

Praćenje odabranih parametara kvalitete enzimski koaguliranog sira s jestivim premazom na bazi proteina sirutke

Cetin, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:907604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Sara Cetin
0178117158**

**PRAĆENJE ODABRANIH PARAMETARA
KVALITETE ENZIMSKI KOAGULIRANOG SIRA S
JESTIVIM PREMAZOM NA BAZI PROTEINA
SIRUTKE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

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

Zagreb, 2023.

Projekt

Rad je izrađen u sklopu projekta SIRENA Modifikacija procesa zrenja sira i razvoj proizvoda na bazi sirutke, br. Ugovora KK.01.1.1.04.0096, sufinanciranom iz sredstava Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj, pod voditeljstvom izv.prof. Marijane Blažić, Veleučilište u Karlovcu.



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Praćenje odabranih parametara kvalitete enzimski koaguliranog sira s jestivim premazom na bazi proteina sirutke

Sara Cetin, 0178117158

Sažetak: U ovom radu pratili su se parametri kvalitete enzimski koaguliranog sira na koji je nanesen jestivi premaz na bazi proteina sirutke s ili bez dodatka ekstrakta lista masline. Proizvedeni sirevi dozrijevali su 60 dana, a uzorkovanje se provodilo 1., 15., 30., 45. i 60. dan. Svim uzorcima određena je pH vrijednost, antioksidacijski kapacitet DPPH metodom, udio suhe tvari, pepela i proteina te je provedena mikrobiološka analiza sireva. Cilj je bio usporediti parametre kvalitete sireva s jestivim premazom i dodanim ekstraktom lista masline s uzorkom bez premaza. Temeljem dobivenih rezultata vidljivo je da se sirevi s jestivim premazom na bazi proteina sirutke ne razlikuju bitno od kontrolnog sira, odnosno obje vrste uzoraka pokazuju vrlo slične trendove u pogledu smanjenja pH vrijednosti i udjela pepela. Međutim, primjena jestivog premaza pokazala je pozitivne učinke na povećanje udjela proteina u siru, a premazi obogaćeni ekstraktom lista masline utjecali su na povećanje antioksidacijskog kapaciteta sireva te su pokazali antimikrobni učinak pred kraj zrenja što je rezultiralo boljom mikrobiološkom kvalitetom sireva.

Ključne riječi: sir, jestivi premaz, antioksidacijski kapacitet, mikrobiološka analiza, ekstrakt lista masline

Rad sadrži: 27 stranica, 3 slike, 4 tablice, 24 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Datum obrane: 14. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Monitoring performance parameters of enzymatically coagulated cheese with an edible whey protein based coating

Sara Cetin, 0178117158

Abstract: In this study, the quality parameters of enzymatically coagulated cheese with an edible coating based on whey protein with or without the addition of olive leaf extract were examined. The produced cheeses were matured for 60 days, and samples were taken on days 1, 15, 30, 45, and 60. All samples were analyzed for pH value, antioxidant capacity by the DPPH method, dry matter, ash and protein content, and a microbiological analysis of the cheeses was conducted. The aim was to compare the quality parameters of cheeses with an edible coating and added olive leaf extract with samples without a coating. Based on the results obtained, it is evident that cheeses with an edible coating based on whey protein do not differ significantly from the control cheese, as both types of samples showed a decrease in pH value and ash content to very similar values. However, the application of an edible coating showed positive effects on increasing the protein content in the cheese, and coatings enriched with olive leaf extract influenced the increase in the antioxidant capacity of the cheeses and exhibited antimicrobial effects towards the end of maturation, resulting in better microbiological quality of the cheeses.

Keywords: cheese, edible coating, antioxidant capacity, microbiological analysis, olive leaf extract

Thesis contains: 27 pages, 3 figures, 4 tables, 24 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate Professor

Thesis defended: July 14, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE SIRA	2
2.1.1. Odabir i čuvanje mlijeka	2
2.1.2. Standardizacija udjela mliječne masti u mlijeku	2
2.1.3. Toplinska obrada mlijeka	3
2.1.4. Dodavanje sirila i sirenje mlijeka	3
2.1.5. Obrada gruša.....	4
2.1.6. Oblikovanje i prešanje sira	4
2.1.7. Soljenje sira	5
2.1.8. Zrenje sira.....	5
2.2. JESTIVI PREMAZI	6
2.2.1. Proteinski premazi	7
2.2.2. Upotreba antimikrobnih sredstava u jestivim premazima	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Kemikalije i reagensi	8
3.1.2. Aparatura	9
3.2. METODE	10
3.2.1. Priprema jestivog premaza na bazi proteina sirutke	10
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti sira.....	10
3.2.3. Određivanje udjela proteina u siru metodom po Kjeldahlu (Kjeltec metoda).....	11
3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u siru	12
3.2.5. Određivanje udjela pepela	12
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorku sira DPPH metodom	13
3.2.7. Mikrobiološka analiza sira	14
3.2.8. Obrada podataka.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. REZULTATI MJERENJA pH VRIJEDNOSTI	16
4.2. REZULTATI ANALIZE UDJELA PROTEINA U SIRU METODOM PO KJELDAHU 17	
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNE SUHE TVARI I PEPELA	18
4.4. REZULTATI ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ODREĐENOG DPPH METODOM	19
4.5. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE UZORAKA SIRA	20

5. ZAKLJUČCI	24
6. LITERATURA.....	26

1.UVOD

Prema općoj definiciji sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke ili kombinacijom navedenih sirovina (Tratnik i Božanić, 2012).

Arheološka istraživanja u području današnjeg Iraka, u plodnoj dolini između rijeka Eufrat i Tigris, upućuju na postojanje sira prije nekih 8000 godina (Božanić, 2015). Vještina proizvodnje sira razvijala se stoljećima u svrhu što kvalitetnije prehrane ljudi, ali i konzerviranja te čuvanja mlijeka na što duži period. Pojedine zemlje i regije tih zemalja razvile su specifične te vrlo različite postupke proizvodnje sira stoga suvremena civilizacija danas posjeduje velik broj različitih vrsta sira (Matijević, 2015).

Opće poznata činjenica danas je da su mlijeko, fermentirano mlijeko i sir osnova pravilne prehrane. Osim što pružaju užitak brojnim gurmanima, sirevi su izvor hranjivih tvari i to u oblicima koje organizam može s lakoćom iskoristiti. Također su dobar izvor vitamina topljivih u mastima (vitamini A, D, E, K) i vitamina topljivih u vodi (vitamini B skupine: B1, B2, B6, B9 i B12), ali i mineralnih tvari osobito kalcija, fosfora i magnezija (Kalit, 2015).

Sir zbog svojega sastava, načina proizvodnje i skladištenja predstavlja lako kvarljivu namirnicu. Najčešći uzročnici kvarenja su bakterije, kvasci i plijesni. U proizvodnji sira primjenjuju se jestivi filmovi i premazi da bi se produžio rok valjanosti, ali i poboljšala kvaliteta. Razvoj jestivih materijala potaknuto je povećanom potražnjom potrošača za novim ekološki prihvatljivim materijalima. Filmovi i premazi na bazi prirodnih materijala dokazano produljuju rok trajanja sira i ne utječu značajno na smanjenje kvalitete sira. Mogu utjecati na očuvanje okusa, boje i hranjive vrijednosti sira, što doprinosi poboljšavanju kvalitete sira. Također pružaju mogućnost ugradnje antimikrobnih tvari koje djeluju kao dodatna zaštita protiv neželjenih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenja sira. (Božanić i sur., 2022)

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati mogućnost primjene jestivog premaza s ekstraktom lista masline u proizvodnji polutvrđog sira. Praćeni su određeni parametri kvalitete sira unutar kojih je pH vrijednosti, ukupna suhe tvar, udio pepela, udio proteina metodom po Kjeldahlu, antioksidacijski kapacitet DPPH metodom te mikrobiološka analiza uzoraka sira. Budući da je sir lako kvarljiva namirnica kratkog roka trajanja ispitivalo se hoće li dodatak ekstrakta lista masline koji ima antimikrobna svojstva utjecati na mikrobiološka svojstva sira.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE SIRA

U proizvodnji sira postoje tehnološki postupci koji su zajednički kod svih vrsta sireva, oni obuhvaćaju sirenje ili grušanje mlijeka, sušenje gruša i oblikovanje sirnog zrna. Također pri daljnjoj obradi gruša razlikujemo specifične postupke za proizvodnju određene vrste sira. Postoje dva glavna cilja tehnologije proizvodnje sira, ustanoviti parametre koji siru daju zadana i poželjna svojstva (okus, miris, aroma, tekstura, topljivost i sposobnost razvlačenja), te izraditi protokol proizvodnje i zrenja sira, čime se osigurava ujednačena kvaliteta gotovog proizvoda. (Havranek i sur., 2014)

2.1.1. Odabir i čuvanje mlijeka

Tratnik i Božanić (2012) navode da je količina proteina u mlijeku najvažnija pri proizvodnji sira te da je bitno sačuvati svojstva kazeina radi većeg prinosa i bolje kvalitete sira. Isto tako treba osigurati dovoljnu količinu topljivog kalcija koji je kasnije potreban za sirenje mlijeka djelovanjem enzima. Pošto bi visoka toplinska obrada mlijeka smanjila njegovu sposobnost za sirenje ona se ne smije primijeniti stoga mlijeko mora biti higijenski proizvedeno i što prije prerađeno u sir. Ako se mlijeko dulje hladno skladišti slabi njegovo svojstvo sirenja, jer dolazi do razgradnje kazeina i smanjenja topljivog kalcija u mlijeku. Također moguće su nepoželjnih promjena izazvane prisutnošću mikroorganizama. Ipak ako se mlijeko ne može odmah preraditi u sir, potrebno ga je termalizirati pri 63-69 °C/10-60 sekundi te čuvati pri temperaturi 2-3 °C. Termalizacija će privremeno inhibirati rast bakterija ali neće inaktivirati njihove enzime dakle ona ne može biti zamjena za pasterizaciju. Prije same proizvodnje sira svakako se mora provesti kontrola kvalitete mlijeka.

2.1.2. Standardizacija udjela mliječne masti u mlijeku

Standardizacija sadržaja mliječne masti odnosno tipizacija mlijeka, smatra se jednim od najvažnijih postupaka pripreme mlijeka za sirenje. Ona se provodi obiranjem mliječne masti iz punomasnog mlijeka ili dodatkom obranog mlijeka u prahu. Mast u mlijeku za sirenje tipizira se zato što razne vrste sireva sadrže različit standardni udio masti u suhoj tvari sira. Kako bi se izračunala potrebna količina dodanoga obranog mlijeka tijekom standardizacije mliječne masti u kotlu za sirenje, koristi se Pearsonov kvadrat (Havranek i sur., 2014). Nadalje u suvremenoj

proizvodnji sira prema Tratnik i Božanić (2012) prakticira se u mlijeku standardizirati omjer kazeina i mliječne masti kako bi se osigurala svojstvena konzistencija, tipična tekstura i maksimalni prinos sira.

2.1.3. Toplinska obrada mlijeka

U industrijskom sirarstvu najvažniji cilj pasterizacije mlijeka je uništavanje svih patogenih mikroorganizama i smanjenje većine ostalih vegetativnih mikroorganizama. Time se osigurava zdravstvena ispravnost sireva. Ovisno o temperaturnom režimu, pasterizacija mlijeka utječe na fizikalna i kemijska svojstva mlijeka za sirenje koje se toplinski može obraditi na više načina. Za manje količine mlijeka primjenjuje se niska pasterizacija pri 63-65 °C/30 minuta, kojom se neznatno mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva mlijeka. U velikim pogonima najčešće se upotrebljava kratkotrajna srednja pasterizacija uglavnom u izmjenjivačima topline pri 72-75 °C/15 - 20 sekundi. Kada se zbog loše mikrobiološke kvalitete mlijeka treba primijeniti temperaturu pasterizacije višu od 80 °C tada je smanjena sposobnost zgrušavanja mlijeka sirilom. Takva pojava ispravlja se dodatkom kalcijeva klorida ili kalcijeva laktata u mlijeko za sirenje (Havranek i sur., 2014). Međutim niti toplinska obrada mlijeka ne garantira vrhunsku mikrobiološku kvalitetu sira jer se neće uništiti prisutne spore sporogenih bakterija. Shodno tome mlijeko se prethodno može obraditi baktofugacijom ili mikrofiltracijom da bi se osigurala njegova bakteriološka kvaliteta i poželjne značajke sira (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.4. Dodavanje sirila i sirenje mlijeka

Prema Havranek i sur. (2014) zgrušavanje mlijeka ključna je faza prijelaza mlijeka u sir. Najrašireniji postupak zgrušavanja mlijeka u proizvodnji sira je onaj primjenom sirila. Sirilo sadrži sirišni enzim kimozin i pepsin u različitom omjeru koji ovisi o starosti i hranidbi životinje. Sirilo teladi hranjene isključivo mlijekom smatra se idealnim enzimatskim pripravkom za proizvodnju sira, zbog velikog sadržaja kimozina (od 80 do 90 %). Posljedica aktivnosti kimozina na kazeinu utječe na njegovu promjenu koja se vidi kao nastajanje gruš. Kimozin se smatra prikladnim za sirarstvo jer daje slatki gruš, nema mirisa i ne uzrokuje gorčinu budući da je riječ o proteolitičkom enzimu koji uvjetuje ograničenu proteolizu. Prije dodavanja u mlijeko za sirenje, sirilo treba razrijediti do 10 puta destiliranom vodom. Neposredno nakon dodavanja sirila, mlijeko je potrebno dobro izmiješati kako bi se sirilo jednolično raspodijelilo u mlijeku. Brzina zgrušavanja mlijeka proporcionalna je koncentraciji

dodanog enzima.

Zgrušavanje mlijeka sirilom najčešće se provodi na temperaturi od 31 do 35 °C i odvija se u tri faze koje predstavljaju Tratnik i Božanić (2012), a to su primarna enzimska, sekundarna neenzimska i tercijarna faza. Tijekom primarne faze odvija se hidroliza K-kazeina koji se nalazi na površini micela (na udaru je djelovanja enzima) što dovodi do destabilizacije micela kazeina. U mlijeku se hidrolizira oko 80 % K-kazeina. U sekundarnoj fazi dolazi do agregacije promijenjenih micela uz prisutnost kalcijevih iona. Kako hidroliza napreduje povećava se stupanj agregacije. Tercijarna faza najmanje je objašnjena, a u nju se ubraja proces sinereze i daljnja nespecifična proteoliza kazeinskoga gruš.

Najčešća metoda za određivanje završetka zgrušavanja, je uranjanje ruke ili štapa u gruš i podizanje gruš pri čemu on puca. Pokazatelj da je gruš spreman za rezanje predstavlja jasna pukotina sa zelenom sirutkom u bazi.

2.1.5. Obrada gruš

Havranek i sur. (2014) navode da je svrha obrade oblikovati sirna zrna iz gruš i iz njih izdvojiti potrebnu količinu sirutke, o čemu kasnije ovise konzistencija, tvrdoća, zrenje, okus, aroma, kvaliteta i vrsta sira. Prvu fazu odvajanja sirutke omogućava rezanje gruš koje se najčešće izvodi sirarskom sabljom ili harfom. Gruš dobiven rezanjem drobi se sirnom lopaticom te usitnjava na komade pa na jednaka zrna, karakteristična za određenu vrstu sira. Kako bi se omogućilo još bolje izdvajanje sirutke tj. sinereza, gruš se dogrijava pri temperaturi od 35-40 °C. Dogrijava se provodi postepeno kako bi nastala proteinska membrana koja će omogućiti dehidraciju gruš. Membrana zadržava mast u unutrašnjosti sirnog zrna, a mali otvori na površini omogućuju izlazak sirutke. Ona ujedno štiti sadržaj sirnog zrna od mehaničkih oštećenja. Po završetku sinereze gruš se prebacuje u posebno oblikovana cjedila.

2.1.6. Oblikovanje i prešanje sira

Izvađena sirna gruda premješta se iz sirarskog kotla u perforirane kalupe za sir. Oni mogu biti plastični ili metalni, različite veličine i oblika te su većinom perforirani da bi se omogućilo daljnje istjecanje sirutke (Tratnik i Božanić, 2012). Kalupi sa sirom slažu se u različite vrste preša. Zadatak prešanja sira je povezivanje sirnog zrna u kompaktnu sirnu masu, izdvajanje zaostale sirutke, oblikovanje sira i stvaranje kore. Stvaranje kore tj. zatvaranje vanjske površine sira bitno je kako bi ona bila bez pukotina u koje bi mogli doprijeti različiti mikroorganizmi.

Sirno zrno za vrijeme prešanja mora biti toplo, temperature više od 20 °C, jer u suprotnom neće doći do potpunog sljepljivanja sirnih zrna. Pritisak prešanja određen je za različite vrste i površine sira. Tijekom prešanja sir je potrebno okretati da bi se pravilno raspodijelila vlaga u siru te kako bi se dobio odgovarajući oblik (Havranek i sur., 2014).

2.1.7. Soljenje sira

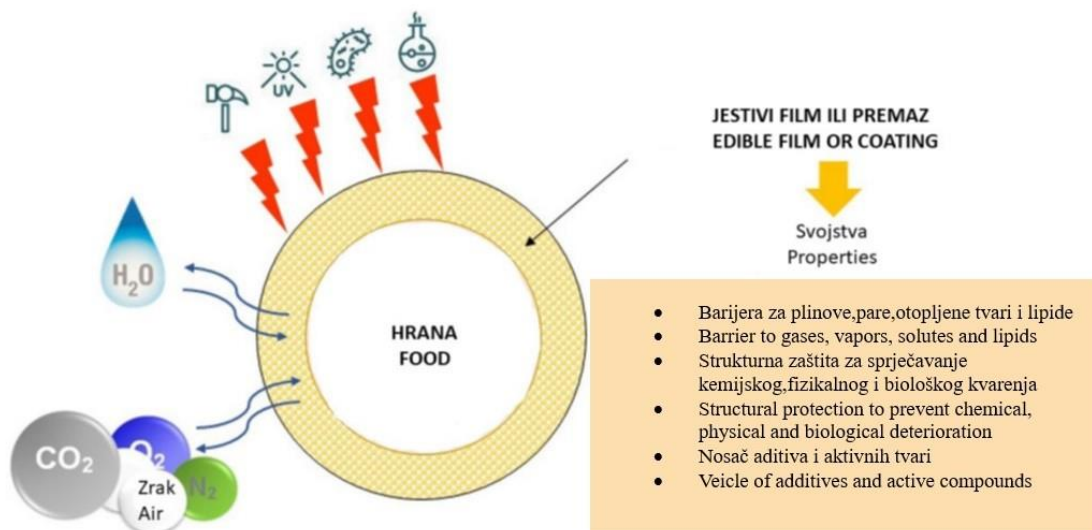
Nakon prešanja sirevi se moraju soliti radi stvaranja željenog okusa, konzerviranja (inhibira rast nekih bakterija) i sušenja sira. Za soljenje sireva koristi se kuhinjska sol (NaCl) koja mora biti pročišćena. Najčešći načini soljenja su utrljavanje soli po površini sira, soljenje sira u kalupu kod punjenja sirnim tijestom te uranjanje sira u salamuru (otopina soli u vodi ili sirutki). Salamura koja se koristi mora biti odgovarajućeg sastava ovisno o vrsti sira, bitna je temperatura, određena kiselost i koncentracija soli. Bolje je koristiti salamuru manje koncentracije soli da bi sol postupno i ravnomjernije prodirala u unutrašnjost sirnog tijesta. Dok voda iz sira putuje iz unutrašnjosti sira prema površini te tako sol izbacuje vodu iz sira zbog čega su sirevi na površini uvijek suši (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.8. Zrenje sira

Cilj zrenja sireva je pretvaranje sirne mase, koja se u početku neznatno razlikuje ovisno o vrsti sira, u sireve specifične arome, okusa, mirisa, teksture i izgleda. Rezultat zrenja biokemijske su promjene razgradnje složenih organskih spojeva u jednostavnije. Gotovo svi sastojci sira mijenjaju se i ovisno o promjenama sir poprima poželjna ili nepoželjna svojstva. Prema Tratnik i Božanić (2012) zrenje sira odvija se u prostorijama sa povoljnom klimom tj. onim prostorijama koje imaju određenu temperaturu, relativnu vlažnost i protok zraka te odgovarajuću opremu kako bi se osiguralo odvijanje fizikalno-kemijskih i biokemijskih procesa u siru. Tijekom zrenja treba voditi brigu o siru poput okretanja, brisanja suhom ili vlažnom krpom pa i četkanja, struganja ili ribanja sira da bi se spriječio razvoj plijesni ili prekomjernog maza (Kalit i sur., 2015).

2.2. JESTIVI PREMAZI

Prema Božanić i sur. (2022) jestivi premazi tumače se kao tanki slojevi jestivog materijala koji se nanose na površinu prehrambenih proizvoda kao zaštita od oštećenja te kemijskih i mikrobioloških funkcija. Konzumiraju se zajedno s hranom kao cjeloviti prehrambeni proizvod što isključuje stvaranje otpada, a zbog njihovih različitih sastava mogu se postići bolja organoleptička i nutritivna svojstva kao i duži rok trajanja proizvoda. Upotrebljavaju se u tekućem obliku najčešće uranjanjem proizvoda, pri čemu se oblikuje tanaka jestiva prevlaka na proizvodu. Primjena jestivih premaza ne smije isključivati pakiranje tradicionalnim materijalima, već je proizvod potrebno pakirati nakon primjene premaza koji pruža dodatni sloj zaštite. Jestivi premazi služe kao polupropusna barijera za kisik, ugljikov dioksid i vodenu paru, a svrha je kontrola izmjene plinova, prodiranja vlage ili oksidacijskih procesa proizvoda, dok istovremeno mogu sadržavati antimikrobna sredstva što inhibira rast neželjenih mikroorganizama (Valdés i sur., 2017). Jestivi premazi obično sadrže proteine, polisaharide i lipide, koji se smatraju trima glavnim sastojcima premaza. Oni se mogu koristiti u kombinaciji ili pojedinačno i svaki ima svoje pozitivne učinke, ali i ograničenja.



Slika 1. Glavne funkcije jestivih filmova i premaza za pakiranje hrane (Božanić i sur., 2022)

2.2.1. Proteinski premazi

Takve filmove odlikuju dobra mehanička i optička svojstva te imaju nisku propusnost kisika, ugljikovog dioksida, aroma i lipida. Jestivi filmovi koji su pripremljeni od proteina sirutke tj. proteina koji ostaju u mliječnom serumu nakon koagulacije kazeina, imaju dobru otpornost na zatezanje i probijanje. Pošto su proteini sirutke hidrofilni nedostatak predstavlja propusnost vodene pare koja narušava barijerna i mehanička svojstva takvih filmova. Svojstva barijere takvih filmova mogu se poboljšati dodatkom hidrofobnih materijala (npr. voskova i lipida).

2.2.2. Upotreba antimikrobnih sredstava u jestivim premazima

Još jedna od prednosti jestivih premaza je što se mogu koristiti kao nositelji antimikrobnih tvari koje štite proizvod od mikrobnog kvarenja i produžuju njegov rok trajanja (Valdés i sur., 2017). Antimikrobna sredstava ugrađuju se u matricu jestivog premaza koji ima sposobnost održavanja aktivne tvari na površini tj. sprječava neželjenu difuziju tvari unutar sira. Tako se smanjuje mikrobiološka kontaminacija i kvarenje sira kroz zaštitni sloj. Neki od spojeva čija je svrha antimikrobno djelovanje, uključuju bakteriocine (nizin i natamicin), enzim lizozim te eterična ulja različitih biljnih vrsta (Božanić i sur., 2022). Brojnim istraživanjima dokazano je antimikrobno djelovanje biljnih ekstrakta, a konkretan primjer je ekstrakt lista masline koji ima sposobnost inhibicije mikroorganizama koji su uzročnici kvarenja hrane (Marhamatizadeh i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za provođenje eksperimentalnog dijela rada korišteni su uzorci polutvrdog sira proizvedenog od svježeg mlijeka proizvođača mini mljekara Veronika d.o.o. u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Kao baza za jestive premaze koji su se nanosili na uzorke sira korišteni su proteini sirutke (Impact Whey Isolate) proizvođača The Hut.Com Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo. Na tri uzorka sira nanesen je jestivi premaz na bazi proteina sirutke, dok je u dva od tri takva uzorka sira jestivi premaz bio obogaćen dodatkom ekstrakta lista masline u dvije različite koncentracije, kako je prethodno određeno istraživanjem kojeg je provela Vranković (2022). Uzorci sireva pakirani su u plastičnim vrećicama i stavljeni na zrenje u trajanju 60 dana, na temperaturu od 11 °C i relativnu vlažnost koja se kretala između 80 i 82 %. Uzorci su analizirani 1., 15., 30., 45. i 60. dan zrenja. Vrste uzoraka:

Uzorak A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline

Uzorak B- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹)

Uzorak C- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

Uzorak K- kontrolni sir

Od laboratorijskog pribora, tijekom provođenja eksperimentalnog dijela, korištene su Erlenmeyerove tikvice, odmjerne tikvice, staklene boce, stakleni lijevak, štipić po Drigalskom, staklene i plastične Petrijeve zdjelice, menzure, laboratorijske čaše, staklene epruvete, birete, mikropipete, kivete za Kjeltex sustav, staklene kivete, plastične ladice za vaganje, metalne žličice i tarionik s tučkom.

3.1.1. Kemikalije i reagensi

Za pripremu premaza na bazi proteina sirutke:

-Impact whey Isolate (My Protein, Ujedinjeno Kraljevstvo)

-Tween 20 (Sigma Aldrich, Taufkirchen Njemačka)

- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska)
- Glicerol (Gram-Mol, Hrvatska)

Pri određivanju udjela proteina u siru metodom po Kjeldahl korišteni su:

- Sumporna kiselina 96 %-tna (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kjeldahl tablete (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka)
- Borna kiselina 4 %-tna (Gram-Mol, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid 40 %-tni (Gram-Mol, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (0,1 M, Gram-Mol, Hrvatska)

Pri određivanju antioksidacijske aktivnosti u uzorku sira DPPH metodom korišten su:

- Metanol 95 %-tni (KEFO, Hrvatska)
- $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil, Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom metanolu (KEFO, Hrvatska)

Prilikom pripreme uzoraka i decimalnih razrjeđenja tijekom mikrobiološke analize sira korišteni su:

- 2 %-tna otopina natrij citrata
- Fiziološka otopina

Za pripremu hranjivih podloga korištene su različite dehidrirane podloge:

- ukupan broj mikroorganizama: Tryptic glucose yeast agar (Biolife, Milano)
- kvasci i plijesni: Sabourad dextrose agar CAF 50 (Biolife, Milano)
- enterobakterije: Violet red biel glucose agar (Biolife, Milano)
- koagulaza pozitivne stafilokoke: Baird Parker agar + egg yolk tellurite emulsion (Biolife, Milano)

3.1.2. Aparatura

- pH-metar (pH3110, WTW, Weilheim, Germany)
- Blok za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska)
- Digestor (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska)
- Kjeltec I Destiling Unit sustav za destilaciju (2100 Distillation Unit, FOSS)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC)

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Digitalna vaga (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Električni grijač s magnetskom miješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Termostat (INKO, Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema jestivog premaza na bazi proteina sirutke

U Erlenmeyerovu tikvicu preneseno je prethodno izvaganih 5 g izolata proteina sirutke (Impact Whey Isolate) te je dodano 100 mL destilirane vode. Tikvica je potom stavljena na električni grijač s magnetskom miješalicom i zagrijavala se 20 minuta uz konstantno miješanje na 80 °C. Smjesa u Erlenmeyerovoj tikvici ohlađena je na sobnu temperaturu, a zatim je dodano 4 g glicerola te je opet postavljena na električni grijač sa magnetskom miješalicom gdje se miješala 20 minuta bez zagrijavanja. Po isteku vremena smjesi se dodaje 0,8 g suncokretovog ulja i oko 0,016 g Tween 20 te se miješa još 20 minuta.

Na kraju je dodan i ekstrakt lista masline u dvije različite koncentracije. U jedan premaz za uzorak C dodano je 16,5 mL ekstrakta na 100 mL premaza, u uzorak B 16,5 mL prethodno 100x razrijeđenog ekstrakta na 100 mL premaza dok se u premaz uzorka A ekstrakt nije dodavao.

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti sira

Prema Božanić i sur. (2010) pH vrijednost sira određivana je pomoću pH-metra (pH3110, WTW, Weilheim, Germany). Uzorak sira usitnio se u tarioniku te se zatim pomiješao s destiliranom vodom koja je prethodno prokuhana i ohlađena u omjeru 3:10. U homogeniziranoj smjesi uranjanjem elektrode pH-metra očitana je pH vrijednost.

3.2.3. Određivanje udjela proteina u siru metodom po Kjeldahlu (Kjeltec metoda)

Kjeldahlov postupak određivanja ukupnih proteina pripada grupi postupaka kojima se udio proteina određuje indirektno preko udjela dušika. Množenjem dobivenog udjela dušika sa faktorom pretvorbe (definiran za određene skupine namirnica) dobije se udio ukupnih proteina u uzorku. Metoda po Kjeldahlu odvija se kroz tri koraka.

Prethodno je potrebno pripremiti uzorak tako da se na laboratorijskoj vagi odvagne 1 – 2 g sira te se prebaci u kivetu od 500 mL. Zatim se dodaje 15 mL 96 %-tne sumporne kiseline i 2 Kjeldahl-ove tablete ($K_2SO_4 + CuSO_4$) kao katalizator te ostavlja da se odvijee reakcija. Prvi je korak metode tako pripremljenog uzorka spaljivanje koje se provelo na bloku za spaljivanje koji je smješten u digestoru na način da se jačina zagrijavanja postupno pojačavala. Spaljivanje se provodi do pojave bistre plavo-zelene tekućine bez krutih crnih komadića uzorka. Nakon hlađenja sadržaja u kiveti, dodaje se 80 mL destilirane vode slijedi postupak destilacije što je ujedno i drugi korak metode. Destilacije se provela u Kjetlec I Destiling Unit sustav za destilaciju. Prije postavljanja u destilacijsku jedinicu, u Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 25 mL 4 %-tne borne kiseline (blijedoružičaste boje) te se tikvica podigne tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kiveta je također postavljena na, za nju predviđeno mjesto, u destilacijskoj jedinici Kjeltec sustava te je automatski dozirano 70 mL 40 %-tnog NaOH. Destilacija koja se provela trajala je četiri minute tijekom koje je amonijak predestiliran u bornu kiselinu uz nastanak amonijevog borata, pri čemu se prisutnost amonijevih iona očitovala u promjeni boje iz blijedoružičaste u zelenu boju koja ukazuje na prisutnost amonijaka. Nakon destilacije, posljednji korak je titracija koja se provodi direktno u prihvatnoj tikvici s 0,1 M HCl. Amonijev borat titracijom s klorovodičnom kiselinom rezultira nastankom amonijevog klorida i borne kiseline te promjenu boje iz zelene natrag u blijedoružičastu što ujedno označava kraj titracije. Isti postupak provede se i za tzv. “slijepu probu” koja sadrži sve osim uzorka.

Udio ukupnog dušika izračunat je prema jednadžbi [1]:

$$\% N = \frac{(V - V_s) * c(HCl) * 14,007 * 100}{m(uzorak)[mg]}$$

Udio ukupnih proteina izračunat je prema jednadžbi [2]:

$$\% proteina = \% N * F$$

gdje je:

V – utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju uzorka

V_s – utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju slijepa probe

F – faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode)

3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u siru

Standardna laboratorijska metoda određivanja suhe tvari sušenjem u sušioniku pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase temelji se na uklanjanju vode iz malih količina uzorka isparavanjem. U prethodno posušenu i ohlađenu aluminijsku posudicu napunjenu izžarenim kvarcnim pijeskom odvagane se 2-3 g uzorka. Posudica se potom stavi u sušionik tako da nije skroz poklopljena i suši 1 – 2 sata pri temperaturi od 105 °C. Potom se posudica izvadi iz sušionika, premjesti u eksikator gdje se hladi te se ohlađena odvažuje na analitičkoj vagi. Sušenje se ponavlja tako dugo dok zadnja odvaga ne bude veća od prethodne (Božanić i sur., 2010).

Zatim se vrši izračun udjela suhe tvari prema formuli [3]:

$$\% \text{ suha tvar} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100$$

3.2.5. Određivanje udjela pepela

Određivanje pepela, temelji se na suhom spaljivanju uzorka u mufolnoj peći. Spaljivanjem se iz uzorka uklanjaju organske tvari dok zaostaju anorganske tvari koje predstavljaju ukupne mineralne tvari u uzorku. Uzorak za određivanje pepela pripremljen je tako da je odvagano otprilike 2 grama uzorka sira u porculansku zdjelicu koja je prethodno prije vaganja uzorka izžarena u mufolnoj peći, ohlađena na sobnu temperaturu u eksikatoru i izvagana. Zatim je uzorak prebačen u mufolnu peć gdje je spaljivan na temperaturi oko 550 °C. Spaljivanje se provodi do postizanja pepela konstantne mase. Nakon spaljivanja porculanska zdjelica s pepelom ohlađena je u eksikatoru te ponovno izvagana.

Udio ukupnih mineralnih tvari izračunat je prema formuli [4]:

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

gdje je :

m1- masa prazne porculanske zdjelice

m2- masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)

m3- masa porculanske zdjelice i pepela (g)

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorku sira DPPH metodom

Metodu se temelji na sposobnosti uklanjanja DPPH radikala antioksidansima prisutnim u analiziranom uzorku. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) je ljubičasto obojen dušikov radikal, stabilan je zahvaljujući delokalizaciji slobodnog elektrona preko cijele molekule, stoga ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. Prilikom miješanja otopine DPPH radikala s nekim uzorkom koji sadrži antioksidanse, odnosno tvari koje mogu donirati svoj atom vodika, DPPH radikal reducira se u DPPH spoj blijedožute boje (dolazi do gubitka ljubičaste boje). Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal prati se mjerenjem apsorbancije na 517 nm.

Određivanju antioksidacijskog kapaciteta prethodi priprema uzorka i DPPH reagensa. Uzorak se priprema tako da se 20 g uzorka tj. sira homogenizira u tarioniku sa 20 mL destilirane vode. Homogenizirana smjesa se centrifugira (Rotina 380R, Hettich Zentrifugen GmbH, Njemačka) deset minuta. Po završetku centrifuge odvoji se supernatant od ostatka smjese koji je filtriran te skladišten na 4 °C do upotrebe. Priprema DPPH reagensa vrši se na način da se 0,004 g DPPH otopi u 100 mL 95 % metanolu. Odmjerna tikvica obložena je aluminijskom folijom kako bi se smanjila izloženost svjetlu.

Analiza je provedena prema Al-Dhaheri i sur. (2017) tako da se u staklene epruvete otpipetira 800 mL DPPH reagensa i 200 mL ekstrakta, uzorke je zatim potrebno dobro promiješati na vortexu te ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami jer se apsorbancija DPPH u metanolu se smanjuje pod utjecajem svjetla. Priprema se i slijepa proba koja sadrži sve osim uzorka, umjesto njega dodaje se metanol u istoj količini. Zatim se mjeri apsorbancija uzoraka na valnoj duljini od 517 nm.

Sposobnost redukcije radikala izračunata je prema jednadžbi [5]:

$$\text{Redukcija radikala (\%)} = \frac{A(\text{slijepa proba}) - A(\text{ekstrakt})}{A(\text{slijepa proba})} \times 100$$

3.2.7. Mikrobiološka analiza sira

Mikrobiološka analiza provedena je na svim uzorcima sireva prvog, sedmog, petnaestog, tridesetog, četrdeset i petog te šezdesetog dana, a pritom se određivao broj kvasaca i plijesni, ukupni broj bakterija, broj enterobakterija i koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Priprema uzoraka i decimalnih razrjeđenja:

Uzorak sira pripremljen je na način da se 20 g sira usitnjava u sterilnom tarioniku uz postepeno dodavanje 180 mL 2 %-tne otopine natrijevog citrata prethodno zagrijanog na 45 °C. Homogenizirani sadržaj tarionika kvantitativno se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima. Time je dobiveno osnovno razrjeđenje te su načinjena daljnja decimalna razrjeđenja tako da se iz homogeniziranog uzorka (prethodno promiješanog na vortexu) sterilnom pipetom prenese 1 ml uzorka u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. Dobiveno razrjeđenje homogenizira se na vortexu te se sterilnom pipetom prenese 1 ml prethodnog razrjeđenja u drugu epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. Ponavljanjem opisanog postupka pripremaju se daljnja potrebna razrjeđenja (Božanić i sur., 2010).

Priprema hranjivih podloga:

Prije same inokulacije uzoraka potrebno je pripremiti hranjive podloge. Prema uputama na ambalaži dehidriranih podloga odvažuje se određena količina praha u laboratorijsku čašu koji se potom kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu te prelije sa propisanom količinom destilirane vode. Pripremljeni sadržaj se zatim stavi kuhati na električni grijač s magnetskom miješalicom, radi boljeg miješanja sadržaja, a tikvica je pokrivena aluminijskom folijom kako bi se spriječio ulazak mikroorganizama iz okoline. Kuhanje je završeno kada se sadržaj u tikvici skroz razbistri. Zatim hranjive podloge za određivanje ukupnog broja te kvasaca i plijesni prelijevamo u manje staklene boce te autoklaviramo pri 121 °C/15 minuta. U hranjivu podlogu za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka dodaje se egg yolk te se odmah razlijeva u Petrijeve zdjelice koje se ne autoklaviraju, nego se čuvaju u hladnjaku do korištenja. Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija također se ne autoklavira već se hladi u vodenoj kupelji na 45 °C te se odmah koristi tj. razlijeva u Petrijeve zdjelice s prethodno dodanim uzorkom.

Inokulacija i inkubacija uzoraka:

Slijedi proces inokulacije uzorka. Za dokazivanje prisutnosti ukupnog broja bakterija, enterobakterija kao i prisutnosti kvasaca i plijesni proces inokulacije provodi se na način da se mikropipetom uzme 1 mL osnovnog ili pripremljenog decimalnog razrjeđenja i prenese u praznu Petrijevu zdjelicu. Nakon pipetiranja uzorka u svaku zdjelicu dolije se 10-12 ml određene hranjive podloge koja je prethodno rastopljena pri temperaturi višoj od 100 °C i ohlađena na 45 °C u vodenoj kupelji. Tada se Petrijeve zdjelice promiješaju kružnim, blagim pokretima. Kada se nakon 10-15 minuta podloga skrutne, zdjelice se okreću sa dnom prema dolje (Božanić i sur., 2010). Petrijeve zdjelice namijenjene određivanju ukupnog broja mikroorganizama stavljaju se na inkubaciju u termostat na 32 °C kroz 24 sata, Petrijeve zdjelice za određivanje enterobakterija također se inkubiraju u termostatu na 37 °C kroz 24 sata, dok se Petrijeve zdjelice namijenjene određivanju kvasaca i plijesni ostavljaju pri sobnoj temperaturi kroz 72 sata.

Inokulacija uzorka za dokazivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka provedena je tako da se otpipetiralo 100 µL tekućeg uzorka ili željenog decimalnog razrjeđenja na gotovu hranjivu podlogu. Pomoću štapića po Drigalskom (prethodno uronjen u etanol i osušen prolaskom kroz plamen) uzorak je ravnomjerno razmazan po podlozi. Nakon naciepljivanja Petrijeve zdjelice stavljene su na inkubaciju u termostat na 37 °C kroz 48 sati (Božanić i sur., 2010).

Očitavanje rezultata:

Nakon inkubacije slijedi brojanje naraslih kolonija mikroorganizama. Za potrebe brojanja odabiru se one Petrijeve zdjelice gdje je naraslo između 30 i 300 kolonija. Broj naraslih kolonija pomnoži se s faktorom decimalnog razrjeđenja i tako se odredi broj mikroorganizama u 1 mL uzorka (Božanić i sur., 2010).

3.2.8. Obrada podataka

Za sve uzorke sireva svi pokusi ponovljeni su 2 puta te su rezultati prikazani u radu srednje vrijednosti dvaju paralelnih određivanja. Srednje vrijednosti izmjerenih rezultata dobivene su obradom podataka pomoću Microsoft Office Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI MJERENJA pH VRIJEDNOSTI

pH vrijednosti uzoraka sira očitane s pH-metra prvog, petnaestog, tridesetog, četrdeset i petog te šezdesetog dana zabilježene su i prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Prosječne pH vrijednosti analiziranih uzoraka sira

pH vrijednosti					
Uzorak	1. DAN	15. DAN	30. DAN	45. DAN	60. DAN
A	6,66	5,82	5,59	5,42	5,25
B	6,65	5,86	5,31	5,15	5,11
C	6,62	6,03	5,49	5,78	5,29
K	6,57	5,70	5,46	5,28	5,13

A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline, **B**- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹), **C**- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹), **K**- kontrolni sir

Iz tablice 1. vidljivo je da se pH vrijednost postepeno smanjivala tijekom skladištenja. Prvog dana pH u svim uzorcima bio je u rasponu od 6,57 do 6,66 dok je 60. dan bio od 5,11 do 5,29. Veće razlike u pH vrijednostima između uzoraka nisu vidljive što bi upućivalo da premaz nema značajnog učinka premda su u uzorku C izmjerene najveće PH vrijednosti tj. zabilježen je najmanji pad pH. Snižavanje pH vrijednosti može se povezati s povećanjem broja mikroorganizama. Pošto uzorak C uz jestivi premaz sadrži i veću koncentraciju ekstrakta lista masline s obzirom na druge uzorke, on pokazuje najmanji pad pH vrijednosti, što bi se moglo povezati s antimikrobnim učinkom ekstrakta.

Şengül i sur. (2009) mjerili su pH vrijednosti Cecil sira tijekom zrenja kroz 90 dana. pH vrijednosti prvi dan iznosile su 6,11 i 6,12. Do 30. dana bitno su se smanjile 5,59, a daljnjim zrenjem do 90. dana pH vrijednosti nastavile su se smanjivati sporije do 5,61 i 5,80. Vrijeme zrenja imalo je utjecaj na smanjenje pH kao i u ovom radu.

4.2. REZULTATI ANALIZE UDJELA PROTEINA U SIRU METODOM PO KJELDAHU

Udio proteina određen je u uzorcima sira prvog, petnaestog, tridesetog te šezdesetog dana, a rezultati izračunati prema jednadžbama [6] i [7] prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prosječni udjeli proteina u uzorcima sira metodom po Kjeldahlu

Udio proteina (%)				
Uzorak	1. DAN	15. DAN	30. DAN	60. DAN
A	18,43	18,82	17,60	17,44
B	19,19	19,37	19,31	19,02
C	19,87	19,26	19,47	19,35
K	18,39	18,69	17,78	14,75

A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline, **B**- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$), **C**- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$), **K**- kontrolni sir

Jovanović i sur. (2007) pratili su promijene dušičnih tvari tijekom zrenja polutvrđog sira zaštićenog plastificiranim premazom s fungicidnim svojstvima. Udijeli proteina u njihovim uzorcima kretao se između 19,63 % i 23,55 %. Prvog dana udjel proteina iznosio je 19,63 %, nakon 15 dana udio se povećao na 22,67 % dok se daljnjim zrenjem do 120 dana udio proteina nije bitno promijenio. U ovom radu su se početni udijeli proteina u uzorcima kretali između 18,09 % (kontrolni uzorak) i 19,87 % (uzorak C). Bojanić Rašović i sur. (2013) određivali su udio proteina u crnogorskom polutvrđom siru. Srednja vrijednost udjela proteina svih uzoraka iznosila je 21,85 % dok su se vrijednosti u ovom radu kretale između 14,75 % i 19,87 % što su niže vrijednosti.

Općeniti trend koji se može primijetiti je da je nakon 15 dana zrenja ukupan udio proteina lagano porastao, slično kao i u istraživanju Jovanović i sur. (2007), a nakon čega počinje padati što se dešava kontinuirano do kraja perioda zrenja od 60 dana. Pri tome je najveći pad, a samim time i najniže vrijednosti (14,75 %) ukupnog udjela proteina na kraju zrenja (tablica 2) utvrđene kod kontrolnog uzorka što bi upućivalo na najintenzivnije procese zrenja tijekom kojih dolazi do razgradnje proteina. Slično tomu, i uzorak A (sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke bez dodanog ekstrakta) također pokazuje nešto niže vrijednosti (17,44 %) na kraju zrenja (Tablica 2), međutim u usporedbi s kontrolnim uzorkom krajnji udio proteina je ipak znatno

viši. Takvi rezultati bi mogli ukazivati da jestivi premaz na bazi proteina sirutke u određenoj mjeri usporava proces zrenja. U uzorcima B i C slično kao i u istraživanju Jovanović i sur. (2007), postotak proteina raste do 15. dana, a poslije se udijeli bitno ne mijenjaju te su znatno viši (19,02 % i 19,35 %) na kraju zrenja (tablica 2) u usporedbi s kontrolnim uzorkom, kao i s uzorkom A, što bi moglo ukazivati da dodani ekstrakt lista masline značajnije usporava procese zrenja.

4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA UKUPNE SUHE TVARI I PEPELA

Određivanje udjela ukupne suhe tvari i pepela provedeno je 1. i 60. tj. zadnji dan skladištenja sira. Rezultati su izraženi u postocima i prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz prosječnih udjela ukupne suhe tvari i pepela u uzorcima sira 1. i 60. dana skladištenja

Uzorak		Udio ukupne suhe tvari (%)	Udio pepela (%)
1. DAN	A	52,93	5,35
	B	53,64	6,12
	C	47,13	5,46
	K	53,83	6,04
60.DAN	A	55,08	2,15
	B	45,12	2,25
	C	51,68	2,59
	K	46,49	2,20

A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline, B- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹), C- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹), K- kontrolni sir

Iz tablice 3. vidljivo je da se udio suhe tvari kontrolnog uzorka smanjio sa 53,83 % na 46,49 % od 1. do 60. dana zrenja. Udio suhe tvari u uzorku B također je bio manji 60. dan dok se u

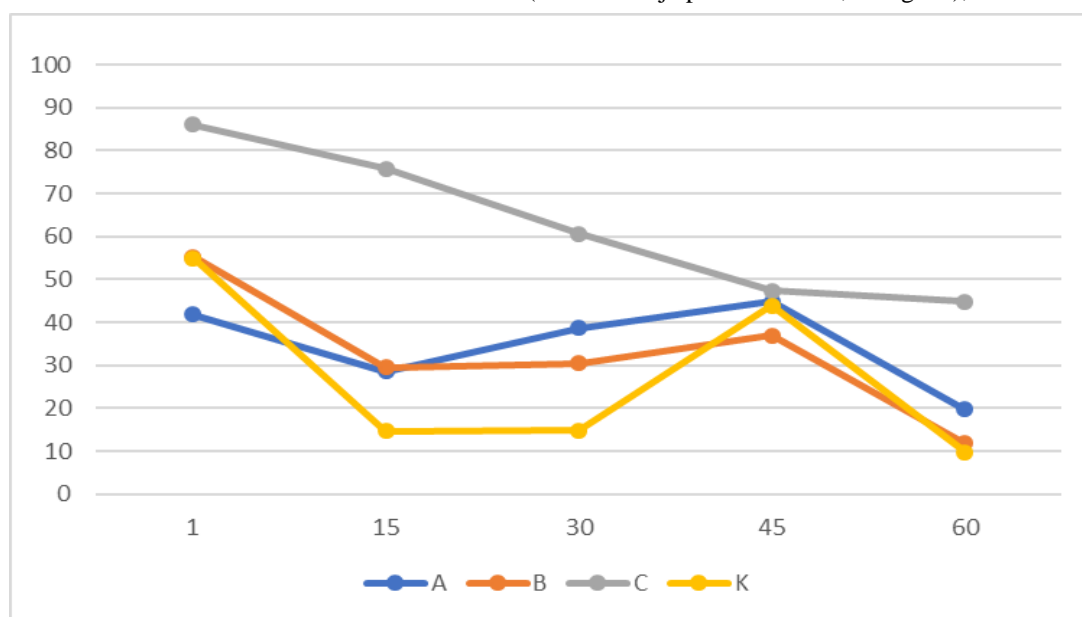
uzorcima A i C udio suhe tvari povećao tijekom zrenja. Tako je u uzorku C prvog dana udio suhe tvari iznosio 47,13 %, a 60. dan 51,58 %. Şengül i sur. (2009) određivali su udio suhe tvari u Cecil siru tijekom njegovog zrenja od 90 dana. Izmjerene vrijednosti varirale su između 47,06 % i 49,41 %. U ovom radu slične su vrijednosti, udio suhe tvari uglavnom se kreće oko 50 %.

Şengül i sur. (2009) uz suhu tvar također su mjerili i udio pepela u Cecil. Udjeli pepela su se povećavali tijekom zrnja sira, najniža vrijednost od 9,22 % izmjerena je 1. dan, a najviša vrijednost 90. dan i iznosila je 10,59 %. U ovom radu vrijednosti su se suprotno kretale tj. udio pepela se s vremenom smanjivao, što je vidljivo iz tablice 3.

4.4. REZULTATI ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ODREĐENOG DPPH METODOM

Određivanje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima sireva provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Mjerio se nastali intenzitet obojenja pri 517 nm. Mjerenjem dobivene apsorbancije preračunate su prema jednadžbi [8] u postotak redukcije DPPH radikala koji predstavlja krajnji rezultat. Uzorak sadrži više antioksidansa što je veći postotak redukcije DPPH radikala u uzorku.

A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline, **B-** sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹), **C-** sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹), **K-** kontrolni sir



Slika 2. Antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom koja je izražena kao postotak reduciranih DPPH radikala u uzorcima sira tijekom 60 dana

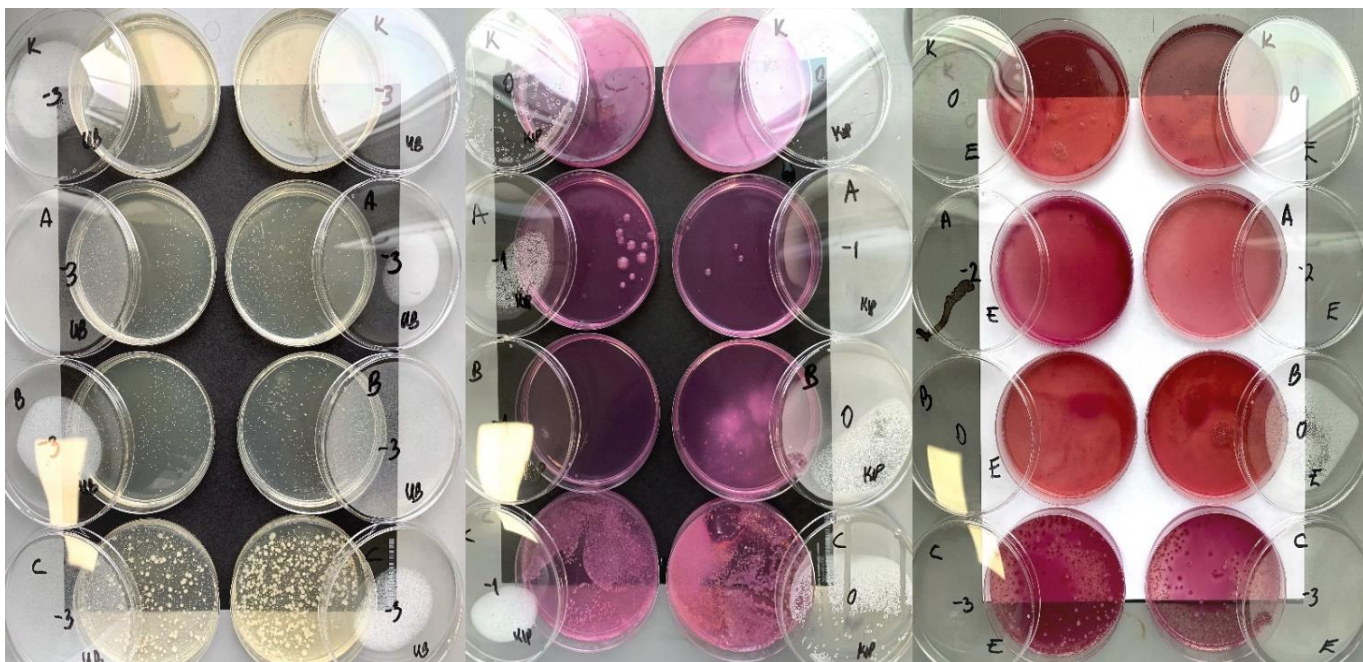
Iz slike 3. vidljivo je kako upotreba jestivog premaza i ekstrakta lista masline pridonosi boljoj sposobnosti redukcije DPPH radikala. Uzorak C, koji u jestivom premazu ima veći postotak polifenolnih komponenti, pokazuje najveće postotke redukcije radikala. Općenito najmanju sposobnost redukcije pokazuje kontrolni uzorak. Vrijednosti sposobnosti redukcije za sve uzorke 45. dan pokazuju približno jednake vrijednosti između 37 i 47,4 %. Približavanjem šezdesetom danu uzorcima slabi sposobnost redukcije radikala s iznimkom uzorka C koji stagnira na približnoj vrijednosti kao i 45. dan.

Lee N.-K. i sur. (2016) određivali su antioksidacijski kapacitet Cheddar sira obogaćenog ekstraktom *Inule botannice* i dokazuju kako se ona povećava pri povećavanju koncentracije ekstrakta. Antioksidacijski kapacitet određivali su u uzorcima s različitim koncentracijama ekstrakta. Uzorak s najvećom koncentracijom ekstrakta (1 %) pokazao je najveću sposobnost redukcije radikala koja je nultog dana iznosila 79,07 % dok je u ovom radu iznosila 86,1 % te se također istaknuo kao najbolje učinkovit uzorak s najvećom koncentracijom ekstrakta. Istraživanje koje su proveli Lee N.-K. i sur. (2016) pokazuje kako se sposobnost redukcije radikala smanjuje proporcionalno s vremenom skladištenja te se može usporediti s ovim radom gdje se vrijednosti isto smanjuju s vremenom uzimajući u obzir iznimku 45. dana uz pretpostavku ne preciznog mjerenja.

4.5. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE UZORAKA SIRA

Za određivanje završetka trajnosti sira, analizom dobivene vrijednosti broja bakterija uspoređuju se s nekim kriterijima propisanim Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) i pripadajućoj Uredbi EU 2073/2005 te kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2009). Njime je propisano da u uzorku sira broj kvasaca i plijesni mora biti manji od 10^3 CFU g⁻¹ ($\log 1000$ CFU/g = 3) u suprotnom siru nije ispravan za konzumaciju i označava se kraj trajnosti sira. Također je određen broj za koagulaza pozitivne stafilocoke, kao i enterobakterije koji u uzorcima sira mora biti manji od 10^2 CFU g⁻¹ ($\log 100$ CFU/g = 2).

Tablica 4. prikazuje rezultate mikrobiološke analize uzoraka sireva koji su prikazani kao logaritamske vrijednosti broja naraslih kolonija po gramu sira (\log_{10} CFU g^{-1}). Uzorci koji prelaze Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) propisane kriterije označeni su crveno.



Slika 3. Prikaz naraslih kolonija ukupnog broja bakterija (lijevo), kvasaca i plijesni (sredina) i enterobakterija (desno) (Vlastita fotografija)

Tablica 4. Prikaz rezultata broja mikroorganizama ($\log \text{CFU g}^{-1}$) u uzorcima sira

Dan skladištenja	Uzorak	Ukupan broj	Kvasci i plijesni	Enterobakterije	Koagulaza pozitivni stafilokoki
		log CFU/g			
1. dan	A	3,26	3,16	1,76	0
	B	3,56	3,28	1,88	0
	C	3,66	3,57	2,07	0
	K	3,22	2,98	1,58	0
7. dan	A	4,17	3,33	2,11	0
	B	4,63	3,89	2,68	0
	C	4,72	3,57	2,64	0
	K	4,14	3,08	1,34	0
15. dan	A	5,11	2,54	2,61	0
	B	5,14	2,00	3,12	0
	C	5,10	3,16	2,94	0
	K	5,17	3,62	2,86	0
30. dan	A	5,26	3,76	3,85	0
	B	3,38	3,37	2,69	0
	C	4,25	3,07	2,37	0
	K	4,71	3,33	3,41	0
45. dan	A	4,11	2,22	1,40	0
	B	3,98	1,81	1,82	0
	C	4,34	3,84	4,40	0,3
	K	4,17	2,33	1,84	0
60. dan	A	4,94	2,61	1,26	0
	B	5,22	3,31	1,65	0
	C	5,02	3,28	1,60	0
	K	5,04	1,40	1,38	0

A- sir s jestivim filmom od proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline, B- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$), C- sir s jestivim filmom od proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$), K- kontrolni sir

U svim uzorcima sira s premazom je odmah nakon proizvodnje utvrđena prisutnost kvasaca i plijesni iznad kriterija preporučenih Vodičem (2009) te u uzorku C i enterobakterija, a u kontrolnim uzorcima je broj kvasaca i plijesni bio blizu postavljenoj granici. Takvi rezultati mogu upućivati na neadekvatan režim pasterizacije mlijeka kao i na kontaminaciju mikroorganizmima iz okoliša uslijed rukovanja prilikom nanošenja samih premaza. Ukupan broj bakterija 15. dan kretao se između 5,10 i 5,17 što pokazuje nastavak rasta ukupnog broja bakterija, a time ukazuje i na činjenicu da ekstrakt lista masline ne inhibira rast bakterija mliječne kiseline koje su primarna mikroflora mlijeka i mliječnih proizvoda. Vrijednosti su nastavile rasti do 45. dana izuzev uzorku A i B koji 30. dan pokazuju smanjeni broj kvasaca i plijesni ispod granice kriterija. 45. dan zrenja vrijednosti su manje, a većina uzoraka zadovoljava kriterije Vodiča (2009) i Uredbe (2073/2005) osim uzorka C koji ima povećan broj kvasaca i plijesni te enterobakterija. Takvi rezultati mogu se objasniti djelovanjem ekstrakta kao inhibitora za rast mikroorganizama. Zadnji tj. 60. dan zrenja vrijednosti se opet povećavaju, ali ostaju unutar kriterija s izuzetkom uzorka B i C kojima vrijednosti za broj kvasaca i plijesni ne zadovoljavaju kriterij. Koagulaza pozitivni stafilokoki jedino su prisutni 45. dan u uzorku C, ali ne prelaze propisanu granicu prema Uredbi 2073/2005.

Wedad M. EL- Kholy i sur. (2017) istraživali su učinak pojedinih eteričnih ulja na kvalitetu mekog sira tijekom skladištenja kroz 28 dana. U kontrolnom uzorku ukupan broj bakterija tijekom 28 dana se povećavao sa 6,27 na 8,42, a broj kvasaca i plijesni također je rastao od pojave četrnaestog dana do zadnjeg. Koristeći različita eteričnih ulja potvrdili su njihova antimikrobna svojstva, a najbolje rezultate je pokazalo eterično ulje timijana gdje je ukupan broj bakterija narastao samo sa 2 na 3,26 dok kvasci i plijesni nisu bili prisutni kroz cijeli period od 28 dana. U ovom radu rezultati se bitno razlikuju iako se može reći kako se pokazalo antimikrobno svojstvo ekstrakta lista masline kao inhibitor rasta mikroorganizama, a to je vidljivo u smanjenju broja određenih mikroorganizama u uzorcima 45. dan.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata te provedene rasprave mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. pH vrijednosti svih uzoraka sira postupno se smanjivao tijekom skladištenja. Uspoređujući pH vrijednosti uzoraka sira s premazom na bazi proteina sirutke i dodanim ekstraktom s kontrolnim uzorkom nisu vidljive veće razlike u vrijednostima, iako je u uzorku s premazom i ekstraktom koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ zabilježen najmanji pad pH.
2. Uzorku sira s premazom na bazi proteina sirutke i dodanim ekstraktom koncentracije polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$ te kontrolnom uzorku ukupni udio suhe tvari smanjio se tijekom zrenja dok se uzorku sira s premazom i dodanim ekstraktom koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ te uzorku s premazom bez dodatka ekstrakta udio suhe tvari povećao od 1. do 60. dana zrenja. Udio pepela svih uzoraka s vremenom se smanjivao.
3. Početni udio proteina u analiziranim uzorcima sireva kretao se između 18,39 % i 19,87 %. Najniži udio proteina (14,75 %) utvrđen je u kontrolnom uzorku nakon 60 dana zrenja što ukazuje na najintenzivniji proces zrenja. U uzorcima s premazom na bazi proteina sirutke sira (uzorak A) utvrđen je određen pad ukupnog udjela proteina tijekom 60 dana zrenja, no krajnje vrijednosti (17,44 %) su bile znatno više u usporedbi s kontrolnim uzorkom što bi moglo ukazivati da jestivi premaz usporava proces zrenja. U uzorcima s jestivim premazom i dodanim ekstraktom koncentracije polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$ (uzorak B) odnosno $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ (uzorak C) udio proteina nije se značajnije mijenjao tijekom zrenja što bi moglo ukazivati da dodani ekstrakt lista masline dodatno usporava proces zrenja.
4. Upotreba jestivog premaza i ekstrakta lista masline pridonosi boljoj sposobnosti redukcije DPPH radikala odnosno povećava antioksidacijsku aktivnost analiziranih uzorka sireva. Tako je uzorak sira s jestivim premazom na bazi proteina sirutke i dodanim ekstraktom koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ imao najveće postotke redukcije radikala.
5. Uzorci sira već prvog dana pokazuju povećane brojeve većine ispitivanih mikroorganizama navedenih u Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009). Povećana prisutnost kvasaca i plijesni, ukupnog broja bakterija i enterobakterija moguća je posljedica uvjeta prilikom proizvodnje sira u laboratoriju te nepravilnog rukovanja sirom tijekom nanošenja jestivog premaza.

6. Rezultati mikrobiološke analize poboljšali su se 45. i 60. dan što je moguća posljedica antimikrobnog djelovanja ekstrakta lista masline dodanog u jestivi premaz na rast mikroorganizama.

6. LITERATURA

Bojanić Rašović M, Nikolić N, Martinović A, Katić V, Rašović R, Walcer M, Domig K (2013) Correlation between protein to fat ratio of milk and chemical parameters and the yield of semi-hard cheese. *Biotechnol. Anim. Husb.* **29** (1), 145-159, <https://doi.org/10.2298/BAH1301145B>

Božanić R, Breški M, Barukčić I, Lisak Jakopović K (2022) Primjena jestivih filmova i prevlaka u proizvodnji sira. *Cro J Food Tech, Biotech and Nutritio* **17** (1-2), <https://doi.org/10.31895/hcptbn.17.1-2.2>

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

Cagri A, Ustunol Z, Ryser Elliot T (2004) Antimicrobial Edible Films and Coatings, Review. *J. Food Prot.*, **67**(4), 833–848. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.833>

Carić M, Vrbaski Ž, Kulić Lj, Gavarić D, Vranac K, Radovančev Ž (1985) Utjecaj primene jestivih gliceridnih premaza na randman sira. *Mljekarstvo* **35** (9). <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo>

Filipan K. (2021) Utjecaj dodatka ekstrakta lista masline (*Olea europaea*) na fizikalnokemijske karakteristike i fermentaciju kravljeg mlijeka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014.) Sirarstvo, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Jooyandeh H. (2011) Whey Protein Films and Coatings: A Review. *Pak J Nutr.* **10** (3), 296-301. <http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2011.296.301>

Jovanović S, Maćej O, Barać M, Vučić T (2007) Promjene dušičnih tvari tijekom zrenja polutvrđog sira proizvedenog na temelju koagregata proteina mlijeka. *Mljekarstvo* **57**(3), 169-193.

Lovrić K. (2018) Utjecaj dodatka ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet,

Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Marhamatizadeh, M.H., Ehsandoost, E., Gholami, P., Mohaghegh, M.D. (2013) Effect of Olive Leaf Extract on Growth and Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* for Production of Probiotic Milk and Yoghurt. *Intl J Farm & Alli Sci.* **2** (17), 572-578.

Marković K., Vahčić N., Hruškar M. (2017) Analitika prehrambenih proizvoda, Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci Technol.* **26**, 211-219. https://www.researchgate.net/publication/237620105_The_use_of_the_stable_radical_Diphenylpicrylhydrazyl_DPPH_for_estimating_antioxidant_activity

Lee N.-K., Jeewanthi R. K. C., Park E.-H., Paik H.-D. (2016) *Short communication:* Physicochemical and antioxidant properties of Cheddar-type cheese fortified with *Inula britannica* extract. *J. Dairy Sci.* **99**, 83–88 <http://dx.doi.org/10.3168/jds>

Rogelj, I., Božanić, R., Perko, B., Kalit, S., Matijević, B., Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., Magdić, V., Stručić, D.: *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015.

Sengul M, Degirmenci M, Erkaya T (2009) Compositional and Microbiological Characteristics During Ripening of Çeçil Cheese, a Traditional Turkish Cheese. *Asian J. Chem.* **21**(4), 3087-3093.

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

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu

Valdés A., Ramos M., Beltrán A., Jiménez A., Garrigós M.C. (2017) State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications

Valkaj K (2015) Međimurski sir turoš u odnosu na varaždinsku prgicu i bjelovarski kvargl – kvalitativne razlike (doktorski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Vranković Lucija (2022) Optimiranje postupka proizvodnje sireva od kravljeg mlijeka s dodatkom ekstrakta lista masline (*Olea europaea L.*), (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Wedad M. EL- Kholly , Reda A. Aamer, Mailam, M. A. (2017) Effect of Some Essential Oils on the Quality of UF-Soft Cheese During Storage. *Fd. Sci. & Technol.* **14**(1), 13-27. <http://dx.doi.org/10.12816/0038401>

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu, Narodne novine br. 83/2022.

Izjava o izvornosti

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

Sara Cetin

Vlastoručni potpis