

Razvoj inovativnog fermentiranog bademovog napitka primjenom specijalnih vege starter kultura uz dodatak različitih hidrokoloida

Cvetko, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:980229>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Maja Cvetko

**RAZVOJ INOVATIVNOG FERMENTIRANOG
BADEMOVOG NAPITKA PRIMJENOM
SPECIJALNIH *VEGE* STARTER KULTURA
UZ DODATAK RAZLIČITIH HIDROKOLOIDA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Irene Barukčić Jurina.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ireni Barukčić Jurina na prenesenom znanju, savjetima, strpljivosti i razumijevanju tijekom cijelog procesa izrade diplomskog rada. Također se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović i tehničkoj suradnici Snježani Šimunić na dodatnim savjetima i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, bližnjima i dečku Robertu što su uvijek vjerovali u mene i pružali mi beskrajnu ljubav i podršku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

RAZVOJ INOVATIVNOG FERMENTIRANOG BADEMOVOG NAPITKA PRIMJENOM SPECIJALNIH
VEGE STARTER KULTURA UZ DODATAK RAZLIČITIH HIDROKOLOIDA

Maja Cvetko, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212668

Sažetak: Biljne alternative mliječnim proizvodima postaju sve popularnije zbog intolerancije na laktozu, alergija na kravlje mlijeko, promjene prehrane, veće brige za zdravlje, okoliš i dobrobit životinja. Stoga je cilj ovog rada bio optimirati proces fermentacije bademovog napitka primjenom različitih starter kultura uz dodatak različitih hidrokoloida s ciljem razvoja inovativnog proizvoda kao alternative mliječnom jogurtu. Fermentirani bademovi napitci skladišteni su 21 dan pri 4 °C te su analizirani svakih 7 dana. Svim uzorcima određivana je aktivna kiselost, udjeli suhe tvari, mineralnih tvari te ukupnih ugljikohidrata; boja, kapacitet zadržavanja vode i sinereza, reološka, mikrobiološka i senzorska svojstva. Rezultati istraživanja pokazali su da najveći kapacitet zadržavanja vode ima uzorak dobiven fermentacijom bademovog napitka starter kulturom VEGE 033 uz dodatak 1 % ksantana, 0,5 % inulina i 3 % saharoze. Uzorak fermentiran starter kulturom VEGE 053 uz dodatak 1 % brašna sjemenki rogača, 0,5 % guar gume i 3 % saharoze bio je najbolje prihvaćen od strane potrošača.

Ključne riječi: bademov napitak, fermentacija, brašno sjemenki rogača, inulin, kvaliteta

Rad sadrži: 54 stranica, 13 slika, 15 tablica, 80 literaturnih navoda,

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Irena Barukčić Jurina

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Irena Barukčić Jurina (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marija Badanjak Sabolović (član)
4. izv. prof. dr. sc. Marko Obranović (zamjenski član)

Datum obrane: 18. srpnja 2024

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

DEVELOPMENT OF AN INNOVATIVE FERMENTED ALMOND BEVERAGE USING SPECIAL *VEGE* STARTER CULTURES WITH THE ADDITION OF VARIOUS HYDROCOLLOIDS

Maja Cvetko, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212668

Abstract: Plant-based alternatives to dairy products are gaining popularity due to lactose intolerance, cow's milk allergies, dietary changes, increased concerns about health, the environment, and animal welfare. Therefore, the aim of this study was to optimize the fermentation process of almond beverage by using different starter cultures and adding various hydrocolloids to develop an innovative product as an alternative to dairy yogurt. The fermented almond beverages were stored for 21 days at 4 °C and analyzed every 7 days. All samples were tested for active acidity, dry matter, ash content, content of carbohydrates, color, water-holding capacity, syneresis as well as rheological, microbiological, and sensory properties. The research results showed that the almond beverage fermented with *VEGE* 033 starter culture, along with 1 % xanthan gum, 0,5 % inulin, and 3 % sucrose, had the highest water-holding capacity. The almond beverage fermented with *VEGE* 053 starter culture, supplemented with 1 % carob seed flour, 0,5 % guar gum, and 3 % sucrose, was sensory best rated.

Keywords: almond beverage, fermentation, carob seed flour, inulin, quality

Thesis contains: 54 pages, 13 figures, 15 tables, 80 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Katarina Lisak Jakopović, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Katarina, Lisak Jakopović, PhD, Associate professor (president)
2. Irena, Barukčić Jurina, PhD, Associate professor (mentor)
3. Marija, Badanjak Sabolović, PhD, Associate professor (member)
4. Marko, Obranović, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 18th, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BILJNI NAPITCI	2
2.2. BADEMOV NAPITAK	4
2.3. FERMENTIRANI BILJNI NAPITCI	5
2. HIDROKOLOIDI	6
2.4.1. Ksantan guma.....	7
2.4.2. Inulin	7
2.4.3. Guar guma.....	8
2.4.4. Brašno sjemenki rogača.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Aparatura.....	12
3.1.2. Pribor	12
3.1.3. Reagensi	13
3.2. PRELIMINARNA ISPITIVANJA	14
3.3. METODE RADA	17
3.3.1. Određivanje kiselosti.....	17
3.3.2. Određivanje udjela suhe tvari.....	18
3.3.3. Određivanje udjela mineralnih tvari (pepela)	18
3.3.4. Određivanje reoloških svojstava.....	19
3.3.5. Mikrobiološka analiza.....	19
3.3.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata	20
3.3.7. Određivanje boje.....	23
3.3.8. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode i sinereze.....	25
3.3.9. Senzorska analiza.....	25
3.3.10. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA	28
4.2. ODREĐIVANJE KISELOSTI.....	30

4.3. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI	31
4.4. ODREĐIVANJE UDJELA MINERALNIH TVARI (PEPELA)	32
4.5. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA.....	33
4.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA.....	37
4.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA	39
4.8. ODREĐIVANJE BOJE.....	41
4.9. ODREĐIVANJE KAPACITETA ZADRŽAVANJA VODE I SINEREZE	42
4.10. SENZORSKA ANALIZA	45
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Potrošači u današnje doba sve više teže tzv. *clean label* proizvodima odnosno minimalno procesiranim prehrambenim proizvodima visoke prehrambene i zdravstvene vrijednosti. Osviještenost potrošača o svemu prethodno navedenom postala je jedan od glavnih pokretača u razvoju prehrambenih proizvoda koji mogu odgovoriti na posebne nutritivne potrebe i pružiti dodanu vrijednost u pogledu zdravstvenog učinka (Deziderio i sur., 2023). Porast popularnosti biljnih alternativa potiču različiti čimbenici i zahtjevi potrošača, uključujući izazove povezane sa zdravljem poput intolerancije na laktozu i alergije na mlijeko, kao i zabrinutost zbog prisutnosti kolesterola te zasićenih masnih kiselina u visokom udjelu u mlijeku. Etičke dileme vezane uz životinje, ekološka pitanja i promjene u prehrambenim navikama gdje je sve zamjetniji afinitet prema veganskoj i vegetarijanskoj prehrani također igraju ulogu u ovom trendu. Nadalje, sve veća percepcija o zdravijoj prehrani potiče potražnju za alternativnima mliječnim proizvodima, a marketinška promocija tih proizvoda kao zdravstveno korisnih dodatno potiče njihovu popularnost (Tangyu i sur., 2019).

Od davnina, fermentacija je prirodan način proizvodnje hrane, a danas su fermentirane namirnice popularnije nego ikad prije. Smatra se da fermentirana hrana poboljšava zdravlje probavnog sustava, jača imunitet, smanjuje razinu kolesterola u krvi i visok krvni tlak te ima protuupalno i antikancerogeno djelovanje, dok istovremeno pomaže u održavanju tjelesne težine i zdrave crijevne mikroflore. Upravo zbog tih razloga, razvoj fermentiranih biljnih napitaka predstavlja veliki potencijal u stvaranju novih funkcionalnih proizvoda (Hew i sur., 2023).

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati proces fermentacije bademovog napitka bakterijama mliječne kiseline kako bi se dobio funkcionalni proizvod konzistencije slične jogurtu sa željenim senzorskim svojstvima i odgovarajućom prehrambenom vrijednosti. Za optimiranje okusa i konzistencije fermentiranog bademovog napitka dodani su brašno sjemenki rogača, guar guma, ksantan guma, inulin te saharoza. Također, praćena su fizikalno-kemijska svojstva konačnog proizvoda određivanjem aktivne kiselosti, udjela suhe tvari, mineralnih tvari i ugljikohidrata, kapaciteta zadržavanja vode, sinereze, boje te reoloških svojstava. Provedene su i mikrobiološke i senzorske analize kako bi se ispitala stabilnost konačnog proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BILJNI NAPITCI

Mlijeko se smatra potpunom namirnicom jer sadrži proteine, masti, šećere i mineralne tvari važne za ljudsko zdravlje. Unatoč zdravstvenim dobrobitima i preporukama za konzumaciju, sve je zamjetniji trend smanjenja potrošnje mlijeka u razvijenim zemljama. Ovaj trend je povezan sa sve većom pojavom intolerancije na laktozu, koja uzrokuje nelagodu nakon konzumacije mliječnih proizvoda, te alergija na proteine kravljeg mlijeka. Također, ovom trendu pridonose i vegani koji izbjegavaju konzumaciju svih namirnica životinjskog podrijetla, uključujući mlijeko i mliječne proizvode. Ovi čimbenici doprinose promjenama u prehranbenim navikama i potražnji za alternativnim izvorima hranjivih tvari koje se nalaze u životinjskom mlijeku (Tangyu i sur., 2019). Zanimljivo je da se biljni napitci sve češće koriste ne samo među veganima, već i među pojedincima koji inače preferiraju mliječne proizvode, ali uočavaju prednosti biljnih alternativa u smislu zdravlja, okoliša i etičkih pogleda. Opisani trend potiče širenje svijesti o prehrani temeljenoj na hrani biljnog podrijetla, što potiče razvoj novih inovativnih i funkcionalnih prehranbenih proizvoda koji zadovoljavaju raznolike prehranbene potrebe potrošača (Aydar i sur., 2020).

Biljni napitci su tekućine koje nastaju usitnjavanjem i redukcijom biljnog materijala (žitarica, pseudožitarica, mahunarki, uljarica, orašastih plodova) koji se zatim ekstrahira u vodi, a daljnjom homogenizacijom postiže se raspodjela veličine čestica u rasponu od 5 do 20 μm , što imitira izgled i konzistenciju kravljeg mlijeka (Dhakal i sur., 2023). Okus biljnih napitaka ovisi o korištenoj sirovini. Prema Dhakal i sur. (2023) biljni napitci klasificiraju se u pet kategorija: biljni napitci na bazi mahunarki (kikiriki, soja, slanutak, grašak), biljni napitci na bazi orašastih plodova (badem, lješnjak, orah, indijski oraščić), biljni napitci na bazi žitarica (riža, zob, pir, ječam), biljni napitci na bazi pseudožitarica (kvinoja, amarant, heljda, tef) te biljni napitci na bazi sjemenki (sezam, konoplja, lan, suncokret). Mahunarke predstavljaju odličan izvor proteina, složenih ugljikohidrata, vlakana i vitamina. Lošija aroma biljnih napitaka dobivenih iz mahunarki ili orašastih plodova može se poboljšati postupkom prženja tijekom toplinske obrade (Dhakal i sur., 2023) kao i fermentacijom (Božanić i sur., 2011) te primjenom različitih dodataka prilikom razvoja receptura. Prema istraživanju Angelino i sur. (2020), rižini i zobeni napitci sadrže veće količine ukupnih ugljikohidrata u usporedbi s drugim biljnim napitcima, dok su bademovi i sojini napitci bogatiji ukupnim mastima i proteinima (pogotovo sojin napitak). Biljni proteini često se smatraju nepotpunima jer ne sadrže dovoljne količine esencijalnih aminokiselina. Sadržaj proteina i sastav aminokiselina razlikuje se među biljnim vrstama. Na primjer, žitarice imaju nizak udio lizina, dok mahunarke imaju visok udio lizina, ali nizak udio metionina, triptofana i cisteina. Kombinacijom žitarica i mahunarki mogu se postići optimalne razine esencijalnih

aminokiselina, kompenzirajući njihove nedostatke i poboljšavajući hranjivu vrijednost (Sá i House, 2024; Bozzhigitova, 2020).

U biljnim sirovinama poput mahunarki, žitarica i orašastih plodova prirodno su, uz makronutrijente, prisutni i antinutrijenti. Antinutrijenti imaju sposobnost vezanja za proteine i mineralne tvari, čime smanjuju njihovu apsorpciju. Rafinoza, kondenzirani tanini, fitinska kiselina, alkaloidi, lektini, tripsinski inhibitori samo su neki od antinutrijenata koji svojom prisutnošću u visokim koncentracijama u biljnim materijalima mogu utjecati na hranjivu vrijednost napitaka na biljnoj bazi. Nedavna istraživanja pokazala su značajno smanjenje koncentracije antinutrijenata tijekom fermentacije biljnih napitaka (Montemurro i sur., 2021). Na primjer, tijekom fermentacije enzim fitaza, aktiviran smanjenjem pH vrijednosti, razgrađuje fitinsku kiselinu koja pri neutralnim pH vrijednostima ima negativno nabijene fosfatne grupe što omogućava interakciju s pozitivno nabijenim komponentama kao što su mineralne tvari i proteini (Montemurro i sur., 2021; Poljanec, 2019). Proteini mahunarki slabo se probavljaju zbog prisutnosti antinutrijenata poput inhibitora tripsina, čiji se negativan utjecaj može smanjiti povećanjem temperature (Bozzhigitova, 2020).

Proizvodnja biljnih napitaka može se provesti na različite načine, ali neki koraci su uvijek isti. Proces počinje odabirom sirovine koja može biti s ljuskom ili bez nje. Ukoliko je sirovina s ljuskom, kao što su kokos, kikiriki, soja, orasi ili indijski oraščići, prvi korak je namakanje u vrućoj vodi te uklanjanje ljuske. Nakon toga, oljušteni materijal je potrebno osušiti (Aydar i sur., 2020). Prženje se može koristiti u proizvodnji biljnih napitaka na bazi badema, kikirikija i lješnjaka. Zaaboul i sur. (2019) su utvrdili da se prženjem kikirikija poboljšava topljivost proteina i stabilnost emulzije. Namakanje u vodi primjenjuje se primjerice kod soje, lješnjaka, badema, oraha, žitarica, sezamovih sjemenki i kikirikija. Ovaj proces omogućuje bubrenje i omekšavanje žitarica i orašastih plodova, kao i smanjenje količine amiloze i toksina poput lektina, saponina, fitata, cijanogenih glikozida, koji se oslobađaju u vodi (Aydar i sur., 2020; Rehman i sur., 2014). Slijedi mljevenje u mlinu nakon kojeg se pogača odvaja od tekućeg dijela filtracijom ili centrifugiranjem. Zatim se mogu provesti enzimski ili kemijski postupci hidrolize škroba, vlakana ili drugih sastojaka. Slijedi blanširanje kojim se inaktiviraju endogeni enzimi, dok se termičkom obradom inaktiviraju mikroorganizmi kvarenja i patogene bakterije. Sljedeći korak je homogenizacija kojom se zaostale čestice smanjuju radi mehaničke stabilizacije proizvoda. U posljednjem koraku, dodaju se različiti dodaci poput stabilizatora, arome, boje, zgušnjivača, konzervansa, proteina, masti, vitamina, minerala i drugih tvari koje utječu na okus, izgled i trajnost proizvoda (Manasa i sur., 2020).

Proizvodi na biljnoj bazi, poput biljnog napitka, zahvaljujući prisutnosti fenolnih spojeva, flavonoida te vitamina A, E i C, djeluju kao prirodni antioksidansi pružajući tijelu zaštitu od oksidativnog stresa i povezanih bolesti poput raka, koronarne bolesti srca i ateroskleroze (AL

Zahrani i Shori, 2023). Biljni napitci mogu se konzumirati samostalno kao piće, ali mogu biti i osnova za proizvodnju prehrambenih proizvoda poput sladoleda, jogurta, kefira, sira i maslaca (Aydar i sur., 2020).

2.2. BADEMOV NAPITAK

Badem (*Prunus amygdalus*) pripada porodici *Rosaceae* te se ubraja među najvažnije orašaste plodove jer blagotvorno djeluje na ljudsko zdravlje (Ahmed i Jassem, 2022). Smatra se funkcionalnom hranom jer je važan izvor brojnih hranjivih tvari uključujući visokokvalitetne proteine, ugljikohidrate s niskim glikemijskim indeksom, jednostruko i višestruko nezasićene masne kiseline (oleinska i linolenska kiselina), prehrambena vlakna, vitamine (vitamin E, riboflavin), mineralne tvari (magnezij, bakar, fosfor, kalcij), fenolne kiseline i flavonoide (Topcuoglu i Yilmaz-Ersan, 2020).

Vrijednost badema kao sirovine za biljni napitak, prepoznata je zahvaljujući visokom udjelu proteina, koji prema nekim autorima iznosi i do 25 % od čega je najprisutniji amandin (Manasa i sur., 2020), ugljikohidrata (19,9 g / 100 g), masti (50,6 g / 100 g), kalija, kalcija i fosfora. Također, ima visok omjer kalija prema natriju, a prisutni ugljikohidrati imaju nizak glikemijski indeks, što ga čini pogodnima za dijabetičare (Bernat i sur., 2014). Redovita konzumacija badema može doprinijeti smanjenju razine šećera u krvi te smanjiti rizik od srčanih bolesti (Winans i sur., 2020). Uz to, neka istraživanja su pokazala da badem potiče razvoj korisnih mikroorganizama u crijevima te može imati i prebiotička svojstva zbog prisutnih vlakana i polifenola (Topcuoglu i Yilmaz-Ersan, 2020).

Počeci proizvodnje bademovog napitka sežu unatrag do ranih devedesetih godina dvadesetog stoljeća, a uobičajena metoda pripreme bademovog napitka započinje namakanjem badema i mljevenjem s velikom količinom vode. Slijedi filtriranje kojim nastaje bijela tekućina nalik mlijeku. U industrijskoj proizvodnji, bademov napitak se obično homogenizira pod visokim tlakom, a zatim pasterizira kako bi se povećala njegova stabilnost i produljio rok trajanja (Vanga i Raghavan, 2018).

Bademov napitak ističe se kao alternativa mliječnim proizvodima bez laktoze, kolesterola i zasićenih masnih kiselina te s niskom energijskom vrijednosti (30-60 kcal/100 mL), što ga čini pogodnim za populaciju intolerantnu na laktozu kao i za potrošače koji žele smanjiti unos kalorija i masti. Također, pozitivno djeluje na ljudski organizam jer djeluje kao antioksidans, protuupalno sredstvo, smanjuje razinu lipida u krvi, djeluje protutumorski, smanjuje agregaciju trombocita te jača imunološki sustav (Topcuoglu i Yilmaz-Ersan, 2020). Neka istraživanja sugeriraju da je bademov napitak bolja zamjena za mlijeko u prehrani novorođenčadi, nego naširoko korištene formule na bazi soje i proteinskih hidrolizata (Vanga i Raghavan, 2018).

2.3. FERMENTIRANI BILJNI NAPITCI

Fermentirana hrana, koja čini veliki dio ljudske prehrane, opisuje se kao hrana proizvedena kontroliranim rastom mikroorganizama i enzimskom preradom sastojaka (Gänzle, 2022). Fermentacija biljnih sirovina koristi se od davnina. Biljni napitci nemaju istu nutritivnu vrijednost kao mlijeko, međutim fermentacija može poboljšati funkcionalna svojstva konačnog proizvoda (Deziderio i sur., 2023). Osim funkcionalnih svojstava, proces fermentacije poboljšava i nutritivnu i senzorsku vrijednost hrane te povećava bioraspoloživost nekih sastojaka poput mineralnih tvari (Ahmed i Jassem, 2022). Uz to, većina fermentirane hrane i napitaka sadrži dodatke poput probiotika i prebiotika, koji imaju ključnu ulogu u održavanju zdravlja crijeva, ali i općeg zdravlja. Probiotici su pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koja, kada se primjenjuje u dovoljnim količinama, ima povoljne učinke na zdravlje domaćina, uključujući jačanje imunološkog sustava, snižavanje kolesterola, liječenje upalnih crijevnih bolesti, antikancerogeno, antimikrobno, antimutageno i antialergijsko djelovanje (Hadjimbei i sur., 2022; Mauro i Garcia, 2019). Fermentirani bademov napitak obogaćen probioticima i prebioticima smatra se funkcionalnom hranom jer predstavlja dobar izvor proteina, masti i antioksidanasa (Shi i sur., 2020).

Karakteristična struktura i tekstura mliječnog jogurta proizlazi iz međusobnih interakcija masti, proteina i ugljikohidrata. Kako bi nastao proizvod na biljnoj bazi sličan mliječnom jogurtu, za fermentaciju je potrebno koristiti bakterije mliječne kiseline poput *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Navedene kulture fermentiraju šećer, smanjuju pH vrijednost te doprinose nastanku karakterističnog okusa i željene teksture (Dhakal, 2023). Osim toga, određeni sojevi bakterija mliječne kiseline sintetiziraju egzopolisaharide koji utječu na reološka svojstva proizvoda čineći njegovu konzistenciju sličnu konzistenciji mliječnog jogurta. Egzopolisaharidi imaju sposobnost vezanja vode i interakcije s proteinima što dovodi do povećane viskoznosti i čvrstoće gela te smanjene sinereze (Hickisch i sur., 2016). Uz to, pripisuju im se i zdravstvene koristi zahvaljujući njihovim antimikrobnim, antitumorskim, antivirusnim i protuupalnim svojstvima (Korcz i Varga, 2021). Proteolitički enzimi mikroorganizama tijekom fermentacije hidroliziraju proteine u žitaricama, mahunarkama i orašastim plodovima stvarajući bioaktivne peptide. Fermentirani proizvodi mogu imati povećanu koncentraciju bioaktivnih peptida nastalih enzimskom ili kiselinskom hidrolizom proteina. Fermentacija biljnih napitaka trebala bi se provoditi na temperaturi od 36 °C – 45 °C tijekom 6 - 18 sati, a fermentirani proizvodi biljnog podrijetla trebali bi imati pH vrijednost između 4,6 i 4,9 (Dhakal, 2023).

Tijekom fermentacije i skladištenja fermentiranih biljnih napitaka dolazi do promjena u sinerezi i viskoznosti. Biljni napitci su newtonske tekućine, koji procesom fermentacije postaju

polučvrsti proizvod zbog stvaranja gela i višekomponentne mreže masti, proteina i ugljikohidrata. Stabilnost fermentiranog proizvoda ovisi o čvrstoći njegovog gela (Gilbert i sur., 2020). Pojava sinereze u fermentiranom proizvodu biljnog porijekla može biti rezultat neprikladne formulacije sastojaka, pogrešnog odabira bakterijskih kultura, neodgovarajućeg tretmana toplinom i homogenizacije, pogrešne kombinacije vremena i/ili temperature inkubacije, brzog hlađenja, te brzog i/ili prekomjernog zakiseljavanja. Izmjene u procesu i sirovinama doprinose poboljšanju teksture i smanjenju sinereze. Povećanjem udjela proteina u formulaciji nastaje čvršći gel što rezultira manjom sinerezom. Također, unakrsno povezivanje sitnih čestica masti s proteinima dovodi do smanjenja sinereze te povećava čvrstoću proizvoda (Dhakal, 2023).

Većinu ukupnih proteina u bademima čini amandin, čija heksamerna struktura povezana disulfidnim vezama, osigurava da fermentirani bademov napitak ima jaču strukturu gela i bolje zadržavanje vode. Utjecaj toplinske obrade i fermentacije na strukturu i fizikalno-kemijska svojstva proteina badema još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavlja se da povišene temperature (85-90 °C) uzrokuju veću denaturaciju i stvaranje proteinske mreže koja zadržava kapljice masti. Navedena promjena čini badem pogodnom sirovinom za proizvodnju fermentiranog napitka (Devnani i sur., 2020).

Tijekom proizvodnje mliječnog jogurta, bakterije mliječne kiseline pretvaraju laktozu u mliječnu kiselinu. Budući da badem ne sadrži laktozu, potrebno je dodati drugi izvor ugljikohidrata kako bi se osigurale hranjive tvari za rast i preživljavanje starter kulture tijekom fermentacije kao i tijekom definiranog roka trajnosti. Pri tom je važno paziti na dodanu količinu ugljikohidrata, ne samo zbog intenziteta slatkog okusa, već i zbog utjecaja previsoke koncentracije šećera na rast i preživljavanje starter kulture (Zhao i sur., 2021).

2. HIDROKOLOIDI

Posljednjih godina zamjetna je sve veća upotreba prirodnih hidrokoloida u prehrambenoj industriji. Njihovom upotrebom postiže se poboljšanje stabilnosti, kvalitete, sigurnosti te funkcionalnih svojstava različitih prehrambenih proizvoda poput napitaka, umaka, preljeva, pekarskih i elastičarskih proizvoda (Yemenicioğlu i sur., 2020). Hidrokoloidi su hidrofilni polimeri koji se prema podrijetlu klasificiraju u četiri glavne kategorije: hidrokoloidi biljnog podrijetla, hidrokoloidi životinjskog podrijetla, hidrokoloidi iz mikrobnih izvora, kemijski modificirani hidrokoloidi biljnog podrijetla (Manzoor i sur., 2020). Koriste se kao prehrambeni aditivi u različite svrhe - kao zgušnjivači, emulgatori, sredstva za želiranje, stabilizatori, sredstva za pjenjenje, sredstva za sprječavanje sinereze, inhibitori kristalizacije u sladoledu te kao sredstvo za vezanje vode u hrani bez glutena (Li i Nie, 2016).

Proizvodnja fermentiranog biljnog napitka zahtijeva dodatak zgušnjivača jer je teško postići

željenu strukturu bez njih. U fermentiranim proizvodima biljnog podrijetla, hidrokoloidi mogu poboljšati teksturu i čvrstoću proizvoda. Dugi i razgranati lanci hidrokoloida zadržavaju vodu te smanjuju protok tekućine u proizvodu, čime se smanjuje sinereza. Neki od hidrokoloida koji se koriste u proizvodnji fermentiranih proizvoda su guar guma, ksantan guma, pektin, brašno sjemenki rogača, guma arabika, alginat, škrob te karagenan. Anionski hidrokoloidi (pektin, karagenan) reagiraju s pozitivno nabijenim proteinskim molekulama stvarajući čvršću proteinsku mrežu, dok neutralni hidrokoloidi (ksantan guma, guar guma, brašno sjemenki rogača) povećavaju viskoznost kontinuirane faze (Dhakal i sur., 2023).

U prehrambenoj industriji često se koristi kombinacija dvaju ili više hidrokoloida u formulaciji proizvoda zbog sinergijskog učinka njihove zajedničke upotrebe čime se poboljša kvaliteta proizvoda. Razumijevanje utjecaja različitih sastojaka na zadržavanje vode u fermentiranim napitcima na biljnoj bazi ključno je za razvoj alternativa mliječnim proizvodima (Amaral i sur., 2018).

2.4.1. Ksantan guma

Ksantan guma je zgušnjivač, stabilizator i sredstvo za geliranje, a proizvodi se aerobnom fermentacijom kukuruznog šećera pomoću gram-negativne bakterije *Xanthomonas campestris* (Yemenicioğlu i sur., 2020). Ksantan gumu karakterizira odlična stabilnost u sustavima visoke temperature i kiselosti (Song i sur., 2020). Često se koristi u prehrambenim proizvodima zbog dobre topljivosti u toplim i hladnim tekućinama, sposobnosti postizanja visoke viskoznosti čak i pri vrlo niskim koncentracijama te odlične toplinske stabilnosti (Horvat, 2023).

Kombinirana primjena različitih stabilizatora može značajno poboljšati teksturu hrane, čak i pri nižim koncentracijama stabilizatora, zahvaljujući sinergijskim učincima koji se razvijaju unutar sustava. Na primjer, zabilježena su brojna sinergijska djelovanja brašna sjemenki rogača, posebno u kombinaciji s karagenanom i ksantan gumom (Camacho i sur., 2005).

2.4.2. Inulin

Inulin je hidrokoloid koji se proučava kao prebiotik i prihvaćen je kao sastojak hrane u svim zemljama (Pirsa i Hafezi, 2022). Sastoji od molekula fruktoze povezanih $\beta(2\rightarrow1)$ glikozidnom vezom i jedne molekule glukoze na kraju lanca. U industriji, inulin se najčešće proizvodi iz korijena cikorije i gomolja jeruzalemske artičoke (Sirbu i Arghire, 2017). Zbog $\beta(2\rightarrow1)$ glikozidne veze, inulin se ne razgrađuje enzimski u gornjem dijelu ljudskog probavnog sustava, već ga fermentiraju endogeni mikroorganizmi u debelom crijevu (Morreale i sur., 2019).

Koristi se u proizvodnji fermentiranih proizvoda jer poboljšava njihovu teksturu i senzorska svojstva (Burrowes i Hekmat, 2023). Fizikalno-kemijska svojstva inulina ovise o stupnju polimerizacije. Kratkolančani inulin je lako topljiv i slatkog okus, stoga se često koristi kao

zamjena za šećer. S druge strane, dugolančani inulin je viskozniji, slabije topljiv i ima sposobnost stvaranja gela zbog čega se koristi kao zamjena za mast i poboljšivač teksture (Wan i sur., 2020).

Inulin se, kao prehrambeno vlakno, povezuje s raznim povoljnim učincima na zdravlje poput smanjenja razine kolesterola, kontrole šećera u krvi te smanjenja rizika od određenih oblika raka debelog crijeva. Također, inulin se koristi kao niskokalorični zaslađivač i zamjena za masti, posebno u mesnim i mliječnim proizvodima (Pirsa i Hafezi, 2022). Unatoč tome što je inulin prebiotik, koristi se i kao sredstvo za zgušnjavanje u prehrambenoj industriji, što može smanjiti pokretljivost i dostupnost hranjivih tvari potrebnih za proces fermentacije, utječući na njegovu učinkovitost (Bernat i sur., 2014).

2.4.3. Guar guma

Guar guma jedan je od najčešće korištenih hidrokoloida u prehrambenoj i neprehrambenoj industriji. Guar guma je hidrokolid dobiven iz endosperma sjemenki mahunarke *Cyamopsis tetragonoloba*. Sastoji se od galaktoze i manoze, koje tvore složeni ugljikohidratni polimer. Zahvaljujući svojoj sposobnosti stvaranja vodikovih veza s molekulama vode, guar guma se široko primjenjuje u industriji, prvenstveno kao stabilizator i sredstvo za zgušnjavanje (Amaral i sur., 2018). Ovaj hidrokolid obiluje vlaknima te može smanjiti koncentraciju glukoze i sniziti razinu kolesterola u krvi. Guar guma povećava viskoznost hrane koja je spremna za probavu, uzrokujući njezin sporiji protok u probavnom traktu. Uz to, djeluje kao inhibitor, sprječavajući obradu i probavu dostupnih ugljikohidrata, čime se smanjuje brzina apsorpcije glukoze u jetrene stanice. Također, guar guma poboljšava osjetljivost hormona inzulina (Pirsa i Hafezi, 2022).

Guar guma nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji zahvaljujući svojoj sposobnosti vezanja velike količine vode. Ovo svojstvo pomaže u sprječavanju stvaranja kristala leda, poboljšanju teksture proizvoda, stabilizaciji konzistencije tijekom temperaturnih promjena i održavanju viskoznosti (Milani i Maleki, 2012). Zahvaljujući tome koristi se u različitim prehrambenim proizvodima kao što su sladoledi, umaci, mliječni i biljni napici, juhe, pekarski proizvodi, ali i u kozmetičkim proizvodima (Pirsa i Hafezi, 2022).

2.4.4. Brašno sjemenki rogača

Rogač je zimzeleno stablo ili grm iz roda rogač (*Ceratonia*) koji pripada porodici mahunarki (*Leguminosae*). Postoji mnogo različitih sorti rogača širom svijeta, a neke od najkvalitetnijih sorti dolaze iz Hrvatske. Raste samoniklo u južnom i srednjem dijelu Dalmacije, a uzgaja se na Visu, Hvaru, Šolti, Korčuli, Lastovu, Šipanu, Lopudu, Mljetu, Malom Drveniku i Velikom Drveniku, te u okolici Dubrovnika. Na tom području poznate su neke naše autohtone sorte, kao

što su Šipanski dugi, Komiški krupni, Moliški, Koštunac i Mekiš (Španjol i sur., 2020; Dragojević, 2017). Šipanski rogač, iz kojeg je dobiveno brašno sjemenki rogača korišteno u ovom istraživanju, je autohtona sorta koja se primarno uzgaja na otoku Šipanu, kao i u Dubrovačkom primorju. Klasificiran je kao stolna sorta zbog dugotrajnosti skladištenja njegovih mahuna. Rogač ima posebnu važnost u prehrambenoj industriji, gdje se koristi u proizvodnji kruha, slastica, kao zamjena za čokoladu, u pripremi različitih napitaka te u proizvodnji krmiva za stoku (Dragojević, 2017). Rogač je vrlo cijenjen zbog kemijskog sastava ploda, koji je bogat polisaharidima, lipidima i proteinima, a oni zajedno čine više od 50 % sastava rogača (Španjol i sur., 2020).

Mahuna rogača (slika 1) sastoji se od pulpe, koja čini 90 % mase ploda, i sjemenke, koja čini 10 % mase ploda (Dragojević, 2017). Mahuna rogača koristi se u prehrani kao brašno rogača, ekstrakt iz sjemenki (karubin) ili karuba guma iz endosperma sjemenki. Sjemenke sadrže proteine, oleinsku, linoleinsku i palmitinsku kiselinu, tanine i gumu. Brašno sjemenki rogača prirodni je biljni zgušnjivač, sredstvo za želiranje, emulgator i stabilizator (Dobričević i sur., 2014). Prema Pravilniku o prehrambenim aditivima, brašno sjemenki rogača, poznato i kao karuba guma, klasificirano je pod brojem E410 kao zgušnjivač (Pravilnik, 2010). Karuba guma je biljni hidrokoloid izoliran iz endosperma sjemenki rogača i posjeduje svojstva polimera visoke molekulske mase (Srećec i sur., 2020).



Slika 1. Mahuna rogača sa sjemenkama (Šipič, 2014)

Karuba guma se, zbog svoje sposobnosti stvaranja viskoznih otopina, stabilizacije emulzija i disperzija te stabilnosti u širokom rasponu pH, koristi u prehrambenim proizvodima kao zgušnjivač i stabilizator mliječnih proizvoda poput sladoleda, sireva i jogurta, te u pekarskim i slastičarskim proizvodima. Također, pokazuje sinergijski učinak s drugim hidrokoloidima te se

često koristi u kombinaciji s karagenanom i ksantan gumom (Srećec i sur., 2020; Dragojević, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za proizvodnju fermentiranog bademovog napitka upotrijebljen je nezaslađeni bademov napitak (Nutrigold, Zagreb), a njegova nutritivna vrijednost prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Nutritivna vrijednost bademovog napitka Nutrigold (Zagreb)

Nutritivna vrijednost u 100 mL napitka	
Energija	64,7 kJ / 15,5 kcal
Masti	1,35 g
Od kojih zasićene masne kiseline	0,1 g
Ugljikohidrati	0,4 g
Od kojih šećeri	0,1 g
Vlakna	0,2 g
Proteini	0,5 g
Sol	0,1 g

Kao sirovine u pripremi fermentiranog bademovog napitka korišteni su bijeli kristal šećer (Viro, Virovitica), brašno sjemenki rogača (OPG Goravica, Šipan), guar guma, ksantan guma (Doves Farms Foods Ltd., Berkshire) i inulin (Naturmind, Zagreb). U preliminarnim istraživanjima isprobani su i drugi dodaci: okara (PBF, Zagreb), rižin protein (Nutrigold, Zagreb), psilijum u prahu (Nutrigold, Zagreb), proteinski prah konoplje (Nutrigold, Zagreb), rižin protein (Nutrigold, Zagreb) te smjesa škroba i pektina komercijalnog naziva GRINDSTED SB 555 (Danisco, Danska).

Za fermentaciju bademovog napitka koristile su se dvije različite starter kulture (Danisco, IFF, Francuska) razvijene posebno za fermentaciju biljnih napitaka, a koje sadrže liofilizirane bakterije mliječne kiseline za inokulaciju i fermentaciju hrane biljnog podrijetla:

VEGE 033 LYO sadrži:

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

VEGE 053 LYO sadrži:

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

- *Bifidobacterium lactis* (HN019™)
- *Lactobacillus acidophilus* (NCFM®)

3.1.1. Aparatura

- Analitička vaga (AB104, Mettler Toledo, Švicarska)
- Tehnička vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Njemačka)
- Štapni mikser (Gorenje HB 802 W, Slovenija)
- Električni grijač s magnetskom miješalicom (Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija)
- pH-metar (914 pH/Conductometer, Metrohm, Švicarska)
- Eksikator sa sredstvom za izvlačenje vlage
- Bunsenov plamenik
- Vorteks (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Termostat (3U1, Inko, Zagreb)
- Centrifuga (Thermo Scientific™, Megafuge™ 16R, Kalkberg, Njemačka)
- Vodena kupelj (WNE 45 Waterbath, Memmert, Njemačka)
- Sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Mufova peć (LP-08, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Rotacijski reometar (RM-180 Rheomat, Rheometric Scientific, Piscataway, SAD)
- Kolorimetar (CM-700d, Konica Minolta, Japan)

3.1.2. Pribor

- Laboratorijske čaše (1000 mL, 2000 mL)
- Odmjerna tikvica (100 mL, 250 mL, 1000 mL)
- Laboratorijska žlica
- Stakleni štapić
- Magnetni štapić
- Lađice za vaganje
- Erlenmeyerove tikvice
- Pipete
- Trbušaste pipete (25 mL)
- Bočice za fermentaciju
- Plastične kivete (50 mL)
- Staklene i plastične petrijeve zdjelice
- Porculanski lončići za žarenje

- Boca štrcaljka
- Staničevina
- Hvataljka
- Posudica s ravnim dnom
- Povratno hladilo
- Zaštitne naočale
- Zaštitne rukavice
- Kamenčići za vrenje

3.1.3. Reagensi

- Destilirana voda
- Carrez otopina (I)
Postupak pripreme: 21,95 g cinkovog acetata dehidrata ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (VWR, SAD) i 3 mL ledene octene kiseline (Honeywell Fluka, SAD) otopi se u destiliranoj vodi te nadopuni do 100 mL
- Carrez otopina (II)
Postupak pripreme: 10,6 g kalijevog heksacijanoferat(II) trihidrata ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$) (VWR, SAD) otopi se u destiliranoj vodi i nadopuni do 100 mL
- Luff-Schoorlov reagens
Postupak pripreme: 25 g bakrovog (II) sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) (VWR, SAD) otopi se u 100 mL vode, 50 g monohidrata limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, SAD) se otopi u 50 mL vode te 143,8 g bezvodnog natrijevog karbonata (Na_2CO_3) (Honeywell Fluka, SAD) u 300 mL tople vode. U odmjernu tikvicu od 1 L doda se otopina natrijevog karbonata i otopina limunske kiseline te se miješa kružnim pokretima dok ne prestane burna reakcija, a zatim se doda otopina bakrovog (II) sulfata i nadopuni do 1 L. Otopinu se pusti tijekom noći te se po potrebi filtrira.
- Otopina natrijevog tiosulfata, 0,1 mol/L (KEFO, Hrvatska)
- Otopina škroba, 2 % (w/v) (Sigma-Aldrich, SAD)
- Sumporna kiselina , 6 mol/L (CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka)
- Otopina kalijevog jodida, 30 % (m/v) (Honeywell Fluka, SAD)
- Natrijev hidroksid (NaOH), 1 mol/L (CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka)
- Klorovodična kiselina, 37 % (CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka)
- Otopina kalijevog klorida, 3 mol/l (WTW, Njemačka)
- Hranjive podloge za određivanje prisutnosti kvasaca i plijesni (Sabouraud Dextrose Agar CAF 50, Biolife, Italija), bakterija mliječne kiseline (Biolife, Italija), ukupan broj

bakterija (Tryptic Glucose Yeast Agar, Biolife, Italija) te enterobakterija (Violet Red Bile Glucose Agar, Biolife, Italija)

- Fiziološka otopina – 9,0 % NaCl (GramMol, Zagreb, Hrvatska)

3.2. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

U prvoj fazi istraživanja provodila su se preliminarna ispitivanja s ciljem razvoja optimalne recepture fermentiranog bademovog napitka koja je pogodna za fermentaciju te senzorski prihvatljiva potrošačima. Tijekom preliminarnih istraživanja pripremljeni su uzorci s različitim dodacima, različitim koncentracijama dodataka i kombinacijama dodataka te različitim starter kulturama (VEGE 053 LYO i VEGE 033 LYO) kako bi se utvrdila optimalna koncentracija dodataka za fermentaciju, kao i optimalna starter kultura. Sve korištene koncentracije i kombinacije dodataka prikazane su u tablici 2.

Tijekom cijelog postupka fermentacije potrebno je koristiti sterilnu aparaturu i pribor. Laboratorijske čaše, bočice za fermentaciju, menzure i stakleni štapići sterilizirani su suhom sterilizacijom na 200 °C kako nepoželjni mikroorganizmi ne bi utjecali na tijek fermentacije te kako bi se dobio mikrobiološki prihvatljiv proizvod.

Tablica 2. Fermentirani bademovi napitci s različitim dodacima i starter kulturama

Oznaka uzorka	Sastojci
K-V053	Fermentirani bademov napitak bez dodataka inokuliran starter kulturom VEGE 053
K-V033	Fermentirani bademov napitak bez dodataka inokuliran starter kulturom VEGE 033
PSY-V053 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % psilijuma i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
PSY-V033 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % psilijuma i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
PSY-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % psilijuma i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
PSY-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % psilijuma i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
XAN-V053 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % ksantan gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053

Tablica 2. Fermentirani bademovi napitci s različitim dodacima i starter kulturama – *nastavak*

XAN-V033 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % ksantan gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
XAN-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % ksantan gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
XAN-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % ksantan gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
ROG-V053 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % brašna sjemenki rogača i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
ROG-V033 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % brašna sjemenki rogača i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
ROG-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % brašna sjemenki rogača i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
ROG-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % brašna sjemenki rogača i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
INU-V053 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
INU-V033 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
OKA-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % okare i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
OKA-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % okare i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
GUAR-V053 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % guar gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
GUAR-V033 (0,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 0,5 % guar gume i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
GRIND-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % GRINDSTED-a i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
GRIND-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % GRINDSTED-a i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033

Tablica 2. Fermentirani bademovi napitci s različitim dodacima i starter kulturama - *nastavak*

GRIND-V053 (1,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1,5 % GRINDSTED-a i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
GRIND-V033 (1,5 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1,5 % GRINDSTED-a i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
INU-V053 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
INU-V033 (1 %)	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
XAN (1 %) + INU (0,5 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % ksantan gume, 0,5 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
XAN (1 %) + INU (1 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % ksantan gume, 1 % inulina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
INU (1 %) + K (3 %)-V053	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina, 3 % proteinskog praha konoplje i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
INU (1 %) + K (4,5 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina, 4,5 % proteinskog praha konoplje i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
INU (1 %) + R (1 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina, 1 % rižin protein i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
INU (1 %) + R (1 %)-V053	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % inulina, 1 % rižinog proteina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 053
OKA (1 %) + R (1 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % okare, 1 % rižinog proteina i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033
OKA (1 %) + K (1 %)-V033	Fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % okare, 1 % proteinskog praha konoplje i 3 % saharoze inokuliran starter kulturom VEGE 033

U prethodno sterilizirane čaše od 1 L, dodano je 300 mL bademovog napitka. Različiti dodaci (brašno sjemenki rogača, guar guma, ksantan guma, psilijum u prahu, inulin, škrob i pektin, rižin protein, okara i proteinski prah konoplje) dodani su različitim koncentracijama kao što je prikazano u tablici 2. Kao zaslađivač koristila se saharoza u koncentraciji od 3 % u svim uzorcima. Dobivena smjesa je prije pasterizacije dobro homogenizirana štapnim mikserom kako bi se postigla homogenost smjese u cijelom volumenu te spriječilo formiranje grudica. Zatim se bademov napitak s dodacima zagrijavao na grijaćoj ploči s magnetskom miješalicom, uz stalno miješanje, sve do temperature od 73 °C na kojoj se 15 sekundi provodila pasterizacija. Slijedilo je postupno hlađenje uzoraka na 40 °C, kako bi se stvorili pogodni uvjeti za dodavanje starter kulture. Nakon što je starter kultura dodana, smjesa se dobro promiješala staklenim štapićem i stavila u prethodno sterilizirane bočice za fermentaciju. Zatim je određena aktivna kiselost mjerenjem pH vrijednosti te su se bočice za fermentaciju prekrile aluminijskom folijom i stavile na fermentaciju u termostat na temperaturu od 40 °C. Tijek fermentacije praćen je u intervalima od jednog ili dva sata, mjerenjem pH vrijednosti na način koji je opisan u poglavlju 3.3.1. Kada je pH vrijednost postigla vrijednost jednaku ili manju od 4,65, fermentacija je zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka u hladnoj vodi, nakon čega su uzorci skladišteni u hladnjaku na temperaturi do 4 °C.

Preliminarna ispitivanja uključivala su i senzorsku analizu prihvatljivosti fermentiranih bademovih napitaka, koja je provedena pomoću hedonističke skale po Peryamu (opisano u poglavlju 3.3.9). Na temelju dobivenih rezultata, određena je konačna receptura fermentiranog bademovog napitka. Proizvedeni fermentirani bademovi napitci (uzorak A, B, K-V033 i K-V053) skladišteni su u hladnjaku na temperaturi od 4 °C tijekom 21 dana te se svakih sedam dana provodilo uzorkovanje prilikom čega su određena sljedeća fizikalno-kemijska svojstva: kiselost (pH vrijednost), udjeli suhe tvari, mineralnih tvari i ugljikohidrata, sinereza, kapacitet zadržavanja vode te indeks boje. Također, provedene su mikrobiološka i senzorska analiza te je praćeno reološko ponašanje uzoraka.

3.3. METODE RADA

3.3.1. Određivanje kiselosti

Određivanje kiselosti bademovog napitka provedeno je mjerenjem pH vrijednosti laboratorijskim pH-metrom. Prije početka mjerenja, elektroda pH-metra se temeljito ispere destiliranom vodom i osuši staničevinom. Zatim se elektroda uroni u čašu s uzorkom, lagano promiješa te se očita pH vrijednost na zaslonu uređaja nakon što se ustali. Nakon svakog mjerenja, elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom, osušiti staničevinom, te na kraju

uroniti u otopinu kalijevo klorida radi čuvanja do sljedeće upotrebe (Božanić i sur., 2010).

3.3.2 Određivanje udjela suhe tvari

Ukupna suha tvar predstavlja masu koja ostane po završetku postupka sušenja na konstantnoj temperaturi do postizanja konstantne mase, a izražava se kao maseni udio. Suhu tvar čine svi sastojci mlijeka, tj. bademovog napitka, osim vode i plinova. Određivanje udjela suhe tvari u fermentiranim bademovim napitcima provedeno je direktnom metodom, sušenjem u sušioniku, koja se temelji na isparavanju vode iz uzorka sušenjem u sušioniku pri konstantnoj temperaturi od 102 ± 2 °C do postizanja konstantne mase (Božanić i sur., 2010).

U aluminijske posudice s ravnim dnom stavi se kvarcni pijesak da prekrije dno te se potom posudice i poklopci stave u sušionik jedan pokraj drugog, na konstantnu temperaturu. Nakon 30 minuta, poklopljene posudice se izvade iz sušionika i stave u eksikator na hlađenje. Kada se posudice ohlade do sobne temperature, izvažu se s točnošću od 0,1 mg na analitičkoj vagi. U tako osušene i ohlađene aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom, dodaje se 10 mL fermentiranog bademovog napitka. Slijedi sušenje otklopljenih posudica u sušioniku dva sata na konstantnoj temperaturi. Nakon sušenja, poklopljene posudice se stave u eksikator na hlađenje do sobne temperature i važu na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja nije bila manja od 0,5 mg. Za izračun se koristila najniža zabilježena masa.

Udio ukupne suhe tvari odredio se prema formuli:

$$\% \text{ suhe tvari} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzroka}} \cdot 100$$

[1]

3.3.3. Određivanje udjela mineralnih tvari (pepela)

Udio mineralnih tvari, odnosno pepela, određen je žarenjem uzoraka pri 550 °C do postizanja konstantne mase. Porculanski lončići žare se u Mufovoj peći pri temperaturi od 550 °C, zatim se ohlade u eksikatoru do sobne temperature te izvažu na analitičkoj vagi. U ohlađene porculanske lončice izvaže se 10 g fermentiranog bademovog napitka te se lončići s uzorkom stave u sušionik na temperaturu od 102 ± 2 °C, dok se u potpunosti ne osuše. Zatim se osušeni lončići stave na žarenje u Mufovu peć na temperaturu od 550 °C, dok sadržaj ne poprimi bijelu boju. Nakon hlađenja do sobne temperature u eksikatoru, porculanski lončići se važu i ponovno žare do konstantne mase. Za izračun se koristila najniža zabilježena masa (Božanić i sur.,

2010).

Udio mineralnih tvari, odnosno pepela, odredio se prema formuli:

$$\% \text{ pepela} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} \cdot 100$$

[2]

3.3.4. Određivanje reoloških svojstava

Reološka svojstva fermentiranih bademovih napitaka ispitana su rotacijskim reometrom. Rotacijski reometar sastoji se od cilindričnog vretena koje se rotira unutar nepomičnog vanjskog plašta u kojem se nalazi uzorak. Cilindrično vreteno pričvrsti se na tijelo uređaja s vanjskim plaštom čime se omogućava da je vreteno tijekom rotiranja uronjeno u uzorak. Reometar određuje napon smicanja i prividnu viskoznost pri brzinama od 100, 270, 440, 610, 780, 950, 1120 te 1290 s⁻¹, koje sam određuje za svaki uzorak. Temperatura uzoraka je oko 20 °C. Na zaslonu rotacijskog reometra prikazuju se vrijednosti napona smicanja (T) u Pas te prividne viskoznosti (μ) u Pas.

Na temelju odabranih vrijednosti brzina smicanja te izmjerenih vrijednosti napona smicanja, u Excelu su linearnom regresijom određeni sljedeći parametri: koeficijent konzistencije (mPas), indeks tečenja (n) te koeficijent regresije (R²). Navedeni parametri se određuju iz jednadžbe linearne regresije. Indeks tečenja je koeficijent smjera pravca (broj uz x) u dobivenoj jednadžbi, dok je koeficijent konzistencije antilogaritam odsječka na osi y, odnosno antilogaritam drugog člana jednadžbe. Koeficijent regresije (R²) predstavlja točnost metode.

3.3.5. Mikrobiološka analiza

Fermentirani proizvodi biljnog podrijetla bogati su hranjivim tvarima čime predstavljaju idealan medij za rast mikroorganizama što dovodi do narušavanja kvalitete proizvoda zbog pojave kvarenja (Dhakal i sur., 2023). Mikrobiološka analiza provedena je kako bi se odredila trajnost proizvoda praćenjem prisutnosti i rasta mikroorganizama, uključujući ukupne aerobne mezofilne bakterije, bakterije mliječne kiseline, enterobakterije te kvasce i plijesni. Mikrobiološka analiza provodi se u aseptičnim uvjetima, upotrebom Bunsenovog plamenika i sterilnog pribora, kako bi se izbjegla naknadna kontaminacija. Prije provođenja mikrobioloških analiza potrebno je pripremiti hranjive podloge te fiziološku otopinu.

Odvagana količina hranjive podloge se, prema uputama proizvođača, otopi u destiliranoj vodi i zagrijava na grijaćoj ploči s magnetskom miješalicom dok se potpuno ne otopi, nakon

čega se prelije u infuzijske boce. Infuzijske boce potrebno je sterilizirati u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta. Fiziološka otopina pripremi se otapanjem 9 g natrijevog klorida u 1000 mL destilirane vode. Zatim se po 9 mL fiziološke otopine otpipetira u epruvete s čepom koje se steriliziraju u autoklavu pri 121 °C tijekom 20 minuta.

Osnovno razrjeđenje pripremi se tako da se u prethodno sterilizirane Erlenmeyerove tikvice sa staklenim kuglicama, sterilnim pipetama otpipetira 20 mL uzorka i 180 mL fiziološke otopine te se homogenizira vorteksom. Za pripremu decimalnih razrjeđenja sterilnom mikropipetom otpipetira se 1 mL homogeniziranog osnovnog razrjeđenja u sterilne epruvete s 9 mL fiziološke otopine. Dobiveno decimalno razrjeđenje se dobro homogenizira vorteksom te se sterilnom mikropipetom prenese 1 mL u drugu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavlja dok se ne dobije željeno decimalno razrjeđenje. Zatim se mikropipetom uzme 1 mL željenog decimalnog razrjeđenja i pod kutom od 45 ° otpusti na sredinu Petrijeve zdjelice. U svaku Petrijevu zdjelicu se potom dodaje hranjiva podloga i promiješa laganim kružnim pokretima. Petrijeve zdjelice hlade se na sobnoj temperaturi dok se sadržaj ne skruti, a potom se okrenu dnom prema gore, kako bi se spriječila kondenzacija isparene vode, i stave u termostat na inkubaciju. Petrijeve zdjelice za određivanje bakterija mliječne kiseline inkubiraju se u termostatu na 43 °C tijekom 48 sati, za određivanje enterobakterija na 35 °C tijekom 18 – 24 sata, za određivanje ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija na 30 °C tijekom 72 sata te za određivanje kvasaca i plijesni na 30 °C tijekom 72 sata. Po završetku inkubacije broje se narasle kolonije, a za brojanje se odabiru one Petrijeve zdjelice na kojima je izraslo između 30 i 300 kolonija (Božanić i sur., 2010).

Broj naraslih kolonija po mL, odnosno CFU (colony-forming unit), izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nacijepljen volumen} \cdot \text{recipočna vrijednost decimalnog razrjeđenja}}$$

[3]

3.3.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata

Ukupni ugljikohidrati određeni su metodom prema Luff-Schoorlu, koja se temelji na sposobnosti reducirajućih ugljikohidrata (glukoza, maltoza, laktoza) da reduciraju metale iz alkalnih otopina njihovih soli, zahvaljujući slobodnoj aldehidnoj, odnosno keto - skupini. Dodatkom Luffove otopine (vodena otopina bakrovog sulfata, natrijevog citrata i natrijevog karbonata) nastaje crveno – smeđi, netopljivi talog bakrovog oksida (Cu₂O), prikazan na slici 2, a količina ugljikohidrata nakon nastanka taloga može se odrediti titracijom suviška nereduciranih iona bakra (Cu²⁺) ili titracijom istaloženog i otopljenog bakrovog oksida.



Slika 2. Talog bakrovog oksida (*vlastita fotografija*)

Dodatkom otopine kalijevog jodida u suvišku u kiseloj sredini postignutoj dodatkom sumporne kiseline, dolazi do reakcije joda i suviška bakrenih iona, što rezultira oslobađanjem molekularnog joda. Oslobođeni molekularni jod se titrira otopinom natrijevog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), uz škrob kao indikator (smjesa otopine škroba i joda daje tamnomodro obojenje), do prijelaza u putenastu boju (slika 3) (Božanić i sur., 2010).



Slika 3. Boja uzorka nakon titracije otopinom natrijevog tiosulfata (*vlastita fotografija*)

Nereducirajući disaharid (saharoza) mora se prvo invertirati, odnosno hidrolizirati, na reducirajuće monosaharide pomoću klorovodične kiseline. Na taj način dobije se podatak o ukupnoj količini ugljikohidrata u istraživanom uzorku (ukupni invert). Iz razlike između

dobivenog ukupnog i prirodnog inverta dobije se udio reducirajućih šećera nastalih inverzijom saharoze (Marković i sur., 2017b; Pravilnik, 2003).

S točnošću od 1 mg izvaze se 10 g uzorka (umjesto 5 g jer se očekuje manji udio ukupnih ugljikohidrata) i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL sa 200 mL destilirane vode. Zatim se doda 5 mL Carrezove otopine (I) i 5 mL Carrezove otopine (II) uz miješanjem prilikom svakog dodavanja, te se dopuni do oznake destiliranom vodom. Slijedi filtriranje te se 10 mL filtrata otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda se 0,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline i stavi u vodenu kupelj. Nakon 30 minuta, tikvica se izvadi iz kupelji, ohladi i neutralizira s 1 mol/L otopinom natrijevog hidroksida uz indikator papir te se nakon neutralizacije dopuni do oznake destiliranom vodom.

U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL s kamenčićima za vrenje otpipetira se 25 mL pripremljenog uzorka i 25 mL Luffovog reagensa. Erlenmeyerova tikvica spoji se na povratno hladilo te se zagrijava do vrenja, otprilike dvije minute, i pusti da lagano vrije točno deset minuta. Nakon toga se tikvica hladi pod mlazom hladne vode te se doda 10 mL otopine kalijevog jodida. Potom se oprezno, zbog burne reakcije, uz miješanje u smjesu otpipetira 25 mL 6 mol/L otopine sumporne kiseline. Titrira se 0,1 mol/L otopinom natrijevog tiosulfata, uz škrob kao indikator, dok plava boja ne nestane.

Istovremeno se provodi slijepa proba pod istim uvjetima, gdje se umjesto 25 mL uzorka koristi 25 mL destilirane vode. Razlika u mililitrima otopine natrijevog tiosulfata potrošenih za slijepu probu i glavni pokus koristi se za izračunavanje udjela šećera uz pomoć empirijskih tablica (tablica 3) (Pravilnik, 2009).

Ukupan invert (%) izračuna se prema formuli:

$$\frac{250 \cdot 100 \cdot d \cdot 100}{c \cdot 10 \cdot 25 \cdot 1000} = 10 \cdot \frac{d}{c} \cdot F$$

[4]

gdje je c masa uzorka (g), d masa invertnog šećera (mg) očitana iz tablice 3 (na temelju razlike u mililitrima otopine natrijevog tiosulfata potrošenih za slijepu probu i glavni pokus), F faktor korekcije koncentracija.

Tablica 3. Određivanje šećera po Luff-Schoorlu (prema Božanić i sur., 2010)

0,1 N-tiosulfat	Glukoza, frukoza ili invertni šećer		Laktoza		Maltoza	
	mL	mg razlika	mg	Razlika	Mg	razlika
1	2,4	/	3,6	/	3,9	/

Tablica 3. Određivanje šećera po Luff-Schoorlu (*prema* Božanić i sur., 2010) – nastavak

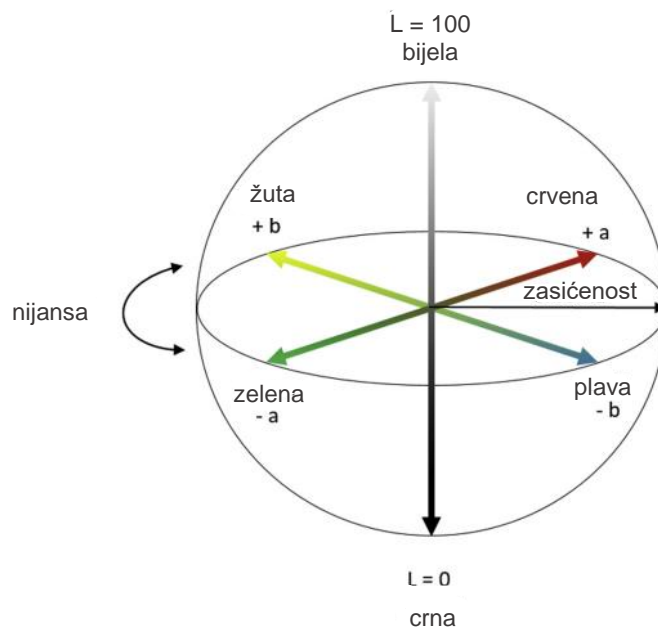
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,2	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1
16	41,5	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	75,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

3.3.7. Određivanje boje

Određivanje boje fermentiranog bademovog napitka temelji se na parametrima trodimenzionalnog spektra boja (L^* , a^* , b^*) korištenjem kolorimetra koji mjeri stupanj reflektirane svjetlosti od površine analiziranog uzorka (McGuire, 1992). CIELAB metoda temelji se na ljudskoj percepciji boja u sve tri dimenzije (Gómez-Polo i sur., 2016). Trodimenzionalni prostor boja čine dvije kromatske osi, a^* i b^* , koje su međusobno okomite i predstavljaju ton boje, te jedna akromatska os L^* , koja predstavlja svjetlinu i okomita je na ravninu kojoj pripadaju osi a^* i b^* (Weatherall i Coombs, 1992).

Akromatska os L^* ima vrijednosti u rasponu od 0 (teoretska crna boja) do 100 (savršena bijela boja). Os a^* označava crveno – zelenu komponentu boje, gdje pozitivna vrijednost

označava zastupljenost crvene boje, a negativna vrijednost zastupljenost zelene boje. Os b^* predstavlja žuto - plavu komponentu boje, gdje pozitivna vrijednost označava žutu boju, a negativna vrijednost plavu boju (Ly i sur., 2020).



Slika 4. CIELAB dijagram trodimenzionalnog prostora boja (prema Ly i sur., 2020)

Razlika u boji između fermentiranih bademovih napitaka s dodacima i kontrolnog uzorka, odredila se prema formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2}$$

[5]

gdje su L^*_{ref} , a^*_{ref} , b^*_{ref} vrijednosti određene za kontrolne uzorke fermentiranih bademovih napitaka, a L^* , a^* , b^* vrijednosti određene za uzorke fermentiranih bademovih napitaka s dodacima.

U tablici 4 prikazano je značenje dobivenih ΔE^* vrijednosti.

Tablica 4. Značenje razlika među određenim ΔE^* vrijednostima (prema Mokrzycki i Tatol, 2011)

ΔE	Značenje
0 – 0,5	Razlike u tragovima
0,5-1,5	Mala razlika

Tablica 4. Značenje razlika među određenim ΔE^* vrijednostima (prema Mokrzycki i Tatol, 2011) - nastavak

1,5-3,0	Primjetna razlika
3,0-6,0	Značajna razlika
6,0-12,0	Velika razlika
>12,0	Vrlo velika razlika

3.3.8. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode i sinereze

Kapacitet zadržavanja vode (WHC) u fermentiranom bademovom napitku određen je metodom centrifugiranja. U plastične kivete od 50 mL izvaže se oko 20 g fermentiranog uzorka te se centrifugira na 5000 rpm pri 4 °C tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se odvoji pipetom, a preostali talog u kiveti se izvaže. Razlika između masa predstavlja masu odvojenog supernatanta koja se koristi za izračun % sinereze (Feng i sur., 2018).

Kapacitet zadržavanja vode (WHC) izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$WHC (\%) = \left(\frac{m_{talog}}{m_{uzorak}} \right) \cdot 100 \quad [6]$$

gdje je m_{talog} masa taloga nakon uklanjanja supernatanta (g), m_{uzorak} masa uzorka prije centrifugiranja (g).

Koisteći dobivene vrijednosti, izračuna se i sinereza kao postotak prema sljedećoj formuli:

$$S (\%) = \left(\frac{m_{supernatant}}{m_{uzorak}} \right) \cdot 100 \quad [7]$$

gdje je $m_{supernatant}$ masa supernatanta odvojenog od mreže gela tijekom centrifugiranja (g), m_{uzorak} masa uzorka prije centrifugiranja (g).

3.3.9. Senzorska analiza

Senzorska analiza predstavlja znanstvenu disciplinu koja se koristi za mjerenje, analizu i interpretaciju reakcija na karakteristična svojstva namirnica putem mirisa, okusa, dodira ili sluha (Božanić i sur., 2010). U prehrambenoj industriji, senzorska analiza ima značajnu ulogu u

pružanju vjerodostojnih informacija o senzorskim svojstvima proizvoda, što je neophodno za donošenje poslovnih odluka (Marković i sur., 2017a).

U ovom istraživanju, prihvatljivost fermentiranih bademovih napitaka ispitana je na većoj grupi ispitanika koji nisu imali potrebnu izobrazbu niti su bili prethodno testirani. Obzirom na loše rezultate mikrobiološke analize, za potrebe određivanja prihvatljivosti uzoraka fermentiranih bademovih napitaka kod potrošača, napravljeni su novi uzorci po istoj recepturi, uz stroži režim pasterizacije koja se provodila na 85 °C tijekom 5 minuta.

Utvrđivanje prihvatljivosti uzoraka fermentiranih bademovih napitaka provedeno je testiranjem 47 ispitanika u dobi od 20 do 60 godina koristeći verbalnu hedonističku skalu po Peryamu s devet mogućih odgovora, koja je prikazana u tablici 5 (Stone i Sidel, 2004). Ova metoda omogućava ponovljivost rezultata s drugom grupom ispitanika te pruža velike mogućnosti za statističku interpretaciju rezultata (Božanić i sur., 2010; Stone i Sidel, 2004). Kako bi proizvod bio prihvaćen kao prihvatljiv, mora se ocijeniti najmanje s ocjenom 7 (Božanić i sur., 2001; Vahčić i sur., 1993).

Tablica 5. Hedonistička skala po Peryamu (*prema* Stone i Sidel, 2004)

Dojam o proizvodu	Ocjena
Naročito visoko poželjan	9
Visoko poželjan	8
Osrednje poželjan	7
Neznatno poželjan	6
Neutralan	5
Neznatno nepoželjan	4
Osrednje nepoželjan	3
Visoko nepoželjan	2
Naročito visoko nepoželjan	1

Na temelju podataka određenih hedonističkom skalom, izračunati su statistički parametri: aritmetička sredina, standardna devijacija, koeficijent varijabilnosti te nepoželjnost, odnosno poželjnost, prema sljedećim formulama.

Aritmetička sredina (A):

$$A = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{n}$$

[8]

gdje je $x_1 + x_2 + \dots + x_i$ brojevni niz podataka, n ukupan broj ispitanika za svaki uzorak.

Standardna devijacija (s):

$$s = \sqrt{s^2} \quad [9]$$

pri čemu je s^2 :

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - A)^2 \quad [10]$$

gdje je n ukupan broj ispitanika za svaki uzorak, A aritmetička sredina, x_1, \dots, x_n brojevni niz podataka.

Koeficijent varijabilnosti (c_v):

$$c_v = \frac{s}{A} \cdot 100 (\%) \quad [11]$$

gdje je s standardna devijacija, A aritmetička sredina.

Postotak nepoželjnosti (N):

$$N = \frac{I}{Y} \cdot 100 \quad [12]$$

gdje je I broj ispitanika koji su uzorku dali ocjenu nižu od pet, Y ukupan broj ispitanika.

Postotak poželjnosti (P):

$$P = 100 - N \quad [13]$$

gdje je N postotak nepoželjnosti.

3.3.10 Obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su u programu Microsoft Excel 2010, a prikazani su kao aritmetička sredina usporednih serija uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Također, provedena je analiza varijance (One-Way ANOVA) te Duncanov test rezultata dobivenih senzorskom analizom prihvatljivosti kod potrošača.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je optimirati proces proizvodnje fermentiranog bademovog napitka kako bi se dobio proizvod na biljnoj bazi koji je alternativa mliječnom jogurtu. U skladu s tim, prvo su provedena preliminarna ispitivanja s ciljem razvoja optimalne recepture fermentiranog bademovog napitka i njenog utjecaja na proces fermentacije i senzorsku prihvatljivost kod potrošača. Na temelju preliminarnih ispitivanja, odabrani su optimalni dodaci i njihova koncentracija te starter kultura.

Nakon proizvodnje fermentiranog bademovog napitka s odabranim recepturama, provedene su analize, čiji su rezultati prikazani grafički i tablicama. Analize koje su se provodile su određivanje kiselosti (tablica 6), određivanje udjela suhe tvari (slika 8) i mineralnih tvari (slika 9), određivanje kapaciteta zadržavanja vode (slika 11) i sinereze (slika 13), određivanje udjela ugljikohidrata (tablica 12), određivanje boje (tablica 13), mikrobiološka analiza (tablica 11), određivanje reoloških parametara (tablice od 7 do 10, slika 10 a–d) te senzorska analiza (tablica 14 i 15). Određivanje kiselosti, kapaciteta zadržavanja vode i sinereze, reoloških parametara te mikrobiološka analiza provodili su se 1., 7., 14. i 21. dan, a određivanje udjela suhe tvari, mineralnih tvari, ugljikohidrata i boje 1. i 21. dan. Prihvatljivost kod potrošača određena je nakon što su pripremljeni novi uzorci po istoj recepturi, uz stroži režim pasterizacije koja se provodila na 85 °C tijekom 5 minuta.

4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

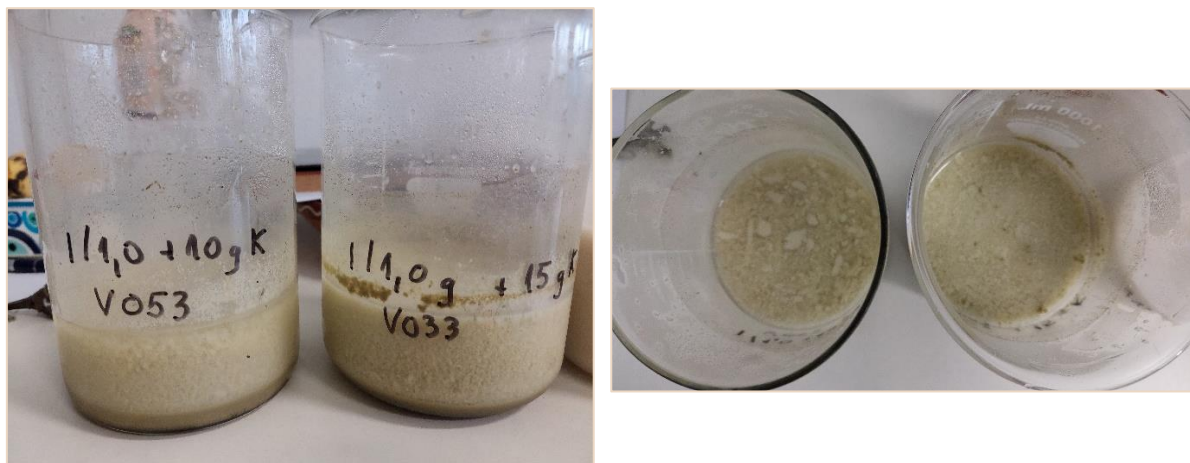
Tijekom preliminarnih istraživanja pripremljeni su uzorci s različitim koncentracijama i kombinacijama dodataka te različitim starter kulturama (VEGE 053 LYO i VEGE 033 LYO) kako bi se odredila optimalna receptura fermentiranog bademovog napitka obzirom na duljinu trajanja fermentacije, postignutu pH vrijednost te senzorsku prihvatljivost potrošača.

Fermentirani bademovi napitci pokazali su se prilično raznolikima ovisno o dodacima koje su sadržavali. Uzorci s dodatkom psilijuma (PSY-V053, PSY-V033) imali su rijetku teksturu s vidljivim "mrvicama", što je vidljivo na slici 5, i zbog toga su dobili loše ocjene prilikom senzorskog ocjenjivanja. Uzorci s dodatkom 0,5 % ksantan gume (XAN-V053, XAN-V033) imali su gustu, homogenu teksturu (slika 5), ali su bili vrlo kiselog okusa. Kada je količina ksantan gume povećana na 1 %, okus se poboljšao, ali je tekstura postala previše gusta. Inulin (INU-V033, INU-V053) je u uzorcima uzrokovao blago izdvajanje faza i prerijetku teksturu. Uzorci s dodatkom proteinskog praha konoplje (OKA-K-V033, INU-K-V053, INU-K-V033) bili su nehomogeni s talogom (slika 6) i loše ocijenjeni, dok su oni s rižinim proteinom (INU-R-V033, INU-R-V053, OKA-R-V033) imali gorak okus. Uzorci s dodatkom GRINDSTED-a imali su

prihvatljiv okus, ali prerijetku i nehomogenu teksturu. Kombinacije ksantan gume i inulina dale su gustu, teksturu pudinga i bile su dobro ocijenjene.



Slika 5. Uzorak PSY-V053 (0,5 %) (lijevo) i uzorak XAN-V053 (1 %) (desno) (vlastite fotografije)



Slika 6. Uzorci INU-K-V053 i INU-K-V033 s dodatkom proteinskog praha konoplje (vlastite fotografije)

Nakon ovih preliminarnih ispitivanja odlučeno je da će se u jednom uzorku kombinirati guar guma i brašno sjemenki rogača, a u drugom ksantan guma i inulin. Uzorak A sadrži 1 % brašna sjemenki rogača, 0,5 % guar gume i 3 % saharoze te je inokuliran starter kulturom VEGE 053. Uzorak B (slika 7) sadrži 1 % ksantan gume, 0,5 % inulina i 3 % saharoze te je inokuliran starter

kulturom VEGE 033. Kontrolni uzorak K-V053 ne sadrži dodatke i inokuliran je starter kulturom VEGE 053, dok kontrolni uzorak K-V033 također nema dodatke, ali je inokuliran starter kulturom VEGE 033.



Slika 7. Uzorak B – fermentirani bademov napitak s dodatkom 1 % ksantan gume, 0,5 % inulina i 3 % saharoze inokuliran je starter kulturom VEGE 033 (*vlastita fotografija*)

4.2. ODREĐIVANJE KISELOSTI

Mjerenjem aktivne kiselosti, koja se izražava koncentracijom vodikovih iona (pH vrijednost), određena je kiselost fermentiranih bademovih napitaka. Osim analiza provedenih na fermentiranim bademovim napitcima tijekom 21 dana pH vrijednost je također praćena tijekom samog postupka fermentacije, do postizanja vrijednosti 4,6, za koju se smatra da označava kraj fermentacije.

Kontrolni uzorci bez dodatka šećera su nakon 10 sati fermentacije imali pH vrijednosti u rasponu od 4,84 do 5. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima i pokazuju kako nizak udio ugljikohidrata u bademovom napitku utječe na postignutu razinu kiselosti tijekom fermentacije (Bernat i sur., 2014). Slične zaključke donijeli su i Oral i sur. (2023) koji su zabilježili veće povećanje kiselosti u fermentiranim bademovim napitcima s dodatkom saharoze ili maltoze u usporedbi s fermentiranim bademovim napitcima bez dodataka. To su povezali s činjenicom da se bakterije mliječne kiseline bolje razvijaju u prisutnosti glukoze i drugih šećera (saharoze, maltoze), što uzrokuje povećanje kiselosti. Prema tablici 6, koja prikazuje pH vrijednosti tijekom 21 dana skladištenja, vidljivo je da je kontrolni uzorak K-V033 održavao pH vrijednost oko 5, a kontrolni uzorak K-V053 oko 4,9.

Kod uzorka A, koji sadrži brašno sjemenki rogača, uočene su niže pH vrijednosti, u rasponu od 4,31 do 4,46, tijekom hladnog skladištenja u odnosu na uzorak B i kontrolne uzorke, koji ne

sadrže brašno sjemenki rogača. To je u skladu s istraživanjem koje su proveli Arab i sur. (2022), gdje su jogurt i probiotički jogurt s dodatkom brašna sjemenki rogača imali niže pH vrijednosti u odnosu na jogurt i probiotički jogurt bez dodatka brašna sjemenki rogača.

Tijekom skladištenja nije zabilježen kontinuiran pad ili rast pH vrijednosti, već svaki uzorak ima stabilnu pH vrijednost. U uzorku B tijekom 14 dana dolazi do blagog povećanja pH vrijednosti (od 4,74 do 4,86) koja se 21. dan neznatno smanjila na 4,84. S druge strane, pH vrijednost uzorka A bilježi rast prvih 7 dana, 14. dan pada te 21. dan ponovno raste. Sposobnost pretvaranja šećera u mliječnu kiselinu u biljnim supstratima varira među različitim bakterijama mliječne kiseline. Ovaj proces ima posebnu važnost za povećanje kiselosti proizvoda jer je proizvodnja mliječne kiseline odgovorna za pad pH vrijednosti koji je vidljiv tijekom fermentacije (Harper i sur., 2022).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu s istraživanjem koje su proveli Shi i sur. (2020) na fermentiranom bademovom napitku s dodatkom polimeriziranog proteina sirutke, u kojem je zabilježeno povećanje pH vrijednosti tijekom prva tri tjedna skladištenja (s 4,3 na 4,4). Suprotno rezultatima ovog istraživanja, Ahmed i Jassem (2022) proveli su istraživanje na fermentiranim bademovim napitcima s dodatkom različitih probiotičkih kultura i zabilježili kontinuirani pad pH vrijednosti tijekom skladištenja.

Tablica 6. Prosječne pH-vrijednosti tijekom 21 dana hladnog skladištenja uzoraka

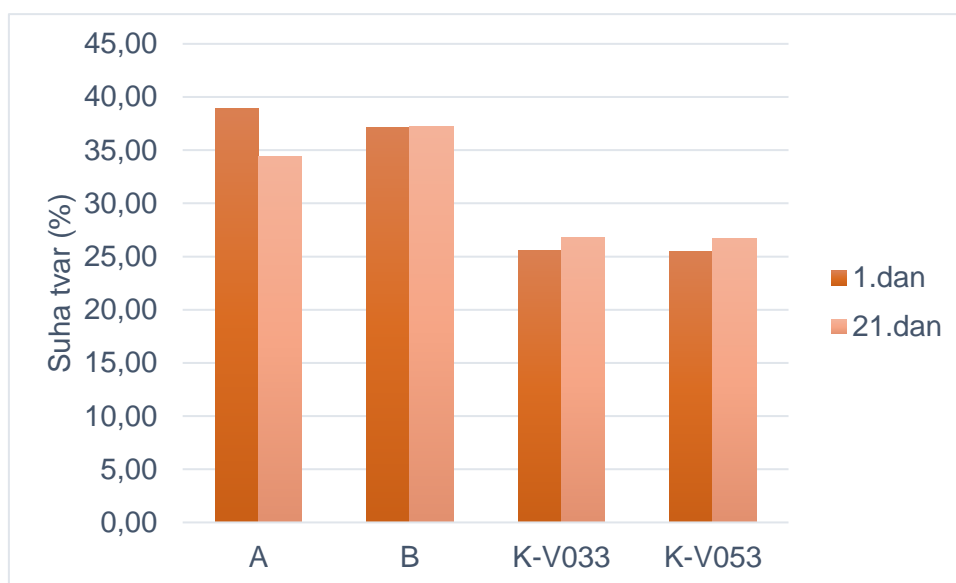
Dan skladištenja	pH-vrijednost			
	A	B	K-V033	K-V053
1.	4,31	4,74	5,00	4,84
7.	4,45	4,75	4,96	4,90
14.	4,33	4,86	5,00	4,86
21.	4,46	4,84	5,04	4,94

4.3. ODREĐIVANJE UDJELA SUHE TVARI

Udio suhe tvari određen je prvi i posljednji dan hladnog skladištenja uzoraka, a dobivene vrijednosti prikazane su grafički na slici 8.

Uzorak B i kontrolni uzorci K-V053 i K-V033 pokazuju blagi porast udjela suhe tvari tijekom skladištenja, dok se u uzorku A smanjuje udio suhe tvari tijekom tog razdoblja. Vidljivo je da uzorci A i B imaju veći udio suhe tvari (od 34,40 do 38,90 %) u usporedbi s kontrolnim uzorcima (oko 26 %), što se pripisuje dodacima brašna sjemenki rogača, ksantan gume, inulina, guar

gume i saharoze.



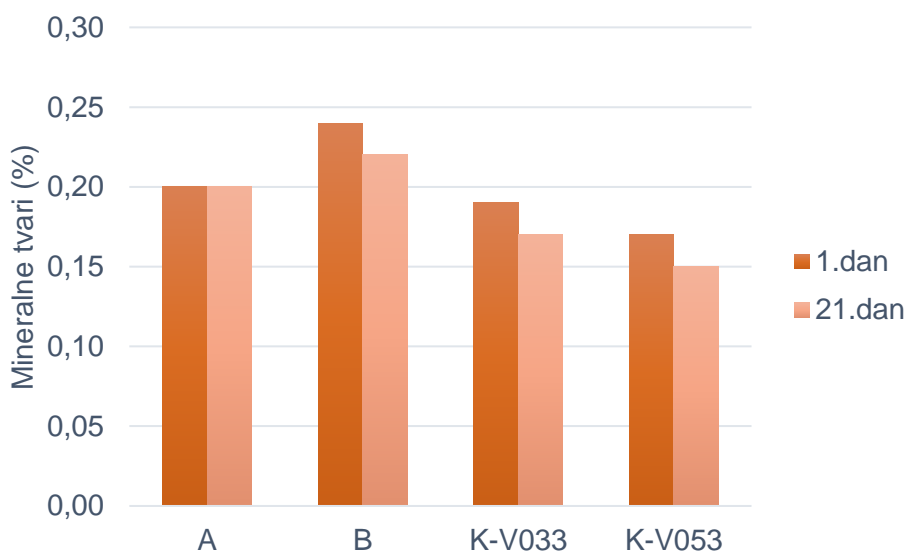
Slika 8. Prosječni udjeli suhe tvari svih uzoraka nakon 1. i 21. dana skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Rezultati prethodnih istraživanja o fermentiranim biljnim napitcima vrlo su raznoliki. Zhao i sur. (2021), uočili su značajne razlike u udjelu suhe tvari među različitim formulacijama fermentiranih bademovih napitaka s rasponom od 10 do 15 %. S druge strane, rezultati istraživanja Kholý i sur. (2015) pokazuju da se ukupni sadržaj suhe tvari kretao oko 20 % u jogurtu s dodanim brašnom sjemenki rogača te sirupom od rogača. U istraživanju koje su proveli Devnani i sur. (2022) na komercijalno dostupnim fermentiranim bademovim napitcima, udio suhe tvari bio je u rasponu od 14,9 % do 21,5 %. Nadalje, Ajogun i sur. (2023) određivali su udio suhe tvari u kokosovom napitku koji je iznosio 28,9 %. Udjeli suhe tvari u dosadašnjim istraživanjima i u ovom radu ne mogu se uspoređivati, budući da su rezultati temeljeni na različitim formulacijama. Razlika u formulacijama pojedinih uzoraka može dovesti do varijacija u udjelu suhe tvari, što otežava direktnu usporedbu rezultata.

4.4. ODREĐIVANJE UDJELA MINERALNIH TVARI (PEPELA)

Mineralni ostatak, odnosno pepeo, nastaje spaljivanjem uzorka te je određen nakon 1. i 21. dana skladištenja, a rezultati su grafički prikazani na slici 9. Prvog dana skladištenja, najveći udio mineralnih tvari zabilježen je u uzorku B (0,24 %), dok je najmanji udio bio prisutan u kontrolnom uzorku K-V053 (0,15 %). Analizom prikazanih rezultata, primijećen je blagi pad udjela mineralnih tvari tijekom skladištenja u uzorku B te kontrolnim uzorcima K-V033 i K-V053,

dok je udio mineralnih tvari u uzorku A bio konstantan. Također, oba kontrolna uzorka pokazuju niži udio mineralnih tvari u usporedbi s uzorcima A i B, koji sadrže dodatke. U istraživanju koje su proveli Bernat i sur. (2015), udio mineralnih tvari fermentiranog bademovog napitka s dodatkom probiotičkih bakterija iznosio je 0,33 %, što je nešto viša vrijednost u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom radu. S druge strane, Shi i sur. (2020) određivali su udio mineralnih tvari u bademovom napitku koji je iznosio 0,21 %, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.



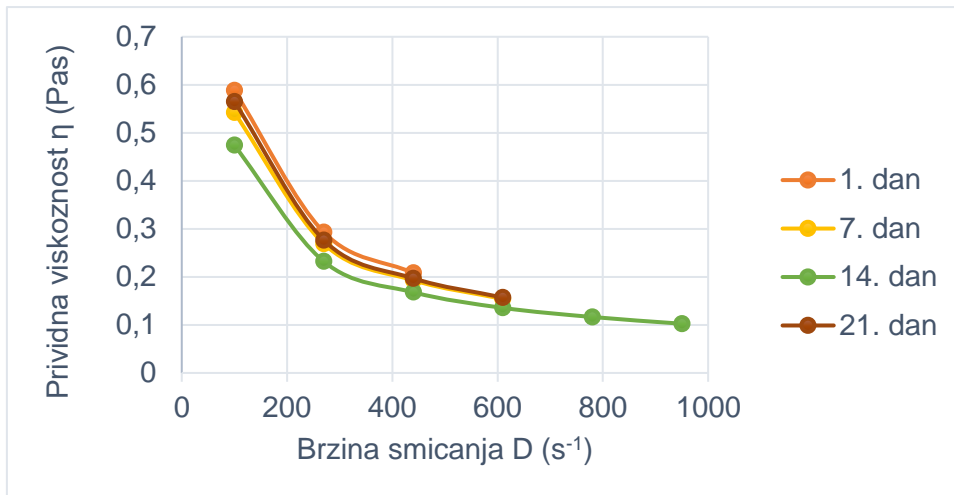
Slika 9. Prosječni udjeli mineralnih tvari svih uzoraka 1. i 21. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

4.5. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA

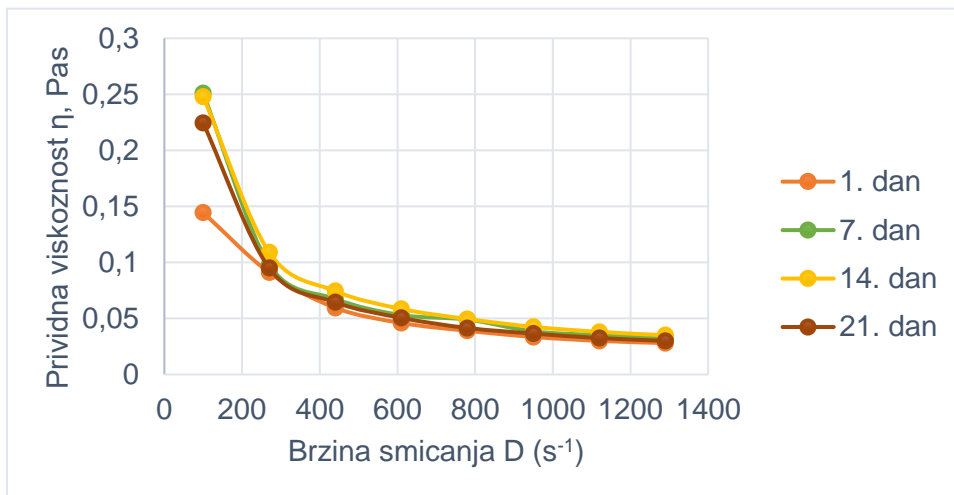
Reološki parametri mjereni su pri brzinama smicanja: 100, 270, 440, 610, 780, 950, 1120 i 1290 s⁻¹. Za procjenu reoloških parametara, izračunate su vrijednosti koeficijenta konzistencije te indeksa tečenja (n).

Za razliku od newtonskih tekućina, čija viskoznost ostaje konstantna kod određene temperature i tlaka u skladu s Newtonovim zakonom, mnogi prehrambeni proizvodi ponašaju se poput nenevtonskih tekućina. To znači da veza između smičnog naprezanja i brzine smicanja nije linearna te da se njihova viskoznost mijenja s promjenom brzine smicanja (Lelas, 2006). Na slici 10 a–d prikazana je ovisnost prividne viskoznosti o smičnoj brzini te je vidljivo da su fermentirani bademovi napitci proizvedeni u ovom radu također nenevtonske tekućine.

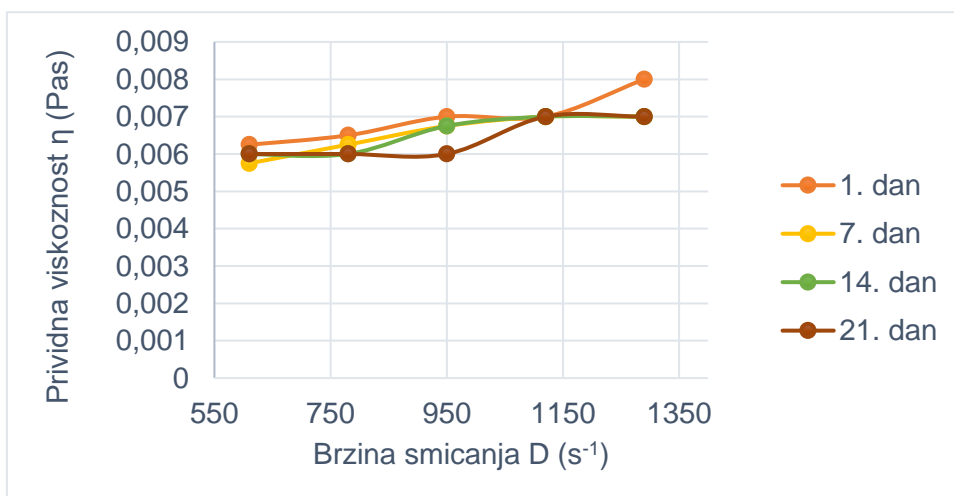
a)



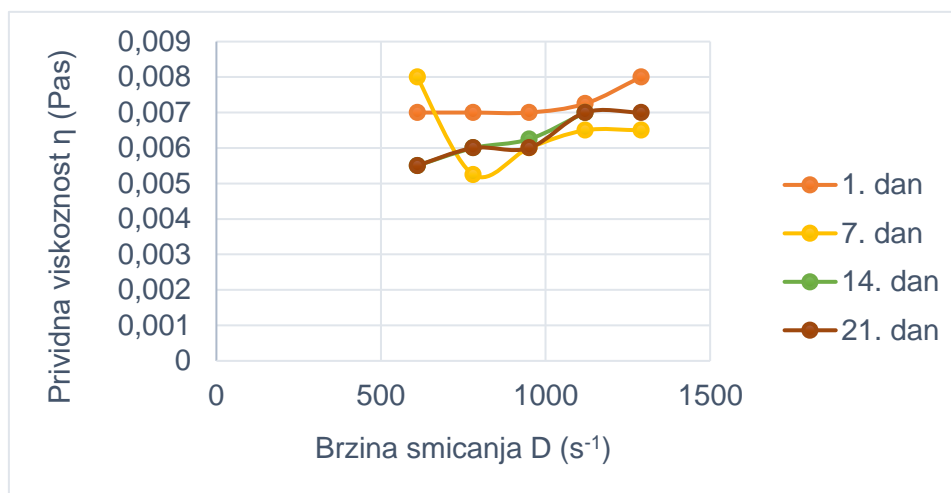
b)



c)



d)



Slika 10. Ovisnost prividne viskoznosti (η , Pas) o brzini smicanja (D , s⁻¹) uzorka A (a), uzorka B (b), uzorka K-V053 (c) te uzorka K-V033 (d) tijekom 21 dana hladnog skladištenja

Iz grafova na slici 10 a) i b), koji prikazuju uzorke A i B, vidljivo je da prividna viskoznost pada s povećanjem brzine smicanja. Također, vrijednost indeksa tečenja uzoraka A i B je manja od 1. Ovo svojstvo karakteristično je za pseudoplastične sustave. Najveći pad prividne viskoznosti uočen je na početku mjerenja pri prijelazu s najmanjih brzina smicanja na veće brzine. Pseudoplastično ponašanje karakterizirano padom prividne viskoznosti s porastom brzine smicanja, zabilježili su i Grasso i sur. (2020) u svom istraživanju fermentiranih biljnih napitaka. Zhao i sur. (2021) su također primijetili smanjenje viskoznosti s porastom brzine smicanja. Suprotno tome, iz grafova na slici 10 c) i d), koji prikazuju kontrolne uzorke, vidljivo je da im prividna viskoznost raste s povećanjem brzine smicanja. Također, vrijednost indeksa tečenja im je veća od 1, što je karakteristika dilatantnih sustava.

U tablicama 7, 8, 9 i 10 prikazane su vrijednosti prividne viskoznosti (μ , mPas), koeficijenta konzistencije (mPas), indeksa tečenja te koeficijenta regresije. Prikazana je prividna viskoznost pri brzini smicanja 1290 s⁻¹, osim kod uzorka A gdje je najveća postignuta brzina smicanja 610 s⁻¹. Početna prividna viskoznost uzorka A iznosi 208 mPas te se 14. dan smanjuje na 168 mPas, nakon čega lagano raste na 197 mPas do 21. dana. Koeficijent konzistencije također pada tijekom prvih 14 dana s početnih 14,97 mPas na 10,62 mPas, a zatim se povećava na 13,78 mPas do 21. dana. Indeks tečenja je stabilan oko 0,30, dok koeficijent regresije (R^2) pokazuje visoku linearnost (od 1,0000 na 1. dan do 0,9997 na 21. dan). Uzorak B pokazuje postupno povećanje prividne viskoznosti s 28 mPas na 35 mPas tijekom 21 dana skladištenja. Koeficijent konzistencije varira tijekom skladištenja. S početnih 7,27 mPas, 21. dan pada na 6,87 mPas. Indeks tečenja ostaje u rasponu od 0,20 do 0,23, dok koeficijent regresije (R^2)

ostaje visok, iznad 0,98. Kontrolni uzorci K-V053 i K-V033 pokazuju konstantno nisku prividnu viskoznost (7-8 mPas) i niski koeficijent konzistencije u rasponu od 0,0006 do 0,00020 mPas. Indeks tečenja kreće se između 1,17 i 1,35, a koeficijent regresije (R^2) je visok, što ukazuje na dobru linearnost mjerenja.

Tablica 7. Prikaz srednjih vrijednosti reoloških parametara uzoraka nakon 1. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Uzorak	Prividna viskoznost mPas	Koeficijent konzistencije mPas	Indeks tečenja, n	Koeficijent regresije, R^2
A	208	14,97	0,30	1,0000
B	28	7,27	0,22	0,9833
K-V053	8	0,0011	1,27	0,9996
K-V033	8	0,0022	1,17	0,9913

Tablica 8. Prikaz srednjih vrijednosti reoloških parametara uzoraka nakon 7. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Uzorak	Prividna viskoznost mPas	Koeficijent konzistencije mPas	Indeks tečenja, n	Koeficijent regresije, R^2
A	154	13,33	0,30	0,9997
B	32	9,19	0,20	0,9135
K-V053	8	0,0008	1,30	0,9997
K-V033	7	0,0008	1,29	0,9809

Tablica 9. Prikaz srednjih vrijednosti reoloških parametara uzoraka nakon 14. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Uzorak	Prividna viskoznost mPas	Koeficijent konzistencije mPas	Indeks tečenja, n	Koeficijent regresije, R^2
A	136	10,62	0,32	0,9960
B	35	8,19	0,23	0,9831
K-V053	7	0,0007	1,32	0,9996
K-V033	7	0,0006	1,35	0,9988

Tablica 10. Prikaz srednjih vrijednosti reoloških parametara uzoraka nakon 21. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Uzorak	Prividna viskoznost mPas	Koeficijent konzistencije mPas	Indeks tečenja, n	Koeficijent regresije, R ²
A	197	13,78	0,30	0,9999
B	35	6,87	0,26	0,9967
K-V053	7	0,0009	1,29	0,9997
K-V033	7	0,0020	1,18	0,9947

Rezultati pokazuju da dodaci brašna sjemenki rogača i guar gume (uzorak A) značajno povećavaju viskoznost u odnosu na kontrolne uzorke (bez dodataka), dok ksantan i inulin (uzorak B) također povećavaju viskoznost, ali u manjoj mjeri. Uzorci bez dodataka (K-V053 i K-V033) imaju najnižu viskoznost. Nedostatak stabilizatora razlog je najnižih viskoznosti kontrolnim uzorcima, što je rezultiralo vidljivim odvajanjem faza zbog njihove niske sposobnosti zadržavanja vode. Froiio i sur. (2020) su zaključili da brašno sjemenki rogača potiče formiranje trodimenzionalne mreže, podržava strukturu fermentiranog biljnog napitka i sprječava njegovu destabilizaciju. Nadalje, Zhao i sur. (2022) zaključili su da veća viskoznost može biti povezana s većim udjelom suhe tvari u uzorku, što se može primijeniti i na ovo istraživanje gdje su uzorci A i B imali veći udio suhe tvari u odnosu na kontrolne uzorke. Općenito, povećana viskoznost mliječnih jogurta i fermentiranih biljnih napitaka dovodi do poboljšanja gustoće, glatkoće, premaza u ustima i okusa, što pozitivno utječe na percepciju proizvoda. (Devnani i sur., 2022)

4.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Broj mikroorganizama određen je indirektnim brojanjem kolonija naraslih iz uzoraka fermentiranih bademovih napitaka nacijepljenih na odgovarajuće hranjive podloge. Određivala se prisutnost kvasaca i plijesni, koliformnih bakterije (enterobakterija), aerobnih mezofilnih bakterija te bakterija mliječne kiseline.

Kvasce karakterizira otpornost na niske temperature i niski pH te mogućnost proizvodnje velike količine enzima i vitamina B skupine. Plijesni imaju sposobnost razgradnje ugljikohidrata, masti i određenih proteina, preferirajući pritom vlažnu i kiselu sredinu. Koliformne bakterije, odnosno enterobakterije, smatraju se neželjenim mikroorganizmima u prehrambenim proizvodima. Njihovo prisustvo često ukazuje na nedostatke u procesima proizvodnje i nepravilne higijenske uvjete (Božanić i sur., 2010). Namirnice koje su kontaminirane ovim

bakterijama smatraju se neprikladnima za konzumaciju zbog rizika za zdravlje. Rezultati mikrobiološke analize prikazani su u tablici 11.

Tablica 11. Prosječne vrijednosti (log CFU/mL) parametara mikrobioloških analiza uzoraka tijekom 21 dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Dani	A	B	K-V053	K-V033
Enterobakterije				
1. dan	3,42±0,06	nebrojivo	2,60±1,63	0,74±0,17
7. dan	3,00±2,33	5,98±0,00	1,88±0,81	1,19±0,44
14. dan	2,40±0,12	6,84±0,01	0,74±0,74	0,65±0,67
21. dan	2,27±0,19	4,81±0,14	0,78±0,76	0,00±0,21
Ukupan broj bakterija				
1. dan	nebrojivo	nebrojivo	3,52±1,58	1,48±1,26
7. dan	6,80±0,00	6,69±0,01	4,70±0,84	4,56±1,44
14. dan	6,19±0,06	7,12±0,00	5,24±0,32	4,78±0,86
21. dan	5,70±0,12	5,30±0,12	5,72±0,29	4,43±3,35
Bakterije mliječne kiseline				
1. dan	4,26±0,10	3,81±0,05	4,89±3,33	1,91±0,44
7. dan	5,53±0,01	3,85±0,09	5,35±0,18	1,87±0,04
14. dan	5,86±0,09	3,55±0,11	5,37±0,02	1,64±1,37
21. dan	5,58±0,18	3,01±0,12	5,40±1,25	1,39±0,42
Kvasci i plijesni				
1. dan	nebrojivo	nebrojivo	2,40±1,91	3,36±2,59
7. dan	6,18±4,58	6,27±0,11	0,30±0,00	1,67±1,40
14. dan	0,00±0,00	6,41±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00
21. dan	2,31±0,04	2,78±0,04	0,00±0,00	1,18±1,04

Tijekom razdoblja hladnog skladištenja u kontrolnom uzorku K-V053 primijećen je trend smanjenja broja kvasaca i plijesni, što rezultira njihovim potpunim odsustvom nakon 14. dana skladištenja. Kontrolni uzorak K-V033, također bilježi kontinuirano smanjenje broja kvasaca i plijesni do 14. dana, kada nisu više prisutni, međutim 21. dan broj kvasaca i plijesni iznosi 1,18 log CFU mL⁻¹. Uzrok odsustva kvasaca i plijesni 14. dan skladištenja je najvjerojatnije prevruća hranjiva podloga koja se izlivala u Petrijeve zdjelice. Uzorci A i B pokazali su visok stupanj kontaminacije kvascima i plijesnima na početku skladištenja, no daljnjim skladištenjem zabilježeno je postupno smanjenje njihovog broja. Broj enterobakterija se u uzorcima A, K-V053 i K-V033 smanjivao s vremenom, iako je u svim uzorcima, osim u uzorku K-V033, bio iznad

maksimalne preporučene vrijednosti prema Vodiču za mikrobiološke kriterije (2009). Uzorak B, na početku skladištenja, imao je najveći broj enterobakterija, koje nije bilo moguće izbrojati. Daljnjim skladištenjem broj enterobakterija bio je i dalje vrlo visok. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u kontrolnim uzorcima, K-V053 i K-V033, se tijekom perioda skladištenja povećavao. Nasuprot tome, uzorci A i B imali su prisutan velik broj aerobnih mezofilnih bakterija prvi dan skladištenja, koji se smanjivao tijekom vremena skladištenja. Ahmed i Jassem (2022) također su zabilježili smanjenje ukupnog broja bakterija u uzorku fermentiranog bademovog napitka tijekom skladištenja zaključivši da je to posljedica nakupljanja sekundarnih metabolita koje proizvode bakterija, a koji imaju inhibicijski učinak na rast bakterija, kao i povećanje kiselosti napitka.

Kod uzoraka A i K-V053 primijećen je porast broja bakterija mliječne kiseline, dok uzorci B i K-V033 pokazuju suprotan trend tijekom skladištenja. Kholy i sur. (2015) navode da dodaci poput brašna sjemenki rogača pružaju zaštitu bakterijama mliječne kiseline, potičući njihovo preživljavanje, što se slaže s rezultatima dobivenima u ovom radu. Ahmed i Jassem (2022) su također uočili blagi porast bakterija mliječne kiseline u fermentiranim bademovim napitcima tijekom 14 dana skladištenja, što se može objasniti aktivnošću stanica i dostupnošću potrebnih hranjivih tvari, kao i odsutnošću metaboličkih produkata koji bi mogli ograničiti rast bakterija

Razlike u rezultatima s ostalim istraživanja mogu biti posljedica različite starter kulture, temperature inkubacije i mikroorganizama prisutnih u kombinaciji kultura, načina proizvodnje i medija korištenih za određivanje broja mikroorganizama (Uzuner i sur., 2016), ali i kontaminacija dodacima, kontaminacija pribora tijekom pripreme uzoraka te nedovoljno strog režim pasterizacije. Budući da je za pripremu uzoraka korišten sterilan pribor i da je bademov napitak kupljen u maloprodaji te uzimajući u obzir činjenicu da su oba kontrolna uzorka (bez dodataka) imala prihvatljivu mikrobiološku kvalitetu, uzrok lošijoj mikrobiološkoj kvaliteti napitaka A i B je vjerojatno kontaminacija korištenih dodataka. Stoga bi, kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta proizvoda, bilo nužno provesti režim pasterizacije pri višim temperaturama.

4.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

Određivanje udjela ukupnih ugljikohidrata provedeno je 1. i 21. dan skladištenja. Prema rezultatima prikazanima u tablici 12 vidljivo je da uzorci A i B pokazuju smanjenje udjela ugljikohidrata, odnosno ukupnog inverta, tijekom skladištenja.

Tablica 12. Udjeli ukupnog invertnog šećera fermentiranih bademovih napitaka 1. i 21. dan (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Oznaka uzorka (dan skladištenja)	Masa invertnog šećera (mg)	Ukupan invert (%)	\bar{x} (%)
A (1)	2,90	2,9	2,8±0,08
	2,75	2,8	
A (21)	2,60	2,6	2,5±0,05
	2,50	2,5	
B (1)	2,90	2,9	3,2±0,40
	3,50	3,5	
B (21)	3,40	3,4	3,1±0,33
	2,90	2,9	
	/*	<2	
K-33 (1)	/*	<2	/
	/*	<2	
K-33 (21)	/*	<2	/
	/*	<2	
	/*	<2	
K-53 (1)	/*	<2	/
	/*	<2	
K-53 (2)	/*	<2	/
	/*	<2	

gdje je \bar{x} srednja vrijednost ukupnog inverta

Kod uzorka A udio ugljikohidrata se smanjio s početnih 2,8 % na 2,5 %, dok se kod uzorka B smanjuje s 3,2 % na 3,1 %. Smanjenje udjela ugljikohidrata tijekom skladištenja je i očekivano budući da ih bakterije mliječne kiseline, ali i ostali prisutni mikroorganizmi koriste kao supstrat. Razlika u potrošenoj količini otopine natrijevog tiosulfata između slijepe probe i kontrolnih uzoraka bila je manja od 1 mL što znači da je udio ugljikohidrata u kontrolnim uzorcima manji od 2 % tijekom skladištenja. Uzorak B, koji sadrži ksantan gumu i inulin, ima veći udio ugljikohidrata. Ovo je u skladu s istraživanjem koje su proveli Makras i sur. (2005), gdje su primijetili da samo neki laktobacili mogu koristiti fruktane poput inulina kao izvor ugljikohidrata. Kao rezultat, većina dodanog inulina ostaje netaknuta u proizvodu, omogućavajući ciljanim potrošačima fermentiranog proizvoda da iskoriste zdravstvene prednosti koje ovaj prebiotik pruža.

U istraživanju Oral i sur. (2022) o fermentiranim bademovim napicima s dodatkom saharoze ili maltoze također je primijećeno smanjenje udjela ugljikohidrata tijekom skladištenja. Uzorak

fermentiranog bademovog napitka s 1 % saharoze pokazuje smanjenje udjela ugljikohidrata s 1,14 % na 0,8 %, što je nešto niži udio ugljikohidrata u usporedbi s uzorcima A i B u ovom istraživanju, a može se pripisati manjoj količini dodane saharoze u njihovom istraživanju. Kontrolni uzorci također pokazuju udio ugljikohidrata manji od 2 %. Zhao i sur. (2021) istraživali su udio ugljikohidrata u fermentiranim bademovim napitcima s različitim udjelima dodane masti, proteina i šećera. Uzorak u kojem je dodano 3 % šećera sadržavao je 2,97 % ukupnih ugljikohidrata, što je u skladu s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju.

4.8. ODREĐIVANJE BOJE

Određivanje boje je ključno za proizvodnju hrane jer boja utječe na prihvatljivost, sigurnost i senzorska svojstva proizvoda kod potrošača, posebno kada je riječ o fermentiranom napitku, gdje je boja važna vizualna karakteristika i podložna je promjenama tijekom skladištenja (Zhao i sur., 2021; Pachekrepapol i sur., 2021). U tablici 13 prikazane su promjene parametara boje (L^* , a^* , b^*) te ukupna razlika obojenosti (ΔE^*) uzoraka fermentiranog bademovog napitka, nakon 1. i 21. dana skladištenja. Parametri L^* , a^* i b^* koriste se za kvantificiranje boje, dok ΔE^* pokazuje ukupnu promjenu boje u odnosu na kontrolne uzorke. Ove informacije važne su za procjenu kvalitete i prihvatljivosti proizvoda tijekom skladištenja.

Tablica 13. Prosječne vrijednosti L^* a^* b^* fermentiranih bademovih napitaka 1. i 21. dan skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoze, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoze, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Uzorak	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
1. dan				
K-53	42,02±0,64	0,80±0,09	3,99±0,85	/
K-33	42,97±0,11	1,36±0,09	6,11±1,56	/
A	54,75±1,69	1,61±0,01	7,55±0,66	8,71
B	74,35±0,04	0,16±0,01	7,40±0,04	1,29
21. dan				
K-53	42,42±1,46	0,76±0,00	2,82±0,26	/
K-33	40,86±0,87	1,28±0,11	6,66±0,44	/
A	53,36±0,57	1,87±0,03	7,63±0,09	11,99
B	73,62±0,13	0,20±0,00	7,63±0,04	32,80

Parametar L^* označava svjetlinu u rasponu od 0 (crna boja) do 100 (bijela boja). Vrijednosti parametra L^* za kontrolne uzorke kretale su se od 40,86 do 42,97, dok je uzorak A imao

vrijednost parametra L^* u rasponu od 53,36 do 54,75, a uzorak B u rasponu od 73,62 do 74,35. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su kontrolni uzorci tamniji od uzoraka A i B. Uzorak B ima značajno višu vrijednost parametra L^* u usporedbi s drugim ispitivanim uzorcima, što ukazuje na svjetliju boju uzorka. Vrijednosti parametra a^* variraju od 0,16 do 1,87, što ukazuje na veći udio crvenog pigmenta u svim uzorcima u odnosu na zeleni pigment, dok su vrijednosti parametra b^* u rasponu od 2,82 do 7,63, što ukazuje na veći udio žutog pigmenta u svim uzorcima u odnosu na plavi pigment. Uspoređujući vrijednosti parametara L^* , a^* , b^* uzoraka A i B, vidljivo je da je uzorak A tamniji i ima veći udio crvenog pigmenta, dok im je udio žutog pigmenta podjednak, što se može pripisati prisutnosti brašna sjemenki rogača.

Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da uzorak B 1. dan skladištenja ima malu razliku u promjeni boje u odnosu na kontrolni uzorak, dok 21. dan skladištenja pokazuje vrlo veliku razliku. S druge strane, uzorak A 1. dan skladištenja ima veliku razliku u promjeni boje u odnosu na kontrolni uzorak, dok 21. dan skladištenja ima vrlo veliku razliku, što se može povezati s prisutnošću brašna sjemenki rogača.

U istraživanju koje su proveli Zhao i sur. (2021) na fermentiranom bademovom napitku s različitim udjelom masti, proteina i šećera, odredili su L^* vrijednosti u rasponu od 71,41 do 81,93, a^* vrijednost u rasponu od -1,03 do 1,22 te b^* vrijednost u rasponu od 7,46 do 13,07. Ovi rezultati pokazuju da uzorci u ovom radu imaju niže vrijednosti L^* i b^* (iako u uzorcima u oba istraživanja prevladava žuti pigment), dok su vrijednosti a^* slične ili nešto veće u usporedbi s istraživanjem Zhao i sur. (2021).

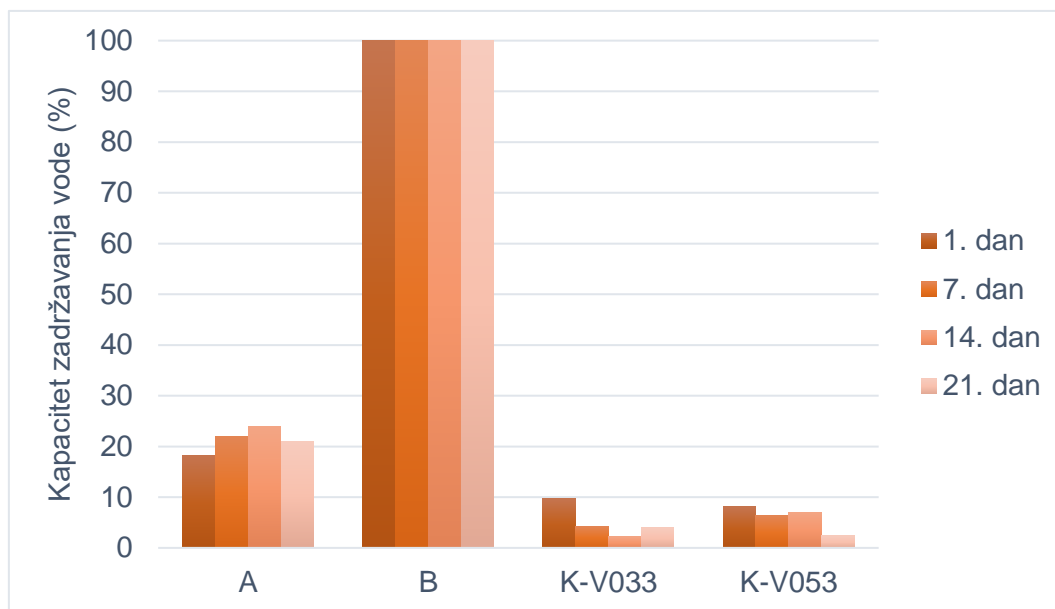
4.9. ODREĐIVANJE KAPACITETA ZADRŽAVANJA VODE I SINEREZE

Kapacitet zadržavanja vode (WHC) i sinereza su važni parametri kvalitete fermentiranog proizvoda. Određivanjem sinereze utvrđuje se količina izdvojene vode na površini fermentiranog proizvoda, dok kapacitet zadržavanja vode pokazuje sposobnost zadržavanja vode u strukturi gela fermentiranog proizvoda, što je ključno za njegovu kvalitetu i ima značajan utjecaj na prihvatljivost kod potrošača (Zhao i sur., 2021).

Na slici 11 su grafički prikazane prosječne vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode uzoraka tijekom 21 dana, izražene u postocima. Prisutnost 1 % ksantana i 0,5 % inulina u uzorku B rezultirala je najvećim kapacitetom zadržavanja vode među uzorcima, koji je ostao stabilan tijekom cijelog razdoblja skladištenja. Kod uzorka A je u prvih 14 dana primijećen porast kapaciteta zadržavanja vode, s 18,23 % na 23,97 %, dok je 21. dan pao na 21,03 %. Suprotno tome, kontrolni uzorci imali su niski kapacitet zadržavanja vode, što je posljedica nedostatka stabilizatora. Ova pojava naglašava važnost stabilizatora u očuvanju strukture i teksture jogurta.

Barkallah i sur. (2017) navode da prehrambena vlakna mogu zadržati vodu, što rezultira

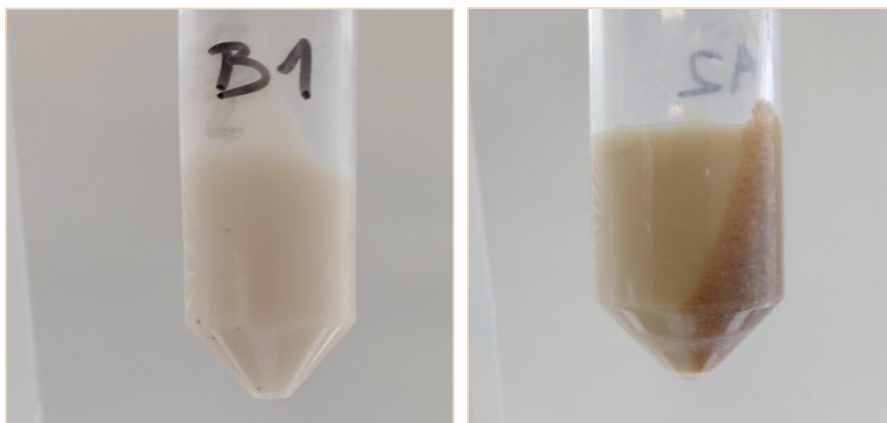
povećanjem kapaciteta zadržavanja vode (WHC) u jogurtu. Zhao i sur. (2021) su zaključili da se veći kapacitet zadržavanja vode može povezati s većim udjelom suhe tvari, što se u ovom radu može primijetiti za uzorak B, koji ima 100 % kapacitet zadržavanja vode, te 37 % udjela suhe tvari. Također, kontrolni uzorci koji su imali niži udio suhe tvari, imaju i niži kapacitet zadržavanja vode.



Slika 11. Prosječne vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode (%) svih uzoraka nakon 1., 7., 14. i 21. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

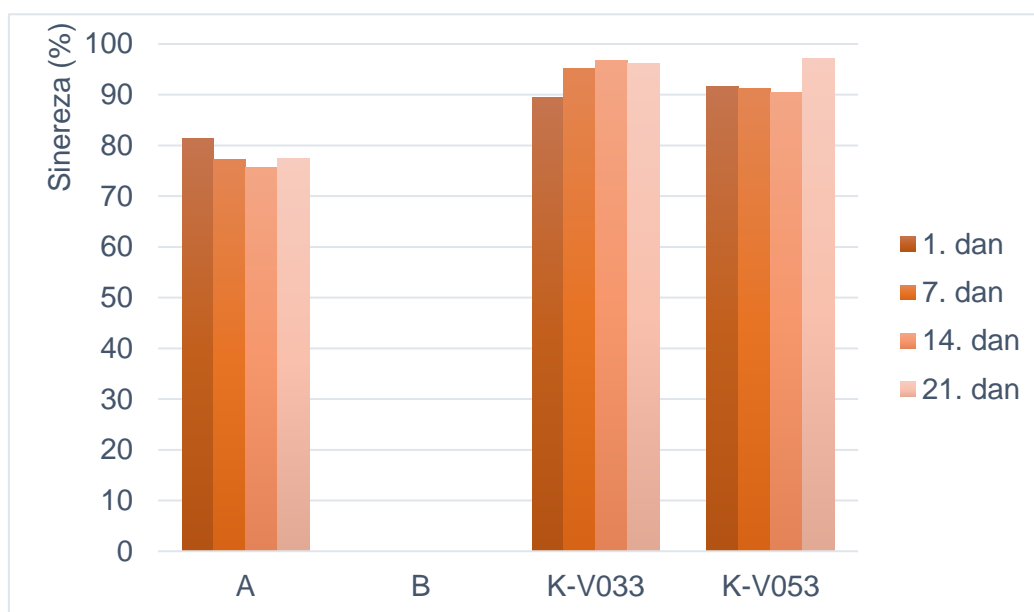
Sichani i sur. (2014.) su istražili kako se kapacitet zadržavanja vode mijenja u nemasnom jogurtu s različitim udjelom brašna sjemenki rogača. Tijekom razdoblja skladištenja, primijetili su da je jogurt s dodatkom brašna sjemenki rogača imao veći kapacitet zadržavanja vode u usporedbi s kontrolnim uzorkom, koji nije sadržavao dodatke. Ovi rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenima u ovom radu.

Na slici 12 su prikazani uzorci A i B nakon centrifugiranja, pri čemu je vidljivo da je u uzorku A došlo do taloženja brašna sjemenki rogača. Do taloženja je moglo doći jer brašno sjemenki rogača pokazuje nisku topljivost pri sobnoj temperaturi te zahtijeva toplinsku obradu kako bi se postigao najbolji kapacitet zadržavanja vode. Zagrijavanjem na 80 °C tijekom 30 minuta, brašno sjemenki rogača postiže topljivost u vodi od približno 75–80 % (Barak i Mudgil, 2014).



Slika 12. Uzorak B (lijevo) i uzorak A (desno) nakon centrifugiranja (*vlastita fotografija*)

Na slici 13 su grafički prikazane prosječne vrijednosti sinereze svih uzoraka tijekom 21 dana, izražene u postocima. Kontrolni uzorci, K-V053 i K-V033, pokazali su veću sinerezu nakon fermentacije i tijekom 21 dana skladištenja u usporedbi s uzorcima A i B. Uzorak K-V053 pokazao je povećanje sinereze s početnih 91,59 % na 97,15 %, kao i uzorak K-V033 čija je sinereza porasla s 89,36 % na 96,09 %. S druge strane, kod uzorka A primijećen je pad vrijednosti sinereze tijekom 14 dana skladištenja, s početnih 81,35 % na 75,56 %, dok je 21. dan primijećeno neznatno povećanje vrijednosti sinereze na 77,38 %. Nasuprot tome, uzorak B, nije pokazao sinerezu tijekom skladištenja, što ukazuje na njegovu stabilnost tijekom skladištenja.



Slika 13. Prosječne vrijednosti sinereze (%) svih uzoraka nakon 1., 7., 14. i 21. dana hladnog skladištenja (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 %

ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Prema istraživanju koje su proveli Sadoud i sur. (2017), primijećeno je da nemasni jogurt bez dodataka ima veću sinerezu u odnosu na nemasni jogurt s dodatkom brašna sjemenki rogača, što se slaže s rezultatima dobivenima u ovom radu. Suprotno tome, Arab i sur. (2022), primijetili su da jogurt obogaćen brašnom sjemenki rogača pokazuje veću sinerezu u usporedbi s kontrolnim jogurtom koji ne sadrži dodatke. Prema njihovim zaključcima, jogurti s dodacima su skloniji većoj sinerezi zbog promjena u proteinskoj mreži, a brašno sjemenki rogača ima manje proteina koji su potrebni za održavanje stabilnosti mreže.

4.10. SENZORSKA ANALIZA

Senzorska procjena obuhvaća različite metode testiranja, a postoje tri osnovne vrste testova – testovi razlika, testovi sklonosti te opisni testovi. Testovi razlika i opisni testovi su analitički tip testa te zahtijevaju trenirani panel, dok testovi sklonosti predstavljaju hedonistički tip testa i ne zahtijevaju trenirani panel (Marković i sur., 2017a; Lawles i Heymann, 2010).

Osnovna svrha testova sklonosti je prikupljanje mišljenja potrošača, bez obzira jesu li oni potencijalni ili stalni kupci. Senzorske procjene od strane potrošača mogu pružiti smjernice za razvoj novih proizvoda. Testovi sklonosti mogu biti kvalitativni ili kvantitativni. Kvalitativni testovi sklonosti koriste se za mjerenje subjektivnih odgovora potrošača na senzorska obilježja uzorka putem pojedinačnih intervjua ili malih skupina. S druge strane, kvantitativni testovi sklonosti koriste se za prikupljanje pojedinačnih odgovora velike skupine potrošača na pitanja preferencije i senzorskih obilježja (Marković i sur., 2017a). Prema Meilgaardu i sur. (2017), postoje dva tipa kvantitativnih testova: testovi preferencije i testovi prihvaćanja. Testovi preferencije koriste se kada proizvodi uspoređuju kao poboljšana verzija ili konkurencija, dok se testovi prihvaćanja primjenjuju za određivanje sklonosti potrošača prema proizvodu. U testovima prihvaćanja, uz razne hedonističke skale koje najbolje prikazuju razinu od neprihvatljivosti do prihvatljivosti, koriste se i kategorijske i linijske ljestvice te ljestvice procjene veličine.

U ovom istraživanju provedeno je utvrđivanje prihvatljivosti uzoraka fermentiranog bademovog napitka s dodatkom saharoze, brašna sjemenki rogača i guar gume (A), fermentiranog bademovog napitka s dodatkom saharoze, ksantana i inulina (B) te dva kontrolna uzorka (K-V033 i K-V053).

Na temelju podataka dobivenih hedonističkom skalom (tablica 5) izračunati su osnovni statistički parametri (prosječna vrijednost (\bar{x}), standardna devijacija (s), koeficijent varijabilnosti (c_v) te postotak nepoželjnosti (N), odnosno poželjnosti (P) koji su prikazani u tablici 14.

Tablica 14. Rezultati ocjenjivanja prihvatljivosti fermentiranih bademovih napitaka od strane potrošača hedonističkom skalom (A – 1 % brašno sjemenki rogača, 0,5 % guar guma, 3 % saharoza, B – 1 % ksantan, 0,5 % inulin, 3 % saharoza, K-V033 – bez dodataka, K-V053 – bez dodataka)

Moguće ocjene	Oznaka uzoraka			
	K-V033	K-V053	A	B
	Frekvencija (broj ocjenjivača)			
9	2	3	2	4
8	2	0	10	7
7	4	8	9	8
6	2	5	11	11
5	12	5	8	4
4	8	5	2	6
3	9	12	2	5
2	6	7	2	1
1	2	2	1	1
n	47	47	47	47
\bar{x}	4,40	4,47	6,09	5,88
s	1,93	2,18	1,71	1,90
c_v	43,93 %	48,69 %	28,04 %	32,39 %
N	53,19 %	55,32 %	14,89 %	27,66 %
P	46,81 %	44,68 %	85,11 %	72,34 %

n – ukupan broj ispitanika, \bar{x} - prosječna vrijednost, s – standardna devijacija, c_v – koeficijent varijabilnosti, N – postotak nepoželjnosti, P – postotak poželjnosti

Iz dobivenih podataka za izražavanje prihvatljivosti proizvoda vidljivo je da se prosječna vrijednost ocjene kretala između 4,40 i 6,09, a izračunati postotak poželjnosti između 44,68 % i 85,11 %. Nijedan uzorak se ne smatra prihvatljivim jer imaju prosječnu ocjenu manju od 7. Najveću ocjenu ($\bar{x} = 6,09$) i postotak poželjnosti (85,11 %) dobio je fermentirani bademov napitak s dodatkom brašna sjemenki rogača, guar gume te saharoze, a nešto nižu ocjenu dobio je fermentirani bademov napitak s dodatkom ksantana, inulina i saharoze. Kontrolni uzorci ocijenjeni su znatno nižim ocjenama (oko 4,40) te im je postotak poželjnosti također znatno niži od uzoraka A i B, što se može pripisati tome da ne sadrže dodane zaslađivače i stabilizatore.

Analiza varijance (tablica 15) pokazuje da postoje statistički značajne razlike između ispitivanih uzoraka (izračunata F vrijednost veća je od granične vrijednosti očitane iz statističkih

tablica). Kako bi se utvrdilo koji su uzorci međusobno statistički različiti, proveden je Duncanov test. Pokazalo se da nema statistički značajne razlike između dva kontrolna uzorka bez dodataka, K-V033 i K-V053. Također, nema statistički značajne razlike između fermentiranog bademovog napitka s dodatkom brašna sjemenki rogača, guar gume i saharoze (A) te fermentiranog bademovog napitka s dodatkom saharoze, ksantana i inulina (B). Međutim, postoje statistički značajne razlike između fermentiranog bademovog napitka s dodatkom saharoze, brašna sjemenki rogača i guar gume (A) te oba kontrolna uzorka (K-V033 i K-V053), kao i između fermentiranog bademovog napitka s dodatkom saharoze, ksantana i inulina (B) te oba kontrolna uzorka (K-V033 i K-V053).

Tablica 15. Analiza varijance podataka iz tablice 14.

Izvor varijance	Sume kvadrata	Stupnjevi slobode	Prosjeci kvadrata	F
Između proizvoda	113,664	3	37,888	9,341
Analitička greška	764,287	184	4,056	/
Ukupno	859,951	187	/	/

$F_{0,05} (3/184)=2,65$

Sveukupno gledano, prihvatljivost fermentiranih bademovih napitaka bez dodataka bila je najmanja, a prihvatljivost fermentiranih bademovih napitaka s dodacima bila je najveća. Rezultati ispitivanja pokazali su zainteresiranost potrošača za ovu vrstu proizvoda pa daljnja ispitivanja treba usmjeriti na poboljšanje kvalitete u smislu senzorskih i mikrobioloških parametara proizvoda.

5. ZAKLJUČCI

1. Fermentirani bademovi napitci imali su stabilnu pH vrijednost (4,31 - 5,04) tijekom skladištenja, a uzorak A imao je niže prosječne pH vrijednosti (4,31 - 4,46) u usporedbi sa svim ostalim uzorcima.
2. Uzorci s dodacima imali su veći udio suhe tvari i mineralnih tvari u usporedbi s kontrolnim uzorcima, što je vjerojatno posljedica dodatka brašna sjemenki rogača, guar gume, ksantana, inulina i saharoze.
3. Svi fermentirani bademovi napitci su nenevtonske tekućine. Uzorci s dodacima pokazuju karakteristike pseudoplastičnih fluida, a kontrolni uzorci karakteristike dilatantnih fluida. Također, rezultati pokazuju da brašno sjemenki rogača, ksantan, guar guma i inulin značajno povećavaju viskoznost uzoraka.
4. Uzorci s dodacima su nakon fermentacije imali nezadovoljavajuće mikrobiološke parametre u pogledu preporučenih vrijednosti za enterobakterije, aerobne mezofilne bakterije te kvasce i plijesni. Stoga bi u daljnjem razvoju recepture trebalo primjenjivati režime toplinske obrade na temperaturama višim od 72 °C.
5. Najveći udio ugljikohidrata (3,2 %) imao je uzorak B s dodatkom 1 % ksantana, 0,5 % inulina i 3 % saharoze, dok su kontrolni uzorci imali udio ugljikohidrata manji od 2 %.
6. Određivanjem boje utvrđeno je da su kontrolni uzorci tamniji od uzoraka s dodacima, a uzorak A s dodatkom 1 % brašna sjemenki rogača, 0,5 % guar gume i 3 % saharoze pokazuje veću razliku u promjeni boje u odnosu na kontrolni uzorak, nego uzorak B.
7. Najveći kapacitet zadržavanja vode imao je uzorak B s dodatkom 1 % ksantana, 0,5 % inulina i 3 % saharoze te nije pokazao sinerezu, dok su kontrolni uzorci imali veću sinerezu u usporedbi s uzorcima s dodacima.
8. Senzorskom analizom utvrđeno je da najbolje prihvaćen uzorak A dobiven fermentacijom bademovog napitka s dodatkom 1 % brašna sjemenki rogača, 0,5 % guar gume i 3 % saharoze.
9. Uzimajući u obzir sve dobivene rezultate, najveći potencijal za daljnji razvoj pokazao je uzorak A dobiven fermentacijom bademovog napitka s dodatkom 1 % brašna sjemenki rogača, 0,5 % guar gume i 3 % saharoze.

5. LITERATURA

Ahmed IK, Jassem MA (2022) Chemical and Micro Faces for Almonds Limited Limits. *IAR J Nut Food Sci* **3**, 17–22. <https://doi.org/10.47310/IARJNFS2022.V03I02.004>

Ajogun CO, Achinewhu SC, Kiin-Kabari DB, Akusu OM (2023) Physicochemical Characteristics and Sensory Properties of Coconut Milk Based Yoghurt. *Res J Food Sci Quality Control* **9**, 92-104. <https://doi.org/10.56201/rjfsqc.v9.no3.2023.pg92.104>

AL Zahrani AJ, Shori AB (2023) Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT* **176**, 114531. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114531>

Amaral TN, Junqueira LA, Prado MET, Cirillo MA, de Abreu LR, Costa FF i sur. (2018) Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. *Food Hydrocoll* **79**, 331–342. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.01.009>

Angelino D, Rosi A, Vici G, Dello Russo M, Pellegrini N, Martini D (2020) Nutritional Quality of Plant – Based Drinks Sold in Italy: The Food Labelling of Italian Products (FLIP) Study. *Foods* **9**, 682. <https://doi.org/10.3390/foods9050682>

Arab R, Hano C, Oomah BD, Yous F, Ayouaz S, Madani K, Makhlof LB (2022) Impact of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp flour supplementation on probiotic viability, milk fermentation and antioxidant capacity during yogurt storage. *Afr J Food Nutr Res* **6(14)**, 154-164. <https://doi.org/10.51745/najfnr.6.14.154-164>.

Aydar EF, Tutuncu S, Ozcelik B (2020) Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *J Funct Foods* **70**, 103975. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103975>

Barak S, Mudgil D (2014) Locust bean gum: Processing properties and food applications – A review, *Int J Biol Macromol* **66**, 74-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.017>

Barkallah M, Dammak M, Louati I, Hentati F, Hadrich B, Mechichi T, Ayadi MA, Fendri I, Attia H, Abdelkafi S (2017) Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT* **84**, 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071>

Bernat N, Cháfer M, Chiralt A, González-Martínez C (2014) Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *Int J Food Sci Technol* **49**, 2553–2562. <https://doi.org/10.1111/IJFS.12585>

Bernat N, Cháfer M, Chiralt A, Laparra JM, González-Martínez C (2015) Almond milk fermented with different potentially probiotic bacteria improves iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Int J Food Stud* **4**, 49–60. <https://doi.org/10.7455/ijfs/4.1.2015.a4>

Bozhigitova D (2020) Impact of bioprocessing on the properties of sorghum and cowpea flours nutrifoos (završni rad) <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30692.91529>

Božanić R, Tratnik Lj, Marić O (2000) Senzorska svojstva i prihvatljivost jogurta i aromatiziranog jogurta proizvedenog od kozjeg i kravljeg mlijeka, *Mljekarstvo*, **50(3)**, 199-208. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/93282> (Datum pristupa: 09.01.2024.)

Božanić R, Tratnik Lj, Parat M (2001) Prihvatljivost jogurta i probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **51** (4), 317-326. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/1915> (Datum pristupa: 09.01.2024.)

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

Božanić R, Lovković S, Jeličić I (2011) Optimising fermentation of soymilk with probiotic bacteria. *Czech J Food Sci*, **29**, 51-56. <https://doi.org/10.17221/97/2010-CJFS>

Burrowes R, Hekmat S (2023) Development of probiotic yogurt from almond and cow's milk using *Lactocaseibacillus rhamnosus* GR-1. *Nutr Food Sci* **53**, 995–1004. <https://doi.org/10.1108/NFS-06-2022-0194>

Camacho MM, Martínez-Navarrete N, Chiralt A (2005) Rheological characterization of experimental dairy creams formulated with locust bean gum (LBG) and λ -carrageenan combinations. *Int Dairy J* **15**, 243–248. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.07.008>

Devnani B, Ong L, Kentish S, Gras S (2020) Heat induced denaturation, aggregation and gelation of almond proteins in skim and full fat almond milk. *Food Chem* **325** 126901. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126901>

Devnani B, Ong L, Kentish SE, Scales PJ, Gras SL (2022) Physicochemical and rheological properties of commercial almond-based yoghurt alternatives to dairy and soy yoghurts. *Future Foods* **6**, 100185. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2022.100185>

Deziderio MA, de Souza HF, Kamimura ES, Petrus RR (2023) Plant-Based Fermented Beverages: Development and Characterization. *Foods* **12**, 4128. <https://doi.org/10.3390/FOODS12224128>

Dhakar D, Younas T, Bhusal RP, Devkota L, Henry CJ, Dhital S (2023) Design rules of plant-based yoghurt-mimic: Formulation, functionality, sensory profile and nutritional value. *Food Hydrocoll* **142**, 108786. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108786>

Dobričević N, Voća S, Šic Žlabur J, Plietić S, Galić A (2014) Sjemenke rogača kao prirodni ugušćivač džemova od voća. U: Šimunović V, Strikić F (ured). Zbornik sažetaka 9. znanstveno-stručnog savjetovanja hrvatskih voćara s međunarodnim sudjelovanjem, Split, str. 74.

Dragojević Müller, I (2017) Morfološke, genetske i fitokemijske značajke populacije rogača u Hrvatskoj (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Froio F, Cristiano MC, Mancuso A, Iannone M, Paolino D (2020) Vegetable Milk Based Yogurt Like Structure: Rheological Properties Influenced by Gluten-Free Carob Seed Flour. *Appl Sci* **10**, 1-15. <https://doi.org/10.3390/app10196963>

Gänzle M (2022) The periodic table of fermented foods: limitations and opportunities. *Appl Microbiol Biotechnol* **106**, 2815–2826. <https://doi.org/10.1007/S00253-022-11909-Y>

Gilbert A, Rioux LE, St-Gelais D, Turgeon SL (2020) Characterization of syneresis phenomena in stirred acid milk gel using low frequency nuclear magnetic resonance on hydrogen and image analyses. *Food Hydrocoll*, **106**, 105907. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105907>

Grasso N, Alonso-MiravallesL, O'Mahony JA (2020) Composition, Physicochemical and

Sensorial Properties of Commercial Plant-Based Yogurts. *Foods* **9(3)**, 252. <https://doi.org/10.3390/foods9030252>

Hadjimbei E, Botsaris G, Chrysostomou S (2022) Beneficial Effects of Yoghurts and Probiotic Fermented Milks and Their Functional Food Potential. *Foods* **11(17)**, 2691. <https://doi.org/10.3390/foods11172691>

Hew JX, Shafie SR, Sulaiman N (2023) Proximate Composition and Antimicrobial Activity of Kefir Produced from Cow's and Almond Milk: Proximate composition and antimicrobial activity of kefir mixtures. *J Trop Life Sci* **13**, 287–296. <https://doi.org/10.11594/JTLS.13.02.06>

Harper AR, Dobson RCJ, Morris VK, Moggré GJ (2022) Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria. *Microb Biotechnol* **15**, 1404–1421. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14008>

Hickisch A, Beer R, Vogel RF, Toelstede S (2016) Influence of lupin-based milk alternative heat treatment and exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the physical characteristics of lupin-based yogurt alternatives. *Food Res Int* **84**, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.037>

Horvat H (2023) Primjena hidrokoloida u prehrambenoj industriji (završni rad), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.

Kholy E, Wedad M, Reda AA, Zedan MA (2015) Production, purification of locust bean gum and carob dibil and their application in manufacture of yoghurt. Egypt. *J Agric Res* **93 (4)**, 1271-1292. <https://doi.org/10.21608/EJAR.2015.157067>

Korc E, Varga, L (2021) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends Food Sci Technol*, **110**, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>

Lawless HT, Heymann H (2010) Sensory evaluation of food: principles and practices, 2. izd., Springer, New York.

Lelas V (2006) Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo 1. Fizička svojstva hrane. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.

Li J, Nie S (2016) The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocoll* **53**, 46 – 61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.035>

Makras L, Van Acker G, De Vuyst L (2005) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl Environ Microb* **71(11)**, 6531-6537. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6531-6537.2005>

Manasa R, Harshita M, Prakruthi M, Shekahara Naik R, Mhesh S (2020) Non-dairy plant based beverages: A comprehensive review. *Pharma Innov J* **9(10)**, 258-271. <https://www.thepharmajournal.com/>

Manzoor M, Singh J, Bandral JD, Gani A, Shams R (2020) Food hydrocolloids: Functional, nutraceutical and novel applications for delivery of bioactive compounds. *Int J Biol Macromol* **165**, 554–567. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.09.182>

Marković K, Vahčić N, Hruškar M (2017a) Interna skripta senzorske analize hrane. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Mauro CSI, Garcia S (2019) Coconut milk beverage fermented by *Lactobacillus reuteri*: optimization process and stability during refrigerated storage. *J Food Sci Technol*, **56(2)**, 854–864. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3545-8>

McGuire RG (1992) Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience* **27**, 1254–1255. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.12.1254>.

Meilgaard M, Civille GV, Carr BT (2007) Sensory Evaluation Techniques, 4. izd., *CRC Press Taylor & Francis Group*, Boca Raton/London/New York.

Milani J, Maleki G (2012) Hydrocolloids in Food Industry. U: Valdez B (ured.) Food Industrial Processes - Methods and Equipment, InTech, London

Mokrzycki W, Tatol M (2011) Color difference Delta E – A survey. *Mach Graph Vis* **20(4)**, 383-411.

Montemurro M, Pontonio E, Coda R, Rizzello CG (2021) Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. *Foods* **10(2)**, 316 <https://doi.org/10.3390/foods10020316>

Morreale F, Benavent-Gil Y, Rosell CM (2019) Inulin enrichment of gluten free breads: Interaction between inulin and yeast. *Food Chem* **278**, 545–551. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.11.066>

Oral O, Kavas N, Kavas G (2023) Almond milk-based yogurt: a new perspective for athlete nutrition. *Sci Chron* **28(2)**, 263-275.

Pachekrepapol U, Kokhuenkhan Y, Ongsawat J (2021) Formulation of yogurt-like product from coconut milk and evaluation of physicochemical, rheological, and sensory properties. *Int J Gastron Food Sci* **25**, 100393. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2021.100393>

Pirsa S, Hafezi K.(2022) Hydrocolloids: Structure, preparation method, and application in food industry, *Food Chem* **399(3)**, 13396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133967>

Pravilnik (2003) Pravilnik o metodah in postopkih ugotavljanja skladnosti kmetijskih pridelkov oziroma živil, Uradni list RS 84, Ljubljana. <https://pisrs.si/pregledPredpisa?id=PRAV4468> Pristupljeno 02. srpnja 2023.

Pravilnik (2009) Pravilnik o šekerima i metodama analiza šećera namijenjenih za konzumaciju, Narodne novine 39, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_03_39_893.html Pristupljeno 03. srpnja 2023.

Pravilnik (2010) Pravilnik o prehrambenim aditivima, Narodne novine 62, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_05_62_1981.html Pristupljeno 15. svibnja 2024.

Rehman S, Awan JA, Anjum FM, Randhawa M (2014) Antinutrients and Toxicity in Plant-based Foods. U: Bhat R, Gómez-López VM (ured.) *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Direction*, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, str. 311-339.

Sá, AGA, House, JD (2024) Protein quality of cereals: Digestibility determination and processing impacts. *J Cereal Sci* **117**, 103892. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.103892>

Sadoud M, Ziar H, Riazi A (2022) Effect of carob galactomannans on starter culture viability and on textural properties of refrigerated non-fat yoghurt. *J Appl Biol Sci* **16(2)**, 296-307. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6590482>

Sethi S, Tyagi SK, Anurag RK (2016) Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J Food Sci Technol* **53**, 3408–3423. <https://doi.org/10.1007/S13197-016-2328-3>

Shi H, Kraft J, Guo M (2020) Physicochemical and microstructural properties and probiotic survivability of symbiotic almond yogurt alternative using polymerized whey protein as a gelation agent. *J Food Sci* **85**, 3450–3458. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15431>

Shori AB, Al Zahrani AJ (2021) Non-dairy plant-based milk products as alternatives to conventional dairy products for delivering probiotics. *Food Sci Technol* **42**, e101321. <https://doi.org/10.1590/FST.101321>

Sichani MS, Ardakani SA, Daneshi M (2014) The effect of cress seed gum and locust bean gum on textural properties of low fat set yoghurt. *Indian J Sci Res* **5 (1)**, 439-445.

Sirbu A, Arghire C (2017) Functional bread: Effect of inulin-type products addition on dough rheology and bread quality. *J Cereal Sci* **75**, 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2017.03.029>

Song X, Sun X, Ban Q, Cheng J, Zhang S, Guo M (2020) Gelation and microstructural properties of a millet-based yogurt-like product using polymerized whey protein and xanthan gum as thickening agents. *J Food Sci* **85**, 3927–3933. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15504>

Srečec S, Kremer D, Dragojević Müller I, Dunkić V, Erhatic R, (2020) Morfologija rogača, cvatnja i formiranje ploda. U: Tomić F (ured.) *Taksonomija, ekologija i uporaba rogača (Ceratonia siliqua L.) i lovora (Laurus nobilis L.) u Hrvatskoj*, Zavod za znanstveni rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti Koprivničko-križevačke županije, Zagreb/Križevci, str. 26-41.

Stone H, Sidel JJ (2004) *Sensory evaluation practices*, 3. izd., Elsevier Academic Press, San Diego, California, SAD, str. 255.

Šipič R (2024) Superhrana – kdaj jo uživamo in zakaj – Delo. <https://old.delo.si/druzba/odprta-kuhinja/superhrana-kdaj-jo-uzivamo-in-zakaj.html> Pristupljeno 14. lipnja 2024.

Španjol Ž, Dorbić B, Vučetić M (2020) Rogač (*Ceratonia siliqua L.*)-šumska voćkarica pogodna u prevenciji i obnovi izgorjenih površina na kršu. *Vatrogastvo i upravljanje požarima* **X(1-2)**, 5–24.

Tangyu M, Muller J, Bolten CJ, Wittmann C (2019) Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 9263–9275. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10175-9/FIGURES/6>

Topcuoglu E, Yilmaz-Ersan L (2020) Effect of fortification with almond milk on quality characteristics of probiotic yoghurt. *J Food Process Preserv* **44**, e14943. <https://doi.org/10.1111/JFPP.14943>

Uzuner AE, Kinik O, Korel F, Yildiz G, Yerlikaya O (2016) Usage of rice milk in probiotic yoghurt production. *Carpath J Food Sci Technol* **8(4)**, 5-25.

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

Vanga SK, Raghavan V (2018) How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? *J Food Sci Technol* **55**, 10. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2915-Y>

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (lipanj, 2009) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb, Republika Hrvatska.

Wan X, Guo H, Liang Y, Zhou C, Liu Z, Li K, i sur. (2020) The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: A review. *Carbohydr Polym* **246**, 116589. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116589>

Winans KS, Macadam-Somer I, Kendall A, Geyer R, Marvinney E (2020) Life cycle assessment of California unsweetened almond milk. *Int J Life Cycle Ass* **25**, 577–587. <https://doi.org/10.1007/S11367-019-01716-5>

Yemenicioğlu A, Farris S, Turkyilmaz M, Gulec S (2020) A review of current and future food applications of natural hydrocolloids. *Int J Food Sci Technol* **55**, 1389–1406. <https://doi.org/10.1111/IJFS.14363>

Zaaboul F, Raza H, Cao C, Yuanfa L (2019) The impact of roasting, high pressure homogenization and sterilization on peanut milk and its oil bodies. *Food Chem* **280**, 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.047>

Zhao J, Bhandari B, Gaiani C, Prakash S (2021) Physicochemical and microstructural properties of fermentation-induced almond emulsion-filled gels with varying concentrations of protein, fat and sugar contents. *Curr Res Food Sci* **4**, 577–587. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.08.007>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Maja Cvetko izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis