

Određivanje antioksidacijske aktivnosti u ovčjoj i kozjoj sirutki

Tretnjak, Karmela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:078758>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Karmela Tretnjak

1121/PI

**ODREĐIVANJE
ANTIOKSIDACIJSKE
AKTIVNOSTI U OVČJOJ I
KOZJOJ SIRUTKI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović te uz pomoć doc. dr. sc. Irene Barukčić i tehničke suradnice Snježane Šimunić.

Od srca zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, na vremenu, strpljenju, korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade i pisanja rada.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na susretljivosti i pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela.

Također zahvaljujem tehničkom suradniku Darjanu Pipiću iz Laboratorija za tehnološke operacije, dr. sc. Srećku Valiću i dr. sc. Nadici Maltar Strmečki sa Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković te dr. sc. Nini Bilandžić sa Hrvatskog veterinarskog instituta na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela.

Veliko hvala cijeloj mojoj obitelji i prijateljima na podršci, strpljenju i razumijevanju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambeno inženjerstvo

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U OVČJOJ I KOZJOJ SIRUTKI

Karmela Tretnjak, 1121/PI

Sažetak: Sirutka je izvrstan izvor visokovrijednih proteina, ugljikohidrata, vitamina, mineralnih tvari te elemenata u tragovima s niskim udjelom masti. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o karakterizaciji ovčje i kozje sirutke dobivene različitim metodama sirenja mlijeka pa je cilj ovog rada bio odrediti antioksidacijsku aktivnost i profil mineralnih tvari u kiseloj i slatkoj, ovčjoj i kozjoj sirutki, a također i kemijski sastav, tj. udio vlage i pepela te kiselost, boju, veličinu čestica i senzorska svojstva sirutke. Radikal koji se koristio za praćenje antioksidacijske aktivnosti sirutke je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), a metoda elektronska spinska rezonancija (ESR). Antioksidacijska aktivnost se određivala u svježim i pasteuriziranim uzorcima sirutke te nakon sedam dana, a rezultati su pokazali da ovčja sirutka ima veću antioksidacijsku aktivnost od kozje. Najveću antioksidacijsku aktivnost ima kisela sirutka dobivena sirenjem mezofilnom kulturom, odnosno sirutka koja inače zaostaje pri proizvodnji svježih sireva.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, DPPH, ESR, kozja sirutka, ovčja sirutka

Rad sadrži: 50 stranica, 21 sliku, 12 tablica, 40 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović*

Pomoć pri izradi: *Doc. dr. sc. Irena Barukčić, Snježana Šimunić, teh. sur., Marko Škegro, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Rajka Božanić*
2. Doc. dr. sc. *Katarina Lisak Jakopović*
3. Doc. dr. sc. *Sven Karlović*
4. Doc. dr. sc. *Nives Marušić Radovčić* (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2019.

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 Engineering

THE DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF ACID AND SWEET WHEY FROM SHEEP'S AND GOAT'S MILK

Karmela Tretnjak, 1121/PI

Abstract: Whey is a very good source of valuable proteins, carbohydrates, vitamins, minerals, trace elements with low-fat content. In available literature there is no data about the characterization of sheep's and goat's whey obtained by different methods of milk coagulation, so the aim of this research was to determine- the antioxidant activity as well as a mineral profile in acid and sweet, sheep's and goat's whey, but also the chemical structure ie. the amount of moisture and ash, acidity, color, particle size and the sensory properties of whey. Radical for detecting the antioxidant activity of whey was 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the used method was electron spin resonance (ESR). Antioxidant activity was determined in fresh and pasteurized whey samples and after seven days, and the results showed that sheep's whey has higher antioxidant activity than goat's whey. The highest antioxidant activity has acid whey obtained by mesophilic culture, i.e. the whey that remains after the production of fresh cheeses.

Keywords: antioxidative activity, DPPH, ESR, goat's whey, sheep's whey

Thesis contains: 50 pages, 21 figures, 12 tables, 40 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Katarina Lisak Jakopović, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Irena Barukčić, Assistant professor, Snježana Šimunić, tech. assistant, Marko Škegro, MEng*

Reviewers:

1. PhD. *Rajka Božanić*, Full professor
2. PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor
3. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor
4. PhD. *Nives Marušić Radovčić*, Assistant professor (substitute)

Defence date: 19th July 2019

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. OVČJE I KOZJE MLIJEKO | 2 |
| 2.2. SIRUTKA..... | 4 |
| 2.3. SASTAV I VRSTE SIRUTKE | 5 |
| 2.4. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI | 8 |
| 2.5. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE SIRUTKE | 8 |
| 2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM | 10 |
| 2.7. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BOJE | 11 |
| 2.8. ODREĐIVANJE VELIČINE ČESTICA LASERSKOM DIFRAKCIJOM | 12 |
| 2.9. ODREĐIVANJE PROFILA MINERALNIH TVARI ICP-OES I ICP-MS METODOM..... | 13 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 16 |
| 3.2. METODE RADA..... | 16 |
| 3.2.1. Priprema sirutke..... | 16 |
| 3.2.2. Određivanje mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom po Gerberu | 17 |
| 3.2.3. Određivanje kiselosti sirutke | 18 |
| 3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u sirutki sušenjem u sušioniku | 19 |
| 3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u sirutki..... | 19 |
| 3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje sirutke..... | 19 |
| 3.2.7. Određivanje veličine čestica u sirutki laserskom difrakcijom | 20 |
| 3.2.8. Senzorska analiza sirutke | 21 |
| 3.2.9. Određivanje profila mineralnih tvari u sirutki ICP-OES i ICP-MS metodom | 22 |
| 3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u sirutki DPPH metodom | 22 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |
| 4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE SIRUTKE | 24 |
| 4.2. BOJA SIRUTKE..... | 29 |
| 4.3. VELIČINA ČESTICA U SIRUTKI | 31 |
| 4.4. SENZORSKA ANALIZA SIRUTKE | 34 |
| 4.5. PROFIL MINERALNIH TVARI U SIRUTKI | 36 |
| 4.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST SIRUTKE ODREĐENA DPPH METODOM | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI | 46 |
| 6. LITERATURA | 47 |
| 7. PRILOZI | |

1. UVOD

Sirutka je nutritivno visoko vrijedna namirnica koja predstavlja sporedni proizvod u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Međutim znatan dio sirutke se ne iskorištava što predstavlja veliki ekonomski gubitak za same mljekare. Sastav sirutke nije uvijek jednak, a ovisi o mlijeku kao sirovini, vrsti sira koji se proizvodi i načinu vođenja tehnološkog procesa.

Sirutka je izvor visokovrijednih proteina sirutke koji posjeduju antimikrobna, antitumorna, antioksidativna, antihipertenzivna te imunoaktivna svojstva zbog visokog udjela esencijalnih aminokiselina, osobito cisteina koji je esencijalan za razvoj mozga. Literatura navodi kako litra i pol sirutke dnevno može zadovoljiti potrebe odrasle osobe za esencijalnim aminokiselinama i vitaminima B kompleksa te može koristiti u terapiji mnogih bolesti.

Antioksidativno svojstvo sirutke temelji se na visokom sadržaju i bioiskoristivosti aminokiseline cistein koja pomaže u sintezi glutationa (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa. Budući da se GSH smatra esencijalnim za podizanje imuniteta to je još jedan razlog zašto bi proteini sirutke trebali imati važno mjesto u prehrani ljudi.

S obzirom da sirutka sadrži vrijedne sastojke, koji dokazano imaju terapijska svojstva, trebalo bi je tretirati kao vrijedan nusproizvod pri proizvodnji sira i preraditi u razne proizvode, a ne je tretirati kao otpadni proizvod mljekara. Sirutka se može iskoristiti u proizvodnji albuminskih sireva, fermentiranih napitaka, dječjih i dijetalnih proizvoda te u mesnoj, pekarskoj i slastičarskoj industriji.

U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o karakterizaciji ovčje i kozje sirutke dobivene različitim postupcima sirenja mlijeka, stoga je cilj ovog rada bio odrediti mineralni te kemijski sastav kisele i slatke sirutke dobivene od ovčjeg i kozjeg mlijeka različitim načinima sirenja mlijeka. Također, cilj je bio ispitati utjecaj koagulacije kazeina (enzimske i kiselinske) i pasterizacije (72 °C/ 15") na antioksidacijsku aktivnost ovčje i kozje sirutke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OVČJE I KOZJE MLIJEKO

Kemijski sastav ovčjeg i kozjeg mlijeka (pa tako i sirutke) ovisi o nekoliko faktora, a to su: pasmina, stadij laktacije, starosna dob životinje, prehrana, okoliš, klima, sezona, genetički faktori te o zdravstvenom stanju životinje (Hejtmankova i sur., 2012). Ovčje i kozje mlijeko ne koriste se često u svakodnevnoj prehrani kao kravlje mlijeko, ali zbog svog nutritivnog sastava i brojnih prednosti sve se više preporučuje njihova konzumacija.

Sastav ovčjeg mlijeka značajno se razlikuje od kravljeg i to većom količinom masti, proteina, pepela i suhe tvari. Odnos pojedinih sastojaka u suhoj tvari mlijeka razlikuje se od onoga u kravljem mlijeku. I ovčje i kravlje mlijeko sadrže podjednaku količinu laktoze, ali su bitne razlike u količini suhe tvari bez masti (Antunac i Lukač Havranek, 1999).

Ovčje mlijeko je bogat izvor mineralnih tvari, a njihov sadržaj uvjetovan je stadijem laktacije pa se tako tijekom laktacije povećava sadržaj klorida i magnezija, a smanjuje sadržaj kalija (Antunac i Lukač Havranek, 1999) (tablica 1). U odnosu na kravlje, ovčje mlijeko sadržava veće količine gotovo svih mineralnih tvari, osim natrija i kalija (Božanić i sur., 2018; Park i sur., 2007). Koncentracija kalcija u ovčjem je mlijeku čak 730 mg L^{-1} veća nego u kravljem mlijeku, dok isto vrijedi i za koncentraciju fosfora, kojeg ima 630 mg L^{-1} više (tablica 1). Od ukupne količine kalcija u ovčjem mlijeku, oko 80 % se nalazi u koloidnom obliku, dok se u kravljem mlijeku u koloidnom obliku nalazi tek 66 % kalcija (Božanić i sur., 2018).

U prehrani se sve više ističu prednosti kozjeg mlijeka, osobito u osoba alergičnih na proteine kravljeg mlijeka. Također, kozje mlijeko se preporučuje i u prehrani mlađih i starijih osoba, jer je probavljivije od kravljeg mlijeka (Božanić i Tratnik, 2012). To se pripisuje nizu fizikalno-kemijskih svojstava većine sastojaka: manji promjer masnih kapljica, veći udio kratko i srednje lančanih masnih kiselina, veći udjel lakše probavljivih frakcija proteina (proteini sirutke) i veći udjel neproteinskog dušika, a manje kazeina uz manji promjer micela.

Kozje mlijeko također sadrži više vitamina D i nikotinske kiseline te vitamina A (retinola) od kravljeg mlijeka. U njemu je sav karoten konvertiran u vitamin A, što je razlog njegove karakteristične vrlo bijele boje (Božanić i sur., 2002).

Kozje mlijeko sadrži veću količinu mineralnih tvari od kravljeg mlijeka (tablica 1), osobito kalija i klorida, pa je zbog toga njegov okus blago slan što ne preferiraju svi potrošači

(Božanić i sur., 2018). Također je izvrstan izvor biorazgradivog kalcija, fosfora i magnezija, jer sadrži veće količine tih tvari u topljivom obliku u odnosu na kravlje (Božanić i sur., 2002).

Ako govorimo o nutritivnoj vrijednosti treba znati da se u ljudski organizam apsorbiraju samo otopljene mineralne tvari, a takvih ovčje mlijeko sadržava najmanje. Zato je ipak kozje mlijeko bolji izvor topljivih mineralnih tvari (Ca, P i Mg) nego ovčje ili kravlje.

Tablica 1. Količine mineralnih tvari (mg L⁻¹) u kravljem, ovčjem i kozjem mlijeku (Božanić i sur., 2018)

| Mineralna tvar | Kravlje mlijeko | Ovčje mlijeko | Kozje mlijeko |
|-----------------|-----------------|---------------|---------------|
| Kalcij | 1200 | 1930 | 1304 |
| Fosfor | 950 | 1580 | 1080 |
| Magnezij | 130 | 180 | 136 |
| Natrij | 500 | 440 | 488 |
| Kalij | 1500 | 1360 | 1996 |
| Kloridi | 1000 | 1600 | 1566 |
| Željezo | 0,5 | 0,8 | 0,5 |
| Zink | 3,5 | 5,7 | 2,9 |
| Bakar | 0,2 | 0,4 | 0,23 |

Najveći ukupni sadržaj proteina sirutke ima ovčje mlijeko (oko 0,9 %), od toga je 69 % β-laktoglobulina, 10 % α-laktalbumina i 20 % imunoglobulina (Božanić i sur., 2018). Suprotno tome, kozje mlijeko, uz najmanji ukupni sadržaj proteina sirutke, ima i najmanju koncentraciju β-laktoglobulina i α-laktalbumina (tablica 2). Proteini kozjeg mlijeka probavljiviji su od proteina kravljeg mlijeka (mekši gruši) i veća je apsorpcija aminokiselina.

Veća probavljivost ovčjeg i kozjeg mlijeka u odnosu na kravlje može se pripisati i prirodnoj homogenosti ovčjeg i kozjeg mlijeka, odnosno manjem promjeru globula mliječne masti pa ih lipaze u probavnom sustavu lakše razgrađuju (Božanić i sur., 2018).

Tablica 2. Koncentracija proteina (g L^{-1}) sirutke u kravljem, ovčjem i kozjem mlijeku (Hernández-Ledesma i sur., 2011)

| Proteini | Kravlje mlijeko | Ovčje mlijeko | Kozje mlijeko |
|--|-----------------|---------------|---------------|
| Ukupni proteini sirutke | 5,0 - 9,0 | 8,8 - 10,4 | 3,7 - 7,0 |
| β- laktoglobulin | 3,2 - 4,0 | 2,7 - 5,0 | 1,8 - 2,8 |
| α- laktalbumin | 1,2 - 1,5 | 1,2 - 2,6 | 0,6 - 1,1 |
| Albumin krvnog seruma | 0,3 - 0,6 | 0,55 - 0,6 | 0,26 - 0,3 |
| Laktoferin | 0,05 - 0,2 | 0,10 | 0,12 |

2.2. SIRUTKA

Sirutka je zeleno-žuta tekućina koja nastaje kao sporedni proizvod pri proizvodnji sira, tj. koagulaciji kazeina. Ovisno o načinu koagulacije kazeina, nastaje kisela (djelovanjem kiseline ili bakterija mliječne kiseline) ili slatka sirutka (djelovanjem enzima). U proizvodnji sira, od 100 litara mlijeka nastaje 80 - 90 litara sirutke (Božanić i Tratnik, 2012).

Najvrjedniji sastojci sirutke su njeni proteini koji se sastoje od β -laktoglobulina, α -laktalbumina, imunoglobulina, laktoferina i albumina krvnog seruma. To su nutritivno najvrjedniji proteini zahvaljujući visokom udjelu esencijalnih aminokiselina (ponajprije lizina i metionina) te visokom udjelu cisteina. Zbog takvog aminokiselinskog sastava proteini sirutke imaju mnogo veću biološku vrijednost (ali i druge parametre hranjive vrijednosti) u usporedbi sa kazeinom, kao i drugim proteinima animalnog podrijetla, uključujući i proteine jaja koji su se dugo smatrali referentnima (tablica 3). S obzirom da su manje i jednostavnije građe od kazeina, potpuno su probavljivi i iskoristivi. Iskoristivost proteina u organizmu usko je vezana i uz omjer cistin/metionin koji je u proteinima sirutke oko 10 puta veći nego u kazeinu (Božanić i sur., 2008; Herceg i Režek, 2006). Gotovo se sto posto resorbiraju u organizmu i bitni su za izgradnju tkiva, enzima i hormona.

Tablica 3. Prosječna biološka vrijednost (BV) proteina sirutke i drugih proteina (Werner, 1981)

| PROTEINI | Sirutke | Jaja | Mlijeka | Govedine | Kazeina | krumpira | Brašna |
|-----------|---------|------|---------|----------|---------|----------|--------|
| BV | 104 | 100 | 92 | 78 | 73 | 69 | 45 |

Proteini sirutke ne mijenjaju se tijekom proizvodnje sira te nakon izdvajanja gruš kazeina u cijelosti prelaze u sirutku. U sirutku prelaze i gotovo sve topljive soli i mikroelementi mlijeka te svi ugljikohidrati iz mlijeka preostali nakon proizvodnje sira, a to su laktoza, glukoza, galaktoza, oligosaharidi te aminošećeri (Antunac i sur., 2011; Božanić i Tratnik, 2012).

2.3. SASTAV I VRSTE SIRUTKE

Sastav i svojstva sirutke ovise o tehnologiji proizvodnje osnovnog proizvoda te o kvaliteti korištenog mlijeka. Prosječna sirutka sadrži oko 93 % vode i 7 % suhe tvari.

Sirutka se može podijeliti na kiselu i slatku. Slatka se dobiva prilikom proizvodnje tvrdih sireva, a kisela sirutka se dobiva prilikom proizvodnje svježih sireva. Kisela sirutka je ukusnija i stabilnija, a sadrži i manje laktoze i mliječne masti. Udio slobodnih aminokiselina je kod kisele sirutke oko 10 puta veći nego u mlijeku.

Tablica 4. Prosječan sastav (g L^{-1}) slatke i kisele sirutke (Jelen, 2011)

| Sastojak | Slatka sirutka | Kisela sirutka |
|-------------------------|----------------|----------------|
| Ukupna suha tvar | 63,0 - 70,0 | 63,0 - 70,0 |
| Laktoza | 46,0 - 52,0 | 44,0 - 46,0 |
| Proteini | 6,0 - 10,0 | 6,0 - 8,0 |
| Kalcij | 0,4 - 0,6 | 1,2 - 1,6 |
| Fosfati | 1,0 - 3,0 | 2,0 - 4,5 |
| Laktati | 2,0 | 6,4 |
| Kloridi | 1,1 | 1,1 |

Osnovna razlika kisele i slatke sirutke je u njezinoj pH vrijednosti i kemijskom sastavu. pH vrijednost slatke sirutke kreće se u rasponu od 5,8 do 6,6, dok je pH vrijednost srednje kisele sirutke između 5,8 i 5,0 pH jedinica, a kisele sirutke manja od 5,0 pH jedinica (Zadow, 1993).

Tablica 5. Prosječni sastav (g L⁻¹) kravlje, ovčje i kozje sirutke (Frévier and Bourdin, 1977)

| Sastojak | Kravlja sirutka | | Ovčja sirutka | Kozja sirutka |
|----------------------|-----------------|--------|---------------|---------------|
| | slatka | Kisela | slatka | kisela |
| Suha tvar | 70,84 | 65,76 | 83,84 | 62,91 |
| Proteini | 9,24 | 7,80 | 18,71 | 9,35 |
| Mliječna mast | 5,06 | 0,85 | 6,46 | 0,40 |
| Laktoza | 51,81 | 45,25 | 50,98 | 39,18 |
| Pepeo | 5,25 | 7,56 | 5,65 | 8,36 |
| Kalcij | 0,47 | 1,25 | 0,49 | 1,35 |

Također, iz tablice 4 vidljivo je da slatka sirutka sadrži veći udio laktoze i proteina, nego kisela sirutka, dok je udio mineralnih tvari veći u kiseloj sirutki prvenstveno zbog manje pH vrijednost sredine pa se otapa više koloidnog Ca- fosfata i soli.

Sastav ovčje i kozje sirutke prikazan je tablicom 5 i prilično se razlikuje od sastava kravlje sirutke, ponajviše u koncentraciji proteina, masti i laktoze (Pintado i sur., 2001). Ovčja i kozja sirutka imaju jedinstven sastav proteina koji ovisi od različitim faktorima- vrsti sirutke (kisela ili slatka), godišnjem dobu, prehrani, stadiju laktacije (Hernández-Ledesma i sur., 2011). Ovčja sirutka je osobito bogata proteinima. Osnovna karakteristika ovčje kisele sirutke je visok sadržaj β-laktoglobulina i nizak sadržaj α-laktalbumina. Općenito, postotak β-laktoglobulina u kozjoj kiseloj sirutki je niži u usporedbi sa ovčjom kiselom sirutkom. U kozjoj sirutki prevladava α-laktalbumin, dok se pred kraj laktacije povećava koncentracija β-laktoglobulina. Omjer β-laktoglobulin/ α-laktalbumin ovisi o pasmini, stadiju laktacije, a također može biti povezan i sa različitim funkcionalnim svojstvima pojedinih vrsti sirutki (Hejtmankova i sur., 2012).

U sirutku prelazi oko 50 % suhe tvari mlijeka i to uglavnom laktoza (oko 70 %), proteini sirutke u cijelosti, topljive mineralne tvari i vitamini B skupine, dok se vitamin C razgradi već tijekom proizvodnje sira (Tratnik, 2003). Laktoza je važan izvor energije, potiče peristaltiku crijeva, olakšava probavu masti, proteina i drugih hranjivih tvari, a povećava i apsorpciju

kalcija i fosfora iz hrane te tako ima preventivnu ulogu u nastanku osteoporoze te osigurava i optimalnu razinu magnezija (Božanić i sur., 2002; De Wit, 2001). Također, uspostavlja blago kiselu reakciju u crijevima, te na taj način sprječava rast i razmnožavanje štetnih bakterija (Antunac i sur., 2011).

Drži se da bi jedna litra sirutke mogla zadovoljiti dnevnu potrebu organizma za riboflavinom (vitamin B₂), koji je u sirutki prisutan u količini od oko 1,7 mg L⁻¹ (De Wit, 2001) i od kojeg potječe žuto-zelena boja sirutke (Lisak, 2012; Tratnik, 2013). Kobalamin (vitamin B₁₂) i folna kiselina nalaze se u vezanom obliku s proteinima sirutke, a riboflavin je i do 95 % u slobodnom obliku. Udjel riboflavina u sirutki može biti veći nego u mlijeku, što je rezultat aktivnosti bakterija mliječne kiseline u proizvodnji sira, stoga je sirutka vrlo dobra polazna sirovina za proizvodnju koncentrata vitamina B₂ (Tratnik, 2003). Po hranjivoj vrijednosti, oko 3 kg sirutke je ekvivalentno 1 kg mlijeka (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997).

Najvrjednija komponenta sirutke su proteini, a sastoje se od α -laktalbumina, β -laktoglobulina, imunoglobulina, laktoferina i albumina krvnog seruma. Neosjetljivi su na djelovanje kiseline ili enzima pa tijekom koagulacije ostaju nepromijenjeni, ali su zato osjetljivi na toplinu te njihova denaturacija počinje već pri 60 °C, dok se potpuna koagulacija svih proteina sirutke očekuje zagrijavanjem na temperaturi 90-95 °C tijekom 10-20 minuta (Herceg i sur., 2008). β -laktoglobulin se toplinski denaturira ireverzibilno, dok je kod α -laktalbumina denaturacija djelomično reverzibilna (Paulsson i Visser, 1992). Toplinska nestabilnost proteina sirutke u odnosu na kazein, pripisuje se odsustvu fosfora, malom udjelu prolina i višem udjelu cistina, cisteina i metionina (Antunac i sur., 2011; Popović-Vranješ i Vujičić, 1997; Tratnik, 2003).

Proteini sirutke sadrže sve esencijalne aminokiseline, a njihova je vrijednost u tome što su potpuno probavljivi i iskoristivi. Proteini sirutke predstavljaju dobar izbor razgranatih aminokiselina (valin, leucin, izoleucin). Proteini sirutke imaju veću biološku vrijednost u odnosu na proteine mlijeka, a razlog tome je visoki udio lizina (40 %) te cisteina i metionina (2,5 puta više). Udjel slobodnih aminokiselina ovisi o stupnju hidrolize kazeina tijekom proizvodnje sira. U slatkoj sirutki udjel slobodnih aminokiselina je otprilike 4 puta veći u odnosu na početno mlijeko, a u kiseloj sirutki čak za približno 10 puta (Božanić i Tratnik, 2012; Tratnik, 2009).

Mineralne tvari su najpromjenjiviji sastojak sirutke zbog različitih biokemijskih procesa u tehnologiji proizvodnje sira. Sirutka je bogata topljivim solima i mikroelementima iz mlijeka. Kalcij i fosfor se djelomično zadrže u kazeinu sira, ovisno o načinu i stupnju hidrolize

kazeina, a druge mineralne tvari se pojavljuju u sirutki približno u istim udjelima kao i u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012). Kisela sirutka sadrži puno veću količinu mineralnih tvari od slatke. Uglavnom je razlika u količini kalcija, fosfata, mliječne kiseline i laktata, kojih u kiseloj sirutki ima znatno više nego u slatkoj (Božanić i sur., 2008), a osobito kalcija jer je pri većoj kiselosti sredine veća topljivost koloidnog Ca-fosfata pa nastaju topljivi Ca-fosfat i Ca-laktat (Božanić i Tratnik, 2012; Tratnik, 2009). Pri toplinskoj obradi sirutke se smanjuje topljivost mineralnih tvari što umanjuje njihovu hranjivu vrijednost, a i visok udio mineralnih tvari uzrokuje nepoželjni slano-trpki okus sirutke (Tratnik, 2003).

2.4. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI

Biološki aktivne tvari su sastojci hrane koji imaju povoljan učinak na zdravlje ako se konzumiraju u dovoljnim količinama. Dijele se na nutritivne (vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati) i ne nutritivne tvari. Možemo ih definirati kao prirodne fiziološki aktivne sastojke hrane koji imaju određena funkcionalna svojstva u organizmu, djeluju kao pomoćna sredstva u sprječavanju i liječenju bolesti te poboljšavanju stanja organizma općenito. Potječu iz biljnih i životinjskih izvora, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji u organizmu. Skupina biološki aktivnih tvari je vrlo velika i raznolika, a neki primjeri skupina biološki aktivnih tvari su: polifenoli, flavonoidi, klorofil, izotiocijanati, alkaloidi, steroli, karoteonoidi i drugi. Sve navedene tvari, ako su unesene u organizam u adekvatnim količinama, mogu povoljno utjecati na zdravlje, odnosno na različite sustave našeg organizma, kao što su gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, živčani, imunološki i drugi (Jašić, 2010).

2.5. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE SIRUTKE

Antioksidansi su tvari ili nutrijenti koji mogu spriječiti ili usporiti oksidacijsku štetu u organizmu. Kada stanice organizma koriste kisik, one proizvode slobodne radikale (nusproizvode) koji mogu uzrokovati štetu. Antioksidansi djeluju kao čistači slobodnih radikala, a time sprječavaju i popravljaju štetu koju nanose slobodni radikali. Antioksidansi se mogu podijeliti na hranjive tvari i enzime. Također mogu poboljšati imunitet i time smanjiti rizik od malignih bolesti kao što je rak ili od infekcija.

Mlijeko sadrži brojne tvari različitih bioloških učinaka koje mu daju epitet funkcionalne hrane. Mlijeko sadržava tvari raznolikog kemijskog sastava koje vrlo djelotvorno sudjeluju u podržavanju određenih fizioloških funkcija organizma te, potkrijepljeno znanstvenim dokazima, imaju i ljekovit učinak (Marenjak i sur., 2006).

Ljekovitost sirutke se prije svega zasniva na snažnima antioksidacijskim svojstvima pojedinih sastojaka koji, kad se unesu u organizam, omogućavaju sintezu endogenih antioksidansa, npr. glutaciona (GSH) (Jašić, 2010).

Pretpostavlja se da je antioksidacijski i antikancerogeni učinak sirutke rezultat veće koncentracije i bioiskoristivosti aminokiseline cistein u proteinima sirutke koji je neophodan za sintezu glutaciona (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa (Marenjak i sur., 2006). GSH je tripeptid aminokiselina L-cisteina, L-glutamina i glicina i najvažniji je antioksidans koji se nalazi u tijelu, a topljiv je u vodi. Ima svojstva podizanja imuniteta, sprječavanja oksidativnog stresa i podizanja općeg zdravlja organizma (Herceg i Režek, 2006).

Cistein sadrži tiolnu grupu koja služi kao aktivni agens u sprječavanju oksidacije i oštećenja tkiva (Herceg i Režek, 2006). Kao antioksidans, glutation je najefikasniji u reduciranom obliku. Riboflavin, niacinamid i glutation reduktaze su bitni kofaktori u sintezi reduciranog oblika glutaciona. Glutacion u formi antioksidacijske komponente sirutke istražuje se kao sredstvo za usporavanje procesa starenja.

Sirutka je također izvrstan izvor mineralnih tvari u prehrani ljudi, osobito kalcija, magnezija i fosfora. Kalcij se u sirutki nalazi u obliku koji se vrlo lako resorbira, te ne služi samo za razvoj i rast kostiju, već ima i znatnu zaštitnu ulogu pri nastanku osteoporoze (Marenjak i sur. 2006). Koncentracija pojedinih mineralnih tvari u mlijeku ovisi o koncentraciji mineralnih tvari u obroku životinja te se i na taj način može utjecati na njihov sadržaj u mlijeku. To osobito vrijedi za jod, kobalt, mangan, molibden, selen, cink, brom i bor.

Osim toga, mliječni šećer- laktoza dodatno pospješuje apsorpciju kalcija, potiče peristaltiku crijeva te smanjuje mogućnost nastanka gastrointestinalnih infekcija uspostavljajući blago kiseli pH crijeva (Lisak, 2012; Tratnik, 2009). Pretpostavlja se da kalcij iz sirutke snižava krvni tlak djelujući kao antihipertenziv, te sprječava nastanak tumora debelog crijeva i mliječne žlijezde (Marenjak i sur., 2006).

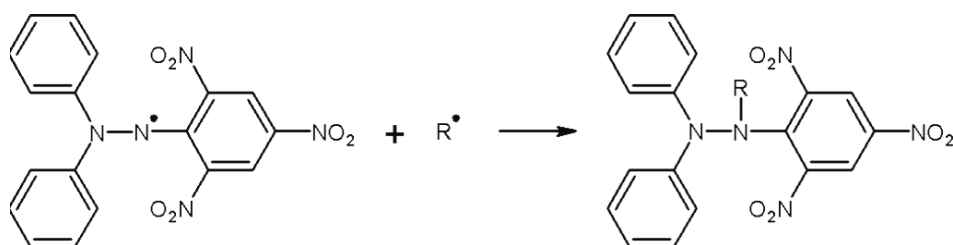
Istraživanja pokazuju da proteini sirutke imaju i povoljan učinak u liječenju arteroskleroze, cistične fibroze, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, a također preventivno djeluju i na

razvoj raka, naročito raka dojke i debelog crijeva (Jašić, 2010). Također pomažu u borbi s HIV-om, u redukciji stresa i smanjenju kortizola, smanjenju krvnog tlaka i povećanju performansi kod sportaša te poboljšanju imuniteta (Herceg i Režek, 2006).

2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Elektronska spinska (ESR) ili paramagnetska rezonancija (EPR) spektroskopska je metoda za detektiranje nesparenih elektrona, tj. prijelaz nesparenih elektrona u primijenjenom magnetskom polju koji se nalaze u mnogim materijalima, kao što su slobodni radikali, mnogi ioni prijelaznih metala, defekti u materijalu. Spin elektronu daje magnetski moment zbog čega se paramagnetički (nespareni) elektroni stavljeni u vanjsko magnetsko polje orijentiraju paralelno ili antiparalelno u odnosu na smjer magnetskog polja prilikom čega dolazi do cijepanja energijskih razina. Primjenom mikrovalnog zračenja određene frekvencije elektron se pobuđuje te prelazi iz niže u višu energijsku razinu. Da bi došlo do prijelaza, vanjsko magnetsko polje mora postići takvu snagu da razlika energije između dvije energijske razine točno odgovara primijenjenoj frekvenciji mikrovalnog zračenja. To se postiže posmicanjem magnetskog polja dok je uzorak izložen mikrovalnom zračenju konstantne frekvencije. Detekcija apsorpcije zračenja čija je energija jednaka razlici između energetske razine temelj je EPR spektroskopije (Ranimol i Sabu, 2010; Junk, 2012).

Radikal koji se koristi za praćenje antioksidacijske aktivnosti je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) čije ime u skladu s IUPAC-ovom nomenklaturom glasi di(fenil)-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazan. Molekulska formula ovog spoja je $C_{18}H_{12}N_5O_6$. Na slici 1 prikazana je struktura oksidiranog i reduciranog oblika DPPH radikala.



Slika 1. Struktura oksidiranog (lijevo) i reduciranog (desno) oblika DPPH radikala (Anonymous 1)

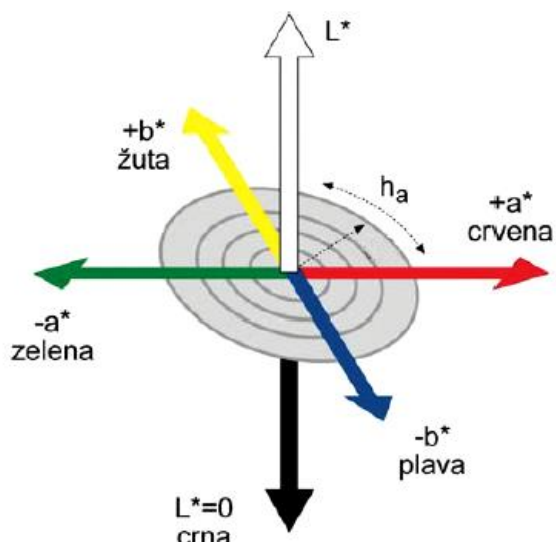
2.7. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE BOJE

Spektrofotometrija se temelji na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari. Za određivanje u UV, Vis i IR dijelu spektra upotrebljavaju se instrumenti, odnosno spektrofotometri. Najvažniji dijelovi instrumenta koji se primjenjuju u apsorpcijskoj spektrofotometriji jesu: izvor svjetlosti, monokromator, kivete i držači za kivete te uređaj za mjerenje intenziteta propuštene svjetlosti (detektor).

U spektrofotometriji za vidljivi dio spektra najčešće se upotrebljava lampa s volframovom niti, dok se za ultraljubičasti dio spektra upotrebljava deuterijeva lampa. Spektrofotometar je uređaj koji mjeri promjene u refleksiji, transmisiji ili zračenju, u intervalima, duž valnih duljina vidljivog dijela spektra. Prilikom određivanja boja najčešće se primjenjuju spektrofotometrijske krivulje u valnom području od 400 nm do 700 nm.

Kako čovjekovo oko vidi boju ovisi o stimulaciji receptora za crvenu, zelenu i plavu komponentu, pa su zato potrebne tri vrijednosti kako bi se opisale sve moguće boje. Stručnjaci su razvili mnoge sustave boja, a najraširenija je primjena XYZ i CIE $L^*a^*b^*$ sustava boja. U XYZ sustavu boja primjenjuju se X, Y i Z oznake za komponente boje, pri čemu X i Y oznaka označavaju koordinate boje, a Z svjetlinu. CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja (slika 2) zasnovan je na suprotnoj teoriji boja. Funkcija svjetline L^* daje skalu neutralne boje od crne do bijele (od 0 do 100 jedinica svjetline), a kromatičnost boje definira se u odnosu na neutralnu os koja ima vrijednost 0 kromatičnosti. CIE a^* je koordinata za crvenu-zelenu, a CIE b^* za žutu-plavu (slika 2).

Svaka boja definira se svjetlinom i kromatičnošću s tri točke na svakoj osi. Na temelju CIE koordinata koje se mogu izračunati za boje pod različitim izvorima svjetla, može se odrediti boja (Mihoci, 2015).

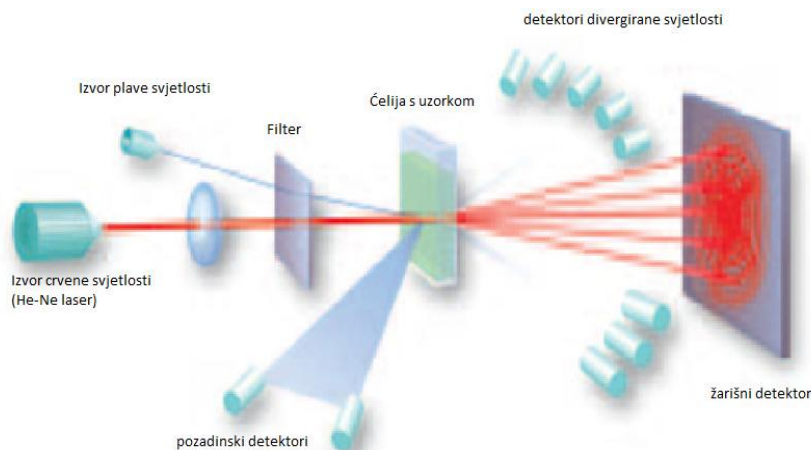


Slika 2. CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja (Anonymous 2)

2.8. ODREĐIVANJE VELIČINE ČESTICA LASERSKOM DIFRAKCIJOM

Za potpunu karakterizaciju čestica trodimenzionalne strukture potrebno je znati tri parametara, a to su dužina, širina i visina.

Analiza veličine čestica laserskom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti (lasersku zraku) raspršuju svjetlost pod određenim kutovima koji izravno ovise o veličini čestica. Kut pod kojim čestica raspršuje svjetlost logaritamski raste sa smanjenjem veličine čestica. Intenzitet raspršene svjetlosti također ovisi o veličini čestica. Čestice velikih dimenzija raspršuju svjetlost pod malim kutovima, ali sa visokim intenzitetom, dok čestice malih dimenzija svjetlost raspršuju pod širim kutovima, ali s manjim intenzitetom. Uređaji za određivanje veličine čestica laserskom difrakcijom sastoje se od lasera kao izvora svjetlosti točno definirane valne duljine, detektora koji mjere intenzitet raspršene svjetlosti pod raznim kutovima te dobavnu jedinicu koja je odgovorna za raspršenje i ravnomjernu raspodjelu čestica u mjernoj ćeliji (slika 3).

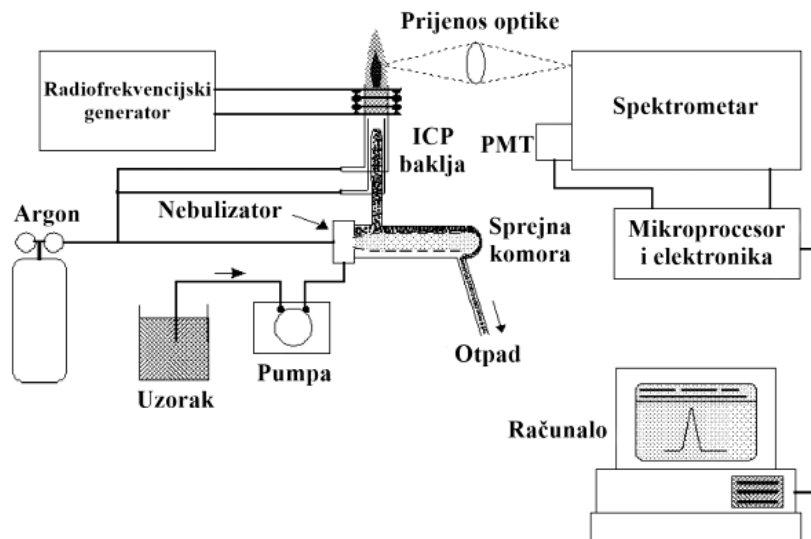


Slika 3. Princip rada laserskog analizatora (Anonymous 3)

2.9. ODREĐIVANJE PROFILA MINERALNIH TVARI ICP-OES I ICP-MS METODOM

Spektrometrija optičke emisije induktivno spregnute plazme (ICP-OES) je multielementna metoda koja ima vrlo dobru detekciju, visoku pouzdanost te veliku brzinu određivanja analita, a osjetljivost ICP je 10-100 puta veća (bolja) od AAS. Obično se koristi za određivanje elemenata u tekućim uzorcima. Može se koristiti za određivanje više od 70 elemenata istovremeno i u širokom rasponu koncentracija (Pingping, 2012). Glavni dijelovi ICP-OES sustava su: nebulizator, ICP baklja i spektrometar (slika 4). Značajna prednost plazme pred plamenom je činjenica da se u plazmi postižu uvjeti za efikasnu atomizaciju i pobuđivanje gotovo svih atoma prisutnih u uzorku. Zbog toga je s ICP-om moguće simultano odrediti veći broj elemenata.

U optičkoj emisijskoj spektrometriji uzorak se podvrgava temperaturama koje su toliko visoke da uz disocijaciju na atome dovode i do pobude i ionizacije atoma u uzorku. Kada se atomi nađu u pobuđenom stanju, prilikom povratka u osnovno stanje emitiraju određenu količinu energije. Intenzitet emitirane svjetlosti pri specifičnoj valnoj duljini se mjeri i koristi za određivanje koncentracije pojedinog elementa jer je intenzitet zračenja proporcionalan broju pobuđenih atoma (Boss i Fredeen, 1999).



Slika 4. Princip rada ICP-OES uređaja (Boss i Fredeen, 1999)

Plazma je vodljiva plinska smjesa koja sadrži znatnu količinu kationa i elektrona. Temperatura plazme je od 6000-10000 K. Glavni dijelovi izvora induktivno spregnute plazme su: plazma plamenik, induksijska zavojnica, sustav za reguliranje protoka argona i radiofrekvencijski generator. Plazma plamenik se sastoji od tri koncentrične kvarcne cijevi kojima struji argon. Ioni argona jednom stvoreni u plazmi apsorbiraju dovoljno snage iz vanjskih izvora, koja održava temperaturu na stupnju prikladnome za daljnju ionizaciju i beskonačno održavanje plazme.

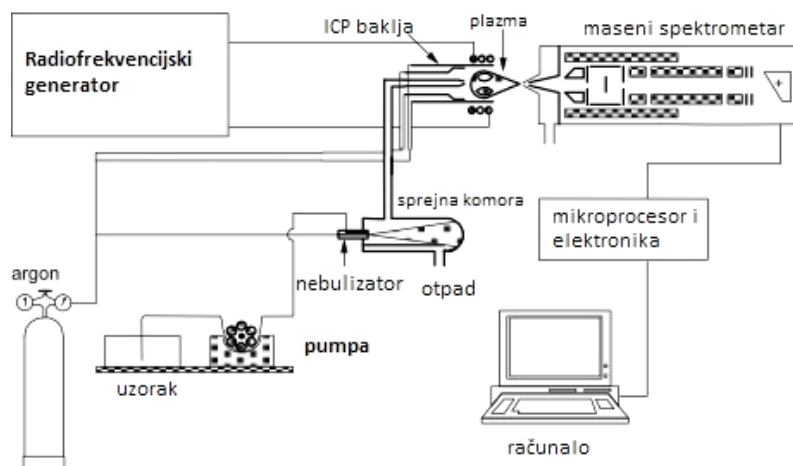
Tipična plazma ima vrlo intenzivnu, blistavo bijelu, neprozirnu jezgru prekrivenu repom sličnom plamenu. Spektralna promatranja uglavnom se obavljaju 15-20 mm iznad induksijske zavojnice (Ingle i Crouch, 1988).

Neke od prednosti plazma-izvora su: atomizacija nastaje u inertoj okolini što produljuje vrijeme života uzorka i temperaturni presjek plazme je jednoličan pa su baždarne krivulje uglavnom linearne za veliki raspon koncentracija (Skoog i sur., 2007).

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) je vrsta atomske spektrometrije masa u kojoj se induktivno spregnuta plazma (ICP) koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom.

Budući da se kod ICP-MS metode koristi maseni spektrometar kao detektor, ovo je vrlo osjetljiva metoda koja ima nisko pozadinsko zračenje, limiti detekcije su u području ng L^{-1} i

omogućuje određivanje svih elemenata. Iako može odrediti iste elemente kao i ostale atomske spektroskopske tehnike kao što su FAA (Flame Atomic Absorption), ETA (Electrothermal atomization) i ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy), ICP-MS ima veliku prednost u svojoj multielementarnoj analizi, brzini analize, niskom limitu detekcije i sposobnosti mjerenju izotopa. ICP-MS može provoditi kvalitativne, polukvantitativne i kvantitativne analize. Na slici 5 prikazan je princip rada ICP-MS uređaja.



Slika 5. Princip rada ICP-MS uređaja (Anonymous 4)

Određivanje elemenata u tragovima može biti vrlo teško zbog potencijalnih smetnji koje nastaju u uzorcima sa visokim koncentracijama velikog broja elemenata (utjecaj matriksa). Utjecaj matriksa i pojava preklapanja mogu se znatno smanjiti odgovarajućim postavkama instrumenta za plazmu i unos uzorka (Boss i Fredeen, 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog rada, za pripremanje kisele i slatke sirutke korišteno je svježe ovčje i svježe kozje mlijeko s lokalnih farmi. Za proizvodnju kisele sirutke korištena je liofilizirana mezofilna kultura (Chr. Hansen's Lab. Danska CHN-22, DVS: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovara diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) te octena kiselina (11 %-tna otopina; Merck, Njemačka), a za proizvodnju slatke sirutke sirilo (enzimski pripravak Siris, jačine 1:1000; Medimon d.o.o., Hrvatska).

Za provedbu analiza korišteni su još: izoamilni alkohol (Kemika, Hrvatska), sumporna kiselina (90-91 %-tna otopina; Carlo Erba, Francuska), natrijeva lužina (0,1 M otopina; Gram-Mol, Hrvatska), 2 %-tna alkoholna otopina fenolftaleina (Gram-Mol, Hrvatska), destilirana voda te radikal DPPH (Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u etanolu ($c = 0,15 \text{ mmol mL}^{-1}$).

3.2. METODE RADA

Za dobivanje kisele i slatke sirutke korišteno je svježe punomasno ovčje i kozje mlijeko s lokalnih farmi prethodno obrano na centrifugalnom separatoru (Tehtnica, Slovenia) do oko 1 % mliječne masti.

Sve analize ponovljene su dva puta, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti dvaju mjerenja.

3.2.1. Priprema sirutke

Mlijeko se najprije zagrijalo na 40 °C da bi se otopile kapljice mliječne masti te se zatim obiralo u centrifugalnom separatoru. Na temelju različite gustoće mliječne masti u mlijeku i centrifugalne sile u separatoru vršilo se odvajanje mliječne masti i mlijeka.

Svaka vrsta sirutke se proizvela iz jedne litre obranog mlijeka.

a) Priprema kisele sirutke - sirenje obranog mlijeka mezofilnom kulturom CHN-22

Od jedne litre obranog ovčjeg i kozjeg mlijeka oduzelo se 100 mL u koje je stavljeno 0,13 g liofilizirane mezofilne kulture CHN-22. Nakon toga se mlijeko sa kulturom stavilo na aktivaciju u termostat na 30 °C tijekom 30 min. Aktivirana mezofilna kultura se zatim

inokulirala u ostatak (900 mL) obranog mlijeka te je uslijedila inkubacija u termostatu na 30 °C tijekom 24 sata kako bi se mlijeko podsirilo i dobila kisela sirutka.

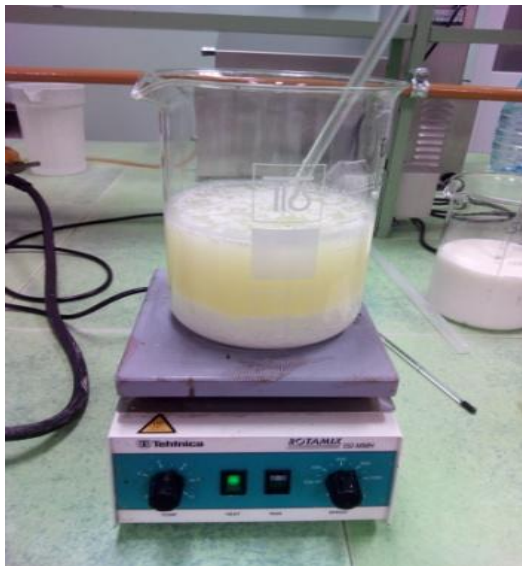
b) Priprema slatke sirutke - sirenje obranog mlijeka sirilom

U jednu litru obranog ovčjeg i kozjeg mlijeka stavljena je određena količina sirila (izračunata prema formuli [1]), jakosti 1:1000. Nakon dodavanja sirila u mlijeko uslijedila je inkubacija u termostatu na 35 °C tijekom 35 min kako bi kazein koagulirao i odvojila se slatka sirutka.

$$\text{količina sirila} = \frac{V (\text{mlijeka, L}) * 40}{\text{jakost sirila} * \text{vrijeme potrebno za sirenje (min)}} \quad [1]$$

c) Priprema kisele sirutke - sirenje octenom kiselinom

Obrano ovčje i kozje mlijeko je zagrijano na 35 °C i zatim se polako dodavala 11 % -tna otopina octene kiseline dok se nije postigla pH vrijednost od oko 4,6, što je ujedno i izoelektrična točka kazeina pa dolazi do umrežavanja kazeina, odnosno stvaranja grušā i otpuštanja kisele sirutke.



Slika 6. Sirenje mlijeka octenom kiselinom (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom po Gerberu
Metoda se temelji na kemijskom otapanju proteina mlijeka (kazeina) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Radi lakšeg odvajanja mliječne masti dodaje se

izoamilni- alkohol koji smanjuje površinsku napetost, odnosno služi za razdvajanje masne i vodene faze. Mast se odvoji centrifugiranjem, a količina se očitava na skali butirometra pri točno određenoj temperaturi (65 °C).

U butirometar se otpipetira 10 mL koncentrirane sumporne kiseline, zatim 10 mL mlijeka i na kraju 1 mL izoamilnog- alkohola. Butirometar se začepi, a sadržaj se promiješa okretanjem butirometra sve dok svijetlo smeđa boja otopine ne promijeni boju u tamno smeđu, što je znak završetka reakcije i mućkanja. Budući da se miješanjem mlijeka i sumporne kiseline butirometar jako zagrijava (preko 90 °C), butirometar je potrebno prije mućkanja zamotati u krpku.

Butirometar se zatim stavi u centrifugalni separator temperiran na 65 °C na 5 min. Nakon centrifugiranja, očitava se udio mliječne masti na skali butirometra (Božanić i sur., 2010).

3.2.3. Određivanje kiselosti sirutke

Kiselost sirutke analizirana je kao aktivna i titracijska kiselost. Aktivna kiselost određivala se potenciometrijski (pH- metrom), a titracijska kiselost (°SH) metodom po Soxhlet-Henkelu.

pH vrijednost je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini i mjerilo je za aktivnu kiselost sirutke. pH vrijednost sirutke određena je pH-metrom (Technische Werkstätten GmbH pH 3110, WTW, Njemačka). Prije samog mjerenja, elektroda pH-metra se ispere destiliranom vodom i kalibrira. Elektroda se zatim polako uroni u čašu sa sirutkom, lagano miješa i očitava se kad se pH-vrijednost na zaslonu ustali. Nakon mjerenja, elektroda se ispere destiliranom vodom i uroni u otopinu KCl-a u kojoj se čuva do slijedeće uporabe.

Titracijska kiselost sirutke određivala se titracijom sirutke s 0,1 M otopinom NaOH uz indikator fenolftalein (2 %-tna otopina). U Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 20 mL uzorka sirutke i doda 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina. Smjesa se promiješa i titrira 0,1 M otopinom natrijeve lužine dok se ne postigne blijedo ružičasta boja otopine koja traje barem 1 min (Božanić i sur., 2010). Kiselost sirutke izražena u stupnjevima po Soxhlet-Henkelu (°SH) izračuna se prema formuli [2]:

$$V(\text{NaOH, mL}) * 2 * f = \text{°SH} \quad [2]$$

3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u sirutki sušenjem u sušioniku

Metoda se temelji na isparavanju vode iz uzorka za analizu sušenjem u sušioniku pri konstantnoj temperaturi od 102 °C do konstantne mase.

U prethodno osušenu (102 °C), ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu sa kvarcnim pijeskom izvaže se 10 mL svakog uzorka sirutke. Otvorena posudica s uzorkom i poklopcem suši se u sušioniku na 102 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, svaka posudica se poklopi odgovarajućim poklopcem i brzo stavi u eksikator na hlađenje do sobne temperature te se zatim izvaže s točnošću od 0,001 g na analitičkoj vagi. Postupak sušenja se ponavlja dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,005 g (Božanić i sur., 2010).

Udio suhe tvari izračuna se prema formuli [4]:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} * 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [4]$$

3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u sirutki

Pepeo, tj. udio mineralnih tvari u sirutki određivao se tako da se svaki uzorak sirutke upario i mineralizirao u Mufolnoj peći na 550 °C.

Svaki uzorak sirutke izvaže se u količini od 10 mL u prethodno izžaren (650 °C), ohlađen i izvagan porculanski lončić za spaljivanje. Svaki porculanski lončić sa uzorkom najprije se zagrijava na plameniku do potpune karbonizacije uzorka, a zatim se stavi u mufolnu peć (prethodno zagrijanu na 550 °C) na spaljivanje. Spaljivanje se provodi do postizanja svijetlo sivog pepela. Po završetku spaljivanja, porculanski lončići sa uzorkom stave se u eksikator sa silikagelom na hlađenje, do postizanja sobne temperature, a potom se izvažu na analitičkoj vagi (Božanić i sur., 2010).

Udio pepela izračuna se prema jednadžbi [5]:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} * 100 = \% \text{ pepela} \quad [5]$$

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje sirutke

Određivanje boje uzorka provodilo se CM-3500d kolorimetrom. Određivanje boje sirutke provedeno je uz masku otvora 30 mm, a mjerenja su provedena u SCE modu. Sirutka je

izlivena u kivetu te umetnuta u uređaj koji je potom mjerio transmitaciju u vidljivom području, te L^* , a^* i b^* vrijednosti. Prije početka mjerenja kalibriran je uređaj za masku otvora 30 mm (Mihoci, 2015). Obrada podataka vršena je u SpectraMagicNX programu. ΔE^* , koji pokazuje koliko neki proizvod odstupa od referentne boje (tablica 6) računa se prema formuli [6]:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2} \quad [6]$$

L^* - svjetlina boje ispitivanog uzorka u $L^*a^*b^*$ sustavu

a^* - parametar boje ispitivanog uzorka

b^* - parametar boje ispitivanog uzorka

L_{ref}^* - svjetlina boje referentnog uzorka

a_{ref}^* - parametar boje referentnog uzorka

b_{ref}^* - parametar boje referentnog uzorka

Tablica 6. Značenje razlika između izmjerene ΔE^* vrijednosti i referentne boje

| ΔE^* | Značenje |
|--------------|---------------------|
| 0,00-0,05 | Razlike u tragovima |
| 0,50-1,50 | Mala razlika |
| 1,50-3,00 | Primjetna razlika |
| 3,00-6,00 | Značajna razlika |
| 6,00-12,00 | Velika razlika |
| >12,00 | Vrlo velika razlika |

3.2.7. Određivanje veličine čestica u sirutki laserskom difrakcijom

Uzorci sirutke homogenizirani su protresanjem plastičnih boca nakon čega je izmjerena veličina čestica uređajem Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). Princip rada uređaja za određivanje raspodjele veličine čestica se bazira na odstupanju laserske zrake tijekom

prolaska kroz vodenu suspenziju čestica ispitivanog materijala. Uzorak se unosi i homogenizira u disperznoj jedinici uređaja. Homogeni uzorak prolazi kroz mjernu ćeliju na koju je usmjerena laserska zraka. Čestice raspršuju svjetlost pod kutom koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Detektor optičkog sustava sastavljen je od više manjih optičkih detektora gdje svaki od njih prikuplja pod različitim kutovima odbijenu svjetlost (Jillavenkatesa i sur., 2001).

Rezultati su obrađeni u Mastersizer 2000 software-u, uz određene parametre, te prikazani grafički kao odnos udjela čestica određene veličine u postocima i veličine čestica u μm . Brzina protoka bila je podešena na 1 L min^{-1} , a obskuracija (gubitak intenziteta laserskog svjetla nakon prolaska kroz uzorak) na 5 %, uz konstantno miješanje pri maksimalnom broju okretaja.

3.2.8. Senzorska analiza sirutke

Senzorska ocjena kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda podrazumijeva procjenu izgleda, boje, mirisa i okusa te taloga.

Pri senzorskoj analizi uzoraka sirutke koristila se metoda bodovanja s 20 ponderiranih bodova (*Prilog 1*). Ocjena pojedinog svojstva (od 1 do 5) pomnožena je faktorom značajnosti tog svojstva (ISO, 1985). Prema broju ponderiranih bodova, odredila se kategorija kakvoće slatke i kisele sirutke.

Ocjenjivanje uzoraka sirutke provedeno je u laboratoriju pri sobnoj temperaturi, od strane 5 školovanih senzorskih analitičara. Uzorci su servirani u prozirne staklene čaše i ohlađeni na sobnu temperaturu, a ocjenjivao se okus, miris, boja, talog i izgled uzoraka. Intenzitet senzorskih svojstava izražen je ocjenama od 1 do 5, a obrazac za gore navedeno ocjenjivanje priložen je u Prilogu 2.

Tablica 7. Kategorija kakvoće mliječnih proizvoda prema broju ponderiranih bodova (Filajdić i sur., 1988)

| Kategorija kakvoće | Raspon ponderiranih bodova |
|--------------------|----------------------------|
| Odlična | 17,6 - 20 |
| Dobra | 15,2 - 17,5 |
| Osrednja | 13,2 - 15,1 |
| Još prihvatljiva | 11,2 - 13,1 |
| Ne prihvatljiva | < 11,2 |

3.2.9. Određivanje profila mineralnih tvari u sirutki ICP-OES i ICP-MS metodom
 Određivanje mineralnog sastava uzoraka ovčje i kozje kisele i slatke sirutke provedeno je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu. Makroelementi (Ca, K, Na i Mg) analizirani su optičkom emisijskom spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES), a ostali elementi masenom spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) (Boss i Fredeen, 1999).

3.2.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti u sirutki DPPH metodom
 Sposobnost gašenja DPPH radikala jedna je od najpopularnijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti hrane.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka kisele i slatke sirutke provedeno je u Laboratoriju za magnetske rezonancije Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, metodom elektronske spinske rezonancije (ESR), na ESR spektrometru tipa Varian E-109 koji je dodatno opremljen mikrovalnim mostom Bruker ER 041 XG.

Kao objekt antioksidacijskog djelovanja sirutke korišten je radikal DPPH otopljen u etanolu. Koncentracija DPPH u etanolu bila je $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$.

Uzorci za EPR mjerenja pripremani su na sljedeći način:

1. pripremljena je otopina DPPH radikala u etanolu koncentracije $0,15 \text{ mmol dm}^{-3}$,
2. snimljen je spektar otopine DPPH radikala kojoj je dodana izvorska voda „Kala“ (slijepa proba),

3. otopini radikala dodan je određeni volumen uzorka sirutke,
4. zabilježeno je vrijeme kad je otopini radikala dodan uzorak sirutke ($t = 0$),
5. nakon što je otopina promiješana, dio otopine stavljen je u kapilaru, a kapilara je stavljena u ESR cjevčicu,
6. spektar reakcijske otopine sniman je tijekom 20 minuta, otprilike svake 1 minute tijekom prvih 10 minuta i svake 2 minute tijekom sljedećih 10 minuta.

ESR spektri snimani su pri centralnom polju od 331 mT (3310 G), uz magnetski posmak od 10 mT (100 G), snagu mikrovalnog polja od 10 mW, amplitudu modulacije 0,1 mT (1 G) i pojačanje 800 te vremenom posmaka magnetskog polja od 20 s (Ranimol i Sabu, 2010; Junk, 2012). Za akumuliranje i obradu spektra korišten je EW (EPRWare) Scientific Software Service program, a rezultati su prikazani pomoću grafova izrađenih u programu SigmaPlot.

Obzirom da su ESR spektrometri koncipirani tako da spektre prikazuju u obliku prve derivacije apsorpcijskih linija, pomoću EW programskog paketa računane su vrijednosti dvostrukih integrala ESR spektara DPPH. Vrijednosti dobivene dvostrukim integriranjem korigirane su za snagu mikrovalnog polja od 10 mW i pojačanje 800. Tako dobivene vrijednosti dvostrukih integrala proporcionalne su broju DPPH radikala u uzorku.

Praćen je pad intenziteta ESR signala, odnosno pad vrijednosti dvostrukih integrala ESR spektara, u funkciji vremena proteklog od trenutka dodatka uzorka sirutke otopini DPPH. Rezultati su normirani na početnu vrijednost tj. na vrijednost dvostrukog integrala slijepe probe. Izmjerene vrijednosti relativnih intenziteta signala, praćene u ovisnosti o proteklom vremenu od trenutka $t = 0$, izražene su u postocima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i profil mineralnih tvari u sirutkama proizvedenima iz ovčjeg i kozjeg mlijeka različitim postupcima sirenja te ispitati utjecaj pasterizacije 72 °C/ 15" na antioksidacijsku aktivnost sirutke.

4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE SIRUTKE

Tablicom 8 prikazan je kemijski sastav kisele sirutke dobivene sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka mezofilnom kulturom, slatke sirutke dobivene sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka sirilom te kisele sirutke dobivene sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka octenom kiselinom.

Tablica 8. Kemijski sastav kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (n=2)

| VRSTA MLIJEKA | VRSTA SIRUTKE | pH | °SH | PEPEO (%) | SUHA TVAR (%) |
|--------------------------|------------------------------------|-------------|--------------|------------------|--------------------------|
| OVČJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 4,73 ± 0,03 | 70,7 ± 2,97 | 1,11 ± 0,15 | 7,32 ± 0,51 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 6,05 ± 0,86 | 23,4 ± 11,31 | 0,75 ± 0,22 | 8,01 ± 0,19 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 4,78 ± 0,25 | 79,6 ± 10,75 | 0,96 ± 0,21 | 7,95 ± 0,65 |
| KOZJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 4,52 ± 0,02 | 59,1 ± 23,90 | 0,95 ± 0,04 | 6,06 ± 0,41 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 6,40 ± 0,55 | 13,4 ± 5,94 | 0,71 ± 0,10 | 6,19 ± 0,28 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 4,66 ± 0,08 | 59,3 ± 3,25 | 0,91 ± 0,05 | 6,51 ± 0,27 |

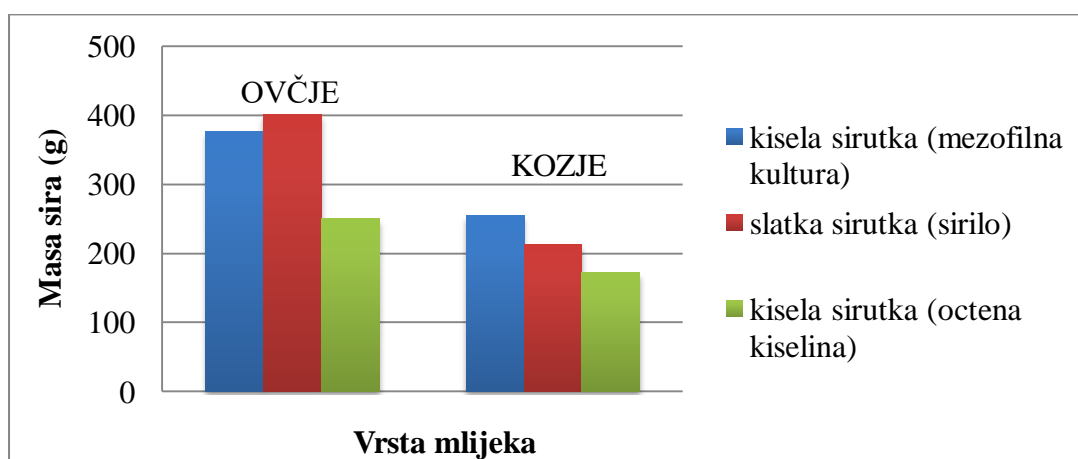
Dobiveni rezultati (tablica 8) prikazuju da izmjerena titracijska kiselost uzoraka slatke i kisele sirutke uglavnom prati pH vrijednost uzoraka, odnosno što je pH vrijednost manja, titracijska je kiselost veća. Ovčja i kozja slatka sirutka imale su značajno veću pH vrijednost i manju titracijsku kiselost od kisele sirutke. pH vrijednost kozje slatke sirutke iznosila je 6,40 (13,4

°SH), dok je pH vrijednost ovčje slatke sirutke bila nešto niža (6,05 pH jedinica, odnosno 23,4 °SH). pH vrijednost kozje kisele sirutke, dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, iznosila 4,52 (59,1 °SH), dok je taj uzorak ovčje sirutke imao nešto višu pH vrijednost (4,73 pH jedinica, odnosno 70,7 °SH). pH vrijednost kozje kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom iznosila je 4,66 (59,3 °SH), dok je pH vrijednost ovčje kisele sirutke (octena kiselina) bila nešto viša (4,78 pH jedinica, odnosno 79,6 °SH). Dobivene vrijednosti pH za sve uzorke kisele i slatke sirutke slažu se sa podacima iz literature (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011). pH vrijednosti uzoraka kisele (mezofilna kultura) ovčje i kozje sirutke niže su od pH vrijednosti kisele sirutke (octena kiselina) zbog većeg udjela nastale mliječne kiseline. Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da je titracijska kiselost ovčje i kozje sirutke viša od titracijske kiselosti kravlje sirutke. To je vjerojatno zbog većeg udjela proteina sirutke i većeg puferskog kapaciteta u ovčjem i kozjem mlijeku (Božanić i sur., 2018).

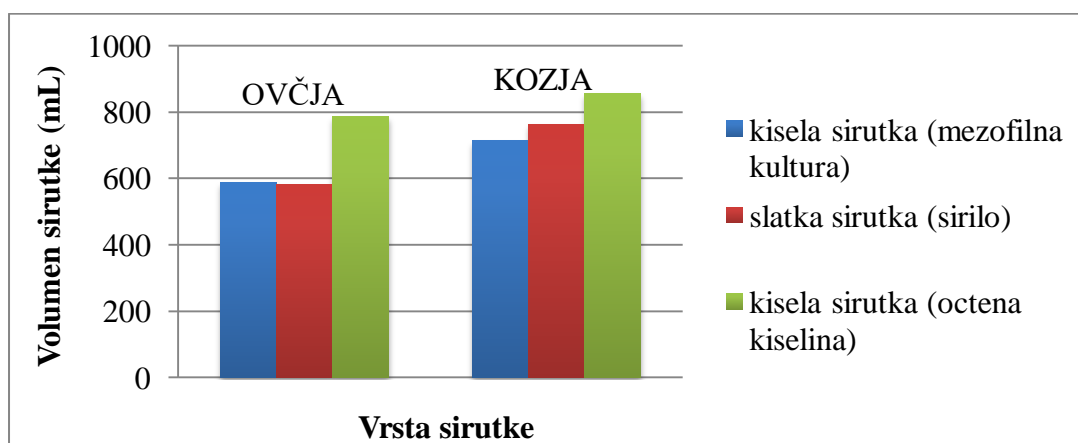
Udio suhe tvari (tablica 8) u analiziranim uzorcima kozje sirutke bio je u rasponu od 6,06 do 6,51 %, što odgovara rezultatima iz literature (Popović-Vranješ i sur., 2017). Udio suhe tvari u uzorcima ovčje sirutke bio je nešto veći i to u rasponu od 7,32 do 8,01 %. Najveći udio suhe tvari imala je ovčja slatka sirutka (8,01 %), zatim kisela dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom (7,95 %), dok kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom imala najmanji udio suhe tvari (7,32 %). Najveći udio suhe tvari u kozjoj sirutki bio je u kiseloj sirutki dobivenoj sirenjem mlijeka octenom kiselinom (6,51 %), zatim u slatkoj sirutki (6,19 %), dok je najmanji udio imala kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (6,06 %). Ako se udio suhe tvari usporedi sa pH vrijednosti sirutke, može se vidjeti da kisela sirutka ima manji udio suhe tvari, a prema tome i manji udio laktoze nego slatka sirutka (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011). Upravo zbog toga je pH vrijednost kisele sirutke manja od pH vrijednosti slatke sirutke, odnosno kiselom koagulacijom kazeina nastaje više mliječne kiseline nego enzimskom koagulacijom (Lučan, 2015). Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017) može se primijetiti da ovčja sirutka sadrži najveći udio suhe tvari, dok je udio suhe tvari kravlje i kozje sirutke približno jednak.

Udio pepela (tablica 8) je u analiziranim uzorcima kozje sirutke bio je u rasponu 0,71 do 0,95 %, dok je u uzorcima ovčje sirutke bio nešto veći i to u rasponu od 0,75 do 1,11 %. Najveći udio pepela imala je ovčja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (1,11 %), zatim kisela dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom (0,96 %), dok je slatka

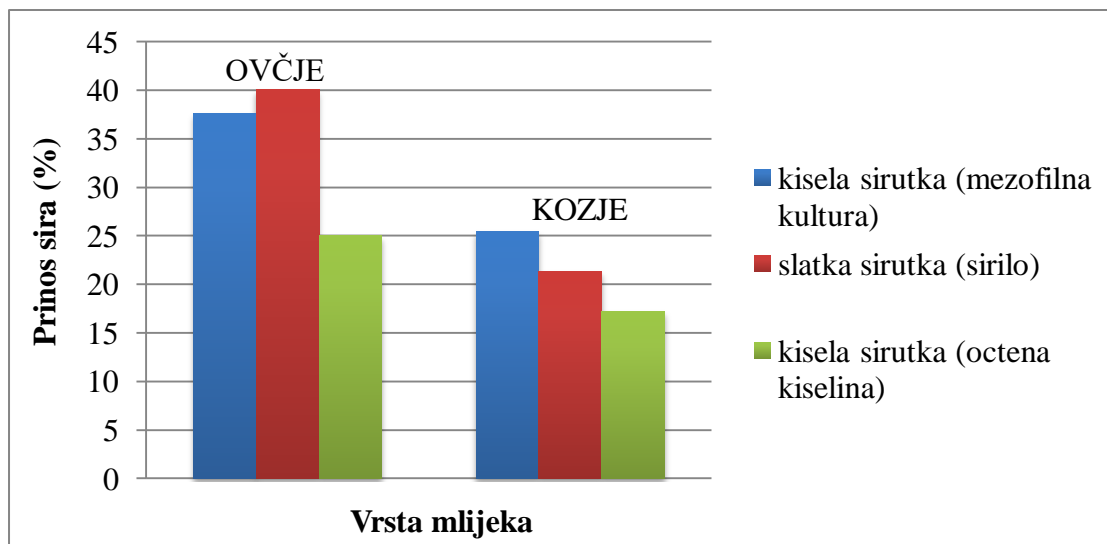
sirutka imala najmanji udio pepela (0,75 %). Najveći udio pepela u kozjoj sirutki bio je u kiseloj sirutki dobivenoj sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (0,95 %), zatim u kiseloj dobivenoj sirenjem mlijeka octenom kiselinom (0,91 %), dok je slatka sirutka imala najmanji udio pepela (0,71 %). Dobiveni rezultati podudaraju se sa podacima navedenima u literaturi (Božanić i Tratnik, 2012). Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da najveći udio pepela sadrži ovčja sirutka zbog većeg udjela mineralnih tvari, dok je u kravljjoj sirutki udio pepela najmanji jer sadrži i manji udjel mineralnih tvari.



Slika 7. Usporedba mase sira dobivenog sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka različitim postupcima (n=2)



Slika 8. Usporedba volumena sirutke dobivenog sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka različitim postupcima (n=2)



Slika 9. Usporedba prinosa sira (na 100 kg mlijeka) dobivenog sirenjem ovčjeg i kozjeg mlijeka različitim postupcima (n=2)

Na slici 9 vidljivo je da veći prinos sira ima ovčje, nego kozje mlijeko, zbog većeg udjela proteina, odnosno kazeina. Prinos sira dobivenog sirenjem ovčjeg mlijeka sirilom bio je najveći i iznosio je 40,03 %, a prinos sira dobivenog sirenjem ovčjeg mlijeka mezofilnom kulturom iznosio je 37,65 %. Prinos sira dobivenog sirenjem ovčjeg mlijeka octenom kiselinom bio je najmanji i iznosio je samo 24,99 %. Kod kozjeg mlijeka, najveći prinos sira dobiven je sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (25,43 %), zatim sirenjem mlijeka sirilom (21,35 %), dok je prinos sira dobivenog sirenjem mlijeka octenom kiselinom bio najmanji i iznosio je samo 17,20 %.

Također, sirevi dobiveni sirenjem kozjeg mlijeka bili su mekše konzistencije i bijele boje (slika 11) zbog manjeg promjera masnih globula i manje α_s -kazeina (Božanić i Tratnik, 2012; Božanić i sur., 2018), dok su oni dobiveni sirenjem ovčjeg mlijeka bili čvršće konzistencije i žućkaste boje (slika 10). Ovčje mlijeko sadrži najveći sadržaj kazeina i veće globule masti pa se zato ostvaruje i najveći prinos (Božanić i Tratnik, 2012), dok kozje mlijeko daje manji prinos i nježniji gruž zbog manje količine α_{s1} -kazeina (Božanić i sur., 2018).



Slika 10. Sir i sirutka dobiveni sirenjem ovčjeg mlijeka različitim postupcima (vlastita fotografija)



Slika 11. Sir i sirutka dobiveni sirenjem kozjeg mlijeka različitim postupcima (vlastita fotografija)

Ako se prinosi sireva usporede s bojom sirutke određivanom kolorimetrom (poglavlje 4.2.), može se vidjeti da sirutka dobivena sirenjem ovčjeg mlijeka octenom kiselinom i kozja sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom imaju najmanju L^* vrijednost, odnosno najmanje su svjetline. Upravo je u tako dobivenoj sirutki boja bila mliječna što ukazuje na zaostali kazein, a to se vidi i po malom prinosu sira koji je kod ovčjeg mlijeka iznosio 24,99 %, a kod kozjeg svega 17,20 %.

Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da ovčje mlijeko ima najveći prinos sira, dok je prinos sira kod kravljeg i kozjeg mlijeka približno jednak. Dodatkom jake kiseline izravno u kozje mlijeko nastaju nježnije pahulje i to puno brže u odnosu na kravlje mlijeko koje sporije stvara grušu, što dokazuje da se kozje mlijeko probavlja brže i lakše u odnosu na kravlje (Božanić i Tratnik, 2012; Božanić i sur., 2018).

Također, ovčje mlijeko je sadržavalo oko 9 % m.m., dok je kozje mlijeko sadržavalo oko 3,6 % m.m. Zbog manjeg promjera masnih globula, obiranje na centrifugalnom separatoru do oko 1 % m.m bilo je znatno sporije nego kod kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017).

4.2. BOJA SIRUTKE

Rezultati kolorimetrijske analize boje sirutke prikazani su u tablici 9. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su svi uzorci ovčje sirutke imali vrijednost parametra a^* negativnu, što znači da prevladava zelena boja. Kisela sirutka (octena kiselina) imala je najnegativniju vrijednost parametra a^* (-3,46), zatim kisela (mezofilna kultura) sirutka (-2,42), dok je slatka sirutka imala vrijednost parametra a^* najbližu nuli (-0,74). Vrijednost parametra b^* za sve uzorke ovčje sirutke je bila pozitivna, što znači da prevladava žuta boja. Kisela (mezofilna kultura) sirutka je imala najmanju vrijednost parametra b^* (21,84), zatim slatka sirutka (25,69), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najveću vrijednost parametra b^* (35,35). Što se tiče vrijednosti parametra L^* , koji označava svjetlinu, najsvjetliji je bilo uzorak slatke sirutke (59,93), zatim uzorak kisele (mezofilna kultura) sirutke (55,79), dok je uzorak kisele (octena kiselina) sirutke bio najmanje svjetline (45,05).

S druge strane, svi uzorci kozje sirutke imali su vrijednost parametra a^* pozitivnu, što znači da je zelena boja malo manje zastupljena. Kisela sirutka (mezofilna kultura) imala je najmanju vrijednost parametra a^* (0,24), zatim kisela sirutka dobivena grušanjem mlijeka

octenom kiselinom (0,28), dok je slatka sirutka imala najveću vrijednost parametra a^* (0,68). Vrijednost parametra b^* bila je pozitivna kao i kod ovčje sirutke, što znači da također prevladava žuta boja, ali u nešto manjem intenzitetu obzirom da su vrijednosti parametra b^* niže nego kod ovčje sirutke. Najveću vrijednost parametra b^* imala je slatka sirutka (13,70), zatim kisela sirutka dobivena podsiravanjem mlijeka mezofilnom kulturom (11,55), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najmanju vrijednost parametra b^* (11,30). Što se tiče parametra L^* , najsvjetliji je bio uzorak kisele sirutke (mezofilna kultura) i iznosio je 74,45, zatim uzorak slatke sirutke (73,22), dok je uzorak kisele sirutke (octena kiselina) bio najmanje svjetline (62,67).

Tablica 9. Rezultati kolorimetrijskog određivanja boje kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (n=2)

| VRSTA MLIJEKA | VRSTA SIRUTKE | L*(D65) | a*(D65) | b*(D65) | ΔE^* |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| OVČJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 55,79 ± 1,82 | -2,42 ± 0,37 | 21,84 ± 2,14 | 28,28 ± 1,34 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 59,93 ± 0,92 | -0,74 ± 0,21 | 25,69 ± 1,48 | 26,56 ± 1,27 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 45,05 ± 10,29 | -3,46 ± 0,37 | 35,35 ± 12,60 | 35,01 ± 15,12 |
| KOZJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 74,45 ± 15,46 | 0,24 ± 0,57 | 11,55 ± 0,52 | 12,62 ± 10,64 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 73,22 ± 10,85 | 0,68 ± 0,29 | 13,70 ± 2,39 | 13,50 ± 10,85 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 62,67 ± 0,04 | 0,28 ± 0,19 | 11,30 ± 0,12 | 13,38 ± 0,09 |

U skladu s dobivenim parametrima, u tablici 9 također su prikazane i izračunate vrijednosti ΔE^* , odnosno odstupanje boje ovčje i kozje sirutke u odnosu na boju kravlje sirutke (Tretnjak, 2017). Svi uzorci ovčje i kozje sirutke vrlo odstupaju (tablica 6) od kravlje sirutke. Ovčja sirutka se više razlikuje od kravlje nego kozja sirutka. Najveće odstupanje zabilježeno je kod ovčje kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom (35,01), dok je najmanje odstupanje zabilježeno kod kozje kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (12,62).

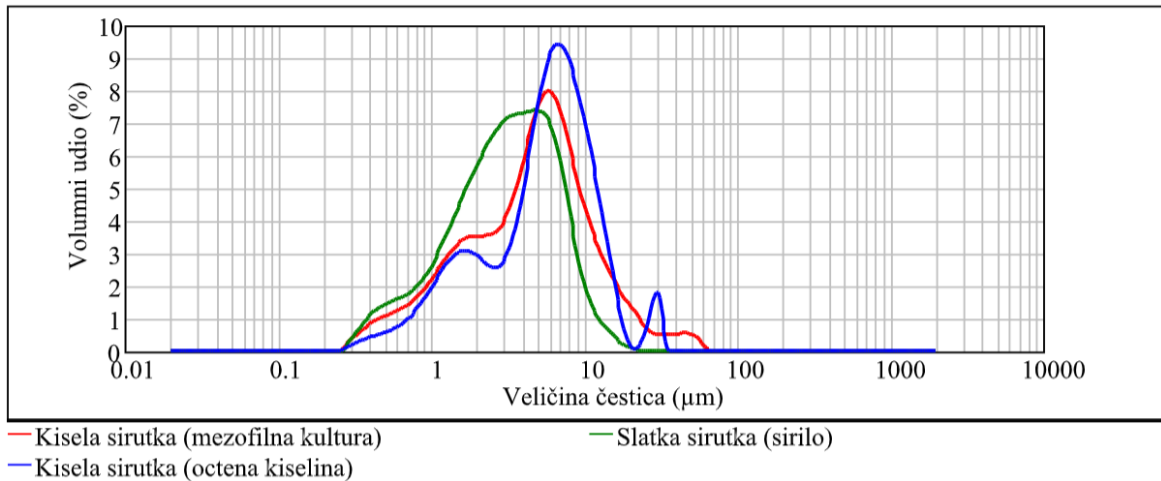
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su svi uzorci ovčje i kozje sirutke svijetle boje. Prema parametru a^* svi se nalaze u zelenom spektru (više ovčja sirutka), a prema parametru b^* u žutom spektru (više ovčja sirutka). Ta zeleno-žuta boja potječe od riboflavina (vitamina B₂) (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997), a prema dobivenim vrijednostima za parametre a^* i b^* može se zaključiti da je ovčja sirutka bogatija riboflavinom.

Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da je kravlja sirutka najsvjetlija jer ima najveću vrijednost parametra L^* , dok je ovčja sirutka najmanje svjetline. Najviše zelenog i žutog pigmenta ima ovčja sirutka jer ima najveće vrijednosti parametara a^* i b^* , dok kozja sirutka ima najmanje. Prema tome može se zaključiti da je ovčja sirutka najbogatija riboflavinom.

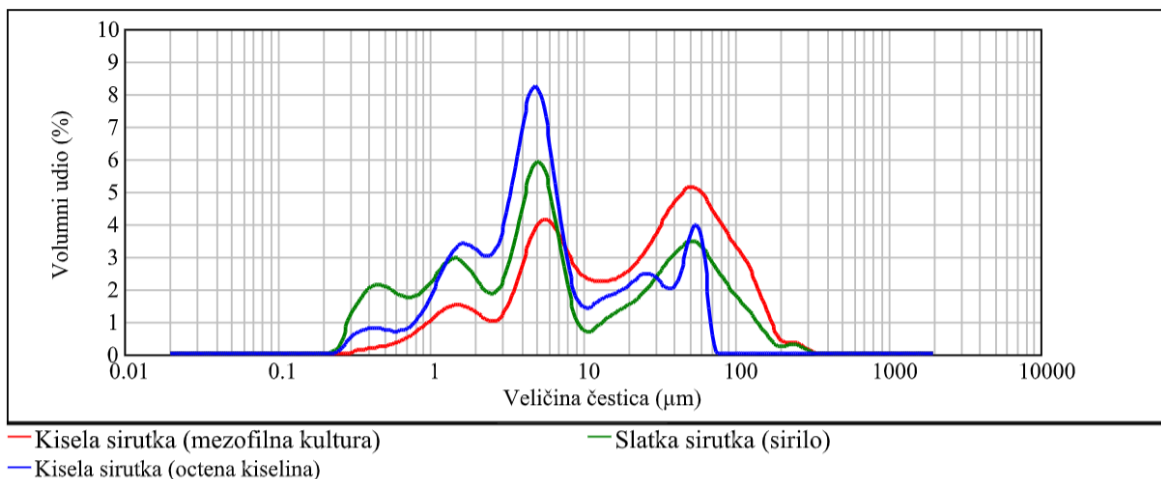
4.3. VELIČINA ČESTICA U SIRUTKI

U svrhu utvrđivanja razlike veličine čestica između kisele i slatke ovčje i kozje sirutke te između pasterizirane i nepasterizirane ovčje i kozje sirutke, određena je distribucija veličine čestica. Prikazi svih prosječnih distribucija veličine čestica nalaze se na slikama 12, 13, 14 i 15. Iz dobivenih rezultata (slike 12, 13, 14 i 15) vidljivo je da se najveći pikovi u svježoj i pasteriziranoj ovčjoj i kozjoj sirutki pojavljuju u području između 0,5 i 100 μm , a odgovaraju promjeru manjih peptida. U tom je području svježja ovčja kisela sirutka (mezofilna) imala najveći udio čestica promjera 8 μm (8,0 %), slatka sirutka je imala najveći udio čestica promjera 7 μm (7,4 %), dok je kisela sirutka (mezofilna kultura) imala najveći udio čestica promjera 9 μm (9,5 %). Nadalje, pasterizirana ovčja kisela sirutka (mezofilna kultura) je imala najveći udio čestica promjera 80 μm (5,2 %), slatka sirutka imala je najveći udio čestica promjera 7 μm (5,9 %), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najveći udio čestica promjera 7 μm (8,3 %).

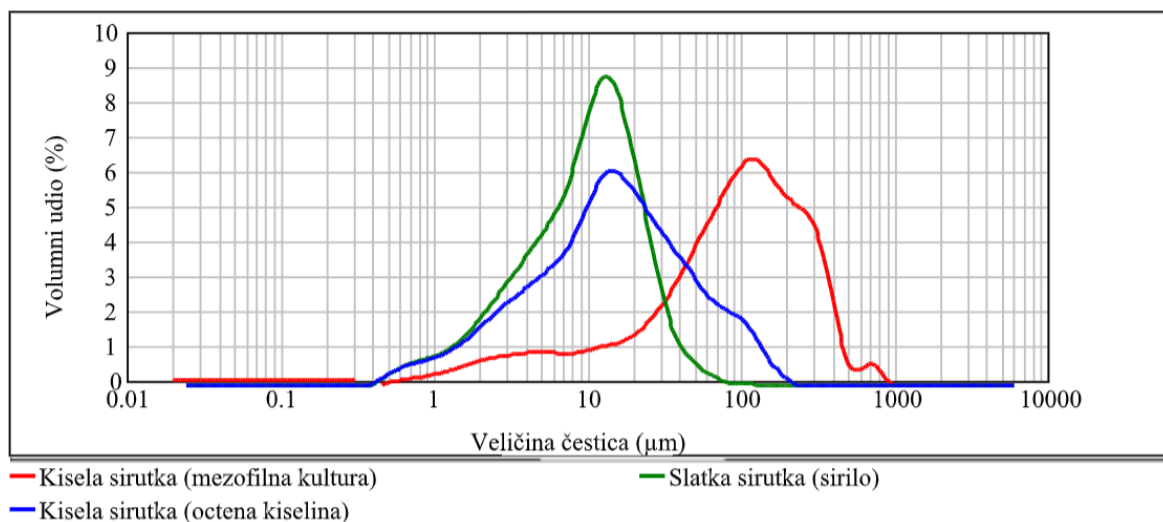
S druge strane, svježa kozja kisela sirutka (mezofilna kultura) imala je najveći udio čestica promjera 8 μm (6,1 %), slatka sirutka također je imala najveći udio čestica promjera 8 μm (8,8 %), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najveći udio čestica promjera 7 μm (6,5 %). Nadalje, pasterizirana kozja kisela sirutka (mezofilna kultura) imala je najveći udio čestica promjera 100 μm (7,1 %), slatka sirutka je imala najveći udio čestica promjera 4,5 μm (9,7 %), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najveći udio čestica promjera 8 μm (8,4 %).



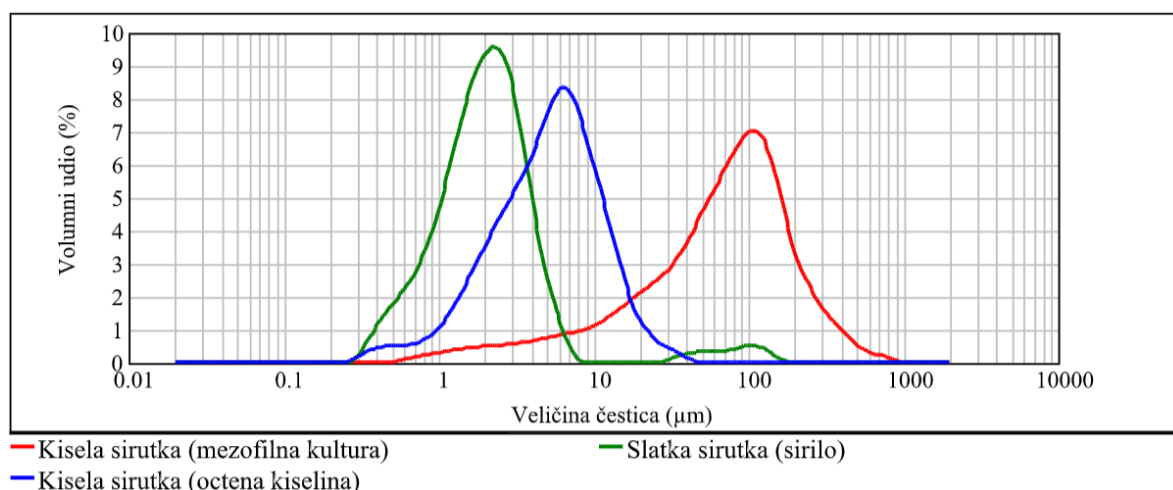
Slika 12. Usporedba distribucije veličine čestica u ovčjoj kiseljoj (mezofilna kultura i octena kiselina) i slatkoj sirutki (n=2)



Slika 13. Usporedba distribucije veličine čestica u pasteriziranoj ovčjoj kiseljoj (mezofilna kultura i octena kiselina) i slatkoj sirutki (n=2)



Slika 14. Usporedba distribucije veličine čestica u kozjoj kiseljoj (mezofilna kultura i octena kiselina) i slatkoj sirutki (n=2)



Slika 15. Usporedba distribucije veličine čestica u pasteuriziranoj kozjoj kiseljoj (mezofilna kultura i octena kiselina) i slatkoj sirutki (n=2)

Pasterizacijom, odnosno toplinskom obradom sirutke dolazi do djelomične denaturacije proteina sirutke, a time i do agregacije denaturiranih proteina te nastanka većih čestica, što je i vidljivo na slikama 13 i 15. Prema tome, može se zaključiti da pasterizacija uzrokuje povećanje raspona veličine čestica jer se povećava udio većih čestica.

Uspoređujući rezultate sa kiselim i slatkim sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da ovčja i kozja sirutka bolji izvor manjih peptida, dok je kravlja sirutka bolji izvor α -laktalbumina jer se pikovi pojavljuju i u području 1000 - 1500 μm , što odgovara prosječnom promjeru čestica α -laktalbumina (Lučan, 2015).

4.4. SENZORSKA ANALIZA SIRUTKE

Rezultati senzorske analize ovčje i kozje sirutke prikazani su tablicom 10 te slikom 16.

Tablica 10. Senzorska svojstva kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (n=2)

| SENZORSKO SVOJSTVO | BROJ PONDERIRANIH BODOVA | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | OVČJA SIRUTKA | | | KOZJA SIRUTKA | | |
| | kisela (mezofilna kultura) | slatka (sirilo) | kisela (octena kiselina) | kisela (mezofilna kultura) | slatka (sirilo) | kisela (octena kiselina) |
| Okus | 7,2 \pm 1,1 | 7,2 \pm 1,1 | 4,0 \pm 3,4 | 7,2 \pm 1,1 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 3,4 |
| Miris | 2,0 \pm 0,0 | 1,8 \pm 0,3 | 1,6 \pm 0,6 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,6 \pm 0,6 |
| Boja | 1,8 \pm 0,3 | 2,0 \pm 0,0 | 1,8 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,3 | 2,0 \pm 0,0 | 1,8 \pm 0,3 |
| Talog | 5,6 \pm 1,8 | 7,0 \pm 0,0 | 4,9 \pm 0,9 | 4,9 \pm 2,9 | 7,0 \pm 0,0 | 5,6 \pm 1,8 |
| Izgled | 0,8 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,8 \pm 0,0 | 0,9 \pm 0,1 | 1,0 \pm 0,0 | 0,9 \pm 0,1 |
| KATEGORIJA KAKVOĆE | DOBRA | ODLIČNA | OSREDNJA | DOBRA | ODLIČNA | OSREDNJA |

Uzorci ovčje i kozje slatke sirutke su za senzorsko svojstvo za boju ocijenjeni sa 2,0 ponderiranih bodova što je i maksimalan broj bodova, dok su uzorci ovčje i kozje kisele sirutke (mezofilna kultura i octena kiselina) ocijenjeni nešto nižom ocjenom, odnosno sa 1,8 ponderiranih bodova. Razlog tome je što su uzorci kisele sirutke bili nešto zamućeniji u odnosu na uzorke slatke sirutke. Uzorci ovčje sirutke bili su tipične žute boje i puno žući od kozje sirutke koja je bila puno svjetlija i sivo-zelene boje.

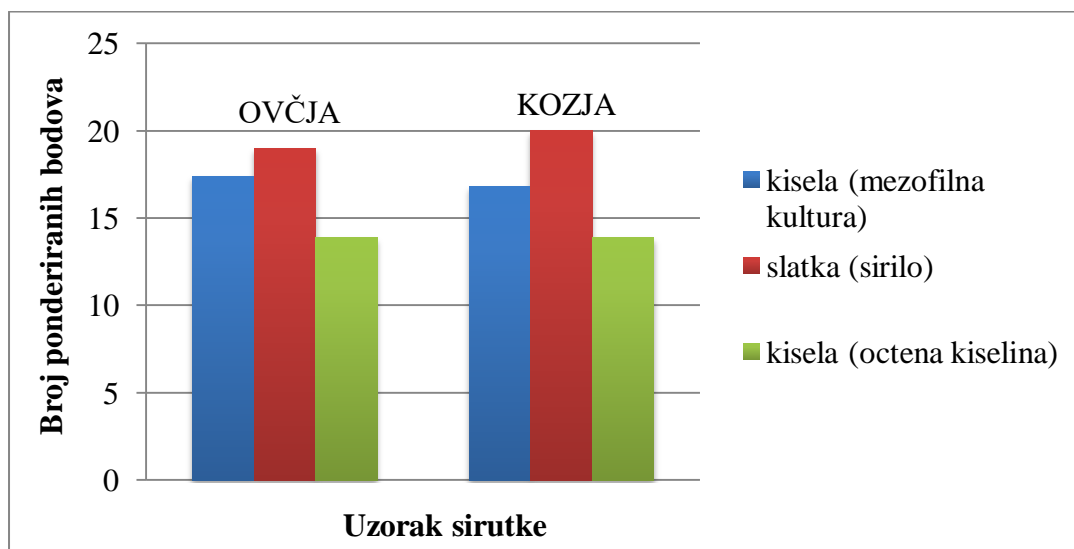
Miris uzoraka kozje sirutke bio je tipičan "kozji", ali s obzirom da je to karakteristika ove sirutke, to se ne smatra manom. Uzorci kisele sirutke (mezofilna kultura) i slatke sirutke ocijenjeni su sa maksimalnih 2,0 ponderiranih bodova, dok je kisela sirutka (octena kiselina) ocijenjena sa 1,6 ponderiranih bodova zbog blagog mirisa na kiselinu. Uzorci ovčje sirutke imali su blaži miris. Kisela sirutka (mezofilna kultura) ocijenjena je sa maksimalnih 2,0 ponderiranih bodova. Slatka sirutka je ocijenjena sa 1,8 ponderiranih bodova, dok je kisela sirutka (octena kiselina) ocijenjena sa 1,6 ponderiranih bodova zbog blagog mirisa na kiselinu.

Izgled ovčje i kozje slatke sirutke ocijenjen je sa maksimalnih 1,0 ponderiranih bodova. Uzorci kozje kisele sirutke (mezofilna kultura i octena kiselina) ocijenjeni su s 0,9 ponderiranih bodova, a uzorci ovčje kisele sirutke (mezofilna kultura i octena kiselina) ocijenjeni su s 0,8 ponderiranih bodova zbog prisutne kazeinske prašine.

Što se tiče taloga, on nije bio prisutan u uzorcima ovčje i kozje slatke sirutke pa su te sirutke za senzorsko svojstvo talog ocijenjene sa maksimalnih 7,0 ponderiranih bodova. Uzorci ovčje kisele sirutke (mezofilna kultura) i kozje kisele sirutke (octena kiselina) su zbog prisutnog taloga ocijenjeni s 5,6 ponderiranih bodova, dok su uzorci ovčje kisele sirutke (octena kiselina) i kozje kisele sirutke (mezofilna kultura) zbog veće količine taloga ocijenjeni s 4,9 ponderiranih bodova.

Najveća razlika u ocjenama je bila za okus, koji ujedno i najviše utječe na ukupnu ocjenu uzorka sa faktorom značajnosti 1,6 i nosi 40 % ponderiranih bodova. Svi uzorci kozje sirutke imali su tipičan "kozji okus". Jedino je slatka kozja sirutka bila karakterističnog okusa pa je ocijenjena sa maksimalnih 8,0 ponderiranih bodova. Kisela sirutka (mezofilna kultura) je zbog blago slankastog okusa ocijenjena s 7,2 ponderiranih bodova, dok je kisela sirutka (octena kiselina), zbog intenzivnog okusa na kiselinu, ocijenjena s 4,0 ponderiranih bodova. Budući da kozja kisela sirutka (mezofilna kultura) sadrži najveći udio pepela, odnosno mineralnih tvari, slanijeg je okusa od ostalih uzoraka kozje sirutke. Nadalje, uzorci ovčje sirutke bili su manje intenzivnog okusa, ali slaniji od kozje sirutke što je i tipično za ovčju sirutku zbog većeg sadržaja mineralnih tvari. Uzorak kisele sirutke (mezofilna kultura) ocijenjen je s 7,2 ponderiranih bodova zbog blago kiselog okusa, dok je uzorak slatke sirutke također dobio 7,2 ponderiranih bodova zbog blago slankastog okusa. Uzorak kisele sirutke (octena kiselina) ocijenjen je sa najmanjim brojem ponderiranih bodova (4,0) zbog intenzivnog okusa na kiselinu.

Prema dobivenim rezultatima slatka sirutka pripada odličnoj kategoriji kakvoće (19 ponderiranih bodova kod ovčje i 20 ponderiranih bodova kod kozje sirutke), kisela sirutka (mezofilna kultura) dobroj kategoriji kakvoće (17,4 ponderiranih bodova kod ovčje i 16,8 ponderiranih bodova kod kozje sirutke), dok je kisela sirutka (octena kiselina) osrednja (13,9 ponderiranih bodova kod ovčje i kod kozje sirutke). Uspoređujući rezultate sa kiselim i slatkim sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017), može se primijetiti da su rezultati vrlo slični. Slatka sirutka je također bila najbolje ocijenjena (odlična kategorija kakvoće), kisela sirutka (mezofilna kultura) je također bila dobre kakvoće, dok je kisela sirutka (octena kiselina) bila ocijenjena nešto lošije (prihvatljiva kategorija kakvoće).

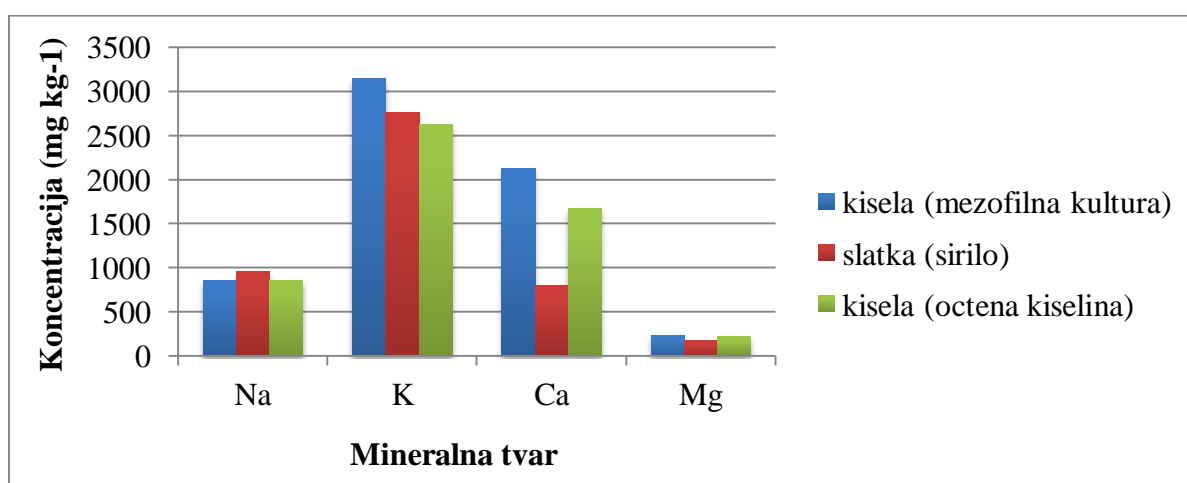


Slika 16. Usporedba ukupnog broja ponderiranih bodova kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (n=2)

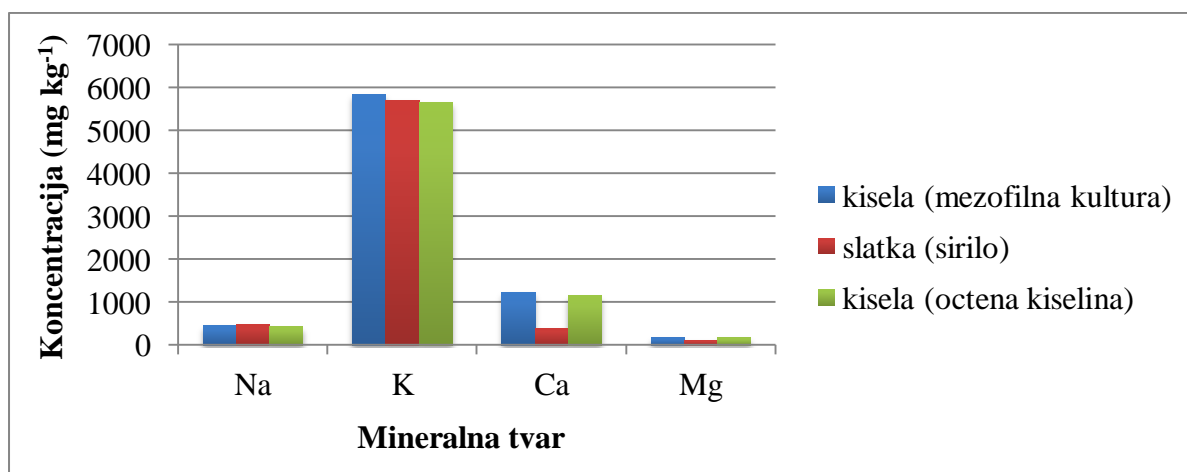
4.5. PROFIL MINERALNIH TVARI U SIRUTKI

Rezultati analize mineralnog sastava uzoraka ovčje i kozje sirutke prikazani su tablicom 11, te slikama 17, 18, 19 i 20. Slikama 17 i 18 prikazane su koncentracije makroelemenata (Na, K, Ca i Mg) u analiziranim uzorcima ovčje i kozje sirutke, a tablicom 11 te slikama 19 i 20 koncentracije elemenata u tragovima. Iz dobivenih rezultata (slike 17 i 18) vidljivo je da su uzorci ovčje i kozje kisele sirutke sadržavali veću koncentraciju mineralnih tvari od slatke sirutke, a kalij je bio zastupljen u najvećoj količini. Najveću koncentraciju kalija sadržavala je kozja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (5842,42 mg kg⁻¹), zatim

slatka sirutka ($5703,70 \text{ mg kg}^{-1}$), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala nešto manje kalija ($5657,20 \text{ mg kg}^{-1}$). Što se tiče ovčje sirutke, ona je također sadržavala najveću koncentraciju kalija, ali nešto manje nego kozja sirutka. Najviše kalija imala je kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom ($3151,98 \text{ mg kg}^{-1}$). Koncentracija kalcija u ovčjoj i kozjoj slatkoj sirutki je bila tri puta manja nego u kiseloj sirutki. Nadalje, ovčja sirutka sadržavala je veću koncentraciju kalcija nego kozja. Najveću koncentraciju kalcija sadržavala je ovčja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom ($2129,44 \text{ mg kg}^{-1}$), dok je koncentracija kalcija u kozjoj kiseljoj sirutki (mezofilna kultura) bila nešto niža ($1236,85 \text{ mg kg}^{-1}$).



Slika 17. Koncentracija (mg kg^{-1}) makroelemenata u kiseljoj i slatkoj sirutki iz ovčjeg mlijeka ($n=2$)

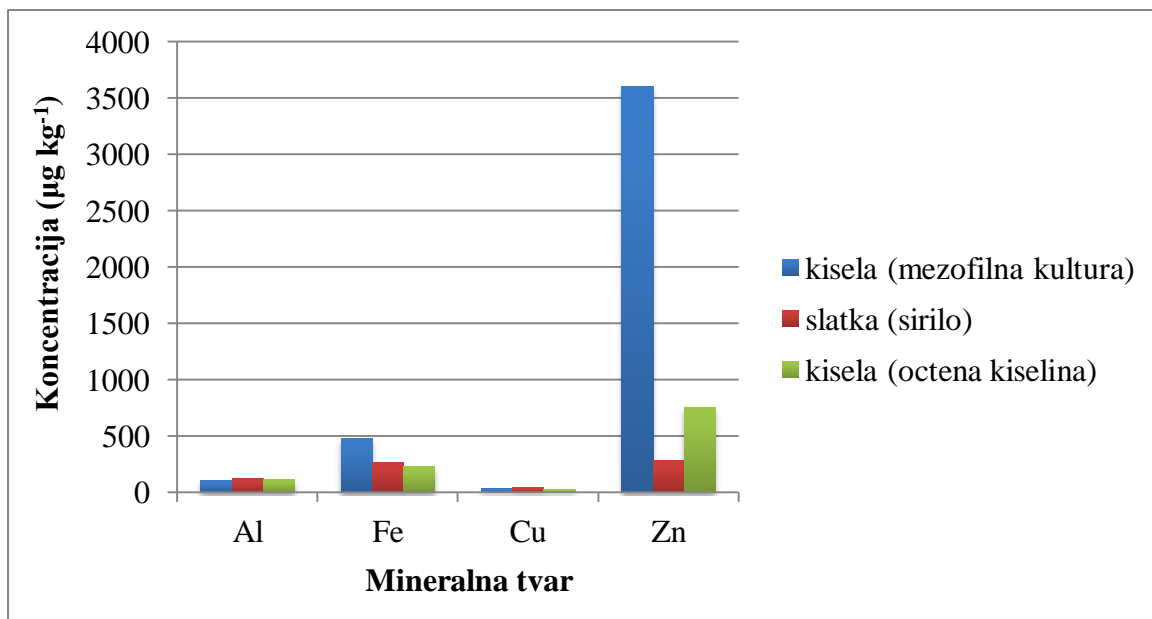


Slika 18. Koncentracija (mg kg^{-1}) makroelemenata u kiseljoj i slatkoj sirutki iz kozjeg mlijeka ($n=2$)

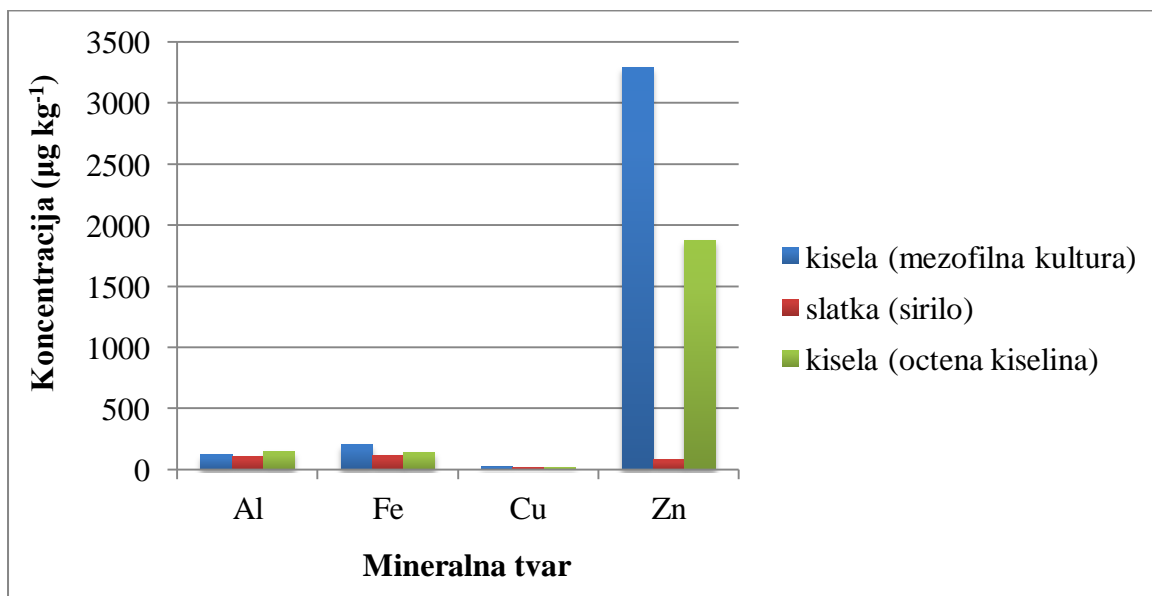
Iz podataka sa slike 17 i 18 vidljivo je da su i ovčja i kozja kisela sirutka (mezofilna kultura) sadržavale najveću koncentraciju makroelemenata (Ca, Mg i K), osim natrija. Najveću koncentraciju natrija sadržavala je slatka sirutka. Koncentracija natrija bila je najveća u ovčjoj slatkoj sirutki ($952,52 \text{ mg kg}^{-1}$), dok je kozja slatka sirutka sadržavala $485,93 \text{ mg kg}^{-1}$ natrija. Od svih makroelemenata, magnezij je bio zastupljen u najmanjoj koncentraciji i u ovčjoj i u kozjoj sirutki. Najveću koncentraciju magnezija sadržavala je ovčja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom ($234,36 \text{ mg kg}^{-1}$), dok je koncentracija magnezija u kozjoj kiseljoj sirutki (mezofilna kultura) bila nešto niža ($170,42 \text{ mg kg}^{-1}$). Dobiveni rezultati slažu se sa podacima iz literature (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011).

Slike 19 i 20 prikazuju koncentraciju elemenata u tragovima (Al, Fe, Cu i Zn). Koncentracija ostalih elemenata u tragovima, koji su prisutni u nižim koncentracijama, prikazana je tablicom 11.

U najvećoj koncentraciji bio je prisutan cink i to u uzorku ovčje kisele sirutke (mezofilna kultura) u koncentraciji od $3606,27 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, dok je kozja kisela sirutka (mezofilna kultura) sadržavala nešto manju koncentraciju cinka ($3294,62 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Također se ističe i željezo koje je u najvećoj koncentraciji bilo prisutno u uzorku ovčje kisele sirutke (mezofilna kultura) u koncentraciji od $481,92 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, dok je koncentracija željeza u kozjoj kiseljoj sirutki (mezofilna kultura) bila nešto niža ($208,41 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Također se može primijetiti da je kozja sirutka od svih mineralnih tvari (osim kalija) sadržavala i veću koncentraciju aluminija od ovčje sirutke. Najveću koncentraciju aluminija sadržavala je kozja kisela sirutka (octena kiselina) i to u koncentraciji $151,29 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, dok je kod ovčje sirutke najveću koncentraciju aluminija imala slatka sirutka ($123,46 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Koncentracija ostalih elemenata (V, Mo, Cd, Co, Ni, As, Ag i Pb) je u svim uzorcima ovčje i kozje sirutke bila manja od $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$.



Slika 19. Koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) elemenata u tragovima u kiseloj i slatkoj sirutki iz ovčjeg mlijeka (n=2)



Slika 20. Koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) elemenata u tragovima u kiseloj i slatkoj sirutki iz kozjeg mlijeka (n=2)

Tablica 11. Koncentracija ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ostalih elemenata u tragovima u kiseloj i slatkoj sirutki iz ovčjeg i kozjeg mlijeka (n=2)

| Mineralna tvar | Broj mjerenja | Vrsta sirutke | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------|
| | | OVČJA | | | KOZJA | | |
| | | kisela (mezofilna kultura) | slatka (sirilo) | kisela (octena kiselina) | kisela (mezofilna kultura) | slatka (sirilo) | kisela (octena kiselina) |
| Se | 1 | 76,44 | 86,76 | 70,12 | <10 | <10 | <10 |
| | 2 | 14,58 | 17,54 | 14,43 | 17,32 | 20,07 | 15,78 |
| | srednja vrijednost | 45,51 | 52,15 | 42,28 | - | - | - |
| Ba | 1 | 375,68 | 38,41 | 259,60 | 81,11 | 11,72 | 80,72 |
| | 2 | 408,76 | 13,14 | 132,99 | 100,02 | <10 | 84,90 |
| | srednja vrijednost | 392,22 | 25,78 | 196,30 | 90,57 | - | 82,81 |
| Mn | 1 | 14,51 | <10 | 47,41 | 58,30 | 75,61 | 221,05 |
| | 2 | 32,02 | <10 | 28,78 | 17,48 | <10 | 41,85 |
| | srednja vrijednost | 23,27 | <10 | 38,10 | 37,89 | - | 131,45 |
| Cd | 1 | <5 | 5,49 | 5,09 | <5 | <5 | 10,29 |
| | 2 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |
| | srednja vrijednost | <5 | - | - | <5 | <5 | - |
| Cr | 1 | 14,03 | 9,67 | <10 | 9,98 | <10 | <10 |
| | 2 | 12,47 | 12,37 | 42,34 | <10 | <10 | <10 |
| | srednja vrijednost | 13,25 | 11,02 | - | <10 | <10 | <10 |
| V, Co, Ni, As, Mo, Ag, Pb | 1 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | 2 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | srednja vrijednost | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |

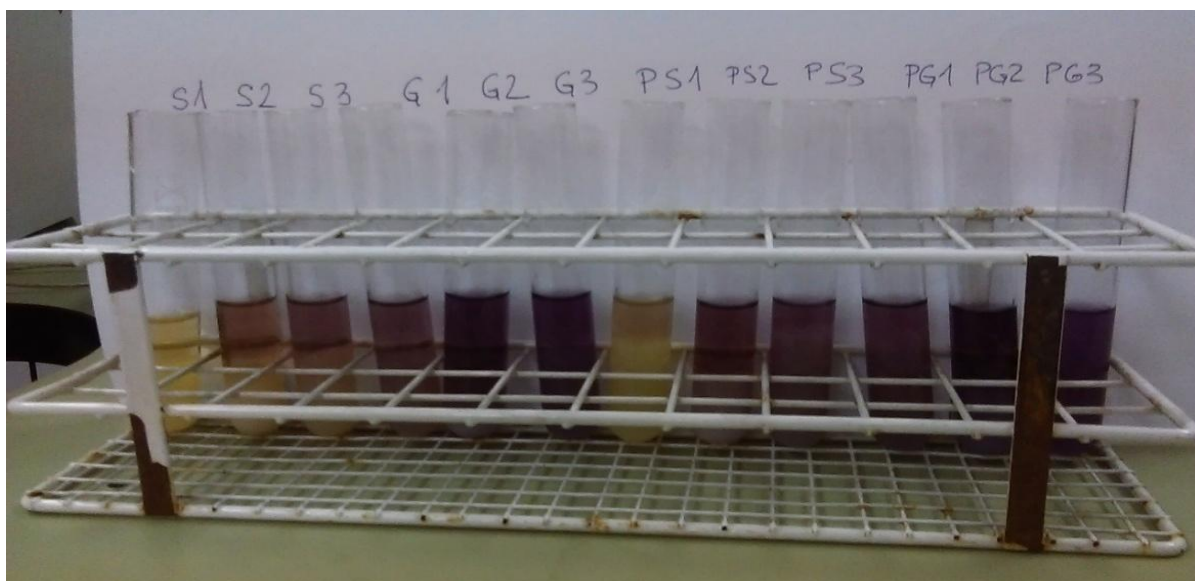
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je kisela sirutka bolji izvor topljivih mineralnih tvari (osobito kalcija) od slatke sirutke jer je način koagulacije kazeina kod ta dva postupka sirenja potpuno različit. Kod kisele koagulacije kazeina dolazi do otapanje Ca- fosfatnih mostova pa je količina kalcija u sirutki značajno veća nego kod enzimske koagulacije. Kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, sadrži veću količinu mineralnih tvari od kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom.

Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017) može se primijetiti da je ovčja sirutka bolji izvor kalcija i ostalih mineralnih tvari (sadrži i najveći udio pepela) od kravlje i kozje sirutke, a to se posebno primijetilo kod senzorske analize jer je ovčja sirutka bila slanijeg okusa.

4.6. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST SIRUTKE ODREĐENA DPPH METODOM

Prije svakog mjerenja snimljen je spektar DPPH otopine (slijepa proba) pri 517 nm. Intenzitet signala koji se dobije dvostrukim integriranjem prve derivacije apsorpcijske linije proporcionalan je koncentraciji radikala. Sposobnost uzorka sirutke za gašenjem radikala prikazana je kao relativni intenzitet I koji predstavlja relativnu vrijednost u odnosu na intenzitet otopine DPPH neposredno prije dodatka uzorka sirutke. Relativni intenzitet I izračunat je prema formuli $I = \frac{I_0}{I_t} * 100$, gdje je I_0 dvostruki integral prve derivacije apsorpcijske linije DPPH otopine (slijepa proba), a I_t dvostruki integral prve derivacije apsorpcijske linije DPPH otopine nakon dodatka uzorka sirutke u određenom vremenu t .

Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti u nepasteriziranim i pasteriziranim uzorcima kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka prikazani su tablicom 12 te slikom 21.



Slika 21. Smanjenje obojenja u nepasteriziranim i pasteriziranim uzorcima ovčje i kozje sirutke uslijed pada koncentracije radikala DPPH (vlastita fotografija)

Slika 21 prikazuje smanjenje intenziteta obojenja u nepasteriziranim i pasteriziranim uzorcima ovčje i kozje sirutke uslijed smanjenja koncentracije DPPH radikala, čija otopina je inače ljubičaste boje. Vidljivo je da je u uzorcima ovčje sirutke prisutno jače obezbojenje (do gotovo žute boje kod uzoraka kisele sirutke dobivene sirenjem ovčjeg mlijeka mezofilnom kulturom), dok su uzorci kozje sirutke uglavnom ljubičaste boje. Iz nastalog obezbojenja možemo zaključiti da je u uzorcima ovčje sirutke došlo do većeg pada koncentracije DPPH radikala, nego kod uzoraka kozje sirutke, odnosno uzorci ovčje sirutke pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost od kozje sirutke.

Tablica 12. Usporedba koncentracije radikala DPPH u svježim i pasteriziranim uzorcima kisele i slatke sirutke iz ovčjeg i kozjeg mlijeka te u istim uzorcima čuvanim 7 dana pri temperaturi hladnjaka izražena kao % DPPH (n=2)

| VRSTA MLIJEKA | VRSTA SIRUTKE | POČETNA KONC. | SVJEŽI UZORAK | PASTERIZIRANI UZORAK | SVJEŽI UZORAK NAKON 7 DANA | PASTER. UZORAK NAKON 7 DANA |
|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| OVČJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 100 | 23,06 ± 1,45 | 20,95 ± 11,09 | 27,81 ± 0,86 | 25,01 ± 1,50 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 100 | 32,39 ± 18,50 | 38,31 ± 6,01 | 24,80 ± 8,12 | 35,28 ± 5,08 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 100 | 35,51 ± 6,33 | 38,62 ± 8,03 | 32,69 ± 7,02 | 35,97 ± 5,19 |
| KOZJE | kisela sirutka (mezofilna kultura) | 100 | 49,13 ± 6,06 | 44,10 ± 4,40 | 44,74 ± 7,96 | 46,09 ± 6,32 |
| | slatka sirutka (sirilo) | 100 | 53,50 ± 0,17 | 57,64 ± 2,49 | 50,33 ± 11,13 | 53,31 ± 0,86 |
| | kisela sirutka (octena kiselina) | 100 | 56,60 ± 0,42 | 49,39 ± 13,09 | 57,38 ± 1,90 | 53,26 ± 11,10 |

Iz podataka iz tablice 12, može se vidjeti da uzorci ovčje sirutke imaju veću antioksidacijsku aktivnost od uzoraka kozje sirutke. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je svježi pasterizirani uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem ovčjeg mlijeka mezofilnom kulturom (pad koncentracije DPPH radikala za gotovo 80 %), dok je u istom nepasteriziranom uzorku pad radikala DPPH bio otprilike 77 %. Zatim slijede svježi nepasterizirani uzorci slatke sirutke (pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 67,5 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 62 % u pasteriziranom uzorku) i kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom (pad koncentracije DPPH radikala za 64,5 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 61,5 % u pasteriziranom uzorku).

U uzorcima kozje sirutke, najveću antioksidacijsku aktivnost također je pokazao svježi pasterizirani uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem kozjeg mlijeka mezofilnom kulturom (pad koncentracije DPPH radikala za 55 %), dok je isti nepasterizirani uzorak imao pad koncentracije DPPH radikala za 51 %. Zatim slijede svježi pasterizirani uzorak kisele sirutke

dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom (pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 50,5 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 43,5 % u nepasteriziranom uzorku) te svježi uzorak nepasterizirane slatke sirutke (pad koncentracije DPPH radikala za 46,5 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 42,5 % u pasteriziranom uzorku).

Kako bi se utvrdilo pada li antioksidacijska aktivnost s vremenom, izmjerena je i antioksidacijska aktivnost u istim uzorcima ovčje i kozje sirutke nakon sedam dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka. Iz tablice 12 vidljivo je da je nakon tjedan dana stajanja najveću antioksidacijsku aktivnost također imala ovčja sirutka. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazivala je nepasterizirana slatka sirutka (pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 75 %), dok je isti uzorak pasterizirane sirutke pokazao pad DPPH radikala za otprilike 65 %. Zatim slijedi pasterizirana kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (pad koncentracije DPPH radikala za 75 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 72 % u nepasteriziranom uzorku) te nepasterizirana kisela (octena kiselina) koja je pokazivala pad koncentracije DPPH radikala od otprilike 67 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 64 % u pasteriziranom uzorku.

Što se tiče uzoraka kozje sirutke, najveću antioksidacijsku aktivnost pokazivao je uzorak nepasterizirane kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 55%), dok je isti uzorak pasterizirane sirutke pokazao pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 54 %. Zatim slijedi uzorak nepasterizirane slatke sirutke (pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 49 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 46,5 % u pasteriziranom uzorku) te uzorak pasterizirane kisele sirutke (octena kiselina) koja je pokazivala pad koncentracije DPPH radikala od otprilike 47 % te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 42,5 % u nepasteriziranom uzorku.

Iz dobivenih podataka može se zaključiti da pasterizacija (72 °C/ 15") nema neki značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost sirutke, uglavnom se koncentracija DPPH radikala razlikuje za 1-10 %.

Iz dobivenih rezultata za antioksidacijsku aktivnost nakon 7 dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka, može se primijetiti je kod nekih uzoraka sirutke došlo do povećanja, a kod nekih do smanjenja koncentracije DPPH radikala, odnosno antioksidacijske aktivnosti. Te razlike u rezultatima mogu biti zbog korištenja ovčjeg i kozjeg mlijeka s različitih farmi, odnosno

različite pasmine, stadija laktacije, starosne dobi životinje, prehrane, okoliša, kao i zdravstvenog stanja životinje (Hejtmankova i sur., 2012; Hernández-Ledesma i sur., 2011).

Uspoređujući rezultate sa kiselom i slatkom sirutkom od kravljeg mlijeka (Tretnjak, 2017) može se primijetiti da je najveći pad koncentracije DPPH radikala (čak 96 % u svježem nepasteriziranom uzorku te pad koncentracije DPPH radikala za otprilike 88,5 % nakon tjedan dana) imala kravlja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, dok su i ostali uzorci kisele i slatke sirutke pokazivali pad koncentracije DPPH radikala za gotovo 80 %. Prema tome, kravlja sirutka pokazuje jača antioksidacijska svojstva od ovčje i kozje sirutke.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Pasterizacijom sirutke dolazi do denaturacije proteina sirutke, a time i do agregacije denaturiranih proteina te nastanka većih čestica. Zbog toga se u uzorcima pasteriziranih ovčjih i kozjih sirutki smanjuje udjel manjih, a povećava udjel većih čestica. Također, pasterizacija (72 °C/ 15") nema neki značajan učinak na antioksidacijsku aktivnost sirutke.
2. Određivanjem sastava mineralnih tvari kisele i slatke ovčje i kozje sirutke, dokazano je da kisela sirutka sadrži veću količinu mineralnih tvari nego slatka sirutka. Ovčja sirutka je bolji izvor kalcija i ostalih makroelemenata (Na, Mg) od kozje sirutke, osim kalija koji je u većim koncentracijama prisutan u kozjoj sirutki. Ovčja kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, sadrži najveću koncentraciju kalcija (2129,44 mg kg⁻¹), dok takva kozja sirutka sadrži najveću koncentraciju kalija (5842,42 mg kg⁻¹). Ovčja sirutka je također i bolji izvor većine mikroelemenata (Fe, Cu, Se, Ba, Cr).
3. Praćenjem kinetike vezanja DPPH radikala, dokazano je da ovčja sirutka posjeduje veća antioksidacijska svojstva, nego kozja sirutka. Kisela sirutka iz ovčjeg mlijeka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, pokazuje najjača antioksidacijska svojstva (smanjenje koncentracije DPPH radikala za gotovo 80 %), dok slatka sirutka i kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom, pokazuju nešto slabija antioksidacijska svojstva.
4. Antioksidacijska aktivnost sirutke neznatno opada s vremenom. Nakon tjedan dana stajanja, ovčja kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, je i dalje pokazivala najjače antioksidacijsko djelovanje (porast koncentracije DPPH radikala za približno 5 % u odnosu na svježi uzorak sirutke).
5. Prema svim analiziranim parametrima, najboljim izvorom sirutke može se smatrati ovčja kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom jer pokazuje najjača antioksidacijska svojstva, najbolji je izvor kalcija i ostalih važnih elemenata, a također je i dobre senzorske kakvoće.

6. LITERATURA

1. Anonymous 1,
<http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Polifenoli_Vino/loghi/DPPH.gif>.
Pristupljeno 18. ožujka 2019.
2. Anonymous 2,
<http://www.globalspec.com/learnmore/manufacturing_process_equipment/inspection_tools_instruments/color_appearance_instruments>. Pristupljeno 12. ožujka 2019.
3. Anonymous 3, <<http://www.ceramicindustry.com/artSpectrochemicalicles/86527-online-exclusive-measuring-particles-with-laser-diffraction>>. Pristupljeno 30. ožujka 2019.
4. Anonymous 4,
<<https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=thcseDsHiemBpdmBIIecCE&subNav=rgggpDsHiemBpdmBIIecCEZ>>. Pristupljeno 2. travnja 2019.
5. Antunac N., Hudik S., Mikulec N., Maletić M., Horvat I., Radeljević B., Havranek J. (2011) Proizvodnja i kemijski sastav Istarske i Paške skute. *Mljekarstvo* **61**, 326-335.
6. Antunac N., Lukač Havranek J. (1999) Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **49**, 241-254.
7. Antunac N., Samaržija D., Lukač Havranek J. (2000) Hranidbena i terapijska vrijednost kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **50**, 297-304.
8. Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.
9. Boss C. B., Fredeen K. J. (1999) Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, 2. izdanje, Perkin Elmer, Norwalk.
10. Božanić R., Jeličić I., Tratnik Lj. (2008) Napitci na bazi sirutke – nova generacija mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **58**, 257-274.

11. Božanić R., Lisak Jakopović K., Barukčić I. (2018) Vrste mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
12. Božanić R., Tratnik Lj. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
13. Božanić R., Tratnik Lj., Drgalić I. (2002) Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti. *Mljekarstvo* **52**, 207-237.
14. De Wit J. N. (2001) Lecturer's handbook on whey and whey products. European Whey Products Association, Brussels.
15. Đorđević J., Maćej O. (1982) Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka. *Mljekarstvo* **32**, 233-242.
16. Filajdić M., Ritz M., Vojnović V. (1988) Senzorska analiza mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **38**, 295-301.
17. Hejtmankova A., Pivec V., Dragounova H. (2012) Differences in the composition of total and whey proteins in goat and ewe milk and their changes throughout the lactation period. *Czech J. Anim. Sci.* **57**, 323-331.
18. Herceg Z., Režek A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56**, 379-396.
19. Herceg, Z., Režek, A., Rimac Brnčić, S. (2008) Molekularna osnova funkcionalnosti proteina sirutke. *Mljekarstvo* **58**, 181-193.
20. Hernández-Ledesma B., Ramos M., Gómez-Ruiz J. A. (2011) Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research* **101**, 196-204.
21. Ingle J. D., Crouch S. R. (1988) Spectrochemical Analysis. Prentice-Hall Inc., New Jersey.

22. Jašić M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet.
23. Jilavenkatesa A., Dapkunas S. J., Lum L.-S. H. (2001) Particle Size Characterization. NIST Special Publication 960-1, Washington DC.
24. Junk J. N. M. (2012) Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy. Springer, Berlin.
25. Lisak K. (2012) Zdravlje iz sirutke. *Mlijeko i Ja* **1**, 28-29.
26. Lučan M. (2015) Sirutka. Skripta, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
27. Marenjak T. S., Poljičak-Milas N., Delaš I. (2006) Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Mljekarstvo* **56**, 119-137.
28. Mihoci M. (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Kem. Ind.* **64**, 681–694.
29. Park Y., Juarez M., Ramos M., Haenlein G. F. W. (2007) Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **68**, 88-113.
30. Paulsson M., Visser H. (1992) Protein Interactions (Visser H., ured.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
31. Pingping S. (2012) Sorption of Metal Ions to Wood, Pulp and Bark Materials. Åbo Akademi University, Finland, 30-31.
32. Pintado M. E., Macedo A. C., Malcata F. X. (2001) Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Sci. Technol. Int.* **7**, 105-116.
33. Popović-Vranješ A., Pihler I., Paskaš S., Krstović S., Jurakić Ž., Strugar K. (2017) Production of hard goat cheese and goat whey from organic goat's milk. *Mljekarstvo* **67**, 177-187.

34. Popović-Vranješ A., Vujičić I. F. (1997) Tehnologija sirutke. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
35. Ranimol S., Sabu T. (2010) Rubber Nanocomposites: Preparation, Properties and Applications. John Wiley & Sons, Singapore.
36. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2007) Principles of Instrumental Analysis, 6. izdanje, Thomson Brooks/Cole, Belmont, Canada.
37. Tratnik Lj. (2009) Sirutka- izvor najvrjednijih funkcionalnih sastojaka. *Mlijeko i ja* **4**, 6-8.
38. Tratnik Lj. (2003) Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo* **5**, 325-352.
39. Tratnik Lj. (2013) Neke spoznaje o mlijeku i mliječnim proizvodima. *Mlijeko i Ja* **1**, 10-11.
40. Tretnjak K. (2017) Određivanje antioksidacijske aktivnosti u kiseloj i slatkoj sirutki. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

7. PRILOZI

Prilog 1.: Ocjenjivanje senzorskih svojstava sirutke sustavom od 20 ponderiranih bodova

| SENZORSKO SVOJSTVO | OPISNI PARAMETRI | OCJENA | FAKTOR ZNAČAJNOSTI | MAX. BODOVI |
|--------------------|--|--------|--------------------|-------------|
| Okus | Jasno izražen, karakterističan za kiselu/slatku sirutku, bez stranih okusa, dobro ili vrlo dobro izražena aroma i okus, dobro ili vrlo dobro izražena svježina, slatkoća | 4 - 5 | 1,6 | 8 |
| | Tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, tragovi stranih okusa | 3 | | |
| | Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, okus po plijesni | 1 - 2 | | |
| Miris | Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan za kiselu/slatku sirutku, bez ikakvih stranih mirisa | 4 - 5 | 0,4 | 2 |
| | Prenaglašen miris ili nedovoljno izražen, tragovi užglosti | 3 | | |
| | Potpuno nekarakterističan za kiselu/slatku sirutku, stran, užegao, po plijesni | 1 - 2 | | |
| Boja | Boja karakteristična za kiselu/slatku sirutku, jednolična, bez vidljivih nepravilnosti | 4 - 5 | 0,4 | 2 |
| | Dobra, ali prisutna prošaranost | 3 | | |
| | Neprihvatljiva ili netipična | 1 - 2 | | |

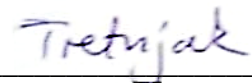
| | | | | |
|--|---|-------|-----|-----------|
| Talog | Bez taloga | 5 | 1,4 | 7 |
| | Prisustvo taloga u manjim količinama | 3 - 4 | | |
| | Puno taloga, neprihvatljivo | 1 - 2 | | |
| Izgled | Odličan, tipičan za kiselu/slatku sirutku, bez nepoželjnih karakteristika | 4 - 5 | 0,2 | 1 |
| | Manje izražene nepoželjne karakteristike | 3 | | |
| | Neprihvatljiv, strane boje, prisutna strana tijela | 1 - 2 | | |
| MAKSIMALAN BROJ PONDERIRANIH BODOVA UKUPNO: | | | | 20 |

Prilog 2.: Obrazac za ocjenjivanje sirutke

| | | | |
|----------------------|---|----------|----------|
| DATUM: | | | |
| OCJENJIVAČ: | | | |
| OCJENJIVANO SVOJSTVO | Upisati postignutu ocjenu od 1 do 5 za svako svojstvo | | |
| | Uzorak 1 | Uzorak 2 | Uzorak 3 |
| Okus | | | |
| Miris | | | |
| Boja | | | |
| Talog | | | |
| Izgled | | | |

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Tretnjak", is written inside a rectangular box.

Ime i prezime studenta