

# Utjecaj dodatka ekstrakta lista masline (*Olea europaea*) na fizikalnokemijske karakteristike i fermentaciju kravljeg mlijeka

---

Filipan, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:628708>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2021.

Katarina Filipan

1229/PI

**UTJECAJ DODATKA  
EKSTRAKTA LISTA MASLINE  
(*Olea europaea*) NA FIZIKALNO-  
KEMIJSKE KARAKTERISTIKE I  
FERMENTACIJU KRAVLJEG  
MLIJEKA**

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. Irene Barukčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ DODATKA EKSTRAKTA LISTA MASLINE (*Olea europaea*) NA FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE I FERMENTACIJU KRAVLJEG MLIJEKA

*Katarina Filipan, 1229/PI*

**Sažetak:** Fermentirani mliječni proizvodi danas su vrlo popularni zbog visoke nutritivne i zdravstvene vrijednosti. U svrhu poboljšanja njihovog djelovanja, mogu se obogaćivati različitim dodacima. Kako bi se iskoristili svi dijelovi biljnog materijala, iz otpada zaostalog nakon proizvodnje ekstrakcijskim se metodama izdvajaju potencijalno biološki aktivne komponente. Ekstrakt lista masline (*Olea europaea*) ima dokazane brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zahvaljujući prisutnim bioaktivnim kemijskim spojevima, ponajprije fenolima. Cilj ovog diplomskog rada bio je proizvesti jogurt obogaćen ekstraktom lista masline (1,5; 3 i 5 %, v/v) te ga usporediti s jogurtom bez dodanog ekstrakta. Svim uzorcima određeni su aktivna i titracijska kiselost, viskoznost, boja, sinereza i kapacitet zadržavanja vode, mikrobiološki parametri, senzorski profil, ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost DPPH i FRAP metodom. Dodatak ekstrakta lista masline uzrokovao je kraće trajanje fermentacije (za 6, 14 odnosno 36 min, ovisno o količini ekstrakta), nižu pH vrijednost (4,42; 4,35 tj. 4,45) u usporedbi s kontrolnim uzorkom (4,53), povećani udio ukupnih fenola te povećani antioksidacijski kapacitet jogurta. Uzimajući u obzir sve dobivene rezultate, dodatak 1,5 % ekstrakta lista masline pokazao se optimalnim.

**Ključne riječi:** antioksidacijska aktivnost, ekstrakt lista *Olea europaea*, fenoli, jogurt

**Rad sadrži:** 78 stranica, 29 slika, 9 tablica, 58 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc.dr.sc., Irena Barukčić

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc., Katarina Lisak Jakopović  
doc. dr. sc., Maja Repajić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Rajka Božanić* (predsjednik)
2. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić* (mentor)
3. Doc.dr.sc. *Maja Repajić* (član)
4. Doc.dr.sc. *Ivona Elez Garofulić* (zamjena)

**Datum obrane:** 4. ožujka 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF THE OLIVE LEAF EXTRACT ADDITION (*Olea europaea*) ON PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND FERMENTATION OF COW'S MILK

*Katarina Filipan, 1229/PI*

**Abstract:** Fermented dairy products are very popular today due to their high nutritional and health value. In order to improve their action, they can be enriched with various additives. In order to use all parts of the plant material, potentially biologically active components are extracted from the waste remaining after production by extraction methods. Olive leaf extract (*Olea europaea*) has proven a number of positive effects on human health thanks to the bioactive chemical compounds present, primarily phenols. The aim of this thesis was to produce yogurt enriched with olive leaf extract (1.5, 3 and 5 %, v/v) and compare it with yogurt without its addition. In all the samples active and titratable acidity, viscosity, color, syneresis and water retention capacity, microbiological parameters, sensory profile, total phenols and antioxidant activity by DPPH and FRAP method were determined. The addition of olive leaf extract caused shorter fermentation (6, 14 and 36 min, depending on the amount of extract), lower pH (4.42, 4.35 or 4.45) compared to the control sample (4.53), increased proportion of total phenols and antioxidant capacity of yogurt. Taking into account all the results obtained, the addition of 1.5 % olive leaf extract proved to be optimal.

**Keywords:** antioxidant activity, *Olea europaea* leaf extract, phenolic compounds, yogurt

**Thesis contains:** 78 pages, 29 figures, 9 tables, 58 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD. *Katarina Lisak Jakopović*, Assistant professor

PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor

#### Reviewers:

1. PhD. *Rajka Božanić*, Full professor
2. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
4. PhD. *Ivona Elez-Garofulić*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** March 4th 2021

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. PROIZVODNJA JOGURTA I NJEGOVA PREHRAMBENA VRIJEDNOST	2
2.2. MASLINA ( <i>OLEA EUROPAEA</i> )	6
2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI MASLINE I NJIHOVI UČINCI NA LJUDSKO ZDRAVLJE	6
2.3.1. Fenoli	7
2.4. METODE EKSTRAKCIJE	12
2.4.1. Optimizacija parametara ekstrakcije	13
2.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	13
<b>3. ESKPERIMENTALNI DIO</b>	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2. PROIZVODNJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE	16
3.3. PRELIMINARNI EKSPERIMENTI	18
3.4. PROIZVODNJA JOGURTA	19
3.4.1. Priprema posuđa za fermentaciju i naredne analize	19
3.4.2. Proizvodnja jogurta	20
3.5. METODE	22
3.5.1. Određivanje pH-vrijednosti mlijeka i jogurta	22
3.5.2. Određivanje titracijske kiselosti u mlijeku i jogurtu metodom po Soxhlet-Henkel- u	22
3.5.3. Određivanje sinereze i kapaciteta zadržavanja vode	23
3.5.4. Određivanje reoloških karakteristika	24
3.5.5. Određivanje boje	25
3.5.6. Mikrobiološka analiza	26
3.5.7. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	28
3.5.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	32
3.5.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	35
3.5.10. Senzorska analiza uzoraka jogurta	37
3.6. OBRADA REZULTATA	39
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	40
4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA	40
4.2. ODREĐIVANJE AKTIVNE I TITRACIJSKE KISELOSTI	41
4.3. ODREĐIVANJE SINEREZE I KAPACITETA ZADRŽAVANJA VODE	44
4.4. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA	47
4.5. ODREĐIVANJE BOJE	51
4.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA	52
4.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA	55
4.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM	58
4.9. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM	60
4.10. SENZORSKA ANALIZA	62
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	69
<b>6. LITERATURA</b>	72

# 1. UVOD

Suvremeni potrošači okrenuli su se zdravoj prehrani te traže proizvode sa što prirodnijim sastojcima i pozitivnim djelovanjem na ljudsko zdravlje zbog čega je potreba za proizvodnjom funkcionalnih proizvoda postala sve veća. Mnoga istraživanja već su godinama prije dokazala zdravstvenu i prehrambenu vrijednost fermentiranih mliječnih napitaka, pa tako i jogurta, te se oni sami po sebi smatraju funkcionalnom hranom. Iz tog razloga postalo je sve popularnije obogaćivati navedene matrikse različitim dodacima u svrhu postizanja dodane vrijednosti ovih proizvoda. Kako su okolišni i aspekt održive proizvodnje sve važniji u svim granama prehrambene industrije, tako je i zanimanje znanstvene zajednice sve više usredotočeno na iskorištenje otpada poput kore, pokožice, lišća, sjemenki i koštica koji su dugo smatrani beskorisnim materijalom. Međutim, oni su izrazito bogati različitim bioaktivnim kemijskim spojevima te je znanost u njima, gledajući s ekonomskog i ekološkog aspekta, prepoznala neiskorišten potencijal pri čemu bi mogli zamijeniti dosada korištene sintetičke varijante. Kako bi se iz navedenih dijelova biljaka izdvojile željene komponente potrebno je provesti metodu ekstrakcije. Budući da je izolacija i pročišćavanje pojedinih kemijskih spojeva jako skup, složen i dugotrajan postupak pribjegava se uporabi cijelih ekstrakata kao alternativnog izvora standardiziranog udjela svih komponenti. Takvim pristupom ujedno bi se doprinijelo i smanjenju otpada nastalog u prehrambenoj industriji odnosno kvalitetnom korištenju svih dijelova biljnog materijala. Razmatrajući preradu biljnih sirovina u Republici Hrvatskoj, u značajnijim količinama zaostaje lišće maslina nakon proizvodnje maslinovog ulja. Međutim, brojna istraživanja pokazala su kako je list masline bogat izvor različitih fenolnih spojeva i triterpenoida dokazanog, prije svega, jakog antioksidacijskog učinka, ali i mnogih drugih djelovanja koja iz njega proizlaze te imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. S druge strane, mlijeko i mliječni proizvodi deficitarni su na fenolnim spojevima pa su stoga brojna istraživanja usmjerena prema ispitivanju mogućnosti obogaćivanja postojećih mliječnih proizvoda biljnim materijalima kao izvorima fenola, ali i drugih biološki aktivnih spojeva, u svrhu kreiranja novih funkcionalnih proizvoda.

U skladu s time cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na tijek fermentacije kravljeg mlijeka i fizikalno-kemijske karakteristike jogurta kao udio polifenola i antioksidacijsku aktivnost, reološka svojstva, boju, sinerezu i kapacitet zadržavanja vode te na senzorski profil krajnjeg proizvoda.

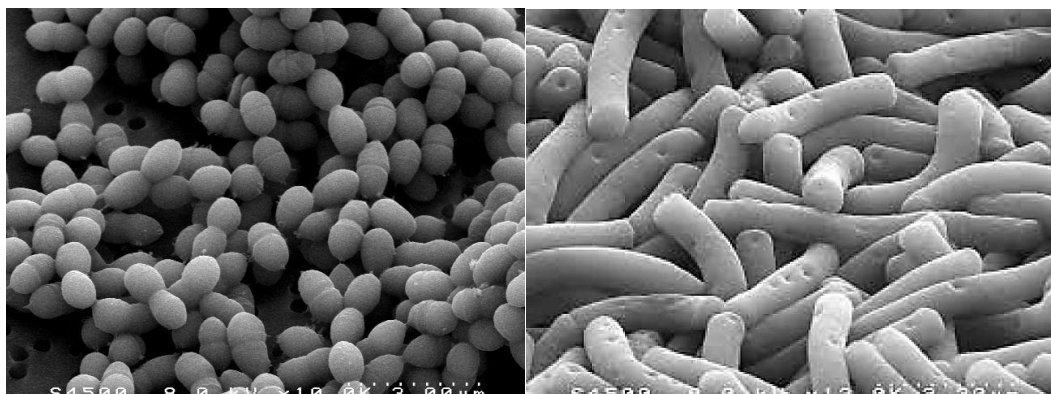


## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA JOGURTA I NJEGOVA PREHRAMBENA VRIJEDNOST

Jogurt pripada skupini fermentiranih mliječnih proizvoda, zajedno s kiselim mlijekom, acidofilom, kefirom, kumisom i mnogim drugima. Može se proizvesti u kontroliranim uvjetima ili spontano, a rezultat je metaboličke aktivnosti prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline u mlijeku ili namjerno dodanih pomno odabranih kultura koje provode mliječno-kiselu fermentaciju. U industriji se provodi proizvodnja u kontroliranim uvjetima kako bi se dobio proizvod željenih svojstava i ujednačene kvalitete. Proizvodnja aromatiziranih, voćnih te desertnih proizvoda odnosno dodatak voća ili voćnih prerađevina, prirodnih aroma i boja te prirodnih zaslađivača kao što su saharoza, fruktoza, laktoza, polioli za dijetetske svrhe ili sladila za dijabetičare jogurtu, samo je povećao njegovu potrošnju i popularnost.

Jogurtna kultura (slika 1) koja se, kako i sam naziv kaže, koristi za proizvodnju najpopularnijeg fermentiranog mliječnog napitka – jogurta pripada skupini mješovitih mikrobnih kultura. Radi se o termofilnoj kulturi bakterija mliječne kiseline *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, koje žive u simbiozi i optimalno rastu te proizvode najviše mliječne kiseline u rasponu od 37 do 45 °C (Tratnik i Božanić, 2012).



Slika 1. Jogurtna kultura: *Streptococcus thermophilus* (lijevo) (Kalpana, 2020) i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (desno) (Jaiswal, 2020)

Bakterijske kulture su homofermentativne što znači da mliječno-kiselim vrenjem proizvode 90 % mliječne kiseline koja je glavni produkt, i 10 % ostalih međuprodukata. Sporedni produkti su uglavnom karbonilni spojevi, od kojih najviše nastaje acetaldehid, a zajedno s mliječnom kiselinom pridonose aromi fermentiranih mlijeka. Ove se dvije bakterije zajedno koriste za proizvodnju jogurta jer na taj način omogućuju bržu provedbu fermentacije te rastom u simbiozi međusobno potpomažu rast jedna druge proizvodeći određene metabolite - streptokok proizvodi ugljični dioksid i mravlju kiselinu, a laktobacil proizvodi aminokiseline. Kao mješovita kultura u procesu proizvodnje jogurta koriste se u omjeru 1:1, a inokulum se dodaje u količini od 2 %. Fermentacija se odvija pri 42 °C i rezultira stvaranjem 0,9-0,95 % mliječne kiseline prekidom na pH vrijednosti izoelektrične točke kazeina – 4,6.

Proizvodnja jogurta započinje kontrolom sirovine te standardizacijom suhe tvari i mliječne masti radi postizanja bolje viskoznosti i deklarirane količine masti. Slijedi homogenizacija s glavnim ciljem usitnjavanja i jednolične raspodjele mliječne masti, ali i povećanjem viskoznosti, probavljivosti te boljom konzistencijom proizvoda. Obično se provodi pri 65 °C i tlaku 15-18 MPa. Mlijeko se potom pasteurizira pri visokoj temperaturi (90-95 °C/5-10 min) kako bi se osigurala mikrobiološka ispravnost, spriječilo nepoželjno djelovanje enzima u mlijeku (kao lipaza) te dobio stabilniji koagulum zbog vezanja proteina sirutke na kazein. Zatim slijedi hlađenje na temperaturu inokulacije mlijeka (obično 42-43 °C) i inokulacija određenim udjelom jogurtne kulture, uz intenzivno miješanje. Uobičajeno trajanje fermentacije je 4-6 h. Daljnji proces proizvodnje ovisi o tipu jogurta koji se proizvodi. Za čvrsti jogurt idući korak je pakiranje te se fermentacija provodi u ambalaži. Potom slijedi hlađenje koje prekida fermentaciju i skladištenje na +4 °C. Za tekući se jogurt nakon inokulacije fermentacija odmah odvija u spremniku, zatim slijedi hlađenje te pakiranje u ambalažu i skladištenje na +4 °C. Prosječan rok trajanja jogurta iznosi 2-3 tjedna (Tratnik i Božanić, 2012).

Vrlo čest problem i nedostatak u proizvodnji i čuvanju jogurta predstavlja sinereza odnosno pojava izdvajanja sirutke na površini krutog fermentiranog mliječnog proizvoda zbog stezanja strukture gela nastalog fermentacijom (Basiri i sur., 2018). Na slici 2 prikazana je količina izdvojene sirutke tijekom čuvanja jogurta u hladnjaku.



Slika 2. Izdvajanje sirutke na površini jogurta nakon tjedan dana (lijevo) i četiri tjedna hladnog skladištenja (desno) (vlastita fotografija)

Stoga, nakon oblikovanja koaguluma važno je fermentaciju odmah prekinuti hlađenjem kako povećana kiselost i utjecaj temperature vrenja ne bi doveli do prethodno opisane pojave (Zoidou i sur., 2017). Međutim, hlađenje fermentiranih mliječnih proizvoda mora se provesti pažljivo budući da i prebrzo hlađenje može dovesti do sinereze. Zbog toga se ono provodi u dvije faze: prvo sniženje do temperature od 15-20 °C te završno hlađenje do temperature ispod 5 °C u hladnjaku (Tratnik i Božanić, 2012). Na pojavu sinereze utječu i procesni uvjeti kao temperatura pasterizacije, tlak homogenizacije, temperatura, vrijeme i pH inkubacije (Gyawali i Ibrahim, 2016) pa je jedan od glavnih ciljeva mljekarske industrije inhibirati razdvajanje faza i smanjiti brzinu sinereze tijekom skladištenja jogurta (Tavakoli i sur., 2018). Sinereza se kontrolira ravnotežom između sila privlačenja i odbijanja unutar kazeinske mreže i rasporedom veza u kazeinskoj mreži (Cardines i sur., 2018), a ovisi o vrsti i udjelu proteina te njihovom svojstvu da zadrže vodu (Zhang i sur., 2018a). Neke od mogućnosti smanjenja sinereze su povećanje ukupnog udjela suhe tvari u mlijeku, upotreba stabilizatora tj. polisaharida (karagenan, guar guma, agar, alginati, pektin, želatina) koji imaju sposobnost zadržavanja velikih količina vode te odabir sojeva jogurtne kulture koji imaju sposobnost prirodne proizvodnje i izlučivanja polisaharida (egzopolisaharidi) u jogurt tijekom fermentacije (Das i sur., 2019).

Jogurt ima visoku nutritivnu vrijednost. Budući da u usporedbi s mlijekom ima veći udio suhe tvari, to povećava njegov sadržaj proteina i minerala, a osobito kalcija. Također, ima ulogu u prevenciji pojedinih bolesti i poboljšava sveukupni imunološki sustav konzumenata. Za takav pozitivan utjecaj na zdravlje odgovorne su komponente kao proteini, neki vitamini i minerali, metabolički produkti fermentacije (mliječna kiselina, peptidi, aminokiseline) i prisutnost živih

kultura bakterija mliječne kiseline (Tavakoli i sur., 2018). Fermentacijom dolazi do djelomične razgradnje proteina pomoću bakterija mliječne kiseline, a proizvedeni peptidi i aminokiseline posjeduju antioksidacijsko djelovanje te utječu na oksidacijsku stabilnost jogurta, inhibiciju lipidne peroksidacije i uklanjanje slobodnih radikala (Kwon i sur., 2019; Tavakoli i sur., 2018). Iz tog razloga biološka aktivnost jogurta veća je nego kod mlijeka. Također, proteini postaju lakše probavljivi i struktura koaguluma proteina fermentiranih proizvoda postaje pristupačnija djelovanju enzima probavnog sustava. Zbog povećane probavljivosti fermentirani su mliječni proizvodi važni u prehrani djece i starijih (Tratnik i Božanić, 2012).

Nadalje, bakterije mliječne kiseline imaju važnu ulogu u probavi, lipidnom metabolizmu, pretilosti i kod ateroskleroze. Vrste roda *Lactobacillus* pokazuju utjecaj na razinu ključnih enzima metabolizma poput hidrolaze žučnih soli, azoreduktaze,  $\beta$ -glukuronidaze i na udio nekonjugiranih/konjugiranih žučnih kiselina. Također se smatra mogućim da neke od kasnije navedenih biokemijskih/fizioloških funkcija jogurta obogaćenog polifenolima masline, poput smanjene razine LDL i ukupnog kolesterola, mogu biti dijelom povezane s većom populacijom i povećanim metabolizmom bakterija mliječne kiseline u jogurtu, a kao rezultat navedenog dodatka (Georgakouli i sur., 2016).

Tijekom fermentacije jogurtna kultura koristi laktozu iz mlijeka za svoj rast i metabolizam te se smanjuje njen udio, i to 20-30 % pri čemu ju pretvara u mliječnu kiselinu zbog čega se pH vrijednost snižava, a titracijska se kiselost izražena u stupnjevima Soxhlet-Henkel-a povećava. Mliječna kiselina stimulira crijevnu peristaltiku i potiče probavu (potiče sekreciju sluzi i korisnih enzima te udvostručuje resorpciju kalcija, fosfora i ostalih hranjivih tvari). Također, produljuje trajnost proizvoda kroz zaustavljanje rasta bakterija koje su osjetljive prema kiselinama i mogu proliferirati samo kod viših pH vrijednosti (Hrenović, 2006). Konzumacijom jogurta i drugih fermentiranih mliječnih proizvoda smanjuje se pH probavnog sustava te na taj način mliječna kiselina potiče rast poželjne mikroflore odnosno sprječava rast nepoželjne mikroflore i nastajanje njezinih toksičnih metabolita.

Zdravstvena vrijednost jogurta očituje se i u manjoj količini prisutne laktoze što je osobito važno u prehrani ljudi koji teško probavljaju laktozu zbog nedostatka ili slabe aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze (Tratnik i Božanić, 2012).

## 2.2. MASLINA (*Olea europaea*)

Maslina (lat. *Olea europaea*) ubraja se u najstarija kultivirana stabla na svijetu. Stablo masline izdržljiva je biljka koja može preživjeti u različitim okolišnim uvjetima (Ray i sur., 2015).

Podrijetlo masline nije točno poznato, ali se zahvaljujući svojoj prilagodljivosti i izdržljivosti jako proširila te danas raste u mnogim područjima svijeta, a prije svega na Mediteranu, obalama jugoistočne Europe i sjeverne Afrike (Talhoui i sur., 2018). Maslina pripada obitelji *Oleaceae* koja sadrži 30 rodova i 600 različitih opisanih vrsta, a rod *Olea* obuhvaća približno 40 vrsta grmlja i drveća (Ray i sur., 2015). Za vrstu *Olea europaea* opisana su dva postojeća oblika: divlja maslina ili oleaster (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) i uzgajana maslina (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) koja je višegodišnje zimzeleno stablo. Italija, Španjolska, Francuska, Tunis i Grčka imaju zabilježen najveći broj kultivara (Fogher i sur., 2010).

Postoje različite sorte maslina koje međusobno razlikuju njihove biološke i gospodarske karakteristike kao sposobnost samooplodnje, zadržavanje/odbacivanje ploda, otpornost na sušu i studen, prema bolestima i štetnicima, rodnost, veličina i oblik ploda, oblik i boja lišća, udio ulja u plodu (10-28 %). Sorte maslina najčešće se razvrstavaju po namjeni ploda i to na uljne i stolne sorte, i po području uzgoja. Najzastupljenija hrvatska sorta masline je oblica koja je i korištena u ovom radu za dobivanje ekstrakta lista masline. Prema namjeni oblica je mješovita sorta što znači da ima kombinirana svojstva stolnih i uljnih sorti tj. može se koristiti kao obje zbog većeg udjela ulja i krupnoće ploda (Škevin, 2016).

## 2.3. BIOAKTIVNI SPOJEVI LISTA MASLINE I NJIHOVI UČINCI NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Maslina je imala važnu ulogu u tradiciji brojnih starih civilizacija (Grci, Rimljani, Egipćani) pa su se tako plod, ulje i lišće masline tijekom povijesti koristili u narodnoj medicini, različitim ceremonijama i kao nutrijenti u prehrani (Talhoui i sur., 2018; Škevin, 2016).

Tijekom proizvodnje maslinovog ulja kao nusprodukti zaostaju komina, koštice i otpadna voda, dok se kao indirektni zaostatak koji čini 10 % ukupne mase maslina javlja lišće. Ono se u procesu prerade odvaja od plodova prije njihovog mljevenja u mlinu te se smatra otpadom.

Masa zaostataka je velika zbog proizvodnje velikih količina maslinovog ulja u svijetu, a gledano s agroindustrijske strane mogu predstavljati velik problem za onečišćenje okoliša. Međutim, s druge strane oni predstavljaju jeftin i neiskorišten izvor energije i biološki aktivnih spojeva te imaju potencijal za korištenje u različite svrhe i donošenje profita (Talhaoui i sur., 2018). Njihova je upotreba vrlo poželjna jer se na taj način može pridonijeti održivosti koja danas drži centar zanimanja znanosti, ali i šire.

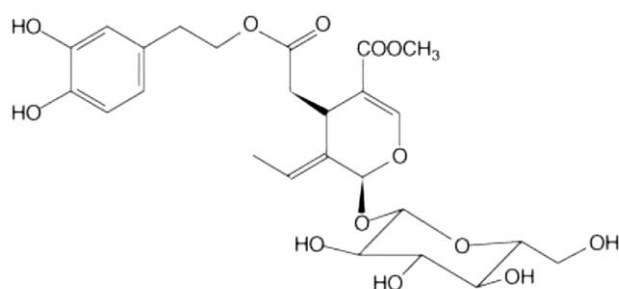
List masline bogat je različitim kemijskim spojevima koji posjeduju značajno biološki aktivno djelovanje. To su prije svega fenolni spojevi, zatim triterpenoidi, pigmenti i tokoferoli. Najznačajniji triterpeni lista masline su oleanolna i maslinska kiselina, uvaol i eritrodiol (Talhaoui i sur., 2018). Kako su fenoli najzastupljeniji spojevi u maslinama i imaju širok raspon utjecaja na ljudsko zdravlje, kao i najjače djelovanje ukratko su opisani u narednom potpoglavlju.

### 2.3.1. Fenoli

Fenolni su spojevi prisutni u velikom broju biljaka kao sekundarni biljni metaboliti. Ubrajaju se u specifične pigmente i do danas je poznato više od 8000 različitih struktura. Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide. Oni sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima biljaka te djeluju kao fotoreceptori. Znatno utjecaj imaju i na boju, okus i miris hrane. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu vanjski uvjeti (svjetlost, temperatura), agrotehničke mjere te uvjeti dozrijevanja, skladištenja, obrade i prerade (Seçmeler i Galanakis, 2019). Također, uočen je i utjecaj sorte, zrelosti i područja uzgoja (Ray i sur., 2015). Nadalje, različite vrste biljnog tkiva posjeduju različite fenolne spojeve što i rezultira njihovim karakterističnim metabolizmom.

U listu masline 36 različitih spojeva pripada ovoj skupini. To su lipofilni krezoli te hidrofilni fenolne kiseline i alkoholi, flavonoidi i sekoiridoidi odnosno preciznije kemijski spojevi: hidroksitirozol, tirozol; kafeinska, *p*-kumarinska, galna, ferulinska, siringinska i vanilinska kiselina, vanilin, oleuropein, oleokantal; luteolin, diosmetin, apigenin, cijanidin i njihovi 7 i 4-glikozidi, rutin, oleacin, verbaskozid, oleurozid i ligstrozid (Seçmeler i Galanakis, 2019; Lee i Lee, 2010).

Najznačajniji i najzastupljeniji fenolni spoj (neflavonoid) lista masline jest oleuropein. On pripada skupini sekoiridoida (monoterpenoidi) koji su u obitelji *Oleaceae* zastupljeni u velikoj količini, a radi se o spojevima vezanim za glikozide koji nastaju sekundarnim metabolizmom terpena. Oleuropein je ester 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozola) i  $\beta$ -glukozilirane elenolske kiseline, a njegova kemijska formula prikazana je na slici 3. Nakon oralne primjene apsorbira se i brzo razgrađuje na sastavne komponente hidrolizom glukozidazama pomoću bakterija u debelom crijevu, pri čemu nastali hidroksitirozol, također fenolni spoj, ima mnoga biološki aktivna djelovanja (Seçmeler i Galanakis, 2019; Segura-Carretero i sur., 2010).



Slika 3. Kemijska formula oleuropeina (Marhamatizadeh i sur., 2013)

Koncentracija oleuropeina na početku sazrijevanja ploda raste, dok opada (razgrađuje se) fiziološkim zrenjem sve do truljenja. Suprotno tomu, njegova se koncentracija tijekom sazrijevanja povećava u lišću, a opada njihovim starenjem (Seçmeler i Galanakis, 2019).

Oleuropein odlikuju gorčina, oporost i trpkost te poneki metalni atributi što predstavlja izrazit nedostatak njegovom korištenju kao dodatku u prehrambene proizvode. Te negativne senzorske karakteristike mogu se značajno smanjiti mliječno-kiselom fermentacijom pri čemu nastaju manje gorki produkti. Također, koncentracija mu se može znatno smanjiti namakanjem maslina u lužnatoj i slanoj otopini prije prešanja. Nadalje, utječe na tamnozeleno-tamnosomeđu boju lišća i ima iznimne pozitivne učinke na zdravlje (Zoidou i sur., 2014).

Dokazano je da ekstrakt lista masline pozitivno utječe na ljudsko zdravlje jer posjeduje radio, gastro i neuroprotektivno, antioksidacijsko, antitumorsko, antidijabetičko, imunomodulativno i antiupalno te antifungalno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje (Talhoui i sur., 2018; Zoidou i sur., 2017; Marhamatizadeh i sur., 2013). Također je iznimno

važno njegovo djelovanje u prevenciji bolesti srca. Sva nabrojana biološki aktivna djelovanja, dokazana na temelju *in vitro*, *in vivo* i kliničkih studija, mogu se pripisati različitim bioaktivnim kemijskim spojevima koji su prisutni u listu masline (prethodno gore navedeni) (Talhaoui i sur., 2018; Zoidou i sur., 2017). Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA), ekstrakt lista masline ocijenjen je sigurnim za uporabu s obzirom na sva postojeća, provedena toksikološka istraživanja i njegovu dugotrajnu uporabu (više od 30 godina) na europskom tržištu te je prihvaćen je njegov doprinos (uglavnom komponente oleuropeina) sveopćem ljudskom zdravlju (Zoidou i sur., 2017).

Najznačajniji i najzastupljeniji spojevi prisutni u ekstraktu lista masline su oleuropein i hidroksitirozol. Oni također od svih fenolnih spojeva u listu masline imaju i najveće antioksidacijsko djelovanje, a u literaturi se spominju i kao jači antioksidansi nego vitamini E i C. Njihovo je djelovanje direktno ili indirektno povezano sa prevencijom mehanizama i smanjenjem rizika nastajanja te liječenjem različitih kroničnih, upalnih, autoimunih i degenerativnih infekcija i bolesti kao što su dijabetes, različite bolesti kardiovaskularnog sustava, moždani i srčani udar, različite vrste tumora (dojke, debelog crijeva, prostate). Osim fenolnih spojeva, nosioci antioksidacijskih svojstava su i triterpeni (Seçmeler i Galanakis, 2019; Talhaoui i sur., 2018).

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprečavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala kada su oni prisutni u štetnom suvišku tj. kada je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Slobodni radikali izuzetno su reaktivne molekule jer imaju nespareni elektron te oštećuju i uzrokuju oksidaciju lipida, DNA i proteina. Antioksidansi inaktiviraju njihovo djelovanje tako da zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala te sprječavaju i smanjuju štetno djelovanje postojećih radikala na različita tkiva i posljedično staničnu smrt. Osim što sprječavaju neželjene procese oksidacije tj. sprječavaju i smanjuju pojavu oksidacijskog stresa tako da neutraliziraju i smanjuju količinu nastalih slobodne radikala (reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta), antioksidansi mogu doprinijeti i smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala. Razlike u fizikalnim i kemijskim svojstvima antioksidansa i slobodnih radikala uvjetuju različite mehanizme stupanja u reakcije (Talhaoui i sur., 2018; Halliwell, 1990).

Mnoštvo spojeva prisutnih u ekstraktu maslinovog lista kao što su fenoli hidroksitirozol, apigenin, luteolin, kafeinska kiselina te triterpeni oleanolna i maslinska kiselina, uvaol i



eritrodiol posjeduju antiupalna svojstva djelujući na smanjenje upalnog odgovora (Talhaoui i sur., 2018).

Oleuropein pozitivno i značajno djeluje na rizične čimbenike za razvoj kardiovaskularnih bolesti, ponajviše jer smanjuje nastajanje i povećanje postojećih aterosklerotičkih plakova u krvnim žilama tako što se veže na LDL i na taj način sprječava odnosno inhibira njegovu oksidaciju, što je EFSA potvrdila znanstvenim mišljenjem (Talhaoui i sur., 2018; Zoidou i sur., 2017). On također djeluje antihipertenzivno-snižuje krvni tlak inhibiranjem razine angiotenzin konvertirajućeg enzima odgovornog za pretvorbu hormona angiotenzina I u aktivni vazokonstriktor angiotenzin inducirajući vazodilataciju i povećanje protoka krvi u koronarnim arterijama (Parisi i sur., 2014). I za druge je spojeve lista masline otkriveno da sudjeluju u vazodilataciji (Talhaoui i sur., 2018). Nadalje, zajedno sa tirozolum i hidroksitirozolum sprječava i smanjuje agregaciju trombocita te inhibira formiranje trombova (Farooqui i Farooqui, 2018). Isto tako, kao i neki drugi fenolni spojevi, djeluje hipolipidemijski – smanjuje količinu LDL-a koji uzrokuje oštećenje arterijskih tkiva promičući aterosklozu (Mushtaq i sur., 2020; Zoidou i sur., 2017; Georgakouli i sur., 2016). Na taj način fenoli provode kardiovaskularnu zaštitu i pozitivno djeluju na pojavu ateroskleroze (Farooqui i Farooqui, 2018; Talhaoui i sur., 2018; Georgakouli i sur., 2016).

Najznačajnije i najopasnije bolesti povezane s procesom oksidacije su tumori. Antitumorski efekti triterpena (uvaol, maslinska kiselina i eritrodiol) i fenolnih spojeva (posebice oleuropein i hidroksitirozol) dokazani su za različite tipove tumora (dojke, mokraćnog mjehura, debelog crijeva) (Mushtaq i sur., 2020; Talhaoui i sur., 2018).

Navedeni kemijski spojevi lista masline djeluju tako da sprječavaju oštećenja DNA u stanicama nastala štetnim djelovanjem vodikovog peroksida, peroksinitrita i mnogih drugih spojeva (Mushtaq i sur., 2020). Također je dokazana njihova značajna uloga na proces karcinogeneze jer imaju sposobnost inhibicije staničnog ciklusa i umnožavanja stanica raka te oksidacijskog stresa pri čemu poboljšavaju aktivnost detoksifikacijskih enzima, induciraju apoptozu i stimuliraju imunološki sustav (Talhaoui i sur., 2018). Na različitim staničnim linijama u *in vitro* studijama, ali i *in vivo* testiranjima dokazano je prethodno opisano djelovanje maslinske kiseline, eritrodiola i hidroksitirozola na stanice raka debelog crijeva (Mushtaq i sur., 2020). Također, za oleuropein je dokazano vrlo brzo i potpuno djelovanje na smanjenje oštećenja kože tj. regresiju tumora kože, i dokazana je njegova kemoprotektivna uloga kod raka jezika (Talhaoui i sur., 2018).

Nadalje, fenolni spojevi kao i triterpen oleanolna kiselina imaju ulogu u borbi protiv različitih tipova dijabetesa putem različitih mehanizama te posjeduju hipoglikemijska djelovanja, posebice oleuropein i hidroksitirozol (Mushtaq i sur., 2020).

Ekstrakt lista masline ima i sposobnost inhibicije patogena prisutnih u hrani, kao i mikroorganizama uzročnika kvarenja hrane, a također i one u crijevima čovjeka (neovisno o patogenosti) (Marhamatizadeh i sur., 2013). Antimikrobno djelovanje prije svega se pripisuje fenolnim spojevima te jačina djelovanja pojedine komponente ovisi o njezinoj strukturi i vrsti/soju mikroorganizma (Shao i sur., 2011).

Oleuropein, kafeinska, vanilinska i *p*-kumarinska kiselina i ostali pokazali su inhibitorno djelovanje na rast različitih sojeva bakterija, na gram-pozitivne: *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* i *Bacillus subtilis*, kao i na gram-negativne: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i *typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* (Talhaoui i sur., 2018). Oleuropein također djeluje antimikrobno na bakterije mliječne kiseline i to na *Lactobacillus plantarum* i *brevis*, *Leuconostoc mensenteroides* te *Pediococcus cerevisiae*, iako ne inhibira rast jogurtne kulture (Zoidou i sur., 2014). Od kvasaca, djelovali su inhibitorno na različite vrste roda *Candida* (*glabrata*, *kreusei*, *parapsilosis* i *albicans*) te posebno vanilinska i kafeinska kiselina na plijesan *Aspergillus flavus* i *parasiticus* (Talhaoui i sur., 2018; Shao i sur., 2011).

Ekstrakt lista masline također ima i antiviralno djelovanje inhibicijom napredovanja infekcije virusom HIV-1 i replikacije inficiranih stanica (Talhaoui i sur., 2018).

Značajna neuroprotektivna uloga zamijećena je za maslinску kiselinu i hidroksitirozol koji čuvaju živčane stanice od oštećenja povezanih s oksidacijom. Također, u istraživanjima je dokazano da oleuropein i ekstrakt lista masline pridonose liječenju Parkinsonove bolesti i da neglikozilirani oleuropein sudjeluje u smanjenju šanse za razvoj Alzheimerove bolesti jer smanjuje proizvodnju toksičnih amiloidnih nakupina u mozgu (Mushtaq i sur., 2020).

Neka istraživanja provedena na životinjskim modelima sugeriraju i da konzumacija oleuropeina može spriječiti gubitak koštane mase kod osteoporoze povezane sa starenjem.

Unatoč velikoj paleti pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje ponajviše zbog kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih spojeva, upotreba ekstrakta lista masline u prehrambenim proizvodima ipak je ograničena radi njihovog utjecaja na kvalitetu hrane prije svega misleći na boju i okus gorčine (Tavakoli i sur., 2018; Segura-Carretero i sur., 2010).

## 2.4. METODE EKSTRAKCIJE

Biljni ekstrakti su danas vrlo popularni u prehrambenoj, ali i kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji te se koriste kao dodatci za obogaćivanje različitih proizvoda. Mnoga znanstvena istraživanja u posljednje se vrijeme bave opisivanjem sastava pojedinih tkiva različitih vrsti biljaka. S obzirom na ogroman broj postojećih biljnih vrsti, ali i razlike u njihovim pojedinim dijelovima, do danas je razvijeno mnogo različitih ekstrakcijskih metoda kako bi se postiglo izdvajanje poželjnih kemijskih spojeva, primarnih i sekundarnih metabolita biljaka s vrlo različitim fizikalno-kemijskim svojstvima (Christen i Kaufmann, 2014).

Ekstrakcijske metode dijele se na konvencionalne ili tradicionalne i moderne. Konvencionalne ekstrakcijske metode uključuju maceraciju, perkolaciju, dekokciju te refluksnu i Soxhlet ekstrakciju koja se danas vrlo često koristi. Karakteristika tih metoda korištenje je velikih volumena otapala, najčešće organskih, vrlo dugo ekstrakcijsko vrijeme, niska selektivnost i često nezadovoljavajuća reproducibilnost (Zhang i sur., 2018b). Najveći problem predstavljaju korištena organska otapala od kojih je većina opasna i onečišćuje okoliš, ali su i skupa. Kako bi se povećao prijenos mase i otapanje željenih spojeva, ove metode koriste protresanje ili zagrijavanje, a zbog dugog vremenskog trajanja može doći do razgradnje spojeva osjetljivih na toplinu. Budući da su razvijene vrlo brze analitičke tehnike pri čemu dobiveni ekstrakti mogu biti analizirani u svega nekoliko minuta, ali i zbog svih navedenih ograničenja i nedostataka tradicionalnih ekstrakcijskih metoda, postojala je potreba za razvojem bržih i efikasnijih te ekonomičnijih i ekološki prihvatljivijih metoda ekstrakcije (Christen i Kaufmann, 2014). Modernim ekstrakcijskim metodama pripadaju ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija uz pomoć mikrovalova, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pomoću pulsirajućeg električnog polja i ekstrakcija potpomognuta enzimima. Prednosti koje imaju naspram tradicionalnih tehnika su korištenje manje količine organskog otapala pri čemu se smanjuje otpad nakon provedenog procesa i dobiva se visoko koncentriran analit (nema velikog razrjeđenja), kraće vrijeme ekstrakcije, veća selektivnost, visoki prinosi ekstrakcije, jednostavnost upotrebe te mogućnost automatizacije (Zhang i sur., 2018b).

#### 2.4.1. Optimizacija parametara ekstrakcije

Kod postupka ekstrakcije jako je važno provesti optimizaciju različitih parametara kao što su temperatura, vrijeme i tlak te količina i veličina čestica korištenog biljnog materijala, koji utječu na njezinu efikasnost tj. učinkovitost i selektivnost, i karakteristike ekstrahiranih spojeva u pogledu kvalitete i kvantitete. U konačnici se nastoji dobiti ekstrakt sa što manje primjesa odnosno da je izdvojena najveća moguća količina željenih spojeva te je za njegovu kasniju aplikaciju u drugim proizvodima važno da ima i najveću antioksidacijsku aktivnost (Christen i Kaufmann, 2014). Dulje vrijeme ekstrakcije omogućit će veće izdvajanje željenih komponenata sve dok se ne postigne ravnoteža otopljene tvari u otapalu i uzorku te nakon toga vrijeme više nema utjecaja. Nadalje, poželjno je što više usitniti biljni materijal jer općenito vrijedi da što je veličina čestica manja, stvara se veća površina koja može doći u kontakt s otapalom pa je poboljšán ulazak otapala i difuzija komponenata. No, čestice ne smiju biti presitne kako ne bi došlo do začepjenja ekstrakcijske ćelije i prevelike apsorpcije otapala u uzorku pri čemu se otežava daljnja filtracija te smanjuje selektivnost (Zhang i sur., 2018b). Isto tako, vrsta i brzina protoka otapala koje će se koristiti vrlo je bitna i mora biti adekvatno i pažljivo odabrana s obzirom na kemijsku strukturu, polarnost (topljivost) i spektralne karakteristike spojeva koji se nastoje izdvojiti iz biljnog materijala. Vrlo se često koriste smjese alkohola i vode. Smjese otapala (organskih ili s vodom) omogućuju učinkovitiju ekstrakciju nego pojedinačna otapala, posebno kada su željeni analiti širokog raspona polarnosti (Christen i Kaufmann, 2014). Odabir otapala vrši se na temelju zakona sličnosti i međusobne miješljivosti otapala i otopljene tvari pa im prema tome polarnost mora biti slična (Zhang i sur., 2018b). Ono što se nastoji postići je da otapalo otopi željene komponente uz minimalnu koekstrakciju nepoželjnih komponenata uzorka tj. da ima dobru selektivnost. Također se u obzir moraju uzeti ekonomski i ekološki aspekti te kompatibilnost s narednim analitičkim postupcima kao HPLC i GC te daljnja namjena (Christen i Kaufmann, 2014).

#### 2.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

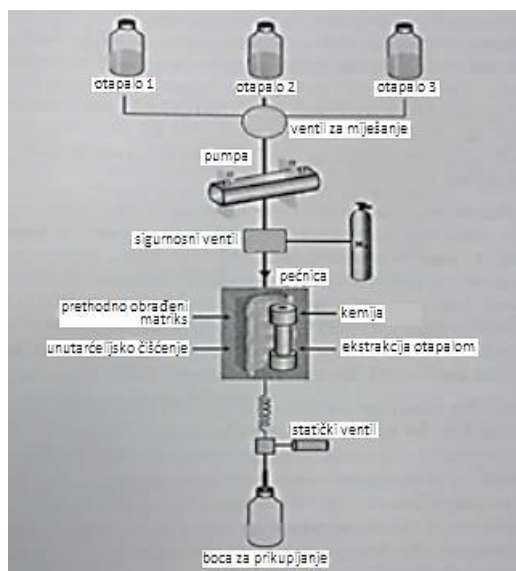
Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *pressurized liquid extraction* – PLE ili *accelerated solvent extraction* – ASE) provodi se na krutim uzorcima pomoću tekućine pri visokom tlaku (do 200 bara) i visokoj temperaturi (do 200 °C) u inertoj atmosferi dušika bez

svjetlosti. Visok tlak održava otapalo u tekućem stanju na temperaturi iznad njegove točke vrenja tijekom cijelog vremena trajanja ekstrakcije, a visoka temperatura smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala te slabi veze analit-matriks, kao i dipolne interakcije između molekula otapala i aktivnih mjesta na matriksu. Njihovo opisano djelovanje zajednički rezultira poboljšanim kontaktom otapala i uzorka, njegovim visokim prodorom u uzorak, povećanim prijenosom mase tj. većim kapacitetom ekstrakcijskog otapala za otapanje ciljanih analita te njihovom visokom topljivošću i velikom brzinom i efikasnosti njihove difuzije (Christen i Kaufmann, 2014; Spinnel i Haglund, 2010).

Ovaj postupak ekstrakcije prije se koristio samo za analizu uzoraka okoliša (tla i sedimenta) i za ekstrakciju samo organskih spojeva stabilnih pri visokim temperaturama, a danas se koristi u vrlo različitim analizama mnogih laboratorija prehrambene i farmaceutske industrije u ekstrakciji aktivnih prirodnih komponenata biljaka jer termolabilnost komponenata više ne predstavlja problem zbog mogućnosti kontrole temperature procesa te kratkog vremena ekstrakcije koji neće dovesti do njihove degradacije (vremenski je ovisna). Tako se ASE koristi za ekstrakciju ugljikohidrata (mono, oligo i polisaharidi), lipida (fosfolipidi, masne kiseline,  $\alpha$ -tokoferol), fenola (fenolne kiseline, kumarini, flavonoidi, rutin, antocijanini), terpenoida (terpeni, seskviterpeni), saponina, ugljikovodika (*n*-alkani) i alkaloida (indol) (Christen i Kaufmann, 2014). Iako se povišenjem temperature povećava količina željenih komponenata, nedostatak je što se na taj način povećava i količina koekstrahiranih spojeva, a isto tako može doći i do gubitka otapala (Zhang i sur., 2018b; Christen i Kaufmann, 2014). Zbog toga metoda ima ograničenu selektivnost budući da se dobivaju ekstrakti nedovoljne čistoće pa bi neželjeni spojevi trebali biti uklonjeni prije same ekstrakcije i dodatno analizirani što je skupo i vremenski zahtjevno te često uključuje upotrebu velikih količina štetnih organskih otapala (Spinnel i Haglund, 2010).

ASE može se provoditi na dva načina: statički i dinamički. Statički se način koristi za izdvajanje komponenata čvrsto vezanih uz matriks odnosno uzoraka koje je teško ekstrahirati. Većina danas provedenih ASE koristi ovaj način te je on korišten i u ovom diplomskom radu. Shema procesa prikazana je na slici 4. Kod statičkog moda, ekstrakcijska se ćelija puni uzorkom, unosi se u pećnicu gdje se provodi zagrijavanje. Otapalo se pumpom dovodi u ćeliju te u njoj raste tlak regulacijom prigušivača. Dalje se otapalo određeno vrijeme drži u ćeliji pri čemu se održavaju prethodno selektirani tlak i temperatura. Otapalo se s izdvojenim analitima zatim ispire u bocu za prikupljanje koristeći tok dušika pod tlakom. Može se provoditi više

ekstrakcijskih ciklusa pri čemu se ćelija svaki puta puni svježim otapalom. Broj provedenih ekstrakcijskih ciklusa također utječe na efikasnost te ovisi o korištenom uzorku i spojevima koji se iz njega nastoje izdvojiti. Nakon zadnjeg ciklusa, ćelija se čisti od otapala strujom dušika (Christen i Kaufmann, 2014).



Slika 4. Shema ASE procesa (iz Priručnika za rad s uređajem za ASE ekstrakciju proizvođača Thermo Scientific, Dionex ASE 350 Operator's manual)

Dinamička se ekstrakcija koristi za lako ekstrahirajuće komponente iz uzoraka odnosno za uzorke kod kojih je moguća brza uspostava ravnoteže unutar i izvan njih. Jedina razlika od statičkog načina jest što se otpuštaju ventili te se otapalo kontinuirano pumpa kroz ekstrakcijsku ćeliju pri visokom tlaku i temperaturi određenim protokom ( $\text{mL min}^{-1}$ ) kako bi se eluirali željeni analiti (Spinnel i Haglund, 2010).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za prvu seriju preliminarnih eksperimenata korišteno je sirovo kravlje mlijeko iz mlijekomata, dok je u drugom dijelu preliminarnog kao i u glavnom dijelu istraživanja korišteno pasterizirano i homogenizirano mlijeko tvrtke Dukat d.d. s 3,2 % mliječne masti.

Za proizvodnju jogurta korištena je termofilna liofilizirana jogurtna kultura YoMix 10 DCU (Danisco-DuPont, Wilmington, SAD).

Maslinovo lišće (slika 5) korišteno za ekstrakciju sakupljeno je tijekom ljeta 2019. godine na području Zadra (oblica) te je sušeno na zraku.



Slika 5. Lišće masline korišteno za dobivanje ekstrakta (vlastita fotografija)

#### 3.2. PROIZVODNJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE

Maslinovo se lišće prije ASE pripremlilo usitnjavanjem na manje komade i mljevenjem u električnom mlincu na malo grublju strukturu, ali ne prefino kako se ćelija korištena za ekstrakciju ne bi začepila. Tako pripremljeno lišće u količini od 2,5 g vagalo se na analitičkoj vagi (ABT 220-4NM, Kern, Njemačka) te se pomiješalo s pola žličice dijatomejske zemlje. Dijatomejska se zemlja koristi kao inertno disperzijsko sredstvo, a dodala se kako bi ekstrakcija bila efikasnija tj. da se izbjegne agregacija usitnjenih čestica uzorka i začepljenje ekstrakcijske ćelije (Christen i Kaufmann, 2014). Smjesa se kroz lijevak usipala u ćeliju za

ekstrakciju (slika 6) volumena 34 mL napravljenu od nehrđajućeg čelika, na čije su se dno prethodno stavila dva celulozna filtera veličine pore 0,45  $\mu\text{m}$ .



Slika 6. Čelija za ekstrakciju napunjena usitnjanim lišćem masline i dijatomejskom zemljom (vlastita fotografija)

Ekstrakcija je provedena na uređaju Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, Waltham, SAD; slika 7) u 3 ciklusa, pri temperaturi od 100  $^{\circ}\text{C}$  i tlaku od 10,34 MPa, dok je statičko vrijeme iznosilo 5 min. Navedeni parametri optimirani su u prethodno provedenim istraživanjima (Horvatin, 2018; Lovrić, 2018), a kao ekstrakcijsko otapalo koristila se destilirana voda koja je prethodno odzračena u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 45-60 min.



Slika 7. ASE uređaj (Dionex ASE 350, proizvođača Thermo Scientific; vlastita fotografija)



Sakupljeni ekstrakti (slika 8) dalje su korišteni za obogaćivanje jogurta. Ekstrakt se prvih dva tjedna nakon proizvodnje čuvao u hladnjaku, no nakon toga se obavezno čuvao u zamrzivaču kako ne bi došlo do nepoželjnih promjena.



Slika 8. Dobiveni ekstrakti nakon ASE ekstrakcije (vlastita fotografija)

Proizvedenim ekstraktima potom su određeni koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost kako je detaljnije opisano u poglavlju 3.5.

### 3.3. PRELIMINARNI EKSPERIMENTI

U svrhu uspostave glavnog istraživanja provedeni su preliminarni eksperimenti čija je svrha bila odrediti količinu ekstrakta koji će se dodati u jogurt s obzirom na koncentraciju fenola i prihvatljivost krajnjeg proizvoda, vrstu mlijeka (nehomogenizirano i nepasterizirano ili prethodno obrađeno-homogenizirano i pasterizirano) s obzirom na količinu vremena na raspolaganju i složenost njegove pripreme kao glavnog materijala za daljnju provedbu istraživanja.

Kao ishodišna sirovina u preliminarnim je ispitivanjima bilo korišteno svježe sirovo mlijeko nabavljeno iz mlijekomata, čuvano pri temperaturi do +4 °C do daljnje obrade. Prije fermentacije mlijeko se profiltriralo kroz sterilnu gazu, obralo na laboratorijskom separatoru te mu se udio mliječne masti podesio na 2,8 %. Tako pripremljenom mlijeku potom se odredila aktivna i titracijska kiselost (vidi poglavlje 3.5.) te se pasteriziralo visokom pasterizacijom pri 90-95 °C/5-10 min. Ono se dalje koristilo za proizvodnju jogurta pomoću

jogurtne kulture YoMix (10 DCU, Danisco-DuPont, Wilmington, SAD) koja se dodala sukladno uputama proizvođača.

Prilikom probne proizvodnje jogurta testirao se dodatak 6 različitih koncentracija ekstrakta lista masline (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1 %, v/v) kako bi se odabrala najpogodnija tri uzorka s obzirom na prihvatljivost senzorskih svojstava. Ekstrakti su se dodali u mlijeko neposredno prije inkubacije, a postupak fermentacije provodio se do postizanja pH 4,6, nakon čega se isti zaustavio naglim hlađenjem pod mlazom hladne vode. Proizvedeni uzorci ostavljeni su preko noći u hladnjaku te su idući dan senzorski ispitani na prihvatljivost kako je opisano u poglavlju 3.5.10. Pritom su odabrana tri uzorka najbolje prihvatljivosti koja su se koristila u nastavku istraživanja.

Kako se ovakva priprema pokazala vremenski dosta zahtjevnom, odlučeno je u glavnom pokusu kao ishodišnu sirovinu koristiti konzumno mlijeko proizvođača Dukat d.d. Međutim, radi isključivanja razlika u senzorskim svojstvima tako proizvedenih jogurta, prije početka glavnog istraživanja napravljena je probna proizvodnja odabranih uzoraka s Dukat pasteriziranim mlijekom, a pri tom je utvrđeno i prosječno trajanje fermentacije od 4 h i 25 min.

### 3.4. PROIZVODNJA JOGURTA

#### 3.4.1. Priprema posuđa za fermentaciju i naredne analize

Prije provedbe pokusa sve predviđeno posuđe steriliziralo se postupkom suhe sterilizacije pri 200 °C tijekom 2 h u laboratorijskom termostatu (3u1, Inko, Zagreb, Hrvatska; slika 9). Na uspješnu provedbu sterilizacije ukazala je promjena boje trake za sterilizaciju zalijepljene na aluminijsku foliju koja prekriva otvor laboratorijskog suđa.



Slika 9. Suha sterilizacija laboratorijskog posuđa (vlastita fotografija)

### 3.2. Proizvodnja jogurta

Prije početka fermentacije bilo je potrebno izvagati jogurtu kulturu YoMix (10 DCU, Danisco-DuPont, Wilmington, SAD; slika 10) na preciznoj analitičkoj vazi (AB104, Mettler Toledo, SAD) sukladno uputi proizvođača. Budući da je za provedbu jednog pokusa bila potrebna količina od 3,88 L mlijeka za fermentaciju, potrebno je bilo odvagati 0,082 g jogurtne kulture.



Slika 10. Jogurtna kultura korištena za proizvodnju jogurta (vlastita fotografija)

Sterilizirane su se čašice, u kojima se kasnije provodila fermentacija, prije inokulacije propisno označile obzirom na količinu dodanog ekstrakta (1,5; 3 i 5 %) i dane čuvanja (1, 7, 14, 21, 28, 35) te su se pripremile za prihvatanje inokuliranog mlijeka.

Prije inokulacije, mlijeko je zagrijano uz konstantno miješanje (slika 11) na temperaturu nešto višu od optimalne za fermentaciju (48 °C).



Slika 11. Zagrijavanje mlijeka prije dodatka mikrobiološke kulture (vlastita fotografija)

Zatim se u zagrijano mlijeko uz konstantno miješanje dodala prethodno izvagana jogurtna kultura, a inokulirano mlijeko potom je odmjereno u manje spremnike u potrebne volumene proračunate za ukupnu količinu pojedinog uzorka te se dodala prethodno izračunata količina ekstrakta. Nakon miješanja, po 250 mL tako pripremljenog inokuliranog mlijeka s dodanim ekstraktom dalje se razlilo u prethodno označene staklene čašice (slika 12) koje su se potom smjestile u termostat podešen na 43 °C čime je započela fermentacija.



Slika 12. Napunjene čašice spremne za početak fermentacije (vlastita fotografija)

Prije početka te u razmacima od sat vremena tijekom trajanja fermentacije (pred kraj fermentacije i češće) izuzimali su se uzorci radi mjerenja kiselosti (pH vrijednost i titracijska kiselost u °SH), čiji je cilj bio odrediti trajanje fermentacije tj. kako dodatak biljnog ekstrakta utječe na rast jogurtne kulture. Završetak fermentacije odredio se postizanjem pH vrijednosti

4,6 koja predstavlja izoelektričnu točku kazeina. Fermentacija je prekinuta naglim hlađenjem odnosno uzorci su žurno izvađeni iz termostata i stavljeni u hladnu vodu te nakon toga u frižider na temperaturu od +4 °C gdje su se čuvali do daljnjih predviđenih analiza. Na kraju fermentacije također se odredio broj laktobacila i streptokoka na MRS i M-17 hranjivoj podlozi kako je opisano u poglavlju 3.5.6.

Svim proizvedenim uzorcima neposredno su se nakon proizvodnje te svakih 7 dana hladnog skladištenja određivali sljedeći parametri kvalitete: kiselost (aktivna i titracijska), reološki parametri, senzorska svojstva, sinereza i kapacitet zadržavanja vode, boja, koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost te je provedena i mikrobiološka analiza s ciljem određivanja trajnosti proizvoda.

Svaki je pokus ponavljan dva puta (svaki s trajanjem čuvanja od 35 dana) te su u izračun i za prikaz rezultata uzete srednje vrijednosti dva mjerenja. Statistička obrada dobivenih podataka uz interpretaciju dobivenih rezultata omogućila je određivanje optimalne količine dodatka biljnog ekstrakta. Za usporedbu se koristio kontrolni uzorak – jogurt bez dodatka ekstrakta.

## 3.5. METODE

### 3.5.1. Određivanje pH vrijednosti mlijeka i jogurta

Za mjerenje pH vrijednosti uzoraka korišten je laboratorijski pH-metar WTW-ProfiLine pH 3110 tvrtke Xylem Analytics (Weilheim, Njemačka). Mjerenje se provodilo uranjanjem čiste, prethodno kalibrirane elektrode u uzorak i očitavanjem nakon što se pH vrijednost na zaslonu uređaja ustalila (Božanić i sur., 2010).

### 3.5.2. Određivanje titracijske kiselosti u mlijeku i jogurtu metodom po Soxhlet-Henkel-u

Kod titracijskih metoda za određivanje kiselosti određuje se volumen natrijevog hidroksida određenog molaliteta potreban za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenolftalein.

U ovom istraživanju primijenila se modificirana metoda te se u Erlenmeyerovu tikvicu pipetom od 20 mL ulio uzorak mlijeka za analizu i pipetom dodao 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina. Tako pripremljeni uzorak titrirao se s 0,1 mol L<sup>-1</sup> NaOH do pojave ružičaste boje koja je bila stabilna jednu minutu (Božanić i sur., 2010).

Slijepa proba načinila se pipetiranjem 20 mL mlijeka u Erlenmeyerovu tikvicu te se dodalo 0,4 mL kobaltovog sulfata (CuSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O). Njihovim miješanjem dobila se boja koja služi kao provjera kraja titracije uzorka odnosno za usporedbu s uzorkom kako bi se osigurala ispravna titracija.

#### *Priprema i analiza uzorka jogurta:*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL odvagalo se 20 g jogurta i razrijedilo dodatkom 20 mL destilirane vode pomoću pipete. Dalje se dodalo 2 mL 2 %-tne alkoholne otopine fenolftaleina i titriralo se s 0,1 M otopinom NaOH do pojave ružičaste boje. Slijepa proba pripremila se analogno načinu prethodno opisanom za uzorak mlijeka (Božanić i sur., 2010).

Kiselost po Soxhlet-Henkel-ovoj metodi izrazila se u stupnjevima po Soxhlet-Henkel-u, a izračunala se prema niže navedenoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = V_{\text{NaOH}} \times f \times 2 \quad [1]$$

gdje je

$V_{\text{NaOH}}$  – količina utrošene lužine za neutralizaciju uzorka u mL

$f$  – faktor molariteta lužine koji ovdje iznosi 1

Dobiveni stupnjevi kiselosti u  $^{\circ}\text{SH}$  preračunali su se dalje u udio mliječne kiseline (%) pomoću sljedećeg izraza (Božanić i sur., 2010):

$$^{\circ}\text{SH} \times 0,0225 = \text{g mliječne kiseline} \quad [2]$$

#### 3.5.3. Određivanje sinereze i kapaciteta zadržavanja vode

Sinereza i kapacitet zadržavanja vode (WHC) vrlo su značajne fizikalne karakteristike jogurta. Kapacitet zadržavanja vode sposobnost je hrane da zadrži vlastitu ili dodanu vodu tijekom primjene sile, tlaka, centrifugiranja ili zagrijavanja. U slučaju fermentiranih mlijeka

to je pokazatelj sposobnosti zadržavanja seruma u strukturi gela, koja doprinosi minimalnom odvajanju sirutke što je presudni aspekt ukupne kvalitete jogurta (Gyawali i Ibrahim, 2016). Sinereza je postupak izdvajanja tekućine – sirutke na površini krutog fermentiranog mliječnog proizvoda zbog stezanja gela (3D mreže proteina kazeina) nastalog tijekom fermentacije (Zoidou i sur., 2017).

Kapacitet jogurta za zadržavanje vode odredio se pomoću modificirane centrifugalne metode po Feng i sur. (2018), pri čemu je u kivete od 50 mL odvagano oko 20 g jogurta. Zatim su kivete s uzorcima centrifugirane na centrifugalnom separatoru (IKA, Rotina 380 R, Njemačka) pri 5000 rpm tijekom 10 min. Nakon centrifugiranja, pipetom se odvojio supernatant, a zaostali se talog u kiveti izvagao. Razlika u masama predstavlja masu odvojenog supernatanta, a izdvojeni supernatant u rezultatima je prikazan u volumnim vrijednostima te se kapacitet zadržavanja vode izračunao prema sljedećoj formuli:

$$\text{WHC (\%)} = (m_{\text{talog}} / m_{\text{uzorak}}) \times 100 \quad [3]$$

$m_{\text{talog}}$  = masa taloga nakon uklanjanja tekućeg dijela prije filtriranja (g)

$m_{\text{uzorak}}$  = masa uzorka prije centrifugiranja (g)

Iz dobivenih vrijednosti preračunala se i sinereza kao postotak prema sljedećoj formuli:

$$\text{S (\%)} = (m_{\text{supernatant}} / m_{\text{uzorak}}) \times 100 \quad [4]$$

$m_{\text{supernatant}}$  = masa supernatanta (sirutke) odvojene od mreže gela tijekom centrifugiranja (g),

$m_{\text{uzorak}}$  = početna masa uzorka, prije centrifugiranja (g)

#### 3.5.4. Određivanje reoloških karakteristika

Od reoloških karakteristika u jogurtima je određena viskoznost pomoću rotacionog reometra (slika 13) RM-180 Rheomat, tvrtke Rheometric Scientific (Rheometric, Inc., Piscataway, SAD). On se sastojao od cilindričnog vretena (br. 1  $\phi$  30 mm, l = 45 mm) i vanjskog plašta (br. 1,  $\phi$  32,54 mm) u koji se stavio uzorak. Uzorak se punio do oznake odnosno u volumenu od 32 mL. Za tijelo uređaja pričvrstilo se cilindrično vreteno s vanjskim plaštom u kojem se nalazio uzorak jogurta. Važno je bilo omogućiti da tijekom cijelog mjerenja i rotiranja



konstantnom brzinom vreteno bude potpuno uronjeno u uzorak. Za mjerenje obrnutog momenta koji se javio na rotirajućem vretenu bilo je korišteno relativno obrtanje mjerne osovine u odnosu na pogonsku osovinu. Uređaj potencijometar vezan na dinamometar, primao je podatke o relativnom obrtanju, pri čemu se obrtni moment pretvarao u električni signal koji se prevodio u digitalnu vrijednost očitavanu na zaslonu uređaja. Reometar je u uzorcima mjerio napon smicanja ( $T$ ) i prividnu viskoznost ( $\mu$  u Pa s) pri brzinama smicanja ( $D$ ) od 100, 270, 440, 610, 780, 950, 1120 i 1290  $s^{-1}$  jedinica. Temperatura uzoraka prilikom određivanja iznosila je oko 20 °C.



Slika 13. Reometar korišten za određivanje viskoznosti u uzorcima jogurta: lijevo – priprema za mjerenje, desno – tijekom mjerenja (vlastita fotografija)

### 3.5.5. Određivanje boje

Određivanje boje uzoraka jogurta provodilo se prema CIElab sustavu pomoću CM-3500d spektrofotometra s izvorom svjetlosti D65, tvrtke Konica Minolta, Japan. Prije početka mjerenja provedena je kalibracija uređaja za propusnost zraka svjetlosti određenih valnih duljina kroz 30 mm visoku kivetu napunjenu jogurtom. Za 0 % kalibracije stavio se tamni zaslon, dok se za 100 % kalibracije stavila kiveta napunjena destiliranom vodom koja se kasnije koristila za uzorke. Nakon toga uslijedilo je mjerenje boje u uzorcima. Jogurt se izlio u kivetu do oznake te se ona stavila u uređaj koji mjeri transmitanciju (propusnost) u



vidljivom dijelu spektra svakih 10 nm, u području valnih duljina 400-700 nm. Na kraju su se dobile vrijednosti za kromatske karakteristike  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ . Parametar  $L^*$  predstavlja svjetlinu (jasnoću) čije vrijednosti variraju između potpuno neprozirne (0 %, crna boja) i potpuno prozirne (100 %, bijela boja). Kromatske koordinate ( $a^*$  i  $b^*$ ) nemaju brojčana ograničenja. Ukoliko je parametar  $a^*$  pozitivan određuje crvenu boju, a ako je negativan određuje zelenu boju uzoraka. S druge strane ukoliko je vrijednost  $b^*$  pozitivna to definira žutu boju, a ako je negativna plavu boju uzorka. Podaci su dobiveni u SpectraMagic NX programu.

Kako bi bilo utvrđeno odstupaju li uzorci s dodatkom ekstrakta lista masline u boji u odnosu na referentni, kontrolni uzorak, iz vrijednosti dobivenih mjerenjem ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) računao se parametar  $\Delta E^*$ , odnosno ukupna razlika obojenosti prema niže navedenoj formuli [5], pri čemu se  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  odnose na ispitivani uzorak, a  $L^*_{ref}$ ,  $a^*_{ref}$  i  $b^*_{ref}$  na referentni uzorak tj. kontrolu. U tablici 1 prikazano je značenje razlika ispitivanih uzoraka u odnosu na referentni s obzirom na kromatske karakteristike dobivene mjerenjem (OIV, 2014).

$$\Delta E^* = \sqrt{((L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2)} \quad [5]$$

Tablica 1. Značenje razlika između izmjerenih vrijednosti za kromatske karakteristike ispitivanih uzoraka i kontrolnog uzorka izraženih kao vrijednost  $\Delta E^*$  (OIV, 2014)

$\Delta E^*$	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

### 3.5.6. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza provodila se na uzorcima jogurta na kraju fermentacije i svakih 7 dana tijekom perioda čuvanja. Za provedbu analize koristile su se komercijalno dostupne hranjive

podloge: MRS za određivanje broja bakterija roda *Lactobacillus* sp. te M-17 za rast bakterija roda *Streptococcus* sp. (obje Biolife, Italija). Hranjive podloge pripremile su se sukladno uputama proizvođača deklariranim na pakiranju, a nakon obavezne sterilizacije ohlađene su i čuvane na suhom i tamnom mjestu do daljnje uporabe. Prije početka provedbe mikrobioloških analiza podloge su se otopile i temperirale na odgovarajuću temperaturu, te su tako čuvane u vodenoj kupelji (WNB, Memmert, Njemačka) do izlivanja na Petrijeve ploče.

U svrhu sprječavanja kontaminacije, uzorci za mikrobiološku analizu pripremljeni su u sterilnim uvjetima postignutim primjenom suhe i mokre sterilizacije laboratorijskog posuđa i ostalih materijala korištenih za analize, dezinficiranjem radne površine etanolom i sve su analize provedene pri otvorenom plamenu.

Mikrobiološka analiza uzoraka provodila se primjenom direktne metode naciepljivanja decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće prethodno pripremljene hranjive podloge (Božanić i sur., 2010). Priprema decimalnih razrjeđenja provodila se kako je opisano u priručniku Božanić i sur. (2010), odnosno tako da je osnovno razrjeđenje ( $10^{-1}$ ) dobiveno pipetiranjem 20 mL uzorka u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL unutar koje su bile 2-3 staklene kuglice te dodatkom 180 mL prethodno pripremljene sterilne fiziološke otopine. Dalje su se iz osnovnog pripremila ostala razrjeđenja pri čemu se 1 mL osnovnog razrjeđenja pipetirao u steriliziranu epruvetu napunjenu s 9 mL fiziološke otopine. Po 1 mL tako dobivenih razrjeđenja pipetirao se u sterilnu Petrijevu ploču (slika 14) i zalijevao odgovarajućom podlogom te inkubirao na 37 °C/48 h (M-17) odnosno 43 °C/48 h (MRS).



Slika 14. Naciepljivanje Petrijevih ploča (vlastita fotografija)

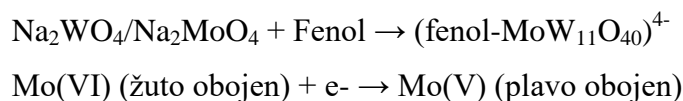
Nakon završetka inkubacije broj poraslih mikroorganizama očitavao se na čitaču bakterijskih kolonija tvrtke Funke Gerber, Njemačka pri čemu su za brojanje bile odabrane one podloge na kojima je naraslo između 30 i 300 kolonija. Broj poraslih kolonija po mL (eng. *Colony-forming Unit*, CFU) izračunao se prema izrazu [6]:

$$\text{CFU mL}^{-1} = \frac{\text{broj kolonija}}{\text{nacijepljen volumen} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}} \quad [6]$$

### 3.5.7. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014). Ukupni fenoli određivani su u vodenom ekstraktu lista masline te uzorcima jogurta.

Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni.



Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini od 765 nm.

Aparatura i korišten pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01\text{g}$ )
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L

7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična lađica za vaganje

#### Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

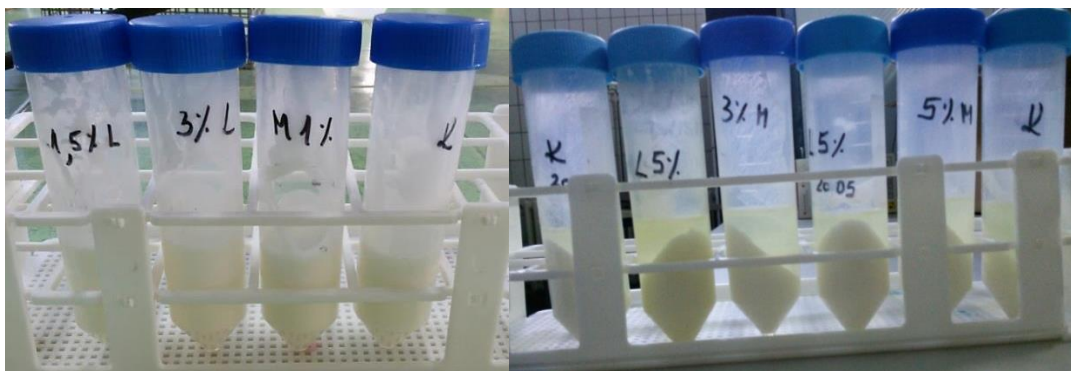
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopilo se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladilo na sobnu temperaturu. Dodalo se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopunilo u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtriralo.

3. Standard galne kiseline

Priprema: Odvagalo se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopilo u danom volumenu, a potom se do oznake nadopunilo destiliranom vodom.

#### Priprema uzoraka jogurta

U kiveti volumena 50 mL odvagnulo se 20 g uzorka jogurta koji se potom centrifugirao na centrifugi Rotina 380 R (Hettich, Njemačka) pri 5000 rpm u trajanju od 5 min i pri temperaturi od 4 °C. Izdvojeni supernatant (slika 15) izuzeo se pipetom i profiltrirao kroz Whatmann filter papir veličine pora 0,45 μm te se tako dobiveni filtrat koristio za analizu.



Slika 15. Uzorci prije centrifugiranja (lijevo) i nakon centrifugiranja (desno)

#### Priprema uzorka ekstrakta

Za potrebe određivanja ukupnih fenola ekstrakte je bilo potrebno prethodno razrijediti kako bi se dobili rezultati u rangu prihvatljivosti (apsorbancija do 1). Optimiranjem najpogodnije

koncentracije ustanovilo se da je ekstrakt lista masline potrebno razrijediti 5 puta s destiliranom vodom.

#### Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetiralo se redom 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta/supernatanta, 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min dodao se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve se skupa homogeniziralo, a potom su uzorci termostatirani 25 min pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  nakon čega se mjerila apsorbancija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 765 nm na UV-spektrofotometru (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, SAD). Na isti način pripremila se i slijepa proba, ali se umjesto uzorka koristilo otapalo za ekstrakciju - destilirana voda.

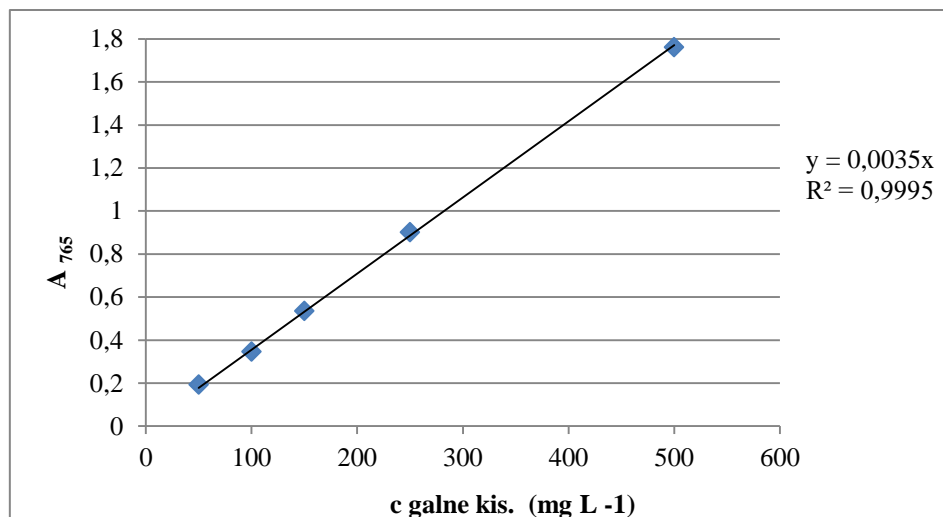
#### Izrada baždarnog pravca

##### Priprema standardne otopine

0,5 g galne kiseline otopilo se u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopunilo destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline izrađena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da su se u konačnici dobile otopine koncentracije 50, 100, 150, 250 i 500  $\text{mg L}^{-1}$ .

Postupak mjerenja apsorbancije za svaku je koncentraciju standardne otopine bio isti kao što je prethodno opisano za uzorke jogurta/ekstrakta.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtao se baždarni pravac (slika 16) pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Tablica 2 prikazuje izmjerene vrijednosti apsorbancije za svaku koncentraciju galne kiseline.



Slika 16. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih fenola u uzorcima jogurta i ekstraktu (standard galna kiselina)

Tablica 2. Izmjerene apsorbancije za pojedine koncentracije galne kiseline

c (mg L <sup>-1</sup> )	A <sub>765 nm</sub>
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad [7]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>)

Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima ekstrakta i jogurta izračunavala se prema dobivenoj jednadžbi pravca.

### 3.5.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom koju su razvili Benzie (1996) i Benzie i Strain (1996), temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt odnosno kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm.

Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Hagerman i sur., 1998; Simic i Jovanovic, 1994). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V. Svi spojevi s nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Reakcija prijenosa elektrona odvija se relativno brzo, najčešće u trajanju od 4 do 6 min, a FRAP vrijednosti izražene su preko Trolox ekvivalenata – TE (Benzie i Strain, 1996).

Aparatura i korišten pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01$ g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Mikropipete, volumena 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
6. Staklena čaša, volumena 50 mL
7. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
8. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 100 mL i 1000 mL
9. Vortex MS2 Minishaker IKA
10. Plastična lađica za vaganje

Reagensi:

1. Klorovodična kiselina, 37 %-tna
2. Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetiralo se 330  $\mu$ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopunilo destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.

3. TPTZ-a (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: Odvagalo se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopunilo do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

4. Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: Odvagalo se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopunilo do oznake s destiliranom vodom.

5. Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ )

6. Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna

7. Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvagalo se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijelo pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetiralo 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopunilo se destiliranom vodom do oznake.

8. FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremio se FRAP reagens na način da se pomiješalo 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

9. Standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)

Priprema: Potrebno je bilo pripremiti 2 mM otopinu Trolox-a. Odvagalo se 0,0501 g Trolox-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenijelo s 2 ml 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu volumena 0,1 L te se ostatak nadopunio destiliranom vodom do oznake. Zatim se tikvica omotala aluminijskom folijom jer je otopinu Trolox-a potrebno čuvati na tamnom, i stavila se u ultrazvučnu kupelj u vremenu od 5 min kako bi se sadržaj homogenizirao. Koristila se uvijek svježe pripremljena otopina standarda.

Priprema uzoraka

Ekstrakti su prije analize bili razrijeđeni 10 puta s destiliranom vodom.

Uzorci jogurta pripremili su se na isti način kao što je prethodno opisano za određivanje koncentracije ukupnih fenola (vidi poglavlje 3.5.7.).

Postupak određivanja

U epruvete se redom otpipetiralo 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  uzorka i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, dobro se promiješalo te 5 min termostatiralo pri temperaturi 37 °C. Zatim se



izmjerila apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržavala je sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodalo otapalo u kojem je uzorak ekstrahiran, odnosno destilirana voda.

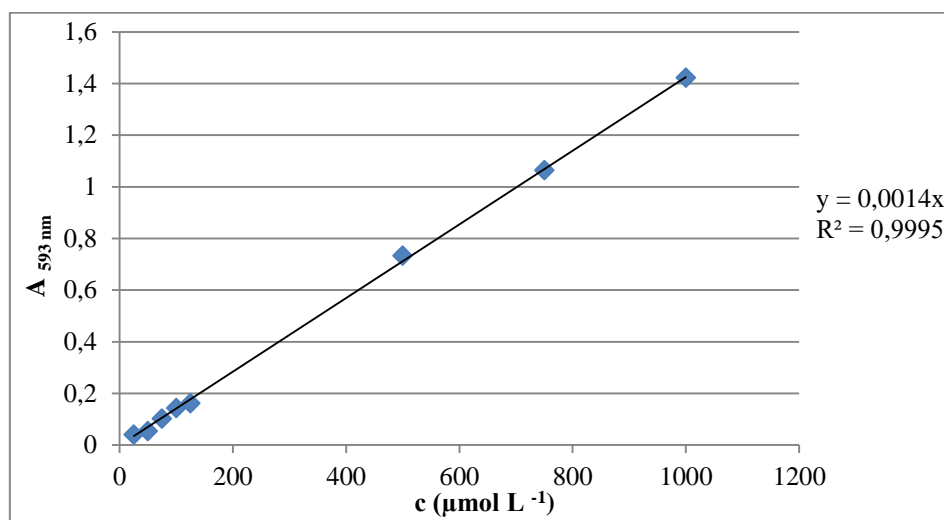
#### Izrada baždarnog pravca

Zbog poteškoća pri mjerenju pojedinih antioksidacijskih komponenti u kompleksnim smjesama, kao standard za mjerenje antioksidativne aktivnosti koristio se Trolox koji je predstavljao analog vitamina E, a sve izmjerene vrijednosti izrazile su se kao ekvivalenti Trolox-a (TE). Za pripremu baždarnog pravca pripremila se 2 mmol L<sup>-1</sup> otopina Trolox-a od koje su se dalje pripremila odgovarajuća razrjeđenja u koncentracijama 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μM.

Daljnji postupak mjerenja antioksidacijske aktivnosti bio isti je kao što je prethodno opisano.

#### Izračunavanje

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopina Trolox-a nacrtao se baždarni pravac (slika 17) pomoću programa Microsoft Office Excel s vrijednostima koncentracije Trolox (μM) na apscisi i vrijednostima apsorbancije nanesenim na ordinati koje su prikazane u tablici 3.



Slika 17. Baždarni pravac za izračun antioksidacijske aktivnosti prema metodi FRAP u uzorcima jogurta i ekstraktu (standard Trolox)

Tablica 3. Izmjerene apsorbancije za pojedine koncentracije Trolox-a

c (μM)	A <sub>593</sub>
75	0,101
100	0,142
125	0,161
500	0,732
750	1,064
1000	1,422

Na temelju dobivenih rezultata, dobila se jednadžba pravca [8] iz koje se izračunao antioksidacijski kapacitet (X) uzoraka određen FRAP metodom:

$$Y = 0,0014 \times X \quad [8]$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 593 nm

X = ekvivalent Trolox-a (TE) (μM) (μmol L<sup>-1</sup>)

### 3.5.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala razvijena je za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva u hrani. DPPH je dušikov radikal koji zbog nesporenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i tamnoljubičaste je boje. DPPH metoda bazira se na prijenosu elektrona (Huang i sur., 2005; Foti i sur., 2004), a princip određivanja temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala u reducirani oblik DPPH-H, pri čemu dolazi do sparivanja nesporenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa. Reakcija se očituje promjenom boje iz ljubičaste u žutu, što se sprektrofotometrijski prati kao pad apsorbancije pri 517 nm. Promjena boje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona (Prior i sur., 2005; Braca i sur., 2001).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)

2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti  $\pm 0,01$  g)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL i 100 mL
6. Epruvete
7. Stalak za epruvete
8. Plastična lađica za vaganje

#### Reagensi:

1. 96 %-tni etanol
2. 60  $\mu$ M otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal)

Priprema: 0,0024 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala odvagalo se u plastičnoj lađici za vaganje te kvantitativno prenijelo i otopilo u 96 %-tnom etanolu u odmjernoj tkvici od 100 mL. Tikvica se nadopunila do oznake 96 %-tnim etanolom i sadržaj se dobro promiješao. DPPH je bilo potrebno čuvati na tamnome u zatvorenoj tikvici zamotanoj u aluminijsku foliju jer je izrazito osjetljiv na svjetlo.

#### Priprema uzorka

2,5 mL destilirane vode dodalo se u 10 g jogurta kojemu se pH prethodno podesio na 4 dodatkom 1 M HCl. Jogurt se potom 10 min inkubirao pri 45 °C i u nastavku centrifugirao pri 10 000 rpm u trajanju od 10 min pri 4 °C. Dobiveni se supernatant izdvojio i pH mu se podesio na 7 dodatkom 1 M NaOH. Potom se ponovio postupak centrifugiranja. Tako dobiveni supernatant koristio se za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Tavakoli i sur., 2018).

#### Postupak određivanja i izračunavanje

Postupak određivanja provodio se prema metodi za određivanje antioksidacijske aktivnosti u jogurtima s dodanim ekstraktom lista masline (Tavakoli i sur., 2018). U epruvetu se otpipetiralo 3 mL etanolne otopine DPPH (60  $\mu$ M) te se dodalo 250  $\mu$ l supernatanta i sve se dobro promiješalo pomoću Vortex-a. Epruvete sa sadržajem stajale su 5 min pri sobnoj temperaturi u mraku nakon čega se izmjerila apsorbancija pri 517 nm ( $A_{\text{ekstrakt}}$ ). Kontrolni uzorak sadržavao je destiliranu vodu umjesto ekstrakta jogurta ( $A_{\text{slijepa proba}}$ ). Sposobnost redukcije radikala izračunao se prema formuli:

$$\text{Redukcija radikala (\%)} = ((A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{ekstrakt}}) / A_{\text{slijepa proba}}) \times 100 \quad [9]$$

### 3.5.10. Senzorska analiza uzoraka jogurta

Senzorsku analizu uzoraka jogurta u ovom je istraživanju provela skupina od 5 panelista s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su ocjenjivani 1., 7., 14., 21., 28. i 35. dan skladištenja, a analiza je uključivala ocjenu izgleda, boje, pojavu sinereze, ocjenu konzistencije, mirisa i okusa. Svako ocjenjivano svojstvo moglo je biti ocjenjeno u rasponu ocjena od 1 do 5, a korištena je metoda bodovanja s ponderiranim sustavom bodova te je svakom ocjenjivanom svojstvu pridružen odgovarajući faktor značajnosti –  $F_v$  (tablica 4) na temelju kojeg je izračunat broj postignutih bodova (Mandić i Perl, 2006; Filajdić i sur., 1988), a ocjene su se upisivale u obrazac prikazan u tablici 5.

Tablica 4. Opisni parametri senzorskih svojstava za ocjenjivanje fermentiranih mliječnih napitaka sustavom od 20 ponderiranih bodova (Mandić i Perl, 2006)

Senzorsko svojstvo	$F_v$	Opisni parametar	Ocjena	Najviši broj bodova
Izgled	0,2	Homogeno, glatko, boja jednaka po cijeloj površini	5	1
		Zamjetne male neravnine i udubljenja, malo izdvajanje sirutke na površini, mala razlike u boji površine	3-4	
		Neravno, znatno izdojena sirutka, bitne razlike u boji na površini	1-2	
Boja	0,2	Jednolična po cijelom proizvodu, bijela do blago žućkasta	4-5	1
		Manja odstupanja u boji	3	
		Strana boja, ne karakteristična za jogurt, nejednolična	1-2	

Konzistencija	0,8	Homogene, viskozno, kompaktno, ujednačene strukture, bez grudica	5	4
		Male nehomogenosti, zamjetno odvajanje krute i tekuće faze ili male grudice	3-4	
		Odvajanje faza, grudičavost, nehomogenost	1-2	
Miris	0,4	Ugodno osvježavajući kiselkasti miris	4-5	2
		Slabo izražen okus po prekiselom	3	
		Proizvod neugodna mirisa, po prekiselom, strani miris	1-2	
Sinereza	0,4	Nema je ili je nezamjetna	4-5	2
		Slabo do umjereno izražena	2-3	
		Jako zamjetna	1	
Okus	2,0	Ugodno kiseo, osvježavajući, bez grudica i fine konzistencije u ustima	4-5	10
		Malo prekiselo ili malo preslatkasto,	3	
		Jako kiseo ili ni malo kiseo, stranog okusa, nehomogen u ustima, ostavlja neugodan naknadni okus	1-2	

Tablica 5. Primjer obrasca za senzorsko ocjenjivanje fermentiranih mliječnih proizvoda

<b>Ime i prezime, datum ocjenjivanja:</b>				
<b>Datum postavljanja pokusa/r.br. uzorkovanja</b>				
<b>Svojstvo (ocjenjuje se ocjenama od 1 do 5)</b>	<b>K</b>	<b>L 1,5 %</b>	<b>L 3%</b>	<b>L 5%</b>
Izgled				
Boja				
Konzistencija				

Miris				
Sinereza				
Okus				
<b>Komentari:</b>				

### 3.6. OBRADA REZULTATA

Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel verzija 2010, a prikazani su kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je proizvesti jogurt s dodatkom ekstrakta lista masline te odrediti utjecaj ekstrakta na fermentaciju kravljeg mlijeka i fizikalno-kemijske, reološke, mikrobiološke i senzorske karakteristike jogurta tijekom 35 dana hladnog skladištenja. Proizvedeni su uzorci jogurta s 1,5; 3 i 5 % ekstrakta te su uspoređeni s kontrolnim uzorkom (jogurt bez dodanog ekstrakta). Svim proizvedenim uzorcima neposredno nakon proizvodnje te svakih 7 dana hladnog skladištenja određivani su sljedeći parametri kvalitete: aktivna i titracijska kiselost, sinereza i kapacitet zadržavanja vode, viskoznost, boja, koncentracija ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost pomoću FRAP i DPPH metode, senzorske karakteristike te je provedena i mikrobiološka analiza.

### 4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

Cilj preliminarnog istraživanja bio je odrediti trajanje fermentacije te još važnije prihvatljivost konačnog proizvoda s obzirom na dodane koncentracije ekstrakta, s naglaskom na okus i miris kao glavne senzorske značajke za potrošače, a kako bi se odlučilo koje će koncentracije biti dodane tijekom glavnog pokusa.

Kod uzoraka s 0,4-1 % ekstrakta okus je bio neznatno različit u usporedbi s kontrolnim uzorkom te jogurtima s udjelom ekstrakta 0,1 i 0,2 %. S povećanjem koncentracije pojačavao se i intenzitet okusa, ali je on i dalje ostao prihvatljiv, blago kiseo i bez osjetne gorčine. Što se tiče mirisa, jogurti s ekstraktom nisu imali posebno izražen miris te se nisu razlikovali od kontrolnog uzorka. Jogurti s većim udjelom ekstrakta odlikovali su se većom viskoznosti. Budući da su se koncentracije od 0,1-1 % pokazale premalim i nedjelotvornim za značajnije povećanje antioksidacijske aktivnosti jogurta, a nisu negativno utjecale na okus ili miris proizvoda, dalje je bilo provedeno ispitivanje s dodatkom 1,5; 2; 2,5; 3 i 5 % ekstrakta lista masline kao što je prikazano na slici 18.

Ponovno je bila provedena senzorska analiza prema obrascu prikazanom u tablici 5 te se prilikom kušanja utvrdilo da u okusu nema razlike do jogurta s dodatkom 2,5 % ekstrakta. Najizraženija je razlika u odnosu na kontrolu bila uočena kod jogurta s 5 % ekstrakta, ali je ona od strane senzorskog panela još uvijek bila percipirana kao pozitivno svojstvo, a ne kao

defekt. U svim je uzorcima bila uočena pojava gorčine pri čemu je intenzitet tog svojstva rastao s porastom udjela ekstrakta. U uzorcima s 3 i 5 % dodanog ekstrakta osjećao se blagi naknadni okus (tzv. aftertaste) gorčine. Do promjene mirisa došlo je jedino u uzorku s 5 % ekstrakta, gdje je bio prisutan miris na masline koji je bio vezan uz okus gorčine. Svi su ostali uzorci i dalje zadržali prirodni miris odnosno miris na obični jogurt (blago kiselo). Boja svih uzoraka ostala je nepromijenjena u odnosu na kontrolu odnosno bijela, što je bio i cilj.



Slika 18. Senzorska analiza uzoraka s dodatkom 1,5-5 % ekstrakta

Zbog učinka na nutritivni profil odlučeno je da će se u glavnom pokusu upotrijebiti tri koncentracije, i to 1,5; 3 i 5 % ekstrakta budući da je među navedenim uzrocima bilo moguće najbolje uočiti razlike između različitih udjela i učinaka koji oni imaju na percepciju potrošača i treniranih kušača.

#### 4.2. ODREĐIVANJE AKTIVNE I TITRACIJSKE KISELOSTI

Tijekom izvođenja eksperimenta, praćenjem fermentacije (mjerenjem pH vrijednosti) utvrđeno je da dodatak ekstrakta lista masline pozitivno utječe na tijek fermentacije. Uočena je pojava bržeg sniženja pH u uzorcima s dodatkom ekstrakta. Fermentacija kontrolnog uzorka trajala je prosječno 4,6 h, dok je kod uzorka s 1,5 % ekstrakta te 3 % ekstrakta trajala 4,5 odnosno 4 h. Smanjenje vremena fermentacije u ovom je primjeru uzrokovalo povećanje udjela ekstrakta. Jedino je uzorak s 5 % ekstrakta odstupao od toga, vrijednost je bila između uzorka s 1,5 % i 3 % ekstrakta te je prosječno vrijeme fermentacije iznosilo 4,36 h. Primjer praćenja fermentacije prikazan je u tablici 6.



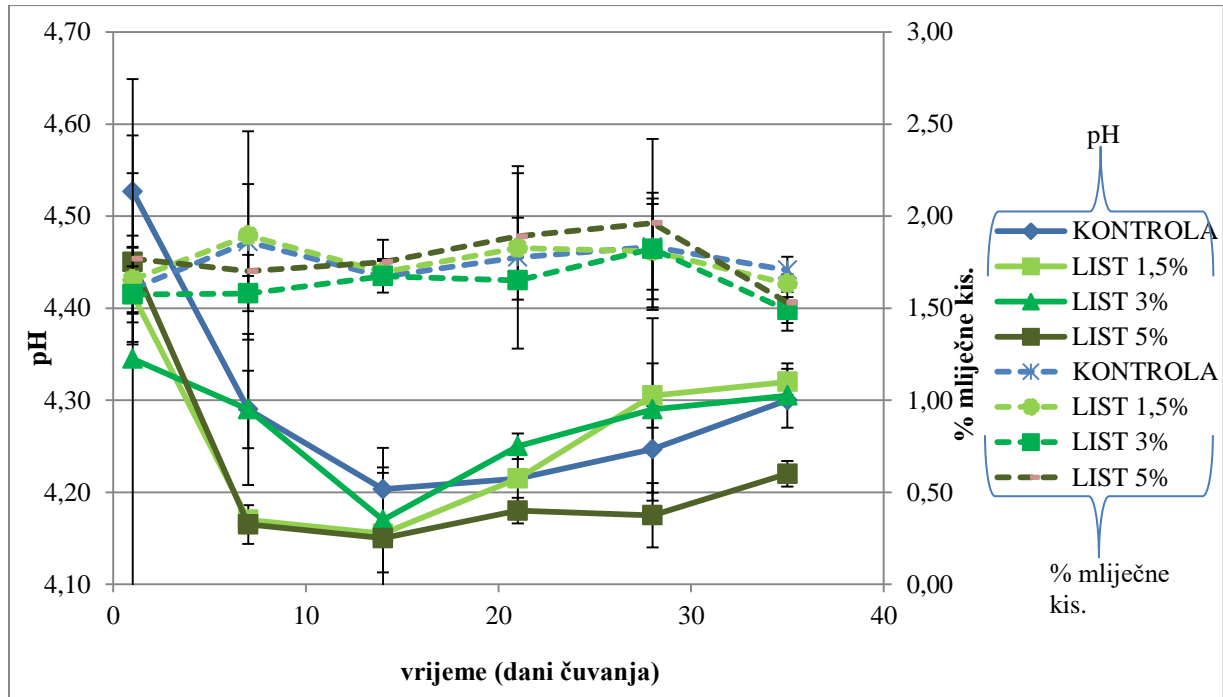
Tablica 6. Prosječne pH-vrijednosti mjerene tijekom fermentacije u uzorcima jogurta  
(Kontrola, List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) (n=2)

Vrijeme (h)	Uzorak / pH			
	kontrola	list 1,5 %	list 3 %	list 5 %
0	6,64	6,63	6,64	6,73
1	6,56	6,55	6,52	6,60
2	6,25	6,23	6,12	6,19
3	5,42	5,17	5,09	5,22
3,5	/	4,80	4,88	5,00
<b>4</b>	4,91	4,78	<b>4,64 (kraj)</b>	4,79
<b>4,5/4,36</b>	4,73	<b>4,63 (kraj)</b>	/	<b>4,61 (kraj)</b>
<b>4,6</b>	<b>4,64 (kraj)</b>	/	/	/

Navedeni rezultati konzistentni su s rezultatima prethodno objavljenih istraživanja (Kwon i sur., 2019; Georgakouli i sur., 2016) koji su pokazali da dodatak biljnih ekstrakata (lišće masline, chia sjemenke) značajno povećava broj bakterija mliječne kiseline tijekom fermentacije jogurta što rezultira većom proizvodnjom laktata i ubrzanim padom pH odnosno pozitivno utječe na proces fermentacije jer se skraćuje potrebno vrijeme. U radu Marhamatizadeh i sur. (2013) također je uočena pozitivna korelacija između povećane kiselosti i povećane koncentracije ekstrakta lista masline. S obzirom da veći udio ekstrakta povećava brzinu rasta bakterija tijekom fermentacije željena se kiselost (pH=4,6) postigla u kraćem vremenu.

Na slici 19 prikazana je promjena aktivne kiselosti (pH) i titracijske kiselosti za sve uzorke s obzirom na dane čuvanja. Vidljivo je da se za sve uzorke najveći pad pH vrijednosti postignuo između 1. i 14. dana čuvanja, a nakon toga pH je počeo blago rasti. Najvišu pH vrijednost do 14. dana čuvanja imao je kontrolni uzorak, a dalje su uzorci s dodatkom 1,5 i 3 % ekstrakta lista masline imali veću vrijednost. pH vrijednost se na kraju kretala između 4,22 i 4,32, dok je na početku bila između 4,53 i 4,35. Razlog opadanja pH i tijekom vremena skladištenja vjerojatno je bio preostala aktivnost jogurtne kulture koja je i dalje provodila svoje metaboličke aktivnosti u kojima laktoza prelazi u mliječnu kiselinu. Međutim, s obzirom na uvjete čuvanja pri niskoj temperaturi taj proces je bio usporen odnosno nije se odvijao u satima nego u danima. Nakon 14 dana čuvanja pH vrijednost ponovno je počela

blago rasti i pH se dodatno nije smanjivao jer bi daljnjom pretvorbom laktoze u mliječnu kiselinu jogurtna kultura počela inhibirati svoj rast budući da je 2 % mliječne kiseline maksimalna koncentracija koju ove bakterije mogu podnijeti, i to uglavnom laktobacili. Veća količina ih ubija bez obzira što ju same proizvode.



Slika 19. Promjena pH vrijednosti i titracijske kiseline (% mliječne kiseline) u proizvedenim uzorcima jogurta (Kontrola, List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

Slično ponašanje u pogledu sniženja pH i povećanja kislosti uzoraka tijekom skladištenja pokazano je u istraživanjima Tavakoli i sur. (2018) te Zoidou i sur. (2017). U navedenim je radovima pH kontrole padao od 4,45 tj. 4,42 do 4,24 tj. 4,19 na kraju čuvanja, što je vrlo slično rezultatima ovog istraživanja u kojem su vrijednosti iznosile između 4,53 i 4,20. Međutim, vrijednosti za jogurt s dodatkom fenola lista masline nisu se u navedenim istraživanjima razlikovale od kontrole što je suprotno rezultatima ovog diplomskog rada kod kojih je vidljiva razlika između kontrole i jogurta s ekstraktom te potonji ima niži pH na početku. U radu Zoidou i sur. (2017) čak su uočene veće vrijednosti za jogurt s ekstraktom i to tijekom cijelog perioda čuvanja.

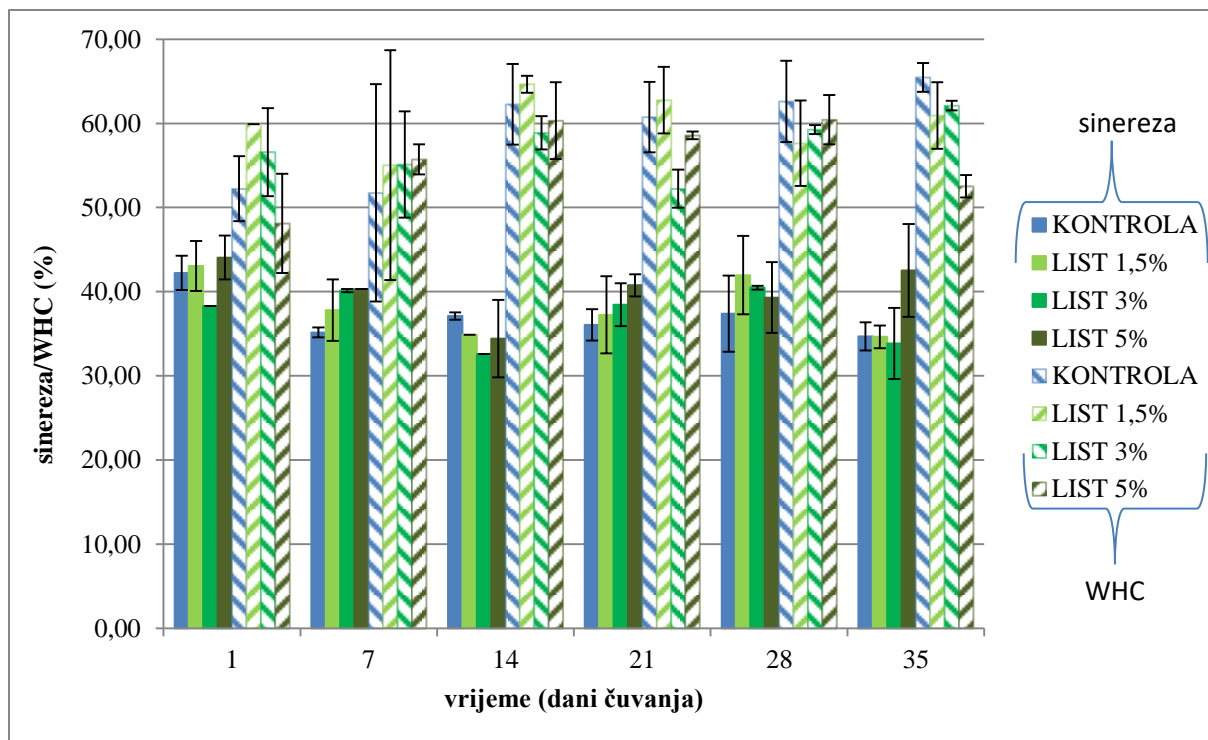
Titracijska je kislost izražena kao udio mliječne kiseline (%) te je iz slike19 vidljivo da su se vrijednosti kretale između 1,5 i 2 % tijekom cijelog perioda čuvanja za sve uzorke, dok je u

istraživanju Tavakoli i sur. (2018) udio mliječne kiseline bio je puno manji (0,97-1,07 % za kontrolu te 0,89-1,08 % za obogaćen jogurt). Za uzorke s dodatkom 3 i 5 % ekstrakta (list 3 %, list 5 %) udio mliječne kiseline blago je rastao, dok je za kontrolu i uzorak s 1,5 % ekstrakta (list 1,5 %) vidljivo da se izmjenjivao rast i pad kiselosti. Uzorci list 1,5 i 5 % uglavnom su imali veće udjele mliječne kiseline od kontrole, osim pred kraj čuvanja, dok je uzorak list 3 % imao malo manje vrijednosti od kontrole. Tijekom zadnjih tjedan dana čuvanja na slici je jako dobro vidljivo kako je porast pH neposredno pratio sniženje udjela mliječne kiseline i to je vrijedilo za sve uzorke.

#### 4.3. ODREĐIVANJE SINEREZE I KAPACITETA ZADRŽAVANJA VODE

Sinereza je izdvajanje sirutke iz strukture gela nastalog tijekom procesa fermentacije na površini krutog fermentiranog mliječnog proizvoda, dok je kapacitet zadržavanja vode pokazatelj sposobnosti zadržavanja seruma u strukturi gela jogurta tijekom primjene sile, tlaka, centrifugiranja ili zagrijavanja te igra glavnu ulogu u stvaranju teksture hrane. Do sinereze dolazi zbog stezanja gela (modifikacije 3D mreže proteina kazeina) nastalog tijekom fermentacije odnosno zbog gubitka njegove sposobnosti da zadrži cijelu serumsku fazu (Zoidou i sur., 2017). Slika 20 prikazuje dobivene vrijednosti za ova dva fizikalna svojstva jogurta tijekom hladnog skladištenja uzoraka.

Rezultati za sinerezu pokazuju da je ona tijekom cijelog perioda skladištenja bila veća kod uzoraka s ekstraktom nego kod kontrole, što je najviše izraženo u uzorku s 5 % ekstrakta. Iznimku opisanog ponašanja pokazali su svi uzorci s dodatkom ekstrakta 14. dana čuvanja kada su im vrijednosti bile manje od kontrole te uzorak list 3 % prvog i posljednjeg dana čuvanja. Najviše se sirutke izdvojilo u uzorku list 5 %, osim kod 14. (kontrola) i 28. dana čuvanja (list 1,5 %), a najviša je vrijednost zabilježena 1. dan čuvanja i iznosila je 44,06 %. S druge strane, najmanje se sirutke izdvojilo u uzorku list 3 % za 1., 14. i 35. dan čuvanja te u kontrolnom uzorku za 7., 21. i 28. dan čuvanja, pri čemu najmanja vrijednost iznosi 32,60 % i postignuta je u uzorku list 3 % 14. dana čuvanja. Prvi, drugi i četvrti tjedan čuvanja karakterizirao je rast vrijednosti za sinerezu od kontrole prema uzorku list 5 %. Ostale tjedne čuvanja uglavnom je karakterizirao pad vrijednosti, uz pojedine izuzetke.



Slika 20. Prosječne vrijednosti (%) sinereze i kapaciteta zadržavanja vode (WHC) uzoraka jogurta bez (Kontrola) i s dodatkom ekstrakta lista masline (List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

Gledajući za svaki uzorak posebno tijekom vremena čuvanja, vrijednosti za sinerezu su padale. Izuzetak su predstavljali 14. i 28. dan čuvanja za kontrolu, 21. i 28. dan čuvanja za uzorke list 1,5 i 3 %, dok se kod potonjeg rast javio i u 7. danu čuvanja (taj je uzorak tada bio jako rijedak kao što je opisano u raspravi za senzorsku analizu) te 21. i 35. dan čuvanja za list 5 %. Uglavnom se povećanje uočilo pred kraj skladištenja uzoraka što je uobičajena pojava. Kontrolni uzorak i uzorak list 1,5 % najvišu su vrijednost postigli prvog dana čuvanja, a najnižu zadnjeg dana, dok su uzorci list 3 i 5 % najnižu vrijednost postigli u 14. danu čuvanja. List 5 % najvišu je vrijednost također postigao prvog dana čuvanja, a jedina je iznimka uzorak list 3 % koji je najvišu vrijednost postigao 28. dana čuvanja. Vrijednosti za sinerezu bile su manje od 50 %, ali su i dalje ostale dosta visoke (30-45 %). U istraživanju Zoidou i sur. (2017) izdvajanje sirutke tijekom vremena je čuvanja raslo za kontrolu i obogaćen jogurt, ali se ipak više sirutke odvojilo za obogaćen jogurt kao i u ovom diplomskom radu. Porast sinereze s većom koncentracijom ekstrakta objašnjavao se porastom količine aktivne vode i redukcijom kapaciteta zadržavanja vode. Suprotno tomu, vrijednosti za sinerezu kod jogurta s dodatkom ekstrakta chia sjemenki u radu Kwon i sur. (2019) bile su značajno manje nego kod kontrole. Također, u istraživanju Tavakoli i sur. (2018) te Zhang i sur. (2018a) dokazano je da

je sinereza manja za uzorke jogurta obogaćene fenolima lista masline odnosno ekstraktom lista moringe, naspram kontrole. To smanjenje sinereze pripisali su interakcijama između fenola ekstrakta lista masline/moringe i proteina u jogurtu pri čemu se stvara proteinska mreža s manjim porama i većom sposobnošću vezanja vode, a pri niskom pH disocijacija proteina stvara i više mjesta vezanja. Nadalje, u radu Tavakoli i sur. (2018) utvrđeno je kako su pojava sinereze te njezin intenzitet konstantno padali tijekom perioda čuvanja od 21 dana, što je u suprotnosti s utvrđenom činjenicom kako pad pH tijekom čuvanja povećava sinerezu.

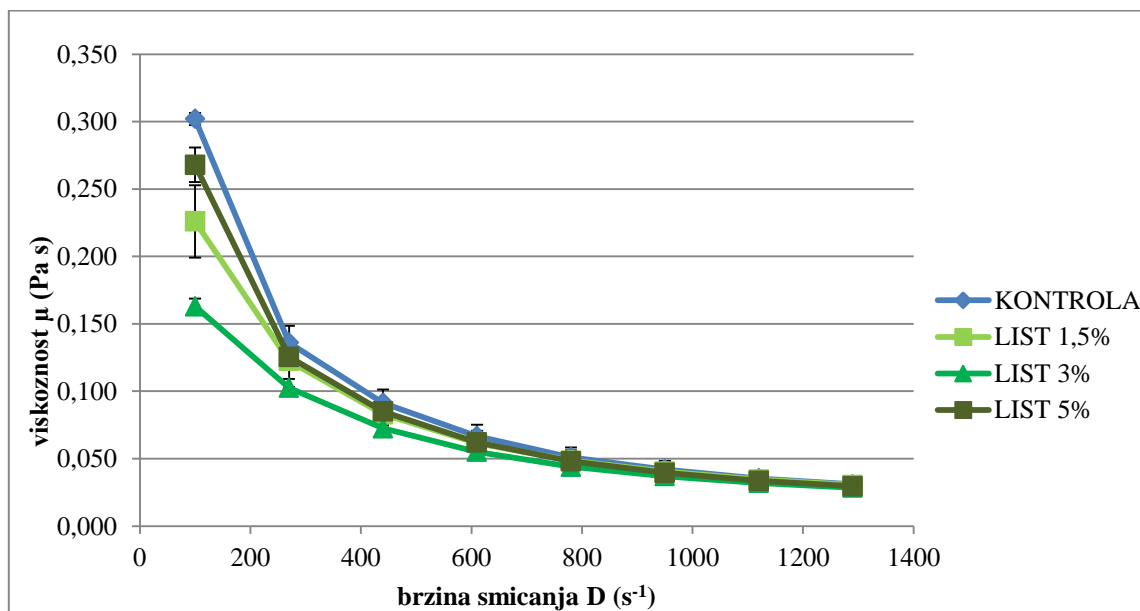
Kapacitet zadržavanja vode u cijelom je periodu čuvanja uglavnom pokazao suprotan trend od vrijednosti za sinerezu odnosno kod uzoraka s ekstraktom bio je manji od kontrole. Iznimke su se mogle uočiti posebice za uzorak list 1,5 % koji je sve do posljednja dva tjedna čuvanja imao veće vrijednosti nego kontrola. Također, svi su uzorci 7. dana čuvanja pokazali veći kapacitet zadržavanja vode u usporedbi s kontrolnim uzorkom, a uzorak list 3 % veću je vrijednost pokazao i prvog dana čuvanja. Iz slike je vidljivo da je najveću vrijednost imao uzorak list 1,5 %, osim u 7. danu čuvanja kada je neznatnije veću vrijednost imao uzorak list 5 %, i u zadnja dva tjedna čuvanja kada je kontrolni uzorak imao veće vrijednosti. Uzorci kontrola i list 3 % pokazali su sličan trend: prva dva tjedna vrijednosti su bile približno konstantne te je nakon toga usijedio rast 14. dana čuvanja. Kontrola je naredne tjedne poprimila otprilike konstantnu vrijednost, dok se kod uzorka list 3 % izmjenjivao pad i rast vrijednosti. Posljednji tjedan čuvanja za oba uzorka vrijednosti su blago porasle. Kod uzorka list 1,5 % stalno se izmjenjivao pad i rast vrijednosti, osim 14. i 21. dana čuvanja kada je postignuta približno jednaka i najveća vrijednost koja je bila 64,65 %. Kod uzorka list 5 % na početku je, a do 14. dana čuvanja, bio vidljiv rast kapaciteta zadržavanja vode pri čemu je parametar poprimio približno konstantnu vrijednost koja je zadnji tjedan drastično pala. Najveću izmjerenu vrijednost kapaciteta zadržavanja vode (65,46 %) imala je kontrola 35. dan čuvanja, dok je najmanju vrijednost (48,13 %) imao uzorak list 5 % 1. dan čuvanja. Najviša vrijednost utvrđena za WHC jogurta s dodatkom 0,1 % vodenog ekstrakta chia sjemenki bila je malo viša nego u ovom istraživanju i iznosila je 69,6 % (Kwon i sur., 2019). Usporedivši najviše zabilježene vrijednosti svih uzoraka, kontrola je imala najveći kapacitet zadržavanja vode, zatim uzorak list 1,5 % pa 3 % i na kraju 5 %. Gledajući po tjednima čuvanja uočio se pad vrijednosti za kapacitet zadržavanja vode, počevši od uzorka list 1,5 % nastavljajući s kontrolom i uzorkom list 5 % pa sve do uzorka list 3 %, uz iznimku 1. dan čuvanja kada je najmanju vrijednost imao uzorak list 5 % te zadnji dan kada je najveću vrijednost imala kontrola pa list 3 % te je slijedio list 1,5 % i na kraju list 5 %. Osim toga, 7. i

28. dan čuvanja moglo se primijetiti da su vrijednosti rasle od kontrole prema povećanju udjela ekstrakta tj. za 28. dan od list 1,5 % prema povećanju udjela ekstrakta do kontrole kao najboljeg uzorka. Vrijednosti za kapacitet zadržavanja vode kretale su se između 50 i 65 %. U istraživanju Zoidou i sur. (2017) vrijednosti za WHC bile su manje i kretale su se u rasponu 42-49 %. Tijekom čuvanja od 21 dana uočen je pad vrijednosti (najniža 14. dana čuvanja) osim u zadnjem tjednu kada malo raste. Međutim, kako su za obogaćen jogurt zabilježene neznatno veće tj. gotovo iste vrijednosti kao kod kontrole, u tom istraživanju nije vidljiv utjecaj ekstrakta. U radu Kwon i sur. (2019) WHC se značajno povećao u jogurtu s ekstraktom chia sjemenki, kao i kod uzorka list 1,5 % u ovom diplomskom radu.

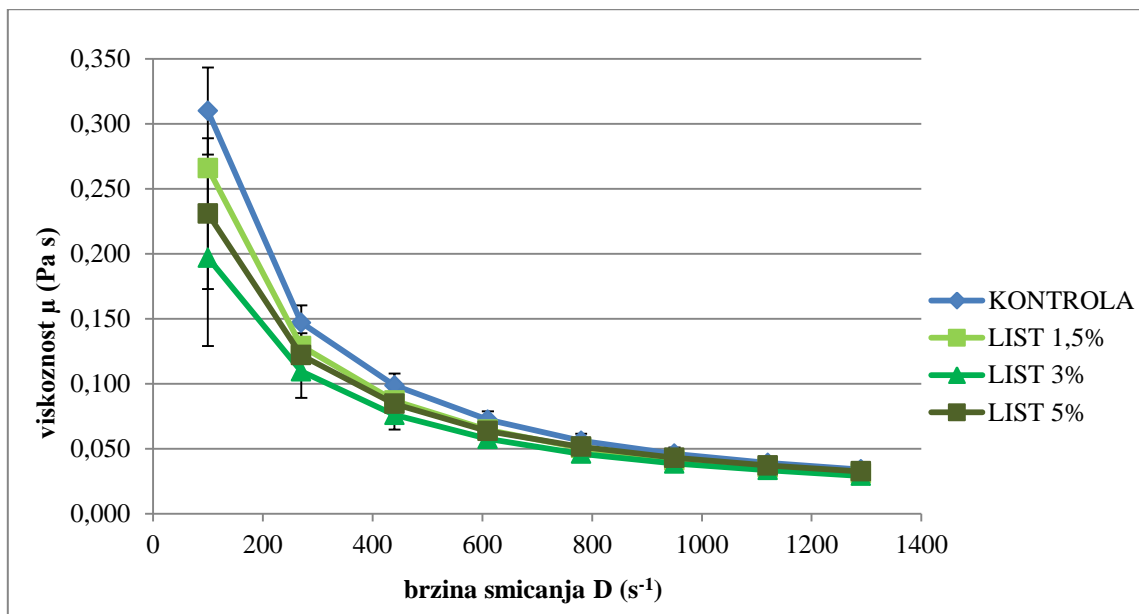
#### 4.4. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH KARAKTERISTIKA

Od reoloških parametara u uzorcima je određivana viskoznost, fizikalna veličina koja opisuje otpor tekućine prema tečenju. Što je tekućina pokretljivija odnosno što su međumolekularne sile kojima se molekule tekućine međusobno privlače i time opiru smicanju susjednih slojeva slabije, to joj je viskoznost manja. Slika 21 a-f pokazuje da se viskoznost svih uzoraka smanjivala s povećanjem brzine smicanja.

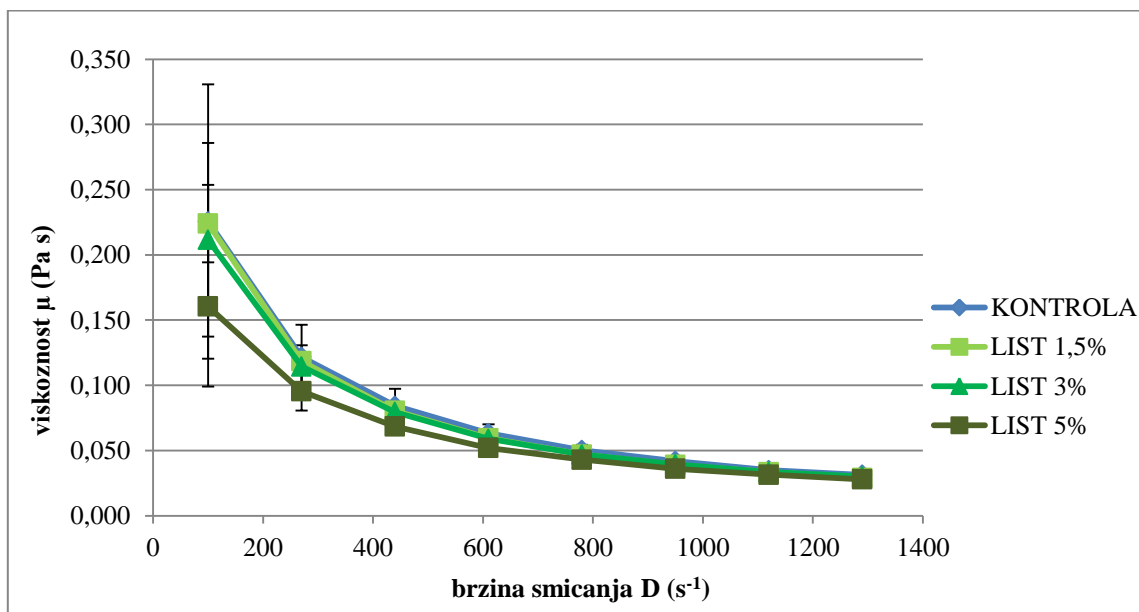
a)



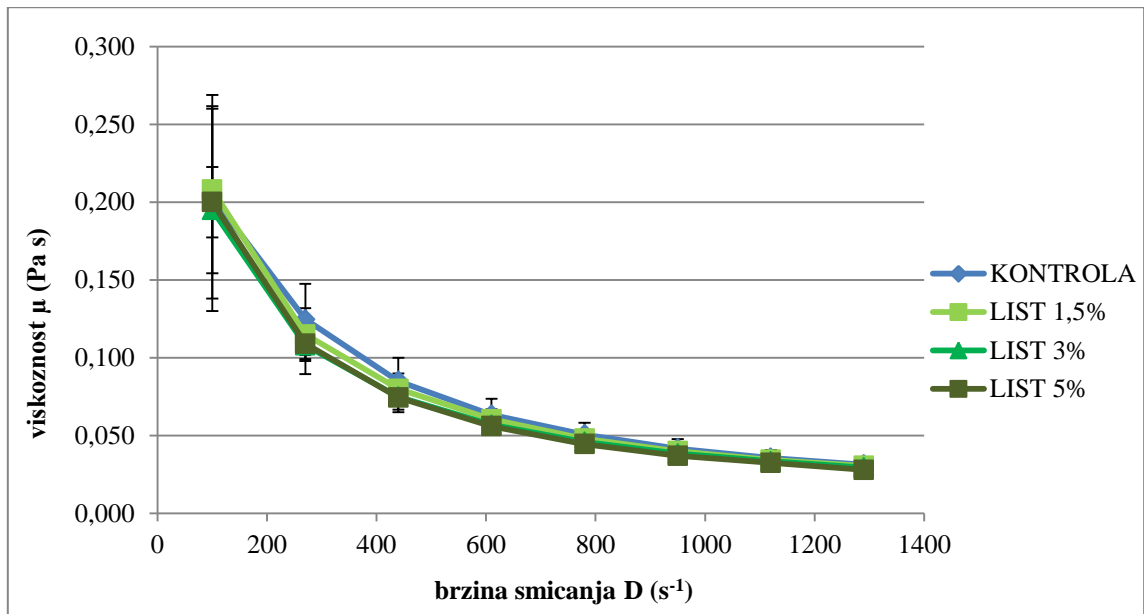
b)



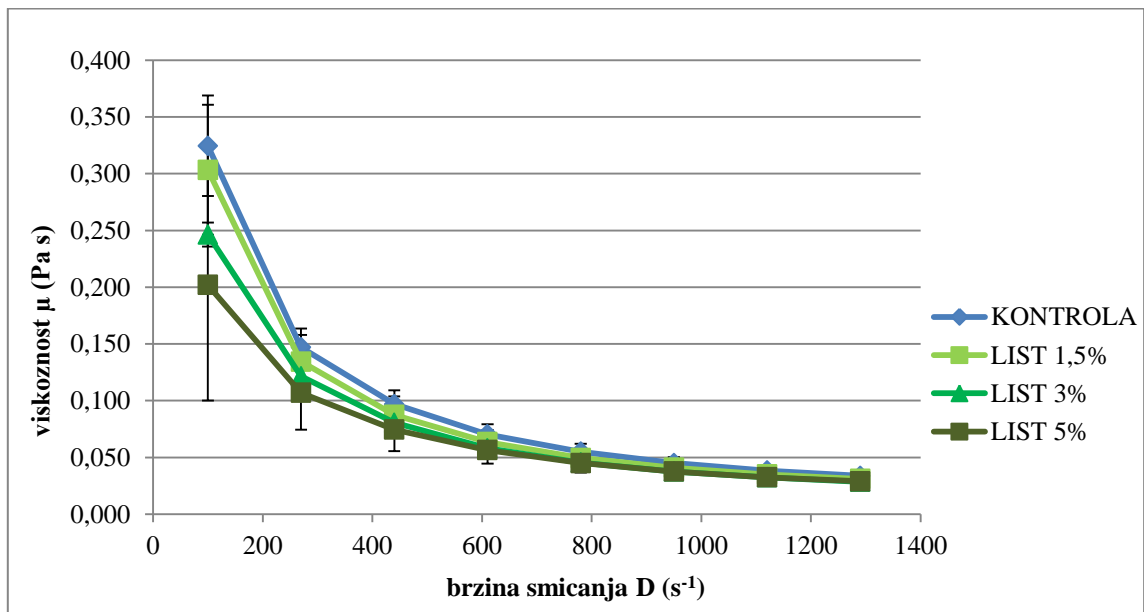
c)



d)

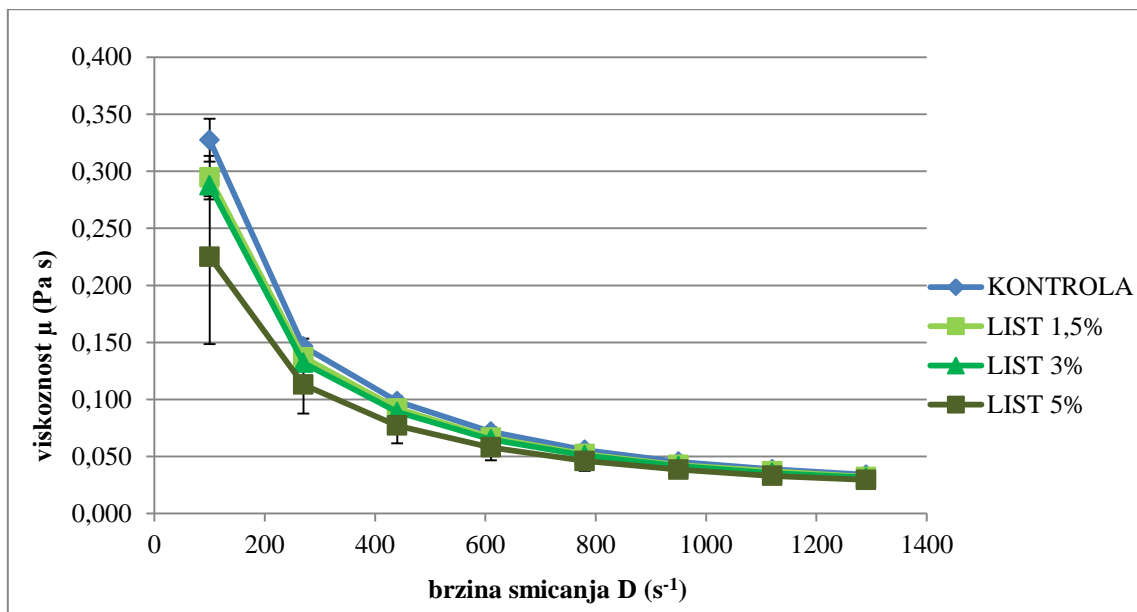


e)





f)



Slika 21. Promjena viskoznosti ( $\mu$ , Pa s) uzoraka jogurta bez (Kontrola) i s dodatkom ekstrakta lista masline (list 1,5 %, list 3 %, list 5 %) obzirom na brzinu smicanja ( $D$ , s<sup>-1</sup>) nakon 1 (a), 7 (b), 14 (c), 21 (d), 28 (e) i 35 (f) dana hladnog čuvanja ( $n=2$ )

Na početku, s prelaska brzine smicanja od 100 na 270 s<sup>-1</sup>, pad viskoznosti bio je nagli, nakon čega je uslijedio blagi pad vrijednosti. To je vjerojatno bio rezultat smicanja različitih slojeva polutekućeg uzorka jogurta pri čemu je povećanje brzine uzrokovalo slabljenje sila odgovornih za njihovo povezivanje. Viskoznost se, od brzine smicanja 780 do 1290 s<sup>-1</sup> za sve uzorke i dane čuvanja, kretala oko istih vrijednosti. Ukupno gledano, tijekom cijelog perioda čuvanja, najveću viskoznost imao je kontrolni uzorak te se ona dalje smanjivala kako je rastao udio ekstrakta odnosno od uzorka list 1,5 % prema 3 % i na kraju 5 %. Iznimku su tu predstavljali 1. dan čuvanja kada je uzorak s 5 % ekstrakta postigao veću vrijednost nego uzorak list 1,5 %, te 7. i 21. dan čuvanja kada je također uzorak list 5 % imao veću vrijednost nego uzorak list 3 %. Dakle, rezultati pokazuju da se povećanjem udjela ekstrakta viskoznost smanjuje. Sličan je trend uočen u radu El-Said i sur. (2014) pri čemu je korišten ekstrakt kore šipka. Takav rezultat objašnjen je povećanim svojstvom proteina za vezanja vode. Tijekom perioda čuvanja vrijednosti za viskoznost uzoraka uglavnom su rasle. Iznimku su predstavljali 14. i 21. dan čuvanja kada su svi uzorci postigli najniže vrijednosti. Također, u radu Zoidou i sur. (2017) viskoznost je rasla po danima čuvanja, ali su vrijednosti s ekstraktom lista masline kroz cijeli period čuvanja bile veće (0,380-0,460) od kontrole (0,360-0,420). Isto tako, Kwon i sur. (2019) dokazali su da je viskoznost jogurta s dodatkom 0,1 % ekstrakta chia sjemenki

značajno bila veća od kontrolnog uzorka. Povećanje viskoznosti u obogaćenom jogurtu objašnjeno je kao pojava stvaranja kompleksa između proteina jogurta i fenola lista masline/chia sjemenki, koji posjeduju značajan afinitet prema proteinima. Taj pozitivni efekt također ovisi o udjelu ukupne suhe tvari te količini, tipu i svojstvima proteina. Najveća vrijednost tijekom cijelog perioda čuvanja izmjerena je u kontroli posljednjeg dana čuvanja i iznosila je 0,327 Pa s, dok je najmanja vrijednost izmjerena za uzorak list 5 % 14. dana čuvanja i iznosila je 0,161 Pa s.

#### 4.5. ODREĐIVANJE BOJE

Boja je važan pokazatelj kvalitete proizvoda i vrlo je važna za prihvatljivost potrošača. Karakteristična boja jogurta potiče od boje mlijeka. Dodani ekstrakt lista masline ne bi trebao značajno utjecati na boju jogurta. Međutim, njegova količina utječe na količinu sastojaka koji ulaze u sastav konačnog proizvoda te veća količina ekstrakta znači više pigmenata lišća, a posljedično jogurt poprima zelenkasto-žutu boju.

Kromatske su karakteristike u uzorcima određene spektrofotometrijski prema CIElab sustavu (OIV 2014). Svjetlina je definirana vrijednostima  $L^*$  koje variraju između potpuno crne (0 %) i potpuno bijele (100 %). Vrijednosti kromatskih koordinata  $a^*$  i  $b^*$  variraju između  $-a^*$  (zelene) i  $+a^*$  (crvene) odnosno između  $-b^*$  (plavo) i  $+b^*$  (žuto). Na temelju izmjerenih transmitancija analiziranih uzoraka dobivene su kromatske karakteristike iz kojih se, prema izrazu [5] navedenom u poglavlju 3.5.5., izračunala vrijednost  $\Delta E^*$  koja pokazuje (ne)postojanje razlike između kontrole i ispitivanih uzoraka.

Tablica 7. Razlika između izmjerenih vrijednosti za kromatske karakteristike ispitivanih uzoraka (list 1,5 %, list 3 %, list 5 %) u odnosu na kontrolni uzorak izraženih kao vrijednost

$$\Delta E^*$$

dani čuvanja	$\Delta E^*$		
	LIST 1,5 %	LIST 3 %	LIST 5 %
1	2,11	4,71	8,49
7	2,39	3,95	8,56
14	1,99	4,23	7,13
21	2,89	4,86	8,23

28	3,87	3,86	8,07
35	3,03	5,65	8,20

S obzirom na te vrijednosti koje prikazuje tablica 7, kod uzorka s dodatkom 1,5 % ekstrakta do 28. dana čuvanja postojala je samo primjetna razlika u odnosu na kontrolu, a zadnja dva tjedna čuvanja razlika je postala značajna. Tijekom cijelog perioda čuvanja uzorak list 3 % se, u odnosu na kontrolu, a prema  $\Delta E^*$  vrijednostima, značajno razlikovao, dok je uzorak list 5 % imao veliku razliku prema kontroli.

Dobiveni rezultati ukazuju kako bi dodatak 1,5 % (v/v) ekstrakta lista masline bio optimalan te ne bi izazvao neprihvatljivu razliku u boji jogurta. Međutim, uzorci se vidljivo nisu razlikovali značajno, a to je ono što i potrošač iz svoje pozicije vidi pa je, gledajući iz te perspektive, prihvatljiv čak i dodatak 5 % ekstrakta u jogurt. Slični trendovi mogu se razaznati i iz rezultata senzorske analize uzoraka u nastavku.

#### 4.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U uzorcima jogurta na kraju fermentacije i tijekom perioda čuvanja od 35 dana, svaki se tjedan određivao broj poraslih bakterija roda *Lactobacillus* sp. na MRS hranjivoj podlozi te broj bakterija roda *Streptococcus* sp. na M-17 hranjivom agaru. Tablice 8 i 9 prikazuju dobivene vrijednosti broja bakterija izražene kao  $\log_{10}$  (CFU mL<sup>-1</sup>).

Za bakterije roda *Lactobacillus* sp. rezultati su pokazali konstantan pad broja u svim uzorcima tijekom perioda čuvanja. Taj je pad za kontrolni uzorak na početku bio nešto blaži, tijekom sredine perioda čuvanja bio je izraženiji te se ponovno blago spuštao pri kraju. Isto je vrijedilo i za uzorak list 1,5 %, dok je kod uzorka list 3 % nagli pad bio zamijećen na početku perioda čuvanja, a dalje se pad nastavio blago do kraja. Za uzorak list 5 % moguće je primijetiti da su se vrijednosti broja kolonija razlikovale od svih drugih uzoraka sve do 21. dana čuvanja i bile su najniže (na početku 7,65, a kod ostalih uzoraka 9,18-9,98), a općenito je bio zamjetan trend kontinuiranog blagog pada broja bakterija. Takvi rezultati mogli bi biti posljedica djelovanja količine određenih komponenata ekstrakta kao inhibitora za rast mikroorganizama budući da mnogi spojevi u listu masline, kao što je objašnjeno u poglavlju 2.3., posjeduju antimikrobna svojstva. Međutim, pad broja mikroorganizama može se pripisati i izloženosti termofilnih

bakterija nepovoljnim uvjetima odnosno niskoj temperaturi čuvanja jogurta koja nije optimalna za njihov rast. Nadalje, smanjenje se pH nastavlja i nakon završene fermentacije u fazi skladištenja pa je značajan inhibitorni učinak mliječne kiseline koju su bakterijske kulture same proizvele metaboličkim reakcijama (Marhamatizadeh i sur., 2013). Iznimku tog uočenog fenomena pada predstavljali su jedino rezultati za 14. dan čuvanja za kontrolu i uzorak list 3 %, 28. dan čuvanja za uzorak list 1,5 % i 21. dan čuvanja za uzorak list 5 %.

Tablica 8. Broj bakterijskih kolonija roda *Lactobacillus* sp. poraslih na MRS hranjivoj podlozi izražen kao  $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>, u uzorcima jogurta bez (Kontrola) i s dodatkom ekstrakta lista masline (List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

dani čuvanja	$\log_{10}$ CFU mL <sup>-1</sup>			
	KONTROLA	LIST 1,5 %	LIST 3 %	LIST 5 %
1	9,98±1,11	9,68±0,39	9,18±2,40	7,65±4,53
7	9,11±0,48	9,05±0,04	6,73±1,98	6,97±2,63
14	9,55±0,56	7,22±3,09	7,28±3,16	6,85±2,46
21	7,01±2,70	7,09±2,74	7,18±2,97	7,22±2,20
28	6,07±1,76	8,50±2,71	7,17±2,11	5,99±1,21
35	5,48±0,62	5,63±0,79	5,26±0,75	5,08±0,00

Ono što je također iz tablice zamjetno je da je broj mikroorganizama bio najveći u kontrolnom uzorku te je padao redom od uzorka list 1,5 % pa 3 % do uzorka s dodatkom 5 % ekstrakta. Takvi rezultati ukazuju da količina dodanog ekstrakta ima određeni utjecaj na rast bakterija odnosno količina dodanog ekstrakta i broj poraslih bakterija obrnuto su proporcionalni te se nameće pretpostavka kako list masline sadrži tvari koje djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama. I u ovom slučaju su utvrđene iznimke, i to su bili 7. dan čuvanja kada je uzorak list 3 % imao nešto nižu vrijednost od 5 %, 35. dan čuvanja kada je uzorak list 1,5 % imao malo više vrijednost od kontrole te 21. i 28. dan čuvanja kada je kontrolni uzorak imao najnižu izmjerenu vrijednost od svih uzoraka s dodatkom ekstrakta.

Kod bakterija roda *Streptococcus* sp. mogla se uočiti slična pojava. Broj bakterija neznatno se smanjivao tijekom perioda čuvanja za sve uzorke. Broj bakterija roda *Streptococcus* sp. bio je u uzorcima puno veći nego *Lactobacillus* sp., za uzorak list 5 % to je vrijedilo od početka perioda čuvanja, za uzorak list 3 % od 7. dana čuvanja, za uzorak list 1,5 % od 14. dana

čuvanja i za kontrolu od 21. dana čuvanja – po tjedan dana kasnije za svaki od uzoraka s obzirom na količinu ekstrakta koji sadrži. Broj laktobacila spuštao se s 9,98 na 5,08, dok se broj streptokoka spuštao s 10,57 na 8,89. S obzirom na to može se zaključiti da je rod *Lactobacillus* sp. puno osjetljiviji na uvjete niske temperature i na djelovanje količine prisutnog ekstrakta. Iznimke od pada broja kolonija javile su se u 14., 21. i 35. danu čuvanja za kontrolu, u 21. i 28. danu za list 1,5 %, te u 14. i 28. danu čuvanja za uzorak list 5 %. Također je uočeno da količina ekstrakta djeluje na inhibiciju rasta bakterija te što je udio bio veći, broj bakterija bio je manji. Iznimku su predstavljali 1., 7. i 28. dan čuvanja za uzorak s dodatkom 1,5 % ekstrakta u kojem je broj bakterija bio veći od onog za kontrolu, 14. i 35. dan za list 3 % kod kojeg je vrijednost bila malo viša nego za list 1,5 % te 28. dan čuvanja kada je vrijednost za list 5 % bila malo viša od one za list 3 %.

Tablica 9. Broj bakterijskih kolonija roda *Streptococcus* sp. poraslih na M-17 hranjivom agaru izražen kao  $\log_{10}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ , u uzorcima jogurta bez (Kontrola) i s dodatkom ekstrakta lista masline (List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

dani čuvanja	$\log_{10}$ CFU $\text{mL}^{-1}$			
	KONTROLA	LIST 1,5 %	LIST 3 %	LIST 5 %
1	9,80±0,88	10,57±1,08	10,27±1,07	9,17±0,00
7	9,46±0,65	10,47±1,08	9,97±1,16	8,97±0,34
14	9,80±0,98	9,09±0,15	9,55±0,05	9,36±0,01
21	10,48±2,25	9,33±0,53	9,05±0,14	9,02±0,26
28	8,96±0,25	9,81±1,09	9,04±0,00	9,21±0,43
35	9,42±0,58	8,89±0,24	8,96±0,26	8,92±0,00

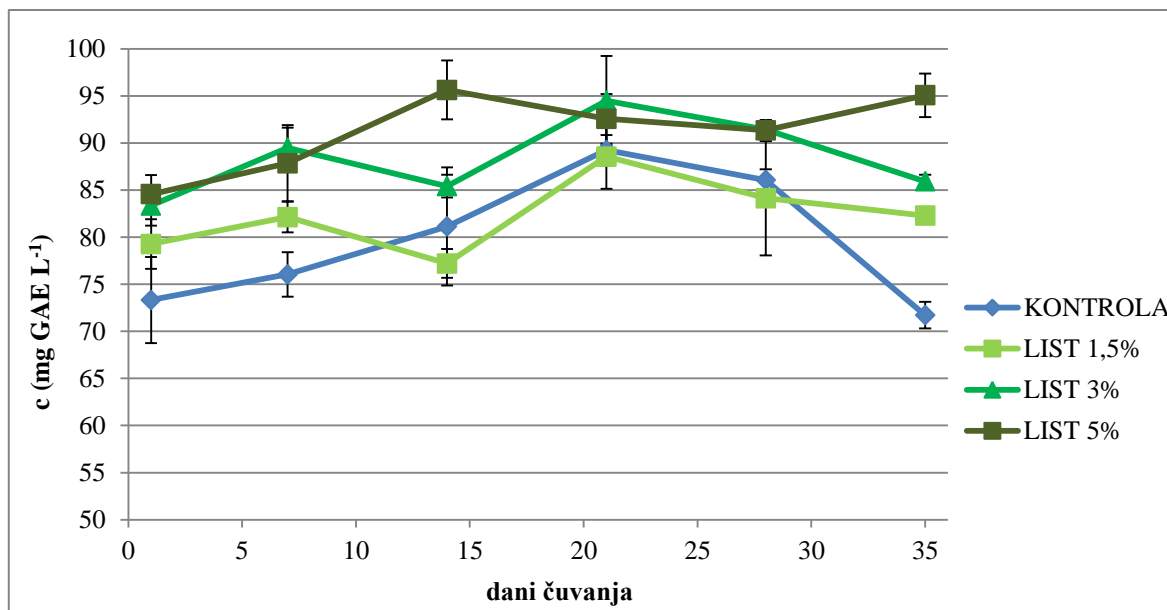
U istraživanju Zoidou i sur.(2017) također je utvrđen blagi pad broja bakterija jogurtne kulture za kontrolni uzorak i uzorak jogurta obogaćen ekstraktom lista masline tijekom perioda čuvanja od 21 dan. Suprotno tomu, u istraživanju Kwon i sur. (2019) te Georgakouli i sur. (2016) dokazano je kako dodatak 1,4 % vodenog ekstrakta chia sjemenki odnosno inkapsuliranih fenola masline poboljšava stabilnost, rast i preživljavanje jogurtne kulture tijekom istog perioda čuvanja. Zoidou i sur. (2017) također su utvrdili veći broj streptokoka nego laktobacila u svim uzorcima tijekom cijelog perioda čuvanja, a zabilježene vrijednosti bile su manje nego u ovom diplomskom radu i iznosile su 8,33-8,89 za rod *Streptococcus* i 6,98-7,44 za rod *Lactobacillus*. Za rod *Lactobacillus* veći je broj bakterija bio utvrđen u

kontroli te je primjetan utjecaj dodatka ekstrakta kao u ovom radu, dok je kod roda *Streptococcus* veći broj bakterija bio zamijećen u obogaćenom jogurtu.

#### 4.7. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

U uzorcima proizvedenog ekstrakta kao i u uzorcima jogurta odredila se koncentracija ukupnih fenola metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa (Shortle i sur., 2014). Tijekom spektrofotometrijskog mjerenja intenziteta nastalog plavog obojenja na 760 nm dobile su se apsorbancije iz kojih su se, pomoću jednadžbe baždarnog pravca (slika 16), izračunale koncentracije, a konačni rezultati iskazali su se kao mg ekvivalenata galne kiseline (mg GAE L<sup>-1</sup>) koja predstavlja standard za mjerenje ukupnih fenola.

Navedenom metodom određeno je da je količina ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu iznosila 990,71 mg GAE L<sup>-1</sup>, što potvrđuje da je list masline odličan prirodni izvor fenola. Rezultati prikazani na slici 22 u skladu su s prethodno navedenim tj. veća količina dodanog ekstrakta povećava udio fenolnih spojeva u uzorku. Tako je uzorak s 5 % dodanog ekstrakta imao najveću koncentraciju ukupnih fenola tijekom cijelog perioda čuvanja te je najveća vrijednost iznosila 95,64 mg GAE L<sup>-1</sup> postignuta tijekom 14. dana čuvanja. Slijedili su ga uzorci jogurta s dodatkom 3 i 1,5 % ekstrakta, dok je najmanja koncentracija ukupnih fenola bila zabilježena u kontrolnom uzorku i iznosila je 71,71 mg GAE L<sup>-1</sup>, a postignula se 35. dana čuvanja. Iznimke su se javile u 7., 21. i 28. danu čuvanja kada su vrijednosti za uzorak s dodatkom 3 i 5 % ekstrakta bile približno jednake te u 14. i 28. danu čuvanja kada je vrijednost za uzorak s 1,5 % ekstrakta bila manja od one za kontrolni uzorak. Tijekom cijelog vremena čuvanja uzoraka u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C, koncentracija ukupnih fenola nije se mijenjala pretjerano odnosno nije došlo do njihove degradacije jer su bili smješteni na hladnom i tamnom, zaštićeni od direktne svjetlosti. Njihove su se vrijednosti kretale u koncentracijama između 70 i 100 mg GAE L<sup>-1</sup> za sve uzorke.



Slika 22. Koncentracija ukupnih fenola ( $c$ ) izražena u mg ekvivalenata galne kiseline (mg GAE L<sup>-1</sup>) u analiziranim uzorcima jogurta (kontrola, List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

Oh i sur. (2016) za jogurt bez dodatka ekstrakta tijekom perioda čuvanja od 28 dana izmjerili su vrijednosti ukupnih fenola između 50 i 60 mg GAE L<sup>-1</sup>, koje su nešto niže nego u ovom diplomskom radu (70-90 mg GAE L<sup>-1</sup>). Također, vrijednosti za jogurt s dodatkom ekstrakta lista bijele murve kretale su se između 90 i 100 mg GAE L<sup>-1</sup> što je ovdje usporedivo s vrijednosti za uzorak list 5 %. Vrijednosti za jogurt s dodatkom ekstrakta lista kineskog duda bile su više nego izmjerene u ovom radu i iznosile su 105-120 mg GAE L<sup>-1</sup>. U radu Kwon i sur. (2019) utvrđene su vrijednosti za kontrolni uzorak i uzorak jogurta s dodatkom 0,1 % ekstrakta chia sjemenki bile dosta manje nego u ovom diplomskom radu te su bile međusobno vrlo bliske, a iznosile su 49 mg GAE L<sup>-1</sup> odnosno 57 mg GAE L<sup>-1</sup>.

Usporedbom uzoraka s dodatkom ekstrakta lista masline i običnog jogurta (kontrola) nije uočena bitna razlika u količini ukupnih fenola. Slično je dokazano u istraživanju Oh i sur. (2016) koji su određivali udio ukupnih fenolnih spojeva u jogurtima s dodatkom ekstrakta lista kineskog duda i bijele murve te su se kontrola i obogaćeni jogurt samo razlikovali po udjelu pojedinih fenolnih komponenata. Mlijeko nije prirodni, endogeni izvor fenolnih spojeva, iako se u njemu oni mogu detektirati u određenoj koncentraciji (u istraživanju Vázquez i sur. (2015) 49 mg GAE L<sup>-1</sup>). Podrijetlo fenolnih spojeva u kravljem mlijeku objasnili su u svom radu Chávez-Servín i sur. (2018). Način ishrane od iznimne je važnosti za

sastav, kvalitetu i svojstva mlijeka jer se unesene komponente putem hrane ugrađuju u organizam, iskorištavaju i u njemu se metaboliziraju putem različitih procesa tvoreći nove spojeve te se dalje prenose i u proizvode metabolizma i tamo se javljaju u određenoj koncentraciji. Mlijeko životinja koje su vođene na slobodnu ispašu pokazalo je veći udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost nego kad su životinje zatvorene i hranjene koncentratima. Razlog tome je što konzumiraju raznovrsno svježe bilje te unose više bioaktivnih spojeva koji pogoduju poboljšanju zdravstvenog profila njihovog mlijeka. Međutim, ako se mlijeko dalje prerađuje isto se pojavljuje i u mliječnim proizvodima (jogurt). Također je uočen i utjecaj godišnjeg doba jer je dokazano da su antioksidacijska aktivnost i ukupna količina fenola veći u proizvodima sušnog naspram kišnog razdoblja. Razlog tomu je što sušna razdoblja predstavljaju abiotički stres za biljke te one kao odgovor na to proizvode povećan udio sekundarnih metabolita (fenolnih i drugih spojeva) koji ishranom ulaze u organizam životinja u sustavu slobodnog uzgoja. Osim različitog sastava krmnog bilja, radi se i o raznolikosti pašnjaka s obzirom na rast različitih vrsta biljaka prema njihovoj potrebi za vlagom (Chávez-Servín i sur., 2018). Tako je u mlijeku uočena prisutnost ne samo fenolnih spojeva nego i drugih biološki aktivnih komponenata poput egzogenih vitamina (A, E i C) te endogenih enzima (glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza), laktoferina i koenzima Q10, za koje je dokazano da značajno reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom jer i oni djeluju kao antioksidansi, ali puno manje od fenolnih spojeva, i mogu dati lažno pozitivan rezultat odnosno obojenje koje se prilikom mjerenja bilježi kao apsorbancija te doprinose konačnoj vrijednosti ukupnih fenola (Vázquez i sur., 2015).

I mnogi drugi nefenolni spojevi mogu ući u reakciju s FC reagensom kao što je navedeno u radu Everette i sur. (2010). To su proteini (čija reaktivnost ovisi o omjeru triptofana, tirozina i cisteina), aminokiseline, nukleotidne baze (adenin blage te gvanin jake reaktivnosti), ugljikohidrati (trioze gliceraldehid i dihidroksiaceton), tioli, nezasićene masne kiseline, vitamini (askorbinska i retinoična kiselina najznačajnijeg djelovanja, folna kiselina, piridoksin, tiamin, trolox kao derivat vitamina E), amini (hidrazini, hidroksilamini, tercijarni i aromatski amini, pirol i indoli), organske kiseline, anorganski ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{I}^-$  i  $\text{SO}_3^{2-}$ ), metalni kompleksi (salicilati), aldehidi i ketoni (butandion,  $\alpha$ -ionon). Zbog svih tih spojeva predlagalo se korištenje FC metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, a ne sadržaja fenola. Međutim, budući da su fenoli najzastupljeniji antioksidansi u većini biljaka, u većini slučajeva metoda zaista daje okvirnu aproksimaciju ukupnog sadržaja fenola (Everette i sur., 2010).



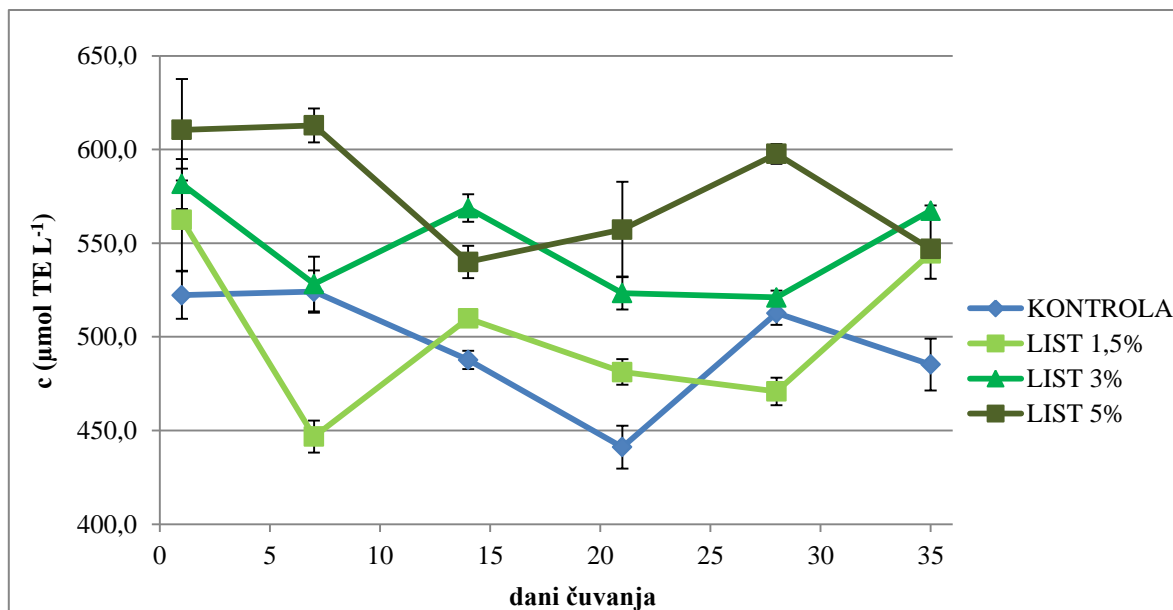
Iz svega navedenog vrijednosti dobivene za kontrolu vjerojatno su detekcija spojeva kojih u mlijeku kao takvom nema nego potiču iz dodataka stočnoj hrani. Krajnji je rezultat tako zbroj postojeće koncentracije fenola, kao i drugih gore navedenih bioaktivnih komponenata te ne odgovara samo fenolnim spojevima. Taj se učinak može anulirati na način da se vrijednosti za kontrolu oduzmu od vrijednosti dobivenim u uzorcima s ekstraktom te se može izvući pretpostavka koje su koncentracije dodanog ekstrakta bile najučinkovitije.

Zamjetnije povećanje udjela fenolnih spojeva u jogurtu dodatkom veće količine ekstrakta značilo bi djelovanje na druge karakteristike jogurta, prvenstveno uzrokujući promjenu boje, okusa i mirisa koji su od velikog značaja za potrošače. Iz tog je razloga potrebno uključiti i druge načine za povećanje količine fenolnih spojeva te antioksidacijske aktivnosti u jogurtu.

#### 4.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta nastalog plavog obojenja redukcijom TPTZ reagensa pri 593 nm. Tamnije obojenje znači da je u jogurtu prisutna veća količina spojeva antioksidacijskog djelovanja. Dobivene vrijednosti apsorpcije pomoću jednadžbe baždarnog pravca [8] preračunale su se u koncentraciju izraženu kao  $\mu\text{mol}$  ekvivalenata Trolox-a ( $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ ).

Rezultati antioksidacijske aktivnosti jogurta bez i s dodatkom ekstrakta lista masline (slika 23) pokazuju da se ona povećala s količinom dodanog ekstrakta, kao što je i očekivano, budući da je on bogat biološki aktivnim spojevima. Tako je najveća antioksidacijska aktivnost bila zabilježena za uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta i iznosila je  $612,86 \mu\text{mol TE L}^{-1}$ , a najmanja za kontrolni uzorak i iznosila je  $441,19 \mu\text{mol TE L}^{-1}$ . Međutim, ovdje se nije radilo o vrlo značajnom povećanju antioksidacijske aktivnosti jogurta odnosno vidljivo je da je i jogurt bez dodatka ekstrakta posjedovao određenu antioksidacijsku aktivnost što je detaljno objašnjeno u poglavlju 4.7. Također je potrebno naznačiti da su odstupanja bila zabilježena kod 7. i 28. dana čuvanja za uzorak s dodatkom 1,5 % ekstrakta, pri čemu su vrijednosti bile niže od kontrole, te za 14. dan čuvanja kada je vrijednost za 3 % ekstrakta bila malo veća nego za uzorak 5 %.



Slika 23. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom, izražena kao koncentracija ( $c$ ) u ekvivalentima Trolox-a ( $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ ) u analiziranim uzorcima jogurta (kontrola, List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja ( $n=2$ )

Tijekom perioda čuvanja iz slike je vidljivo da se antioksidacijski kapacitet uzoraka nije mijenjao značajno, vrijednosti su bile između 450 i 600  $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ . Dakle, tijekom skladištenja i čuvanja jogurta pri niskim temperaturama u hladnjaku nije došlo do degradacije fenolnih spojeva koji su najviše zaslužni za povećanje antioksidacijske aktivnosti jogurta.

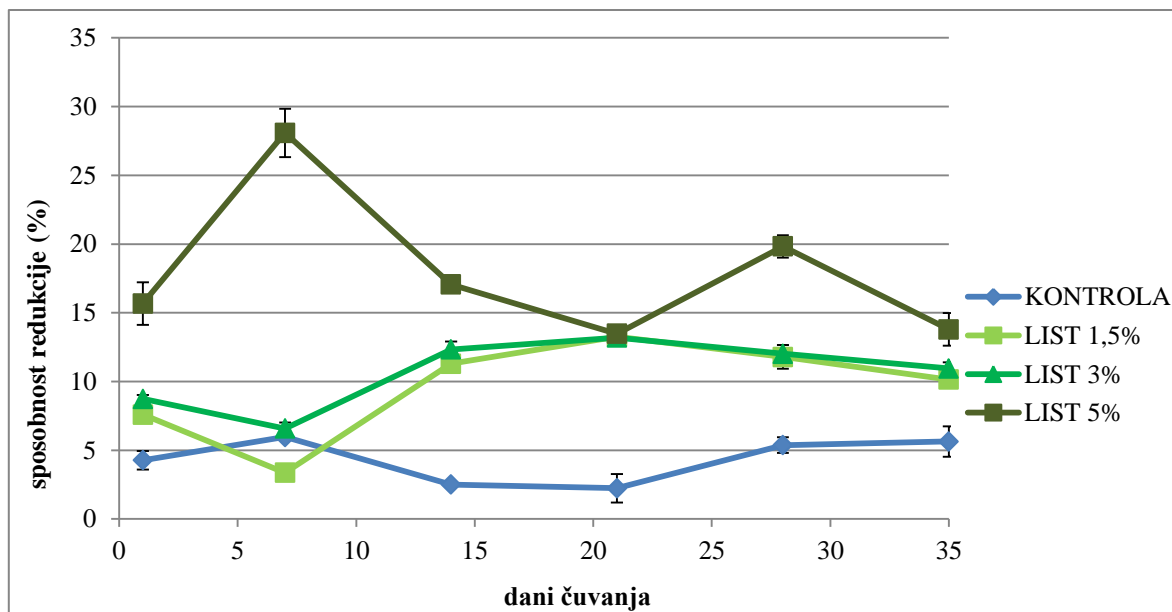
Oh i sur. (2016) također su dokazali pozitivan utjecaj ekstrakta lišća biljaka na antioksidacijsku aktivnost jogurta. U mjerenjima su koristili drugi standard-željezov sulfat heptahidrat pa je kontrolni uzorak imao vrijednost 400-500  $\mu\text{M FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  tijekom 28 dana čuvanja, što najviše i odgovara vrijednostima za kontrolu u ovom diplomskom radu. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za jogurte s dodanim ekstraktom bile su znatno veće nego izmjerene u ovom diplomskom te su se za list bijele murve kretale oko 1400, a za list kineskog duda između 1500 i 1600  $\mu\text{M FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Perna i sur. (2014) u radu su dokazali utjecaj dodatka meda na povećanje antioksidacijske aktivnosti jogurta jer je i on bogat bioaktivnim spojevima. U usporedbi s kontrolom (116,57  $\mu\text{g AAE mL}^{-1}$ ), jogurt s dodatkom meda lješnjaka imao je izmjerenu vrijednost od 234,57  $\mu\text{g AAE mL}^{-1}$ , dok je jogurt s dodatkom meda slatkovine imao vrijednost 168,29  $\mu\text{g AAE mL}^{-1}$ . Sve su vrijednosti dosta niže od onih u ovom diplomskom radu, ali treba uzeti u obzir i uporabu različitog standarda – acetatna kiselina.

FRAP metodom je utvrđeno da ekstrakt lista masline sadrži 9265,16  $\mu\text{mol TE L}^{-1}$  što potvrđuje da list masline ima veliku antioksidacijsku aktivnost, a detaljno je objašnjeno u poglavlju 2.3. Međutim, zbog gorčine koja potječe od biološki aktivnih spojeva te zelene pigmentacije ekstrakt nije moguće dodati u prevelikim količinama, tako da ta dva svojstva predstavljaju ograničavajući faktor u proizvodnji ovakvih funkcionalnih proizvoda.

#### 4.9. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

Antioksidacijska aktivnost uzoraka jogurta i ekstrakta određena je spektrofotometrijski prema metodi koju su prvi put u svom istraživanju objavili Brand-Williams i sur. (1995). Mjerio se intenzitet obojenja nastao redukcijom DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa, pri valnoj duljini od 517 nm. Dobivene apsorbancije preračunale su se pomoću formule [9] u postotak inhibicije DPPH radikala kao konačni rezultat. Što je spomenuta inhibicija bila veća, u uzorku je zabilježena veća prisutnost antioksidansa.

Slika 24 prikazuje da se sposobnost redukcije uzorka s dodatkom 5 % ekstrakta najviše razlikovala od svih drugih uzoraka tijekom cijelog perioda čuvanja. Jedina je iznimka bio 3. tjedan čuvanja kada je vrijednost sposobnosti redukcije DPPH radikala bila jednaka uzorcima s dodatkom 1,5 i 3 % ekstrakta i iznosila je 13,47 %. Sposobnost redukcije bila je najmanja kod kontrolnog uzorka i iznosila je 4,27 %, dok je najveća vrijednost bila izmjerena za jogurt s 5 % ekstrakta 7. dana čuvanja i iznosila je 28,08 %. Također, kao i kod FRAP metode, vidljivo je da se s povećanjem količine dodanog ekstrakta povećala i antioksidacijska aktivnost jogurta izmjerena DPPH metodom. DPPH metoda to puno vjernije prikazuje odnosno vrijednosti za uzorke s ekstraktom puno su se više razlikovale od kontrole, od 14. dana čuvanja pa nadalje. Također je vidljivo da se vrijednost sposobnosti redukcije za sve uzorke stabilizirala prema kraju vremena čuvanja i poprimila je konstantnu vrijednost između 5,64 i 13,79 %, što je međutim bilo manje naglašeno kod uzorka s 5 % ekstrakta, iako su i njegove vrijednosti pokazale blagi trend stabilizacije.



Slika 24. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom, izražena kao sposobnost redukcije DPPH radikala (%) u analiziranim uzorcima jogurta (kontrola, List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

Za razliku od FRAP metode kojom se mjeri antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva, DPPH metodom određuju se svi biološki aktivni spojevi koji mogu ući u reakciju i reducirati DPPH radikal. Stoga, vrijednosti i trendovi dobiveni DPPH metodom (slika 24) nisu pokazali podudarnost s vrijednostima dobivenim za ukupne fenole (slika 22), kao što je to slučaj kod vrijednosti dobivenim pomoću metode FRAP (slika 23).

El-Said i sur. (2014) također su utvrdili da se povećanjem koncentracije ekstrakta kore šipka značajno povećava antioksidacijska aktivnost obogaćenog jogurta neovisno o vremenu njegovog dodatka-prije ili poslije inokulacije, iako su vrijednosti bile veće kod dodatka prije inokulacije. Vrijednosti od 19,12 tj. 17,91 % u slučaju 5 % dodanog ekstrakta u jogurt prije i nakon inkubacije, te 28,82 tj. 29,97 % kod dodatka 15 % ekstrakta prije i nakon inkubacije odgovaraju izmjerenim vrijednostima za list 5 % u ovom diplomskom radu 7. i 28. dana čuvanja. Oh i sur. (2016) u svom su radu izmjerili puno veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Kontrolni uzorak uzrokovao je 15 % inhibicije DPPH radikala, a u ovom se diplomskom radu kretao oko 5 %. Jogurti s ekstraktom lista bijele murve i kineskog duda postigli su 55-60 % inhibicije, a u ovom su diplomskom radu obogaćeni jogurti pokazali 10-20 % inhibicije.

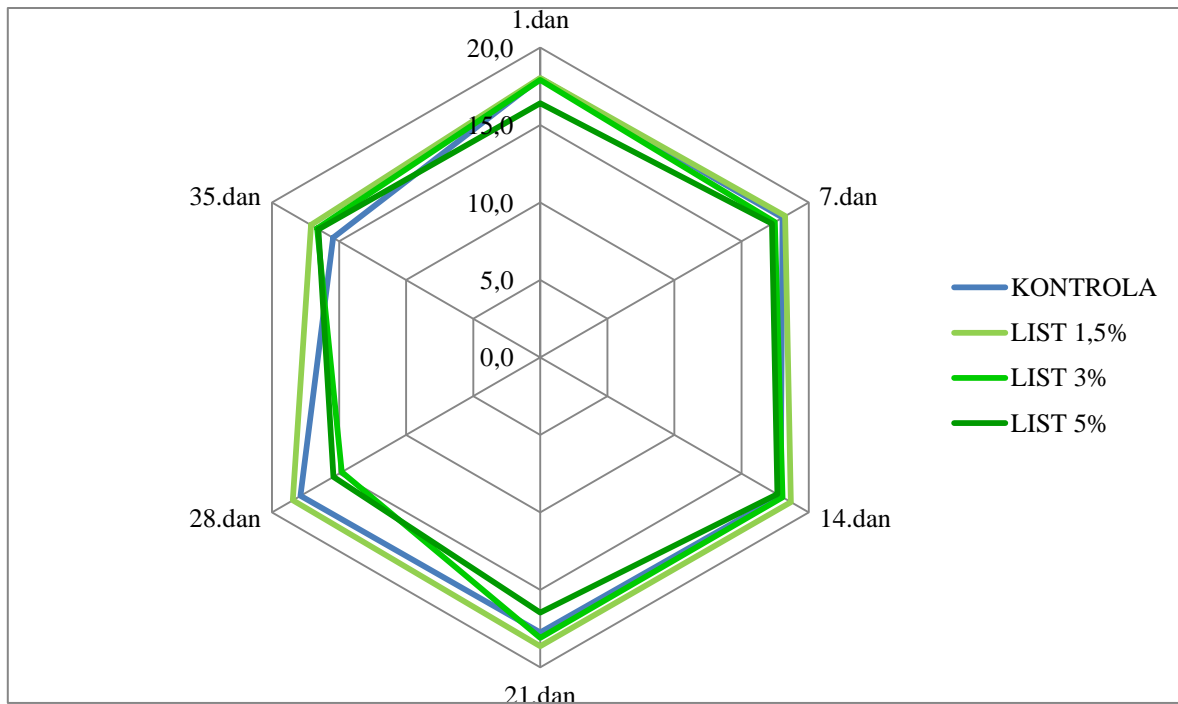
#### 4.10. SENZORSKA ANALIZA

Senzorsko profiliranje u industriji i analitičkim laboratorijima provodi panel treniranih senzorskih analitičara koji se sastoji od minimalno 5 osoba čiji su senzorska osjetljivost i pragovi osjetljivosti provjereni na osnovu agencije (gubitak osjeta okusa za koji je odgovoran jezik, posebno zbog nemogućnosti otkrivanja slatkoće, kiselosti, gorčine, slanosti), anozmije (gubitak osjeta mirisa) i okusa umami (ugodan/slani okus) (Domagała i sur., 2013).

Kao što je prije spomenuto fenoli se ističu svojom gorčinom te je jako važno odrediti optimalan omjer dodatka ekstrakta i njegovog utjecaja na ukupni doživljaj gotovog proizvoda (podnošljivost konzumacije s obzirom na gorčinu), a s druge strane kako bi se dobio funkcionalan proizvod povećane antioksidacijske aktivnosti uspoređujući ga s jogurtom bez dodatka. Za neutralizaciju gorčine ekstrakta odgovorni su mliječna mast i mliječna kiselina nastala fermentacijom mlijeka u proizvodnji jogurta. Njihov optimalan omjer garantira prihvatljivost proizvoda.

Tijekom senzorske analize senzorski je panel prema obrascu prikazanom u tablici 5 svaki tjedan ocjenama od 1 do 5 ocjenjivao sljedeće senzorske karakteristike uzoraka: izgled, boju, konzistenciju, miris, sinerezu i okus. Ukupan zbroj srednjih vrijednosti za sve senzorske karakteristike zajedno i za sve uzorke po danima čuvanja prikazan je u obliku tzv. *paukove mreže* na slici 25.

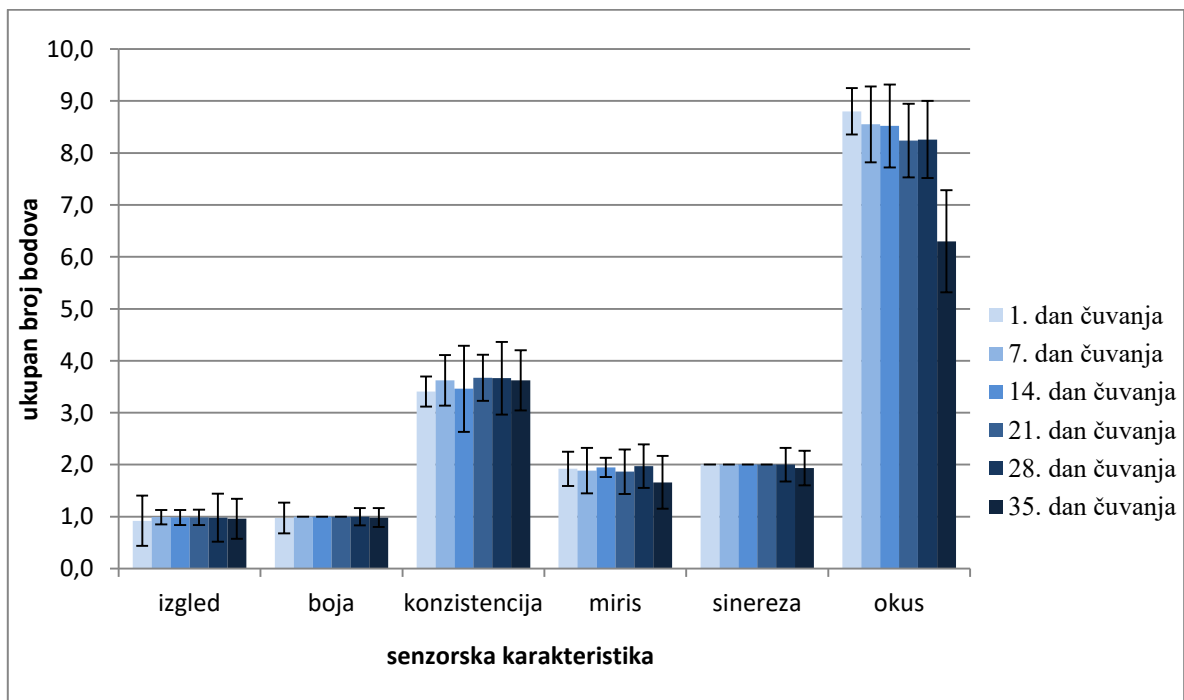
Iz slike je vidljivo da je najviše vrijednosti ukupnih bodova tijekom cijelog perioda čuvanja imao uzorak list 1,5 %, pritom je najviša vrijednost zabilježena u 14. i 21. danu čuvanja, a iznosila je 18,7. U 28. danu čuvanja uzorak je također bio visoke ukupne vrijednosti – 18,5. Najveća vrijednost koju je bilo moguće postići kao zbroj svih senzorskih karakteristika iznosila je 20. Zadnji tjedan čuvanja vrijednost je u uzorku pala na 17,1. Kao najlošije senzorski ocijenjen pokazao se uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta koji je već u 1. danu čuvanja imao ukupnu vrijednost svih senzorskih karakteristika 16,4. Dalje je uslijedio rast do najviše vrijednosti koju je taj uzorak postigao u 14. danu čuvanja i ona je iznosila 17,7. Nakon toga slijedio je ponovni pad, a najniža vrijednost od 15,4 bila je zabilježena u 28. danu.



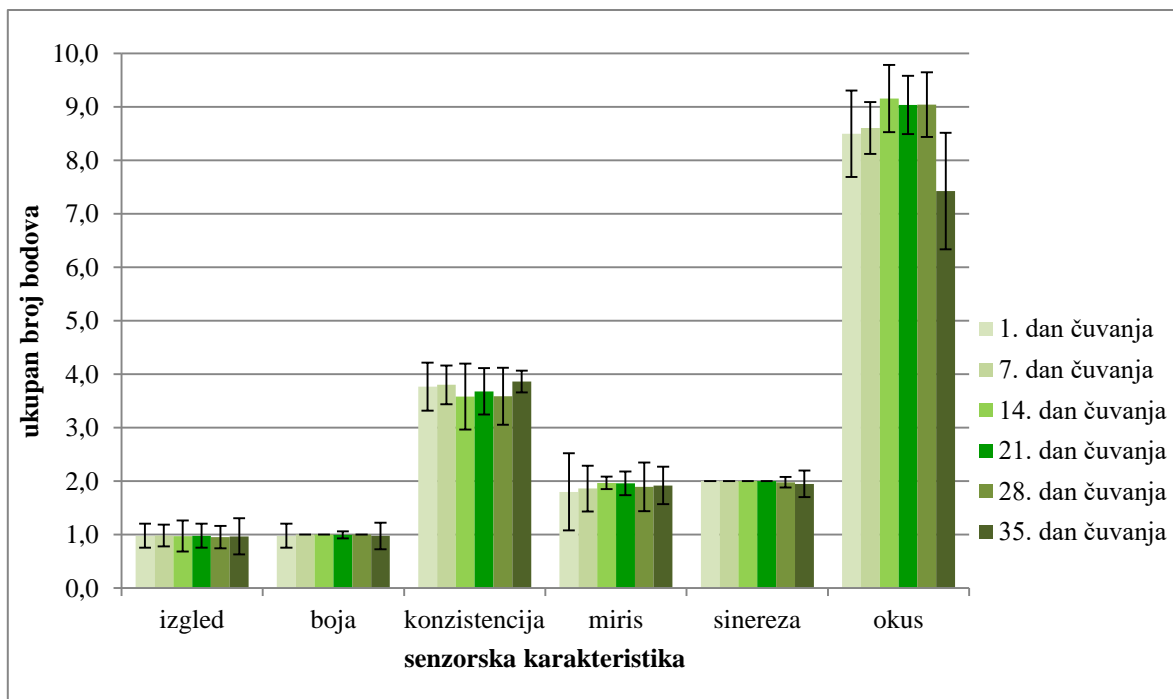
Slika 25. Ukupni bodovi postignuti senzorskom ocjenom uzoraka jogurta bez (Kontrola) i s dodatkom ekstrakta lista masline (List 1,5 %, List 3 %, List 5 %) tijekom 35 dana hladnog čuvanja (n=2)

Tijekom cijelog vremena skladištenja uzorak s 5 % ekstrakta zauzimao je najnižu poziciju, osim zadnja dva tjedna kada su najlošije ocijenjeni bili uzorak s 3 % ekstrakta (28. dan) i kontrola (35. dan). Kontrolni je uzorak vrijednostima bio blizak uzorku s 1,5 % ekstrakta i pokazao je veće vrijednosti od uzorka s 3 % ekstrakta. Iznimku su predstavljali 14., 21. i 35. dan čuvanja kada je vrijednost za list 3 % ipak bila malo viša. Najviša vrijednost za uzorak s 3 % ekstrakta postigla se u 14. i 21. danu čuvanja do kojih je ona rasla i iznosila je 18,1. Dalje je slijedio nagli pad, i u 28. danu uzorak je postigao najnižu vrijednost od 14,8, koja je ujedno bila i najniža vrijednost gledajući sve uzorke i cijeli period čuvanja. Tijekom cijelog perioda čuvanja vrijednosti za kontrolni uzorak blago su padale, a minimum se postigao u 35. danu (15,5). Kod uzorka list 1,5 % vrijednosti su rasle do 14. dana čuvanja te su se polako spuštale prema 35. danu. Iz svega prethodno navedenog, može se zaključiti da bi uzorak s 1,5 % ekstrakta bio najprihvatljiviji, uzorak s 3 % ekstrakta bio bi prihvatljiv do 21. dana čuvanja, a zbog niskih početnih vrijednosti uzorak s 5 % ekstrakta uopće se ne bi mogao karakterizirati kao prihvatljiv za potrošače.

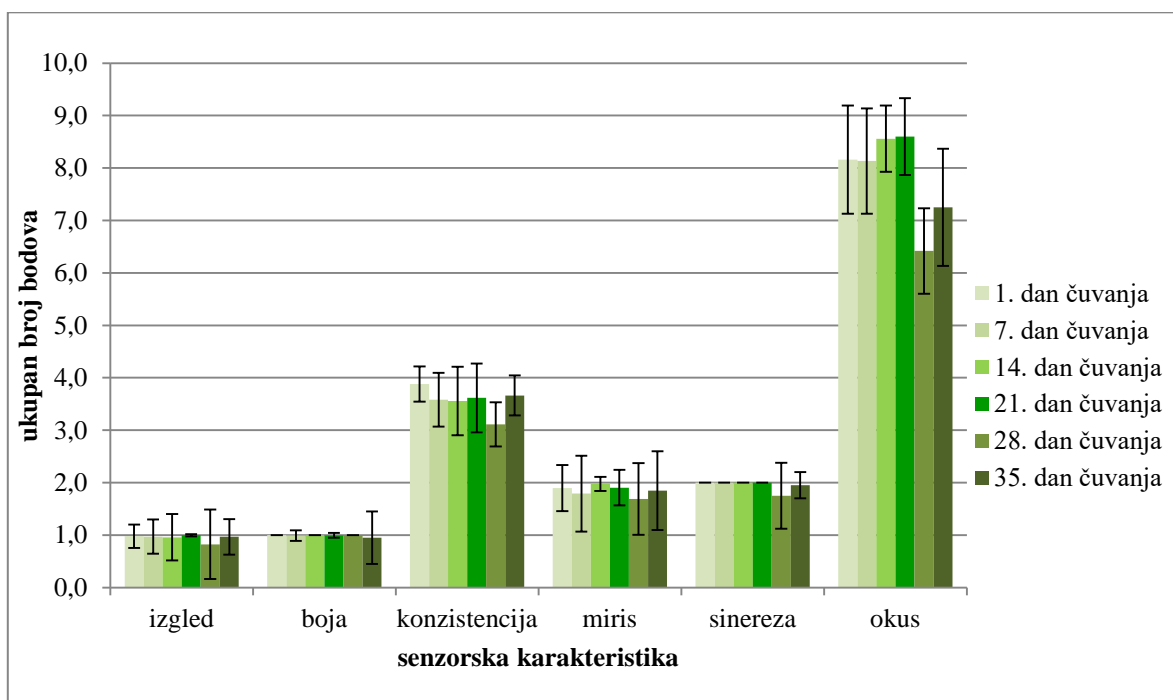
U narednih nekoliko slika (26-29) prikazan je ukupan broj bodova za svaku pojedinu senzorsku karakteristiku po danima čuvanja i za svaki uzorak posebno. Maksimalni broj bodova koji je bilo moguće postići rezultat je umnoška maksimalne srednje vrijednosti ocjene svih pet ocjenjivača (5,0) i faktora vrijednosti. Iz tablice 4 moguće je zaključiti kako je od svih senzorskih karakteristika okus najvažniji, a slijedi ga konzistencija. Oni uistinu predstavljaju primarne kriterije za potrošače kod odabira proizvoda prilikom sljedeće kupnje i garantiraju njihovo zadovoljstvo.



Slika 26. Promjena senzorskih karakteristika tijekom perioda čuvanja od 35 dana za kontrolni uzorak (n=2)

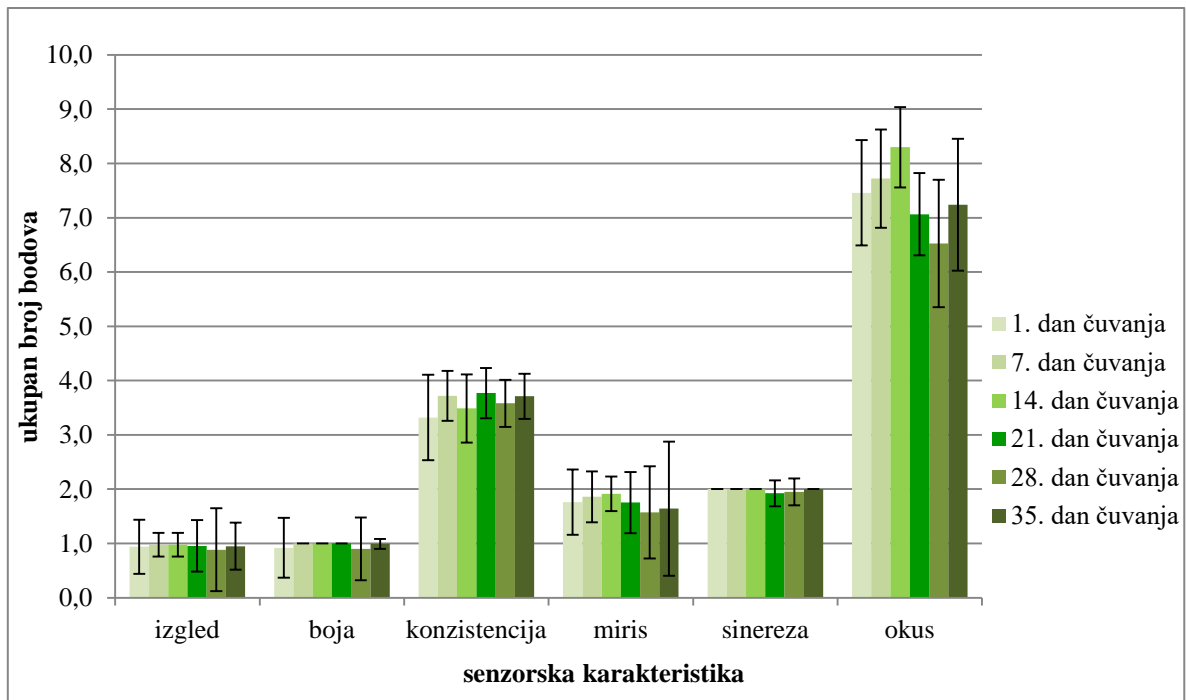


Slika 27. Promjena senzorskih karakteristika tijekom perioda čuvanja od 35 dana za uzorak s dodatkom 1,5 % ekstrakta (n=2)



Slika 28. Promjena senzorskih karakteristika tijekom perioda čuvanja od 35 dana za uzorak s dodatkom 3 % ekstrakta (n=2)





Slika 29. Promjena senzorskih karakteristika tijekom perioda čuvanja od 35 dana za uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta (n=2)

### Okus

Usporedbom gore prikazanih vrijednosti za senzorske karakteristike, za svaki je uzorak vidljivo da je okus bio najpromjenjivije svojstvo i da su za njega postignuti bodovi bili najmanji u odnosu na najveći mogući broj bodova. Na početku je kontrola imala najbolji zabilježen okus (8,8 bodova), a naredne je tjedne veće vrijednosti imao uzorak s 1,5 % ekstrakta pri čemu je najbolji okus postigao 14. dana čuvanja – 9,2 boda. Prema kraju čuvanja okus se pogoršao te je bilo moguće zamijetiti nagli pad vrijednosti zadnjih dana čuvanja za sve uzorke, a najmanja je vrijednost bila postignuta u kontrolnom uzorku 35. dan čuvanja i iznosila je 6,3 boda. S obzirom na okus, najbolje je ocijenjen bio uzorak list 1,5 %, zatim 3 % i na kraju 5 %.

Prema komentarima članova panela nedostaci zamijećeni u uzorcima, koji su uzrokovali smanjenje broja bodova za okus, odnosili su se na pretjeranu kiselost koja je primijećena na početku i sredinom perioda čuvanja u kontrolnom uzorku, a pred kraj perioda čuvanja konstatirana je za sve uzorke. Nadalje, gorčina (okus na maslinu) te blagi do jaki naknadni okus tzv. aftertaste uočeni su u uzorcima list 3 % i list 5 %. Sljedeći nedostatak uočen na početku čuvanja svih uzoraka druge proizvodnje bio je strani, neobičan okus. Pred kraj vremena čuvanja neki od članova detektirali su mane okusa opisane kao “po pokvarenom, starom, ustajalom“, „na kvasce i plijesan“, bljutavo i ukiseljeno. Kod uzorka list 5 % to se

javilo već 21. dan čuvanja (pogotovo okus na plijesan), kod kontrole i list 3 % 28. dan, a kod uzorka list 1,5 % 35. dan čuvanja. Temeljem svih navedenih primjedbi, kao i rezultata ostalih mjerenja, formirao se predloženi kraj roka trajanja proizvoda. Kod uzorka list 5 % taj period je ograničen na 14 dana, kod uzorka list 3 % i kontrole na 21 dan, a kod uzorka list 1,5 % na 28 dana. Očekivano je bilo da će dodani ekstrakt djelovati inhibitorno na rast kvasaca i plijesni, međutim njegov dodatak nije pokazao značajniji utjecaj na rast ovih mikroorganizama što je u suprotnosti s rezultatima istraživanja navedenima u poglavlju 2.3., gdje je list masline prikazan kao antimikrobni agens.

### *Konzistencija*

Bodovi postignuti za svojstvo konzistencije uglavnom su se kretali između 3,5 i 3,8. Najviša vrijednost iznosila je 3,9 i zabilježena je 1. dan čuvanja kod uzorka list 3 % te zadnji dan čuvanja kod uzorka list 1,5 %. Pozitivna karakteristika zamijećena u uzorcima list 1,5 i 3 % prve proizvodnje je da su bili viskoziji i kremastiji od kontrole. Najniža vrijednost od 3,1 bila je zabilježena 28. dana čuvanja kod uzorka list 3 %. Na sniženje bodova za konzistenciju uglavnom je utjecala prisutnost grudica (većih ili manjih) i prevelika gustoća koja je tijekom druge proizvodnje zamijećena na početku vremena čuvanja za uzorke s dodatkom ekstrakta, sredinom vremena čuvanja kod kontrole i uzorka list 1,5 %, te na kraju perioda čuvanja kod uzorka list 3 %. Nedostatak je također u nekoliko uzoraka bio i pretjerana rijetkost (vodenost), i to za kontrolu 14. dan čuvanja, list 3 % 28. dan čuvanja te list 5 % 7. i 21. dan čuvanja.

### *Miris*

Vrijednosti za miris kretale su se uglavnom oko 1,9. Najniža je vrijednost bila zabilježena u uzorku list 5 % zadnjih dana skladištenja i iznosila je 1,6. Na početku druge proizvodnje u svim je uzorcima bio zamijećen strani miris, a kod kontrole još dodatno i miris na kiselo. Pred kraj vremena čuvanja u uzorcima se osjetio miris po starom, ustajalom, kvascima i plijesni. Kod kontrole i uzoraka list 1,5 i 3 % to se javilo 28. dan čuvanja, a kod uzorka list 5 % već 21. dan.

### *Ostale senzorske karakteristike*

Izgled, boja i sinereza uglavnom su odgovarali maksimalnim vrijednostima za sve uzorke. Iznimke su bile uzorak list 5 % u prvom tjednu čuvanja kada je primijećena malo tamnija, krem boja odnosno nijanse žute, te list 3 % 35. dan čuvanja i list 5 % 28. dan čuvanja koji su također bili primjetne žute boje. Jedina iznimka za sinerezu bio je uzorak list 3 % 28. dan

čuvanja druge proizvodnje kada je zamijećeno puno izdvojene sirutke, a uzorak je tada bio i jako rijedak.

U istraživanju Tavakoli i sur. (2018) isto tako je dokazano da dodatak ekstrakta lista masline, zbog prisutnosti oleuropeina i drugih fenolnih spojeva, negativno utječe na boju (svijetlo-zelena) i okus jogurta (javljaju se gorčina i oporost) te su srednje ocjene senzorskog panela za navedena svojstva postupno padale tijekom skladištenja uzoraka. Slično je utvrđeno i u radu Zoidou i sur. (2017) uz blagi naknadni okus koji nije toliko negativno utjecao na promjenu prirodne arome jogurta. Suprotno, prosječne su se vrijednosti za teksturu u jogurtima povećavale kako je vrijeme odmicalo te su obogaćeni jogurti općenito bili čvršći nego kontrola. Oni, dakle, u svom istraživanju nisu utvrdili najtipičniji defekt jogurta koji je niska viskoznost odnosno smanjena čvrstoća (rijetkost) i sinereza, kao što je u ovom diplomskom radu u nekoliko uzoraka zamijećeno.

Ono što bi još obavezno bilo potrebno napraviti, prije stavljanja proizvoda na tržište jest provesti test prihvatanja proizvoda za buduće potrošače koristeći npr. hedonističke skale kako bi se odredio stupanj prihvatljivosti odnosno (ne)svidanja, za što je potrebno sudjelovanje velikog broja ljudi različitog spola, dobi, zaposlenja, izobrazbe i geografskog položaja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak ekstrakta lista masline pozitivno je utjecao na tijek fermentacije te je veća koncentracija ekstrakta pogodovala bržoj proizvodnji mliječne kiseline i sniženju pH pa je fermentacija bila kraća. Dodatak 3 % ekstrakta najviše je skratio trajanje fermentaciju (4 h) u odnosu na kontrolni jogurt (4,6 h). Aktivna kiselost izražena kao pH vrijednost kretala se između 4,15 i 4,53 pri čemu je najniža vrijednost izmjerena za uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta (14. dan čuvanja), a najviša za kontrolni uzorak (1. dan čuvanja). Titracijska kiselost izražena kao udio mliječne kiseline (%) kretala se između 1,5 i 2 % tijekom cijelog perioda čuvanja za sve uzorke.

2. Tijekom cijelog perioda skladištenja, uz određene iznimke, sinereza je bila veća kod uzoraka s dodatkom ekstrakta nego kod kontrolnog uzorka, što je najviše bilo izraženo u uzorku s 5 % dodanog ekstrakta. Kapacitet zadržavanja vode pokazao je suprotan trend te je kod uzoraka s dodanim ekstraktom bio uglavnom manji od kontrolnog, uz izuzetak uzorka s dodatkom 1,5 % ekstrakta.

3. Viskoznost svih uzoraka smanjivala se s povećanjem brzine smicanja, koje je uzrokovalo slabljenje sila odgovornih za povezivanje različitih slojeva polutekućeg uzorka jogurta. S vremenom čuvanja viskoznost svih uzoraka uglavnom je rasla, a s povećanjem udjela ekstrakta se smanjivala. Najveća vrijednost tijekom cijelog perioda čuvanja izmjerena je u kontrolnom uzorku posljednjeg dana čuvanja i iznosila je 0,327 Pa s, dok je najmanja vrijednost izmjerena za uzorak s 5 % ekstrakta 14. dana čuvanja i iznosila je 0,161 Pa s.

4. S obzirom na  $\Delta E^*$  vrijednosti, najmanja razlika u odnosu na kontrolu zamijećena je u uzorku s dodatkom 1,5 % ekstrakta, dok je najveća utvrđena u uzorku s dodatkom 5 % ekstrakta. Dobiveni rezultati ukazuju kako bi dodatak 1,5 % ekstrakta lista masline bio optimalan te ne bi izazvao neprihvatljivu razliku u boji jogurta.

5. Broj bakterija roda *Lactobacillus* sp. i *Streptococcus* sp. konstantno je padao u svim uzorcima tijekom perioda čuvanja. Njihov broj bio je najveći u kontrolnom uzorku te je padao razmjerno povećanju količine dodanog ekstrakta lista masline. Stoga se nameće pretpostavka kako list masline sadrži tvari koje djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama. Broj bakterija

roda *Streptococcus* sp. bio je u svim uzorcima veći nego broj bakterija roda *Lactobacillus* sp., što može ukazivati na veću osjetljivost potonjih na djelovanje inhibitornih tvari dodanog ekstrakta.

6. Ekstrakt lista masline sadržavao je 990,71 mg GAE L<sup>-1</sup> ukupnih fenolnih spojeva. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima kretala se između 70 (kontrolni uzorak) i 100 (uzorak list 5 %) mg GAE L<sup>-1</sup>, a ista je rasla proporcionalno povećanju količine dodanog ekstrakta. Čuvanjem uzoraka u hladnjaku koncentracija ukupnih fenola nije se bitno mijenjala s vremenom tj. nije došlo do njihove degradacije. Usporedbom uzoraka s dodatkom ekstrakta lista masline i kontrole uočena je sličnost u količini ukupnih fenola. Razlog je prisutnost fenolnih i drugih biološki aktivnih spojeva u mlijeku koji reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom i daju lažno pozitivan rezultat.

7. FRAP metodom utvrđeno je da je antioksidacijska aktivnost ekstrakta lista masline iznosila 9265,16 μmol TE L<sup>-1</sup> te se posljedično i antioksidacijska aktivnost jogurta povećavala s količinom dodanog ekstrakta. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta (612,86 μmol TE L<sup>-1</sup>), a najmanju kontrolni uzorak (441,19 μmol TE L<sup>-1</sup>). Tijekom perioda čuvanja vrijednosti se nisu bitno mijenjale (450-600 μmol TE L<sup>-1</sup>) što ukazuje da skladištenjem pri niskim temperaturama nije došlo do degradacije spojeva zaslužnih za povećanje antioksidacijske aktivnosti jogurta.

8. S povećanjem količine dodanog ekstrakta povećala se i antioksidacijska aktivnost jogurta izmjerena DPPH metodom. Sposobnost redukcije bila je najmanja u kontrolnom uzorku (4,27 %), dok je najveća vrijednost bila izmjerena za jogurt s 5 % ekstrakta (28,08 %). Prema kraju vremena čuvanja vrijednosti su se za sve uzorke stabilizirale i poprimile konstantu u rasponu 5,64 (kontrolni uzorak) i 13,79 % (uzorak list 5 %).

9. Ukupni bodovi svih senzorskih karakteristika zajedno pokazali su da bi uzorak s 1,5 % ekstrakta bio najprihvatljiviji za potrošače jer je tijekom cijelog perioda čuvanja imao najviše vrijednosti. Suprotno, kao najmanje prihvatljiv pokazao se uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta. Nedostaci zamijećeni u uzorcima bili su prevelika kiselost, gorčina, naknadni i stran okus, a pred kraj vremena čuvanja okus se znatno pogoršao za sve uzorke te je nastupio okus po ustajalom, kvascima, plijesni i ukiseljenom. Sukladno tomu za uzorak s dodatkom 5 % ekstrakta trajnost bi iznosila 14 dana, s 3 % ekstrakta 21 dan te 1,5 % ekstrakta 28 dana.

10. Uzimajući u obzir sve rezultate, dodatak 1,5 % ekstrakta bio bi optimalan za daljnje optimiranje proizvodnje ovako obogaćenog jogurta.

## 6. LITERATURA

Basiri, S., Haidary, N., Shekarforoush, S.S., Niakousari, M. (2018) Flaxseed mucilage: A natural stabilizer in stirred yogurt. *Carbohydr. Polym.* **187**, 59-65.

Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J. Nat. Prod.* **64** (7), 892-895.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol-Leb.* **28** (1), 25-30.

Benzie, I.F.F. (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **29**, 111-116.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

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

Cardines, P.H.F., Baptista, A.T.A., Gomes, R.G., Bergamasco, R., Vieira, A.M.S. (2018) Moringa oleifera seed extracts as promising natural thickening agents for food industry: Study of the thickening action in yogurt production. *LWT – Food Sci. and Technol.* **97**, 39-44.

Chávez-Servín, J.L., Andrade-Montemayor, H.M., Velázquez-Vázquez, C., Aguilera-Barreyro, A., García-Gasca, T., Ferríz-Martínez, R.A., Olvera-Ramírez, A.M., de la Torre-Carbot, K. (2018) Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Res.* **160**, str. 54-58.

Christen, P., Kaufmann, B. (2014) New Trends in Extraction of Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurized Liquid Extraction. U: Encyclopedia of

Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, (Meyers, R.A., ured.), John Wiley & Sons, Ltd., New York.

Das, K., Choudhary, R., Thompson-Witrick, K.A. (2019) Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. *LWT – Food Sci. and Technol.* **108**, 69-80.

Domagała, J., Wszoleka, M., Tamimeb, A.Y., Kupiec-Teahanc, B. (2013) The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Res.* **112**, 154-161.

El-Said, M.M., Haggag, H.F., El-Din, H.M.F., Gad, A.S., Farahat, A.M. (2014) Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. *Ann. Agric. Sci.* **59** (2), 207-212.

Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B. (2010) A thorough study of reactivity of various compound classes towards the folin-ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem.* **58**(14), 8139-8144.

Farooqui, A.A., Farooqui, T. (2018) Effects of Mediterranean Diet Components on Neurodegenerative Diseases. U: Role of the Mediterranean Diet in the Brain and Neurodegenerative Diseases, (Farooqui, A.A., Farooqui, T., ured.), Academic press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 1-16.

Feng, C., Wang, B., Zhao, A., Wei, L., Shao, Y., Wang, Y., Cao, B., Zhang, F. (2018) Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. *Food Chem.* **277**, 238-245.

Filajdić, M., Ritz, M., Vojnović, V. (1988) Senzorska analiza mliječnih proizvoda. *Mljekartstvo* **38**, 295-301.

Fogher, C., Busconi, M., Sebastiani, L., Bracci, T. (2010) Olive Genomics. U: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 1. izd., (Preedy, V.R., Watson, R.R., ured.), Academic Press, London/Burlington/San Diego, str. 17-24.



Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH center dot radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **69** (7), 2309-2314.

Georgakouli, K., Mpesios, A., Kouretas, D., Petrotos, K., Mitsagga, C., Giavasis, I., Jamurtas, A.Z. (2016) The Effects of an Olive Fruit Polyphenol-Enriched Yogurt on Body Composition, Blood Redox Status, Physiological and Metabolic Parameters and Yogurt Microflora. *Nutrients* **8** (6), 344-357.

Gyawali, R., Ibrahim, S.A. (2016) Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends Food Sci. Tech.* **56**, 61-76.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T. Hartzfeld, P.W., Reichel, T.L. (1998) High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887-1892.

Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Res. Com.* **9** (1), 1-32.

Horvatin, Lucija (2018) Utjecaj dodatka ekstrakta majčine dušice i protektivne kulture na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka (diplomski rad), PBF, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hrenović, J. (2006) E-škola - biologija, <<https://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor233.htm>>. Pristupljeno 4. studenog 2020.

Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.* **53** (6), 1841-1856.

Jimenez, A., Selga, A., Torres, J.U., Julia, L. (2004) Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Org. Lett.* **6** (24), 4583-4586.

Jaiswal, S. (2020) Alchetron, <<https://alchetron.com/Lactobacillus-delbrueckii-subsp.-bulgaricus>>. Pristupljeno 11. siječnja 2021.

Kalpana, K. (2020) Alchetron, <<https://alchetron.com/Streptococcus-thermophilus>>. Pristupljeno 11. siječnja 2021.

Kwon, H.C., Bae, H., Seo, H.G., Han, S.G. (2019) Chia seed extract enhances physiochemical and antioxidant properties of yogurt. *J. Dairy Sci.* **102**, 4870-4876.

Lee, O-H., Lee, B-Y. (2010) Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technol.* **101**, 3751-3754.

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

Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y. (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42** (2), 361-370.

Mandić, M., Perl, A. (2006) Osnove senzorske procjene hrane. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska.

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

Mushtaq, A., Hanif, M.A., Ayub, M.A., Bhatti, I.A., Romdhane, M. (2020) Olive. U: Medicinal Plants of South Asia Novel sources for drug discovery, (Hanif, M.A., Nawaz, H., Khan, M.M., Byrne, H.J., ured.), Elsevier, Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 541-555.

Nguyen, L., Hwang, E.-S. (2016) Quality Characteristics and Antioxidant Activity of Yogurt Supplemented with Aronia (*Aronia melanocarpa*) Juice. *Prev. Nutr. Food Sci.* **21**(4), 330-337.

Oh, N.S., Lee, J.Y., Joung, J.Y., Kim, K.S., Shin, Y.K., Lee, K-W., Kim, S.H., Oh, S., Kim, Y. (2016) Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba L.* leaf extracts. *J. Dairy Sci.* **99**, 6014-6025.

OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin (2014). Determination of chromatic characteristics (OIV-MA-BS-27). Paris, France: International Organisation of Vine and Wine.

Parisi, O.I., Casaburi, I., Sinicropi, M.S, Avena, P., Caruso, A., Givigliano, F., Pezzi, V., Puoci, F. (2014) Most Relevant Polyphenols Present in the Mediterranean Diet and Their Incidence in Cancer Diseases. U: Polyphenols in Human Health and Disease, **1** (Watson, R.R., Preedy V.R., Zibadi, S., ured.), Academic Press, London/Waltham/San Diego, str. 1341-1351.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. (2014) Antioxidant activity of yogurt made from milk characterized by different casein haplotypes and fortified with chestnut and sulla honeys. *J. Dairy Sci.* **97**, 6662-6670.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53** (10), 4290-4302.

Ray, N.B., Lam, N.T., Luc, R., Bonvino, N.P., Karagiannis, T.C. (2015) Cellular and Molecular Effects of Bioactive Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. U: Olive and Olive Oil Bioactive Constituents, (Boskou, D., ured.), AOCS Press, Urbana, str. 53-91.

Reitermayer, D., Kafka, T.A., Lenz, C.A., Vogel, R. F. (2018) Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC Microbiol.* **18**, 72

Seçmeler, Ö., Galanakis, C.M. (2019) Olive Fruit and Olive Oil. U: Innovations in Traditional Foods, 1. izd, (Galanakis, C.M., ured.), Woodhead publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 193-220.

Segura-Carretero, A., Menéndez-Menéndez, J., Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Polyphenols in Olive Oil: The Importance of Phenolic Compounds in the Chemical Composition of Olive Oil. U: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 1. Izd. (Preedy, V.R., Watson, R.R., ured.), Academic Press, London/Burlington/San Diego, str. 167-175.

Shao, S., Zhou, T., Tsao, R. (2011) Antimicrobials from Plants – Food Preservation and Shelf-Life Extension. U: Comprehensive Biotechnology, 2. izd, 4 (Moo-Young, M., ured.), Academic press, Amsterdam/Oxford/Waltham, str. 645-658.

Shortle, E., O'Grady, M.N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J.P. (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98** (4), 828-834.

Simic, M.G., Jovanovic, S.V. (1994) Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. U: Food Phytochemicals for Cancer Prevention, (Ho, C. T., Osawa, T., Huang, M.-T., Rosen, R. T., ured.), American Chemical Society, Washington DC.

Spinnel, E., Haglund, P. (2010) A Modular Approach to Pressurized Liquid Extraction with In-Cell Cleanup. *LC GC N A.* **28** (7), 544-552.

Škevin, D. (2016) Interna skripta iz Procesa prerade maslina i kontrole kvalitete proizvoda, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Talhaoui, N., Trabelsi, N., Taamalli, A., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Arraez-Roman, D. (2018) *Olea europaea* as Potential Source of Bioactive Compounds for Diseases Prevention. U: Studies in Natural Products Chemistry, 1. Izd., **57** (Rahman, A., ured.), Elsevier Applied Science, Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 389-411.

Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S.M., Katouzian, I. (2018) Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Yogurt Enriched by Olive Leaf Phenolics within Nanoliposomes. *J. Agr. Food Chem.* **66** (35), 9231-9240.

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

Vázquez, C.V., Rojas, M.G., Ramírez, C.A., Chávez-Servín, J.L., García-Gasca, T., Ferriz-Martínez, R.A., García, O.P., Rosado, J.L., López-Sabater, C.M., Castellote, A.I., Montemayor, H.M., de la Torre Carbot, K. (2015) Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem.* **176**, 480-486.

Zhang, T., Jeong, C.H., Cheng, W.N., Bae, H., Seo, H.G., Petriello, M.C., Han, S.G. (2018) Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. *LWT – Food Sci. and Technol.* **101**, 276-284.


Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W.C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* **13**, 20

Zoidou, E., Magiatis, P., Melliou, E., Constantinou, M., Haroutounian, S., Skaltsounis, A-L. (2014) Oleuropein as a bioactive constituent added in milk and yogurt. *Food Chem.* **158**, 319-324.

Zoidou, E., Melliou, E., Moatsou, G., Magiatis P. (2017) Preparation of functional yogurt enriched with olive-derived products. U: *Yogurt in Health and Disease Prevention*, (Shah, N. P., ured.), Academic Press, London.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Ime i prezime studenta