exopolysaccharides, further enhancing their antioxidant activity in vitro and in vivo [100,118].

The main limitation in the development and consumption of legume-based foods lies in the ANFs contained within [106]. The presence of these factors leads to reduced digestibility of proteins and bioavailability of certain nutrients [83,120]. Legumes contain heterogeneous and species-dependent ANFs, such as oligosaccharides, phytic acid, tannins, alkaloids, lectins, pyrimidine glycosides (e.g., vicin and convicin), and protease inhibitors [84]. ANFs reduce the digestibility and bioavailability of other nutrients as well. Some of them are thermolabile (e.g., protease inhibitors and lectins) and easily removed by heat treatment. Others (e.g., phytic acid, raffinose, tannins, and saponins) remain unchanged by heating. Thermostable components can be removed efficiently using biological methods (including fermentation) [83,84].

Fermented soy products have a low content of trypsin inhibitors and phytates [121]. Fermentation of mung beans and soybeans with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, and *Lacticaseibacillus casei* has been found to reduce the content of phytic acid compared to unfermented seeds [122]. Red kidney beans fermentation with *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus thermophilus* results in reduction of phytates, trypsin inhibitor activity, saponins, tannins, and raffinose oligosaccharides [123]. Faba bean seeds fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* have shown reduced trypsin inhibitor activity, condensation of tannins, and better in vitro protein digestibility [124].

LAB-fermented products may affect the sensory perception of legume products [125]. LAB produce different types of metabolites during the fermentation of proteins, carbohydrates, and lipids, including diacetyl, acetoin, ethyl acetate, and ethyl propanoate, which impart flavor and aroma to the product. LAB produce various organic acids, such as acetic acid, lactic acid, and propionic acid, during the metabolism of food ingredients that impart the product a sour taste. Organic acids and such substances as alcohol and aldehydes react to form various flavor compounds that enhance the taste of the fermented product [106,125]. Pea protein products fermented with LAB starter culture and yeast have been shown to incite better sensory perception than unfermented pea protein products. Most of the molecules responsible for the unpleasant notes of legumes have been found to degrade during the fermentation process [126]. The effect of fermentation by LAB on selected properties of legumes is summarized in Table 4.

Table 4. The effect of fermentation with LAB on selected properties of legumes.

Types of Legumes	Form of Raw Material	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
Soybean	soybeans (<i>Glycine max</i> L.)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B1-6	37 °C, 30 h	<ul style="list-style-type: none"> reduction of the total saponin content, phytic acid content, and trypsin inhibitor activity; significant increase in the total phenolic content by the end of fermentation; improvement in the protein digestibility 	Rui et al., 2017 [109]
	flour from soybeans (<i>Glycine max</i> L.) and fava beans (<i>Vicia faba</i> L.)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DSM 20343 (LAB)-consortium: <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> WCFS1, <i>Levilactobacillus brevis</i> ATCC 14869,	30 °C, 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the viscosity; decrease in the oligosaccharides content 	Xu et al., 2017 [90]
	flour from soybeans (<i>Glycine max</i> L. Merr.)	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53/03, <i>Companilactobacillus nantensis</i> LP33, <i>Limosilactobacillus fermentum</i> CIP 102980, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 20016, <i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	spontaneous fermentation with 12 h intervals	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the bulk density with increase in fermentation period; decrease in the swelling capacity; decrease in the later holding capacity; increase in the oil holding capacity; increase in the emulsion capacity 	Ogodo et al., 2018 [89]
	soybean (<i>Glycine max</i> L.) whey	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B1–6	37 °C, 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the total phenolic and isoflavone aglycone content; increase in the radical scavenging activity and protection against oxidative DNA damage 	Xiao et al., 2015 [101]
	flour from yellow soybeans (<i>Glycine max</i> cv. Merit) and flour from Mung beans (<i>Vigna radiata</i>)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CECT 748 T	30 °C, 48 h	<p>For fermented samples:</p> <ul style="list-style-type: none"> increase in the bioactivity because of conversion of glycosylated isoflavones into bioactive aglycones; increase in the bioactive vitexin; increase in the tryptophan content <p>For all fermented samples:</p>	Landete et al., 2015 [103]
soybeans (var. Rudoji and Progress) and wholemeal from lupin (<i>Lupinus luteus</i> , <i>L. albus</i>) seeds	<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KTU05-6, <i>Pediococcus acidilactici</i> KTU05-7, <i>P. pentosaceus</i> KTU05-8 (each strain applied separately)	30–35 °C (depending on the strain), 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in protein digestibility; capacity to degrade phenylethylamine, spermine and spermidine by tested LAB strains; capacity to produce putrescine, histamine, and tyramine (biogenic amines) by tested LAB strains, but at levels lower than those causing adverse health effects 	Bartkiene et al., 2015 [105]	
Pea	pea (<i>Pisum sativum</i> L.) protein isolate	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM-20174, <i>Lactobacillus perolens</i> DSM-12744, <i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM-20391, <i>Lactocaseibacillus casei</i> DSM-20011, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> DSM-20200, <i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM-20336 (each strain applied separately) <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ,	30–37 °C (depending on the strain), 24 h and 48 h	<p>For all fermented samples:</p> <ul style="list-style-type: none"> after 24 h—aroma attributes and bitter taste decreased; after 48—cheesy aroma, acid and salty tastes were increased; decrease in the protein solubility and emulsifying capacity; foaming capacity remained constant; reduction in the intensity of the allergenic protein fractions 	Garcia-Artegoa et al., 2021 [99]
	pea (<i>Pisum sativum</i> L.) protein isolate	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (strains applied in combination) with one of the yeasts: <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i>	30 °C, until reaching pH 4.55	<p>For all fermented samples:</p> <ul style="list-style-type: none"> degradation of most of the molecules responsible for the leguminous and green off-notes; the presence of yeasts triggered the generation of esters; decrease in the intensity of the leguminous and green perception compared to strains without yeasts 	Youssef et al., 2020 [126]

Table 4. Cont.

Types of Legumes	Form of Raw Material	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
	pea (<i>Pisum sativum</i> L.) protein isolate	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	37 °C, 25 h	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the water-soluble protein content; reduction in off-flavor; desirable changes in aroma profile (removing the part of aldehyde and ketone content) 	Shi et al., 2021 [104]
	pea seeds (<i>Pisum sativum</i> var. <i>Bajka</i>)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 299v	3 h, 72 h, and 168 h at 22, 30, and 37 °C	<ul style="list-style-type: none"> ACE inhibitory activity after in vitro digestion of fermented seeds for all samples reduction in the level of trypsin inhibitors; 	Jakubczyk et al., 2013 [115]
	flour from grass pea (<i>Lathyrus sativus</i> L.)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	30 °C, 24 h	<ul style="list-style-type: none"> elimination of inositol phosphates; increase in the amount of total phenolics; partial improvement of the antiradical activity (with DPPH• assay) 	Starzyńska-Janiszewska et al., 2011 [108]
	lupine flour (<i>Lupinus angustifolius</i>)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> (strains applied in combination)	30 °C, 20 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the mushroom, soil, green, and nutty aroma characteristics; modification of the overall aroma characteristics and potential improvement of the consumer acceptability of lupine products 	Kaczmarek et al., 2018 [125]
	flour from sweet lupin (<i>Lupinus angustifolius</i>)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> K779, <i>Limosilactobacillus reuteri</i> K777 (strains applied in combination)	35 °C, 72 h	<ul style="list-style-type: none"> noticeable antiproliferative activities against Caco-2 and MCF-7 cancer cell lines; pronounced antihypertensive activities; α-glucosidase inhibition; increase in the antioxidant activities 	Ayyash et al., 2019 [116]
Lupin	lupin (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) protein isolate treated with papain, alcalase 2.4 L, and pepsin	<i>Lactilactobacillus sakei</i> ssp. <i>carnosus</i> DSM 15831, <i>Lb. amylolyticus</i> TL 5, <i>Lb. helveticus</i> DSM 20075 (each strain applied separately)	37–42 °C (depending on the strain), 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the foaming activity while maintaining proper emulsification capacity as a result of the combination of enzymatic hydrolysis and fermentation; increase in the protein solubility at acidic conditions; combination of enzymatic hydrolysis and fermentation was effective in breaking down large polypeptides into low molecular weight peptides and degrading with it the major allergen Lup an 1 of lupin 	Schlegel et al., 2021 [85]
	lupin seeds (<i>Lupinus luteus</i> L. and <i>Lupinus albus</i> L.)	<i>Lactilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KTU05-6, <i>Pediococcus acidilactici</i> KTU05-7, <i>Pediococcus pentosaceus</i> KTU05-8 (each strain applied separately)	30–35 °C (depending on the strain), 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the protein digestibility; increase in the total phenolic compounds content; increase in the antioxidant activity 	Krunglevičiūtė et al., 2016 [119]
	red beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	30 °C, 120 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the concentration of antioxidant substances, including total phenolics, anthocyanin, flavonoids, vitamins C and E; nattokinase activity exhibition 	Jhanet al., 2015 [117]
Bean	flour from kidney beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Pinto)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CECT 748	37 °C, 96 h	<ul style="list-style-type: none"> exhibition of potential antihypertensive activity due to their large γ-aminobutyric acid (GABA) content; activity of angiotensin converting enzyme inhibitory (ACEI) 	Limón et al., 2015 [114]
	Mung bean (<i>Vigna radiata</i>), kidney bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), and soybean (<i>Glycine max.</i> L.),	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> EMCC1102, <i>Lb. acidophilus</i> EMCC1324, <i>Lactocaseibacillus casei</i> EMCC1643 (each strain applied separately)	37 °C, 72 h	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the phytic acid content 	Mohamed et al., 2011 [122]

Table 4. Cont.

Types of Legumes	Form of Raw Material	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
	red kidney beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> (strains applied in combination)	42 °C, 96 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the protein digestibility; reduction of phytates, trypsin inhibitor activity (TIA), saponins, tannins, and raffinose oligosaccharides 	Worku et al., 2017 [123]
Faba bean	flour from faba bean (<i>Vicia faba</i> cv. Kontu)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> VTT E-133328	30 °C, 48 h	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the vicine and convicine contents; reduction of trypsin inhibitor activity and condensed tannins; increase in the amount of free amino acids, especially of the essential amino acids and GABA (γ-aminobutyric acid); enhancement in the in vitro protein digestibility; decrease in the hydrolysis index 	Coda et al., 2015 [124]
	faba bean seeds (<i>Vicia faba</i> L. var. White Winston)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 299v	3 h, 72 h, and 168 h at 22, 30, and 37 °C	<p>For all samples:</p> <ul style="list-style-type: none"> ACE-inhibitory activity; antiradical activity against ABTS⁺; LOX inhibitory activity 	Jakubczyk et al., 2019 [111]
Lentil	lentil seeds (<i>Lens culinaris</i> var. <i>castellana</i>)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CECT 748T	37 °C, 96 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the GABA content; increase in the antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activities; increase in the total phenolic compounds 	Torino et al., 2013 [112]
Chickpea	flour from chickpea (<i>Cicer arietinum</i>) seeds	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>	spontaneous fermentation at 37 °C, 24 h with back-slopping for 10 days	<ul style="list-style-type: none"> reduction in the concentrations of raffinose and stachyose; elimination of verbascose; reduction of phytic acid; increase in the total phenolic contents; higher water-holding capacity of sourdoughs 	Xing et al., 2020 [120]

5. Legumes as Raw Materials for the Production of Fermented Plant-Based Beverages

5.1. Characteristics of Plant-Based Beverages

Plant-based beverages are products that do not have a specific definition and classification in the literature. They are most often categorized as products obtained by water extraction of shredded plant materials, in the form of colloidal suspensions or emulsions [19,127,128]. Plant-based beverages are made from a variety of raw materials:

- cereals (e.g., oats, rice, millet, spelled);
- legumes (e.g., soybean, lupine, peas);
- nuts (e.g., hazelnuts, pistachios, almonds, walnuts);
- seeds (e.g., sesame, flax, hemp, sunflower);
- pseudocereals (e.g., quinoa, amaranth, buckwheat);
- other materials (e.g., coconut) [19,127,129,130].

Plant-based beverages are becoming more and more popular every year [19]. This has been prompted, in large part, by the shift away from cow's milk and its derivatives among consumers, which is spurred by multiple factors. The most common motivator behind this trend is allergy and/or intolerance to milk components, especially lactose and casein [19,127,131]. The main consumers of plant-based beverages are vegetarians and vegans, who avoid animal products for ethical reasons and prefer plant-based beverages for their health benefits. Their popularity is further driven by the growing environmental awareness of consumers [16,132–134]. Intensive animal farming leads to depletion of water resources and high greenhouse gas emissions, which is why reining in growth of this sector should be prioritized in environmental governance [135,136].

Plant-based milk substitutes are usually designed to have a similar appearance, taste, and shelf life to cow's milk, so that they can be used in a similar manner. In practice, however, each type of plant-based beverage has its own unique properties, which are a function of their composition and the unit operations involved in their production [15].

The production technology of each plant-based beverage is tailored to the raw materials used, but the general outline of the process is usually the same [131]. Initially, raw

materials are inspected and cleaned to prepare them for further processing. They are then subject to the process of soaking, grinding, and water extraction. The resulting slurry is filtered and/or centrifuged to remove solid matter. The filtered fluid is subject to standardization processes wherein the composition of the beverages is unified, and various types of ingredients are added to improve the technological and functional properties of the product [127,131]. Emulsifiers and stabilizers are added to increase the stability of the product (e.g., cellulose, tapioca, gella, guar, carrageenan, locust bean gum, lecithin). The beverages are usually amended with vegetable oils (such as peanut or sunflower oil) and sweeteners (such as sugar, agave syrup, fructose, and maltodextrin). Salt is added to shape palatability. Additionally, the plant-based beverages are fortified with calcium and vitamins (e.g., A and D) to make their nutritional value more similar to cow's milk, then homogenized to reduce the particle size and unify the structure. The resultant beverage is heat treated (pasteurized or sterilized) in order to improve the stability of the suspension and inactivate microorganisms [127,129,131,137]. An overview of the general plant-based beverages production technology is shown in Figure 1.

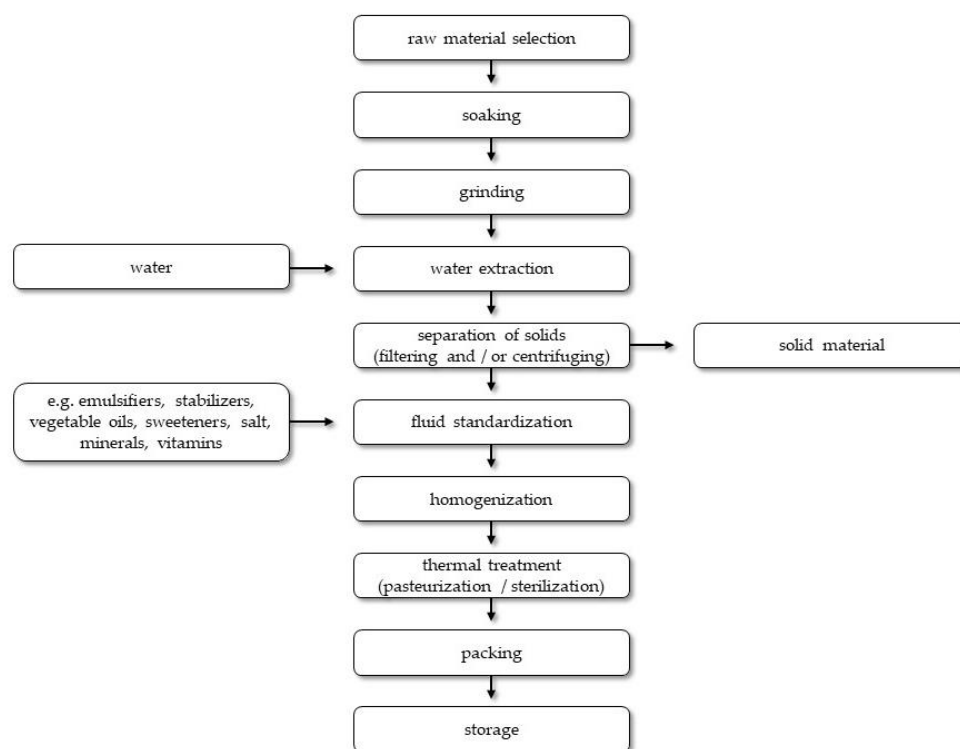


Figure 1. The general production technology of plant-based beverages.

Plant-based beverages are complex media that contain small particles (e.g., fat droplets, protein particles, or plant cell fragments) dispersed in an aqueous medium [15]. The characteristics of these colloidal particles (i.e., their composition, structure, size, interfacial properties, and interactions) ultimately determine the physical, functional, sensory, and nutritional properties of plant-based milk substitutes. They determine the appearance, texture, taste, and stability of the drink, as well as bioavailability of individual nutrients. The characteristics of the particles contained in plant-based beverages and their stability are often determined by the type of processes used in their production technology and the storage conditions [15,19].

The most frequently consumed plant-based beverages include soy, almond, coconut, oat, and rice beverages [15,127,138]. The growing popularity of such products has prompted producers to employ a wider range of raw materials in making their products [131]. Categorizing cow's milk substitutes is an oft-raised issue. They are often referred to as "plant milks", but this is a misnomer as they do not meet the definition and do not have the

nutritional value of milk [20,139]. Commission Regulation (EU) No 605/2010 of 2 July 2010 laying down animal and public health and veterinary certification conditions for the introduction into the European Union of raw milk and dairy products intended for human consumption defines “raw milk” as milk produced by the secretion of the mammary gland of farmed animals [140]. Naming plant-based beverages as milk is therefore a generalization that may mislead consumers.

The composition and properties of milk and plant-based beverages differ on several levels. The nutritional value of plant-based beverages varies depending on the raw material from which they are produced and the production technology used [16]. Nevertheless, in most cases they are high in carbohydrates and low in protein, containing up to 30 times less protein than cow’s milk. Soy beverages have the most similar protein content to cow’s milk [16,141]. Even so, vegetable protein is inferior, mainly due to the presence of limiting amino acids (lysine in cereals, methionine in legumes) and poor digestibility [127,129]. In most cases, plant-based beverages are low in fat unless supplemented with vegetable oils. Compared to milk, plant-based beverages have a low content of saturated fatty acids (less than 0.7 g/100 g), with the exception of coconut beverage, which is SFA-rich (about 1.7 g/100 g) [137]. Plant-based beverages are dominated by unsaturated fatty acids, mainly in the form of oleic, linolenic, and linoleic acids [127,137,141]. Cow’s milk is a natural source of calcium (120 mg/100 g on average), and plant-based beverages tend to be low in this nutrient if not fortified during production. Cow’s milk contains naturally-occurring vitamins A and trace amounts of vitamins D, E, K, C, and B. It is also a source of phosphorus, potassium, zinc, and easily digestible magnesium, as well as small amounts of sodium and iron [129].

Table 5 shows the nutritional value of selected plant-based beverages. The values for the individual nutrients are presented as a range of values due to the discrepancies between literature sources. This variability is mostly attributable to different authors using different technologies for the production of plant-based beverages.

Plant-based beverages, compared to cow’s milk, have a nutritious fatty acid profile due to the low content of saturated fatty acids and the dominant share of unsaturated fatty acids in total fat [165,166]. In addition, plant-based beverages contain bioactive ingredients with health-promoting effects, such as β -glucans (present, e.g., in oat beverages), phytosterols, and polyphenols (present, e.g., in soy and almond beverages) [131,137,141]. These products do not contain lactose, which cannot be consumed by people allergic to this component, and cholesterol, which is often avoided by people with hypercholesterolemia [16]. Scientific reports indicate that individual components of plant-based beverages have a positive effect on health. Unsaturated fatty acids and phytosterols in such products provide health benefits, including reducing the risk of heart disease, stroke, and heart attack, as well as lowering cholesterol, preventing cancer, modulating the immune system, and slowing aging [167,168]. In addition, plant-based beverages are rich in antioxidants, the consumption of which can prevent cancer of the ovary, breast, stomach, prostate, and lung, mainly by reducing oxidative stress in the body [169,170].

Table 5. The nutritional value of selected plant-based beverages.

Category of Plant-Based Beverages	Type of Plant-Based Beverages	Protein (g/100 g)	Total Lipid (g/100 g)	Carbohydrate (g/100 g)	Fiber (g/100 g)	References
Cereal-based beverages	Oat-based beverage	0.4–1.0	0.7–1.9	6.5–27.0	-	Mäkinen et al., 2015 [127]; Parrish 2018 [142]; Veber et al., 2021 [143]
	Rice-based beverage	0.1–0.8	0.9–2.6	9.1–27.0	0.0–0.1	Chalupa-Krebzdak et al., 2018 [144]; Mäkinen et al., 2015 [127]; Vanga and Raghavan, 2018 [145]
Legume-based beverages	Soy-based beverage	2.1–3.0	1.3–3.2	1.8–4.7	0.7–1.3	Manzoor et al., 2017 [146]; Shen et al., 2019 [147]; Giri and Mangaraj, 2012 [148]; Jiang et al., 2013 [149]
	Pea-based beverage	2.8–7.9	0.1–4.5	10.0–27.0	n.d.	Parrish 2018 [142]; Veber et al., 2021 [143]; Pandhi and Poonia 2021 [150]
	Lupin-based beverage	1.8–3.5	1.3–1.4	1.2–3.3	n.d.	Vogelsang-O'Dwyer et al., 2021 [151]; Lopes et al., 2020 [152]; Laaksonen et al., 2021 [86]
Nut-based beverages	Cashew-based beverage	0.4–2.2	1.0–5.2	3.7–5.7	0–1.1	Manzoor et al., 2017 [146]; Chalupa-Krebzdak et al., 2018 [144]; Singhal et al., 2017 [153]; Chalupa-Krebzdak et al., 2018 [144]; Jeske et al., 2017 [131]; Mäkinen et al., 2015 [127]; Vanga and Raghavan 2018 [145]
	Almond-based beverage	0.3–2.1	0.8–4.4	0.2–3.3	1.0–1.6	Mäkinen et al., 2015 [127]; Vanga and Raghavan 2018 [145]
	Hazelnut-based beverage	2.3–4.5	1.5–6.5	2.3–3.2	-	Atalar 2019 [154]; Aysu et al., 2020 [155]; Gul et al., 2021 [156]
Seed-based beverages	Sesame-based beverage	2.6–2.9	6.4–7.8	4.0–16.5	0.0–0.5	Afaneh et al., 2011 [157]; Sethi et al., 2016 [19]; Ahmadian-Kouchaksaraei et al., 2014 [158]
	Hemp-based beverage	0.8–1.9	1.2–7.0	2.2–7.9	0.0–0.2	Chalupa-Krebzdak et al., 2018 [144]; Mäkinen et al., 2015 [127]; Parrish 2018 [142]
Pseudocereal-based beverages	Quinoa-based beverage	0.4–4.5	0.2–6.0	9.0–15.5	-	Kaur and Tanwar, 2015 [159]; Sethi et al., 2016 [19]; Pineli et al., 2015 [160]
	Buckwheat-based beverage	0.2–4.3	0.0–1.2	4.6–8.8	0.0–0.9	Cardinali et al., 2021 [161]; Kowalska and Ziarno 2020 [162]; Zhou et al., 2019 [163]
Other plant-based beverages	Coconut-based beverage	<1	3.2–5.0	0.7–30.1	0.0–1.0	Vanga and Raghavan, 2018 [145]; Sethi et al., 2016 [19]; Lu et al., 2019 [164]

n.d.—no data.

5.2. Legume-Based Beverages

From a nutritional point of view, legume seeds are high in protein, vitamins, and minerals [171]. Of all plant-based beverages, legume-based beverages have the most balanced composition while also having a low glycemic index [152]. Their protein fraction is around 3.0–4.0 %, similar to cow's milk (i.e., 3.3–3.5%), while other types of cereal- and nut-based beverages usually have a protein fraction of between 0.1% and 1.0% [152,171].

So far, soybeans are the most commonly used to produce plant-based beverages and the most widely described in the literature among the group of legumes. Though soybean beverages are mainly produced on an industrial scale, other types of legumes may also be a suitable matrix for the production of plant-based beverages [21]. In the case of beverages

from legumes other than soybean, most of the production technologies have not yet been entirely refined, whereas their composition and properties are variable, directly determined by the technological processes applied [172].

Generally, plant beverages are typically an oil-in-water (O/W) emulsion with water as the aqueous phase and oil as the dispersed phase. These two phases are immiscible and thermodynamically unstable, tending to separate into fractions and aggregate particles as a result [173]. Legume-based beverages are a complex colloidal system formed by dispersed particles such as proteins, oil droplets, and solids from raw materials. These factors make it difficult to obtain stable products [152,173]. Legume proteins exhibit emulsifying properties, which result from their ability to adsorb at the oil–water interface and form stabilizing protein films around the oil droplets. Such properties have been identified in the proteins of soybean, chickpeas, peas, and beans and indicated them to be plant proteins that may potentially affect the stabilization of O/W emulsions [171,174].

The basic technology for the production of beverages from legume seeds includes the following stages: raw material selection, soaking, grinding, water hydrolysis, filtration, homogenization, and thermal treatment [21,152]. Apart from technological measures, the process of making legume-based beverages also employs sweeteners, salt, aromas, and other food additives, as dictated by the local market. These treatments are used to increase the overall acceptance of beverages [175].

In the production of vegetable beverages from legumes, it is vital to include processes designed to reduce the content of anti-nutrients and increase the digestibility of proteins. For example, ingredients such as trypsin inhibitors, lectins, and hemagglutinins inhibit the action of proteolytic enzymes, resulting in reduced digestibility and absorption of proteins [175]. The processes that directly reduce ANFs include, among others, soaking, cooking, enzymatic treatment, protein extraction, germination, and fermentation [172,176]. The use of enzymatic treatment, fermentation, and germination processes increases the bioactivity and bioavailability of phenolic compounds, while activating the release of bioactive peptides. Such treatments make it possible to obtain functional food products or beverages with improved health-promoting properties [172,177].

Legume germination increases the amount of protein and dietary fiber, reduces the content of tannins and phytic acid, and improves the bioavailability of minerals [178]. During the germination process, proteolytic enzymes are activated, changing the protein profile of legumes and, consequently, of their derived beverages. The protein content in lentil-based beverages made of germinated seeds has been shown to be 3.3% higher (in terms of dry matter) than in a beverage made of non-germinated seeds. The germinated-lentil beverage contained more B vitamins and minerals compared to the beverage made from non-germinated lentils. This is attributed to the activity of α -amylase, which cleaves the high molecular weight carbohydrates that form cell membranes in plant materials. This leads to increased extractivity and thus more nutrients being transferred into the beverage [179]. In the soy-based beverage, the germination process increased the protein content while reducing fat, trypsin inhibitors, saponins, and phytic acid, with the added effect of inducing the proteolysis of the main storage proteins and releasing peptides that were easier to digest [152]. Compared to its non-germinated counterpart, the germinated bean-based beverage was characterized by higher “milk” yield, good color, and high sensory acceptability due to the lack of “beany” flavor and aroma [152].

Protein extraction is used to produce isolates or concentrates that not only have high protein content, but also better protein digestibility due to the elimination of ANFs [180]. Commercial protein isolates are usually obtained from legumes via alkaline protein extraction, which is followed by precipitating the extracted proteins at their isoelectric point [176,180]. To obtain legume-based beverages with greater stability, the formation of protein–polysaccharide conjugates can also be induced by spray drying and preparing a powder, which is then dissolved and reconstituted as a plant-based beverage [181].

The properties of the proteins may vary due to the use of processes such as high shear mixing, homogenization, and ultra-high temperature (UHT) processing in the pro-

duction of legume-based beverages [174]. The associated pressure and thermal effects can lead to changes in the stability of protein emulsions [174,182]. Heat treatment, such as pasteurization, can increase the viscosity of the legume-based beverage, affecting its stability. This is important when the legumes are high in starch, such as chickpeas and peas [152]. Accordingly, additional processing techniques are also used to improve the stability of legume-based beverages. Advanced processes such as High Hydrostatic Pressure (HHP), Pulsed Electric Field (PEF), and Ultra High Pressure Homogenization (UHPH) have been successfully employed to improve the acceptability and properties of chickpea and faba bean beverages. These technologies are being rapidly developed thanks to ongoing research efforts, which could lead to the production of high-quality legume-based milk alternatives [21,173]. In addition to technological treatments, additives of various types of stabilizing substances are also used. The most common of those are hydrocolloids, which induce molecular interactions between the ingredients of the beverage, helping ensure a uniform consistency [183].

The sensory acceptability of legume-based beverages is the main limiting factor due to their characteristic “beany” flavor. This flavor is associated with the presence of endogenous lipoxygenases in the legumes, which oxidize unsaturated fatty acids [152,184]. Thermal inactivation is an effective technique for removing the “beany” flavor in legume-based beverages. The flavor has also been suppressed in a soy-based beverage by high-temperature (approx. 130 °C) steam treatment, or traditionally by boiling the beans prior to the grinding process, and finally by the germination process [152].

5.2.1. Soy-Based Beverages

Among the legume-based beverages, the one most consumed and most widely available is derived from soy [152,173,185]. Soybeans are believed to be the first plant used in the preparation of plant-based beverage substitutes in China some 2000 years ago [21]. The soybean beverage has a high nutritional value and contains a similar amount of protein to cow’s milk (minimum 3%) [152]. Arnoldi et al. (2007) [186] report that soy proteins exhibit hypocholesterolemic properties. A soy-based beverage is an inexpensive, refreshing, and nutritious product with additional health-promoting ingredients, including isoflavones (such as genistein and daidzein) [20]. These ingredients are phytoestrogens, which have a chemical structure similar to that of estradiol-17 β , the most potent mammalian estrogen [187,188]. Isoflavones can help relieve postmenopausal symptoms and are well known for their protective effect against certain diseases such as hormone-dependent cancers (e.g., breast and endometrial cancer), cardiovascular disease, and osteoporosis [20,21,188,189].

Soybean beverages contain fiber, minerals (mainly iron, calcium, and zinc), B-group vitamins, unsaturated fatty acids, and plant sterols [20]. These products are also rich in phytochemicals such as phytosterols, which are known for their cholesterol-lowering properties [21]. Soy isoflavones elicit an antioxidant effect [187]. A study by Rossi et al. (2001) [187] showed that consumption of soybean beverage over 3 weeks (two servings per day providing 40 g protein and 44 mg genistein) increased the total plasma antioxidant values in each of the 10 male adolescents.

The traditional basic method of producing a soybean beverage mainly consists of soaking, hulling cooking, wet grinding, filtering, and heat treatment to obtain the final product. The soybean beverage is similar in appearance to cow’s milk and is sold both sterilized and pasteurized, with or without flavoring [175].

Consumption of soybean beverages has been met with barriers in the form of consumer health concerns regarding genetic modification of soy, allergens in soy (mainly proteins β -conglycinin and glycinin), high levels of isoflavones, and trace CO₂. Accordingly, it would be expedient to develop other milk alternatives from legumes—ones which may exhibit sensory properties similar or superior to those of soybeans [152]. The available products of this type which have been researched thus far include beverages made of peas, chickpeas, lupins, beans, and lentils.

5.2.2. Pea-Based Beverages

Peas are a raw material that is widely available on a commercial scale [190]. Peas contain about 20–25% protein, which has properties similar to soybean protein and includes a large amount of the amino acid lysine. Compared to soybeans, peas have a higher level of dietary fiber, minerals, and vitamin C, as well as a lower fat content [190]. Pea proteins show promising functional properties, such as gelling or the ability to emulsify and foam across almost all pH ranges. What is more, these properties are retained after heat treatment [21,171]. Pea protein isolate is one of the most useful functional protein sources due to its high nutritional profile, high antioxidant potential, and low allergenicity compared to protein sourced from other plants [21]. These factors make peas a very good matrix for the production of plant-based beverages. Pea protein emulsions are more stable than other plant protein emulsions. However, the stability of pea-based beverages is highly dependent on the method used to process or prepare the beverage [21].

The nutritional value of peas varies depending on the degree of maturity [21]. For example, peas reach their highest concentration of sucrose, glucose, and fructose in the early stage of ripening, while these values decrease in fully ripe seeds with a concomitant increase in proteins and oligosaccharides. This trait makes it possible for manufacturers to pick and choose pea seeds with a specific degree of maturity, depending on the target nutritional value of the plant-based beverage [21].

Under laboratory conditions, a beverage was made from pigeon peas by first producing a powdered pea extract through the shelling, soaking, cooking, drying, and pulverizing of raw seeds [190]. The resultant beverage was shown to have hypoglycemic, hypocholesterolemic, and antioxidant properties in diabetic and hypercholesterolaemic rats. This indicates the potential of the pigeon pea-based beverage as a functional anti-diabetes product.

5.2.3. Chickpea-Based Beverages

Chickpea is another legume that is a good source of protein and can be used to make plant-based beverages [171]. It is a good source of macro- and micronutrients, vitamins (such as thiamine and niacin), and minerals (such as magnesium, calcium, iron, and zinc) and is considered to be a suitable source of dietary protein due to its good balance of amino acids and high bioavailability [21]. Chickpea beverage is high in threonine, glycine, alanine, and arginine. Chickpea protein isolate can be used to make chickpea protein hydrolysates as it has good solubility and high protein quality compared to the protein found in raw seeds [171,184].

Though commercial chickpea beverages are available on the market, research into their properties is relatively limited [21]. Wang et al. (2018) [191] produced a garbanzo chickpea-based beverage by soaking, mixing, cooking, and filtering the liquid from its solid residues. Compared to soybean beverage, the chickpea beverage contained less protein, less fat, and more carbohydrates. Nevertheless, fresh chickpea beverage was determined to have potential as a substitute for soy-based beverages in terms of nutritional and organoleptic quality [191]. Other studies have also shown that the sensory acceptability of chickpea beverages was the same as that of soybean beverages [192].

5.2.4. Lupine-Based Beverages

The main variety used in the production of lupine-based beverages is sweet lupine, grown on a large scale in Australia [82]. Lupine protein is a good source of arginine but has less sulfur-containing amino acids such as cysteine. Lupine contains mainly insoluble dietary fiber; however, its properties have been described as very similar to those of pectin and not to other insoluble non-starch polysaccharides. Its high carotenoid content gives lupine products a yellow color. Compared to its bitter cousins and other legumes, sweet lupine has negligible levels of anti-nutritional phytochemicals such as alkaloids, saponins, lectins, and phytates. Therefore, unlike most other legumes, sweet lupines do not require heating or chemical treatment to denature ANFs [82,173].

Lupine proteins have very good technological and functional properties, such as solubility and emulsification, which makes them a suitable raw material for the production of cow's milk and soybean beverage substitutes [21]. Various methods have been developed to produce lupine-based beverages, but the basic process involves grinding the soaked lupine grain and mixing it with water to make a thick paste. This paste is then forced through a filter to obtain a milk substitute. However, this particular product has been shown to feature low stability, and some years later a beverage was produced based on a lupine protein extract obtained from lupine flour under alkaline conditions. The formulation was then diluted and blended with fat, carbohydrates, and bleaching agents, producing a lupine beverage with the desired organoleptic properties and nutritional value [21,186]. In addition to having favorable technological properties, sweet lupine also exhibits health-promoting attributes; it has hypoglycemic effects, induces satiety, promotes energy balance, and regulates the function of the circulatory and digestive systems [173,186].

5.2.5. Bean-Based Beverages

Beans come in many varieties (including white, red, adzuki, and mung beans), but all of them are characterized by a high protein content, which is two to three times higher than in cereal grains. In addition, beans contain large amounts of dietary fiber, starch, vitamins, and minerals, as well as a wide range of phytochemicals [176]. Their glycemic index is low, not exceeding 27, so they are usually recommended for diabetic patients [20]. The basic bean-based beverage is prepared mainly by rinsing, soaking, grinding, and cooking the raw material. The obtained suspension is filtered and then thermally treated [20,172,193]. The resultant bean-based beverage contains the essential amino acids isoleucine, leucine, tyrosine, valine, asparagine, serine, glutamine, and proline [171]. Bean-based beverages are not produced on a large scale but have been successfully produced under laboratory conditions [193].

5.2.6. Lentil-Based Beverages

Lentils are a valuable raw material that serves as a source of protein with a balanced amino acid composition and low fat content. It is also a valuable source of complex carbohydrates, soluble and insoluble fiber, vitamins, and minerals (including Na, Ca, Fe, P, and Cu) [171,179]. Lentil proteins have similar properties to soy proteins in terms of functionality and organoleptic properties [194]. Much like other legume-based drinks, lentil-based beverages are prepared by cleaning the grains, soaking the raw material, grinding, cooking, filtering, and heat-preserving [194]. Such products have not been produced on a commercial scale so far, but laboratory tests have been carried out to study their properties. A technology which has been used to successfully produce a lentil-based beverage harnesses the germination process, which increases its nutritional value and the protein digestibility of the final product [179].

5.2.7. Legume-Based Beverages as Elements of Beverage Blends

Legume-based beverages are often used in research as elements of beverage blends, where they mainly serve to boost the protein content. The other ingredients are largely intended to improve the organoleptic properties and stability of the final product.

Agrahar-Murugkar et al. (2020) [178] prepared beverages primarily composed of sorghum and finger millet (5.8% each), sprouting soy flour (1.1%), sprouting green-gram flour (0.7%), milk whitener (1.6%), and desiccated coconut (1.8%). In addition, one of the beverage variants contained jaggery (8.3%) and water (75%), whereas the other contained buttermilk (67%), cumin/black salt (1% each), and water (15%). Both variants were stable and rich in minerals, flavonoids, and antioxidants compared to most beverages on the market. Both products were acceptable to consumers. Sprouting legumes improved the solubility and nutrient extractability, while also increasing the level of antioxidants and flavonoids [178].

In a study by Rincon et al. (2020) [184], a new milk substitute based on chickpeas and coconut was developed, containing 70% chickpea extract, 30% coconut extract, and 0.3% vanilla extract. The beverage had beneficial nutritional composition (protein, calcium, and lipid content) compared to cow's milk and other common cow's milk substitutes such as oat, almond, and rice beverages. However, the sensory acceptance scores for the beverage were quite low [184].

Felberg et al. (2009) [175] developed a product based on a soybean beverage and Brazil nut beverage. The latter, with a dry matter concentration of about 10%, was added to soybean milk with a dry matter concentration of 7% at ratios ranging from 10 to 50% (based on the final beverage), after which 3% sugar and 0.2% salt were added. The addition of Brazil nut beverage to a soybean beverage positively influenced consumer response. The blend was more stable than the Brazil nut-based beverage alone [175].

Cereal proteins contain little lysine and tryptophan but provide optimal levels of sulfur amino acids (such as methionine and cysteine) [195]. The amino acid profile of legumes is rich in lysine but quite low in methionine and cysteine. Therefore, combining grains and legumes can improve the quality of the protein consumed [195]. Oladeji et al. (2014) [195] produced a beverage containing dried and ground preparations of sorghum and soybeans with the addition of cocoa powder and defatted melon flour. Cocoa powder, malted sorghum, soy flour, and skim melon flour were mixed to the ratio of 60:10:20:10 and 65:05:20:10. Thus prepared beverages had good physicochemical and organoleptic properties. It was also estimated that the production cost of such a beverage is low, which would make it a competitive product on the market [195].

5.2.8. Other Potential Raw Materials for the Production of Legume-Based Beverages

Some legume seeds have yet to be used in the production of plant-based beverages, neither in commercial nor laboratory conditions. However, their properties make them potentially a good matrix for their production. These legumes include faba bean and cowpea.

So far, faba bean protein has only been used to a limited extent on an industrial scale, but that is gradually changing. It is a good source of macro and micronutrients and minerals such as sodium, magnesium, calcium, iron, and zinc [21]. Faba bean is a protein-rich legume with similar properties to soybean proteins. Due to these properties, it can potentially be used as a soybean substitute in plant-based milk alternatives [174]. So far, to the best of the authors' knowledge, faba bean-based beverages have not been commercialized, though there do exist faba bean concentrates with a favorable, neutral taste [21].

Cowpea is an important legume used mainly in East and West Africa, as well as in other developing countries. The total protein content of cowpea is approximately two to four times higher than that of tubers and cereals. In addition, cowpea protein is rich in amino acids such as lysine, phenylalanine, and histidine [21,171]. It is also a good source of bioactive and functional ingredients, such as phenols with antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, hypolipidemic, and hypoglycemic effects. There are indications that any potential production of a cowpea-based beverage should best involve a sprouting process, as it significantly reduces the content of oligosaccharides [21].

5.3. Fermentation of Legume-Based Beverages Using LAB

An important direction in the development of plant-based beverages as milk substitutes is the use of fermentation in their production technology. Fermentation can lead to the production of a new range of products with a better sensory profile, nutritional properties, and improved microbiological safety [24,128,194,196]. Plant matrices are a good carrier for probiotic bacteria. Products made by plant fermentation with probiotics can meet consumers' demands for health-promoting, dairy-free products [129,197–200]. Most of the plant-based beverages described in the literature are fermented using *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* [24,129,194,201]. Fermentation of plant matrices is usu-

ally done through four main stages—obtaining a plant-based beverage; conditioning the beverage to reach the temperature optimal for the growth of the microorganisms; fermentation under specific conditions; and cooling to a temperature of about 4 °C [201]. These procedures may vary depending on the raw material, the type of the starter cultures used, and the final product characteristics. The fermentation of plant-based beverages is typically longer (around 12–24 h) than standard fermented dairy production and ends when the pH value is around 4.2–4.5 [21,201].

Fermentation of plant-based beverages significantly improves their nutritional and health-promoting properties. As in the fermentation of raw legumes, the content of oligosaccharides, tannins, protease inhibitors, and phytic acid is reduced, which increases the bioavailability of calcium, iron, and zinc [196,202–204]. In addition, the organic acids produced during fermentation have the ability to increase the absorption of iron and zinc by forming soluble ligands, while also producing a low pH that optimizes the activity of the endogenous phytic acid-reducing phytase [196,200]. Fermentation of legume-based beverages also increases antioxidant capacity and, as a result, anti-radical activity [200,205–207]. Some strains of LAB have the ability to synthesize B vitamins (including folic acid, riboflavin, and vitamin B12) in legume-based beverages, e.g., those made with soy and beans [31,208–210]. Microbial activity can also increase the content of minerals and protein in the product [196]. The use of the germination process before fermentation improves the growth rate of probiotic strains by increasing the content of fermentable monosaccharides and amino acids [127,193].

So far, out of all legume-based beverages, soybean beverages are the ones most commonly processed via fermentation. To that end, bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* are generally used [211–213]. In order to select suitable LAB strains for the production of functional food based on a soybean beverage, the fermentation properties of 14 strains of LAB belonging to the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* were assessed. All 14 strains were able to grow in the soybean beverage, and the strains *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* showed the most promising results [214]. Soy-based beverages fermented by LAB have a higher content of aglycone isoflavones. The increase of isoflavone aglycone contents during fermentation is a result of β -glucosidase activity towards isoflavone glucosides [205,212,215,216]. The use of LAB to ferment legume-based beverages can also have an anti-mutagenic effect. Fermentation of soy-based beverages using strains of the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* has been shown to significantly enhance anti-mutagenicity, but the extent of that increase varied across different starter organisms and types of mutagen tested [217].

Soymilk fermented by LAB can improve aroma, flavor, and overall acceptability [212]. Furthermore, they can be used to modulate and enhance the texture properties of soymilk, such as its water holding capacity and apparent viscosity [211,218]. Exopolysaccharide-producing (EPS-producing) LAB are used in the production of fermented soy beverages, due to their effect on consistency and rheology. Exopolysaccharides can modify the flow characteristics of fluids, stabilize suspensions, flocculate particles, encapsulate materials, and produce emulsions [211]. Fermentation of soybean beverages with LAB also reduces ANFs, e.g., fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* removes phytates [203], whereas raffinose is removed during fermentation by bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Streptococcus* [204]. LAB involved in soybean beverage fermentation may also exhibit anti-pathogen properties in food. Soybean beverage fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* demonstrated antimicrobial activity against selected foodborne pathogens, e.g., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* [219].

Bean, faba bean, lentil, chickpea, and cowpea beverages can also be good matrices for the fermentation process. Fermentation of a red bean-based beverage, using bacteria of the genera *Lactobacillus* and *Streptococcus*, has been shown to produce an increase in the total phenolic content and promote antioxidant activity [220], while fermentation of

a navy bean-based beverage with *Lactobacillus* has been found to boost ACE-inhibitory activity [221]. An adzuki bean-based beverage fermented with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG has shown increased levels of γ -aminobutyric acid (GABA) [222]. Fermentation of a bean-based beverage with the use of *Lactobacillus* strains can increase the share of palmitic, stearic, and oleic acids in the fatty acid profile compared to raw bean seeds [193]. Fermentation of a beverage made from germinated beans using yoghurt starter cultures Yo-Mix 205 LYO (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *B. lactis*) and FD-DVS ABY-3 Probio-Tec (*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, and *B. animalis* subsp. *lactis*) has been found to reduce stachyose and raffinose, while increasing riboflavin, niacin, and pyridoxine in the manufactured products [223].

Fermentation of a faba bean-based beverage using starter cultures containing bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, and *Leuconocstoc* has been demonstrated to enhance the DPPH radical scavenging ability and total phenol content. The resultant beverage had higher complex viscosity values, which were expressed in a weak, gel-like structure [224]. A study by Verni et al. (2020) [194] showed that the strains of *Lactobacillus* spp., *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Limosilactobacillus fermentum*, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* were able to ferment a lentil-based beverage within 24 h, while strains *Lb. acidophilus*, *Limosilactobacillus fermentum*, and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* boasted the highest growth rates and the lowest pH values. The fermented beverages showed reduced levels of phytic acid and oligosaccharides [194].

A study by Wang et al. [191] demonstrated that a chickpea-based beverage can be a promising alternative to a soy-based beverage after some optimization. Compared to soymilk, the chickpea beverage contained lower amounts of protein, fat, and sugar, due to a higher starch content. Sensory analysis revealed that the fresh chickpea beverage was as acceptable as the soy one. However, the fermented chickpea beverage did receive lower appearance scores compared with the soy product [191]. A chickpea-based beverage fermented with *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* has been demonstrated to have higher reducing power, and reduced content of β -conglycinin and glycinin, which are considered to be food allergens [225].

The cowpea-based beverage turned out to be a good fermentation matrix using probiotic cultures containing bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus* [198]. The obtained fermented beverage showed faster microbial growth during the first two weeks of storage. During this period, no significant differences were observed in terms of sensory attributes (taste, texture, and overall acceptability). However, the authors recommend that more work should be done to improve the sensory acceptability of the products, and that their potential health benefits should be determined through in vivo studies. The effect of fermentation with LAB on selected properties of legume-based beverages is summarized in Table 6.

Table 6. Effect of fermentation with LAB on selected properties of legume-based beverages.

Type of Legume-Based Beverages	Ingredients of the Beverage	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
Soy-based beverages	soybean seeds, water	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC® 4356™, <i>Lactocaseibacillus casei</i> ATCC® 393™ (strains applied as a mixed cultures)	37 °C, 12 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the viscosity; increase in the antioxidant activity; increase in the isoflavones (genistein and daidzein) content; improvement of the sensory evaluation for parameters: color, texture, aroma, flavor, overall acceptability 	Ahsan et al., 2020 [212]
	soybean seeds, water, sucrose,	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 70810, <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> 6005, yogurt starter culture DVS YC-X11 (<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>) (strains applied separately)	37 °C, 12 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the water holding capacity, apparent viscosity, and exopolysaccharide (EPS) amount (highest with <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 70810); EPS-protein improved the texture of fermented beverage; increase in the concentration of the characteristic flavor compounds and decrease in the beany off-flavor (investigated only for <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 70810) 	Li et al., 2014 [211]
	soybean seeds, water	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KC51	30 °C, 18 h	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the phytate content 	Oh et al., 2009 [203]
	soybean seeds, water	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052, <i>Bifidobacterium longum</i> R0175, <i>Streptococcus thermophilus</i> ST5 (strains applied single or as a mixed cultures)	30 °C, until pH 4.7 was reached	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the isoflavones level with <i>L. helveticus</i> R0052 and combination of <i>S. thermophilus</i> ST5 + <i>L. helveticus</i> R0052; fermentation did not significantly modify vitamin B1 or B6 levels 	Champagne et al., 2010 [218]
	commercial soymilk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCRC 14079, <i>Streptococcus thermophilus</i> CCRC 14085, <i>Bifidobacterium infantis</i> CCRC 14633, <i>B. longum</i> B6 (strains applied single or as a mixed cultures)	37 °C, 24–32 h (depending on the strain)	<ul style="list-style-type: none"> major reduction in the contents of glucoside, malonylglucoside, and acetylglucoside isoflavones along with a significant increase of aglycone isoflavones content 	Chien et al., 2006 [215]
	commercial soymilk, yeast extract, glucose	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI L10, <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb1466, <i>Lb. acidophilus</i> La4962, <i>Lactocaseibacillus casei</i> LAFTI L26, <i>Lactocaseibacillus casei</i> Lc279, <i>Bifidobacterium lactis</i> LAFTI B94, <i>B. longum</i> B1 536, <i>Streptococcus thermophilus</i> St1342 (strains applied as a mixed culture)	42 °C, 48 h	<ul style="list-style-type: none"> reduction of raffinose content; release of bioactive peptides with ACE-inhibitory activities 	Donkor et al., 2007 [204]
soybean seeds, water	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCRC 14079, <i>Streptococcus thermophilus</i> CCRC 14085, <i>Bifidobacterium infantis</i> CCRC 14633, <i>B. longum</i> B6 (strains applied single or as a mixed cultures)	37 °C, 32 h	<ul style="list-style-type: none"> fermentation significantly enhanced the antimutagenicity of soymilk (the levels of increased antimutagenicity of fermented soymilk varied with the starter organism and the type of mutagen tested) 	Hsieh et al., 2006 [217]	
Bean-based beverages	navy bean seeds, water	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B1-6, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 70810, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> MB2-1 (strains applied separately)	31–42 °C (depending on the strain), 6 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the ACE inhibitory activity; decrease in the protein content with <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B1-6 	Rui et al., 2015 [221]
	red bean powder, water, refined sugar	<i>Lactocaseibacillus casei</i> 388, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 299v, <i>Streptococcus thermophilus</i> TISTR 894 (strains applied single or as mixed cultures)	37 °C, 18–20 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the total phenolic contents and antioxidant activities 	Naprasert et al., 2019 [220]

Table 6. Cont.

Type of Legume-Based Beverages	Ingredients of the Beverage	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
	white bean seeds, water	industrial starter cultures: Yo-Mix 205 LYO (<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>) and FD-DVS ABY-3 Probio-Tec (<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12) (cultures applied separately)	43 °C, 4 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the content of stachyose and raffinose; increase in the levels of riboflavin, niacin, and pyridoxine 	Ziarno et al., 2019 [223]
	adzuki bean flour, water	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG (strains applied as a mixed cultures)	37 °C, 24 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the content of γ-aminobutyric acid (GABA) 	Liao et al., 2013 [222]
	white bean seeds, water	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842, <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797, <i>Lb. acidophilus</i> La3, <i>Lb. helveticus</i> LH-B01, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DSM 9843, <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> LH32, <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC 9338, <i>Levilactobacillus brevis</i> L342, <i>Lactocaseibacillus casei</i> 01, <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> BGP1	37 °C, 18 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the share of palmitic, stearic, and oleic acids in the fatty acid profile compared to that in raw bean seeds; lower share of palmitic and stearic acids and higher share of oleic acid in position sn-2 was observed compared to non-fermented beverages 	Ziarno et al., 2020 [193]
Faba bean-based beverages	faba bean and chickpea seed, water	Starter culture 1 contains <i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , and starter culture 2 contains <i>Lactocaseibacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bio var. <i>diacetyllactis</i> , <i>Leuconostoc species</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> (starters applied separately)	43 °C, 10 h	<ul style="list-style-type: none"> increase of the DPPH radical scavenging ability and total phenol content; higher complex viscosity values for faba bean-based products, which displayed a weak gel-like structure 	Vasilean et al., 2021 [224]
Lentil-based beverages	lentil seeds, water	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>Lb. gasserii</i> ITEM 13541, <i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009, <i>Lb. johnsonii</i> NCC533, <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103, <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM 20312, <i>Limosilactobacillus fermentum</i> DSM 20052 (strains applied separately)	37 °C, 24 h	<ul style="list-style-type: none"> decrease in the phytic acid and raffinose content 	Verni et al., 2020 [194]
Chickpea-based beverages	chickpea seeds, water, with addition of soy sauce or vanillin sugar and coconut flakes	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 299v	35 °C, 18 h	<ul style="list-style-type: none"> increase in the reducing power; decrease in the content of β-conglycinin and glycinin (which are considered as one of food allergens) 	Skrzypczak et al., 2019 [225]
	garbanzo chickpea seeds, water	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	42 °C, 16 h	<ul style="list-style-type: none"> lower amounts of protein, fat, and sugar, and higher starch content compared to soymilk; fermented chickpea beverage received lower ratings than the soy one for appearance 	Wang et al., 2018 [191]

Table 6. Cont.

Type of Legume-Based Beverages	Ingredients of the Beverage	Microorganisms Used for Fermentation	Fermentation Conditions	Effect of Fermentation	References
Cowpea	cowpea seeds, water	Probiotic starter cultures: ABT-5 (<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>La-5</i> + <i>Bifidobacterium animalis</i> Bp-12 + <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>), YFL-903 (<i>S.</i> <i>thermophilus</i> + <i>Lb. bulgaricus</i> <i>subs. debulgaricus</i>) and Yoba Fiti (<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GR-1 + <i>S. thermophilus</i>) (cultures applied separately)	45 °C, 14 h	<ul style="list-style-type: none"> • decrease in the carbohydrate content; • increase in microbial growth during the first two weeks of storage 	Aduol et al., 2020 [198]

6. Probiotic Ingredients in Legumes and Legume-Based Beverages

Literature studies indicate that one of the most important determinants of human health is maintaining an optimal balance of the gastrointestinal microflora [226]. The relationship between gastrointestinal microflora and human health is being increasingly recognized. The influence of gastrointestinal microbiota on the host has been well characterized, including maintenance of the body's energy metabolism and immune system [227]. Dysbiosis of the intestinal ecosystem can lead to certain illnesses, e.g., inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, infectious and antibiotic-associated diarrhea, diabetes, and nonalcoholic fatty liver disease. These illnesses can be reversed by probiotics and prebiotics [228]. Probiotics can be defined as living bacteria or fungi that confer a health benefit for the host [228].

According to the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (IS-APP), prebiotics are substrates that are selectively utilized by host microorganisms, eliciting health-beneficial effects [229]. The following criteria are used to classify a compound as a prebiotic:

- It should be resistant to acidic pH of stomach, cannot be hydrolyzed by mammalian enzymes, and should not be an absorber in the gastrointestinal tract;
- It can be fermented by intestinal microbiota;
- The growth and/or activity of the intestinal bacteria can be selectively stimulated by this compound, and this process is beneficial to the host's health [230,231].

Prebiotics are not digested in the upper gastrointestinal tract and enter the cecum without changing their structure. They are not excreted in the feces as they are fermented by the flora of the colon, promoting the growth of beneficial bacteria from the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [232–234]. During the fermentation, a mixture of short-chain fatty acids (SCFA) is produced, including acetate, propionate, and butyrate, as well as L-lactate, CO₂, and H₂ [233,235]. These compounds provide a broad range of important physiological benefits, including anti-inflammatory and immune regulation, as well as anti-cancer properties and metabolic regulation [235]. The alleged mechanisms of action of prebiotics may be direct or indirect. The indirect mode of action involves providing nutrients to the intestinal flora for natural growth, which is beneficial to health. A prebiotic may also act directly by inhibiting certain pathogenic bacteria, preventing cancer, removing cholesterol, controlling cardiovascular disease, and finally—preventing obesity and constipation [226].

Benefits of consuming prebiotics include improved intestinal barrier function and host immunity, reduction of potentially pathogenic bacterial subpopulations (e.g., *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*), and increased production of SCFAs [234], which helps regulate the absorption of sodium and water and may increase the absorption of calcium and other minerals. SCFAs lower the pH of the colon, which can inhibit the growth of potential pathogens and promote the growth of beneficial bacteria such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [226,234]. Propionate exerts an anti-inflammatory effect on colon cancer cells. Butyrate regulates apoptosis and reduces metastasis in colon cell

lines. It is also the preferred energy source for colon epithelial cells, promotes normal cell differentiation and proliferation, and protects the body against carcinogens by enhancing the expression of enzymes involved in detoxification [226,234].

Legumes and legume-based beverages have proven to be a good source of food ingredients that may exhibit prebiotic properties [235–237]. These ingredients mainly include oligosaccharides, resistant starch, polyphenols, and isoflavones [237]. Legume oligosaccharides are often considered unbeneficial ingredients. Due to their high fermentability, they induce the production of gases (mainly CO₂, H₂, and sometimes CH₄) responsible for the digestive discomfort associated with the consumption of legumes. In addition, their consumption may reduce the absorption of some nutrients. While it may be desirable to remove these components from legumes, they also exhibit favorable prebiotic properties [232,233,235].

Among the oligosaccharides of legumes with prebiotic properties, the most important are those of the raffinose family (RFO), also called α -galactosides [232,238]. They are low molecular weight, non-reducing carbohydrates that are widespread in the plant kingdom and soluble in water and hydroalcoholic solutions [238]. Chemically, α -galactosides are considered to be derivatives of sucrose, as they are a combination of d-galactose units linked to a group of d-glucose moieties. The oligosaccharides most common in legumes are raffinose, stachyose, and verbascose [192,232,238]. These compounds are not digested by the human gastrointestinal tract, as it does not produce α -galactosidase—An enzyme that has the ability to digest oligosaccharides by cleaving α -galactosyl moieties. As a consequence, these compounds are not broken down by digestive enzymes, so they are not absorbed in the upper part of the gastrointestinal tract and pass into the large intestine, where they promote the growth of bacteria from the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* [238,239].

Bifidobacterium and *Lactobacillus* prevent the growth of exogenous pathogenic microorganisms and the excessive growth of native harmful microflora, resulting in the production of SCFAs (mainly acetic and lactic acid) [232]. The production of SCFAs and subsequent acidification of the colonic contents affect the availability of minerals. Lower pH leads to increased solubility of minerals, especially calcium and magnesium, which consequently increases their absorption [232]. SCFAs strengthen the intestinal barrier by inhibiting the growth of pathogens and the production of toxic elements [236]. Oligosaccharides can inhibit bacterial adhesion to the gastrointestinal wall and act as a repressor of virulence factors by inhibiting gene expression in enteropathogens. They can adhere to bacterial binding sites on the surface of enterocytes, blocking adhesion of pathogenic bacteria to intestinal epithelial cells [226]. In a study with rats, prebiotic oligosaccharides from red gram beans have been shown to be hypolipidemic [240]. The authors pointed out that the use of prebiotics can be a potential as a preventive measure for overweight and obesity in humans, and legume prebiotics could be tested as a new prebiotic product candidate for the consumer market.

Resistant starch (RS) is the total amount of starch and products of starch degradation resistant to digestion in the upper gastrointestinal tract [241]. RS is a linear α -1,4-d-glucan molecule, which is a fraction of starch that is resistant to digestion by human pancreatic amylase in the small intestine, thus reaching the colon unchanged. In the colon, RS is fermented by intestinal bacteria [231,242]. Legume RS plays a role in improving digestive health and meets the criteria for classification as a prebiotic [241]. It can be fermented by the human gastrointestinal microflora, providing a source of carbon and energy for bacteria present in the gastrointestinal anaerobic environment, thereby potentially altering the composition of the microflora and its metabolic activity. Fermentation of carbohydrates by anaerobic bacteria produces SCFAs, mainly composed of acetic, propionic, and butyric acids, which can lower gut pH [242].

Resistant starch has no calories and does not increase blood glucose levels, having physiological effects similar to those of dietary fiber [237,241]. Its prebiotic effect can be enhanced by combining it with other types of prebiotics with complementary kinetics, such as fructooligosaccharides (FOS). These prebiotics are characterized by different fermentation

rates in the large intestine, so their combination may result in a more pronounced probiotic effect through synergy. This combined effect may provide greater health benefits to the host. Additionally, the combination of RS and inulin has been shown to elicit a synergistic effect on intestinal calcium and magnesium absorption in rats. Fermentation of these substrates in the large intestine to SCFAs is a major cause of the increase in mineral absorption [242].

Scientific reports increasingly report interactions between polyphenols and the gastrointestinal microbiota, recommending them as candidates for prebiotics [243]. A growing number of animal and in vitro models describe the interactions between polyphenols and the gastrointestinal microbiota and the resulting health benefits, some of which include protection against cancer, obesity, insulin resistance, hepatitis, sleep deprivation, and atherosclerosis [244]. Polyphenols are secondary metabolites of plants, characterized by aromatic rings containing one or more hydroxyl groups in their chemical structure. Phenolic compounds are the largest group of phytochemicals, comprising over 50,000 heterogeneous compounds [245]. Polyphenols found in all types of legumes are characterized by low bioavailability and extensive metabolism in the large intestine, which promotes interaction with intestinal microorganisms [246]. One mode of two-way interaction involves polyphenols modulating the intestinal microflora, with microorganisms modulating the activity of phenolic compounds in turn. This interaction can regulate the metabolism and bioavailability of the polyphenols, converting them into metabolites that can have various effects on the health of the host. Overall, polyphenols elicit antioxidant, anti-inflammatory, anti-obesity, anti-lipidemic, and anti-diabetic effects. The role of polyphenols in the diet is determined by their metabolic processes, their absorption, and bioavailability, which are also associated with the modulation of the intestinal microflora [246].

Although polyphenols are currently recognized as modulators of the composition of the intestinal microflora, there is still no conclusive evidence of their prebiotic effects [247]. The prebiotic activity of each polyphenol can be influenced by the food source and the chemical structure of the compound, as well as by individual differences in the composition of the intestinal microflora. Flavonoids, which belong to polyphenols, are consumed with food mainly in the form of glycosides, which makes it difficult for their absorption through the small intestine. Polyphenols can act as prebiotics by modulating the microbiome, promoting the colonization of beneficial gut microbes. By acting as prebiotics, the gut microbes are capable of degrading glycosided polyphenols and producing simple phenolic metabolites. The glycosylated flavonoids may serve as the sole source of carbon and energy for certain microorganisms in the intestinal microbiota that preferentially ferment the sugars associated with the flavonoids. Polyphenols can act as prebiotics to promote the growth of beneficial gut microbes such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. [245,246].

Among the ingredients of legumes, isoflavones may also show prebiotic properties. The highest concentration of isoflavones is found in soybeans [248]. These compounds belong to the class of hormone-like diphenol phytoestrogens and are similar in structure to the female estrogen 17β estradiol. The most popular soy isoflavone is genistein, which is consumed in the form of an α -glycoside called genistin. Upon ingestion, genistin is hydrolyzed to the aglycone genistein by β -glucosidases. Enzymes capable of carrying out this stage of deglycosylation are found on the brush border of the small intestine (lactase-floridase hydrolase) and in enterocytes (cytosolic β -glucosidases). In addition, several major groups of colon bacteria have β -glucosidase activity, including *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., and *Bifidobacterium* spp. It is this ability of these intestinal bacteria to break down isoflavone glycosides that may be related to the prebiotic effect of isoflavones, which stimulate the growth of these microorganisms. Pharmacokinetic studies confirm that healthy adults absorb genistein quickly and efficiently. The bioavailability of genistin depends on deglycosylation by the intestinal bacteria [248]. Equol and O-desmethylangolensin are active metabolites produced by the action of colonic bacteria on soy isoflavones. These metabolites also have health benefits, such as estrogenic, antioxidant, anti-inflammatory, antioxidant, and hepatoprotective effects. [246].

The prebiotic properties of legume ingredients make them a good matrix for the fermentation process, also with the participation of probiotic bacteria [226]. Both pre- and probiotics have been found to work best in combination. This combined effect of both leads to the formation of the so-called synbiotics. Prebiotic foods remain unchanged in the digestive tract because gastric enzymes cannot act on them. They reach the large intestine intact and are selectively fermented for beneficial effects [226]. Probiotics present in legumes may increase the survival rate of probiotic bacteria involved in the fermentation process, which pass through the upper part of the digestive tract after ingestion with food. This is the result of their selective stimulation by prebiotics. Prebiotics can also enhance the effects of probiotic bacteria that enter the large intestine [242].

7. Conclusions

LAB are widely used in the fermentation of animal and plant products. The most common use of LAB in food is in dairy production. Due to the growing popularity of plant diets and the health benefits of consuming fermented products, there has been growing interest in the fermentation of plant products and the selection of microorganisms suitable for this process. Research into microorganisms suitable for fermenting plant matrices could lead to an increase in the range of fermented plant products that can be used as alternatives to dairy.

Legumes are a suitable raw material for the production of dairy alternatives. This is mainly due to the high protein content and the presence of ingredients that enable their fermentation. Currently, legume fermentation is widely used in the production of intermediate bakery products (e.g., cookies, pasta, bread), ingredients for Asian cuisine, substitutes for dairy products, and as an ingredient of animal feed. The fermentation has also been found to elicit a beneficial effect on the bioconservation of legumes and their sensory properties. Fermentation reduces the content of thermostable ANFs in legumes, which are the main limitation in the development and consumption of legume-based foods. This process leads directly to an increase in digestibility of proteins and bioavailability of certain nutrients. Fermentation leads to an increase in the nutritional value of legume-based foods by increasing the content of antioxidant components, biological availability of total fiber and phenols, as well as increasing the levels of vitamins, amino acids, minerals, and short-chain fatty acids.

Legumes are a suitable matrix for the production of plant-based beverages, which are the most popular products among dairy alternatives. Among the legume-based beverages, soybeans are the most commonly used to produce plant-based beverages. Scientific reports indicate that there are also other legumes highly suitable for the production of plant-based beverages, e.g., beans, peas, broad beans, chickpeas, lupins, lentils, and cowpea. Creating beverages from legumes enables the production of plant-based beverages with a composition similar to cow's milk. These products can be successfully fermented with LAB, including, e.g., *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, and *Streptococcus thermophilus*.

Both raw legumes and legume-based beverages can be carriers of probiotic bacteria. This is favored by the presence of natural ingredients with prebiotic properties in legumes, including oligosaccharides, resistant starch, polyphenols, and isoflavones. The properties of legumes make it possible to use them to create synbiotic food, which is a source of probiotics and prebiotics. However, in the production of fermented foods, it is crucial to optimize the process parameters. Too long fermentation time of legumes and legume-based beverages may affect the production of compounds with undesirable properties. The development of fermented products that can be commercialized requires careful development of technology and parameters of processing.

Author Contributions: Conceptualization, P.C. and M.Z.; methodology, P.C. and M.Z.; formal analysis, P.C. and M.Z.; investigation, P.C. and M.Z.; writing—original draft preparation, P.C. and M.Z.; writing—review and editing, P.C. and M.Z.; visualization, P.C. and M.Z.; funding acquisition, M.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hill, D.; Sugrue, I.; Arendt, E.; Hill, C.; Stanton, C.; Ross, R.P. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research* **2017**, *6*, 751. [[CrossRef](#)]
2. Bintsis, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* **2018**, *4*, 665–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Khalid, K. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* **2011**, *1*, 1–13.
4. Panagopoulos, V.; Boura, K.; Dima, A.; Karabagias, I.K.; Bosnea, L.; Nigam, P.S.; Kanellaki, M.; Koutinas, A.A. Consolidated bioprocessing of lactose into lactic acid and ethanol using non-engineered cell factories. *Bioresour. Technol.* **2022**, *345*, 126464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. De Oliveira, J.; Vandenberghe, L.P.; De Oliveira, P.Z.; De Mello, A.F.; Rodrigues, C.; Nigam, P.S.; Faraco, V.; Soccol, C.R. Bioconversion of potato-processing wastes into an industrially-important chemical lactic acid. *Bioresour. Technol. Rep.* **2021**, *15*, 100698. [[CrossRef](#)]
6. Ganatsios, V.; Nigam, P.; Plessas, S.; Terpou, A. Kefir as a Functional Beverage Gaining Momentum towards Its Health Promoting Attributes. *Beverages* **2021**, *7*, 48. [[CrossRef](#)]
7. Ayivi, R.D.; Gyawali, R.; Krastanov, A.; Aljaloud, S.O.; Worku, M.; Tahergorabi, R.; da Silva, R.C.; Ibrahim, S.A. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* **2020**, *1*, 202–232. [[CrossRef](#)]
8. Holzapfel, W.H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J.; Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 365S–373S. [[CrossRef](#)]
9. Gajewska, J.; Błaszczuk, M. Probiotic lactic acid bacteria (LAB). *Post. Mikrobiol.* **2012**, *51*, 55–65.
10. Zhang, L.; Zhang, M.; Mujumdar, A.S. New technology to overcome defects in production of fermented plant products—A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *116*, 829–841. [[CrossRef](#)]
11. Kamiński, M.; Skonieczna-Żydecka, K.; Nowak, K.; Stachowska, E. Global and local diet popularity rankings, their secular trends, and seasonal variation in Google Trends data. *Nutrition* **2020**, *79–80*, 110759. [[CrossRef](#)]
12. Peres, C.M.; Peres, C.; Hernandez-Mendoza, A.; Malcata, F.X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria—With an emphasis on table olives. *Trends Food Sci. Technol.* **2012**, *26*, 31–42. [[CrossRef](#)]
13. Dairy Alternatives Share & Growth Report, 2021–2028. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dairy-alternatives-market> (accessed on 31 October 2021).
14. Aschemann-Witzel, J.; Gantriis, R.F.; Fraga, P.; Perez-Cueto, F.J.A. Plant-Based Food and Protein Trend from a Business Perspective: Markets, Consumers, and the Challenges and Opportunities in the Future. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3119–3128. [[CrossRef](#)]
15. McClements, D.J. Development of Next-Generation Nutritionally Fortified Plant-Based Milk Substitutes: Structural Design Principles. *Foods* **2020**, *9*, 421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Aydar, E.F.; Tutuncu, S.; Ozcelik, B. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *J. Funct. Foods* **2020**, *70*, 103975. [[CrossRef](#)]
17. Ranadheera, C.S.; Vidanarachchi, J.K.; Rocha, R.S.; Cruz, A.G.; Ajlouni, S. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. *Fermentation* **2017**, *3*, 67. [[CrossRef](#)]
18. Trzaskowska, M. Probiotics in products of plant origin. *Food. Sci. Technol. Qual.* **2013**, *4*, 5–20. [[CrossRef](#)]
19. Sethi, S.; Tyagi, S.K.; Anurag, R.K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3408–3423. [[CrossRef](#)]
20. Paul, A.; Kumar, S.; Kumar, V.; Sharma, R. Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3005–3023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Nawaz, M.A.; Tan, M.; Øiseth, S.; Buckow, R. An Emerging Segment of Functional Legume-Based Beverages: A Review. *Food Rev. Int.* **2020**, 1–39. [[CrossRef](#)]
22. Aviles-Gaciola, S.; Chuck-Hernandez, C.; Salvador, S. Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 17–29. [[CrossRef](#)]
23. Petruľáková, M.; Valík, L. Legumes as potential plants for probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Acta Univ. Agric. Silv.* **2015**, *63*, 1505–1511. [[CrossRef](#)]
24. Tangyu, M.; Muller, J.; Bolten, C.J.; Wittmann, C. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 9263–9275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ganzle, M. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *2*, 106–117. [[CrossRef](#)]

26. Mora-Villalobos, J.A.; Montero-Zamora, J.; Barboza, N.; Rojas-Garbanzo, C.; Usaga, J.; Redondo-Solano, M.; Schroedter, L.; Olszewska-Widdrat, A.; López-Gómez, J.P. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* **2020**, *6*, 23. [[CrossRef](#)]
27. Jurkowski, M.; Błaszczyk, M. Physiology and biochemistry of lactic acid bacteria. *Kosmos* **2012**, *61*, 493–504.
28. Wu, C.; Huang, J.; Zhou, R. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **2017**, *43*, 393–404. [[CrossRef](#)]
29. Mombelli, B.; Gismondo, M.R. The use of probiotics in medical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 531–536. [[CrossRef](#)]
30. Pessione, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 86. [[CrossRef](#)]
31. LeBlanc, J.G.; Laino, J.E.; del Valle, M.J.; Vannini, V.; van Sinderen, D.; Tatanto, M.P.; Font de Valdez, G.; Savoy de Giori, G.; Sesma, F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—Current knowledge and potential applications. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 1297–1309. [[CrossRef](#)]
32. Bintsis, T. Lactic acid bacteria: Their applications in foods. *JBMOA* **2018**, *6*, 89–94. [[CrossRef](#)]
33. Tamang, J.P.; Waranabe, K.; Holzapfel, W.H. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 377. [[CrossRef](#)]
34. Waters, D.M.; Mauch, A.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Zannini, E. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *55*, 503–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cichońska, P.; Pudło, E.; Wojtczak, A.; Ziarno, M. Effect of the Addition of Whole and Milled Flaxseed on the Quality Characteristics of Yogurt. *Foods* **2021**, *10*, 2140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Widyastuti, Y.; Rohmatussolihat, R.; Febrisiantosa, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food Nutr. Sci.* **2014**, *5*(4), 435–442. [[CrossRef](#)]
37. Leroy, F.; Scholliers, P.; Amilien, V. Elements of innovation and tradition in meat fermentation: Conflicts and synergies. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *112*, 2–8. [[CrossRef](#)]
38. LeGrand, K.; Borarin, B.; Young, G.M. Tradition and Fermentation Science of prohok, an ethnic fermented fish product of Cambodia. *J. Ethn. Foods* **2020**, *7*, 12. [[CrossRef](#)]
39. Septembre-Malaterre, A.; Remiza, F.; Poucheret, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res. Int.* **2018**, *104*, 86–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Nosrati, R.; Hashemiravan, M.; Talebi, M. Fermentation of vegetables juice by probiotic bacteria. *Int. J. Biosci.* **2014**, *4*, 171–180.
41. Adebo, O.A.; Medina-Meza, I.G. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules* **2020**, *25*, 927. [[CrossRef](#)]
42. Gemechu, T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr. J. Food Sci.* **2015**, *9*, 170–175. [[CrossRef](#)]
43. Chen, H.; Hoover, D.G. Bacteriocins and their Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 82–100. [[CrossRef](#)]
44. Hernández-González, J.C.; Martínez-Tapia, A.; Lazcano-Hernández, G.; García-Pérez, B.E.; Castrejón-Jiménez, N.S. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals* **2021**, *11*, 979. [[CrossRef](#)]
45. Bharti, V.; Mehta, A.; Singh, S.; Jain, N.; Ahirwal, L.; Mehta, S. Bacteriocin: A novel approach for preservation of food. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 20–29.
46. Soomro, A.H.; Masud, T.; Kiran, A. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health—A Review. *Pak. J. Nutr.* **2002**, *1*, 20–24. [[CrossRef](#)]
47. Pasolli, E.; De Filippis, F.; Mauriello, I.E.; Cumbo, F.; Walsh, A.M.; Leech, J.; Cotter, P.D.; Segata, N.; Ercolini, D. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2610. [[CrossRef](#)]
48. Moradi, M.; Kousheh, S.A.; Almasi, H.; Alizadeh, A.; Guimarães, J.T.; Yilmaz, N.; Lotfi, A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 3390–3415. [[CrossRef](#)]
49. Evive, S.E.; Huo, G.; Igene, J.O.; Bian, X. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61*, 1318034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Panesar, P.S. Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. *Food Nutr. Sci.* **2011**, *2*, 47–51. [[CrossRef](#)]
51. Mathur, H.; Beresford, T.P.; Cotter, P.D. Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients* **2020**, *12*, 1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Matsumoto, K.; Takada, T.; Shimizu, K.; Moriyama, K.; Kawakami, K.; Hirano, K.; Kajimoto, O.; Nomoto, K. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 547–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Guillemard, E.; Tondu, F.; Lacoïn, F.; Schrezenmeier, J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 reduces the duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 58–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Mori, N.; Kano, M.; Masuoka, N.; Konno, T.; Suzuki, Y.; Miyazaki, K.; Ueki, Y. Effect of probiotic and prebiotic fermented milk on skin and intestinal conditions in healthy young female students. *Biosci. Microbiota Food Health* **2016**, *35*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Tillisch, K.; Labus, J.; Kilpatrick, L.; Jiang, Z.; Stains, J.; Ebrat, B.; Guyonnet, D.; Legrain-Raspaund, S.; Trotin, B.; Naliboff, B.; et al. Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 1394–1401. [[CrossRef](#)]
56. Hickson, M.; Souza, A.L.D.; Muthu, N.; Rogers, T.R.; Want, S.; Rajkumar, C.; Bulpitt, C.J. Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* **2007**, *335*, 80. [[CrossRef](#)]
57. Jauhiainen, T.; Rönneck, M.; Vapaatalo, H.; Wuolle, K.; Kautiainen, H.; Groop, P.H.; Korpela, R. Long-term intervention with Lactobacillus helveticus fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 424–431. [[CrossRef](#)]
58. Świeca, M.; Herok, A.; Piwowarczyk, K.; Sikora, M.; Ostanek, P.; Gawlik-Dziki, U.; Kapusta, I.; Czyż, J. Motility and Survival of AGS Human Gastric Carcinoma Cells. *Molecules* **2020**, *25*, 2963. [[CrossRef](#)]
59. Yoo, D.; Kim, D. Lactobacillus pentosus var. plantarum C29 increases the protective effect of soybean against scopolamine-induced memory impairment in mice. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2015**, *66*, 912–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Marzulli, G.; Magrone, T.; Kawaguchi, K.; Kumazawa, Y.; Jirillo, E. Fermented grape marc (FGM): Immunomodulating properties and its potential exploitation in the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 43–50. [[CrossRef](#)]
61. Wen, J.; Ma, L.; Xu, Y.; Wu, J.; Yu, Y.; Peng, J.; Tang, D.; Zou, B.; Li, L. Effects of probiotic litchi juice on immunomodulatory function and gut microbiota in mice. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Campos-Vega, R.; Loarca-Pina, G.; Oomah, D. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 461–482. [[CrossRef](#)]
63. Bouchenak, M.; Lamri-Senhadj, M. Nutritional Quality of Legumes, and Their Role in Cardiometabolic Risk Prevention: A Review. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 1–14. [[CrossRef](#)]
64. Kamboj, R.; Nanda, V. Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes—A review. *Legum. Res.* **2018**, *41*, 325–332. [[CrossRef](#)]
65. FoodData Central Search Results by, U.S. Department of Agriculture. Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/query=LEGUMES> (accessed on 31 October 2021).
66. Kan, L.; Nie, S.; Hu, J.; Wang, S.; Bai, Z.; Wang, J.; Zhou, Y.; Jiang, J.; Zeng, Q.; Song, K. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chem.* **2018**, *260*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ferreira, H.; Vasconcelos, M.; Gil, A.M.; Pinto, E. Benefits of pulse consumption on metabolism and health: A systematic review of randomized controlled trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 85–96. [[CrossRef](#)]
68. Singh, B.; Singh, J.P.; Shevkani, K.; Singh, N.; Kaur, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 858–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Margier, M.; George, S.; Hafnaoui, N.; Remond, D.; Nowicki, M.; Du Chaffaut, L.; Amiot, M.; Reboul, E. Nutritional Composition and Bioactive Content of Legumes: Characterization of Pulses Frequently Consumed in France and Effect of the Cooking Method. *Nutrients* **2018**, *10*, 1668. [[CrossRef](#)]
70. Brummer, Y.; Kaviani, M.; Tosh, S.M. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Res. Int.* **2015**, *67*, 117–125. [[CrossRef](#)]
71. Chon, S. Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 6112–6124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Petchiammal, C.; Hopper, W. Antioxidant activity of proteins from fifteen varieties of legume seeds commonly consumed in India. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 476–479. [[CrossRef](#)]
73. Bacchetti, T.; Masciangelo, S.; Bicchiega, V.; Bertoli, E.; Ferrett, G. Phytosterols, phytostanols and their esters: From natural to functional foods. *Med. J. Nutr. Metab.* **2011**, *4*, 165–172. [[CrossRef](#)]
74. Kalogeropoulos, N.; Chiou, A.; Ioannou, M.; Karathanosa, V.T.; Hassapidou, M.; Andrikopoulou, N.K. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chem.* **2010**, *121*, 682–690. [[CrossRef](#)]
75. Mazquiz, M.; Varela, A.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Guillamon, E.; Pedrosa, M. Bioactive compounds in legumes: Pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 227–244. [[CrossRef](#)]
76. Lal, N.; Barcciaya, J.; Raypuriy, N.; Shiurkar, G. Anti-nutrition in legumes: Effect in human health and its elimination. *Inno. Farm.* **2017**, *2*, 32–36.
77. Han, I.H.; Baik, B. Oligosaccharide Content and Composition of Legumes and Their Reduction by Soaking, Cooking, Ultrasound, and High Hydrostatic Pressure. *Cereal Chem.* **2006**, *83*, 428–433. [[CrossRef](#)]
78. Nkhata, S.G.; Ayua, E.; Kamau, E.; Shingiro, J. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 2446–2458. [[CrossRef](#)]
79. Gomez, M.; Martinez, M.M. Changing flour functionality through physical treatments for the production of gluten-free baking goods. *J. Cereal Sci.* **2016**, *67*, 68–74. [[CrossRef](#)]
80. De Pasquale, I.; Pontonio, E.; Gobetti, M.; Rizello, C.G. Nutritional and functional effects of the lactic acid bacteria fermentation on gelatinized legume flours. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *316*, 108426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

81. Hefnawy, T.H. Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Ann. Agric. Sci.* **2011**, *56*, 57–61. [[CrossRef](#)]
82. Kouris-Blazos, A.; Belski, R. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2016**, *25*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Bartkiene, E.; Bartkevics, V.; Starkute, V.; Zadeike, D.; Juodeikiene, G. The Nutritional and Safety Challenges Associated with Lupin Lacto-Fermentation. *Front. Plant Sci.* **2016**, *28*, 951. [[CrossRef](#)]
84. Gobbetti, M.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Polo, A.; Rizzello, C.G. The sourdough fermentation is the powerful process to exploit the potential of legumes, pseudo-cereals and milling by-products in baking industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2158–2173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Schlegel, K.; Lidzba, N.; Ueberham, E.; Eisner, P.; Schweiggert-Weisz, U. Fermentation of Lupin Protein Hydrolysates—Effects on Their Functional Properties, Sensory Profile and the Allergenic Potential of the Major Lupin Allergen Lup an 1. *Foods* **2021**, *10*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Laaksonen, O.; Kahala, M.; Marsol, A.; Blasco, L.; Järvenpää, E.; Rosenvald, S.; Vietanen, M.; Tarvainen, M.; Yang, B. Impact of lactic acid fermentation on sensory and chemical quality of dairy analogues prepared from lupine (*Lupinus angustifolius* L.) seeds. *Food Chem.* **2020**, *346*, 128852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Galli, V.; Venturi, M.; Pini, N.; Guerrini, S.; Granchi, L. Exploitation of sourdough lactic acid bacteria to reduce raffinose family oligosaccharides (RFOs) content in breads enriched with chickpea flour. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245* (Suppl. S1), 2353–2363. [[CrossRef](#)]
88. Villacrés, E.; Cueva, P.; Diaz, M.; Rosell, C.M. Replacing Wheat Flour with Debittered and Fermented Lupin: Effects on Bread's Physical and Nutritional Features. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2020**, *75*, 569–575. [[CrossRef](#)]
89. Ogodo, A.C.; Ugbogu, O.C.; Onyeagba, R.A.; Okereke, H.C. In-vitro starch and protein digestibility and proximate composition of soybean flour fermented with lactic acid bacteria (LAB) consortia. *Agric. Nat. Resour.* **2018**, *52*, 503–509. [[CrossRef](#)]
90. Xu, Y.; Coda, R.; Shi, Q.; Tuomainen, P.; Katina, K.; Tenkanen, M. Exopolysaccharides Production during the Fermentation of Soybean and Fava Bean Flours by *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 2805–2815. [[CrossRef](#)]
91. Curiel, J.A.; Coda, R.; Centomani, I.; Summo, C.; Gobbetti, M.; Rizzello, C.G. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *196*, 51–61. [[CrossRef](#)]
92. Wang, Y.; Sorvali, P.; Laitila, A.; Maina, N.H.; Coda, R.; Katina, K. Dextran produced in situ as a tool to improve the quality of wheat-faba bean composite bread. *Food Hydrocoll.* **2018**, *84*, 396–405. [[CrossRef](#)]
93. Bartkiene, E.; Jakobson, I.; Pugajeva, I.; Bartkevics, V.; Zadeike, D.; Juodeikiene, G. Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine. *LWT* **2016**, *65*, 275–282. [[CrossRef](#)]
94. Rizzello, C.G.; Verni, M.; Koivula, H.; Montemurro, M.; Seppa, L.; Kemell, M.; Katina, K.; Coda, R.; Gobbetti, M. Influence of fermented faba bean flour on the nutritional, technological and sensory quality of fortified pasta. *Food Funct.* **2017**, *8*, 860–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Starzyńska-Janiszewska, A.; Stodolak, B.; Mickowska, B. Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *94*, 359–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Adeyemo, S.M.; Onilude, A.A. Weaning food fortification and improvement of fermented cereal and legume by metabolic activities of probiotics *Lactobacillus plantarum*. *Afr. J. Food Sci.* **2018**, *12*, 254–262. [[CrossRef](#)]
97. Pontonio, E.; Raho, S.; Dingo, C.; Centrone, D.; Carofiglio, V.E.; Rizzello, C.G. Nutritional, Functional, and Technological Characterization of a Novel Gluten- and Lactose-Free Yogurt-Style Snack Produced with Selected Lactic Acid Bacteria and Leguminosae Flours. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1664. [[CrossRef](#)]
98. Shori, A.B. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *J. Taibah Univ. Sci.* **2013**, *7*, 202–208. [[CrossRef](#)]
99. Garcia-Artega, V.; Leffler, S.; Muranyi, I.; Eisner, P.; Schweiggert-Weisz, U. Sensory profile, functional properties and molecular weight distribution of fermented pea protein isolate. *Curr. Res. Food Sci.* **2021**, *4*, 1–10. [[CrossRef](#)]
100. Filannino, P.; Di Cagno, R.; Gobetti, M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 64–72. [[CrossRef](#)]
101. Xiao, Y.; Wang, L.; Rui, X.; Li, W.; Chen, X.; Jiang, M.; Dong, M. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 33–44. [[CrossRef](#)]
102. Fritsch, C.; Vogel, R.F.; Toelstede, S. Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates—Influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 1075–1088. [[CrossRef](#)]
103. Landete, J.A.; Hernandez, T.; Robredo, S.; Duenas, M.; de Las Rivas, B.; Estrella, I.; Munoz, R. Effect of soaking and fermentation on content of phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit) and mung beans (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2015**, *66*, 203–209. [[CrossRef](#)]
104. Shi, Y.; Singh, A.; Kitts, D.; Pratap-Singh, A. Lactic acid fermentation: A novel approach to eliminate unpleasant aroma in pea protein isolates. *LWT* **2021**, *150*, 111927. [[CrossRef](#)]
105. Bartkiene, E.; Krungleviciute, V.; Juodeikiene, G.; Vidmantiene, D.; Maknickiene, Z. Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 1336–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. Sakandar, H.A.; Chen, Y.; Peng, C.; Chen, X.; Imran, M.; Zhang, H. Impact of Fermentation on Antinutritional Factors and Protein Degradation of Legume Seeds: A Review. *Food Rev. Int.* **2021**, *1–23*, 1–23. [[CrossRef](#)]
107. Pontonio, E.; Rizzello, C.G. Milk Alternatives and Non-Dairy Fermented Products: Trends and Challenges. *Foods* **2021**, *10*, 222. [[CrossRef](#)]
108. Starzyńska-Janiszewska, A.; Stodolak, B. Effect of Inoculated Lactic Acid Fermentation on Antinutritional and Antiradical Properties of Grass Pea (*Lathyrus sativus* 'Krab') Flour. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2011**, *61*, 245–249. [[CrossRef](#)]
109. Rui, X.; Wang, M.; Zhang, Y.; Chen, X.; Li, L.; Liu, Y.; Dong, M. Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. *J. Food Process. Preserv.* **2017**, *41*, 13290. [[CrossRef](#)]
110. Budryn, G.; Klewicka, E.; Grzelczyk, J.; Gałazka-Czarnecka, I.; Mostowski, R. Lactic acid fermentation of legume seed sprouts as a method of increasing the content of isoflavones and reducing microbial contamination. *Food Chem.* **2019**, *285*, 478–484. [[CrossRef](#)]
111. Jakubczyk, A.; Karaś, M.; Złotek, U.; Szymanowska, U.; Baraniak, B.; Bochniak, J. Peptides obtained from fermented faba bean seeds (*Vicia faba*) as potential inhibitors of an enzyme involved in the pathogenesis of metabolic syndrome. *LWT* **2019**, *105*, 306–313. [[CrossRef](#)]
112. Torino, M.I.; Limón, R.I.; Martínez-Villaluenga, C.; Mäkinen, S.; Pihlanto, A.; Vidal-Valverde, C.; Frias, J. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1030–1037. [[CrossRef](#)]
113. Bautista-Expósito, S.; Peñas, E.; Silván, J.M.; Frias, J.; Martínez-Villaluenga, C. pH-controlled fermentation in mild alkaline conditions enhances bioactive compounds and functional features of lentil to ameliorate metabolic disturbances. *Food Chem.* **2018**, *248*, 262–271. [[CrossRef](#)]
114. Limon, R.I.; Penas, E.; Torino, M.I.; Martinez-Villaluenga, C.; Duenas, M.; Frias, J. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chem.* **2015**, *1*, 343–352. [[CrossRef](#)]
115. Jakubczyk, A.; Karaś, M.; Baraniak, B.; Pietrzak, M. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3774–3780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Ayyash, M.; Johnson, S.K.; Liu, S.; Mesmari, N.; Dahmani, S.; Dhaheri, A.; Kizhakkayil, J. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp. *Food Chem.* **2019**, *275*, 50–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Jhan, J.; Chang, W.; Wang, P.; Chou, S.; Chungm, Y. Production of fermented red beans with multiple bioactivities using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *LWT* **2015**, *63*, 1281–1287. [[CrossRef](#)]
118. Verni, M.; Verardo, V.; Rizzello, C.G. How Fermentation Affects the Antioxidant Properties of Cereals and Legumes. *Foods* **2019**, *8*, 362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Krunglevičiūtė, V.; Starkutė, V.; Bartkienė, E.; Bartkevics, V.; Juodeikienė, G.; Vidmantienė, D.; Maknickienė, Z. Design of lupin seeds lactic acid fermentation—Changes of digestibility, amino acid profile and antioxidant activity. *Vet. Med. Zoot.* **2016**, *73*, 47–53.
120. Xing, Q.; Dekker, S.; Kyriakopoulou, K.; Boom, R.M.; Smid, E.J.; Schutyser, M.A.I. Enhanced nutritional value of chickpea protein concentrate by dry separation and solid state fermentation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *59*, 102269. [[CrossRef](#)]
121. Licandro, H.; Ho, P.H.; Nguyen, T.K.; Petchkongkaew, A.; Nguyen, H.V.; Chu-Ky, S.; Nguyen, T.V.; Lorn, D.; Wache, Y. How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? *Food Control* **2020**, *110*, 106957. [[CrossRef](#)]
122. Mohamed, R.K.; Arab, E.A.; Gibriel, A.Y.; Rasmy, N.M.; Abu-Salem, F.M. Effect of legume processing treatments individually or in combination on their phytic acid content. *Afr. J. Food Sci.* **2011**, *2*, 36–46.
123. Worku, A.; Sahu, O. Significance of fermentation process on biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* (red beans). *Biotechnol. Rep.* **2017**, *16*, 5–11. [[CrossRef](#)]
124. Coda, R.; Melama, L.; Rizzello, C.G.; Curiel, J.A.; Sibakov, J.; Holopainen, U.; Pulkkinen, M.; Sozer, N. Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *193*, 34–42. [[CrossRef](#)]
125. Kaczmarska, K.T.; Chandra-Hioe, M.V.; Frank, D.; Arcot, J. Aroma characteristics of lupin and soybean after germination and effect of fermentation on lupin aroma. *LWT* **2018**, *87*, 225–233. [[CrossRef](#)]
126. Youssef, C.E.; Bonnarme, P.; Fraud, S.; Peron, A.; Helinck, S.; Landaud, S. Sensory Improvement of a Pea Protein-Based Product Using Microbial Co-Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeasts. *Foods* **2020**, *9*, 349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Mäkinen, O.E.; Wanhalinna, V.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Foods for special dietary needs: Non-dairy plant based milk substitutes and fermented dairy type products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 339–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Alcorta, A.; Porta, A.; Tarrega, A.; Alvarez, M.D.; Vaquero, M. Foods for Plant-Based Diets: Challenges and Innovations. *Foods* **2021**, *10*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Walczak, Z.; Florowska, A.; Krygier, K. Plant-based milk beverages—Characteristics and availability in Poland. *Food Ind.* **2017**, *71*, 14–18. [[CrossRef](#)]
130. Cichońska, P.; Ziarno, M. Production and Consumer Acceptance of Millet Beverages. In *Milk Substitutes—Selected Aspects*; Ziarno, M., Ed.; Intech Open: London, UK, 2020; pp. 19–32. [[CrossRef](#)]
131. Jeske, S.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Evaluation of Physicochemical and Glycaemic Properties of Commercial Plant-Based Milk Substitutes. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2017**, *72*, 26–33. [[CrossRef](#)]
132. Haas, R.; Schnepps, A.; Pichler, A.; Meixner, O. Cow Milk versus Plant-Based Milk Substitutes: A Comparison of Product Image and Motivational Structure of Consumption. *Sustainability* **2019**, *11*, 5046. [[CrossRef](#)]

133. Fox, N.; Ward, K. Health, ethics and environment: A qualitative study of vegetarian motivations. *Appetite* **2008**, *50*, 422–429. [[CrossRef](#)]
134. Wolf, C.A.; Malone, T.; McFadden, B.R. Beverage milk consumption patterns in the United States: Who is substituting from dairy to plant-based beverages? *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 11209–11217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Pelletier, N.; Tyedmers, P. Forecasting potential global environmental costs of livestock production 2000–2050. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18371–18374. [[CrossRef](#)]
136. Thornton, P.K. Livestock production: Recent trends, future prospects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2010**, *365*, 2853–2867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Hoffmann, M.; Kostyra, E. Sensory quality and nutritional value of vegan substitutes of milk. *Postępy Tech. Przetw. Spoż.* **2015**, *1*, 52–57.
138. Cichońska, P.; Ziarno, M. Choices and preferences of young women on plant-based beverages. *Postępy Tech. Przetw. Spoż.* **2021**, *31/58*, 22–28.
139. McClements, D.J.; Newman, E.; McClements, I.F. Plant-based Milks: A Review of the Science Underpinning Their Design, Fabrication, and Performance. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 2047–2067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. COMMISSION REGULATION (EU) No 605/2010 of 2 July 2010 laying down animal and public health and veterinary certification conditions for the introduction into the European Union of raw milk and dairy products intended for human consumption. *Off. J. Eur. Union* **2010**, *175*, 1–24.
141. Fructuoso, I.; Romao, B.; Han, H.; Raposo, A.; Ariza-Montes, A.; Arya-Castillo, L.; Zandonadi, R.P. An Overview on Nutritional Aspects of Plant-Based Beverages Used as Substitutes for Cow's Milk. *Nutrients* **2021**, *13*, 2650. [[CrossRef](#)]
142. Parrish, C.R. Moo-ove Over, Cow's Milk: The Rise of Plant-Based Dairy Alternatives. *Pract. Gastroenterol.* **2018**, *171*, 20–27.
143. Veber, A.L.; Leonova, S.A.; Simakova, I.V.; Esmurzaeva, Z.B. The development of a beverage with a dispersion structure from pea grains of domestic selection. *IOP Conf. Ser.* **2021**, *624*, 012127. [[CrossRef](#)]
144. Chalupa-Krebsdak, S.; Long, C.J.; Bohrer, B.M. Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *Int. Dairy J.* **2018**, *87*, 84–92. [[CrossRef](#)]
145. Vanga, S.K.; Raghavan, V. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Manzoor, M.F.; Manzoor, A.; Siddique, R.; Ahmad, N. Nutritional and sensory properties of cashew seed (*Anacardium occidentale*) milk. *Mod. Concepts Dev. Agron.* **2017**, *1*, 1–4. [[CrossRef](#)]
147. Shen, P.; Walker, G.D.; Yuan, Y.; Reynolds, C.; Stanton, D.P.; Fernando, J.R.; Reynolds, E.C. Effects of soy and bovine milk beverages on enamel mineral content in a randomized, double-blind in situ clinical study. *J. Dent.* **2019**, *88*, 103160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Giri, S.K.; Managaraj, S. Processing Influences on Composition and Quality Attributes of Soymilk and its Powder. *Food Eng. Rev.* **2012**, *4*, 149–164. [[CrossRef](#)]
149. Jiang, S.; Cai, W.; Xu, B. Food Quality Improvement of Soy Milk Made from Short-Time Germinated Soybeans. *Foods* **2013**, *2*, 198–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Pandhi, S.; Poonia, A. Formulation of pea milk fortified dahi incorporated with jamun seed extract. *Indian J. Dairy Sci.* **2021**, *74*, 80–88. [[CrossRef](#)]
151. Vogelsang-O'Dwyer, M.; Sahin, A.W.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Physicochemical and nutritional properties of high protein emulsion-type lupin-based model milk alternatives: Effect of protein source and homogenization pressure. *J. Sci. Food Agric.* **2021**. [[CrossRef](#)]
152. Lopes, M.; Pierrepont, C.; Duarte, C.M.; Filipe, A.; Medronho, B.; Sousa, I. Legume Beverages from Chickpea and Lupin, as New Milk Alternatives. *Foods* **2020**, *9*, 1458. [[CrossRef](#)]
153. Singhal, S.; Baker, R.D.; Baker, S.S. A Comparison of the Nutritional Value of Cow's Milk and Nondairy Beverages. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2017**, *64*, 799–805. [[CrossRef](#)]
154. Atalar, I. Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. *LWT* **2019**, *107*, 256–263. [[CrossRef](#)]
155. Aysu, S.; Akil, F.; Çevik, E.; Kılıç, M.E.; İlyasoğlu, H. Development of Homemade Hazelnut Milk-based Beverage. *J. Culin. Sci. Technol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
156. Gul, O.; Saricaoglu, F.T.; Atalar, I. Effect of high pressure homogenization on microstructure and rheological properties of hazelnut beverage cold-set gels induced glucono- δ -lactone. *LWT* **2021**, *143*, 111154. [[CrossRef](#)]
157. Afaneh, I.; Abu-Alruz, K.; Quasem, J.M.; Sundookah, A.; Abbadi, J.; Alloussi, S.; Ayyad, Z. Fundamental elements to produce sesame yoghurt from sesame milk. *Am. J. Appl. Sci.* **2011**, *8*, 1086–1092. [[CrossRef](#)]
158. Ahmadian-Kouchaksaraei, Z.; Varidi, M.; Varidi, M.J.; Pourazarang, H. Influence of processing conditions on the physicochemical and sensory properties of sesame milk: A novel nutritional beverage. *LWT* **2014**, *57*, 299–305. [[CrossRef](#)]
159. Kaur, I.; Tanwar, B. Quinoa beverages: Formulation, processing and potential health benefits. *Rom. J. Diabetes Nutr. Metab. Dis.* **2016**, *23*, 215–225. [[CrossRef](#)]
160. Pineli, L.L.; Botelho, R.B.; Zandonadi, R.P.; Solorzano, J.L.; de Oliveira, G.T.; Reis, C.E.; Teixeira, D. Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. *LWT* **2015**, *63*, 1261–1267. [[CrossRef](#)]
161. Cardinali, F.; Osimani, A.; Milanović, V.; Garofaslo, C.; Aquilanti, L. Innovative Fermented Beverages Made with Red Rice, Barley, and Buckwheat. *Foods* **2021**, *10*, 613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

162. Kowalska, E.; Ziarno, M. Characterization of Buckwheat Beverages Fermented with Lactic Acid Bacterial Cultures and Bifidobacteria. *Foods* **2020**, *9*, 1771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Zhou, Y.; Jiang, Q.; Zhao, S.; Yan, B.; Zhou, X. Impact of Buckwheat Fermented Milk Combined with High-Fat Diet on Rats' Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 3833–3842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Lu, X.; Chen, J.; Zheng, M.; Guo, J.; Qi, J.; Chen, Y.; Miao, S.; Zheng, B. Effect of high intensity ultrasound irradiation on the stability and structural features of coconut grain milk composite systems utilizing maize kernels and starch with different amylose contents. *Ultrason. Sonochem.* **2019**, *55*, 135–148. [[CrossRef](#)]
165. Craig, W.; Fresan, U. International Analysis of the Nutritional Content and a Review of Health Benefits of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Nutrients* **2021**, *13*, 842. [[CrossRef](#)]
166. Islam, N.; Shafiee, M.; Vatanparast, H. Trends in the consumption of conventional dairy milk and plant-based beverages and their contribution to nutrient intake among Canadians. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2021**. [[CrossRef](#)]
167. Decloedt, A.; Van Landschoot, A.; Watson, H.; Vanderputten, D.; Vanhaecke, L. Plant-Based Beverages as Good Sources of Free and Glycosidic Plant Sterol. *Nutrients* **2018**, *10*, 21. [[CrossRef](#)]
168. Gylling, H.; Plat, J.; Turley, S.; Ginsberg, H.N.; Ellegard, L.; Jessup, W.; Jones, P.; Lutjohann, D.; Maerz, W.; Masana, L.; et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **2014**, *232*, 346–360. [[CrossRef](#)]
169. Silva, A.G.; Rebellato, A.P.; Carames, E.T.; Greiner, R.; Pallone, J.A. In vitro digestion effect on mineral bioaccessibility and antioxidant bioactive compounds of plant-based beverages. *Food Res. Int.* **2020**, *130*, 108993. [[CrossRef](#)]
170. Obrenovich, M.E.; Li, Y.; Parvathaneni, K.; Yendluri, B.B.; Palacios, H.H.; Leszek, J.; Aliev, G. Antioxidants in health, disease and aging. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2011**, *10*, 192–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Qamar, S.; Manrique, Y.J.; Parekh, H.; Falconer, J.R. Nuts, cereals, seeds and legumes proteins derived emulsifiers as a source of plant protein beverages: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2742–2762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Chen, Y.; Zhang, H.; Liu, R.; Mats, L.; Zhu, H.; Pauls, K.P.; Deng, Z.; Tsao, R. Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols and peptides of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk and yogurt in Caco-2 and HT-29 cell models. *J. Funct. Foods* **2019**, *53*, 125–135. [[CrossRef](#)]
173. Xia, X.; Dai, Y.; Wu, H.; Liu, X.; Wang, Y.; Cao, J.; Zhou, J. Effects of pressure and multiple passes on the physicochemical and microbial characteristics of lupin-based beverage treated with high-pressure homogenization. *J. Food Process. Preserv.* **2019**, *43*, 13912. [[CrossRef](#)]
174. Nawaz, M.A.; Singh, T.K.; Jegasothy, H.; Buckow, R. UHT Treatment on the Stability of Faba Bean Protein Emulsion. *Proceedings* **2021**, *70*, 29. [[CrossRef](#)]
175. Felberg, I.; Antoniassi, R.; Deliza, R.; Freitas, S.C.; Modesta, R.C. Soy and Brazil nut beverage: Processing, composition, sensory, and color evaluation. *Food Sci. Technol.* **2009**, *29*, 609–617. [[CrossRef](#)]
176. Hayat, I.; Ahmad, A.; Ahmed, A.; Khalil, S.; Gulfranz, M. Exploring the potential of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to develop protein based product for food applications. *J. Anim. Plant Sci.* **2014**, *24*, 860–868.
177. Abbas, Y.; Ahmad, A. Impact of processing on nutritional and antinutritional factors of legumes: A review. *Ann. Food Sci. Technol.* **2018**, *19*, 199–215.
178. Agrahar-Murugka, B.; Bajpai-Dixit, P.; Kotwaliwale, N. Rheological, nutritional, functional and sensory properties of millets and sprouted legume based beverages. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 1671–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Ianchyk, M.; Atanasova, V. Effect of germinated lentil seeds addition on the nutritional value of the beverage. *Ukr. J. Food Sci.* **2020**, *8*, 241–250. [[CrossRef](#)]
180. Mohan, N.; Mellem, J.J. Functional properties of the protein isolates of hyacinth bean [*Lablab purpureus* (L.) Sweet]: An effect of the used procedures. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *129*, 109572. [[CrossRef](#)]
181. Boostani, S.; Aminlari, M.; Moosavi-Nasab, M.; Niakosari, M.; Mesbahi, G. Fabrication and characterisation of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: A novel ingredient in spraydried soy beverage formulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *9*, 102. [[CrossRef](#)]
182. Trikusuma, M.; Paravisini, L.; Peterson, D.G. Identification of aroma compounds in pea protein UHT beverages. *Food Chem.* **2020**, *312*, 126082. [[CrossRef](#)]
183. Xu, J.; He, Z.; Zeng, M.; Li, B.; Qin, F.; Wang, L.; Wu, S.; Chen, J. Effect of xanthan gum on the release of strawberry flavor in formulated soy beverage. *Food Chem.* **2017**, *228*, 595–601. [[CrossRef](#)]
184. Rincon, L.; Assuncao, R.B.; Rodrigues de Alencar, E. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *128*, 109479. [[CrossRef](#)]
185. Silva, M.C.; Speridiao, P.L.; Marciano, R.; Amancio, O.M.; d Morais, T.B.; de Morais, M.B. Effects of soy beverage and soy-based formula on growth, weight, and fecal moisture: Experimental study in rats. *J. Pediatr.* **2015**, *91*, 306–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Arnoldi, A.; Resta, D.; Brambilla, F.; Boschini, G.; D'Agostina, A.; Sirtori, E.; O'Kane, F. Parameters for the evaluation of the thermal damage and nutraceutical potential of lupin-based ingredients and food products. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 431–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Rossi, A.L.; Blostein-Fujii, A.; DiSilvestro, R.A. Soy Beverage Consumption by Young Men: Increased Plasma Total Antioxidant Status and Decreased Acute, Exercise-Induced Muscle Damage. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods.* **2001**, *3*, 33–44. [[CrossRef](#)]

188. Jackson, C.J.; Dini, J.P.; Lavandier, C.; Rupasinghe, H.P.V.; Faulkner, H.; Poysa, V.; Buzzell, D.; DeGrandis, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* **2002**, *37*, 1117–1123. [[CrossRef](#)]
189. Anupongsanugool, E.; Teekachunhatean, S.; Rojanasthien, N.; Pongsatha, S.; Sangdee, C. Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clin. Pharmacol.* **2005**, *3*, 2. [[CrossRef](#)]
190. Ariviani, S.; Affandi, D.R.; Listyaningsih, E.; Handajani, S. The potential of pigeon pea (*Cajanus cajan*) beverage as an anti-diabetic functional drink. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *102*, 012054. [[CrossRef](#)]
191. Wang, S.; Chelikani, V.; Serventi, L. Evaluation of chickpea as alternative to soy in plant-based beverages, fresh and fermented. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *97*, 570–572. [[CrossRef](#)]
192. Chaturvedi, S.; Chakraborty, S. Review on potential non-dairy synbiotic beverages: A preliminary approach using legumes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2021**, *56*, 2068–2077. [[CrossRef](#)]
193. Ziarno, M.; Bryś, J.; Parzyszek, M.; Veber, A. Effect of Lactic Acid Bacteria on the Lipid Profile of Bean-Based Plant Substitute of Fermented Milk. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1348. [[CrossRef](#)]
194. Verni, M.; Demarinis, C.; Rizzello, C.G.; Baruzzi, F. Design and Characterization of a Novel Fermented Beverage from Lentil Grains. *Foods* **2020**, *9*, 893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Oladeji, B.S.; Badmus, A.O. Physico-chemical and sensory properties of cereal/legume-substituted cocoa-based beverage. *Nutr. Food Sci.* **2014**, *44*, 400–406. [[CrossRef](#)]
196. Akeem, S.A.; Kolaole, F.L.; Joseph, J.K.; Kayode, R.M.; Akintayo, O.A. Traditional food processing techniques and micronutrients bioavailability of plant and plant-based foods: A Review. *Annals. Food Sci. Technol.* **2019**, *20*, 30–41.
197. Zielińska, D.; Kołożyn-Krajewska, D.; Goryl, A. Survival models of potentially probiotic *Lactobacillus casei* KN291 bacteria in a fermented soy beverage. *Food. Sci. Technol. Qual.* **2008**, *5*, 126–134.
198. Aduol, K.O.; Onyango, A.N.; Imathiu, S.M. Proximate, Microbial and Sensory Characteristics of Cowpea Milk Fermented with Probiotic Starter Cultures. *EJFOOD* **2020**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)]
199. Bao, Y.; Zhang, Y.; Li, H.; Liu, Y.; Wang, S.; Dong, X.; Su, F.; Yao, G.; Sun, T.; Zhang, H. In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*, 1311–1320. [[CrossRef](#)]
200. Kumari, A.; Angmo, K.; Monika, S.; Bhalla, T.C. Functional and technological application of probiotic *L. casei* PLA5 in fermented soymilk. *Int. Food Res. J.* **2018**, *25*, 2164–2172.
201. Bernat, N.; Chafer, M.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. Vegetable milks and their fermented derivative products. *Int. J. Food Stud.* **2014**, *3*, 93–124. [[CrossRef](#)]
202. Hati, S.; Vij, S.; Mandal, S.; Malik, R.K.; Kumar, V.; Khetra, Y. α -galactosidase activity and oligosaccharides utilization by *Lactobacilli* during fermentation of soy milk. *J. Food Process. Preserv.* **2013**, *38*, 1065–1071. [[CrossRef](#)]
203. Oh, N.; In, M. Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soymilk. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 3023–3026.
204. Donkor, O.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N.P. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chem.* **2007**, *104*, 10–20. [[CrossRef](#)]
205. Marazza, J.A.; Nazareno, M.A.; de Giori, G.S.; Garro, M.S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 594–601. [[CrossRef](#)]
206. Zhang, X.; Zhang, S.; Xie, B.; Sun, Z. Influence of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chickpea Yam Milk. *J. Food Qual.* **2021**, 5523356. [[CrossRef](#)]
207. Wang, Y.; Yu, R.; Chou, C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 128–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Anino, C.; Onyango, A.; Imathiu, S.; Maina, J. Effect of Lactic Acid Bacteria Starter Cultures on Vitamin and Oligosaccharide Composition of Milk Extracted from Three Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Varieties. *J. Food Res.* **2019**, *8*, 103–110. [[CrossRef](#)]
209. Del Valle, M.J.; Laino, J.E.; de Giori, G.S.; LeBlanc, J.G. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 1015–1019. [[CrossRef](#)]
210. Molina, V.; Medici, M.; de Valdez, G.; Taranto, M. Soybean-based functional food with vitamin B12-producing lactic acid bacteria. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 831–836. [[CrossRef](#)]
211. Li, C.; Li, W.; Chen, X.; Feng, M.; Rui, X.; Jiang, M.; Dong, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT* **2014**, *57*, 477–485. [[CrossRef](#)]
212. Ahsan, S.; Khalia, A.; Chughtai, M.; Nadeem, M.; Din, A.; Hlebova, M.; Rebezov, M.; Khayrullin, M.; Mikolaychik, I.; Morozova, L.; et al. Functional exploration of bioactive moieties of fermented and non-fermented soy milk with reference to nutritional attributes. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **2020**, *10*, 145–149. [[CrossRef](#)]
213. Božanić, R.; Lovković, S.; Jeličić, I. Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech J. Food Sci.* **2011**, *29*, 51–56. [[CrossRef](#)]
214. Bordignon, J.R.; Nakahara, K.; Yoshihashi, T.; Nikkuni, S. Hydrolysis of Isoflavones and Consumption of Oligosaccharides during Lactic Acid Fermentation of Soybean Milk. *Jpn. Agric. Res. Q.* **2004**, *38*, 259–265. [[CrossRef](#)]
215. Chien, H.; Huang, H.; Chou, C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 772–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

216. Choi, Y.; Kim, K.; Rhee, J. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 2113–2116. [[CrossRef](#)]
217. Hsieh, M.; Chou, C. Mutagenicity and antimutagenic effect of soymilk fermented with Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *111*, 43–47. [[CrossRef](#)]
218. Champagne, C.P.; Tompkins, T.A.; Buckley, N.D.; Green-Johnson, J.M. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 968–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Olaniyi, O.I.; Adeniran, H.A.; Abiose, S.H. Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria in African yam bean-based drink. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26*, 1733–1740.
220. Naprasert, J.; Suttisansanee, U.; Kemsawasd, V. Single and mixed lactic acid bacteria culture fermentation in red bean milk for development of a functional beverage. *Malays. Appl. Biol.* **2019**, *48*, 139–145.
221. Rui, X.; Wen, D.; Li, W.; Chen, X.; Jiang, M.; Dong, M. Enrichment of ACE inhibitory peptides in navy bean (*Phaseolus vulgaris*) using lactic acid bacteria. *Food Funct.* **2015**, *6*, 622–629. [[CrossRef](#)]
222. Liao, W.; Wang, C.; Shyu, Y.; Yu, R.; Ho, K. Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1108–1115. [[CrossRef](#)]
223. Ziarno, M.; Zaręba, D.; Maciejak, M.; Veber, A. The impact of dairy starter cultures on selected qualitative properties of functional fermented beverage prepared from germinated white kidney beans. *J. Food Nutr. Res.* **2019**, *58*, 167–176.
224. Vasilean, I.; Aprodu, I.; Garnai, M.; Munteanu, V.; Patrascu, L. Preliminary Investigations into the Use of Amylases and Lactic Acid Bacteria to Obtain Fermented Vegetable Products. *Foods* **2021**, *10*, 1530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Skrzypczak, K.; Jabłońska-Ryś, E.; Gustaw, K.; Sławińska, A.; Waśko, A.; Radzki, W.; Michalak-Majewska, M.; Gustaw, W. Reinforcement of the Antioxidative Properties of Chickpea Beverages Through Fermentation Carried Out by Probiotic Strain *Lactobacillus plantarum* 299v. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2019**, *13*, 1–12. [[CrossRef](#)]
226. Mohanty, D.; Misra, S.; Mohapatra, S.; Sahu, P. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Biosci.* **2018**, *26*, 152–160. [[CrossRef](#)]
227. Nie, Y.; Luo, F.; Lin, Q. Dietary nutrition and gut microflora: A promising target for treating diseases. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *75*, 72–80. [[CrossRef](#)]
228. Patel, R.; DuPont, H.L. New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, 108–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)]
230. Davani-Davari, D.; Negahdaripour, M.; Karimzadeh, I.; Seifan, M.; Mohkam, M.; Masoumi, S.J.; Berenjian, A.; Ghasemi, Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* **2019**, *8*, 92. [[CrossRef](#)]
231. Lockyer, S.; Nugent, A.P. Health effects of resistant starch. *Nutr. Bull.* **2017**, *42*, 10–41. [[CrossRef](#)]
232. Martinez-Villaluenga, C.; Frias, J.; Vidal-Valverde, C. Alpha-Galactosides: Antinutritional Factors or Functional Ingredients? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 301–316. [[CrossRef](#)]
233. Gullion, F.; Champ, M. Carbohydrate fractions of legumes: Uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 293–306. [[CrossRef](#)]
234. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **2013**, *5*, 1417–1435. [[CrossRef](#)]
235. Johnson, N.; Johnson, C.R.; Thavarajah, P.; Kumar, S.; Thavarajah, D. The roles and potential of lentil prebiotic carbohydrates in human and plant health. *Plants People Planet* **2020**, *2*, 310–319. [[CrossRef](#)]
236. Valero-Cases, E.; Cerdá-Bernad, D.; Pastor, J.; Frutos, M. Non-Dairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. *Nutrients* **2020**, *12*, 1666. [[CrossRef](#)]
237. Johnson, C.R.; Thavarajah, D.; Combs, G.F.; Thavarajah, P. Lentil (*Lens culinaris* L.): A prebiotic-rich whole food legume. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 107–113. [[CrossRef](#)]
238. Prieto-Santiago, V.; Cavia, M.; Barba, F.J.; Alonso-Torre, S.R.; Carillo, C. Multiple reaction monitoring for identification and quantification of oligosaccharides in legumes using a triple quadrupole mass spectrometer. *Food Chem.* **2022**, *368*, 130761. [[CrossRef](#)]
239. Swennen, K.; Courtin, C.M.; Delcour, J.A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 459–471. [[CrossRef](#)]
240. Shakappa, D.; Talari, A. I Rajkumar, H.; Shujauddin, M. Hypolipidemic Effect of Red Gram (*Cajanus cajan* L.) Prebiotic Oligosaccharides in Wistar NIN Rats. *J. Diet. Suppl.* **2018**, *15*, 410–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Rengadu, D.; Gerrano, A.S.; Mellem, J.J. Prebiotic effect of resistant starch from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea) using an in vitro simulated digestion model. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 332–339. [[CrossRef](#)]
242. Fuentes-Zaragoza, E.; Sanchez-Zapata, E.; Sendra, E.; Sayas, E.; Navarro, C.; Fernandez-Lopez, J.; Perez-Alvarez, J. Resistant starch as prebiotic: A review. Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch* **2011**, *63*, 406–415. [[CrossRef](#)]
243. Sanders, M.E.; Merenstein, D.J.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Rastall, R.A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 605–616. [[CrossRef](#)]

244. Moorthy, M.; Chaikunapruk, N.; Jacob, S.A.; Palanisamy, U.D. Prebiotic potential of polyphenols, its effect on gut microbiota and anthropometric/clinical markers: A systematic review of randomised controlled trials. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *99*, 634–649. [[CrossRef](#)]
245. Thilakarathna, W.; Langille, M.; Rupasinghe, V. Polyphenol-based prebiotics and synbiotics: Potential for cancer chemoprevention. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *20*, 51–57. [[CrossRef](#)]
246. Alves-Santos, A.M.; Sugizaki, C.S.; Lima, G.C.; Naves, M.M. Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. *J. Funct. Foods* **2020**, *74*, 104169. [[CrossRef](#)]
247. Cueva, C.; Silva, M.; Pinillos, I.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. *Nutrients* **2020**, *12*, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Steer, T.E.; Johnson, I.T.; Gee, J.M.; Gibson, G.R. Metabolism of the soyabean isoflavone glycoside genistin in vitro by human gut bacteria and the effect of prebiotics. *Br. J. Nutr.* **2003**, *90*, 635–641. [[CrossRef](#)]

Warszawa, 10.09.2024

Patrycja Malinowska (z d. Cichońska)
patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Ziarno, M., 2022, Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics, Microorganisms, 10(1), 91 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zainicjowaniu wykonania badań, opracowaniu koncepcji pracy, opracowaniu metodologii, przeprowadzaniu analizy literatury, analizie danych, napisaniu publikacji, edycji i recenzji publikacji, wizualizacji danych i pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Warszawa, 18.04.2024

Małgorzata Ziarno
malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie



Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Ziarno, M., 2022, Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics, Microorganisms, 10(1), 91 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji pracy, częściowym opracowaniu metodologii, częściowej analizie literatury i danych, wsparciu w pisaniu publikacji, edycji i recenzji publikacji, wizualizacji danych i pozyskiwaniu finansowania.

Podpis



Article

Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages

Patrycja Cichońska ¹, Ewa Domian ^{2,*} and Małgorzata Ziarno ¹

¹ Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW (WULS-SGGW), Nowoursynowska 159c St., 02-787 Warsaw, Poland

² Department of Food Engineering and Process Management, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences-SGGW (WULS-SGGW), Nowoursynowska 159c St., 02-787 Warsaw, Poland

* Correspondence: ewa_domian@sggw.edu.pl

Abstract: The objectives of this study were to compare the properties of the yogurt-type bean-based beverages B and BG produced from the nongerminated and germinated beans, respectively, by high-pressure homogenization (HPH) and fermentation with three starter cultures. Optical techniques were used to evaluate the particle size distribution (PSD), color parameters, and instability during storage, while rheological tests were used to evaluate the shear viscosity, flow behavior, and viscoelastic properties. The BG compared to B, irrespective of the starter culture used, showed a higher mean diameter and Span of PSD ($d_{4,3} \approx 76.8\text{--}84.2$, Span $\approx 2.24\text{--}2.35$ for BG vs. $d_{4,3} \approx 38.2\text{--}47.0$, Span $\approx 1.90\text{--}2.00$ for B). The BG vs. B showed lower viscosity (0.47 Pa·s for BG vs. 0.81 Pa·s for B at shear rate 75 s^{-1}) and slightly lower but satisfactory stability (after 21 days at 6 °C, the Turbiscan Stability Index TSI $\approx 1.3\text{--}2.0$ for BG vs. TSI $\approx 0.6\text{--}0.9$ for B). Both B and BG were characterized by light-yellow color and showed the characteristics of a viscoelastic fluid. The HPH and germination mainly affected the properties of the tested plant tissue, which has a direct impact on the properties of the final products.

Keywords: plant-based beverages; fermentation; storage stability; viscoelastic properties; particle size distribution; oscillatory rheology



Citation: Cichońska, P.; Domian, E.; Ziarno, M. Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages. *Sensors* **2022**, *22*, 8348. <https://doi.org/10.3390/s22218348>

Academic Editor: Somsubhra Chakraborty

Received: 11 October 2022

Accepted: 28 October 2022

Published: 31 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Foods are complex materials, mostly consisting of mixtures of solids and fluid structural components [1]. When developing a novel food, it is of great importance to determine its properties, which is possible through the use of various types of analytical techniques. Food analysis is an essential aspect of quality control, which enables the production of safe food with defined and reproducible properties [2]. Besides traditional methods for assessing the quality of food, such as chemical, microbiological, and sensory analysis, there are also rheological and optical methods that describe the structural properties of food.

Most of the optical methods used in food analysis are based on conventional visible and near-infrared spectroscopy. These techniques use measurements of the aggregate amount of light either reflected from or transmitted through a biological or food material, resulting from the combined effect of absorption and scattering of photons by the tissues. The obtained data are converted into quantitative or qualitative parameters describing the observed phenomenon [3]. The optical methods can be used for nondestructive, real-time, and fast monitoring of the samples. They are based on measuring the properties of incident or reflected light in food systems. Various types of analytical devices are used that analyze light scattering, laser diffraction of particles, or monitor the mechanisms that occur in food during storage, including particle destabilization. As a result, optical studies enable

the analysis of various food characteristics, including, e.g., stability, color, turbidity, and particle size distribution [4,5].

Rheology studies the flow and deformation of matter and is an important tool to characterize fundamental processing properties of food systems such as fluid flow properties, viscosity, and elasticity [6]. It describes a relationship between the stress acting on a given material and the resulting deformation and/or flow that takes place [1,6]. Rheological properties play an important role in food process design. Rheological data are required for calculation in any process involving fluid flow, including pump sizing, extraction, filtration, extrusion, and purification. These data enable an analysis of flow conditions in many food processes (e.g., in pasteurization, evaporation, and drying) [5,7].

Plant-based diets have been gaining popularity in the food market in recent years. As reported in previous studies, consumers are increasingly avoiding animal products due to the following reasons: allergies to the proteins present in cow's milk, intolerance to lactose, environmental or animal welfare concerns, desire to follow a vegan lifestyle, and willingness to diversify their diets [8–11]. Among dairy alternatives, the most popular ones are milk substitutes, which are usually referred to as plant-based beverages [12]. These products are colloidal systems that are formed by large, dispersed particles such as fat globules, solid particles from raw materials, proteins, and starch granules. The presence of these components limits the possibility of obtaining a stable product due to sedimentation [12]. Ultrahigh-pressure homogenization and high-pressure homogenization (HPH) are some of the novel technologies used in the production of plant-based milk substitutes. These processing technologies result in smaller and more uniform-sized particles, reduction of adverse mouthfeel, and increased stability of liquid food products [12,13]. HPH alters the arrangement of components and thus modifies the particle size, color, viscosity, and physical stability of the product [14]. Application of HPH also allows deflocculating clusters of primary oil bodies and uniform dispersion of agglomerates in plant-based beverages [14–17].

Since the demand for dairy alternatives is increasing in the world market, it is of primordial importance to food companies to develop new products [18]. Soybean beverage is the most popular milk substitute on the market [19,20]. However, some research studies have shown that legumes other than soybean are also suitable to produce plant-based beverages [21,22]. One of them is beans which are rich in carbohydrates, proteins, vitamins, minerals, phenolics, polyphenols, and phytosterols [15,23,24]. Legumes have gained great popularity as a dairy alternative; however, their beany flavor and the antinutritional factors (ANFs) they contain are undesirable and must therefore be eliminated in the manufacturing process [12,25]. ANFs present in food, such as phytic acid, trypsin inhibitor, lectins, and some oligosaccharides, reduce the digestibility and bioavailability of nutrients [15,26]. A variety of techniques are used to eliminate off-flavors and ANFs from legumes, including soaking, boiling, heat treatment, fermentation, and germination. During germination, proteolytic enzymes are activated, which change the protein profile of legumes. This results in an increase in the amount of protein and dietary fiber and a reduction in the content of tannins and phytic acid, as well as an improvement in the bioavailability of minerals [27,28]. Similarly, fermentation reduces off-flavors and ANFs and increases the bioavailability of bioactive components as microorganisms break down complex organic substances into simpler molecules [15,29].

The above-mentioned HPH, germination, and fermentation can aid in achieving new organoleptic and functional characteristics in the product, which can favor the production of novel dairy alternatives, including yogurt-type probiotic products [19,30,31]. Describing the properties of newly developed products using specific analytical methods is important for determining their application in the food industry. It may be advantageous to use optical methods, the application of which allows for the analysis of the stability and physicochemical characteristics of the product particles, as well as rheological methods that describe the viscosity and flow behavior of the medium. There is a lack of studies on the use of optical and rheological methods in the analysis of bean-based beverages (BBB). Therefore, our study aimed to compare the quality and storage properties of the newly developed products

with colloidal-suspension structure such as yogurt-type bean-based beverages (Y-T BBB) using optical and rheological methods. The effects of germination, fermentation with three different starter cultures, and storage at 6 °C on the BBB were analyzed. Optical techniques were used to evaluate the Y-T BBB towards particle size distribution, color characteristics, and the instability phenomena during storage, while rheological tests were used to evaluate the shear viscosity, flow behavior, and viscoelastic properties.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Experimental Design

The BBB used in our study were prepared from white kidney beans “Piękny Jaś Karłowcy” (Lestello Sp. z o.o., Cmolas, Poland). Three industrial freeze-dried starter cultures were used: Beaugel Soja 1 (Ets Coquard, Villefranche-sur-Saône, France), which consisted of *Lactobacillus casei* (currently classified as *Lacticaseibacillus casei*), *Streptococcus thermophilus*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; YO-MIX 207 LYO 500 DCU (DuPont™ Danisco, Copenhagen, Denmark), which consisted of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium lactis*; and ABY-3 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark), which consisted of *L. acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *S. thermophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Two variants of beverages were produced: B and BG from non- and germinated beans, respectively. The experimental design used in the study was based on three factors: beans germination, starter culture used for fermentation, and period of storage at 6 °C (Table 1).

Table 1. The explanation of the sample codes for B and BG beverages.

Sample Code	Beans Germination	Fermentation/Starter Culture	Storage at 6 °C
B0	-	-	1 day
B100	-	Beaugel Soja 1	1 day
B101	-	YO-MIX 207	1 day
B102	-	ABY-3	1 day
B0s	-	-	21 days
B100s	-	Beaugel Soja 1	21 days
B101s	-	YO-MIX 207	21 days
B102s	-	ABY-3	21 days
BG0	+	-	1 day
BG100	+	Beaugel Soja 1	1 day
BG101	+	YO-MIX 207	1 day
BG102	+	ABY-3	1 day
BG0s	+	-	21 days
BG100s	+	Beaugel Soja 1	21 days
BG101s	+	YO-MIX 207	21 days
BG102s	+	ABY-3	21 days

2.2. Development of Fermented Bean-Based Beverages

The BBB were obtained according to Ziarno et al. [32] with some modifications. Briefly, the germination was carried out in a sprouter at 25 °C for 72 h (water was changed every 24 h) placed in a laboratory incubator. Germinated and nongerminated beans were sterilized in the drinking water at 121 °C for 15 min to perform the starch gelatinization and inactivate microorganisms and native bean enzymes. The sterilized beans were then mixed with drinking water at a ratio of 1:9 (m/m) including the water absorbed during sterilization and blended for 7 min until a homogeneous mass was obtained. The resulting mass was filtered through a sieve with a mesh size of 0.1 mm. The beverages were then prepared by a two-step homogenization process at 50/5 MPa using a high-pressure homogenizer NS 1001 L2 PANDA, GEA Niro Soavi (GEA, Parma, Italy). HPH was used as a tool to prevent BBB destabilization according to Bernat et al. [14]. The prepared beverages were sterilized at 121 °C for 15 min.

Inoculums were prepared by dissolving the freeze-dried starter cultures in distilled water. The BBB were inoculated at 1.0% (m/m) and incubated at 45 °C for 6 h. After fermentation, the beverages were refrigerated at 6 °C and stored for 21 days. In the case of unfermented samples, 0.1% sodium azide (Chempur, Piekary Slaskie, Poland) was added to prevent the occurrence of microbiological changes during storage.

Table 2 shows the physicochemical characteristics of the developed BBB, before and after fermentation.

Table 2. Physicochemical characteristics of for B and BG beverages.

Sample Code ¹	pH	Dry Mater Content (g/100 g)	Water Activity (–)
B0	5.86	9.41	0.998
B100	5.86	8.74	0.997
B101	4.46	8.61	0.992
B102	4.14	8.25	0.994
BG0	6.46	7.33	0.996
BG100	4.41	6.66	0.995
BG101	4.27	6.89	0.995
BG102	4.13	7.13	0.996

¹ Description as in Table 1.

2.3. Optical Analysis

2.3.1. Color Analysis

The color of the BBB was assessed using a Minolta CR-400 colorimeter (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan) equipped with a 2° standard observer and illuminant D65, according to the CIELab measuring system (measurement area $\varnothing = 8$ mm). The color parameters determined were as follows: L (the analyzed sample was black when L = 0 or white if L = 100), a* (–a* was considered greenness and +a* redness), b* (–blue and + yellow), C* (indicating the saturation of the color), and h* (indicating the angle of the shade). The measurements were made in triplicate for each sample. The difference in the color of the samples before and after fermentation was denoted by ΔE , which expressed how far apart visually the two samples are in the color “sphere”. The reference samples for this calculation were BBB before fermentation (B0 for nongerminated beverages and BG0 for germinated beverages). The ΔE between BBB before fermentation (having L_1^* , a_1^* , b_1^*) and after fermentation (having L_2^* , a_2^* , b_2^*) was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2}. \quad (1)$$

2.3.2. Stability Analysis

The physical stability of the BBB was determined using a Turbiscan LabExpert light scattering optical analyzer (Formulation, Toulouse, France) based on the Turbiscan Stability Index (TSI) calculated using the TurbiSoftLab 2.3.1.15 program (Formulation, Toulouse, France). Briefly, 20 mL of unfermented BBB was transferred to flat-bottomed borosilicate glass cells (27.5 mm \times 70 mm) and scanned immediately after inoculation. Then, the samples were fermented at 45 °C for 6 h, and kept in a laboratory refrigerator at 6 °C. The fermented BBB were stored at 6 °C and placed in the Turbiscan for scanning at preset intervals within 21 days of sample preparation. Considering backscattering profiles as a function of the height of the sample, the possible instabilities were identified and monitored at regular intervals.

2.3.3. Particle Size Analysis

The particle size distribution (PSD) of the BBB was determined using a CILAS 1190 laser diffraction particle size analyzer (CILAS, Orléans, France). Measurements were performed in a recirculating cell with distilled water as a dispersant using the following operating procedures: dispersion of the sample by drops without ultrasound to achieve 15%

laser obscuration, and the Fraunhofer approximation, which does not require the optical properties of the sample and preferred for opaque particles. The mean particle diameter was recorded as the volume mean diameter $d_{4,3}$. PSD was characterized by $d_{V0.1}$, $d_{V0.5}$, and $d_{V0.9}$ percentiles denoting points on the cumulative granulometric curve representing particle diameters at which 10%, 50%, and 90% of particles are smaller, respectively. The Span of PSD was calculated according to the following equation:

$$\text{Span}_V = \frac{d_{V0.9} - d_{V0.1}}{d_{V0.5}}. \quad (2)$$

2.4. Rheological Analysis

Rheological measurements of the BBB were carried out using a Haake Mars 40 rheometer (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany). To prevent spillage, a plate with serrated platens was used (35 mm diameter, 1 mm gap) which was set at 20 °C. The results were analyzed using the HAAKE RheoWinDataManager V.4.75 software (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany).

Steady shear tests were performed in the controlled-rate mode at a linearly increasing shear rate of 1–100 s⁻¹ for 210 s at 20 °C. Experimental flow curves (shear stress vs. shear rate) were compared using the power law model, which is the typical equation characterizing shear-thinning fluids: $\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n$, where τ is the shear stress (Pa), k is the consistency index (Pa·sⁿ), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s⁻¹), τ_0 is the yield stress (Pa), and n is the flow index; for a shear-thinning fluid, the values of τ_0 and n are ≥ 0 and < 1 , while for a Newtonian fluid the values are 0 and 1, respectively.

Small-amplitude oscillatory shear tests were conducted at 20 °C. Two different dynamic oscillatory rheological tests were performed: strain sweep and frequency sweep. The strain amplitude with diverse strains from 0.1% to 100% was first scanned at 1 Hz in order to identify the linear viscoelastic region (LVR) for each sample. Next, the frequency-sweep test was carried out in a range of 0.1–10 Hz and a constant strain of 1%. The parameters describing the viscoelastic behavior of the samples, namely elastic moduli (G'), viscous moduli (G''), complex viscosity ($|\eta^*|$), and loss angle $\tan(\delta)$, were determined using this test. In addition, parameters “a” and “b” were determined using the power law ($|\eta^*| = a\text{Hz}^b$) equation, where “a” is the consistency coefficient and “b” is the slope of the curve in a log–log plot of (y) against the frequency (x) and is related to the nature and behavior of the dispersion analogous to that observed for the viscous flow. The model was appropriately fit for the experimental data with a correlation coefficient (r^2).

2.5. Statistical Analysis

The program Statistica 13.1 (StatSoft, Krakow, Poland) was used to analyze the data obtained in the experiments. Analysis of variance was used to determine the effect of germination (G), fermentation (C), and storage period (S) on the observed outcomes of the experiments. The significance of the differences was analyzed using Tukey’s test at $\alpha = 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Optical Analysis

Obtaining a high-quality colloidal-suspension product requires understanding the properties of its particles and its stability. It is ensured by the use of various types of optical techniques that analyze the transmissivity, reflectivity, and absorptivity of the food [33]. The optical characteristics of food have a direct impact on its properties and consumer perception [5,34]; therefore, our study used optical techniques (color, PSD, and stability analysis) to analyze the BBB.

3.1.1. Color Analysis

The values of color parameters (L^* , a^* , b^* , C^* , and h^*) of the BBB are shown in Table 3. Significantly ($p < 0.05$) higher L^* and h^* values and lower a^* (i.e., in reddish), b^* (i.e., in yellowness), and C^* values were observed in nonfermented and fermented BG ($L^* \approx 71.70$ – 72.69 , $h^* \approx 81.46$ – 81.50 , $a^* \approx 1.25$ – 1.94 , $b^* \approx 16.78$ – 17.03 , and $C^* \approx 16.88$ – 17.04) compared to B ($L^* \approx 69.81$ – 70.49 , $h^* \approx 81.43$ – 81.44 , $a^* \approx 2.66$ – 2.84 , $b^* \approx 19.97$ – 20.28 , and $C^* \approx 20.16$ – 20.46). Although the results obtained differed significantly, their orders of magnitude remained the same; therefore, the color of both B and BG was identified as light yellow. The differences in the content of bioactive ingredients in the samples might be the reason for the different results observed in B and BG. In general, during germination, ANF levels are reduced and, consequently, the availability of bioactive ingredients is increased. It has been reported that bioactive ingredients such as phenols, carotenoids, chlorophylls, and betalains can change the color parameters of the product [35]. Moreover, BG was characterized by a significantly higher mean diameter of particles (Table 4), which might have led to higher lightness and lower color saturation in these samples. Similar to our results, other researchers have also observed that germination resulted in changes in the color parameters of products [36–38].

Table 3. Variations of color parameters L^* , a^* , b^* , C^* , h^* and color difference (ΔE) between BBB before fermentation and after fermentation, and the results of Turbiscan Stability Index (TSI) after 21 days of storage at 6 °C.

Sample Code ¹	Color Parameters					Turbiscan Stability		
	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*	ΔE	TSI	Category ²
B0	70.49 ± 0.01 ^c	2.66 ± 0.02 ^c	20.28 ± 0.03 ^e	20.46 ± 0.02 ^e	81.44 ± 0.00 ^b	-	0.65 ± 0.10 ^a	A
B100	69.81 ± 0.01 ^a	2.79 ± 0.02 ^{cd}	19.97 ± 0.02 ^c	20.16 ± 0.03 ^c	81.43 ± 0.00 ^{ab}	0.77 ± 0.02 ^b	0.75 ± 0.10 ^a	A
B101	70.18 ± 0.01 ^b	2.84 ± 0.00 ^d	20.11 ± 0.01 ^d	20.31 ± 0.01 ^d	81.43 ± 0.00 ^a	0.41 ± 0.03 ^a	0.85 ± 0.20 ^a	A
B102	70.22 ± 0.01 ^b	2.84 ± 0.02 ^d	20.18 ± 0.01 ^{de}	20.45 ± 0.01 ^e	81.44 ± 0.00 ^b	0.35 ± 0.02 ^a	0.90 ± 0.10 ^a	A
BG0	71.70 ± 0.07 ^d	1.25 ± 0.17 ^a	17.03 ± 0.11 ^b	17.04 ± 0.12 ^b	81.50 ± 0.01 ^d	-	1.40 ± 0.30 ^{ab}	B
BG100	72.50 ± 0.04 ^e	1.93 ± 0.01 ^b	16.89 ± 0.03 ^{ab}	16.99 ± 0.02 ^{ab}	81.46 ± 0.00 ^c	1.07 ± 0.16 ^{bc}	1.45 ± 0.10 ^{ab}	B
BG101	72.69 ± 0.02 ^f	1.91 ± 0.01 ^b	16.78 ± 0.01 ^a	16.88 ± 0.01 ^a	81.46 ± 0.00 ^c	1.22 ± 0.14 ^c	2.00 ± 0.20 ^b	B
BG102	72.65 ± 0.04 ^f	1.94 ± 0.02 ^b	16.89 ± 0.06 ^{ab}	16.97 ± 0.07 ^{ab}	81.46 ± 0.00 ^c	1.18 ± 0.17 ^c	1.30 ± 0.10 ^{ab}	B
Statistics ANOVA, η^2 [-]								
G	0.933	0.945	0.998	0.999	0.777	0.813	0.701	-
C	ns	0.688	0.661	0.568	0.604	ns	ns	-

^{a, b, c, d, e, f}—mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹ Description as in Table 1. ² Category of Turbiscan Stability and TSI limits: A+—excellent stability (TSI < 0.5), A—good stability (TSI 0.5–1.0), B—satisfactory stability (TSI 1.0–3.0), C—poor stability (TSI 3.0–10.0), D—unsatisfactory stability (TSI > 10.0). Explanations: ns—non-significant; G—germination; C—starter culture; S—storage period; η^2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G and C.

Table 4. The results of the volume PSD ($d_{4,3}$, $d_{0,9}$, Span) and summary of parameter values related to flow (the parameters of the Ostwald-de-Waele model k and n , and the viscosity at shear rate of 25, 50 and 75 s^{-1}) obtained for BBB before fermentation, after fermentation, and after 21 days of storage.

Sample Code ¹	$d_{4,3}$ (μm)	$d_{0,9}$ (μm)	Span (-)	k (Pa·s ^{n})	n (-)	at 25 s ⁻¹ (Pa·s)	at 50 s ⁻¹ (Pa·s)	at 75 s ⁻¹ (Pa·s)
B0	43.0 ± 0.1 ^{ab}	84.3 ± 0.5 ^{ab}	2.00 ± 0.04 ^a	36.9 ± 1.4 ^d	0.08 ± 0.01 ^{abc}	1.94 ± 0.01 ^d	1.03 ± 0.02 ^e	0.71 ± 0.01 ^e
B100	38.2 ± 0.2 ^a	74.1 ± 0.5 ^a	1.94 ± 0.01 ^a	33.0 ± 2.1 ^{cd}	0.08 ± 0.01 ^{ab}	1.70 ± 0.06 ^c	0.89 ± 0.03 ^d	0.62 ± 0.02 ^d
B101	44.9 ± 0.3 ^{ab}	87.4 ± 0.5 ^b	1.96 ± 0.01 ^a	50.0 ± 2.8 ^{ef}	0.07 ± 0.01 ^a	2.50 ± 0.09 ^{gh}	1.31 ± 0.04 ^{ghi}	0.90 ± 0.03 ^{gh}
B102	47.0 ± 0.1 ^b	92.0 ± 0.4 ^b	1.98 ± 0.01 ^a	49.6 ± 2.1 ^{ef}	0.08 ± 0.01 ^{ab}	2.56 ± 0.04 ^{gh}	1.35 ± 0.02 ^{hi}	0.93 ± 0.01 ^{hi}
B0s	46.6 ± 0.3 ^b	90.1 ± 0.1 ^b	1.92 ± 0.03 ^a	45.1 ± 1.2 ^e	0.08 ± 0.00 ^{ab}	2.34 ± 0.05 ^f	1.24 ± 0.03 ^g	0.85 ± 0.02 ^g
B100s	41.6 ± 0.1 ^{ab}	81.2 ± 0.1 ^{ab}	1.97 ± 0.01 ^a	36.9 ± 0.9 ^d	0.07 ± 0.00 ^a	1.86 ± 0.03 ^d	0.98 ± 0.01 ^e	0.67 ± 0.01 ^{de}
B101s	45.0 ± 0.1 ^{ab}	86.4 ± 0.1 ^{ab}	1.90 ± 0.02 ^a	47.1 ± 1.0 ^{ef}	0.08 ± 0.01 ^{ab}	2.43 ± 0.04 ^{fg}	1.28 ± 0.02 ^{gh}	0.88 ± 0.02 ^{gh}
B102s	46.2 ± 0.2 ^b	89.2 ± 0.4 ^b	1.91 ± 0.01 ^a	51.9 ± 0.3 ^{ef}	0.07 ± 0.00 ^{ab}	2.63 ± 0.02 ^h	1.38 ± 0.01 ⁱ	0.95 ± 0.01 ⁱ

Table 4. Cont.

Sample Code ¹	$d_{4,3}$ (μm)	$d_{0,9}$ (μm)	Span (-)	k ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)	n (-)	at 25 s^{-1} ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)	at 50 s^{-1} ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)	at 75 s^{-1} ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
BG0	81.5 ± 1.6^c	169.8 ± 5.5^d	2.35 ± 0.06^b	25.7 ± 2.3^{ab}	0.12 ± 0.01^c	1.48 ± 0.10^e	1.12 ± 0.05^f	0.56 ± 0.04^f
BG100	76.8 ± 0.2^c	156.8 ± 0.6^c	2.25 ± 0.01^b	22.4 ± 0.8^a	0.10 ± 0.00^{bc}	1.25 ± 0.05^a	0.67 ± 0.02^{abc}	0.53 ± 0.02^{abc}
BG101	78.3 ± 1.2^c	160.8 ± 3.1^{cd}	2.27 ± 0.01^b	25.9 ± 1.0^{ab}	0.08 ± 0.01^{ab}	1.33 ± 0.05^{ab}	0.70 ± 0.03^{bc}	0.48 ± 0.02^{bc}
BG102	82.9 ± 0.1^{cd}	171.3 ± 1.7^d	2.29 ± 0.04^b	28.2 ± 1.9^{bc}	0.07 ± 0.01^a	1.42 ± 0.06^b	0.75 ± 0.03^c	0.51 ± 0.02^c
BG0s	79.3 ± 0.2^c	161.9 ± 0.1^{cd}	2.25 ± 0.01^b	21.9 ± 0.3^a	0.10 ± 0.00^{bc}	1.23 ± 0.01^a	0.66 ± 0.01^{ab}	0.46 ± 0.00^{ab}
BG100s	80.1 ± 0.1^c	163.5 ± 0.4^{cd}	2.24 ± 0.01^b	24.3 ± 0.6^{ab}	0.08 ± 0.00^{ab}	1.27 ± 0.02^{ab}	0.67 ± 0.01^{abc}	0.46 ± 0.00^{abc}
BG101s	84.2 ± 0.1^d	173.9 ± 0.1^{cd}	2.28 ± 0.01^b	23.2 ± 0.8^a	0.09 ± 0.01^{abc}	1.25 ± 0.02^a	0.66 ± 0.01^{ab}	0.46 ± 0.01^{ab}
BG102s	82.9 ± 0.6^{cd}	169.1 ± 1.4^d	2.23 ± 0.01^b	24.2 ± 0.5^{ab}	0.07 ± 0.00^a	1.20 ± 0.05^a	0.63 ± 0.00^a	0.43 ± 0.00^a
Statistics ANOVA, η^2 (-)								
G	0.983	0.989	0.960	0.876	0.217	0.739	0.733	0.729
C	0.446	0.469	ns	0.500	0.347	0.307	0.302	0.299
416 S	0.177	ns	0.279	ns	ns	ns	ns	ns

a, b, c, d, e, f, g, h, i—mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹ Description as in Table 1. Explanations: ns—non-significant; G—germination; C—starter culture; S—storage period; η^2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C, and S.

In both B and BG, color differences (ΔE) between fermented and unfermented samples were not higher than 1.22 (Table 3). This means that color differences cannot be easily detected by the naked human eye, and only ΔE values greater than 3.0 can be noticed [39].

3.1.2. Stability and PSD Analysis

Plant-based beverages contain particulate matter that has a different density than the watery fluids they are dispersed in. This difference in density results in a gravitational pull on particulate matter. Particulate matter that is less dense than water, such as oil bodies and fat droplets, tends to reach the top surface of the beverages, whereas particulate matter with a higher density, such as plant cell fragments, starch granules, and protein aggregates, tends to sediment at the bottom [16]. The stability of plant-based beverages can be improved by reducing particle size, increasing the aqueous phase viscosity, and reducing the density contrast [16,17]. HPH has been shown to reduce the size of the particular matter [40].

The stability of Y-T BBB was assessed using the Turbiscan tool, which allows identifying the instability of the system in concentrated liquid dispersions and does not damage the test material [41]. The values of TSI determined after 21 days of storage at 6°C , which stimulates the real-life conditions for Y-T BBB, are shown in Table 3. Our study showed that nonfermented and fermented B and BG, regardless of the type of the starter culture used, displayed good (category A) and satisfactory (category B) stability, respectively, in accordance with the Formulation Application Note (2013) (Table 3) [42].

The backscatter (BS) profiles of the BBB obtained within 21 days of storage at 6°C are shown in Figure 1, in which the stability of the nonfermented and fermented B and BG is denoted by overlapping lines. A similar intensity in BS over the entire height of the sample was observed for all BBB. On the surface part of the sample, a decrease in BS was noticed, which may indicate the syneresis phenomenon of the sample during storage. As the temperature of the BBB decreased after fermentation, syneresis occurred due to the closer packing of starch granules [43]. An increase in BS was observed for fermented BG after 7 days of storage. During the further storage period, no changes in BS were observed, which indicates that the sample was stabilized. During the first week of storage, the pH of fermented samples could have stabilized, which resulted in changes in their BS profile. The higher availability of simple sugars due to the germination process used for BG could have increased the stabilization time of bacterial cells involved in fermentation. The lower particle size and higher viscosity of B in our study (Table 4) resulted in slightly higher stability, which is consistent with the findings of studies conducted on other systems [40,44–46].

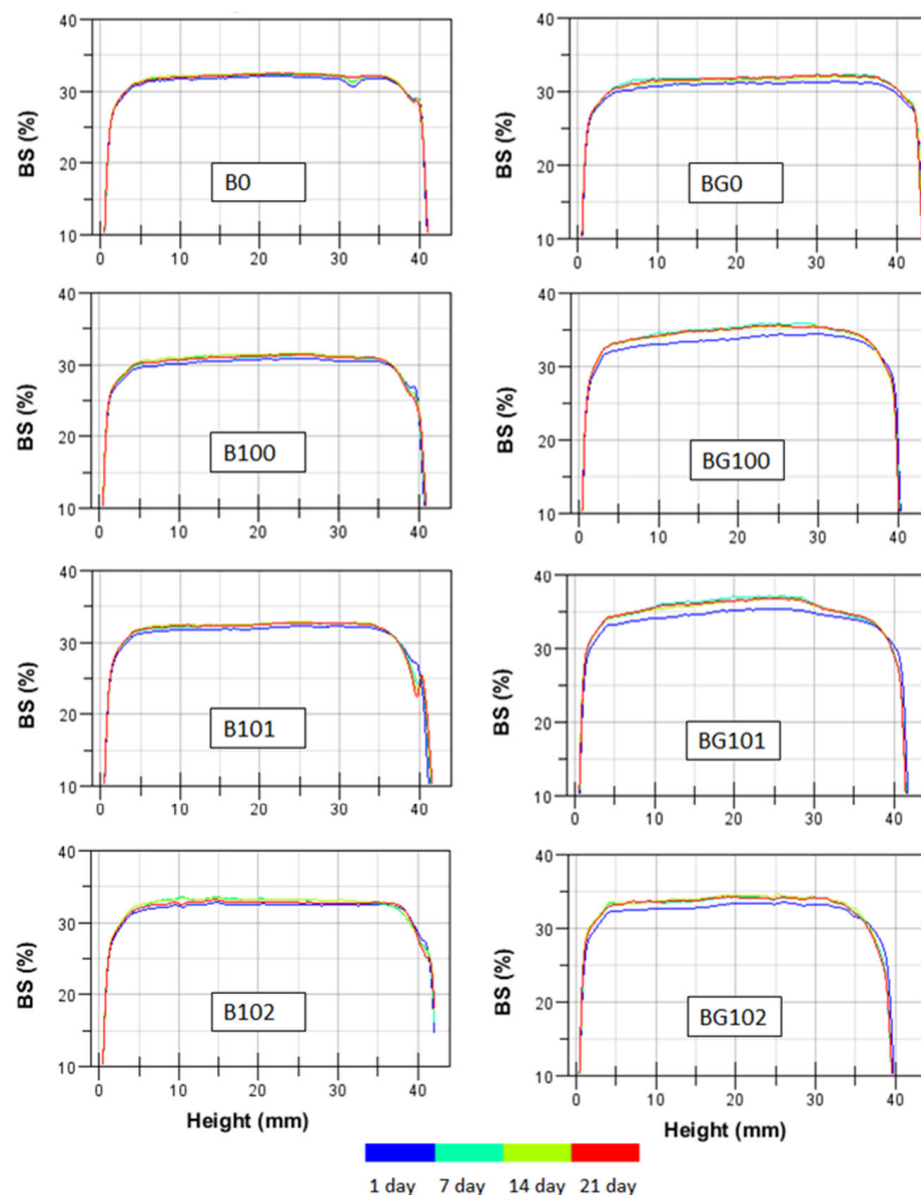


Figure 1. The backscatter (BS) profiles as a function of sample height within 21 days at 6 °C for BBB. Explanations: B/BG0, B/BG100, B/BG101, B/BG102—description as in Table 1.

The images of the studied nonfermented and fermented BBB stored for 21 days at 6 °C are presented in Figure S1 in the Supplementary Material. During storage, delamination of the samples was not observed and both tested types of beverages showed high storage stability.

The PSD values of B and BG before and after fermentation and after 21 days of storage are given in Table 4. HPH used in the BBB production resulted in dispersions with monomodal PSD (Figures S2 and S3 in the Supplementary Material) and with particles smaller than $d_{0,9} \sim 84 \mu\text{m}$ for B and $d_{0,9} \sim 170 \mu\text{m}$ for BG. Germination was the primary factor affecting the PSD of the beverages ($\eta^2 = 0.983$). A higher Span and mean diameter were observed in the nonfermented and fermented BG (Span ≈ 2.24 – 2.35 , $d_{4,3} \approx 76.8$ – 84.2) compared to B (Span ≈ 1.90 – 2.00 , $d_{4,3} \approx 38.2$ – 47.0). Span values were used to indicate the width of the distributions and $d_{4,3}$ as an indicator of the presence of larger particles or aggregates. The fermentation had a lesser effect ($\eta^2 = 0.446$) on the PSD of the BBB than the germination. In BBB fermented with the ABY-3 (B/BG102) starter culture, a slight increase in $d_{4,3}$ from 43.0 to 47.0 μm for B and from 81.5 to 82.9 μm for BG was observed.

The finest particle fraction of the BBB was probably composed mainly of proteins and oil bodies, whereas the largest particles were composed of the remains of cellular tissue and particle aggregates [14]. Nongerminated beans have a hard and dry structure, which allows more effective grinding during the processing and HPH. This results in a product with a small particle size and low particle diversity. During germination, the structure of the cell wall polysaccharides in legumes is modified, probably due to the intactness of tissue histology and disruption in the protein–carbohydrate integration. This intensifies cell wall biosynthesis and as a result, new dietary fiber is produced. As reported in a previous study, the modifications in the cell walls of the germinated seeds include changes in their physicochemical properties [47]. After germination, the beans have a more fibrous structure, which reduces the grinding efficiency and results in a product with significantly higher particle size.

Fermentation can affect the PSD of the products as the acidity of the products changes during fermentation. The decrease in pH could lead to the rearrangement of particles such as proteins and clusters on all length scales, causing particle fusion and an increase in the size of the building blocks. Formation of large protein aggregates may occur during fermentation, and this process may intensify during storage, resulting in the formation of larger particle clusters and a decrease in the number of smaller particles [48,49].

The values of Span differed significantly between B and BG, but those for both types of beverages showed a similar order of magnitude (~2). This indicates that the PSD of the BBB was shaped primarily during the preparation process, especially due to HPH. Other researchers have also reported that HPH increases the stability of plant-based beverages by disrupting aggregates and lipid droplets and thus decreasing their PSD. Such an effect has previously been observed for soy [50,51], hemp [40], almond, and hazelnut beverages [14] as well.

3.2. Rheological Analysis

Primary structure, external factors, and the time of observation are the parameters determining the rheological character of a system [52]. The BBB showed a suspension structure, which is attributable to solid particles of plant tissue of various sizes and bacterial cells present in the starter cultures. Stability studies using Turbiscan showed that the forces of interaction between the components of the colloidal suspension system of B and BG stabilized the structure of the BBB and kept them intact against weak external forces, such as the force of gravity. As deformation increases (e.g., during mixing or pumping through the conduits), the shear forces may exceed the forces of the structure-forming interaction, which leads to the reorganization of the original structure of the BBB.

In our evaluation of steady-state shear flow curves, it was assumed that each shear rate corresponds to a certain equilibrium structure and equilibrium viscosity, which allowed us to determine the relationship between the internal structure of multiphase liquid systems of the BBB and their flow properties. The viscous flow (in the range of shear rate from 1 to 100 s⁻¹) of the liquid dispersions of B and BG was well described by the Ostwald–de Waele equation, which showed that all the BBB were shear-thinned fluids ($n < 1.0$) with no yield stress. The Ostwald–de Waele model parameters determined by fitting the experimental flow curves (r^2 ranging from 0.994 to 0.999) are shown in Table 4. The values of n and k were significantly affected by germination and fermentation. The nonfermented and fermented BG showed a significantly lower consistency index k , ranging from 21.9 to 28.2 Pa·s ^{n} , compared to B (33.0–51.9 Pa·s ^{n}). After fermentation, a significant increase in k was observed for BBB fermented with ABY-3 (B/BG102) starter culture (B—from 36.9 to 49.6 Pa·s ^{n} , BG—from 25.7 to 28.2 Pa·s ^{n}). Fermentation with ABY-3 also influenced the flow index n in BG as a significant reduction in n was noticed (from 0.12 to 0.07), whereas no significant change in n was observed for B.

Based on the shear-thinning property of the BBB, it can be concluded that their structures were characterized by relatively low resistance to deformation and flow. Changes in the shear rate made B and BG adopt new equilibrium structures in accordance with the direction and duration of the action of shear forces. Hence, with the increase in the

shear rate from 25 to 50 and 75 s⁻¹, the viscosity of the nonfermented and fermented BBB systems decreased on average from 2.24 to 1.18 and 0.81 Pa·s for B and from 1.30 to 0.69 and 0.47 Pa·s for BG, respectively (Table 4). The lower viscosity and shear-thinning values of BG can be determined by PSD, which were significantly larger and had higher Span values (Table 4). In addition, studies on food suspension systems indicate that coarse particles have a flow-directional orientation [53].

The dispersed systems, in which a three-dimensional network of phases is observed, exhibit viscoelastic properties as a function of particle sizes [54]. Analysis of the rheological character of the BBB under dynamic shear conditions allowed us to obtain information on their nature and behavior under the influence of slight deformations.

The length of the LVR of the elastic modulus (G') can be used as a measure of sample structure stability, since structural properties are in good correlation with elasticity. As reported in a previous study, weakly flocculated and stable dispersions have longer linear regions, whereas coagulated and strongly flocculated dispersions have relatively short linear regions [1]. The values of LVR determined in our study are presented in Table 5. The structure of the BBB was stable under low strains. The nonfermented and fermented B had a higher G' plateau than BG, which was 191–250 Pa for B and 86–163 Pa for BG. After fermentation with starter cultures YO-MIX 207 (B101) and ABY-3 (B102), the G' plateau was significantly increased in nonstored B (from 193 to 205–261 Pa) and significantly decreased in all fermented (BG100, BG101, and BG102) and nonstored BG (from 163 to 98–138 Pa).

Table 5. Rheological parameters under oscillatory testing at 20 °C (including: LVR values obtained in the amplitude sweep test at 1 Hz; elastic (G') and viscous (G'') moduli, complex viscosity * , and $\tan(\delta)$ values at 1 Hz obtained at the frequency sweep test at strain 1%; and parameters obtained by a power law ($|^*| = a\omega^b$) equation of the curve in a log–log plot) for the BBB before and after 21 days of storage.

Sample Code ¹	LVR		Frequency Sweep. Values at 1 Hz				$\log(^*) = a + b\log(\text{Hz})$ at $f < 10$ Hz		
	G' Plateau (Pa)	γ (%)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ ^* $ (Pa·s)	$\tan(\delta)$ [-]	a	b	r^2
B0	193 ± 25 ^{cde}	2.3 ± 0.4 ^{ab}	203 ± 15 ^{abcd}	24 ± 1 ^{ab}	33 ± 2 ^{abcd}	0.120 ± 0.004 ^a	1.52 ± 0.03 ^{bc}	−0.888 ± 0.004 ^{abc}	1.000 ± 0.000 ^a
B100	183 ± 11 ^{cde}	2.1 ± 0.2 ^{ab}	159 ± 43 ^{abcd}	20 ± 4 ^{ab}	26 ± 6 ^{abcd}	0.126 ± 0.007 ^{abc}	1.42 ± 0.11 ^{abc}	−0.889 ± 0.009 ^{abc}	0.998 ± 0.003 ^a
B101	205 ± 10 ^{def}	2.8 ± 0.3 ^{ab}	198 ± 16 ^{abcd}	24 ± 2 ^{ab}	32 ± 3 ^{abcd}	0.120 ± 0.001 ^a	1.52 ± 0.03 ^{bc}	−0.897 ± 0.006 ^{bc}	0.998 ± 0.002 ^a
B102	261 ± 20 ^g	2.5 ± 0.3 ^{ab}	229 ± 37 ^{abcd}	26 ± 3 ^{ab}	37 ± 6 ^{abcd}	0.113 ± 0.004 ^a	1.58 ± 0.07 ^d	−0.898 ± 0.005 ^{bc}	0.999 ± 0.002 ^a
B0s	191 ± 16 ^{cde}	2.0 ± 0.1 ^a	193 ± 45 ^{abcd}	24 ± 4 ^{ab}	31 ± 6 ^{abcd}	0.124 ± 0.006 ^{ab}	1.50 ± 0.09 ^{bc}	−0.902 ± 0.009 ^c	0.996 ± 0.004 ^a
B100s	176 ± 5 ^{cd}	2.0 ± 0.1 ^a	159 ± 7 ^{abcd}	20 ± 1 ^{ab}	25 ± 1 ^{abcd}	0.125 ± 0.001 ^{ab}	1.42 ± 0.02 ^{abc}	−0.873 ± 0.004 ^{abc}	0.999 ± 0.000 ^a
B101s	231 ± 14 ^{efg}	2.3 ± 0.1 ^{ab}	260 ± 32 ^d	29 ± 3 ^b	42 ± 6 ^d	0.112 ± 0.002 ^a	1.63 ± 0.05 ^d	−0.895 ± 0.007 ^{bc}	1.000 ± 0.000 ^a
B102s	250 ± 27 ^{fg}	2.3 ± 0.2 ^{ab}	246 ± 51 ^{cd}	28 ± 5 ^b	39 ± 7 ^{cd}	0.116 ± 0.003 ^a	1.60 ± 0.08 ^d	−0.889 ± 0.001 ^{abc}	1.000 ± 0.000 ^a
BG0	163 ± 17 ^{abcd}	2.9 ± 0.2 ^{ab}	178 ± 25 ^{abcd}	22 ± 5 ^{ab}	29 ± 7 ^{abcd}	0.126 ± 0.005 ^{abc}	1.56 ± 0.09 ^{bc}	−0.889 ± 0.001 ^{bc}	1.000 ± 0.000 ^a
BG100	98 ± 22 ^a	3.0 ± 0.1 ^b	147 ± 37 ^{abc}	19 ± 4 ^{ab}	24 ± 8 ^{abc}	0.137 ± 0.013 ^{abcd}	1.24 ± 0.06 ^a	−0.850 ± 0.005 ^a	0.998 ± 0.001 ^a
BG101	112 ± 18 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^{ab}	113 ± 23 ^a	16 ± 3 ^{ab}	18 ± 4 ^a	0.144 ± 0.004 ^d	1.27 ± 0.09 ^a	−0.875 ± 0.005 ^{abc}	0.997 ± 0.002 ^a
BG102	138 ± 10 ^{abc}	2.7 ± 0.5 ^{ab}	135 ± 27 ^{ab}	19 ± 3 ^{ab}	22 ± 4 ^{ab}	0.143 ± 0.003 ^{cd}	1.34 ± 0.09 ^{ab}	−0.876 ± 0.009 ^{abc}	0.999 ± 0.000 ^a
BG0s	86 ± 3 ^a	2.8 ± 0.5 ^{ab}	108 ± 20 ^a	16 ± 3 ^a	17 ± 3 ^a	0.145 ± 0.005 ^d	1.26 ± 0.07 ^a	−0.851 ± 0.008 ^{ab}	0.998 ± 0.001 ^a
BG100s	109 ± 7 ^{ab}	2.7 ± 0.1 ^{ab}	111 ± 7 ^a	16 ± 1 ^a	18 ± 1 ^a	0.142 ± 0.002 ^{cd}	1.28 ± 0.03 ^a	−0.853 ± 0.004 ^{abc}	0.998 ± 0.000 ^a
BG101s	110 ± 10 ^{ab}	2.5 ± 0.5 ^{ab}	105 ± 24 ^a	15 ± 4 ^a	17 ± 5 ^a	0.149 ± 0.011 ^d	1.25 ± 0.09 ^a	−0.857 ± 0.008 ^{abc}	0.996 ± 0.003 ^a
BG102s	108 ± 10 ^a	2.8 ± 0.2 ^{ab}	108 ± 8 ^a	16 ± 1 ^a	17 ± 1 ^a	0.145 ± 0.005 ^d	1.27 ± 0.01 ^a	−0.847 ± 0.003 ^a	0.998 ± 0.000 ^a
Statistics ANOVA, η_2 [-]									
G	0.792	0.350	0.509	0.425	0.508	0.715	0.714	0.456	ns
C	0.328	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

a, b, c, d, e, f, g—mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹ Description as in Table 1. Explanations: ns—non-significant; G—germination; C—starter culture; S—storage period; η_2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C, and S.

Frequency sweep is a useful parameter to determine the viscoelastic properties of a sample as a function of timescale. It is also used to estimate several parameters, such as storage (elastic) modulus (G') and viscous (loss) modulus (G''). G' reflects the elastic response of a material by measuring the energy stored in the sample during the shear process, and G'' reflects the viscous response of the material by measuring the energy dissipated as heat [1]. To summarize, the frequency sweep curve gives a good rheological description of how the product will behave during storage and application. Figure 2 shows

the courses of mechanical spectra G' , G'' , $|\eta^*|$, and $\tan\delta$ for nonfermented B and BG before (Figure 2a,b,e,f) and after storage (Figure 2c,d,g,h). These figures are presented in a double logarithmic coordinate system and cover a range of three decades of oscillation frequency from $f = 0.1$ to 100 Hz (corresponding to $\omega \approx 0.63$ –628 rad/s). The mechanical spectra were obtained in the range of linear viscoelasticity (1% deformation), in which the original structure of the beverages was intact.

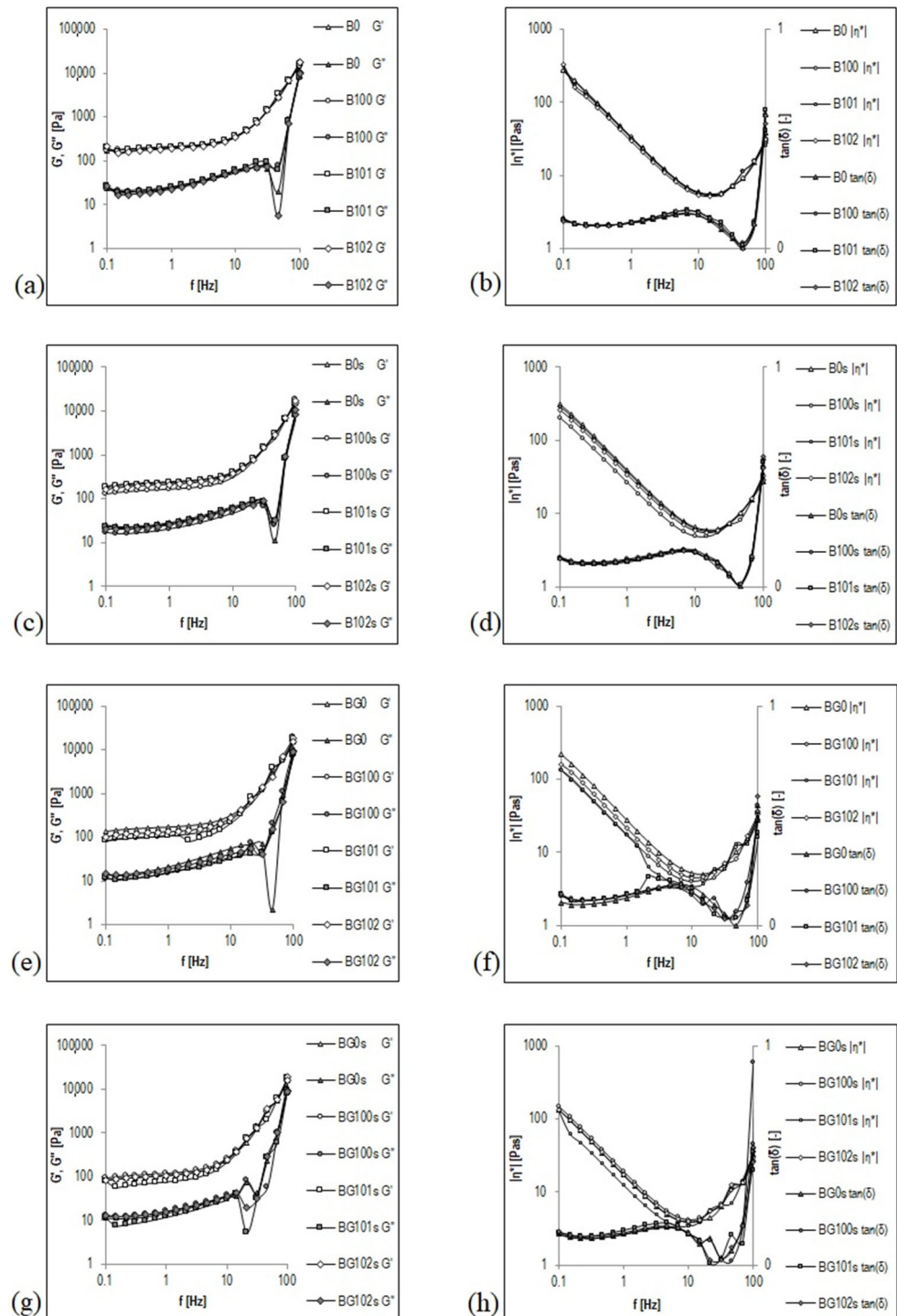


Figure 2. Mechanical spectra of germinated and non-germinated BBB presented graphically as functional relationships G' , G'' , $|\eta^*|$, and $\tan\delta = f(\text{Hz})$. Explanations: B/BG0, B/BG100, B/BG101, B/BG102—description as in Table 1.

The type of structure of the BBB was precisely and unambiguously characterized by the mechanical spectrum presented as a graph $G', G'' = f$ (Hz). Both nonfermented and fermented B and BG showed the character of a viscoelastic fluid with a colloidal suspension structure before and after storage. As dispersions with the structure of an entanglement network, a special feature of these viscoelastic liquids is the occurrence of a plateau in the intermediate frequency range (up to $f \approx 10$ Hz), in which G' assumes a transiently constant value, characteristic of an elastic crosslinked state (Figure 2). In the literature on rheology, this plateau is called the elastic plateau [55]. In the frequency range that involves elastic plateaus, the G'' curve appears below the G' curve. In contrast, in relatively higher oscillation frequency ranges (third decade of the frequency from $f > 10$ Hz), to the right of the elastic plateau, the values of G' and G'' modules become more dependent on the oscillation frequency, and the G' and G'' curves follow the intersection at an oscillation frequency of ≥ 100 Hz. This intersection point is considered the limit of the elastic plateau, beyond which—i.e., when the curve exceeded in the range of even higher oscillation frequencies—the G'' curve will most likely run above the G' curve [56]. This state of the multiphase system of the BBB may reflect the interactions between coarse particles present in the dispersed phase or additional energy dissipation processes resulting from the local movements of elements or fragments of the structure.

In the frequency range in which elastic plateaus appear, small values of the tangent of the loss angle $\tan(\delta)$ from 0.112 to 0.149 (Figure 2b,d,f,h) express a relatively low contribution of viscous properties in the viscoelastic properties of nonfermented and fermented B and BG. The viscous features begin to appear in areas of higher oscillation frequencies, which leads to a rapid increase in the $\tan\delta$ –frequency relationship. The dominant role of viscous properties in forming the viscoelastic properties of the BBB will most likely be observed at $f > 10$ Hz (frequency range not covered by these tests) when the values of $\tan\delta$ are > 1 .

The complex viscosity $|\eta^*|$ decreases with increasing frequency in the frequency range of the elastic plateau (Figure 2b,d,f,h), which means that the BBB exhibit the properties of shear-thinning fluids. This behavior is like the one observed for these BBB in a viscous flow. The values of the coefficients a and b of the line $|\eta^*| = f(\text{Hz})$ in a log–log plot in the frequency range of the elastic plateau (Table 5) correlate with the values of k (consistency coefficients) and n (flow index)—parameters of the Ostwald–de Waele equation describing the flow curve (Table 4). The values of both k and a are significantly higher for B ($k \approx 33$ –52, $a \approx 1.42$ –1.63) than that for BG ($k \approx 22$ –28, $a \approx 1.24$ –1.56). However, both n and b are significantly lower for B ($n \approx 0.07$ –0.08, $b \approx -0.087$ –0.090) than for BG ($n \approx 0.07$ –0.10; $b \approx -0.085$ –0.089).

A significant influence of the germination on the mechanical spectra $G', G'', |\eta^*|$, and $\tan\delta$ for 1 Hz was noticed in the elastic plateau (Table 5). The values of G', G'' , and $|\eta^*|$ were significantly higher for the nonfermented and fermented B ($G' \approx 159$ –246 Pa, $G'' \approx 20$ –29 Pa, $|\eta^*| \approx 25$ –39 Pa·s) compared to the BG ($G' \approx 105$ –178 Pa, $G'' \approx 15$ –22 Pa, $|\eta^*| \approx 17$ –29 Pa·s). This finding may be impacted by the PSD of the tested samples. The B that had a lower mean diameter $d_{4,3}$ of the particles (Table 4) showed significantly higher G' and G'' modules, and more complex viscosity $|\eta^*|$ than BG.

With respect to the rheological properties, nonfermented and fermented B and BG can be characterized as colloidal suspensions with the character of a viscoelastic fluid with the elastic plateau and also with the shear-thinning behavior in the viscous flow. Previous studies have reported similar rheological character for other liquid plant products [57,58] and dispersions such as vegetable carbon and calcium carbonate suspended in water–glycerol mixtures [59], glutenin suspensions [60], and cellulose suspensions [61].

4. Conclusions

The use of optical and rheological methods revealed that regardless of the starter cultures used in the fermentation, the BBB were characterized by a light-yellow color, high stability against dephasing during refrigerated storage, and the same rheological character. As discussed earlier, being viscoelastic fluids with a colloidal suspension structure, a

special feature of both nonfermented and fermented B and BG is the occurrence of the elastic plateau in the intermediate frequency range (up to $f \approx 10$ Hz), in which the BBB had a relatively low contribution of viscous properties. The viscous flow of both B and BG liquid dispersions was well described by the Ostwald–de Waele equation, which indicates that all the BBB are shear-thinned fluids with no yield stress; thus, the viscosity of the beverages decreased with an increase in shear forces.

The findings of our study demonstrate that germination is the crucial process that determines the values of selected rheological parameters (such as the parameters of the Ostwald–de-Waele model k and n , the viscosity at shear rate of 25, 50, and 75 s^{-1} , LVR, elastic (G'), and viscous (G'') moduli, complex viscosity * and $\tan(\delta)$ values at 1 Hz), and the TSI of the obtained beverages. This is directly related to the differences in the particle size of the particulate matter obtained by HPH of nongerminated and germinated BBB. Hence, the higher values of brightness and TSI as well as the lower values of viscosity and elastic and viscous moduli observed for BG can be explained by the PSD of the tested samples, i.e., significantly larger particles and higher Span than for B.

The applied optical and rheological methods allowed to conclude that HPH and germination mainly affected the properties of the tested plant tissue, which has a direct impact on the properties of the final products. Further research on the properties of plant-based beverages made from other plant materials is needed.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/s22218348/s1>, Figure S1: The tested bean-based beverages before and after 21 days of storage period at 6°C ; Figure S2: The particle size distribution of the nongerminated bean-based beverages; Figure S3: The particle size distribution of the germinated bean-based beverages.

Author Contributions: Conceptualization, P.C.; methodology, E.D., P.C. and M.Z.; formal analysis, P.C.; investigation, P.C.; data curation, P.C.; writing—original draft preparation, P.C.; writing—review and editing, E.D. and M.Z.; visualization, P.C.; supervision, E.D. and M.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tabilo-Munizaga, G.; Barbosa-Canovas, G.V. Rheology for the food industry. *J. Food Eng.* **2004**, *67*, 147–156. [[CrossRef](#)]
2. Kotsanopoulos, K.V.; Arvanitoyannis, I.S. The Role of Auditing, Food Safety, and Food Quality Standards in the Food Industry: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 760–775. [[CrossRef](#)]
3. Lu, R.; Beers, R.V.; Saeys, W.; Li, C.; Cen, H. Measurement of optical properties of fruits and vegetables: A review. *Postharvest Biol. Technol.* **2020**, *159*, 111003. [[CrossRef](#)]
4. Liu, J.; Huang, X.; Lu, L.; Li, M.; Xu, J.; Deng, H. Turbiscan Lab[®] Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *190*, 214–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chung, C.; McClements, D.J. Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. *Food Struct.* **2014**, *1*, 106–126. [[CrossRef](#)]
6. Zhong, Q.; Daubert, C.R. Food Rheology. In *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering*, 2nd ed.; Kutz, M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; pp. 403–426. [[CrossRef](#)]
7. Marcotte, M.; Hoshahili, A.R.; Ramaswamy, H.S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 695–703. [[CrossRef](#)]
8. Aydar, E.F.; Tutuncu, S.; Ozcelik, B. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *J. Funct. Foods* **2020**, *70*, 103975. [[CrossRef](#)]
9. Craig, W.J.; Fresán, U. International Analysis of the Nutritional Content and a Review of Health Benefits of Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Nutrients* **2021**, *13*, 842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Fructuoso, I.; Romão, B.; Han, H.; Raposo, A.; Ariza-Montes, A.; Araya-Castillo, L.; Zandonadi, R.P. An Overview on Nutritional Aspects of Plant-Based Beverages Used as Substitutes for Cow's Milk. *Nutrients* **2021**, *13*, 2650. [[CrossRef](#)]

11. Craig, W.J.; Brothers, C.J.; Mangels, R. Nutritional Content and Health Profile of Single-Serve Non-Dairy Plant-Based Beverages. *Nutrients* **2021**, *14*, 162. [[CrossRef](#)]
12. Sethi, S.; Tyagi, S.K.; Anurag, R.K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3408–3423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Patrignani, F.; Lanciotti, R. Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bernat, N.; Chafer, M.; Rodríguez-García, J.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT* **2015**, *62*, 488–496. [[CrossRef](#)]
15. Paul, A.A.; Kumar, S.; Kumar, V.; Sharma, R. Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3005–3023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. McClements, D.J. Development of Next-Generation Nutritionally Fortified Plant-Based Milk Substitutes: Structural Design Principles. *Foods* **2020**, *9*, 421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mäkinen, O.; Wanhalinna, V.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Foods for Special Dietary Needs: Non-Dairy Plant Based Milk Substitutes and Fermented Dairy Type Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 339–349. [[CrossRef](#)]
18. Silva, A.; Silva, M.; Ribeiro, B. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Res. Int.* **2020**, *131*, 108972. [[CrossRef](#)]
19. Bernat, N.; Chafer, M.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. Vegetable milks and their fermented derivative products. *Int. J. Food Stud.* **2014**, *3*, 93–124. [[CrossRef](#)]
20. Haas, R.; Schnepps, A.; Pichler, A.; Meixner, O. Cow Milk versus Plant-Based Milk Substitutes: A Comparison of Product Image and Motivational Structure of Consumption. *Sustainability* **2019**, *11*, 5046. [[CrossRef](#)]
21. Lopes, M.; Pierrepont, C.; Duarte, C.M.; Filipe, A.; Medronho, B.; Sousa, I. Legume Beverages from Chickpea and Lupin, as New Milk Alternatives. *Foods* **2020**, *9*, 1458. [[CrossRef](#)]
22. Nawaz, M.A.; Tan, M.; Øiseth, S.; Buckow, R. An Emerging Segment of Functional Legume-Based Beverages: A Review. *Food Rev. Int.* **2020**, *36*, 1–39. [[CrossRef](#)]
23. Hayat, I.; Ahmad, A.; Masud, T.; Ahmed, A.; Bashir, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 580–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ganesan, K.; Xu, B. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Roland, W.S.; Pouvreau, L.; Curran, J.; Velde, D.; Kok, P.M. Flavor Aspects of Pulse Ingredients. *Cereal Chem.* **2016**, *94*, 58–65. [[CrossRef](#)]
26. Cichońska, P.; Ziarno, M. Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms* **2022**, *10*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Singh, B.; Singh, J.P.; Shevkani, K.; Singh, N.; Kaur, A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 858–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Agrahar-Murugka, D.; Bajpai-Dixit, P.; Kotwaliwale, N. Rheological, nutritional, functional and sensory properties of millets and sprouted legume based beverages. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 1671–1679. [[CrossRef](#)]
29. Fisher, E.; Cayot, N.; Cachon, R. Potential of Microorganisms to Decrease the “Beany” Off-Flavor: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 4493–4508. [[CrossRef](#)]
30. Chaturvedi, S.; Chakraborty, S. Review on potential non-dairy synbiotic beverages: A preliminary approach using legumes. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *56*, 2068–2077. [[CrossRef](#)]
31. Valero-Cases, E.; Cerdá-Bernad, D.; Pastor, J.; Frutos, M. Non-Dairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. *Nutrients* **2020**, *12*, 1666. [[CrossRef](#)]
32. Ziarno, M.; Bryś, J.; Parzyszek, M.; Veber, A. Effect of Lactic Acid Bacteria on the Lipid Profile of Bean-Based Plant Substitute of Fermented Milk. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1348. [[CrossRef](#)]
33. Lee, C.C.; Tomas, M.; Jafari, S.M. Optical analysis of nanoencapsulated food ingredients by color measurement. In *Nanoencapsulation in the Food Industry*, 1st ed.; Jafari, S.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; Volume 4, pp. 505–528. [[CrossRef](#)]
34. Sliburyte, L.; Skeryte, I. What We Know about Consumers’ Color Perception. *Procedia Soc. Behav. Sci.* **2014**, *156*, 468–472. [[CrossRef](#)]
35. Sant’Anna, V.; Gurak, P.D.; Marczak, L.D.; Tessaro, I. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods—A review. *Dyes Pigments* **2013**, *98*, 601–608. [[CrossRef](#)]
36. Patil, S.B.; Khan, K. Some cooking properties of germinated brown rice of Indian varieties. *Agric. Eng. Int. CIGR J.* **2012**, *14*, 156–162.
37. Beaulieu, J.C.; Reed, S.S.; Obando-Ulloa, J.M.; McClung, A.M. Green processing protocol for germinating and wet milling brown rice for beverage formulations: Sprouting, milling and gelatinization effects. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 2445–2457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sofi, S.A.; Singh, J.; Muzaffar, K.; Mir, S.A.; Dar, B.N. Effect of germination time on physico-chemical, functional, pasting, rheology and electrophoretic characteristics of chickpea flour. *J. Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 2380–2392. [[CrossRef](#)]

39. Aliakbarian, B.; Bagnasco, L.; Perego, P.; Leardi, R.; Casale, M. UV-VIS spectroscopy for monitoring yogurt stability during storage time. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 5962. [[CrossRef](#)]
40. Wang, Q.; Jiang, J.; Xiong, L. High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 487–494. [[CrossRef](#)]
41. Liu, Z.Q.; Yang, X.; Zhang, Q. TURBISCAN: History, development, application to colloids and dispersions. *Adv. Mater. Res.* **2014**, *936*, 1592–1596. [[CrossRef](#)]
42. Formulation Application Note, Using the Turbiscan Stability Index to Determine the Stability Diagram of a Liquid Dispersion. Available online: <http://www.formulation.com> (accessed on 28 September 2022).
43. Onyango, C.; Luvitaa, S.K.; Unbehend, G.; Haase, N. Nutrient composition, sensory attributes and starch digestibility of cassava porridge modified with hydrothermally-treated finger millet. *J. Agric. Food Res.* **2020**, *2*, 100021. [[CrossRef](#)]
44. Fernández-Ávila, C.; Escriu, R.; Trujillo, A.J. Ultra-High Pressure Homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Res. Int.* **2015**, *75*, 357–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hebshy, E.; Buffa, M.; Guamis, B.; Blasco-Moreno, A.; Trujillo, A.J. Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: Effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2015**, *32*, 79–90. [[CrossRef](#)]
46. Li, Y.; Wu, C.; Liu, J.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Jiang, L.; Qi, B.; Zhang, X.; Wang, Z.; Teng, F. Soy Protein Isolate-Phosphatidylcholine Nanoemulsions Prepared Using High-Pressure Homogenization. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Martín-Cabrejas, M.A.; Ariza, N.; Esteban, R.; Mollá, E.; Waldron, K.; López-Andréu, F.J. Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1254–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jiang, J.; Chen, J.; Xiong, Y.L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7576–7583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hahn, C.; Sramek, M.; Nöbel, S.; Hinrichs, J. Post-processing of concentrated fermented milk: Influence of temperature and holding time on the formation of particle clusters. *Dairy Sci. Technol.* **2011**, *92*, 91–107. [[CrossRef](#)]
50. Poliseli-Scopel, F.H.; Hernández-Herrero, M.; Guamis, B.; Ferragut, V. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT* **2012**, *46*, 42–48. [[CrossRef](#)]
51. Ferragut, V.; Hernández-Herrero, M.; Veciana-Nogués, M.T.; Borrás-Suarez, M.; González-Linares, J.; Vidal-Carou, M.C.; Guamis, B. Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: Physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *95*, 953–961. [[CrossRef](#)]
52. Moelants, K.R.; Cardinaels, R.; Van Buggenhout, S.; Van Loey, A.M.; Moldenaers, P.; Hendrickx, M.E. A Review on the Relationships between Processing, Food Structure, and Rheological Properties of Plant-Tissue-Based Food Suspensions. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 241–260. [[CrossRef](#)]
53. Zheng, E.; Rudman, M.; Kuang, S.; Chryss, A. Turbulent coarse-particle suspension flow: Measurement and modelling. *Powder Technol.* **2020**, *373*, 647–659. [[CrossRef](#)]
54. McClements, D.J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 611–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Genovese, D.B.; Lozano, J.E.; Rao, M.A. The Rheology of Colloidal and Noncolloidal Food Dispersions. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, 11–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ewoldt, R.H.; Winter, P.; Maxey, J.; McKinley, G.H. Large amplitude oscillatory shear of pseudoplastic and elastoviscoplastic materials. *Rheol. Acta* **2009**, *49*, 191–212. [[CrossRef](#)]
57. Tiziani, S.; Vodovotz, Y. Rheological effects of soy protein addition to tomato juice. *Food Hydrocoll.* **2005**, *19*, 45–52. [[CrossRef](#)]
58. Wan, Y.; Xu, M.; Gilbert, R.G.; Yin, J.; Huang, X.; Xiong, T.; Xie, M. Colloid chemistry approach to understand the storage stability of fermented carrot juice. *Food Hydrocoll.* **2019**, *89*, 623–630. [[CrossRef](#)]
59. Domian, E.; Marzec, A.; Kowalska, H. Assessing the effectiveness of colloidal microcrystalline cellulose as a suspending agent for black and white liquid dyes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *56*, 2504–2515. [[CrossRef](#)]
60. Xu, J.; Bietz, J.A.; Carriere, C.J. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1025–1030. [[CrossRef](#)]
61. Jia, X.; Chen, Y.; Shi, C.; Ye, Y.; Abid, M.; Jabbar, S.; Wnag, P.; Zeng, X.; Wu, T. Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. *Food Hydrocoll.* **2014**, *39*, 27–33. [[CrossRef](#)]

Warszawa, 10.09.2024

Patrycja Malinowska (z d. Cichońska)
patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

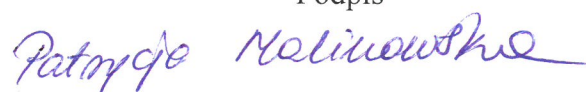
**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Domian, E., Ziarno, M., 2022, Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages, Sensors, 22(21), 8348 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zainicjowaniu wykonania badań, opracowaniu koncepcji pracy, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badania, analizie i przechowywaniu danych, napisaniu publikacji, wizualizacji danych i pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Warszawa, 18.04.2024

Ewa Domian
ewa_domian@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Domian, E., Ziarno, M., 2022, Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages, Sensors, 22(21), 8348 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na częściowym opracowaniu metodologii, recenzji i edycji publikacji i częściowemu nadzorowaniu projektu.



Podpis

Warszawa, 18.04.2024

Małgorzata Ziarno
malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy pracy Cichońska, P., Domian, E., Ziarno, M., 2022, Application of Optical and Rheological Techniques in Quality and Storage Assessment of the Newly Developed Colloidal-Suspension Products: Yogurt-Type Bean-Based Beverages, Sensors, 22(21), 8348 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał częściowym opracowaniu metodologii, recenzji i edycji publikacji i częściowemu nadzorowaniu projektu.

Podpis





OPEN

Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages

Patrycja Cichońska^{1✉}, Joanna Bryś² & Małgorzata Ziarno¹

The market for plant-based beverages (PBBs) is relatively new; hence, to enable its further development, it is important to use new raw materials and improve production technology. The use of natural biotechnological processes can diversify the segment of PBBs, which may offer products with better functionality than those available in the market. Therefore, the present study aimed to determine the effects of fermentation and germination on the nutritional properties of bean-based beverages (BBs) and lentil-based beverages (LBs). The applied processes significantly ($p \leq 0.05$) influenced the characteristics of PBBs. Fermentation improved the antioxidant properties (e.g., by increasing the level of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity by 2–6% and 3–7% for BBs and LBs, respectively) and modified the fatty acid (FA) profile of PBBs. This process increased the share of polyunsaturated FAs in the sn2 position in triacylglycerols, which may promote its absorption in the intestine. The simultaneous use of germination and fermentation was most effective in decreasing oligosaccharide content (< 1.55 mg/kg), which may reduce digestive discomfort after consuming PBBs. We recommend that the designing of innovative legume-based beverages should include the application of fermentation and germination to obtain products with probiotic bacteria and improved nutritional properties.

Natural biotechnological processes have been used for centuries to increase the nutritional value of foods and extend their shelf life. It is hypothesized that as farming started to replace hunting and gathering around 10,000 years ago, humans began to produce fermented foods and beverages¹. Sprouting (also known as germination) of seeds has been known for a very long time, mainly in Eastern countries where germinated plants have been used in traditional cuisine². Presently, these techniques are being successfully used to process plant and animal products^{3,4}; thus, it may be beneficial to use these techniques to produce novel healthy foods.

Plant-based diets are becoming increasingly popular in the global food market; consequently, plant-based substitutes for animal products are in great demand⁵. The most popular products in this food group are milk substitutes, which are also known as plant-based beverages (PBBs). PBBs are water-soluble extracts of shredded plant materials (e.g., legumes, seeds, cereals, pseudocereals, and nuts) in the form of colloidal suspensions or emulsions^{6,7}. Among the nondairy matrices, legumes are the least explored ones, with the majority of studies focused on soybean alone^{5,8}. However, the market share of soy beverages is decreasing because of health concerns related to genetically modified organisms, allergens, high levels of isoflavones, and CO₂ footprint⁹. Thus, there is an opportunity to expand and diversify this segment by using other legumes that may provide better functionality and nutrition than soy. Hence, it is necessary to gain more knowledge regarding the processing, functionality, and health benefits and risks of beverages prepared using other legumes¹⁰.

Currently, legume consumption is minimal because of limitations such as taste, availability, flatulence factor, and lack of knowledge regarding the preparation process. Designing new legume-based beverages is a beneficial approach that can overcome these limitations by offering modern convenience food¹⁰. Various methods have been used to improve the properties of legumes, such as soaking, cooking, fermentation, and germination¹¹. The use of these processes, particularly in combination, can provide improved nutritional value, aroma, taste, texture, stability, and safety against microbial contamination^{7,12}.

¹Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences - SGGW (WULS-SGGW), Nowoursynowska 159C St., 020776 Warsaw, Poland. ²Department of Chemistry, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences - SGGW (WULS-SGGW), Nowoursynowska 159C St., 020776 Warsaw, Poland. ✉email: patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

The market for PBBs is relatively new; therefore, to enable its further growth and development, it is essential to improve the technology of producing PBBs. A goal of the food industry is to develop new, ecofriendly processing strategies to reduce energy consumption and maximize the value of raw materials¹³. The answer to this may be the use of natural biotechnological processes such as germination and fermentation, which can increase the attractiveness of legume-based beverages and does not require the use of technologies with limited industrial application due to high energy consumption and cost related to complex equipment purchase^{13,14}.

Previous research on the properties of legume-based beverages other than those made from soybean does not provide clear recommendations on using processes to improve product properties and overcoming barriers to their consumption. Moreover, to date, the effects of a combination of different biotechnological processes on the properties of bean-based beverages (BBs) and lentil-based beverages (LBs) have not been studied. The study focused on a BBs and LBs due to their potential to produce highly nutritious PBBs from legumes other than soy. This is the result of the high content of protein, carbohydrates, dietary fiber, and bioactive ingredients (such as polyphenols) in beans and lentils^{10,11}. We believe that these legumes hold promise in addressing the growing demand for sustainable and nutritious food alternatives, due to their nutritional richness, diversity, cultural significance, availability, and the potential for further advancement in the development of protein-enriched plant-based foods. Therefore, the present study aimed to assess the possibility of using natural biotechnological processes, i.e., fermentation and germination, to improve the nutritional properties of BBs and LBs. The influence of the studied processes on fermentation (pH and population of lactobacilli and bifidobacteria), nutritional profile (carbohydrate content, total share of fatty acids, fatty acid profile, and positional distribution of fatty acids in triacylglycerols (TAGs)), and antioxidant properties (total phenolic content and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (RSA)) of BB and LB was analyzed. The changes in the tested properties of the PBBs after their production and after 21 days of refrigerated storage at 6 °C were analyzed. This study also aimed to offer recommendations for the use of fermentation and germination for producing innovative legume-based beverages.

Materials and methods

Materials and experimental design

The PBBs used in our study were prepared from white kidney beans “Piękny Jaś Karłowy” (Lestello Sp. z o.o., Cmolas, Poland) and brown lentils (Natural Expert, Białystok, Poland). The nutritional values of the tested beans and lentils are shown in Supplementary Table S1 online, according to the product label.

Three industrial freeze-dried starter cultures were used: Beaugel Soja 1 (Ets Coquard, Villefranche-sur-Saône, France), which comprised *Lactobacillus casei* (currently classified as *Lacticaseibacillus casei*), *Streptococcus thermophilus*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; YO-MIX 207 LYO 500 DCU (DuPont™ Danisco, Copenhagen, Denmark), which comprised *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium lactis*; and ABY-3 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark), which comprised *L. acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *S. thermophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. These starter cultures were selected to determine the differences between fermentation with a starter culture containing basic yoghurt bacteria (Beaugel Soja 1) and fermentation with starter cultures enriched with different strains of bifidobacteria (YO-MIX 207 and ABY-3).

Two variants of each PBB were prepared: from germinated (G) and non-G beans and lentils. The experimental design used in the study was based on three factors: germination, starter culture used for fermentation, and storage period at 6 °C (Table 1). The experiment was conducted in duplicate. Supplementary Table S2 online

Sample code	Germination	Fermentation	Storage at 6 °C
BB0/LB0	–	–	–
BB100/LB100	–	Beaugel Soja 1	–
BB101/LB101	–	YO-MIX 207	–
BB102/LB102	–	ABY-3	–
BB0s/LB0s	–	–	21 days
BB100s/LB100s	–	Beaugel Soja 1	21 days
BB101s/LB101s	–	YO-MIX 207	21 days
BB102s/LB102s	–	ABY-3	21 days
BBG0/LBG0	+	–	–
BBG100/LBG100	+	Beaugel Soja 1	–
BBG101/LBG101	+	YO-MIX 207	–
BBG102/LBG102	+	ABY-3	–
BBG0s/LBG0s	+	–	21 days
BBG100s/LBG100s	+	Beaugel Soja 1	21 days
BBG101s/LBG101s	+	YO-MIX 207	21 days
BBG102s/LBG102s	+	ABY-3	21 days

Table 1. The explanation of the sample codes for tested PBBs.

shows the physicochemical characteristics of basic PBBs derived from G beans (BBG), non-G beans (BB), G lentils (LBG), and non-G lentils (LB).

Preparation of PBBs

Germination was performed in a sprouter at 25 °C for 72 h (water was changed every 24 h). G and non-G beans and lentils were sterilized at 121 °C for 15 min, mixed with drinking water at the ratio of 1:9 (m/m), and blended until a homogeneous mass was obtained. The resulting mass was filtered through a sieve with 0.1 mm mesh size and then homogenized using the laboratory mixer L4R (Silverson, Chesham, UK). The prepared PBBs were then sterilized at 121 °C for 15 min.

Fermentation of PBBs

Inoculums were prepared by dissolving the freeze-dried starter cultures in a sterile saline solution. The PBBs were inoculated with 1.0% (m/m) of starter cultures (final cell density of around 6–7 log CFU/mL) and incubated at 45 °C for 6 h. After fermentation, the PBBs were refrigerated at 6 °C and stored for 21 days. The non-stored PBBs were frozen at – 18 °C until analysis.

Active acidity and microflora population analysis

The active acidity was determined by measuring the pH of the PBBs using a calibrated digital CPO-505 pH meter (Elmetron, Zabrze, Poland). The measurement was conducted twice.

Microflora population was analyzed by the culture method in Petri dishes. De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany) was used to determine the viable population of lactobacilli. M17 agar (Merck) was used to determine the viable population of *S. thermophilus*. Bifidus Selective Medium (BSM) agar (Merck) was used to determine the viable population of bifidobacteria. The measurement was conducted twice. Petri dishes were incubated at 37 °C for 72 h under aerobic conditions for M17 medium and under anaerobic conditions for MRS and BSM media. After incubation, the number of colonies was counted, and CFU/mL was calculated. The result was expressed as a logarithm of the total cell count.

Carbohydrate content of PBBs

The carbohydrate content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a refractive index detector (RID). The sample was prepared according to the method of Ziarno et al.¹⁵ without any modifications. The analytes were separated using an HPLC kit equipped with DeltaChrom™ pumps, an S 6020 needle injection valve dosing loop (Sykam, Fürstenfeldbruck, Germany), a DeltaChrom™ temperature control unit column temperature controller (Sykam), and a 05397–51 Cosmosil Sugar-D column (250 × 4.6 mm, 5 μm; Cosmosil, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) secured by a pre-column 05394–81 Cosmosil Guard Column Sugar-D (10 × 4.6 mm, 5 μm, Cosmosil). The analytes were detected with an S3580 RID (Sykam). The chromatographic analysis parameters were the same as those described by Ziarno et al.¹⁵ without any modifications. The analysis was performed in duplicate. After the analysis, the carbohydrates were identified by comparison with the retention times of selected carbohydrate standards, including glucose, sucrose, raffinose, stachyose, and verbascose (Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA).

Analysis of antioxidant properties

The antioxidant properties of the PBBs were analyzed by determining total phenolic content (TPC) and the level of DPPH RSA according to the method of Zhao and Shah¹⁶ with some modifications. The PBB extracts were prepared by mixing 2 mL of the sample with 4 mL of 80% methanol; the extract was then vortexed for 1 min and centrifuged in an MPW-350R centrifuge (MPW Med. Instruments) at 4000 × g for 20 min at 4 °C. The precipitate was then extracted twice with 2 mL of 80% methanol, and the supernatants were pooled. All supernatants were filtered through a syringe filter (Merck) with 0.45 μm pore size and were used as the antioxidant extracts (AEs) to estimate TPC and DPPH RSA.

TPC (analyzed by the Folin–Ciocalteu method) and the efficiency of the PBBs to scavenge DPPH radicals were determined according to the method of Zhao and Shah¹⁶ without any modifications. The analyses were performed in duplicate. TPC was estimated by comparing the absorbance of the AEs with a calibration curve constructed using a gallic acid standard (0.5–2.5 mg/mL) and was expressed as milligrams of gallic acid (GAE)/mL of PBBs. RSA was expressed as percent DPPH inhibition using the following Eq. (1):

$$\text{DPPH RSA (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100, \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance of a methanolic solution of DPPH radicals without sample extract and A_s is the absorbance of PBBs.

Analysis of fatty acid (FAs) profile

The PBBs were first extracted using the Folch method¹⁷. The FAs profile was analyzed according to the method of Ziarno et al.¹⁸ by using a gas chromatography system (YL6100 GC) with an installed flame ionization detector (Young Lin Instrument Co., Ltd., Anyang, Korea) and a MEGA-10 capillary column (ID 0.25 mm, film thickness 0.25 μm, length 60 m, MEGA S.r.l., Legnano, Italy). FAs were detected based on the retention time by comparison with a selected external standard (Fatty Acid Methyl Esters Standard Mixture, Merck). The analysis was performed in duplicate. The share of the analyzed FA in the FA profile was estimated by determining the area of the peaks in the chromatogram. The analysis was performed for basic PBBs obtained from G and non-G

beans and lentils and for beverages fermented with the ABY-3 starter culture, which showed the highest acidification activity.

Analysis of the positional distribution of FAs in TAGs

The hydrolysis of TAGs and the analysis of the positional distribution of FAs in TAGs were conducted and calculated according to the method of Ziarno et al.¹⁸ without any modifications. The analysis was performed for basic PBBs obtained from G and non-G beans and lentils and for beverages fermented with the ABY-3 starter culture (BB102/LB102, BB102s/LB102s, BBG102/LBG102, and BBG102s/LBG102s), which showed the highest acidification activity.

Statistical analysis

Statistica version 13.1 software (StatSoft, Krakow, Poland) was used to analyze the data obtained in the experiments. Analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effect of germination (GM), fermentation (C), and storage (S) on the obtained results. Differences were considered significant at $\alpha = 0.05$ based on Tukey's test.

Results and discussion

Active acidity and viable bacterial population

Legume-based beverages provide a favorable matrix for fermentation; however, the process typically requires a longer time (approximately 12–48 h) for completion as compared to milk fermentation (approximately 4–6 h)^{6,19}. During the fermentation of food (including milk and milk substitutes), it is beneficial to maintain pH in the range of 4.3–4.7; an acidic pH can protect the product from microbial contamination and retain favorable organoleptic properties related to the concentration of organic acids and other flavor-forming components^{20,21}.

Table 2 shows the pH values and the population of lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria in the tested PBBs. All fermented samples of PBBs showed a significant decrease in pH, which indicated the metabolic activity of microorganisms in all tested starter cultures. In all tested PBBs, no significant changes in pH were observed after storage. Fermentation was the primary factor that affected the obtained values ($\eta^2 \approx 0.925\text{--}0.989$).

At the time of consumption, probiotic products must contain an adequate number of viable cells, ranging from at least 10^6 to 10^7 CFU/mL, to exert their beneficial effects²¹. Here, by using the starter cultures YO-MIX 207 (BB/LB/BBG/LBG101) and ABY-3 (BB/LB/BBG/LBG102), the recommended number of viable cells of the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* was achieved after fermentation of all tested samples (BBs/LBs and BBGs/LBGs) (Table 2). Most of these samples did not show a decrease in the bacterial population below 10^7 CFU/mL during the storage period. The BB100, BBG100, and LB100 samples fermented with the Beaugel Soja 1 starter culture did not reach the recommended *Lactobacillus* cell count and showed values of 5.99, 5.86, and 5.73 \log_{10} CFU/mL, respectively. All the tested samples of PBBs showed no significant effect of germination on the population of LAB and bifidobacteria. The 21-day refrigerated storage period also had no significant effect on the pH of all tested samples; however, it showed a slight effect ($\eta^2 \approx 0.211\text{--}0.358$) on changes in the viable population of bacteria.

In the present study, the required population level of LAB and bifidobacteria and the pH value recommended for fermented beverages were achieved for most of the tested samples. Moreover, these values were obtained by fermentation performed for 6 h. Most of the PBBs described in the literature exhibited a lower acidification rate, slow growth of probiotic bacteria, and prolonged fermentation time due to the low concentration of soluble carbohydrates^{12,21}. A short fermentation time is more efficient and economically advantageous for use on a production scale.

G and non-G BBs and LBs fermented with the Beaugel Soja 1 starter culture showed a lower efficiency in obtaining the recommended pH and level of the bacterial population. This starter culture was the least diverse one with regard to microbial species and contained only *Lactobacillus* and *Streptococcus*. The other tested starter cultures (YO-MIX 207 and ABY-3) also contained the genus *Bifidobacterium*; this finding indicates that a greater diversity of microflora in the starter culture is conducive to a more effective fermentation of PBBs. This phenomenon may be due to the synergistic activities of microorganisms in complex starter cultures and the metabolism of carbohydrates in legumes. According to Adamberg et al.²², the strain balance and activities of microorganisms are determined by an interplay of different factors between consortium members, such as antagonism, competition for substrates, and symbiosis by cross-feeding. In their study, the authors showed that the growth of *L. paracasei* F8 was enhanced in the presence of *B. breve* 46. Similarly, in our study, a reduced concentration of *Lactobacillus* cells was observed only in samples fermented using the Beaugel Soja 1 starter culture, which did not contain bifidobacteria.

The samples fermented with Beaugel Soja 1 also had the slowest rate of pH decrease. According to Pokusaev et al.²³, bifidobacteria metabolize carbohydrates more efficiently than LAB. The bifidobacterial pathway yields 2.5 mol of ATP, 1.5 mol of acetate, and 1 mol of lactate from 1 mol of fermented glucose. Homofermentative LAB produce 2 mol of ATP and 2 mol of lactic acid from 1 mol of glucose, while heterofermentative LAB produce 1 mol each of lactic acid, ethanol, and ATP from 1 mol of fermented glucose. Efficient milk fermentation can be achieved using the classic yogurt culture, which is characterized by protosymbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*²⁴. The present study shows that for the fermentation of plant-based beverages, it is more effective to use starter cultures enriched with bifidobacteria, which can enhance fermentation rate and microbial proliferation.

Sample code ¹	pH	Bacteria population [log ₁₀ CFU/mL]		
		Lactobacilli	<i>S. thermophilus</i>	Bifidobacteria
Bean-based beverages				
BB0	6.03 ± 0.32 ^b	nd	nd	nd
BB100	4.79 ± 0.17 ^a	5.99 ± 0.05 ^b	9.60 ± 0.07 ^d	nd
BB101	4.59 ± 0.36 ^a	7.17 ± 0.06 ^{cd}	8.16 ± 0.13 ^{cd}	8.07 ± 0.22 ^b
BB102	4.39 ± 0.25 ^a	7.50 ± 0.02 ^{de}	9.53 ± 0.18 ^d	7.86 ± 0.08 ^{ab}
BB0s	5.96 ± 0.38 ^b	nd	nd	nd
BB100s	4.73 ± 0.25 ^a	5.25 ± 0.21 ^a	6.87 ± 0.11 ^b	nd
BB101s	4.39 ± 0.55 ^a	7.28 ± 0.09 ^{cd}	8.18 ± 0.23 ^{cd}	7.52 ± 0.13 ^a
BB102s	4.38 ± 0.26 ^a	7.49 ± 0.04 ^{de}	7.72 ± 0.09 ^c	7.43 ± 0.24 ^a
BBG0	6.35 ± 0.06 ^b	nd	nd	nd
BBG100	4.74 ± 0.24 ^a	5.86 ± 0.11 ^b	7.72 ± 0.18 ^c	nd
BBG101	4.30 ± 0.07 ^a	7.17 ± 0.18 ^{cd}	8.08 ± 0.20 ^{cd}	7.76 ± 0.13 ^{ab}
BBG102	4.27 ± 0.22 ^a	7.73 ± 0.11 ^{de}	7.72 ± 0.17 ^c	7.72 ± 0.18 ^{ab}
BBG0s	6.30 ± 0.02 ^b	nd	nd	nd
BBG100s	4.72 ± 0.06 ^a	5.15 ± 0.07 ^a	6.14 ± 0.19 ^a	nd
BBG101s	4.40 ± 0.18 ^a	7.47 ± 0.09 ^{de}	8.32 ± 0.18 ^d	7.74 ± 0.14 ^{ab}
BBG102s	4.31 ± 0.13 ^a	7.03 ± 0.08 ^c	7.71 ± 0.11 ^c	7.42 ± 0.13 ^a
Statistics ANOVA. η ² [-]				
GM	ns	ns	ns	ns
C	0.925	0.995	0.969	0.999
S	ns	0.211	0.265	0.261
Lentil-based beverages				
LB0	6.36 ± 0.08 ^c	nd	nd	nd
LB100	4.36 ± 0.04 ^{cd}	5.73 ± 0.10 ^{ab}	8.60 ± 0.08 ^e	nd
LB101	4.43 ± 0.02 ^{abcd}	6.15 ± 0.17 ^{bc}	7.65 ± 0.19 ^{cd}	6.89 ± 0.06 ^a
LB102	4.38 ± 0.01 ^{abcd}	6.34 ± 0.10 ^{cd}	8.62 ± 0.11 ^e	6.75 ± 0.14 ^a
LB0s	6.27 ± 0.03 ^c	nd	nd	nd
LB100s	4.67 ± 0.08 ^d	5.87 ± 0.18 ^{abc}	7.28 ± 0.18 ^c	nd
LB101s	4.46 ± 0.08 ^{abcd}	7.23 ± 0.15 ^{ef}	7.69 ± 0.13 ^{cd}	8.02 ± 0.12 ^{bc}
LB102s	4.37 ± 0.11 ^{abcd}	7.30 ± 0.16 ^{fg}	5.82 ± 0.29 ^a	7.69 ± 0.11 ^{bc}
LBG0	6.39 ± 0.03 ^c	nd	nd	nd
LBG100	4.51 ± 0.21 ^{abcd}	6.78 ± 0.17 ^{de}	7.75 ± 0.14 ^{cd}	nd
LBG101	4.19 ± 0.01 ^a	7.75 ± 0.08 ^{gh}	7.62 ± 0.17 ^{cd}	7.52 ± 0.13 ^b
LBG102	4.21 ± 0.21 ^{ab}	7.80 ± 0.15 ^h	7.88 ± 0.04 ^d	7.47 ± 0.20 ^b
LBG0s	6.26 ± 0.05 ^c	nd	nd	nd
LBG100s	4.58 ± 0.07 ^{bcd}	6.67 ± 0.16 ^d	7.49 ± 0.01 ^{cd}	nd
LBG101s	4.25 ± 0.07 ^{abc}	5.59 ± 0.16 ^a	6.74 ± 0.21 ^b	6.83 ± 0.12 ^a
LBG102s	4.14 ± 0.04 ^a	7.66 ± 0.06 ^{fgh}	7.25 ± 0.12 ^{bc}	6.64 ± 0.09 ^a
Statistics ANOVA. η ² [-]				
GM	0.347	ns	ns	ns
C	0.989	0.969	0.978	0.992
S	ns	ns	0.358	ns

Table 2. The pH and population of lactic acid bacteria and bifidobacteria in the tested PBBs. Table shows mean values and standard deviations (SD) range, and statistics ANOVA (η²—coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C and S). *nd* not detected, *ns* non-significant, *G* germination, *C* starter culture, *S* storage period. All analyses were made in duplicate. ^{a,b,c,d,e,f,g,h}Mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1.

Carbohydrate content

Carbohydrates are the main component of legumes (55–65%) and consist mainly of starch, monosaccharides, disaccharides, and α-galactosides²⁵. Humans and monogastric animals lack α-galactosidase required to hydrolyze α(1 → 6) glycosidic linkages; consequently, oligosaccharides remain undigested in their upper gastrointestinal tract. The undigested oligosaccharides are responsible for digestive discomfort²⁶; therefore, it is desirable to remove these oligosaccharides during the production of legume-based products.

Table 3 shows the content of carbohydrates in the tested PBBs. BBs and BBGs showed the highest glucose content among all the carbohydrates tested. In BBs, germination was the primary factor that influenced the changes in the concentrations of glucose, sucrose, stachyose, and verbascose ($\eta^2 > 0.825$). The germination process significantly reduced the content of glucose, sucrose, and verbascose and increased the content of stachyose. Fermentation with different starter cultures showed the greatest effect on reducing glucose and sucrose content in most of the tested BB and BBG samples; this decrease was directly caused by the metabolic activity of microorganisms present in the starter cultures used for fermentation.

Sample code ¹	Carbohydrates content [mg/kg]				
	Glucose	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Verbascose
Bean-based beverages					
BB0	6.53 ± 0.10 ^f	3.40 ± 0.24 ^f	0.60 ± 0.11 ^a	0.62 ± 0.04 ^a	1.62 ± 0.03 ^{bc}
BB100	4.73 ± 0.29 ^e	2.67 ± 0.10 ^{ef}	0.58 ± 0.12 ^a	0.51 ± 0.03 ^a	1.56 ± 0.09 ^{bc}
BB101	4.33 ± 0.17 ^e	2.11 ± 0.33 ^{cde}	0.58 ± 0.11 ^a	0.41 ± 0.01 ^a	1.47 ± 0.05 ^{bc}
BB102	4.29 ± 0.12 ^e	2.16 ± 0.45 ^{cde}	0.50 ± 0.03 ^a	0.44 ± 0.01 ^a	1.59 ± 0.11 ^{bc}
BB0s	6.93 ± 0.28 ^f	2.99 ± 0.03 ^{ef}	0.59 ± 0.04 ^a	0.65 ± 0.08 ^{ab}	1.51 ± 0.02 ^{bc}
BB100s	6.37 ± 0.53 ^f	2.20 ± 0.12 ^{cde}	0.74 ± 0.16 ^a	0.64 ± 0.07 ^{ab}	1.41 ± 0.01 ^b
BB101s	5.97 ± 0.13 ^f	2.16 ± 0.23 ^{cde}	0.57 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.08 ^a	1.69 ± 0.12 ^c
BB102s	4.87 ± 0.41 ^e	1.59 ± 0.37 ^{bcd}	0.55 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.08 ^a	1.55 ± 0.08 ^{bc}
BBG0	2.58 ± 0.42 ^{cd}	2.47 ± 0.17 ^{de}	0.61 ± 0.02 ^a	1.68 ± 0.29 ^f	0.25 ± 0.08 ^a
BBG100	2.25 ± 0.31 ^{bcd}	0.91 ± 0.18 ^{ab}	0.33 ± 0.06 ^a	1.18 ± 0.09 ^{cd}	0.27 ± 0.09 ^a
BBG101	1.40 ± 0.02 ^{ab}	1.45 ± 0.14 ^{bc}	0.48 ± 0.09 ^a	1.55 ± 0.13 ^{cdef}	0.21 ± 0.01 ^a
BBG102	2.21 ± 0.07 ^{bcd}	1.02 ± 0.31 ^{ab}	0.59 ± 0.22 ^a	1.22 ± 0.02 ^{cde}	0.22 ± 0.01 ^a
BBG0s	3.03 ± 0.13 ^d	2.46 ± 0.16 ^{de}	0.62 ± 0.05 ^a	1.67 ± 0.09 ^{ef}	nd
BBG100s	2.94 ± 0.10 ^d	0.79 ± 0.06 ^{ab}	0.55 ± 0.12 ^a	1.59 ± 0.03 ^{def}	nd
BBG101s	1.09 ± 0.25 ^a	0.79 ± 0.01 ^{ab}	0.61 ± 0.04 ^a	1.09 ± 0.05 ^{bc}	0.19 ± 0.07 ^a
BBG102s	1.89 ± 0.05 ^{abc}	0.32 ± 0.11 ^a	0.53 ± 0.14 ^a	1.30 ± 0.22 ^{cdef}	nd
Statistics ANOVA. η^2 [-]					
GM	0.918	0.825	ns	0.899	0.984
C	0.619	0.836	ns	0.394	ns
S	0.266	0.321	ns	ns	0.254
Lentil-based beverages					
LB0	12.49 ± 0.65 ^h	1.20 ± 0.91 ^c	0.25 ± 0.06 ^a	1.15 ± 0.16 ^e	2.65 ± 0.16 ^h
LB100	11.53 ± 0.52 ^{gh}	1.22 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.04 ^a	0.87 ± 0.10 ^{abcd}	2.24 ± 0.14 ^{fgh}
LB101	8.48 ± 0.49 ^f	0.50 ± 0.05 ^b	0.19 ± 0.01 ^a	0.86 ± 0.19 ^{abcd}	2.45 ± 0.15 ^{gh}
LB102	4.68 ± 0.14 ^b	0.40 ± 0.03 ^{ab}	0.18 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.12 ^{abcd}	2.24 ± 0.08 ^{fgh}
LB0s	10.29 ± 0.25 ^g	1.08 ± 0.04 ^c	0.23 ± 0.03 ^a	1.09 ± 0.07 ^e	1.78 ± 0.06 ^{efg}
LB100s	6.33 ± 0.28 ^{bcd}	0.33 ± 0.08 ^{ab}	0.25 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.03 ^e	1.40 ± 0.05 ^{cde}
LB101s	2.57 ± 0.64 ^a	0.31 ± 0.01 ^{ab}	0.14 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.07 ^{cd}	1.64 ± 0.07 ^{ef}
LB102s	2.53 ± 0.57 ^a	0.35 ± 0.07 ^{ab}	0.12 ± 0.03 ^a	0.97 ± 0.09 ^{bcd}	1.60 ± 0.14 ^{def}
LBG0	8.21 ± 0.24 ^{ef}	1.21 ± 0.05 ^c	0.91 ± 0.12 ^{de}	1.19 ± 0.07 ^e	0.90 ± 0.03 ^{bcd}
LBG100	6.19 ± 0.08 ^{bcd}	0.21 ± 0.08 ^a	0.68 ± 0.06 ^{bcd}	1.08 ± 0.03 ^e	nd
LBG101	5.86 ± 0.16 ^{bc}	0.52 ± 0.03 ^b	0.71 ± 0.08 ^{bcd}	0.98 ± 0.08 ^{cd}	0.31 ± 0.01 ^{ab}
LBG102	6.76 ± 0.33 ^{cdef}	0.38 ± 0.08 ^{ab}	0.73 ± 0.12 ^{bcd}	0.61 ± 0.03 ^{abc}	nd
LBG0s	7.79 ± 0.60 ^{def}	1.07 ± 0.04 ^c	0.99 ± 0.02 ^e	1.01 ± 0.02 ^e	0.78 ± 0.06 ^{abc}
LBG100s	6.25 ± 0.31 ^{bcd}	0.36 ± 0.08 ^{ab}	0.61 ± 0.03 ^{bc}	1.13 ± 0.09 ^e	0.43 ± 0.06 ^{ab}
LBG101s	6.49 ± 0.42 ^{cde}	0.49 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.05 ^b	0.55 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.06 ^a
LBG102s	6.79 ± 0.62 ^{cdef}	0.39 ± 0.03 ^{ab}	0.78 ± 0.08 ^{cde}	0.59 ± 0.08 ^{ab}	nd
Statistics ANOVA. η^2 [-]					
GM	ns	ns	0.905	ns	0.901
C	0.487	0.714	0.440	0.468	0.389
S	0.219	ns	ns	ns	0.312

Table 3. Carbohydrates content in the tested PBBs. Table shows mean values and standard deviations (SD) range, and statistics ANOVA (η^2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C and S). *nd* not detected, *ns* non-significant, *G* germination, *C* starter culture, *S* storage period. All analyses were made in duplicate. ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i} Mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

¹Description as in Table 1.

LBs and LBGs also exhibited the highest glucose content among all the carbohydrates tested; however, compared to BB0 and BG0, the glucose content was almost twofold higher for LB0 (12.49 mg/kg) and more than threefold higher for LG0 (8.21 mg/kg), respectively (Table 3). Fermentation with different starter cultures was the main factor that affected the content of glucose ($\eta^2 = 0.487$) and sucrose ($\eta^2 = 0.487$) in LBs and led to a significant decrease in the content of these carbohydrates. In LBs, germination significantly reduced verbasose content and increased stachyose content, while fermentation significantly reduced the content of all the tested oligosaccharides. In all tested PBBs, the refrigerated storage period had the least effect on modifying the content of the analyzed carbohydrates.

According to Nkhata et al.²⁷, the effect of germination on carbohydrates is largely dependent on the activation of hydrolytic and amylolytic enzymes; these enzymes decrease starch content and increase the content of simple sugars. Germination improves the digestibility of legumes by activating endogenous enzymes such as α -amylase. However, in the present study, germination led to a significant decrease in glucose content in the tested PBBs. The presence of glucose in the tested PBBs may result not only from the germination process used but also from other processing steps, including grinding. Ineffective grinding of the legumes may lead to a mass with a large particle size that will be retained on the sieves during the filtration process and will not be included in the beverage solution. This could reduce the concentration of dry matter in beverages and further result in a lower concentration of sugars^{28,29}. Previous studies have shown that germinated BBs have a higher span and mean diameter $d_{4,3}$ (span ≈ 2.24 – 2.35 , $d_{4,3} \approx 76.8$ – 84.2) than non-germinated BBs (span ≈ 1.90 – 2.00 , $d_{4,3} \approx 38.2$ – 47.0)³⁰. This indicates the presence of larger particles or aggregates in the germinated beverage, which may directly result from the lower efficiency of the filtration process. The formation of protein aggregates is mainly observed in solutions prepared from legumes³¹. Germination leads to an increase in the availability of proteins³², which may result in more intensive formation of aggregates and, consequently, less effective grinding and filtration processes. Zahir et al.³³ also observed the most intensive formation of protein aggregates in samples of germinated soybean preparations as compared to that in non-germinated ones.

TPC and antioxidant capacity

Free radicals, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species are generated by our body through various endogenous systems when exposed to different physiochemical or pathological conditions³⁴. The use of various processing techniques, including germination and fermentation, may increase the TPC and antioxidant capacity of legumes following a reduction in the anti-nutritional factors (ANFs) and the production of new components with antioxidant properties^{35,36}. We are also aware that the total phenolic content theoretically, but not necessarily, correlates with the antioxidant activity, although this is widely accepted as a screening parameter. The Folin-Ciocalteu method to quantify TPC has some limitations. This test is sensitive to pH, temperature, and reaction time as well as to inorganic and nonphenolic organic compounds (including reducing sugars) that react with the Folin reagent, thereby underestimating the phenol content³⁷.

Figure 1 shows the TPC of the tested BBs (A) and LBs (B) and DPPH RSA of the tested BBs (C) and LBs (D). The results suggest that fermentation, choice of starter culture, germination, and storage conditions play crucial roles in determining the TPC of both BBs and LBs. These findings highlight the importance of these factors in modulating the antioxidant potential and potential health benefits of the tested products. The TPC of the base LB was twice as high as that of the base BB, which confirms the previous report that lentils naturally contain higher levels of phenolic compounds than beans^{38,39}. Fermentation with the three different starter cultures was the primary factor that influenced the TPC of the tested PBBs ($\eta^2 = 0.652$ for BBs and 0.651 for LBs). Fermentation with the starter culture ABY-3 (BB/BBG/LB/LBG102) was the most effective process. The present study showed that the refrigerated storage period significantly reduced the TPC in BBs, as indicated by the coefficient of determination (η^2) value of 0.505 . However, the refrigerated storage period did not affect the results obtained for LBs, thus implying that the phenolic content in LBs remained stable during refrigeration.

All the tested PBBs exhibited a relatively high DPPH scavenging capability ($> 83\%$) (Fig. 1). The base BB and LB showed a similar ability to scavenge DPPH radicals ($\sim 85\%$). Fermentation with the three different starter cultures was the primary factor that influenced the DPPH RSA of the tested PBBs ($\eta^2 = 0.601$ and 0.752 for BBs and LBs, respectively). Similar to the results obtained for TPC, fermentation with the starter culture ABY-3 (BB/BBG/LB/LBG102) was the most effective process. Germination significantly affected the obtained results only for the BBs ($\eta^2 = 0.285$). Refrigerated storage had no effect on the DPPH RSA of all tested PBBs. This might be due to the presence of microorganisms and their metabolic activity, which also occurs during storage. LAB and bifidobacteria can produce bioactive peptides that increase the antioxidant capacity of the product^{40,41}. Bioactive peptides are short amino acid sequences released from proteins by proteolysis, which are generated by enzymes produced by microorganisms⁴². Heydari et al.⁴³ studied the effects of Iranian probiotic and commercial strains that included *B. lactis*, *L. acidophilus*, and *L. casei* on the functional properties of a water-soluble peptide extract. The tested microorganisms showed proteolytic activity during the 28-day cold storage period and significantly affected the formation of antioxidant, antimutagen and antibacterial peptides.

In the present study, the tested PBBs exhibited antioxidant properties derived from TPC and DPPH RSA. Compared to TPC, the DPPH RSA of the tested PBBs was more stable after the application of biotechnological processes and storage. This finding suggests that not only phenolic components but also other ingredients such as ascorbate, tocopherols, or carotenoids are responsible for the DPPH RSA of the studied PBBs⁴⁴.

Fermentation was the primary factor that increased the TPC and DPPH RSA of the tested samples. Regardless of whether microbial fermentation is performed using fungi, yeasts, or bacteria, it affects the content of phenolic compounds in foods; moreover, metabolic activities are specific to the involved species or strains and depend on their array of enzymes. Among the fermented legumes, phenolic acid decarboxylase and esterase activities were reported in fermented cowpeas, lentils, and chickpeas³⁶. In the present study, fermentation using

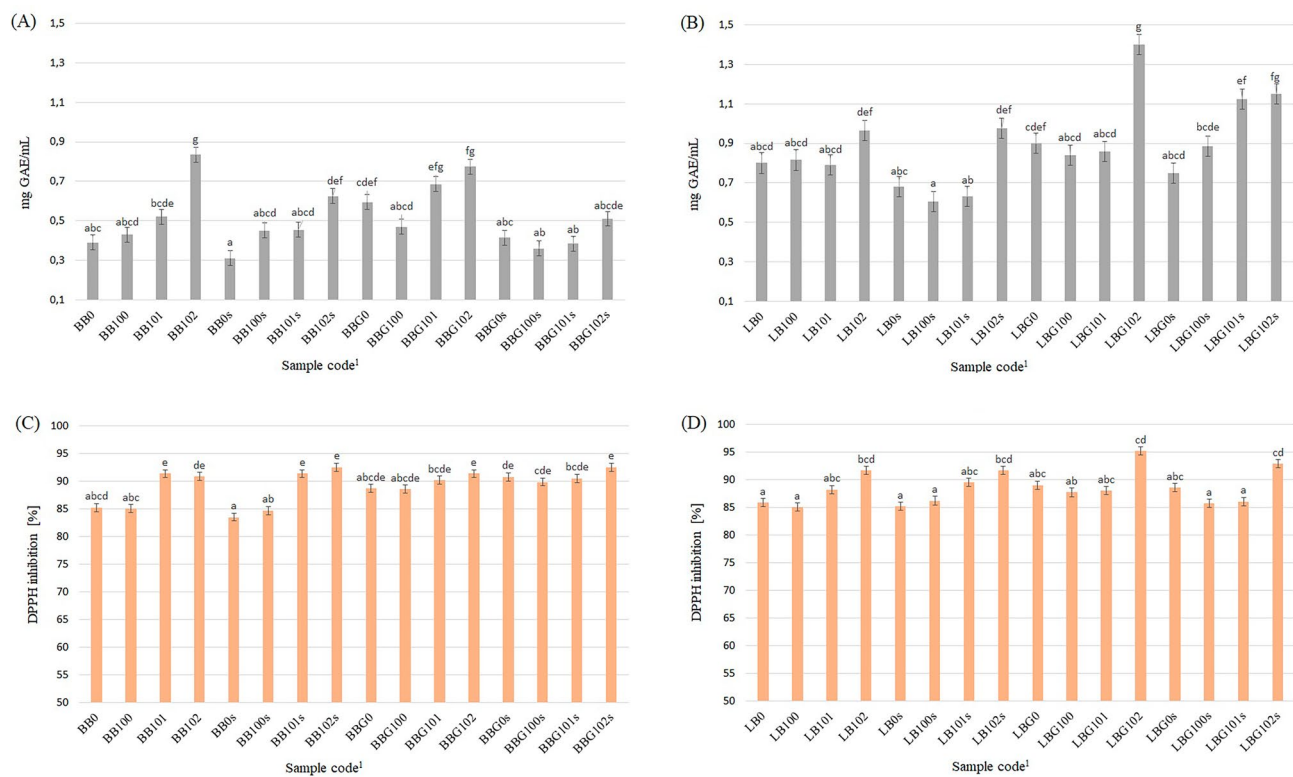


Figure 1. Total phenolic content of the tested BBs (A) and LBs (B) and DPPH radical scavenging activity of the tested BBs (C) and LBs (D). ^{a,b,c,d,e,f,g}Mean values in columns denoted by different code letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1. All analyses were made in duplicate.

the ABY-3 culture showed the greatest ability to increase the antioxidant properties of the tested beverages; this is because the culture contained the largest variety of microorganisms (*L. acidophilus* La-5, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *S. thermophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) among the tested starter cultures. Greater microbial diversity may present a broader enzyme array, which may increase the availability of antioxidant components, e.g., through the breakdown of ANFs¹¹. In addition, the ABY-3 starter culture contains the strain *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, which is the world's most documented probiotic *Bifidobacterium*⁴⁵. These microorganisms produce a significant amount of bioactive peptides that may also exhibit antioxidant properties (e.g., iron-binding ferritin-like antioxidant protein)⁴⁶. Previous studies also indicate that this strain has higher antioxidant activity than LAB^{47,48}.

The effect of germination on the TPC and DPPH RSA of the tested PBBs varied depending on the analyzed raw material. Although these properties of BBGs and LBGs have not been previously investigated by other researchers, inconsistent results, depending on the tested raw material, were obtained for raw G and non-G legumes^{49–51}. Therefore, the combination of germination and fermentation is the most beneficial approach to extend the effect on increasing the antioxidant properties of PBBs. This was also indicated by a previous study of Hubert et al.⁵², in which fermented soy germ extracts exhibited a higher inhibition effect against the superoxide anion radical, and lesser but significant DPPH radical scavenging effects compared to raw soy germ.

Total share of FA and FA profile

The content of FAs and the ratio between unsaturated fatty acids (UFAs) and saturated fatty acids (SFAs) are the important parameters to determine the nutritional value of fats^{53,54}. Figure 2 and Supplementary Table S3 online shows the total share of UFAs and SFAs in the tested PBBs. UFAs dominated in all the tested PBBs, constituting 77.3–86.7% in BBs/BBGs and 74.1–80.3% in LBs/LBGs. Fermentation with the ABY-3 starter culture had a significant effect on the content of SFAs and UFAs in BBs/BBGs. Fermentation significantly increased the concentration of UFAs from 81.5% to 86.7% and simultaneously decreased the concentration of SFAs in BBG. In the remaining PBBs, fermentation, germination, and storage did not affect the total share of SFAs and UFAs.

In the FA profile of the tested PBBs, linolenic acid (C18:2 n-6c) was the dominant FA (Table 4). The other UFAs with a significant share in the tested PBBs were α -linolenic acid and oleic FAs. Only two SFAs, namely palmitic acid and stearic acid, had a significant share in the FA profile of the tested PBBs. The remaining FAs had a share of approximately 0.1% or less than that in the FA profile.

Fermentation with the ABY-3 starter culture was the primary factor that affected the FA profile of BBs and BBGs ($\eta^2 \approx 0.306–0.929$) (Table 4). Fermentation significantly modified the profile of n-3 and n-6 FAs by increasing the share of α -linolenic acid n-3 and reducing the share of linoleic acid n-6. Moreover, fermentation

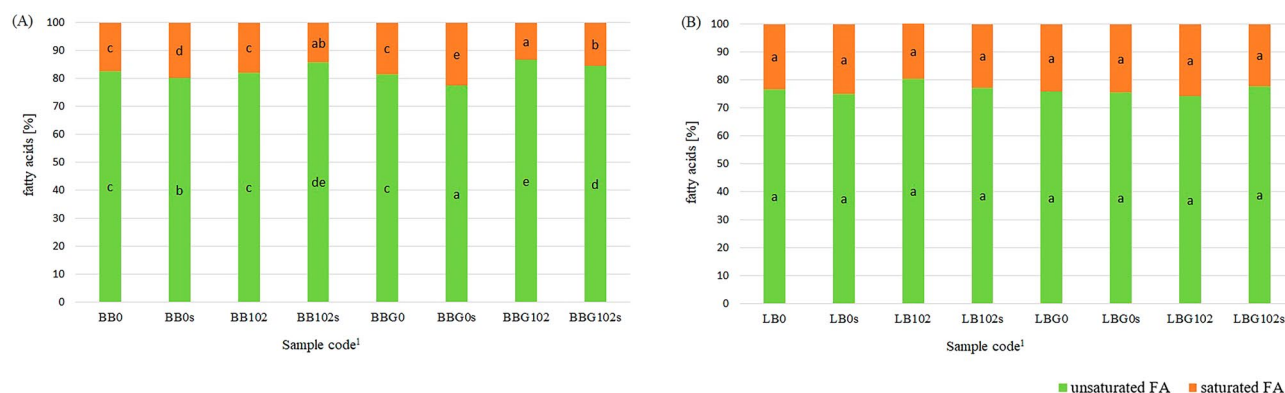


Figure 2. Total share of unsaturated and saturated fatty acids in the tested BBs (A) and LBs (B). ^{a,b,c,d,e}Mean values in the group of FA denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1. All analyses were made in duplicate.

Sample code ¹	Palmitic FA C16:0	Stearic FA C18:0	Oleic FA C18:1 n9-c	Linoleic FA C18:2 n-6c	α -linolenic FA C18:3 n-3c
Bean-based beverages					
BB0	14.45 \pm 0.35 ^c	3.00 \pm 0.00 ^c	12.95 \pm 0.21 ^b	44.00 \pm 0.14 ^d	25.55 \pm 0.35 ^b
BB102	15.65 \pm 0.35 ^{cd}	2.15 \pm 0.07 ^a	13.00 \pm 0.00 ^b	40.70 \pm 0.14 ^a	27.70 \pm 0.14 ^c
BB0s	16.90 \pm 0.42 ^d	2.95 \pm 0.07 ^c	12.10 \pm 0.28 ^a	43.15 \pm 0.49 ^d	24.90 \pm 0.28 ^{ab}
BB102s	11.30 \pm 0.00 ^b	2.50 \pm 0.00 ^b	13.70 \pm 0.00 ^c	41.85 \pm 0.07 ^{abc}	29.25 \pm 0.07 ^d
BBG0	15.15 \pm 0.35 ^c	3.25 \pm 0.07 ^d	12.80 \pm 0.00 ^b	43.75 \pm 0.07 ^d	25.05 \pm 0.21 ^{ab}
BBG102	9.60 \pm 0.14 ^a	2.55 \pm 0.07 ^b	12.75 \pm 0.07 ^b	42.95 \pm 0.07 ^{cd}	29.30 \pm 0.14 ^d
BBG0s	19.40 \pm 0.57 ^d	3.25 \pm 0.07 ^d	11.80 \pm 0.00 ^a	41.25 \pm 0.64 ^{ab}	24.30 \pm 0.00 ^a
BBG102s	11.85 \pm 0.07 ^b	2.50 \pm 0.00 ^b	12.90 \pm 0.00 ^b	41.95 \pm 0.07 ^{bc}	28.45 \pm 0.07 ^c
Statistics ANOVA. η^2 [-]84					
GM	ns	0.613	ns	ns	ns
C	0.550	0.929	0.452	0.306	0.914
S	ns	ns	ns	ns	ns
Lentil-based beverages					
LB0	17.50 \pm 0.84 ^a	5.75 \pm 0.92 ^c	26.15 \pm 0.49 ^d	39.90 \pm 0.71 ^{ab}	10.65 \pm 1.06 ^{ab}
LB102	15.70 \pm 0.99 ^a	2.15 \pm 0.07 ^a	24.70 \pm 0.14 ^{bcd}	42.35 \pm 0.49 ^{abc}	11.05 \pm 0.07 ^b
LB0s	18.40 \pm 0.85 ^a	6.65 \pm 1.06 ^c	25.35 \pm 0.07 ^{cd}	39.20 \pm 1.13 ^a	10.40 \pm 0.85 ^{ab}
LB102s	18.75 \pm 0.92 ^a	1.95 \pm 0.07 ^a	23.20 \pm 0.28 ^{bc}	41.30 \pm 0.57 ^{abc}	11.30 \pm 0.14 ^b
LBG0	19.20 \pm 0.14 ^a	4.75 \pm 1.20 ^{abc}	23.30 \pm 0.71 ^{bc}	43.85 \pm 0.35 ^c	8.80 \pm 0.14 ^a
LBG102	18.45 \pm 0.78 ^a	2.75 \pm 0.07 ^{ab}	19.65 \pm 0.49 ^a	42.35 \pm 0.78 ^{abc}	10.60 \pm 0.14 ^{ab}
LBG0s	19.45 \pm 1.20 ^a	5.10 \pm 0.71 ^{bc}	23.10 \pm 0.00 ^b	43.60 \pm 0.42 ^{bc}	8.75 \pm 0.07 ^a
LBG102s	16.55 \pm 1.46 ^a	2.20 \pm 0.28 ^a	19.35 \pm 1.20 ^a	45.10 \pm 1.12 ^c	11.35 \pm 0.49 ^b
Statistics ANOVA. η^2 [-]					
GM	ns	ns	0.872	0.626	0.426
C	ns	0.843	0.807	ns	0.613
S	ns	ns	ns	ns	ns

Table 4. Fatty acid profile (%) of the tested PBBs. Table shows mean values and standard deviations (SD) range, and statistics ANOVA (η^2 – coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C and S). Other minor fatty acids in the fatty acid profile include 14:0, 15:0, 16:1, 17:0, 17:1, 20:0, 20:1, 20:3 n-3, 22:2, 24:0, 20:5 n-3. *nd* not detected, *ns* non-significant, G germination, C starter culture, S storage period. All analyses were made in duplicate. ^{a,b,c,d}Mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1.

significantly reduced the content of palmitic acid in BBGs and reduced stearic acid content in BBs and BBGs. Germination significantly increased the share of only stearic acid in BBG (from 3.0 to 3.25%).

Both fermentation and germination showed a significant effect on the FA profile of the tested LBs and LBGs. Fermentation with the ABY-3 starter culture significantly reduced the share of stearic acid and oleic acid and increased the share of α -linolenic acid (Table 4). Germination significantly reduced the share of oleic acid and

α -linolenic acid and increased the share of linoleic acid. The refrigerated storage period had no effect on the FA profile of all the tested PBBs.

UFAs dominated the FA profile of the tested PBBs, thus making beans and lentils suitable for nutritional applications. A similar trend of the dominance of UFAs in FA profiles was observed for nonfermented legume-based beverages, including BB^{18,55} and soy-based beverages⁵⁶. In the present study, among the SFAs, only palmitic acid and stearic acid had a significant share, with palmitic acid being the predominant SFA; palmitic acid was also identified in raw beans and lentil seeds^{18,57}. The FA profile in the fats of the legume seeds, however, differs considerably between the legume species and even between their varieties⁵⁸. This is reflected directly by the FA profile of PBBs prepared from them.

During the production of legume-based beverages, it is beneficial to use processes that will contribute to increase the share of n-3 UFAs and/or reduce the share of SFAs in the FA profile. In the tested PBBs, the use of fermentation to modify the FA profile was more efficient than the use of germination. Fermentation using the ABY-3 starter culture significantly increased the share of α -linolenic acid and decreased the share of stearic acid in the FA profile of BBs/BBGs and LBs/LBGs. In all the tested PBBs, a multidirectional modification of the content of the remaining analyzed FAs was also observed. According to Adebo et al.⁵⁹, the observed increase and decrease in these fat-related constituents after fermentation suggest selective lipase activities. While these lipolytic enzymes could have contributed to lipid dissociation and increased the extractability of fat-related constituents, the same enzymes could have also exerted selective reductive activities, perhaps using these fat-related components as carbon sources.

In the tested PBBs, germination mainly influenced the modification of the share of UFAs in the FA profile of LBs and LBGs by reducing the share of oleic and α -linolenic acids. The decrease in FAs could be due to hydrolysis during seed germination, where they were used to produce the necessary energy for biochemical and physico-chemical modifications⁶⁰. A significant modification of the UFAs in the FA profile during germination was also reported in raw lentil seeds^{60,61}.

Positional distribution of FAs in TAGs

The intramolecular structure of TAGs in terms of the position of the FA chain in the glycerol backbone (sn1, sn2, and sn3 positions) influences the digestion and absorption of FAs⁶². Pancreatic lipase, which is responsible for the hydrolysis of TAGs, hydrolyzes the sn1 and sn3 positions of dietary TAGs, thereby producing free FAs and 2-monoglyceride. Structural rearrangement of 2-monoglycerides can occur during digestion, resulting in complete degradation into glycerol and free FAs⁶³. In plants, TAGs are synthesized with structural specificity: SFAs can be found mostly in terminal positions, while UFAs are located at the sn-2 position⁶⁴. There are very few scientific reports on the effect of biotechnological processes on the distribution of FAs in TAGs in food, and these reports are related to the use of lipids in human milk fat substitutes⁶⁵.

Tables 5 and 6 show the positional distribution of sn2 FAs in TAGs and the positional distribution of sn1,3 FAs in TAGs in the tested PBBs, respectively. In all nonfermented PBBs, the highest share of palmitic acid was found at the sn2 position in TAGs. Among UFAs, oleic acid had the largest share of all sn2 FAs. Similarly, in the sn1,3 position in TAGs, PUFAs, i.e., linoleic acid and α -linolenic acid, had the highest share. Fermentation was the main factor that influenced the changes in the distribution of sn2 and sn1,3 FAs in TAGs. The application of fermentation significantly reduced the share of SFAs and monounsaturated fatty acids (MUFAs), increased the share of PUFAs in the sn2 position in TAGs, increased SFAs and MUFAs, and decreased PUFAs in the sn1,3 position in TAGs for BB/BBG/LB102. The exception was LBGs, where the share of PUFAs in the sn2 position in TAGs decreased for linoleic and α -linolenic acids, and consequently, the share of α -linolenic acid in the sn1,3 position in TAGs increased. Moreover, after the fermentation, previously absent stearic acid in BBs and BBGs and myristic acid in LBs and LBGs appeared among the sn2 and sn1,3 FAs in TAGs. The refrigerated storage period had no effect on FA distribution in TAGs in most of the tested PBBs.

To date, it remains unclear how fermentation using complex starter cultures affects the changes in the distribution of FAs in the TAGs of PBBs. Ziarno et al.¹⁸ analyzed the effect of fermentation of BBs on the positional distribution of FAs in TAGs by using monocultures of *Lactobacillus*. After fermentation, the BBs usually showed a lower share of palmitic and stearic acid in the sn2 position. The fermentation also increased the share of oleic acid in the sn2 position as compared to that in BBs obtained from germinated beans. Fermented beverages showed an average higher share of PUFAs (linoleic and α -linolenic acids) than that observed in the nonfermented PBBs. The present study showed similar results for SFAs and PUFAs.

The obtained results indicate that the fermentation of legume-based beverages increases the share of PUFAs in the sn2 position in TAGs and simultaneously increases the share of SFAs and MUFAs in the sn1,3 position in TAGs. This is beneficial from a nutritional point of view, as SFAs and MUFAs will be first hydrolyzed by pancreatic lipase and separated from TAGs. These FAs will be less efficiently absorbed in the intestine because they can react with free calcium ions to form insoluble calcium salts, which are then excreted in the feces⁶⁶. PUFAs located mainly at the sn2 position in TAGs will be mostly absorbed as monoacylglycerols. PUFAs are referred to as dietary essential FAs because humans cannot synthesize these molecules; therefore, they must be supplied with the diet⁶⁷.

Conclusions

The development of legume-based beverages is essential to provide consumers with PBBs with a high nutritional value, particularly those with a protein content similar to milk. Although this segment of PBBs is still poorly researched, previous studies indicate limitations related to their consumption, such as the presence of ANFs or

Sample code ¹	Myristic FA C14:0	Palmitic FA C16:0	Stearic FA C18:0	Oleic FA C18:1 n9-c	Linoleic FA C18:2 n-6c	α -linolenic FA C18:3 n-3c
Bean-based beverages						
BB0	nd	52.66 ± 1.29 ^d	nd	39.42 ± 1.10 ^c	4.62 ± 0.47 ^a	3.30 ± 0.16 ^a
BB102	nd	5.72 ± 0.64 ^a	10.84 ± 0.64 ^a	26.71 ± 1.00 ^b	32.20 ± 0.14 ^d	24.53 ± 1.09 ^d
BB0s	nd	52.25 ± 1.39 ^d	nd	40.33 ± 0.49 ^c	4.40 ± 0.16 ^a	3.02 ± 0.18 ^a
BB102s	nd	20.56 ± 1.46 ^c	39.19 ± 1.36 ^c	21.21 ± 1.09 ^a	11.59 ± 0.47 ^b	7.45 ± 0.55 ^b
BBG0	nd	51.20 ± 1.58 ^d	nd	40.63 ± 1.60 ^c	4.74 ± 0.17 ^a	3.43 ± 0.21 ^a
BBG102	nd	14.55 ± 0.61 ^b	17.43 ± 0.72 ^b	24.72 ± 1.20 ^{ab}	25.50 ± 0.99 ^c	17.80 ± 0.83 ^c
BBG0s	nd	52.55 ± 0.92 ^d	Nd	39.99 ± 1.05 ^c	4.42 ± 0.15 ^a	3.05 ± 0.09 ^a
BBG102s	nd	6.71 ± 0.35 ^a	8.58 ± 0.86 ^a	27.97 ± 1.27 ^b	33.15 ± 1.34 ^d	23.59 ± 0.91 ^d
Statistics ANOVA. η^2 [-]84						
GM	-	ns	ns	ns	ns	ns
C	-	0.958	0.592	0.941	0.782	0.745
S	-	ns	ns	ns	ns	ns
Lentil-based beverages						
LB0	nd	34.10 ± 1.43 ^c	13.60 ± 0.62 ^c	30.80 ± 1.30 ^b	16.20 ± 0.83 ^a	5.30 ± 0.23 ^b
LB102	3.70 ± 0.28 ^a	12.80 ± 0.99 ^a	4.40 ± 0.28 ^a	27.70 ± 1.53 ^{ab}	42.10 ± 1.39 ^d	9.30 ± 0.31 ^d
LB0s	nd	34.44 ± 1.16 ^c	14.19 ± 0.69 ^c	30.53 ± 1.45 ^{ab}	15.93 ± 0.25 ^a	4.93 ± 0.22 ^b
LB102s	6.50 ± 0.42 ^c	19.60 ± 1.13 ^b	6.20 ± 0.47 ^a	26.80 ± 1.06 ^{ab}	33.30 ± 1.13 ^c	7.60 ± 0.18 ^c
LBG0	nd	31.60 ± 1.98 ^c	12.90 ± 0.82 ^c	29.80 ± 0.98 ^{ab}	20.60 ± 0.78 ^b	5.10 ± 0.23 ^b
LBG102	10.90 ± 0.35 ^d	33.10 ± 1.84 ^c	10.10 ± 0.37 ^b	25.50 ± 1.40 ^a	16.80 ± 0.64 ^{ab}	3.60 ± 0.13 ^a
LBG0s	nd	33.63 ± 0.98 ^c	12.69 ± 0.52 ^c	29.33 ± 1.10 ^{ab}	19.47 ± 0.96 ^{ab}	4.88 ± 0.18 ^b
LBG102s	5.40 ± 0.42 ^b	17.50 ± 1.27 ^{ab}	4.60 ± 0.20 ^a	25.40 ± 1.43 ^a	39.40 ± 1.24 ^d	7.70 ± 0.66 ^c
Statistics ANOVA. η^2 [-]						
GM	ns	ns	ns	0.370	ns	ns
C	0.792	0.608	0.819	0.799	0.543	0.372
S	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table 5. Positional distribution of sn2 FA in TAGs (%) in the tested PBBs. Table shows mean values and standard deviations (SD) range, and statistics ANOVA (η^2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C and S). *nd* not detected, *ns* non-significant, *G* germination, *C* starter culture, *S* storage period. All analyses were made in duplicate. ^{a,b,c,d}Mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1.

barriers related to taste and texture. The present study demonstrated that the use of natural biotechnological processes in the production of newly developed beverages made from beans and lentils enables to increase their nutritional properties. The use of germination and fermentation improved the antioxidant properties, modified the oligosaccharide content, and altered the profile and positional distribution of FAs in TAGs of the tested PBBs. Importantly, the tested beverages were a good matrix for the fermentation process using LAB and bifidobacteria, including the probiotic species.

Based on the findings of the present study, we recommend that the designing of innovative legume-based beverages should include the use of fermentation and germination processes that will allow to obtain products that serve as carriers of probiotic bacteria and have improved nutritional properties. Moreover, it is recommended to use multispecies starter cultures containing both LAB and bifidobacteria in the fermentation of legume-based beverages, which enables a more efficient process. These products can directly meet the market demand for high-quality plant products as a substitute for animal products. Future research should focus on analyzing the properties of PBBs derived from other legumes and conducting a broad assessment of their sensory properties, which may be the most important factor limiting the consumption of PBBs by consumers. Moreover, the presented study considered selected health-promoting and functional properties of BBs and LBs as plant products with high nutritional value. These beverages are poorly described in the literature, so we recommend that future research should focus on the analysis of their other properties, in particular the quantity and quality of proteins and amino acids. This will allow for an in-depth analysis of these products also in terms of their suitability as analogues of cow's milk.

Sample code ¹	Myristic FA C14:0	Palmitic FA C16:0	Stearic FA C18:0	Oleic FA C18:1 n9-c	Linoleic FA C18:2 n-6c	α -linolenic FA C18:3 n-3c
Bean-based beverages						
BB0	nd	2.93 ± 0.20 ^a	nd	6.52 ± 0.55 ^a	56.80 ± 1.40 ^d	33.75 ± 0.96 ^{bc}
BB102	nd	21.94 ± 0.85 ^e	2.83 ± 0.18 ^a	12.68 ± 0.99 ^c	34.31 ± 1.10 ^a	28.24 ± 0.91 ^a
BB0s	nd	2.75 ± 0.20 ^a	nd	6.00 ± 0.18 ^a	56.59 ± 1.58 ^d	34.66 ± 0.92 ^c
BB102s	nd	8.35 ± 0.59 ^b	nd	9.79 ± 0.72 ^b	45.40 ± 0.98 ^c	36.41 ± 0.82 ^c
BBG0	nd	3.92 ± 0.48 ^a	nd	6.32 ± 0.47 ^a	56.61 ± 1.44 ^d	33.15 ± 1.00 ^c
BBG102	nd	11.60 ± 0.66 ^c	2.90 ± 0.16 ^a	12.20 ± 0.93 ^{bc}	40.26 ± 1.16 ^b	33.04 ± 0.95 ^{bc}
BBG0s	nd	3.68 ± 0.18 ^a	nd	5.70 ± 0.52 ^a	56.30 ± 1.54 ^d	34.32 ± 0.81 ^{bc}
BBG102s	nd	16.79 ± 0.92 ^d	3.45 ± 0.24 ^b	12.64 ± 0.69 ^c	36.67 ± 0.82 ^{ab}	30.45 ± 0.61 ^{ab}
Statistics ANOVA. η^2 [-]84						
GM	–	ns	0.613	ns	ns	ns
C	–	0.722	0.862	0.917	0.898	ns
S	–	ns	ns	ns	ns	ns
Lentil-based beverages						
LB0	nd	9.20 ± 0.27 ^a	1.90 ± 0.13 ^c	23.80 ± 1.05 ^d	51.80 ± 1.57 ^{cd}	13.30 ± 0.58 ^{bcd}
LB102	3.90 ± 0.17 ^c	12.80 ± 0.79 ^b	3.20 ± 0.14 ^d	28.50 ± 1.27 ^e	42.30 ± 1.19 ^a	9.30 ± 0.54 ^a
LB0s	nd	9.02 ± 0.33 ^a	1.60 ± 0.56 ^{bc}	23.18 ± 0.92 ^{cd}	52.56 ± 0.80 ^{cd}	13.65 ± 0.83 ^{cd}
LB102s	1.90 ± 0.07 ^a	18.30 ± 0.91 ^c	0.20 ± 0.00 ^a	21.40 ± 0.89 ^{bcd}	45.00 ± 1.00 ^{ab}	13.20 ± 0.61 ^{bcd}
LBG0	nd	13.00 ± 0.69 ^b	0.70 ± 0.06 ^{ab}	20.10 ± 0.74 ^{bc}	55.50 ± 1.68 ^d	10.70 ± 0.51 ^{ab}
LBG102	2.50 ± 0.23 ^b	11.10 ± 0.85 ^b	0.90 ± 0.10 ^{ab}	16.20 ± 0.47 ^a	54.10 ± 1.40 ^{cd}	15.20 ± 0.58 ^d
LBG0s	nd	12.52 ± 0.59 ^{ab}	0.53 ± 0.08 ^a	19.37 ± 0.54 ^{ab}	56.45 ± 1.60 ^d	11.14 ± 0.83 ^{abc}
LBG102s	2.30 ± 0.17 ^{ab}	16.10 ± 0.82 ^c	1.00 ± 0.30 ^{abc}	16.60 ± 0.38 ^a	49.80 ± 1.17 ^{bc}	14.20 ± 0.99 ^d
Statistics ANOVA. η^2 [-]						
GM	ns	ns	0.340	0.703	0.703	ns
C	0.898	0.443	ns	ns	0.718	ns
S	ns	ns	0.293	ns	ns	ns

Table 6. Positional distribution of sn1,3 FA in TAGs (%) in the tested PBBs. Table shows mean values and standard deviations (SD) range, and statistics ANOVA (η^2 —coefficient indicating the extent of the effect of factors G, C and S). *ns* non-significant, *G* germination, *C* starter culture, *S* storage period. All analyses were made in duplicate. ^{a,b,c,d,e}Mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). ¹Description as in Table 1.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 17 March 2023; Accepted: 5 October 2023

Published online: 09 October 2023

References

- Gasbarrini, G., Bonvicini, F. & Gramenzi, A. Probiotics history. *J. Clin. Gastroenterol.* **50**, 116–119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697> (2016).
- Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., Stagnari, F. & Galieni, A. Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients* **11**, 421. <https://doi.org/10.3390/nu11020421> (2019).
- Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G., Cui, C. & Ruan, Z. Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Sci. Hum. Wellness* **8**, 203–243. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.003> (2019).
- Miyahira, R. F., Lopes, J. & Antunes, A. E. The use of sprouts to improve the nutritional value of food products: A brief review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **76**, 143–152. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00888-6> (2021).
- Chaturvedi, S. & Chakarborty, S. Review on potential non-dairy synbiotic beverages: A preliminary approach using legumes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **56**, 2068–2077. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14779> (2020).
- Cichońska, P. & Ziarno, M. Legumes and legume-based beverages fermented with lactic acid bacteria as a potential carrier of probiotics and prebiotics. *Microorganisms* **10**, 91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010091> (2021).
- Reyes-Jurado, F. *et al.* Plant-based milk alternatives: Types, processes, benefits, and characteristics. *Food Rev. Int.* <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421> (2021).
- Fructuoso, I. *et al.* An overview on nutritional aspects of plant-based beverages used as substitutes for cow's milk. *Nutrients* **13**, 2650. <https://doi.org/10.3390/nu13082650> (2021).
- Lopes, M. *et al.* Legume beverages from chickpea and lupin, as new milk alternatives. *Foods* **9**, 1458. <https://doi.org/10.3390/foods9101458> (2020).
- Nawaz, M. A., Tan, M., Øiseth, S. & Buckow, R. An emerging segment of functional legume-based beverages: A review. *Food Rev. Int.* **38**, 1064–1102. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1762641> (2022).
- Sakandar, H. A. *et al.* Impact of fermentation on antinutritional factors and protein degradation of legume seeds: A review. *Food Rev. Int.* <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1931300> (2021).

12. Rasika, D. M. *et al.* Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Curr. Opin. Food Sci.* **38**, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.025> (2021).
13. Penha, C. B., De Paola Santos, V., Spornaza, P. & Kurozawa, L. E. Plant-based beverages: Ecofriendly technologies in the production process. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **72**, 102760. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102760> (2021).
14. Ohanenye, I. C., Tsopmo, A., Ejike, C. & Udenigwe, C. C. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends Food Sci. Technol.* **101**, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.003> (2020).
15. Ziarno, M., Zareba, D., Maciejak, M. & Veber, A. L. The impact of dairy starter cultures on selected qualitative properties of functional fermented beverage prepared from germinated White Kidney Beans. *J. Food Nutr. Res.* **2**, 167–176 (2019).
16. Zhao, D. & Shah, N. P. Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk–tea beverage. *Food Chem.* **158**, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.119> (2014).
17. Eggers, L. F. & Schwudke, D. Liquid extraction: Folch. In *Encyclopedia of Lipidomics* (ed. Wenk, M. R.) 1–6 (Springer Science + Business Media, 2016).
18. Ziarno, M., Bryś, J., Parzyszek, M. & Veber, A. Effect of lactic acid bacteria on the lipid profile of bean-based plant substitute of fermented milk. *Microorganisms* **8**, 1348. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091348> (2020).
19. Shafiee, G. *et al.* Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological, characteristics of probiotic fermented milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**, 1265–1274 (2010).
20. Sfakianakis, P. & Tzia, C. Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: A review. *Foods* **3**, 176–193. <https://doi.org/10.3390/foods3010176> (2014).
21. Fazilah, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Rios-Solis, L. & Halim, M. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J. Funct. Foods* **48**, 387–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.039> (2018).
22. Adamberg, S. *et al.* Survival and synergistic growth of mixed cultures of bifidobacteria and lactobacilli combined with prebiotic oligosaccharides in a gastrointestinal tract simulator. *Microb. Ecol.* **25**, 23062. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.23062> (2014).
23. Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes Nutr.* **6**, 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6> (2011).
24. Heller, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 374–379. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.374s> (2001).
25. Sanchez-Chino, X., Jimenez-Martinez, C., Davila-Ortiz, G., Alvarez-Gonzalez, I. & Madrigal-Bujaidar, E. Nutrient and nonnutrient components of legumes, and its chemopreventive activity: A review. *Nutr. Cancer* **67**, 401–410. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004729> (2015).
26. Kannan, U., Sharma, R., Gangola, M. P. & Chibbar, R. N. Improving grain quality in pulses: Strategies to reduce raffinose family oligosaccharides in seeds. *Ekin J. Crop Breed. Genetic.* **4**, 70–88 (2018).
27. Nkhata, S. G., Ayua, E., Kamau, E. H. & Shingrio, J. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Sci. Nutr.* **6**, 2446–2458. <https://doi.org/10.1002/fsn3.846> (2018).
28. Kinnarinen, T., Tuunila, R. & Häkkinen, A. Reduction of the width of particle size distribution to improve pressure filtration properties of slurries. *Miner. Eng.* **102**, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.12.009> (2017).
29. Vishwanathan, K. H., Singh, V. & Subramanian, R. Wet grinding characteristics of soybean for soymilk extraction. *J. Food Eng.* **106**, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.04.002> (2011).
30. Cichońska, P., Domian, E. & Ziarno, M. Application of optical and rheological techniques in quality and storage assessment of the newly developed colloidal-suspension products: Yogurt-type bean-based beverages. *Sensors* **22**, 8348. <https://doi.org/10.3390/s2218348> (2022).
31. Tang, C.-H., Chen, L. & Ma, C.-Y. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *Food Chem.* **113**, 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.038> (2009).
32. Ohanenye, I. C. *et al.* Legume seed protein digestibility as influenced by traditional and emerging physical processing technologies. *Foods* **11**, 2299. <https://doi.org/10.3390/foods11152299> (2022).
33. Zahir, M., Fogliano, V. & Capuano, E. Soybean germination limits the role of cell wall integrity in controlling protein physicochemical changes during cooking and improves protein digestibility. *Food Res. Int.* **143**, 110254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110254> (2021).
34. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phoc. Rev.* **4**, 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902> (2010).
35. Vaz Pato, M. C. *et al.* Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **34**, 105–143. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897907> (2015).
36. Verni, M., Verardo, V. & Rizello, C. G. How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. *Foods* **8**, 362. <https://doi.org/10.3390/foods8090362> (2019).
37. Box, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* **17**, 511–525. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90111-2) (1983).
38. Zhao, Y., Du, S., Wang, H. & Cai, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chem.* **152**, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.006> (2014).
39. Djordjevic, T. M., Šiler-Marinkovic, S. S. & Dimitrijevic-Brankovic, S. I. Antioxidant activity and total phenolic content in some cereals and legumes. *Int. J. Food Prop.* **14**, 175–184. <https://doi.org/10.1080/10942910903160364> (2011).
40. Amiri, S., Moghanjoui, Z. M., Barl, M. R. & Khaneghah, A. M. Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry: An overview of current and future applications. *Ital. J. Food Sci.* **33**, 55–68. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33iS1.2045> (2021).
41. Rahmawati, I. S. & Suntorsuk, W. Effects of fermentation and storage on bioactive activities in milks and yoghurts. *Procedia Chem.* **18**, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.010> (2016).
42. Chaves-López, C. *et al.* Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiol.* **42**, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.005> (2014).
43. Heydari, S., Hosseini, S. E., Mortazavian, A. M. & Taheri, S. Extraction of bioactive peptides produced in probiotic yoghurt and determination of their biological activities. *Int. Dairy J.* **139**, 105544. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105544> (2023).
44. Kebede, M. & Admassu, S. Application of antioxidants in food processing industry: Options to improve the extraction yields and market value of natural products. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci.* **5**, 38–49. <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-5-155> (2019).
45. Jungersen, M. *et al.* The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]. *Microorganisms* **2**, 92–110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092> (2014).
46. Gilad, O., Viborg, A. H., Stuer-Lauridsen, B. & Jacobsen, S. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects. *Proteomics* **11**, 2503–2514. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000716> (2011).
47. Okoń, A., Stadnik, J. & Dolatowski, Z. J. Effect of *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 on proteolytic changes in dry-cured loins. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 633–641. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0076-4> (2017).

48. Bujna, E., Farkas, N. A., Tran, A. M., Dam, M. S. & Nguyen, Q. D. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food Sci. Biotechnol.* **27**, 633–641. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0269-x> (2018).
49. Chon, S. Total polyphenols and bioactivity of seeds and sprouts in several legumes. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6112–6124. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340005> (2013).
50. MinYing, C., Azlan, A., Al-Sheraji, S. H., Hassan, F. A. & Prasad, K. N. Antioxidant activities and total phenolic content in germinated and non-germinated legume extracts following alkaline-acid hydrolysis. *Pak. J. Nutr.* **12**, 1036–1041. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.1036.1041> (2013).
51. Khang, D. T., Dung, T. N., Elzaawely, A. A. & Xuan, T. D. Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. *Foods* **5**, 27. <https://doi.org/10.3390/foods5020027> (2016).
52. Hubert, J., Berger, M., Napveu, F., Paul, F. & Dayde, J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem.* **109**, 709–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.081> (2008).
53. Baum, S. J. *et al.* Fatty acids in cardiovascular health and disease: A comprehensive update. *J. Clin. Lipidol.* **6**, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.04.077> (2012).
54. Kostik, V., Memeti, S. & Bauer, B. Fatty acid composition of edible oils and fats. *JHED* **4**, 112–116 (2013).
55. Aydar, E. F., Metdinc, Z., Demiracan, E., Cetinkaya, S. K. & Ozcelik, B. Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) milk substitute as a novel plant-based drink: Fatty acid profile, antioxidant activity, in-vitro phenolic bio-accessibility and sensory characteristics. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **83**, 103254. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103254> (2023).
56. Martinez-Padilla, E. *et al.* In vitro protein digestibility and fatty acid profile of commercial plant-based milk alternatives. *Foods* **9**, 1784. <https://doi.org/10.3390/foods9121784> (2020).
57. Gharibzahedi, S. M., Mousavi, S. M., Jafari, S. M. & Faraji, K. Proximate composition, mineral content, and fatty acids profile of two varieties of lentil seeds cultivated in Iran. *Chem. Nat. Compd.* **47**, 976–978. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0119-2> (2012).
58. Grela, E. R., Samolińska, W., Kiczorowska, B., Klebaniuk, R. & Kiczorowski, P. Content of minerals and fatty acids and their correlation with phytochemical compounds and antioxidant activity of leguminous seeds. *Biol. Trace Elem. Res.* **180**, 338–348. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1005-3> (2017).
59. Adebo, J. A. *et al.* Fermentation of cereals and legumes: Impact on nutritional constituents and nutrient bioavailability. *Fermentation* **8**, 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020063> (2021).
60. Pal, R. S. *et al.* Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients, anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). *J. Food Sci. Technol.* **54**, 909–920. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2351-4> (2016).
61. Alkaltham, M. S., Özcan, M. M., Uslu, N., Salamatullah, A. M. & Hayat, K. Changes in antioxidant activity, phenolic compounds, fatty acids, and mineral contents of raw, germinated, and boiled lentil seeds. *J. Food Sci.* **87**, 1639–1649. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16099> (2022).
62. Dima, C., Assadpour, E., Dima, S. & Jafari, S. M. Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**, 954–994. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12547> (2020).
63. Golding, M. & Wooster, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.006> (2010).
64. Gerbig, S. & Takats, Z. Analysis of triglycerides in food items by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2186–2192. <https://doi.org/10.1002/rcm.4630> (2010).
65. Zhang, L., Chu, M., Zong, M., Yang, J. & Lou, W. Facile and green production of human milk fat substitute through rhodococcus opacus fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 9368–9376. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03185> (2020).
66. Bryś, J. & Wirkowska, M. Knowledge of the structure of triacylglycerols in designing structured lipids. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* **2**, 86–89 (2010).
67. Lee, J. M., Lee, H., Kang, S. & Park, W. J. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* **8**, 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023> (2016).

Acknowledgements

White kidney beans “Piękny Jaś Karłow” were purchased from Lestello Sp. z o.o., Cmolas, Poland and brown lentils were purchased from Natural Expert, Białystok, Poland. All procedures for using the seeds of the plants have been carried out in accordance with the institutional, national, and international guidelines and laws. We would like to thank Paulina Capek, Iwona Puton, Karolina Szczurowska and Katarzyna Czarniak for their participation in laboratory analyses.

Author contributions

Conceptualization, P.C. and M.Z.; methodology, P.C., J.B. and M.Z.; data curation, P.C.; formal analysis, P.C., J.B. and M.Z.; investigation, P.C. and J.B.; writing—original draft preparation P.C.; writing—review & editing, J.B. and M.Z.; validation, P.C.; project administration, P.C.; Supervision, M.Z. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44239-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Warszawa, 10.09.2024

Patrycja Malinowska (z d. Cichońska)
patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Bryś, J., Ziarno, M., 2023, Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages, Scientific Reports, 13, 16976 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zainicjowaniu wykonania badań, opracowaniu koncepcji pracy, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badania, analizie i przechowywaniu danych, napisaniu publikacji, walidacji, administracji projektu i pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Patrycja Malinowska

Warszawa, 18.04.2024

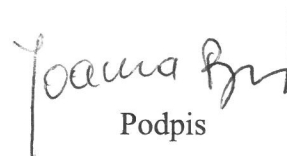
Joanna Bryś
joanna_brys@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**

**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Bryś, J., Ziarno, M., 2023, Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages, Scientific Reports, 13, 16976 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na częściowym opracowaniu metodologii, wsparciu w przeprowadzeniu badań, częściowej analizie danych, recenzji i edycji publikacji.


Podpis

Warszawa, 18.04.2024

Małgorzata Ziarno
malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska, P., Bryś, J., Ziarno, M., 2023, Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages, Scientific Reports, 13, 16976 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu w opracowaniu koncepcji pracy, częściowym opracowaniu metodologii i danych, recenzji i edycji publikacji, nadzorze nad realizacją projektu.

Podpis





Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Enhancing the sensory and nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages through fermentation and germination

Patrycja Cichońska^{a,*}, Eliza Kostyra^b, Anna Piotrowska^b, Iwona Ścibisz^a, Marek Roszko^c, Małgorzata Ziarno^a

^a Department of Food Technology and Assessment, Institute of Food Science, Warsaw University of Life Sciences—SGGW (WULS-SGGW), Warsaw, Poland

^b Department of Functional and Organic Food, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences—SGGW (WULS-SGGW), Warsaw, Poland

^c Department of Food Safety and Chemical Analysis, Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Fermentation
Lactic acid bacteria
Germination
Sensory quality
Milk substitutes

ABSTRACT

This study investigates the potential of using fermentation and germination can alter the nutritional and sensory properties of bean-based beverages (BBs) and lentil-based beverages (LBs). The research examines the impact on B vitamins, dietary fiber, glycemic index (GI), isoflavones, and volatile compounds. In addition, the influence of germination, fermentation, and the addition of raspberry–cranberry pulp on the sensory properties was investigated. Germination was found to increase the levels of specific B vitamins, isoflavones, and dietary fiber while decreasing the GI. The microorganisms involved in fermentation showed the ability to synthesize thiamine, riboflavin, and pyridoxine. However, the changes in volatile compounds due to fermentation had a negative impact on the sensory quality of the beverages. The study suggests that the sensory quality of BBs and LBs could be enhanced by incorporating raspberry–cranberry pulp. Although germination and fermentation improved the nutritional properties of the beverages, the study highlights the need for further research to enhance their sensory quality.

1. Introduction

In today's society, consumers are increasingly focused on improving their health, leading to the rising popularity of plant-based diets. Studies suggest that such diets can positively impact longevity by preventing metabolic diseases and modulating the gut microbiome (Herlich et al., 2022). This trend has led to a rising demand for plant-based products that offer highly bioavailable nutrients to consumers (Henchion et al., 2017). One of the fastest-growing segments in this market is plant-based milk substitutes, also known as plant-based beverages (PBBs). Soy beverages, due to their high nutritional value, closely resemble the nutritional profile of cow's milk. However, concerns about environmental impact and health issues associated with soy have created a need for alternative PBBs that mimic the nutritional value of cow's milk (Lopes et al., 2020). Research suggests that other legumes have the potential to produce nutritionally rich PBBs (Nawaz et al., 2022).

Despite the nutritional benefits of legumes, their consumption faces challenges such as beany off-flavor, poor digestibility, and cooking

requirements (Rajhi et al., 2022). In the plant-based beverage (PBB) market, challenges related to the consumption of these products include beany or painty off-flavors caused by lipoxygenase activity and a chalky mouthfeel due to insoluble large particles (Aydar et al., 2020). Previous research suggests that various technological processes, including heating, germination, extrusion, fermentation, milling, and enzymatic treatment, may help mitigate off-flavors in legume seeds (Rajhi et al., 2022; Trindler et al., 2022). Techniques such as germination and fermentation are particularly promising, as they not only enhance the sensory profile of legumes but also alter their nutritional value by activating endogenous and microbial enzymes, increasing nutrient availability (Nkhata et al., 2018). Blending legumes or legume-based beverages with fruit products has been suggested as an effective way to mask the bean flavors (Kale et al., 2011; Nawaz et al., 2022).

So far, there have been few publications in the literature regarding the properties of legume-based beverages other than those made from soy. Promising raw materials for the production of these types of PBBs are beans and lentils, which are characterized by a high content of

* Corresponding author.

E-mail addresses: patrycja_cichonska@sggw.edu.pl (P. Cichońska), eliza_kostyra@sggw.edu.pl (E. Kostyra), anna_piotrowska@sggw.edu.pl (A. Piotrowska), iwona_scibisz@sggw.edu.pl (I. Ścibisz), marek.roszko@ibprs.pl (M. Roszko), malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl (M. Ziarno).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116140>

Received 20 December 2023; Received in revised form 7 April 2024; Accepted 26 April 2024

Available online 26 April 2024

0023-6438/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

protein, fiber, vitamins, minerals, and bioactive ingredients (Hall et al., 2016). However, there are no reports on methods for improving the properties of these products to increase their nutritional value and sensory desirability, which could help to overcome barriers to their consumption. Therefore, this paper aims to present the possibilities of enhancing the sensory and nutritional properties of bean-based beverages (BBs) and lentil-based beverages (LBs) through fermentation and germination.

The effects of these processes on the content of B vitamins by high-performance liquid chromatography (HPLC), dietary fiber by AOAC 991.43:1994 method, glycemic index (GI) by in vitro method, isoflavones by HPLC, and volatile compounds using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) have been evaluated. The influence of germination, fermentation, and the addition of raspberry–cranberry pulp on the sensory characteristics of the tested PBBs using Quantitative Descriptive Analysis (QDA) was also examined.

2. Materials and methods

2.1. Materials and experimental design

The study involved plant-based beverages (PBBs) made from “Piękny Jaś Karlowy” white kidney beans (Lestello Sp. z o.o., Cmolas, Poland) and brown lentils (Natural Expert, Białystok, Poland). These PBBs were subjected to fermentation using two types of industrial freeze-dried starter cultures: Beugel Soja 1 (Ets Coquard, Villefranche-sur-Saône, France), containing *Lactobacillus casei* (now classified as *Lactocaseibacillus casei*), *Streptococcus thermophilus*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; and ABY-3 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark), consisting of *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *S. thermophilus*, and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Additionally, samples of the base PBBs were prepared by adding raspberry–cranberry pulp (Eurohansa, Toruń, Poland).

Various beverages were prepared for analyzing B vitamins, dietary fiber, glycemic index (GI), isoflavones, and volatile compounds in their base form (BB, LB), from germinated beans and lentils (BBG/LBG) and fermented with two different starter cultures—Beugel Soja 1 (BS1) and ABY-3 (ABY3). The experimental design used in this study was based on two main factors—germination and the starter culture used for fermentation. For sensory analysis, PBBs were prepared in their base form (BB, LB), fermented with the ABY-3 starter culture (BB + ABY3, LB + ABY3), germinated (BBG, LBG), and with the addition of raspberry–cranberry pulp (BB + Fruit, LB + Fruit). The codes for the different beverage types evaluated are explained in Table 1. Supplementary Table S2, available online, presents the physicochemical characteristics of the basic PBBs.

Table 1
The explanation of the sample codes for tested PBBs.

Sample code	Germination	Fermentation/ starter culture	The addition of raspberry-cranberry pulp
BB/LB	–	–	–
BB + BS1/LB + BS1	–	Beugel Soja 1	–
BB + ABY3102/ LB + ABY3102	–	ABY-3	–
BBG/LBG	+	–	–
BBG + BS1/LBG + BS1	+	Beugel Soja 1	–
BBG + ABY3/LBG + ABY3	+	ABY-3	–
BB + Fruit	–	–	+
LB + Fruit	–	–	+

2.2. Preparation and fermentation of PBBs

PBBs were prepared using germinated and nongerminated beans and lentils following the method outlined by Cichońska et al. (2023) without any modifications. Additionally, beverages containing raspberry–cranberry pulp were created by adding 15% fruit pulp to BB and LB. For the fermentation of PBBs, inoculums were prepared by dissolving the freeze-dried starter cultures in a sterile saline solution. PBBs were inoculated with 1.0% (by mass) starter cultures, resulting in a final cell density of approximately 6–7 log CFU/mL, and then incubated at 45 °C for 6 h.

2.3. Analysis of B vitamins

The vitamin B content was assessed using HPLC coupled with a UV-VIS detector. The samples were prepared following the method described by Agostini-Costa et al. (2007) without any modifications. An HPLC kit equipped with DeltaChrom™ pumps, an S6020 needle injection valve dosing loop (Sykam, Fürstfeldbruck, Germany), a DeltaChrom™ temperature control unit column temperature controller (Sykam), and a C18 Cosmosil column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm; Cosmosil, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) was used to separate the analytes. These analytes were detected using an S3210 UV-VIS detector (Sykam) at a wavelength of 220 nm. The mobile phase used was a mixture of 50 mM K₂HPO₄ (pH = 7) and methanol (Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA) in a ratio of 99:1. Sample solutions of 0.01 mL were injected into the system using a microsyringe. Each sample underwent a 30-min analysis. The B vitamins were identified by comparing their retention times to vitamin standards, which included thiamine, riboflavin, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, biotin, folate, and cyanocobalamin (Sigma-Aldrich, Burlington, VT, USA).

2.4. Analysis of isoflavones

The isoflavone content analysis was conducted using an HPLC method following the procedure outlined by da Costa César et al., (2006) with some modifications. Initially, 25 g of the beverage samples were frozen at –40 °C using a ProfiMaster PMU0452 shock freezer (GmbH, Germany) and then subjected to freeze-drying for 48 h at 20 °C and 0.947 mbar pressure using Alpha 1–4 LSCplus (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). Subsequently, 2 g of the resulting lyophilizate was mixed with a solution of 80% ethyl alcohol (RCI LAB-SCAN, Bangkok, Thailand) containing 3 M HCl (Merck, Darmstadt, Germany). This mixture underwent intense mixing, followed by a 5-min ultrasonic bath treatment at 30 °C (Ultrasonic Bath, SW 3H, Sonoswiss AG, Switzerland) and incubation at 80 °C for 1 h. After the incubation period, the samples were cooled and centrifuged at 4 °C and 16,000×g for 10 min using the MPW-350R centrifuge (MPW MED. INSTRUMENTS, Warsaw, Poland). The resulting supernatant was transferred to a 25 mL flask and topped up to the mark with ethanol solution. Before HPLC analysis, these solutions were filtered using a syringe filter with a pore size of 0.45 μm (Merck, Darmstadt, Germany).

The HPLC analysis was conducted using a Shimadzu Prominence HPLC system (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) equipped with a diode array detector (SPD M20A), a pump (LC-20AD), a degasser (DGU-20A5R), an autosampler (SIL-20A HT), and the data collection was managed by the LCsolution software. A Luna C18 RP (5 μm) 250 × 4.6 mm column was employed. The eluent, a mixture of 0.1% acetic acid and methanol in a ratio of 520:480 v/v was delivered at a flow rate of 1.0 mL/min. The analysis was conducted using an isocratic method at 30 °C and a detection wavelength of 260 nm. Daidzein, genistein, and glycitein were identified based on their retention time compared with the standard solutions. The results are presented in mg/100 g of lyophilizate.

2.5. Analysis of dietary fiber content

The soluble and insoluble fiber content of the tested PBBs was analyzed using the AOAC 991.43:1994 method.

2.6. Determination of the GI in vitro

The analysis of the GI was conducted based on U.S. Pat. 2009/0004642 A1 by [Magaletta and DiCataldo \(2009\)](#) with some modifications. Briefly, a sample equivalent of 0.50 g of available carbohydrates (25.0 g for BB and 15.0 g for LB) was measured into 250 mL Schott bottles. Then, 150 mg of Kreon Travix (Abbott products GMBH, Warsaw, Poland) enzyme mixture, consisting of pancreatin enzymes with 10,000 IU lipase activity, 8000 IU amylase activity, and 600 IU protease activity, was added. The pH of the mixture was adjusted to 2.5 with 0.01 M HCl. The mixture was shaken in a 37 °C water bath (175 strokes/min) for 30 min. Subsequently, the pH was adjusted to 6 with 0.01 M NaOH, and an additional 150 mg of the enzyme mixture was added. The samples were shaken in a 37 °C water bath (175 strokes/min) for 20 min. Following this, the samples were immediately transferred to falcon tubes, and a ratio of 1:1 of 80% methanol (Avantor Performance Materials Poland) was added to halt the digestion reaction. The samples were mixed, placed in an ultrasonic bath at 30 °C for 30 min, and then centrifuged in the MPW-350R centrifuge (MPW MED. INSTRUMENTS) at 4 °C and 16,000×g for 30 min. Then the supernatant was filtered through a syringe filter with a pore size of 0.45 µm (Merck) and analyzed using HPLC as detailed above. The in vitro GI of the PBB was calculated using the following equation:

$$GI = 63.080214 - 0.974313 \text{ Protein}(\%) - 0.67442 \text{ Fat}(\%) + 367.97478 \text{ Glucose}(\%) - 452.5341 \text{ Fructose}(\%) - 191.8138 \text{ Lactose}(\%) - 437.3615 \text{ Galactose}(\%) - 298.0102 \text{ Maltitol}(\%)$$

Lactose, galactose, and maltitol were excluded from the calculations since they are not present in beans and lentils. The calculations were based on the protein, fat, glucose, and fructose content of the tested PBBs, which are detailed in [Supplementary Tables S1 and S2](#) online.

2.7. Analysis of volatile compounds

The analysis of volatile compounds in the PBBs was conducted using GC/MS following the method of [Sokołowska, Połaska, Dekowska Woźniak, & Roszko \(2020\)](#) with some modifications. Samples were extracted and introduced into the GC instrument using a CombiPal auto-sampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Five grams of the sample were placed in a 20 mL glass auto-sampler vial, mixed with 1 g of sodium chloride, and sealed with Teflonscrew caps. The samples were then conditioned at 50 °C for 10 min. Headspace extraction was carried out for 30 min using solid-phase microextraction (SPME) fibers coated with 50/30 mm-thick divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane films. The SPME fibers were conditioned at 270 °C for 60 min in the GC injector port before usage. Desorption of the fibers was performed for 10 min at the injector port operating at 260 °C in splitless mode. Analysis was conducted using an Agilent 5975 C/6890 GC/MS instrument (Santa Clara, CA, USA) with a ZB-WAX fused-silica capillary column (60 m × 0.25 mm id × 0.25 mm film thickness) for chromatographic separation. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL/min. The oven temperature was initially held at 40 °C for 6 min, then ramped at 4 °C/min to 150 °C, followed by a further ramp at 20 °C/min to 250 °C, and maintained for 15 min. Samples were analyzed in triplicates, and urethane was used as an internal standard. Pure authentic standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for the calibration of quantified compounds. Results were expressed as the relative peak area of individual quantified peaks.

2.8. Sensory analysis

The sensory characteristics of the PBBs were assessed using QDA following the guidelines of PN-EN ISO 13299:2016. Thirty-two descriptors were selected and defined specifically for the profiling procedure. The intensity of the attributes in the PBBs was measured on a linear scale ranging from 0 to 10 cm. The visual appearance, odor, consistency, flavor attributes, and overall sensory quality were assessed. Each sample was analyzed in two independent replicates, and the results were the average of 18 evaluations.

Panel and testing conditions: The sensory tests were conducted by a specially trained sensory panel consisting of nine members who were qualified experts according to PN-EN ISO 8586:2014–03. The panelists had prior experience with sensory procedures and conducting assessments using QDA. The evaluations took place in the Laboratory of Sensory Analysis of the Institute of Human Nutrition Sciences at Warsaw University of Life Sciences. The sensory evaluation was conducted with the approval of the Rector's Commission for Ethics in Scientific Research Involving Human Subjects at Warsaw University of Life Sciences (resolution no. 12/RKE/2023/U). The laboratory meets the requirements for sensory laboratories according to PN-EN ISO 8589:2010/A1:2014–07. It is equipped with individual booths and a computerized system for data acquisition and processing system ANALSENS.

For sample preparation and presentation, each assessor received 30 mL of a PBB in plastic beakers (150 mL), covered with a lid to allow the aroma to be assessed. The samples were coded individually and presented in random order to avoid carry-over effects. Still, water was provided as a factor to neutralize the taste of the samples.

2.9. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess the impact of germination and fermentation on B vitamins, dietary fiber, Glycemic Index (GI), isoflavones, and volatile compounds. The analysis was performed using Statistica 13.1 software (StatSoft, Krakow, Poland). The significance of the differences was determined using Tukey's test at $\alpha = 0.05$. For the sensory analysis results, XLSTAT 2021 software (Addinsoft, Paris, France) was used. Principal Component Analysis (PCA) was utilized to identify similarities and differences in the sensory characteristics of the beverages.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of B vitamins

The study observed that LB exhibited a higher content of biotin, riboflavin, niacin, pyridoxine, and folate compared to BB ([Table 2](#)). Germination emerged as the primary factor augmenting biotin, niacin, and pantothenic acid while reducing folate content. Fermentation notably resulted in over a 3-fold and 11-fold increase in thiamine content, a more than 150-fold and 2-fold increase in riboflavin content, and a more than 3-fold and 2-fold increase in pyridoxine content in non-germinated BB and LB, respectively.

Legumes serve as a natural source of B vitamins, including riboflavin, thiamine, niacin, pyridoxine, and folate ([Rebello et al., 2014](#)). However, their content in food products can be naturally altered through biotechnological processes like fermentation and germination ([Singh et al., 2015](#)). Analysis of the results demonstrated that a 250 mL serving of fermented and germinated beverages (BBG + BS1/ABY3100/102 and LBG + BS1/ABY3) meets the Recommended Daily Allowance (RDA) for a healthy adult regarding biotin, with an RDA of 30 µg ([Kennedy, 2016](#)). In our study, we observed that germination played a significant role in elevating the levels of biotin, niacin, and pantothenic acid. The increase in B vitamin content during germination is attributed to their endogenous synthesis, which supports seedling development and growth ([Lemmens et al., 2019](#)). However, this study also observed a notable

Table 2

Vitamins B content in tested PBBs: Mean Values, Standard Deviations (SD), and ANOVA Statistics (ANOVA statistics includes the η^2 coefficient, which indicates the magnitude of the extent of the effect of germination and starter culture).

Sample code ^a	vitamin content [mg/100 g]							
	B1	B2	B3	B5	B6	B7	B9	B12
Bean-based beverages								
BB	0.044 ± 0.002 ^a	nd	0.091 ± 0.004 ^a	0.004 ± 0.000 ^a	0.033 ± 0.008 ^b	0.029 ± 0.006 ^a	0.165 ± 0.026 ^a	0.015 ± 0.001 ^b
BB + BS1	0.133 ± 0.001 ^b	0.283 ± 0.037 ^c	0.267 ± 0.008 ^{bc}	0.010 ± 0.002 ^a	0.102 ± 0.011 ^d	0.035 ± 0.002 ^a	0.151 ± 0.020 ^a	nd
BB + ABY3	0.134 ± 0.041 ^b	0.156 ± 0.015 ^{ab}	0.251 ± 0.007 ^b	0.016 ± 0.004 ^{ab}	0.193 ± 0.008 ^e	0.039 ± 0.006 ^a	nd	0.002 ± 0.000 ^a
Lentil-based beverages								
LB	0.029 ± 0.008 ^a	0.022 ± 0.00 ^a	0.147 ± 0.027 ^a	0.019 ± 0.003 ^a	0.012 ± 0.004 ^{ab}	0.034 ± 0.008 ^a	0.342 ± 0.002 ^d	0.007 ± 0.000 ^a
LB + BS1	0.312 ± 0.009 ^{cd}	0.055 ± 0.012 ^c	0.152 ± 0.008 ^a	0.035 ± 0.007 ^a	0.025 ± 0.004 ^{bc}	0.037 ± 0.002 ^a	0.095 ± 0.015 ^c	0.010 ± 0.000 ^a
LB + ABY3	0.340 ± 0.034 ^{cd}	0.028 ± 0.001 ^{ab}	0.153 ± 0.001 ^a	0.022 ± 0.001 ^a	0.045 ± 0.002 ^d	0.046 ± 0.005 ^{ab}	0.018 ± 0.002 ^{ab}	0.019 ± 0.001 ^{bc}
LBG	0.180 ± 0.018 ^b	0.031 ± 0.003 ^{ab}	0.178 ± 0.001 ^a	0.035 ± 0.006 ^a	0.009 ± 0.001 ^a	0.068 ± 0.003 ^{bc}	0.048 ± 0.012 ^{bc}	0.009 ± 0.002 ^a
LBG + BS1	0.222 ± 0.061 ^{bc}	0.045 ± 0.002 ^{bc}	0.178 ± 0.002 ^a	0.075 ± 0.011 ^b	0.029 ± 0.006 ^c	0.078 ± 0.008 ^c	0.038 ± 0.011 ^{ab}	0.010 ± 0.002 ^{ab}
LBG + ABY3	0.373 ± 0.003 ^d	0.038 ± 0.001 ^{abc}	0.189 ± 0.008 ^a	0.110 ± 0.014 ^c	0.016 ± 0.002 ^{abc}	0.086 ± 0.001 ^c	nd	0.010 ± 0.004 ^{ab}
Statistics ANOVA. η^2 [-]								
Germination	ns	0.512	0.723	0.903	ns	0.932	0.650	ns
Starter culture	0.886	0.960	ns	ns	0.575	ns	ns	ns
Explanations: nd – not detected; ns – non-significant.								
All analyses were made in triplicate.								
^a , ^b , ^c , ^d , ^e - mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).								
^a Description as in Table 1.								

decrease in thiamine, pyridoxine, and cyanocobalamin content in BBs following germination (Table 2). According to Lemmens et al. (2019), the reduction in certain B vitamins may result from their transfer into the steeping water during germination. Furthermore, B vitamins are also transported to the rootlets and acrospires during this process.

Some strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) possess the ability to synthesize B vitamins using available precursors or by utilizing vitamins present in the raw materials, consequently reducing their content (LeBlanc et al., 2013). In the presented study, fermentation using both starter cultures resulted in an increase in thiamine, riboflavin, and pyridoxine content in nongerminated PBBs (Table 2). Previous studies have also observed augmented thiamine and pyridoxine content in fermented soy beverages (Champagne et al., 2010; Li et al., 2012). While the complete microbial thiamine synthesis pathway has been described solely for *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (Saulnier et al., 2011), extensive research on pyridoxine's most crucial form, pyridoxal-5'-phosphate (PLP), has been conducted in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Rosenberg et al., 2017). Further exploration is essential to deepen our understanding of the mechanisms involved in thiamine and pyridoxine synthesis by various LAB strains. In LAB, the genes responsible for riboflavin synthesis are organized as a single operon with a specific gene order: riboflavin-specific deaminase and reductase (*ribG*), riboflavin synthase alpha subunit (*rib*), a bifunctional enzyme involving the formation of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate from ribulose 5-phosphate (*ribA*), and riboflavin synthase beta subunit (*ribH*) (Capozzi et al., 2012). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, present in both starter cultures used in this study, contains the entire *rib* operon, enabling it to synthesize vitamin B2 (riboflavin) and likely contributing to the increase observed in fermented PBBs. However, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* is unable to synthesize folates and relies on external sources for growth (Hugenholtz & Smid, 2002; LeBlanc et al., 2013). This could elucidate the significant reduction in folate content across all samples fermented

in this study.

3.2. Analysis of isoflavones

In our study, all of the tested isoflavones aglycones were detected in BBs, with daidzein and genistein present in the highest amounts (Fig. 1). In LBs, only genistein was found, albeit in over 100 times lower concentration compared to BBs. The limited content of isoflavones in dry lentil seeds has been previously noted (Budryn et al., 2019). Germination significantly increased daidzein ($\eta^2 = 0.995$) and genistein ($\eta^2 = 0.998$) content in BBs, as well as genistein ($\eta^2 = 0.990$) in LBs. Regarding glycitein in BBs, germination led to a reduction in its content ($\eta^2 = 0.939$). Fermentation significantly increased the content of daidzein ($\eta^2 = 0.977$) and genistein ($\eta^2 = 0.997$) in BBs, as well as genistein ($\eta^2 = 0.654$) in LBs. Notably, the ABY-3 starter culture (BB/LB + ABY3, BB/LBG + ABY3) showed a more pronounced effect in elevating daidzein and genistein content in PBBs compared to the Beaugel Soja 1 starter culture (BB/LB + BS1, BB/LBG + BS1). The ABY-3's greater microbial diversity, owing to the presence of bifidobacteria, potentially accounts for this difference compared to Beaugel Soja 1.

Isoflavones, bioactive compounds primarily found in legumes like soybeans, possess mildly estrogenic properties and are associated with various health benefits. These benefits include alleviating menopausal symptoms, reducing the risk of breast and prostate cancer, and preventing cardiovascular diseases, osteoporosis, and diabetes (Zaheer & Akhtar, 2017). Until now, the effect of germination and fermentation on isoflavone content in PBBs has not been extensively explored, although similar studies have examined these processes in dry legumes. Previous research by various authors has demonstrated an increase in the content of aglycones and glucoside of daidzein and genistein in germinated soybean seeds (Yoshiara et al., 2018; Zhu et al., 2005). The rise in these components during germination is suggested to be influenced by the

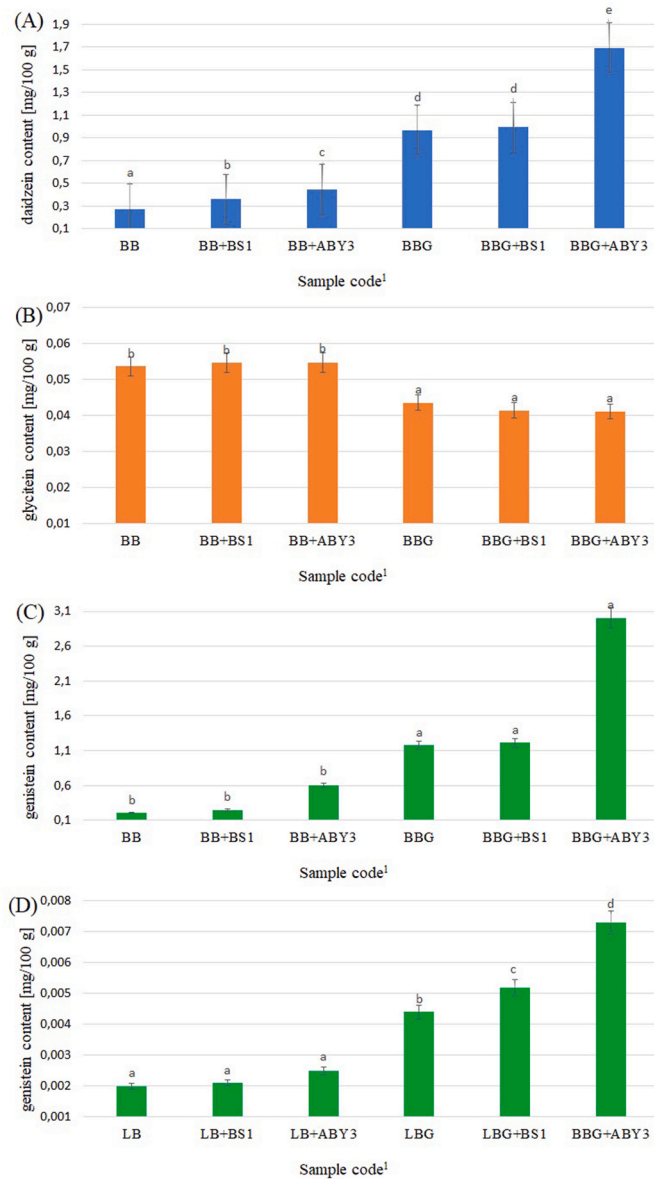


Fig. 1. Isoflavones content in tested PBBs: daidzein in BBs (A), glycitein in BBs (B), and genistein in BBs (C) and LBs (D).

a, b, c, d, e - mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

¹ Description as in Table 1.

All analyses were made in triplicate.

metabolic pathways of naringenin chalcone and isoliquiritigenin, which serve as precursors of isoflavonoids (Zhu et al., 2005). Our study observed a significant decrease in glycitein content after germination. This reduction might be linked to the action of β -glucosidase, an enzyme catalyzing the hydrolysis of isoflavones. This enzymatic action could depend on enzyme concentration, temperature, and pH of the medium (Yoshiara et al., 2018). The increase in isoflavone content after fermentation, as observed in our study, could be attributed to the activity of glucosidases produced by microorganisms in the starter cultures. These enzymes catalyze the hydrolysis of isoflavone β -glucosides, leading to a higher concentration of their respective bioactive aglycones (Budryn et al., 2019).

3.3. Analysis of dietary fiber content

Analysis of soluble and insoluble fiber content in the tested PBBs revealed that the base BBs had more than twice the fiber content compared to LBs (1.3 g/100 g for BB and 0.6 g/100 g for LB) (Fig. 2). Germination was the only factor significantly influencing the results, leading to a substantial increase in fiber content in both BBs ($\eta^2 = 0.738$) and LBs ($\eta^2 = 0.604$). The obtained PBBs can be considered health-promoting products, as the fiber content per 250 mL serving exceeds 1.5 g in both germinated and non-germinated beverages (2.25–4.0 g/250 mL for BBs and 1.5–2.75 g/250 mL for LBs) (Craig & Fresán, 2021).

Legumes are rich in dietary fiber, containing approximately 21–47 g/100 g, making them an excellent source of this essential nutrient in the diet (Trinidad et al., 2010). Researchers are actively exploring the creation of new legume-based milk substitutes enriched with dietary fiber (Sethi et al., 2016). While the impact of germination on the fiber content in PBBs has not been extensively studied by other authors, similar relationships as in this study have been observed during the germination of raw legumes such as soybean (Megat Rusydi et al., 2011), cowpea, lentils, and chickpeas (Ghavidel & Prakash, 2007). Authors indicate that the effect of germination on fiber content varies based on the legume type and occurs during the soaking phase before actual germination (Megat Rusydi et al., 2011). The increase in fiber content in this phase is mainly influenced by polysaccharides with various degrees of solubility (e.g. hemicellulose, pectin, and cellulose), which are found in the cotyledon cell walls. During the initial germination phase, these polysaccharides are hydrated, their availability increases, and consequently the total fiber content increases (Njoui et al., 2019).

In this study, no significant effect of fermentation on the content of soluble and insoluble fiber was observed in legume-based beverages. Similar findings were reported by other researchers analyzing changes in fiber content during the fermentation of various legume-based beverages with different bacterial cultures. For instance, investigations on *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 with LBs (Verni et al., 2020), *Lactobacillus plantarum* with green peas, lentils, and soy flour (Byanju et al., 2021), as well as *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* with lupine and soybeans (Kaczmaraska et al., 2017) yielded similar results, showing minimal impact or no change in fiber content during fermentation.

3.4. Determination of the GI in vitro

In this study, all tested PBB samples fell within values between 60.19 and 60.70 for BBs and 60.82–61.29 for LBs (Fig. 2). Germination significantly reduced the GI of both BBs ($\eta^2 = 0.994$) and LBs ($\eta^2 = 0.921$). Fermentation did not display a noticeable impact on the results. Foods are categorized based on their GI value, with high-GI foods (>70, i.e. foods having carbohydrates that are digested, absorbed, and metabolized quickly), intermediate-GI foods (>55 to <70), and low-GI foods (<55, i.e., foods digested, absorbed and metabolized slowly) (Augustin et al., 2015). Normally, legumes have an average GI of 34, categorizing them as predominantly low-GI foods (Atkinson et al., 2021). However, in this study, the processing of legumes to create PBBs increased their GI due to an increased availability of easily digestible carbohydrates.

The reduction in GI observed in the tested PBBs following germination could be attributed to a concurrent increase in their fiber content, as indicated in Fig. 2. Additionally, our previous study highlighted a significant decrease in glucose content in the tested PBBs after germination, from 6.53 mg/kg for BB to 2.58 mg/kg for BBG, and from 12.49 mg/kg for LB to 8.21 mg/kg for LBG (Cichońska et al., 2023). Both glucose content and the presence of dietary fiber directly influence the GI food (Świeca et al., 2013). In this study, germination significantly decreased the GI of all the PBBs, although it did not shift them to the low-GI food category. However, germination appears to be an intriguing method for enhancing the health-promoting properties of legume-based milk

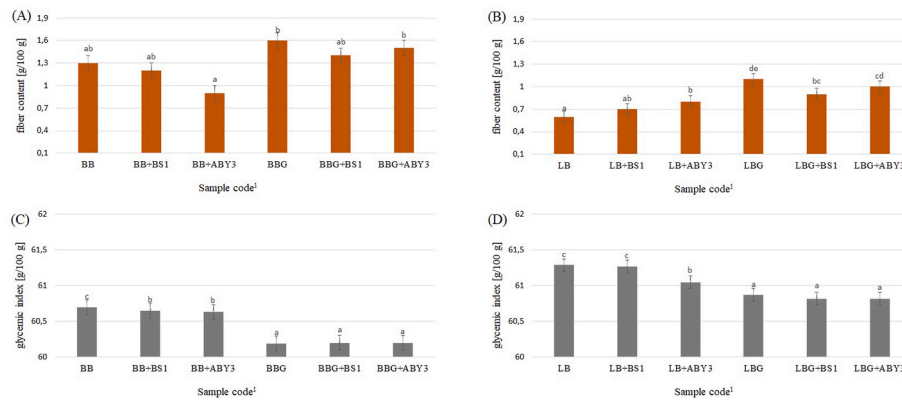


Fig. 2. Fiber content of BBs (A) and LBs (B) and glycemic index of BBs (C) and LBs (D). a, b, c, d, e - mean values in columns denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

¹ Description as in Table 1.

All analyses were made in triplicate.

substitutes. Dietary fiber present in food contributes to increased stomach distension postconsumption, leading to enhanced satiety and slower nutrient absorption (Scazzina et al., 2013). It is essential to note that in this study, GI was estimated *in vitro* theoretically, and future studies should also determine this parameter through *in vivo* studies.

3.5. Analysis of volatile compounds

In the studied legume-based beverages, aldehydes were predominant among the volatile compounds, followed by alcohols, ketones, terpenes, esters, organosulfur compounds, acids, and fatty acids. The distribution of volatile compounds in the tested BBs and LBs can be found in Tables 3 and 4, respectively. In the base BBs (BB), the highest concentrations were identified for 3-furanmethanol, 2-ethylhexanol, 1-hepten-3-one, 1-pentanol, and 2-methylpropanoic acid. In the base LBs (LB), the notable compounds included linalool, esters (butanoic acid, butyl ester, and formic acid, hexyl ester), (E,E)-2,4-nonadienal, and 2-methylpropanoic acid.

The process of germination significantly affected the content of volatile compounds in the tested PBBs (Tables 3 and 4). This process resulted in a considerable increase in the content of two tested alcohols, i.e., 3-methyl-1-butanol (over 25 times for BBG and 116 times for LBG) and ethanol (over five times for BBG and 130 times for LBG) in comparison to nongerminated BBs and LBs. There was also a notable increase in the content of esters (such as butanoic acid, butyl ester, and formic acid, hexyl ester) and fatty acid (2-methylhexanoic acid) in most of the tested samples. Furthermore, for most PBB samples where a significant effect of germination on the content of aldehydes and ketones was demonstrated, a significant increase in these components was observed, particularly for 2-acetylthiazole, (E,E)-2,4-nonadienal, octanal, and 2-methylbutanal. The impact of fermentation on the obtained results was notably significant, yet varied across different types of volatile compounds. In the group of aldehydes, fermentation notably increased their content in most tested BBs and LBs. Fermentation also notably increased the content of selected alcohols, sulfur compounds, esters, fatty acids, and ketones (Tables 3 and 4).

Through the use of sensory and instrumental methods, it is possible to identify the specific components, including volatile compounds, responsible for food attributes (Chambers IV & Koppel, 2013). However, the presence of these compounds in food can be altered due to technological processes. This study noted a significant impact of fermentation on increasing the content of aldehydes, selected alcohols, sulfur compounds, esters, fatty acids, and ketones. This elevated aldehyde content may be the result of lipid oxidation processes and/or chemical reactions catalyzed by active fermentation bacteria. Aldehydes like hexanal, (Z)-2-heptenal, and nonanal are possibly linked to lipid oxidation

processes, generated through the lipoxygenase (LOX) pathway (Lorn et al., 2021). Moreover, the activities of starter cultures can result in the production of octanal during alcoholic fermentation, initiated by the removal of the carboxyl group from pyruvate. Subsequently, ethanol and acetic acid are formed through the actions of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase, respectively, which were observed in this study (Park & Kim, 2021).

Alcohols, sulfur compounds, esters, fatty acids, and ketones can be generated during fermentation via the degradation of amino acids through the Ehrlich pathway and fatty acids degradation (Hazelwood et al., 2008). The presence of aldehydes is often linked with green or grassy aromatics in fruits and vegetables, as well as fatty and citrus notes (Chambers IV & Koppel, 2013). In fermented foods, esters and ketones commonly impart a fruity and creamy aroma, while acids contribute to the food's acidic flavor (Zhang et al., 2023). Applying appropriate technological processes may significantly alter the sensory characteristics of the product, influenced by changes in the aromatic profile. The analysis of the obtained results demonstrated that both germination and fermentation have a multidirectional impact on the volatile compounds of the tested PBBs, significantly influencing the sensory perception of these products.

3.6. Sensory analysis

The sensory characteristics of BBs and LBs are depicted in Tables 5 and 6, respectively. The odor profile among the samples varied substantially, particularly between base (BB/LB) and germinated (BB/LBG) beverages, demonstrating a significantly higher intensity of legume and starch odors compared to fermented ones (BB/LB + ABY3) and beverages with the addition of raspberry–cranberry pulp (BB/LB + Fruit). Interestingly, the germination process appeared to reduce the perception of the legume odor. Fermented PBBs (BB/LB + ABY3) displayed a significantly higher intensity of sour, fermented, alcoholic, and pungent odors than the other samples. On the other hand, BB/LB + Fruit had the most intensely sweet and fruity aroma.

The flavor profile of the tested PBBs showed that BB/LB and BB/LBG had the most pronounced legume flavor. Additionally, BB and BBG were found to have a significantly stronger starch flavor compared to the other BB samples. The vegetable flavor was particularly noticeable in BBG and LB + Fruit. The beverages containing raspberry–cranberry pulp received the highest ratings for overall sensory quality, scoring 5.40 for BB + Fruit and 5.02 for LB + Fruit. Base and germinated PBBs were slightly less favored, whereas the fermented beverages received the lowest overall sensory quality ratings (1.72 for BB + ABY3 and LB + ABY3).

The principal component analysis plot of the similarities and

Table 3

Volatile compounds in tested BBs: Mean Values, Standard Deviations (SD), and ANOVA Statistics (ANOVA statistics includes the η^2 coefficient, which indicates the magnitude of the effect of germination and starter culture).

Constituents	Sample code ^a						Statistics ANOVA. η^2 [-]	
	BB	BB + BS1	BB + ABY3	BBG	BBG + BS1	BBG + ABY3	Germination	Starter culture
Alcohols								
1-butanol	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0005 ± 0.0000 ^a	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0110 ± 0.0012 ^b	0.0143 ± 0.0003 ^c	0.0134 ± 0.0010 ^c	ns	0.983
3-furanmethanol	0.0102 ± 0.0009 ^c	0.0079 ± 0.0007 ^b	0.0061 ± 0.0004 ^a	0.0060 ± 0.0003 ^a	0.0083 ± 0.0003 ^b	0.0062 ± 0.0002 ^a	ns	0.411
2-etyloheksanol	0.0100 ± 0.0004 ^e	0.0066 ± 0.0005 ^d	0.0011 ± 0.0001 ^a	0.0033 ± 0.0001 ^c	0.0014 ± 0.0002 ^a	0.0024 ± 0.0002 ^b	ns	0.595
1-pentanol	0.0051 ± 0.0005 ^a	0.0055 ± 0.0001 ^a	0.0059 ± 0.0005 ^{ab}	0.0076 ± 0.0005 ^c	0.0093 ± 0.0006 ^d	0.0153 ± 0.0018 ^e	0.806	0.663
3-methyl-1-butanol	0.0008 ± 0.0000 ^a	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0067 ± 0.0006 ^b	0.0204 ± 0.0012 ^d	0.0104 ± 0.0004 ^c	0.0317 ± 0.0017 ^e	0.893	0.769
ethanol	0.0022 ± 0.0002 ^a	0.0014 ± 0.0001 ^a	0.0018 ± 0.0001 ^a	0.0124 ± 0.0008 ^{bc}	0.0135 ± 0.0014 ^c	0.0115 ± 0.0007 ^b	0.978	ns
Organosulfur compounds								
Dimethyl disulfide	0.0017 ± 0.0001 ^a	0.0153 ± 0.0010 ^c	0.0093 ± 0.0001 ^b	0.0022 ± 0.0001 ^a	0.0074 ± 0.0003 ^b	0.0088 ± 0.0004 ^b	ns	0.736
Dimethyl trisulfide	nd	0.0177 ± 0.0011 ^d	0.0122 ± 0.0009 ^c	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0012 ± 0.0001 ^a	0.0106 ± 0.0004 ^b	ns	0.630
Terpenes								
Limonene	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0006 ± 0.0001 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0008 ± 0.0000 ^b	0.0042 ± 0.0004 ^d	0.0014 ± 0.0000 ^c	0.689	0.653
Isoeugenol	0.0008 ± 0.0000 ^c	nd	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0003 ± 0.0000 ^b	0.0013 ± 0.0000 ^d	ns	ns
Linalool	0.0001 ± 0.0000 ^a	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0009 ± 0.0001 ^b	0.0030 ± 0.0002 ^c	0.0040 ± 0.0001 ^d	0.792	0.494
Esters								
Butanoic acid, butyl ester	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0009 ± 0.0001 ^a	0.0044 ± 0.0004 ^b	0.0337 ± 0.0023 ^d	0.0174 ± 0.0008 ^c	0.0205 ± 0.0013 ^c	0.876	ns
Formic acid, hexyl ester	0.0033 ± 0.0003 ^a	0.0112 ± 0.0010 ^b	0.0047 ± 0.0002 ^a	0.0033 ± 0.0003 ^a	0.0165 ± 0.0015 ^c	0.0216 ± 0.0019 ^d	0.512	0.640
Fatty acids								
2-methylhexanoic acid	0.0019 ± 0.0001 ^a	0.0045 ± 0.0001 ^b	0.0119 ± 0.0005 ^c	0.0038 ± 0.0002 ^b	0.0117 ± 0.0008 ^c	0.0192 ± 0.0003 ^d	0.817	0.942
Ketones								
2-acetylthiazole	0.0001 ± 0.0000 ^a	nd	0.0007 ± 0.0000 ^b	0.0031 ± 0.0002 ^d	0.0022 ± 0.0001 ^c	0.0019 ± 0.0001 ^c	0.882	ns
Acetoin	nd	0.0413 ± 0.0028 ^b	0.0562 ± 0.0006 ^c	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0718 ± 0.0012 ^d	0.0797 ± 0.0071 ^d	ns	0.947
1-Hepten-3-one	0.0050 ± 0.0003 ^c	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0039 ± 0.0001 ^b	0.0081 ± 0.0005 ^e	nd	0.0059 ± 0.0002 ^d	0.587	0.938
2,3-Pentanedione	0.0006 ± 0.0001 ^a	0.0734 ± 0.0026 ^e	0.0392 ± 0.0007 ^c	0.0005 ± 0.0000 ^a	0.0600 ± 0.0051 ^d	0.0103 ± 0.0005 ^b	0.565	0.951
diacetyl	0.0011 ± 0.0001 ^a	0.0698 ± 0.0046 ^d	0.0471 ± 0.0025 ^{bc}	0.0019 ± 0.0001 ^a	0.0559 ± 0.0055 ^c	0.0438 ± 0.0030 ^b	ns	0.975
Aldehydes								
(E)-2-octenal	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0020 ± 0.0001 ^a	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0003 ± 0.0000 ^b	ns	ns
Nonanal	0.0030 ± 0.0001 ^b	0.0004 ± 0.0000 ^a	0.0046 ± 0.0005 ^{bc}	0.0058 ± 0.0002 ^{cd}	0.0077 ± 0.0005 ^d	0.0219 ± 0.0016 ^e	0.687	0.659
(Z)-2-heptenal	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0004 ± 0.0000 ^a	0.0023 ± 0.0002 ^d	0.0010 ± 0.0001 ^b	0.0019 ± 0.0002 ^c	0.0037 ± 0.0002 ^e	0.922	0.972
Octanal	0.0014 ± 0.0001 ^a	0.0057 ± 0.0003 ^c	0.0030 ± 0.0002 ^b	0.0030 ± 0.0002 ^b	0.0068 ± 0.0004 ^d	0.0107 ± 0.0004 ^e	0.559	0.649
(E,E)-2,4-nonadienal	0.0004 ± 0.0000 ^a	0.0009 ± 0.0000 ^a	0.0049 ± 0.0003 ^b	0.0357 ± 0.0013 ^e	0.0177 ± 0.0006 ^c	0.0206 ± 0.0021 ^d	0.859	ns
hexanal	0.0034 ± 0.0003 ^a	0.0026 ± 0.0000 ^a	0.0263 ± 0.0026 ^c	0.0080 ± 0.0005 ^b	0.0051 ± 0.0003 ^{ab}	0.0253 ± 0.0011 ^c	ns	0.977
pentanal	0.0009 ± 0.0001 ^a	0.0772 ± 0.0054 ^c	0.0051 ± 0.0003 ^b	0.0018 ± 0.0002 ^a	0.0054 ± 0.0006 ^b	0.0046 ± 0.0002 ^b	ns	0.528
2-methylbutanal	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0003 ± 0.0000 ^a	0.0003 ± 0.0000 ^a	0.0027 ± 0.0002 ^c	0.0042 ± 0.0003 ^d	0.0015 ± 0.0000 ^b	0.835	0.488
Acids								
2-methylpropanoic acid	0.0268 ± 0.0015 ^d	0.0116 ± 0.0001 ^c	0.0046 ± 0.0002 ^a	0.0267 ± 0.0006 ^d	0.0065 ± 0.0002 ^{ab}	0.0074 ± 0.0004 ^b	ns	0.966
Acetic acid	0.0170 ± 0.0015 ^a	0.0382 ± 0.0024 ^{ab}	0.2816 ± 0.0262 ^c	0.0363 ± 0.0010 ^{ab}	0.0751 ± 0.0028 ^b	0.4132 ± 0.0337 ^d	ns	0.962

Explanations: nd – not detected; ns – non-significant.

All analyses were made in triplicate.

^{a, b, c, d, e} - mean values in rows denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a Description as in Table 1.

Table 4

Volatile compounds in tested LBs: Mean Values, Standard Deviations (SD), and ANOVA Statistics (ANOVA statistics includes the η^2 coefficient, which indicates the magnitude of the effect of germination and starter culture).

Constituents	Sample code ^a				Statistics ANOVA. η^2 [-]			
	LB	LB + BS1	LB + ABY3	LBG	LBG + BS1	LBG + ABY3	Germination	Starter culture
Alcohols								
1-butanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	–	–
3-furanmethanol	0.0035 ± 0.0001 ^{ab}	0.0056 ± 0.0004 ^{de}	0.0047 ± 0.0003 ^{cd}	0.0033 ± 0.0002 ^a	0.0043 ± 0.0001 ^{bc}	0.0063 ± 0.0005 ^e	ns	0.667
2-etyloheksanol	0.0021 ± 0.0001 ^a	0.0106 ± 0.0006 ^d	0.0026 ± 0.0001 ^{ab}	0.0119 ± 0.0002 ^e	0.0031 ± 0.0001 ^b	0.0060 ± 0.0005 ^c	ns	ns
1-pentanol	0.0015 ± 0.0001 ^a	0.0034 ± 0.0002 ^c	0.0082 ± 0.0006 ^e	0.0006 ± 0.0000 ^a	0.0024 ± 0.0002 ^b	0.0065 ± 0.0005 ^d	0.776	0.986
3-methyl-1-butanol	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0041 ± 0.0004 ^b	0.0060 ± 0.0004 ^c	0.0116 ± 0.0008 ^d	0.056 ± 0.0005 ^c	0.0221 ± 0.0007 ^e	0.715	0.542
ethanol	nd	0.0031 ± 0.0002 ^b	0.0019 ± 0.0001 ^a	0.0133 ± 0.0011 ^c	0.0116 ± 0.0007 ^c	0.0268 ± 0.0011 ^d	0.831	ns
Organosulfur compounds								
Dimethyl disulfide	nd	nd	nd	nd	nd	nd	–	–
Dimethyl trisulfide	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0069 ± 0.0001 ^c	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0019 ± 0.0001 ^b	ns	0.757
Terpenes								
Limonene	0.0027 ± 0.0002 ^{bc}	0.0030 ± 0.0002 ^c	0.0217 ± 0.0021 ^d	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0005 ± 0.0001 ^b	0.0005 ± 0.0001 ^b	0.485	0.477
Isoeugenol	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0009 ± 0.0001 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0045 ± 0.00 ^c	ns	ns
Linalool	0.0070 ± 0.0006 ^{ab}	0.0144 ± 0.0011 ^d	0.0248 ± 0.0024 ^e	0.0052 ± 0.0003 ^a	0.0045 ± 0.0005 ^a	0.0085 ± 0.0001 ^c	0.688	0.665
Esters								
Butanoic acid, butyl ester	0.0062 ± 0.0006 ^c	nd	0.0018 ± 0.0000 ^a	0.0168 ± 0.0016 ^d	0.0036 ± 0.0003 ^b	0.0074 ± 0.0008 ^c	0.807	0.865
Formic acid, hexyl ester	0.0056 ± 0.0004 ^b	0.0160 ± 0.0005 ^c	0.0195 ± 0.0016 ^d	0.0026 ± 0.0002 ^a	0.0047 ± 0.0004 ^{ab}	0.0211 ± 0.0018 ^d	0.366	0.851
Fatty acids								
2-methylhexanoic acid	0.0019 ± 0.0001 ^a	0.0040 ± 0.0002 ^c	0.0063 ± 0.0003 ^d	0.0031 ± 0.0003 ^b	0.0064 ± 0.0004 ^d	0.0163 ± 0.0003 ^e	0.570	0.779
Ketones								
2-acetylthiazole	0.0015 ± 0.0001 ^a	0.0018 ± 0.0000 ^a	0.0015 ± 0.0000 ^a	0.0040 ± 0.0004 ^c	0.0029 ± 0.0002 ^b	0.0058 ± 0.0001 ^d	0.795	ns
Acetoin	nd	0.0327 ± 0.0022 ^a	0.0434 ± 0.0025 ^b	0.0402 ± 0.0034 ^b	0.0287 ± 0.0029 ^a	0.0528 ± 0.0033 ^c	ns	0.596
1-Hepten-3-one	0.0033 ± 0.0002 ^b	0.0061 ± 0.0004 ^c	0.0094 ± 0.0008 ^d	0.0011 ± 0.0001 ^a	0.0018 ± 0.0001 ^a	0.0068 ± 0.0002 ^c	0.886	0.954
2,3-Pentanedione	0.0002 ± 0.0000 ^a	0.0547 ± 0.0038 ^c	0.0314 ± 0.0021 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0032 ± 0.0002 ^a	0.0034 ± 0.0002 ^a	0.609	0.554
diacetyl	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0594 ± 0.0056 ^e	0.0447 ± 0.0045 ^d	0.0008 ± 0.0001 ^a	0.0077 ± 0.00 ^b	0.0288 ± 0.0016 ^c	ns	0.682
Aldehydes								
(E)-2-octenal	nd	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0027 ± 0.0002 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a	0.0021 ± 0.0001 ^b	0.0069 ± 0.0005 ^c	0.600	0.846
Nonanal	0.0011 ± 0.0000 ^{ab}	0.0064 ± 0.0005 ^c	0.0052 ± 0.0003 ^c	nd	0.0039 ± 0.0001 ^{bc}	0.0312 ± 0.0030 ^d	ns	0.558
(Z)-2-heptenal	0.0016 ± 0.0001 ^a	0.0051 ± 0.0002 ^b	0.0091 ± 0.0004 ^c	nd	0.0074 ± 0.0003 ^c	0.0161 ± 0.0015 ^d	0.329	0.875
Octanal	0.0007 ± 0.0000 ^a	0.0016 ± 0.0001 ^a	0.0077 ± 0.0004 ^b	0.0012 ± 0.0001 ^a	0.0060 ± 0.0002 ^b	0.0194 ± 0.0020 ^c	0.569	0.833
(E,E)-2,4-nonadienal	0.0065 ± 0.0001 ^c	0.0012 ± 0.0001 ^a	0.0033 ± 0.0002 ^b	0.0170 ± 0.0013 ^d	0.0031 ± 0.0002 ^b	0.0061 ± 0.0005 ^c	0.617	0.807
hexanal	0.0007 ± 0.0001 ^a	0.0042 ± 0.0003 ^c	0.0059 ± 0.0005 ^d	0.0008 ± 0.0000 ^a	0.0027 ± 0.0001 ^b	0.0190 ± 0.0009 ^e	ns	0.701
pentanal	nd	0.0072 ± 0.0001 ^d	0.0050 ± 0.0004 ^c	0.0003 ± 0.0000 ^a	0.0020 ± 0.0001 ^b	0.0068 ± 0.0006 ^d	ns	0.724
2-methylbutanal	0.0007 ± 0.0000 ^a	0.0012 ± 0.0001 ^b	0.0012 ± 0.0001 ^b	0.0019 ± 0.0001 ^c	0.0029 ± 0.0002 ^d	0.0050 ± 0.0002 ^e	0.777	0.607
Acids								
2-methylpropanoic acid	0.0113 ± 0.0006 ^a	0.0243 ± 0.0014 ^c	0.0113 ± 0.0003 ^a	0.0149 ± 0.0010 ^b	0.0103 ± 0.0008 ^a	0.0114 ± 0.0013 ^a	ns	ns
Acetic acid	0.0010 ± 0.0000 ^a	0.0314 ± 0.0017 ^b	0.1225 ± 0.00 64 ^c	0.0292 ± 0.0014 ^b	0.0177 ± 0.0008 ^{ab}	0.2232 ± 0.0179 ^d	ns	0.897

Explanations: nd – not detected; ns – non-significant.

All analyses were made in triplicate.

a, b, c, d, e - mean values in rows denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a Description as in Table 1.

Table 5
Sensory profiling of BBs.

Attributes	Sample code ^a				Statistics <i>p</i> -value
	BB	BB + ABY3	BBG	BB + Fruit	
Visual attributes					
color	3.37 ^b	2.85 ^b	3.19 ^b	7.36 ^a	<0.0001
density	6.28 ^b	6.38 ^{ab}	6.64 ^{ab}	6.82 ^a	0.137
Odor attributes					
starchy	4.16 ^a	2.07 ^b	4.33 ^a	1.81 ^b	<0.0001
legume	5.52 ^a	2.02 ^c	4.13 ^b	1.33 ^c	<0.0001
vegetable	3.07 ^a	1.88 ^b	3.13 ^a	0.91 ^c	<0.0001
fermentative	1.41 ^b	6.97 ^a	1.71 ^b	0.76 ^b	<0.0001
sour	1.53 ^b	6.49 ^a	1.49 ^b	2.31 ^b	<0.0001
sweet	1.63 ^b	0.40 ^c	1.29 ^b	6.03 ^a	<0.0001
fruity	0.86 ^b	0.13 ^b	0.29 ^b	6.57 ^a	<0.0001
nutty	1.05 ^{ab}	0.09 ^c	1.13 ^a	0.34 ^{bc}	0.021
burnt	1.33 ^a	0.84 ^c	1.23 ^{ab}	0.36 ^d	0.177
alcoholic	0.27 ^b	1.87 ^a	0.12 ^b	0.08 ^b	<0.0001
earthy	1.53 ^a	1.25 ^{ab}	2.10 ^a	0.63 ^b	0.154
sharp	1.09 ^b	4.07 ^a	1.19 ^b	0.92 ^b	<0.0001
Consistency attributes					
oral density	6.11 ^{bc}	6.02 ^c	6.76 ^a	6.63 ^{ab}	0.021
sticking	4.22 ^b	4.57 ^{ab}	4.94 ^{ab}	5.17 ^a	0.138
flouriness	4.47 ^b	3.96 ^b	6.41 ^a	4.33 ^b	<0.0001
Flavor attributes					
starchy	5.33 ^a	2.47 ^b	5.62 ^a	2.97 ^b	<0.0001
legume	5.72 ^a	2.19 ^b	5.09 ^a	2.53 ^b	<0.0001
vegetable	2.89 ^{ab}	1.94 ^{bc}	3.56 ^a	1.13 ^c	0.000
fermentative	1.41 ^b	6.68 ^a	1.41 ^b	0.43 ^b	<0.0001
sour	1.02 ^b	7.51 ^a	1.27 ^b	3.07 ^b	<0.0001
sweet	1.30 ^b	0.69 ^b	1.18 ^b	6.18 ^a	<0.0001
fruity	0.39 ^b	0.52 ^b	0.16 ^b	6.81 ^a	<0.0001
nutty	1.07 ^a	0.14 ^b	0.72 ^{ab}	0.29 ^b	0.027
burnt	1.42 ^a	0.64 ^{ab}	1.16 ^a	0.07 ^b	0.017
bitter	1.55 ^a	1.41 ^a	1.66 ^a	0.59 ^b	0.052
salty	1.07 ^a	0.76 ^{ab}	0.61 ^{ab}	0.23 ^b	0.084
earthy	2.80 ^a	1.84 ^a	2.62 ^a	0.29 ^b	0.002
alcoholic	0.14 ^b	1.97 ^a	0.08 ^b	0.07 ^b	<0.0001
purgency	0.80 ^{ab}	1.42 ^a	0.96 ^{ab}	0.43 ^b	0.028
overall sensory quality	3.68 ^b	1.72 ^c	3.69 ^b	5.40 ^a	<0.0001

a, b, c, d - mean values in rows denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a Description as in Table 1.

differences in the sensory profiling characteristics of the BBs and LBs are shown in Figs. 3 and 4, respectively. The differences and similarities in the sensory quality of PBBs are shown within the first two principal components: F1 (51.52%) and F2 (40.66%) accounting for 98.38% of the total variability for BBs and F1 (79.30%) and F2 (18.28%) accounting for 97.58% of the total variability for LBs. For both BBs and LBs, the PBBs samples containing raspberry-cranberry pulp (BB/LB + Fruit) were positioned close to the overall sensory quality and exhibited attributes associated with fruity and sweet odor and taste. Base (BB/LB) and germinated (BB/LBG) PBBs shared similar positions in the PCA system, indicating a comparable sensory profile characterized by starchy, legume, and vegetable odors and flavors. Conversely, samples of fermented PBBs (BB/LB + ABY3) were situated on the opposite side of the PCA system, reflecting sensory characteristics associated with intense fermentative and sour odor and taste, which negatively correlated with overall sensory quality.

Sensory analysis plays a vital role in product development and quality assessment, enabling the identification of potential enhancements or eliminations in the food's aroma compounds (Chambers IV & Koppel, 2013). Legumes, while nutritionally rich, often encounter resistance due to their sensory attributes (Vaz Patto et al., 2015). In this study, the overall sensory quality assessment highlighted fermented beverages rated the lowest despite exhibiting less noticeable legume, vegetable and starch aroma and flavor attributes. The negative reviews seem to be primarily related to the presence of fermentative, acidic and

Table 6
Sensory profiling of LBs.

Attributes	Sample code ^a				<i>p</i> -value
	LB	LB + ABY3	LBG	LB + Fruit	
Visual attributes					
color	7.51 ^a	4.48 ^c	6.02 ^b	6.68 ^{ab}	<0.0001
density	6.32 ^a	5.46 ^b	6.39 ^a	6.54 ^a	0.007
Odor attributes					
starchy	2.78 ^a	1.72 ^b	2.59 ^a	2.09 ^{ab}	0.033
legume	3.96 ^a	1.60 ^b	3.44 ^a	2.01 ^a	0.000
vegetable	2.61 ^a	1.93 ^{ab}	2.37 ^a	1.12 ^b	0.052
fermentative	2.16 ^b	6.87 ^a	2.85 ^b	1.19 ^c	<0.0001
sour	2.32 ^b	5.64 ^a	2.32 ^b	2.55 ^b	<0.0001
sweet	2.59 ^b	1.15 ^c	3.48 ^b	5.71 ^a	<0.0001
fruity	2.44 ^{bc}	1.48 ^c	3.32 ^b	6.71 ^a	<0.0001
nutty	0.64 ^a	0.32 ^b	0.84 ^a	0.44 ^b	0.269
burnt	1.11 ^a	0.93 ^{ab}	1.36 ^a	0.29 ^b	0.046
alcoholic	0.83 ^b	1.94 ^a	0.75 ^b	0.19 ^b	0.007
earthy	1.17 ^a	0.91 ^b	1.36 ^a	0.43 ^c	0.244
sharp	1.16 ^b	4.92 ^a	1.69 ^a	1.39 ^a	<0.0001
Consistency attributes					
oral density	6.29 ^{ab}	5.43 ^c	5.56 ^{bc}	6.88 ^a	0.002
sticking	5.18 ^a	4.73 ^a	4.97 ^a	5.31 ^a	0.228
flouriness	5.11 ^a	4.43 ^b	5.11 ^a	4.37 ^b	0.272
Flavor attributes					
starchy	3.78 ^a	3.20 ^b	3.77 ^a	2.94 ^b	0.188
legume	4.66 ^a	3.37 ^b	4.79 ^a	2.24 ^b	<0.0001
vegetable	3.29 ^a	2.14 ^a	3.08 ^a	0.77 ^b	0.001
fermentative	2.10 ^b	6.58 ^a	2.66 ^b	0.83 ^c	<0.0001
sour	2.82 ^b	5.77 ^a	2.84 ^b	2.72 ^b	<0.0001
sweet	1.27 ^{bc}	0.63 ^c	1.74 ^b	5.90 ^a	<0.0001
fruity	1.19 ^b	2.16 ^b	1.53 ^b	6.94 ^a	<0.0001
nutty	0.63 ^b	0.34 ^b	1.24 ^a	0.46 ^b	0.008
burnt	0.87 ^{ab}	0.83 ^{ab}	1.43 ^a	0.10 ^b	0.013
bitter	1.92 ^a	1.77 ^a	1.29 ^a	0.43 ^b	0.002
salty	0.66 ^b	1.28 ^a	0.78 ^{ab}	0.20 ^b	0.011
earthy	1.88 ^a	0.90 ^b	1.63 ^a	1.08 ^b	0.284
alcoholic	0.57 ^b	1.71 ^a	0.68 ^b	0.17 ^b	0.015
purgency	1.04 ^a	1.09 ^a	1.06 ^a	0.73 ^{ab}	0.422
overall sensory quality	3.37 ^b	1.72 ^c	3.34 ^b	5.02 ^a	<0.0001

a, b, c - mean values in rows denoted by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

^a Description as in Table 1.

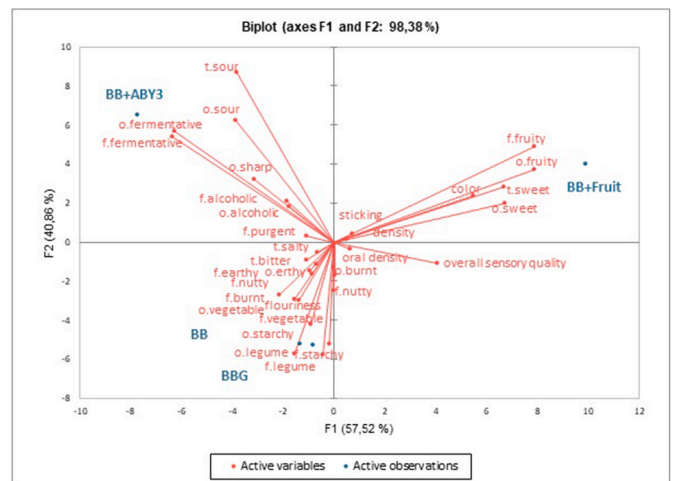


Fig. 3. Principal component analysis plot of the similarities and differences in the sensory profiling characteristics of the BBs.

o. — odor, f. — flavor, t. — taste

BB, BBG, BB + ABY3, BB + Fruit — description identical to Table 1.

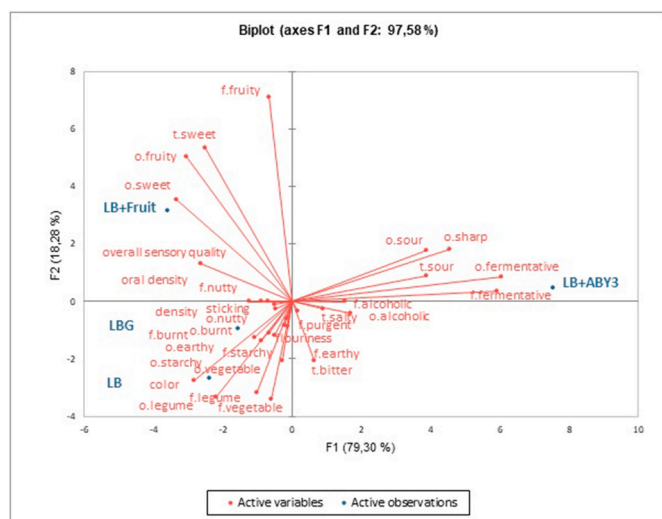


Fig. 4. Principal component analysis plot of the similarities and differences in the sensory profiling characteristics of the LBs.

o. — odor, f. — flavor, t. — taste

LB, LBG, LB + ABY3, LB + Fruit — description identical to Table 1.

alcoholic properties in the beverages. These specific attributes may be linked to certain volatile compounds such as 3-methyl-1-butanol, organosulfur compounds, acetoin, selected ketones (2,3-pentanedione, diacetyl), most tested aldehydes, and acetic acid, which increased notably in the volatile compounds of the PBBs after fermentation. Interestingly, certain ingredients such as hexanal, acetanal, and diacetyl in fermented milk products typically score positively in sensory tests and contribute to their characteristic aroma profile (Moineau-Jean et al., 2020). However, the unfavorable perception of fermented BBs and LBs could be due to the lack of harmonization of the proportions of these volatile compounds. The predominance of aldehydes in these beverages could contribute to the presence of unpleasant, grassy, and pungent aromatics, impacting the overall sensory experience (Xu et al., 2020). The addition of fruit pulp proved to be the most favorable strategy to increase the attractiveness of these beverages and, in particular, to reduce the perception of unfavorable odors and flavors such as legumes, starches, vegetables, bitter, fermentative, and alcoholic. This finding suggests that the addition of fruit pulp could effectively counteract these undesirable properties and thus improve the overall sensory profile of the beverages.

4. Conclusion

This paper presents the potential of using specific technological processes to alter the nutritional and sensory properties of BBs and LBs. The study showed that germination increased the content of certain B vitamins (biotin, niacin, pantothenic acid), isoflavones (daidzein, genistein), and fiber, consequently reducing the GI in the PBBs tested. Microorganisms involved in the fermentation of BBs and LBs showed the ability to synthesize thiamine, riboflavin, and pyridoxine and to produce enzymes that increase the availability of daidzein and genistein especially in samples fermented with more diverse starter cultures. The results indicate that the simultaneous use of fermentation and germination allows for the greatest improvement in their nutritional properties. This is crucial for legume products, the consumption of which is limited despite their high nutritional value, mainly due to the requirements regarding time and method of preparation. Industrial production of legume-based beverages subjected to appropriate pretreatment, including fermentation and germination, may enable an increase in the consumption of nutritional legume-based products.

The available literature lacks clear solutions regarding methods for

improving the sensory properties of legume-based beverages. Our study presents the impact of three different technological operations (fermentation, germination, and flavor addition) on selected sensory characteristics and the volatile compounds associated with them. Both germination and fermentation showed a multidirectional influence on the volatile compounds in the tested PBBs and influenced the sensory properties of the base and fermented beverages. The fermentation-associated changes in the content of certain alcohols, sulfur compounds, esters, fatty acids, and ketones had a negative impact on the overall sensory quality of the PBBs. Quantitative descriptive analysis revealed relatively low sensory quality for BBs and LBs, which could be significantly improved by including raspberry–cranberry pulp. These results provide direct guidance for producers of plant-based beverages who want to expand their offer with new milk substitutes with high nutritional value and improved sensory acceptance.

Continued advances in technological processes, such as the use of novel fermentation strains or the optimization of germination techniques, could potentially refine the nutritional and sensory properties of these beverages, leading to improved consumer acceptance and market competitiveness. It will be beneficial to investigate the effects of fermentation and germination on changes in the content of individual amino acids of legume-based beverages. This will allow us to identify processes that have a positive effect on the nutritional value of the products obtained, making their proteins more similar to those in cow's milk. Moreover, investigating the stability and shelf life of these beverages under different storage conditions is crucial for commercial viability. Understanding how these products evolve and ensuring consistent quality can pave the way for successful market placement and sustained consumer satisfaction.

Ethical statement

This study was approved by the Rector's Committee for the Ethics of Research Involving Human Participants from the Warsaw University of Life Sciences that reviewed and approved the sensory procedures (12/RKE/2023/U, date: April 2023). The informed consent from all study participants was obtained for experiments on human subjects.

Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

Patrycja Cichońska: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Eliza Kostyra:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Anna Piotrowska:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Iwona Ścibisz:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Marek Roszko:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Małgorzata Ziarno:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors extend their gratitude to the Institute of Food Science of the Warsaw University of Life Sciences WULS-SGGW for their support and provision of necessary infrastructure and research materials. Special thanks are given to Aleksandra Kosk, Paulina Kopeć, and Katarzyna Czarniak for their assistance with the analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116140>.

References

- Agostini-Costa, T. S., Teixeira-Filho, J., Scherer, R., Kowalski, C. H., Prado, M. A., & Godoy, H. (2007). Determination of B-group vitamins in enriched flavored milk mixes. *Alimentos e Nutricao*, *18*, 351–356.
- Atkinson, F. S., Brand-Miller, J. C., Foster-Powell, K., Buyken, A. E., & Goletzke, J. (2021). International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: A systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *114*, 1625–1632. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab233>
- Augustin, L. S. A., Kendall, C. W. C., Jenkins, D. J. A., Willett, W. C., Astrup, A., Barclay, A. W., Björck, I., Brand-Miller, J. C., Brighenti, F., Buyken, A. E., Ceriello, A., La Vecchia, C., Livesey, G., Liu, S., Riccardi, G., Rizkalla, S. W., Sievenpiper, J. L., Trichopoulos, A., Wolever, T. M. S., Baer-Sinnot, S., & Poli, A. (2015). Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An international scientific consensus summit from the international carbohydrate quality consortium (ICQC). *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, *25*, 795–815. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.05.005>
- Aydar, E. F., Tutuncu, S., & Ozelik, B. (2020). Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *Journal of Functional Foods*, *70*, Article e103975. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103975>
- Budryn, G., Klewicka, E., Grzelczyk, J., Gałązka-Czarnecka, I., & Mostowski, R. (2019). Lactic acid fermentation of legume seed sprouts as a method of increasing the content of isoflavones and reducing microbial contamination. *Food Chemistry*, *285*, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.178>
- Byanju, B., Hojilla-Evangelista, M. P., & Lamsal, B. P. (2021). Fermentation performance and nutritional assessment of physically processed lentil and green pea flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*, 5792–5806. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11229>
- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M. T., López, P., & Spano, G. (2012). Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *96*, 1383–1394. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4440-2>
- Chambers IV, E., & Koppel, K. (2013). Associations of volatile compounds with sensory aroma and flavor: The complex nature of flavor. *Molecules*, *18*, 4887–4905. <https://doi.org/10.3390/molecules18054887>
- Champagne, C. P., Tompkins, T. A., Buckley, N. D., & Green-Johnson, J. M. (2010). Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiology*, *27*, 968–972. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.003>
- Cichońska, P., Bryś, M., & Ziarno, M. (2023). Use of natural biotechnological processes to modify the nutritional properties of bean-based and lentil-based beverages. *Scientific Reports*, *13*, Article e16976. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44239-8>
- Craig, W. J., & Fresán, U. (2021). International analysis of the nutritional content and a review of health benefits of non-dairy plant-based beverages. *Nutrients*, *13*, e842. <https://doi.org/10.3390/nu13030842>
- da Costa César, I., Braga, F. C., Soares, C. D. V., de Aguiar Nunan, E., Pianetti, G. A., Condessa, F. A., ... Campos, L. M. M. (2006). Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal of Chromatography B*, *836*, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.030>
- Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT*, *40*, 1292–1299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.002>
- Hall, C., Hillen, C., & Robinson, J. (2016). Composition, nutritional value, and health benefits of pulses. *Cereal Chemistry*, *94*, 11–31. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-03-16-0069-FI>
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 2259–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-07>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, *6*, e53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Herlich, C., Müller-Werdan, U., & Norman, K. (2022). Role of plant-based diets in promoting health and longevity. *Maturitas*, *165*, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2022.07.003>
- Hugenholtz, J., & Smid, E. J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*, 497–507. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00367-1](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00367-1)
- Kaczmarek, K. T., Chandra-Hioe, M. V., Zabarar, D., Frank, D., & Arcot, J. (2017). Effect of germination and fermentation on carbohydrate composition of Australian sweet lupin and soybean seeds and flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 10064–10073. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02986>
- Kale, R. V., Pandhare, G. R., Satwase, A. N., & Goswami, D. (2011). Effect of different concentrations of orange juice on quality characteristics of soy milk blended beverage. *Journal of Food Processing & Technology*, *3*, Article e1000140. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000140>
- Kennedy, D. O. (2016). B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients*, *8*, e68. <https://doi.org/10.3390/nu8020068>, 2016.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., De Giori, G. S., Sesma, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y., Le, K.-A., Van den Broeck, H. C., Brouns, F. J., De Brier, N., & Delcour, J. A. (2019). Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*, 305–328. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12414>
- Li, H., Yan, L., Wang, J., Zhang, Q., Zhou, Q., Sun, T., Chen, W., & Zhang, H. (2012). Fermentation characteristics of six probiotic strains in soymilk. *Annals of Microbiology*, *62*, 1473–1483. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0401-8>
- Lopes, M., Pierrepont, C., Duarte, C. M., Filipe, A., Medronho, B., & Sousa, I. (2020). Legume beverages from chickpea and lupin, as new milk alternatives. *Foods*, *9*, Article e1458. <https://doi.org/10.3390/foods9101458>
- Lorn, D., Nguyen, T.-K.-C., Ho, P.-H., Tan, R., Licandro, H., & Wache, Y. (2021). Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, *350*, Article e109242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109242>
- Magaletta, R. L., & DiCataldo, S. N. (2009). In vitro method for the determination of glycemic index of food products (United States patent No. US20090004642A1). *United States Patent and Trademark Office*. <https://www.uspto.gov/>
- Megat Rusydi, M. R., Noraliza, C. W., Azrina, A., & Zulkhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, *18*, 705–713.
- Moineau-Jean, A., Raymond, Y., Sabik, H., Graveline, N., Champagne, C. P., Roy, D., & LaPointe, G. (2020). Effect of manufacturing processes and storage on aroma compounds and sensory properties of yoghurt. *International Dairy Journal*, *105*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104662>. Article e104662.
- Nawaz, M. A., Tan, M., Øiseth, S., & Buckrow, R. (2022). An emerging segment of functional legume-based beverages: A review. *Food Reviews International*, *38*, 1064–1102. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1762641>
- Njomui, S., Amiot, M. J., Rochette, L., Bellagha, S., & Mouquet-Rivier, C. (2019). Soaking and cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, *70*, 551–561. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1544>
- Nkhata, S. G., Ayua, E., Kamau, E. H., & Shingiro, J.-B. (2018). Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Science and Nutrition*, *6*, 2446–2458. <https://doi.org/10.1002/fsn3.846>
- Park, M. K., & Kim, Y.-S. (2021). Mass spectrometry based metabolomics approach on the elucidation of volatile metabolites formation in fermented foods: A mini review. *Food Science and Biotechnology*, *30*, 881–890. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00917-9>
- Rajhi, I., Baccouri, B., Rajhi, F., Hammami, J., Souibgui, M., Amri, M., Mhadhbi, H., & Flamini, G. (2022). *Journal of Food Composition and Analysis*, *112*, Article e104692. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104692>
- Rebello, C. J., Freenway, F. L., & Finley, J. W. (2014). A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obesity Reviews*, *15*, 392–407. <https://doi.org/10.1111/obr.12144>
- Rosenberg, J., Ischebeck, T., & Commichau, F. M. (2017). Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnology Advances*, *35*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.004>
- Saulnier, D. M., Santos, F., Roos, S., Mistretta, T.-A., Spinler, J. K., Molenaar, D., Teusink, B., & Versalovic, J. (2011). Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One*, *6*, Article e18783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018783>
- Scazzina, F., Siebenhandl-Ehn, S., & Pellegrini, N. (2013). The effect of dietary fibre on reducing the glycaemic index of bread. *British Journal of Nutrition*, *109*, 1163–1174. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000032>
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, *53*, 3408–3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Singh, A. K., Rehal, J., Kaur, A., & Jyot, G. (2015). Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*, 1575–1589. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.706661>
- Sokolowska, B., Połaska, M., Dekowska, A., Woźniak, Ł., & Roszko, M. (2020). Degradation of preservatives with the formation of off-odor volatile compounds - the case of strawberry-flavored bottled water. *Beverages*, *6*, e67. <https://doi.org/10.3390/beverages6040067>
- Świeca, M., Baraniak, B., & Gawlik-Dzik, U. (2013). In vitro digestibility and starch content, predicted glycemic index and potential in vitro antidiabetic effect of lentil

- sprouts obtained by different germination techniques. *Food Chemistry*, 138, 1414–1420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.122>
- Trindler, C., Kopf-Bolanz, K. A., & Denkel, C. (2022). Aroma of peas, its constituents and reduction strategies – effects from breeding to processing. *Food Chemistry*, 376, Article e131892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131892>
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S., & Encabo, R. R. (2010). The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103, 569–574. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992157>
- Vaz Patto, M. C., Amarowicz, R., Aryee, A. N. A., Boye, J. I., Chung, H.-J., Martín-Cabrejas, M. A., & Domoney, C. (2015). Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 105–143. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897907>
- Verni, M., Demarinis, C., Rizzello, C. G., & Baruzzi, F. (2020). Design and characterization of a novel fermented beverage from lentil grains. *Foods*, 9, 893. <https://doi.org/10.3390/foods9070893>
- Xu, M., Jin, Z., Gu, Z., Rao, J., & Chen, B. (2020). Changes in odor characteristics of pulse protein isolates from germinated chickpea, lentil, and yellow pea: Role of lipoxygenase and free radicals. *Food Chemistry*, 314, Article 126184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126184>
- Yoshiara, L. Y., Mandarino, J., Carrão-Panizzi, M. C., Madeira, T. B., da Silva, J. B., de Camargo, A. C., Shahidi, F., & Ida, E. I. (2018). Germination changes the isoflavone profile and increases the antioxidant potential of soybean. *Journal of Food Bioactives*, 3, 144–150. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.3157>
- Zaheer, K., & Akhtar, M. H. (2017). An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1280–1293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.989958>
- Zhang, K., Zhang, T.-T., Guo, R.-R., Ye, Q., Zhao, H.-L., & Huang, X.-H. (2023). The regulation of key flavor of traditional fermented food by microbial metabolism: A review. *Food Chemistry*, 19, Article 100871. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100871>
- Zhu, D., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., & Chen, P. (2005). Isoflavone contents in germinated soybean seed. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 147–151. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6931-0>

Warszawa, 10.09.2024

Patrycja Malinowska (z d. Cichońska)
patrycja_cichonska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zainicjowaniu wykonania badań, recenzji i edycji artykułu, napisaniu artykułu, walidacji, administracji projektu, opracowaniu metodologii, przeprowadzeniu badań, analizie wyników badań, gromadzeniu otrzymanych danych i opracowaniu koncepcji badań.

Podpis

Patrycja Malinowska

Warszawa, 24.05.2024

Eliza Kostyra
eliza_kostyra@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu w pisaniu artykułu, częściowym opracowaniu metodologii i wyników oraz wsparciu w przeprowadzeniu badań.



Podpis

Warszawa, 24.05.2024

Anna Piotrowska
anna_piotrowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**
**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu w pisaniu artykułu, częściowym opracowaniu metodologii i wyników oraz wsparciu w przeprowadzeniu badań.

Podpis

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a trailing line, positioned to the right of the word 'Podpis'.

Warszawa, 24.05.2024

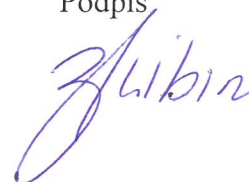
Iwona Ścibisz
iwona_scibisz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu w pisaniu artykułu, częściowym opracowaniu metodologii i wyników oraz wsparciu w przeprowadzeniu badań.

Podpis



Warszawa, 29.05.2024

Marek Roszko
marek.roszko@ibprs.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wsparciu w pisaniu artykułu, częściowym opracowaniu metodologii i wyników oraz wsparciu w przeprowadzeniu badań.

Podpis


D Y R E K T O R
dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB

Warszawa, 24.05.2024

Małgorzata Ziarno
malgorzata_ziarno@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia**
**Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cichońska P., Kostyra E., Piotrowska A., Ścibisz I., Roszko M., Ziarno M, 2024, Enhancing the Sensory and Nutritional Properties of Bean-Based and Lentil-Based Beverages through Fermentation and Germination, LWT, 199, 116140 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji i edycji artykułu, nadzorowaniu projektu oraz wsparciu w opracowaniu metodologii i koncepcji badań.

Podpis



