

Određivanje antioksidacijske aktivnosti u kiseloj i slatkoj sirutki

Tretnjak, Karmela

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:095453>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-18**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Karmela Tretnjak

6480/PT

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U
KISELOJ I SLATKOJ SIRUTKI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

Mentor: Prof. dr. sc. Rajka Božanić, red. prof.

Zagreb, 2017.

Završni rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Rajke Božanić, a uz pomoć više asistentice dr. sc. Katarine Lisak Jakopović, doc. dr. sc. Irene Barukčić i tehničke suradnice Snježane Šimunić

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI U SLATKOJ I KISELOJ SIRUTKI

Karmela Tretnjak, 0058201085

Sažetak:

Sirutka se od davnina koristi u prehrani ljudi, a posljednjih je godina postala popularna kao sastojak mnogih prehrambenih napitaka zbog svojih blagotvornih svojstava. Sirutka je izvrstan izvor visokovrijednih proteina, ugljikohidrata, vitamina, mineralnih tvari, elemenata u tragovima s niskim udjelom masti. Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost i profil mineralnih tvari u kiseloj i slatkoj sirutki, a također i kemijski sastav, tj. udio vlage i pepela te kiselost, boju, veličinu čestica i senzorska svojstva sirutke. Radikal koji se koristio za praćenje antioksidacijske aktivnosti sirutke je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), a metoda elektronska spinska rezonancija (ESR). Antioksidacijska aktivnost se određivala u svježim uzorcima sirutke i nakon sedam dana, a rezultati su pokazali da najveću antioksidacijsku aktivnost ima kisela sirutka dobivena sirenjem kravljeg mlijeka mezofilnom kulturom, odnosno sirutka koja inače zaostaje pri proizvodnji svježih sireva.

Ključne riječi: antioksidacijsko djelovanje, DPPH, ESR, kisela i slatka sirutka

Rad sadrži: 34 stranice, 14 slika, 16 tablica, 22 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *Prof. dr. sc. Rajka Božanić*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Katarina Lisak Jakopović*

Datum obrane: 19. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF SWEET AND ACID WHEY

Karmela Tretnjak, 0058201085

Abstract:

Recently, whey has become a very popular as the ingredient of many nutritional drinks. Whey is a very good source of valuable proteins, carbohydrates, vitamins, minerals, trace elements with low fat content. The aim of this work was to determine the antioxidant activity as well as mineral profile in acid and sweet whey, but also the chemical structure ie. the amount of moisture and ash, acidity, colour, particle size and the sensory properties of whey. Radical for detecting the antioxidant activity of whey was 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and the used method was electron spin resonance (ESR). Antioxidant activity was determined in fresh whey samples and after seven days, and the results showed that the highest antioxidant activity has acidic whey obtained by mesophilic culture, i.e. the whey that lags in the production of fresh cheeses.

Keywords: acid and sweet whey, antioxidative activity, DPPH, ESR

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 16 tables, 22 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *Prof. dr. sc. Rajka Božanić*

Technical support and assistance: *Ph.D. Katarina Lisak Jakopović*

Defence date: September 19th 2017

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Sirutka.....	2
2.2. Sastav i vrste sirutke.....	2
2.3. Biološki aktivne tvari.....	5
2.4. Antioksidacijsko djelovanje sirutke.....	5
2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	6
2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje.....	7
2.7. Određivanje veličine čestica laserskom difrakcijom.....	8
2.8. Određivanje profila mineralnih tvari plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (F-AAS).....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Cilj istraživanja.....	11
3.2. Materijali.....	11
3.3. Metode rada.....	11
3.3.1. Priprema sirutke.....	12
3.3.2. Određivanje mliječne masti u mlijeku.....	12
3.3.3. Određivanje kiselosti sirutke.....	13
3.3.4. Određivanje ukupne suhe tvari u sirutki sušenjem u sušioniku.....	14
3.3.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u sirutki.....	14
3.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje sirutke.....	15
3.3.7. Određivanje veličine čestica u sirutki laserskom difrakcijom.....	15
3.3.8. Senzorska analiza sirutke.....	15
3.3.9. Određivanje profila mineralnih tvari u sirutki plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (F-AAS).....	16
3.3.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti sirutke DPPH metodom.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Fizikalno - kemijske analize sirutke.....	18
4.2. Boja sirutke.....	20
4.3. Veličina čestica u sirutki.....	21
4.4. Senzorska analiza sirutke.....	22
4.5. Profil mineralnih tvari u sirutki.....	24
4.6. Antioksidacijska aktivnost sirutke određena DPPH metodom.....	26
5. ZAKLJUČCI.....	32

6. LITERATURA.....	33
--------------------	----

PRILOZI

1. Uvod

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

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

Antioksidativno svojstvo sirutke temelji se na visokom sadržaju i bioiskoristivosti aminokiseline cistein koja pomaže u sintezi glutaciona (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa.

S obzirom da sirutka sadrži vrijedne sastojke, koji dokazano imaju terapijska svojstva, trebalo bi je tretirati kao vrijedan nusproizvod pri proizvodnji sira i preraditi u razne proizvode, a ne je tretirati kao otpadni proizvod mljekara.

Cilj ovog rada bio je odrediti mineralni te kemijski sastav slatke i kisele sirutke, dobivene različitim postupcima sirenja mlijeka te ispitati utjecaj načina koagulacije kazeina na antioksidacijsku aktivnost sirutke.

2. Teorijski dio

2.1. Sirutka

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

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

Tablica 1.: Prosječna biološka vrijednost (BV) proteina sirutke i drugih proteina (Werner, 1981)

Proteini	Sirutke	Jaja	mlijeka	Govedine	kazeina	krumpira	Brašna
BV	104	100	92	78	73	69	45

2.2. Sastav i vrste sirutke

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

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

Osnovna razlika kisele i slatke sirutke je u njezinoj pH vrijednosti i kemijskom sastavu. pH vrijednost slatke sirutke kreće se u rasponu 5,8 - 6,6, dok je pH vrijednost srednje kisele sirutke između 5,8 i 5,0, a kisele sirutke manja od 5,0 (Zadow, 1993). Također, iz tablice 2 vidljivo je da slatka sirutka sadrži veći udio laktoze i proteina, nego kisela sirutka, dok je udio mineralnih tvari veći u kiseloj sirutki prvenstveno zbog manje pH vrijednost sredine pa se otapa više koloidnog Ca- fosfata i soli.

Tablica 2.: Prosječan sastav slatke i kisele sirutke (Jelen, 2011)

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

U sirutku prelazi oko 50% suhe tvari mlijeka i to uglavnom laktoza (oko 70 %), proteini sirutke u cijelosti, topljive mineralne tvari i vitamini B skupine, dok se vitamin C razgradi već tijekom proizvodnje sira (Tratnik, 2003). Drži se da bi jedna litra sirutke mogla zadovoljiti dnevnu potrebu organizma za riboflavinom (vitamin B₂) od kojeg potječe žuto-zelena boja sirutke (Lisak, 2012; Tratnik, 2013). Udjel riboflavina u sirutki može biti veći nego u mlijeku, što je rezultat aktivnosti bakterija mliječne kiseline u proizvodnji sira, pa se sirutka može koristiti i za dobivanje koncentrata tog vitamina. Kobalamin (vitamin B₁₂) i folna kiselina nalaze se u vezanom obliku s proteinima sirutke, a riboflavin je i do 95% u slobodnom obliku (Tratnik, 2003). Po hranjivoj vrijednosti, oko 3 kg sirutke je ekvivalentno 1 kg mlijeka (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997).

Tablica 3.: Sastojci suhe tvari sirutke (Hramcov, 1976)

Sastojci suhe tvari	g/100 mL	% od ukupnih
Laktoza	4,66	71,7
Proteini sirutke	0,91	14,0
Mineralne tvari	0,50	7,7
Mliječna mast	0,37	5,7
Ostalo	0,06	0,9
UKUPNO	6,50	100,0

Najvrjednija komponenta sirutke su proteini, a sastoje se od α -laktalbumina, β -laktoglobulina, imunoglobulina, laktoferina i albumina krvnog seruma. Neosjetljivi su na djelovanje kiseline ili enzima pa tijekom koagulacije ostaju nepromijenjeni. Proteini sirutke sadrže sve esencijalne aminokiseline, a njihova je vrijednost u tome što su potpuno probavljivi i iskoristivi. Proteini sirutke predstavljaju dobar izbor razgranatih aminokiselina (valin, leucin, izoleucin). Proteini sirutke imaju veću biološku vrijednost u odnosu na proteine mlijeka, a razlog tome je visoki udio lizina (40%) te cisteina i metionina (2,5 puta više). Udjel slobodnih aminokiselina ovisi o stupnju hidrolize kazeina tijekom proizvodnje sira. U slatkoj sirutki udjel slobodnih aminokiselina je otprilike 4 puta veći u odnosu na početno mlijeko, a u kiseloj sirutki čak za približno 10 puta (Božanić i Tratnik, 2012; Tratnik, 2009).

Tablica 4.: Prosječni udjel proteina u sirutki (Bird, 1996)

Proteini sirutke	% od ukupnih
β - laktoglobulin	50
α - laktalbumin	22
Imunoglobulini	12
Proteoze- peptoni	10
Albumin krvnog seruma	5
Ostalo	1

Tablica 5.: Udjel aminokiselina (mg/L) u sirutki (Davidov i Faingar, 1971)

Sirutka	Slobodne aminokiseline		U proteinima	
	Ukupne	Esencijalne	Ukupne	Esencijalne
Slatka	132,7	51,0	6490	3326
Kisela	450,0	356,0	5590	2849

Udio mineralnih tvari sirutke vrlo je promjenjiv zbog bitno različitih biokemijskih procesa u tehnologiji proizvodnje sira. U sirutku prelaze gotovo sve topljive soli i mikroelementi iz mlijeka. Kisela sirutka sadrži puno veću količinu mineralnih tvari od slatke. Uglavnom je razlika u količini kalcija, fosfata, mliječne kiseline i laktata, kojih u kiseloj sirutki ima znatno više nego u slatkoj (Božanić i sur., 2008), a osobito kalcija jer je pri većoj kiselosti sredine veća topljivost koloidnog Ca-fosfata pa nastaju topljivi Ca-fosfat i Ca-laktat (Božanić i Tratnik, 2012; Tratnik, 2009).

2.3. Biološki aktivne tvari

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

2.4. Antioksidacijsko djelovanje sirutke

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

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

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

Pretpostavlja se da je antioksidacijski i antikancerogeni učinak sirutke rezultat veće koncentracije cisteina u proteinima sirutke koji je neophodan za sintezu glutaciona (Marenjak i sur., 2006). Glutacion je najvažniji u vodi topljiv antioksidans koji se nalazi u tijelu (Herceg i Režek, 2006).

Sirutka je također izvrstan izvor mineralnih tvari u prehrani ljudi, osobito kalcija, magnezija i fosfora. Kalcij se u sirutki nalazi u obliku koji se vrlo lako resorbira, te ne služi samo za razvoj i rast kostiju, već ima i znatnu zaštitnu ulogu pri nastanku osteoporoze (Marenjak i sur. 2006).

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

Koncentracija pojedinih mineralnih tvari u mlijeku ovisi o koncentraciji mineralnih tvari u obroku krava te se i na taj način može utjecati na njihov sadržaj u mlijeku. To osobito vrijedi za jod, kobalt, mangan, molibden, selen, cink, brom i bor.

Antioksidacijsko djelovanje sirutke temelji se na visokom sadržaju i bioiskoristivosti aminokiseline cistein, koja pomaže u sintezi glutaciona (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa. GSH je tripeptid, tj. sastoji se od glicina, glutamata i cisteina. Cistein sadrži tiolnu grupu koja služi kao aktivni agens u sprječavanju oksidacije i oštećenja tkiva (Herceg i Režek, 2006). Kao antioksidans, glutation je najefikasniji u reduciranom obliku. Riboflavin, niacinamid i glutation reduktaze su bitni kofaktori u sintezi reduciranog oblika glutaciona. Glutacion u formi antioksidacijske komponente sirutke istražuje se kao sredstvo za usporavanje procesa starenja.

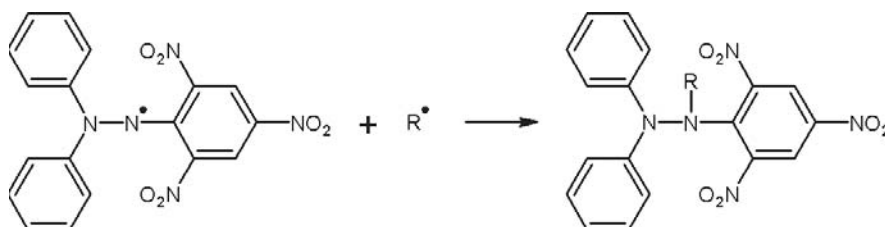
Istraživanja pokazuju da proteini sirutke imaju i povoljan učinak u liječenju arteroskleroze, cistične fibroze, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, a također preventivno djeluju i na razvoj raka, naročito raka dojke i debelog crijeva (Jašić, 2010).

2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Elektronska spinska (ESR) ili paramagnetska rezonancija (EPR) spektroskopska je metoda za detektiranje nesparenih elektrona, tj. prijelaz nesparenih elektrona u primijenjenom magnetskom polju koji se nalaze u mnogim materijalima, kao što su slobodni radikali, mnogi ioni prijelaznih metala, defekti u materijalu. Spin elektronu daje magnetski moment zbog čega se paramagnetički (nespareni) elektroni stavljeni u vanjsko magnetsko polje orijentiraju paralelno ili antiparalelno u odnosu na smjer magnetskog polja prilikom čega dolazi do

cijepanja energijskih razina. Primjenom mikrovalnog zračenja određene frekvencije elektron se pobuđuje te prelazi iz niže u višu energijsku razinu. Da bi došlo do prijelaza, vanjsko magnetsko polje mora postići takvu snagu da razlika energije između dvije energijske razine točno odgovara primijenjenoj frekvenciji mikrovalnog zračenja. To se postiže posmicanjem magnetskog polja dok je uzorak izložen mikrovalnom zračenju konstantne frekvencije. Detekcija apsorpcije zračenja čija je energija jednaka razlici između energetske razine temelj je EPR spektroskopije (Sabu i Ranimol, 2010; Junk, 2012).

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



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

2.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje

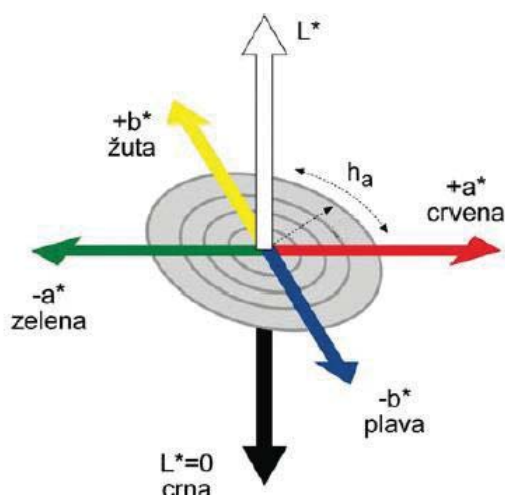
Spektrofotometrija se temelji na ovisnosti energije zračenja i kemijskog sastava tvari. Za određivanje u UV, Vis i IR dijelu spektra upotrebljavaju se instrumenti, odnosno spektrofotometri. Najvažniji dijelovi instrumenta koji se primjenjuju u apsorpcijskoj spektrofotometriji jesu: izvor svjetlosti,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

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

Kako čovjekovo oko vidi boju ovisi o stimulaciji receptora za crvenu, zelenu i plavu komponentu, pa su zato potrebne tri vrijednosti kako bi se opisale sve moguće boje.

Stručnjaci su razvili mnoge sustave boja, a najraširenija je primjena XYZ i CIE $L^*a^*b^*$ sustava boja. U XYZ sustavu boja primjenjuju se X, Y i Z oznake za komponente boje, pri čemu X i Y oznaka označavaju koordinate boje, a Z svjetlinu. CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja zasnovan je na suprotnoj teoriji boja. Funkcija svjetline L^* daje skalu neutralne boje od crne do bijele (od 0 do 100 jedinica svjetline), a kromatičnost boje definira se u odnosu na neutralnu os koja ima vrijednost 0 kromatičnosti. CIE a^* je koordinata za crvenu-zelenu, a CIE b^* za žutu-plavu (slika 2).

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



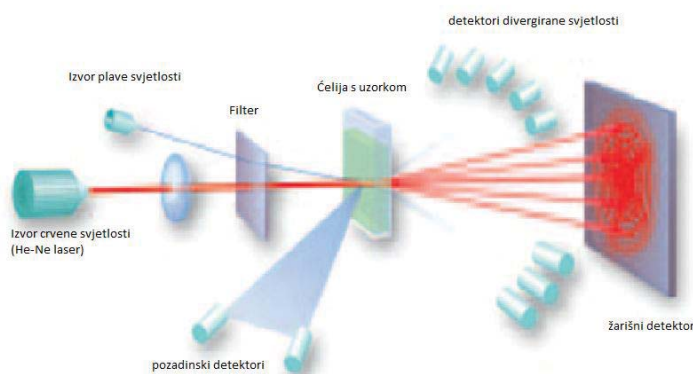
Slika 2.: CIE $L^*a^*b^*$ prostor boja (Anonymous 2)

2.7. Određivanje veličine čestica laserskom difrakcijom

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

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

raspršene svjetlosti pod raznim kutovima te dobavnu jedinicu koja je odgovorna za raspršenje i ravnomjernu raspodjelu čestica u mjernoj ćeliji (slika 3).



Slika 3.: Princip rada laserskog analizatora (Anonymous 3)

2.8. Određivanje profila mineralnih tvari plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (F-AAS)

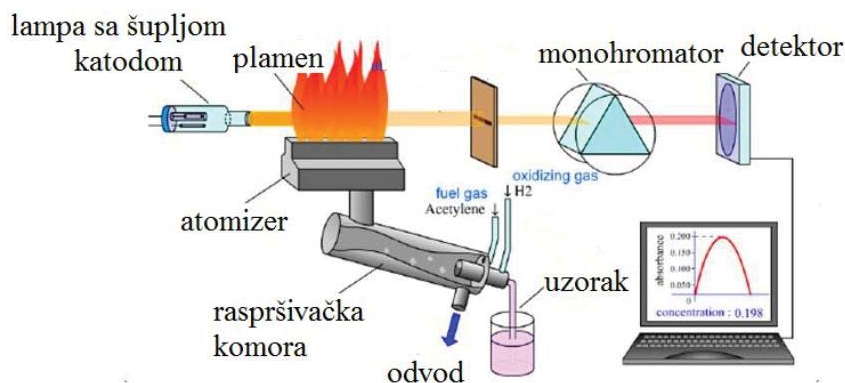
Plamena atomska apsorpcijska spektrometrija je jedna od najčešćih metoda koja se koristi za analizu makro i mikroelemenata mlijeka i mliječnih proizvoda. Razlog tome je jednostavnost postupka, velika brzina određivanja, velika specifičnost, niska granica detekcije za veliki broj elemenata (osobito za elemente u tragovima), mogućnost određivanja većeg broja elemenata u istom uzorku i istim instrumentom.

Pomoću AAS danas se može odrediti veliki broj elemenata. Rezonancijske linije većeg broja metala javljaju se u području valne duljine između 190 i 850 nm, a nemetala ispod 190 nm (Đorđević i Maćej, 1982).

Prilikom atomske apsorpcije, atom u osnovnom stanju apsorpira svjetlosnu energiju specifične valne duljine te prelazi u pobuđeno stanje tako da je količina apsorbirane svjetlosti proporcionalna broju atoma u uzorku. Mjereći količinu apsorbirane svjetlosti moguće je kvantitativno odrediti količinu analita. Korištenje specifičnih izvora svjetlosti i precizan odabir valnih duljina omogućuju specifično određivanje pojedinih elemenata u prisustvu drugih. U atomskoj apsorpciji, dovođenjem toplinske energije, kemijski spojevi u uzorku prevode se u slobodne atome pri čemu većina atoma ostaje u osnovnom stanju te su sposobni apsorbirati svjetlost iz izvora svjetlosti (Beaty i Kerber, 1993).

Osnovni dijelovi apsorpcijskog spektrometra su:

- Izvor svjetlosti koji emitira spektar ispitivanog elementa (šuplja katodna lampa)
- Čelija u kojoj se atomizira uzorak (plamen)
- Monokromator za raspršenje svjetlosti
- Detektor koji mjeri intenzitet svjetlosti i pojačava signal
- Zaslون koji prikazuje očitavanje rezultata nakon što je svjetlost obrađena elektronikom instrumenta



Slika 4.: Princip rada apsorpcijskog spektrometra (Anonymous 4)

Kako bi došlo do atomske apsorpcije, potrebno je iz tekućeg uzorka dobiti atome koji imaju sposobnost apsorpiranja svjetlosti. Lampa sa šupljom katodom emitira svjetlost koja prolazi kroz plamenik. Uzorak se prvo raspršivanjem aspirira u plamenu komoru gdje se kao aerosol miješa s gorivom i oksidirajućim plinovima. Zatim slijedi proces isparavanja odnosno desolvacije kojim se uklanja otapalo. Daljnjom primjenom topline dolazi do rastapanja, a potom i do isparavanja uzorka. Daljnjim zagrijavanjem dolazi do disocijacije molekule u individualne atome koji su sposobni apsorbirati svjetlost. Temperatura plamena je važan parametar u plamenoj tehnici te su najčešće korišteni plameni u F-AAS smjesa zrak/acetilen i N_2O /acetilen. Iza plamenika nalazi se monokromator koji izdvaja rezonantnu liniju te je registrira na detektoru (Beaty i Kerber, 1993; Đorđević i Maćej, 1982).

Prilikom analize makro i mikroelemenata u mlijeku i mliječnim proizvodima važna je dobra priprema uzorka kako bi se dobili pouzdani rezultati. To podrazumijeva uklanjanje organske tvari i potencijalnih interferenata. Dva osnovna postupka korištena za pripremu uzorka su suho i mokro spaljivanje, a standardna metoda kod određivanja mineralnog sastava mlijeka i mliječnih proizvoda je suho spaljivanje, tj. priprema pepela (Đorđević i Maćej, 1982).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja u ovom radu bio je odrediti kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i profil mineralnih tvari u sirutkama dobivenih grušnjem kravljeg mlijeka sirilom, mezofilnom kulturom i kiselinom.

3.2. Materijali

Materijali koji su korišteni za pripremanje kisele i slatke sirutke te provedbu analiza:

1. Svježe kravlje mlijeko s mljekomata (oko 4,2 % m.m.)
2. Liofilizirana mezofilna kultura (Chr. Hansen's Lab. Danska CHN-22, DVS: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovara diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)
3. Sirilo (jačina 1:600)
4. Octena kiselina (11 %-tna otopina)
5. Izoamilni alkohol
6. Sumporna kiselina (90-91 %-tna otopina)
7. Natrijeva lužina (0,1 M otopina)
8. 2 %-tna alkoholna otopina fenolftaleina
9. Destilirana voda
10. Radikal DPPH otopljen u etanolu

3.3. Metode rada

Za dobivanje kisele i slatke sirutke korišteno je svježe punomasno kravlje mlijeko s mljekomata (oko 4,2 % m.m.) prethodno obrano na centrifugalnom separatoru do oko 1 % m.m.

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

3.3.1. Priprema sirutke

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

Svaka vrsta sirutke se proizvela iz jedne litre obranog mlijeka.

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

Od jedne litre obranog mlijeka oduzelo se 100 mL u koje je stavljeno 0,13 g liofilizirane mezofilne kulture CHN-22. Nakon toga se mlijeko sa kulturom stavilo na aktivaciju u termostat na 30°C tijekom 30 min. Aktivirana mezofilna kultura se zatim inokulirala u ostatak (900 mL) obranog mlijeka te je uslijedila inkubacija u termostatu na 30°C tijekom 24 sata kako bi se mlijeko podsirilo i dobila kisela sirutka.

b) Priprema slatke sirutke - sirenje obranog mlijeka sirilom

U jednu litru obranog mlijeka stavljena je određena količina sirila (izračunata prema formuli [1]), jakosti 1:600. Nakon dodavanja sirila u mlijeko uslijedila je inkubacija u termostatu na 35°C tijekom 35 min kako bi kazein koagulirao i odvojila se slatka sirutka.

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

c) Priprema kisele sirutke - sirenje octenom kiselinom

Obrano mlijeko se zagrije na 35°C i zatim se polako dodaje 11 % -tna otopina octene kiseline dok se ne postigne pH vrijednost od oko 4.6, što je ujedno i izoelektrična točka kazeina pa dolazi do umrežavanja kazeina, odnosno stvaranja grušća i otpuštanja kisele sirutke.

3.3.2. Određivanje mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom po Gerberu

Metoda se temelji na kemijskom otapanju proteina mlijeka (kazeina) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Radi lakšeg odvajanja mliječne masti dodaje se izoamilni- alkohol koji smanjuje površinsku napetost, odnosno služi za razdvajanje masne i

vodene faze. Mast se odvoji centrifugiranjem, a količina se očitava na skali butirometra pri točno određenoj temperaturi (65°C).

U butirometar se otpipetira 10 mL koncentrirane sumporne kiseline, zatim 10 mL mlijeka i na kraju 1 mL izoamilnog- alkohola. Butirometar se začepi, a sadržaj se promiješa okretanjem butirometra sve dok svijetlo smeđa boja otopine ne promijeni boju u tamno smeđu, što je znak završetka reakcije i mućkanja. Butirometar se zatim stavi u centrifugalni separator temperiran na 65°C na 5 min. Nakon centrifugiranja, očitava se udio mliječne masti na skali butirometra.

Budući da se miješanjem mlijeka i sumporne kiseline butirometar jako zagrijava (preko 90°C), butirometar je potrebno prije mućkanja zamotati u krpu.

3.3.3. Određivanje kiselosti sirutke

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

pH vrijednost je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini i mjerilo je za aktivnu kiselost sirutke. Prije samog mjerenja, elektroda pH-metra se ispere destiliranom vodom i kalibrira. Elektroda se zatim polako uroni u čašu sa sirutkom, lagano miješa i očitava se kad se pH-vrijednost na zaslonu ustali. Nakon mjerenja, elektroda se ispere destiliranom vodom i uroni u otopinu KCl u kojoj se čuva do sljedeće uporabe.

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

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

3.3.4. Određivanje ukupne suhe tvari u sirutki sušenjem u sušioniku

Ta je metoda referentna za određivanje udjela ukupne suhe tvari.

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

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

Udio suhe tvari izračuna se prema formuli [4]:

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

3.3.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari) u sirutki

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

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

Udio pepela izračuna se prema jednadžbi [5]:

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

3.3.6. Spektrofotometrijsko određivanje boje sirutke

Uzorci sirutke se stave u kivete i redom snimaju kolorimetrom. Dobiveni rezultati su vrijednosti L^* , a^* , i b^* . Prilikom mjerenja je potrebno precizno namjestiti kolorimetar točno iznad kivete, a kivetu prvotno smjestiti u tamnu komoricu kako na dobivene rezultate ne bi bilo utjecaja svjetlosti izvana.

3.3.7. Određivanje veličine čestica u sirutki laserskom difrakcijom

Uzorci sirutke homogenizirani su protresanjem plastičnih boca nakon čega je izmjerena veličina čestica laserskim senzorom Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). Uzorak se unosi i homogenizira u disperznoj jedinici uređaja. Homogeni uzorak prolazi kroz mjernu ćeliju na koju je usmjerena laserska zraka. Čestice raspršuju svjetlost pod kutom koji je obrnuto proporcionalan njihovoj veličini. Detektor optičkog sustava sastavljen je od više manjih optičkih detektora gdje svaki od njih prikuplja pod različitim kutovima odbijenu svjetlost.

Rezultati su prikazani grafički kao odnos udjela čestica određene veličine u postocima i veličine čestica u μm .

3.3.8. Senzorska analiza sirutke

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

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

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

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

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

3.3.9. Određivanje profila mineralnih tvari u sirutki plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom (F-AAS)

Određivanje mineralnog sastava uzoraka kisele i slatke sirutke provedeno je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.

3.3.10. Određivanje antioksidacijske aktivnosti sirutke DPPH metodom

Sposobnost gašenja DPPH radikala jedna je od najpopularnijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti hrane.

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

Kao objekt antioksidacijskog djelovanja sirutke korišten je radikal DPPH otopljen u etanolu. Koncentracija DPPH u etanolu bila je 0,15 mmol/L.

Uzorci za EPR mjerenja pripremani su na sljedeći način:

1. pripremljena je otopina DPPH radikala u etanolu koncentracije 0,15 mmol/dm³,
2. snimljen je spektar otopine DPPH radikala kojoj je dodana izvorska voda „Kala“ (slijepa proba),
3. otopini radikala dodan je određeni volumen uzorka sirutke,

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

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

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

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

4. Rezultati i rasprava

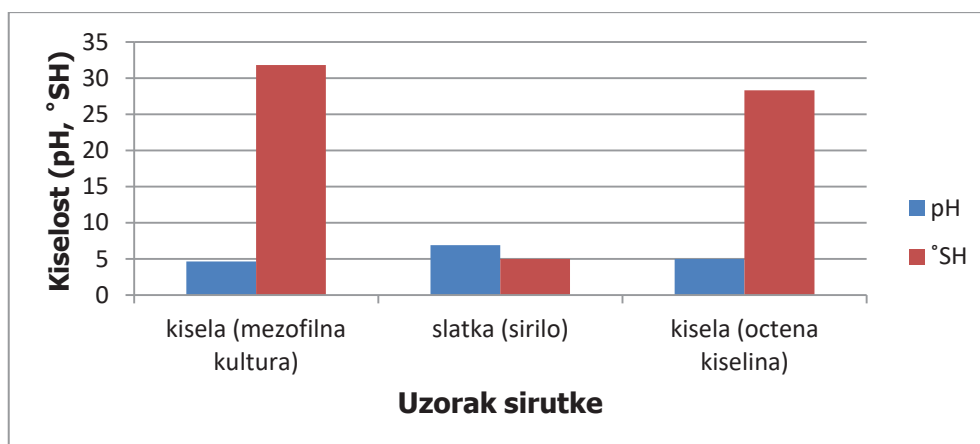
U ovom završnom radu određivana je antioksidacijska aktivnost i profil mineralnih tvari kisele i slatke sirutke proizvedene iz kravljeg mlijeka različitim postupcima sirenja. Također je određivan i kemijski sastav sirutke, tj. udio vlage, pepela te kiselost, boja, veličina čestica i senzorska svojstva sirutke.

4.1. Fizikalno - kemijske analize sirutke

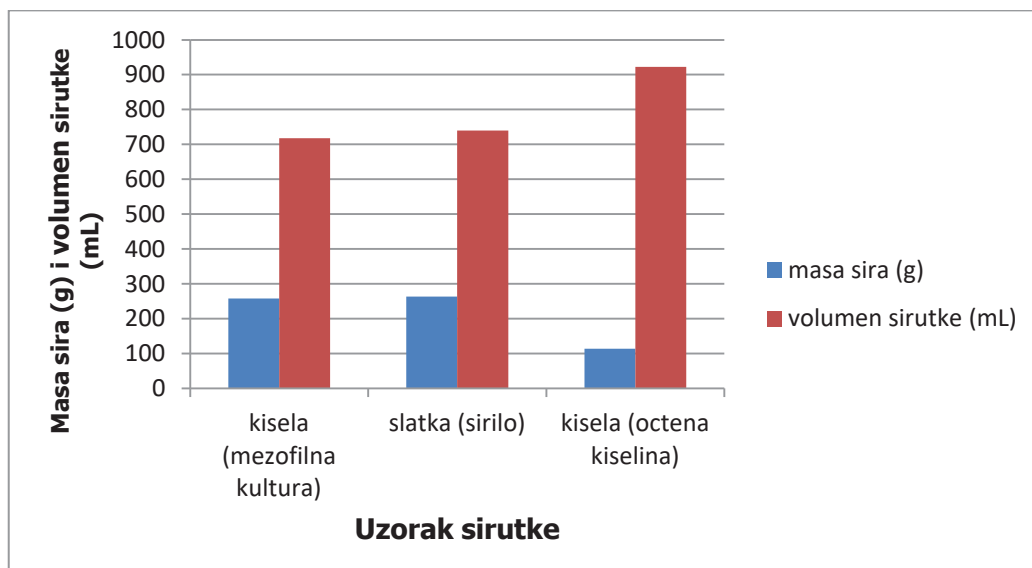
Tablicom 8 prikazan je kemijski sastav kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, slatke sirutke dobivene sirenjem mlijeka sirilom te kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom.

Tablica 8.: Kemijski sastav kisele i slatke sirutke

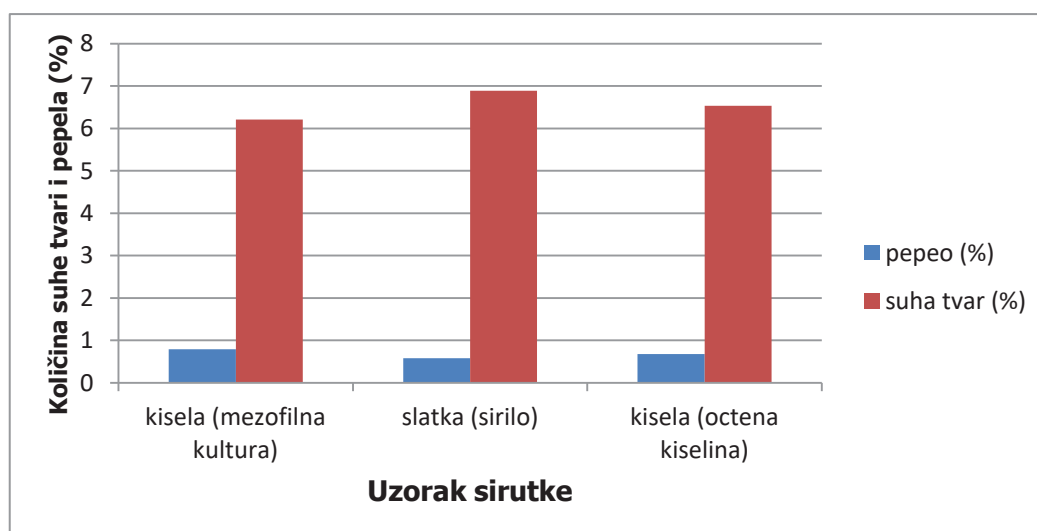
Vrsta sirutke	Broj mjerenja	pH	°SH	masa sira (g)	volumen sirutke (mL)	prinos sira (%)	pepeo (%)	suha tvar (%)
kisela sirutka (mezofilna kultura)	1	5,00	29,4	270,24	710,0	26,29	0,8128	6,4075
	2	4,98	27,2	246,03	725,0	23,93	0,7617	6,0078
	srednja vrijednost:	4,99	28,3	258,14	717,5	25,11	0,7873	6,2077
slatka sirutka (sirilo)	1	6,92	4,8	292,61	705,0	28,46	0,5724	6,9537
	2	6,86	5,2	234,52	775,0	22,81	0,5819	6,8274
	srednja vrijednost:	6,89	5,0	263,57	740,0	25,64	0,5772	6,8906
kisela sirutka (octena kiselina)	1	4,56	33,0	112,53	910,0	10,95	0,6782	6,6869
	2	4,71	30,6	115,69	935,0	11,25	0,6792	6,3704
	srednja vrijednost:	4,64	31,8	114,11	922,5	11,10	0,6787	6,5287



Slika 5.: Usporedba kiselosti kisele i slatke sirutke



Slika 6.: Usporedba mase sira i volumena sirutke dobivenih sirenjem mlijeka različitim postupcima



Slika 7.: Usporedba količine suhe tvari i pepela u kiseloj i slatkoj sirutki

Dobiveni rezultati (tablica 8; slika 5) prikazuju da je slatka sirutka imala značajno veću pH vrijednost i manju titracijsku kiselost od kisele sirutke. pH vrijednost slatke sirutke iznosila je 6,89 (5,0 °SH), dok je pH vrijednost kisele sirutke, dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, iznosila 4,99 (28,3 °SH), a one dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom 4,64 (31,8 °SH). Dobivene vrijednosti pH za kisele sirutke slažu se sa podacima iz literature, dok je pH vrijednost slatke sirutke nešto veća u odnosu na onu navedenu u literaturi (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011).

Udio suhe tvari u analiziranim uzorcima sirutke bio je u rasponu od 6,21 do 6,89 % (tablica 8; slika 7). Najveći udio suhe tvari imala je slatka sirutka (6,89 %), zatim kisela dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom (6,53 %), dok kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom imala najmanji udio suhe tvari (6,21 %). Ako se udio suhe tvari usporedi sa pH vrijednosti sirutke, može se vidjeti da kisela sirutka ima manji udio suhe tvari, a prema tome i manji udio laktoze nego slatka sirutka (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011). Upravo zbog toga je pH vrijednost kisele sirutke manja od pH vrijednosti slatke sirutke, odnosno kiselim koagulacijom kazeina nastaje više mliječne kiseline nego enzimskom koagulacijom (Lučan, 2015).

Udio pepela je u analiziranim uzorcima sirutke bio u rasponu od 0,58 do 0,79 % (tablica 8; slika 7). Najveći udio pepela imala je kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (0,79 %), zatim kisela dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom (0,68 %), dok je slatka sirutka imala najmanji udio pepela (0,58 %). Dobiveni rezultati se podudaraju s podacima navedenima u literaturi (Božanić i Tratnik, 2012).

Iz tablice 8 vidljivo je da je prinos sira dobivenog sirenjem mlijeka sirirom bio je najveći i iznosio je 25,64 %, a prinos sira dobivenog sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom iznosio je 25,11 %. Prinos sira dobivenog sirenjem mlijeka octenom kiselinom bio je najmanji i iznosio je samo 11,1 %. Ako se prinosi sireva usporede s bojom sirutke određivanom kolorimetrom (poglavlje 4.2.), može se vidjeti da sirutka dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom ima najmanju a^* vrijednost, odnosno najmanje je zelena. Upravo je u tako dobivenoj sirutki boja bila mliječna što ukazuje na zaostali kazein, a to se vidi i po malom prinosu sira koji je iznosio svega 11,1%.

4.2. Boja sirutke

Rezultati kolorimetrijske analize boje sirutke prikazani su u tablici 9.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su svi uzorci sirutke imali vrijednost parametra a^* negativnu, što znači da prevladava zelena boja. Slatka sirutka je imala najnegativniju vrijednost parametra a^* (-0,27), zatim kisela (mezofilna kultura) sirutka (-0,16), dok je kisela (octena kiselina) imala vrijednost parametra a^* najbližu nuli (-0,05). Vrijednost parametra b^* za sve uzorke sirutke je bila pozitivna, što znači da prevladava žuta boja. Kisela (mezofilna kultura) sirutka je imala najmanju vrijednost parametra b^* (15,81), zatim kisela (octena kiselina) sirutka (17,36), dok je slatka sirutka imala najveću vrijednost parametra b^* (18,79). Što se tiče vrijednosti parametra L^* , koji označava svjetlinu, najsvjetliji je bilo uzorak slatke

sirutke (85,56), zatim uzorak kisele (mezofilna kultura) sirutke (83,27), dok je uzorak kisele (octena kiselina) sirutke bio najmanje svjetline (74,58). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su svi uzorci sirutke svijetle boje (najviše slatka sirutka). Prema parametru a^* svi se nalaze u zelenom spektru (najviše slatka sirutka), a prema parametru b^* u žutom spektru (najviše slatka sirutka). Ta zeleno-žuta boja potječe od riboflavina (vitamina B₂) (Popović-Vranješ i Vujičić, 1997), a prema dobivenim vrijednostima za parametre a^* i b^* može se zaključiti da je slatka sirutka najbogatija riboflavinom.

Tablica 9.: Rezultati kolorimetrijskog određivanja boje kisele i slatke sirutke

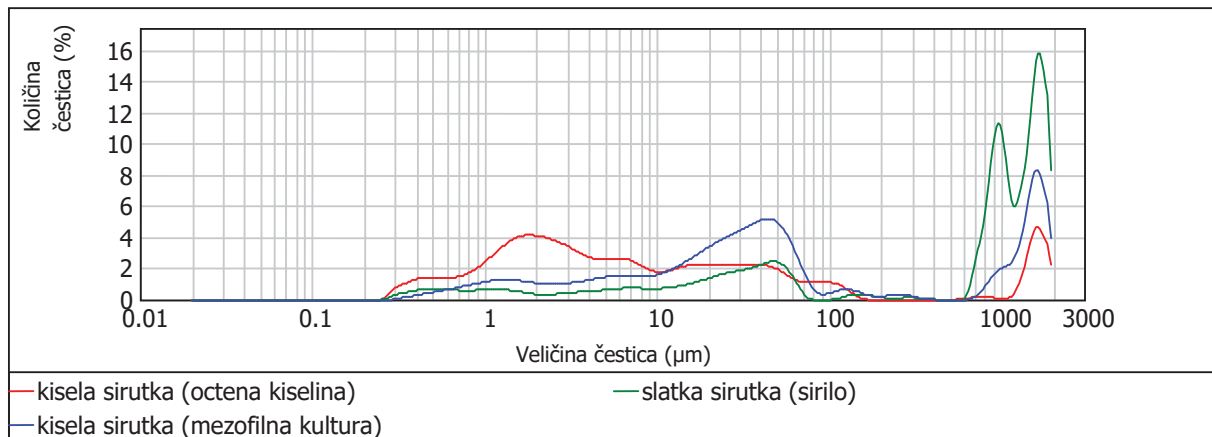
Vrsta sirutke	Broj mjerenja	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
kisela (mezofilna kultura)	1	87,68	-0,2	16,03
	2	78,86	-0,11	15,59
Srednja vrijednost:		83,27	-0,16	15,81
slatka (sirilo)	1	87,94	-0,3	18,05
	2	83,18	-0,23	19,52
Srednja vrijednost:		85,56	-0,27	18,79
kisela (octena kiselina)	1	84,03	-0,03	18,15
	2	65,13	-0,07	16,57
Srednja vrijednost:		74,58	-0,05	17,36

4.3. Veličina čestica u sirutki

U svrhu utvrđivanja razlike veličine čestica između kisele i slatke sirutke, određena je distribucija veličina čestica. Prikaz svih prosječnih distribucija veličine čestica nalazi se na slici 8.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se najveći pikovi pojavljuju u području 1000 - 1500 μm , a odgovaraju prosječnom promjeru čestica α -laktalbumina (Lučan, 2015). Udio α -laktalbumina u slatkoj sirutki bio je 11,0 %. U kiseljoj sirutki dobivenoj podsiravanjem mezofilnom kulturom udio α -laktalbumina bio je 8,4 %, dok je u kiseljoj sirutki dobivenoj podsiravanjem octenom kiselinom udio α -laktalbumina bio najmanji i iznosio je svega 4,9 %. Pikovi se također pojavljuju i u području između 0,5 i 100 μm , a odgovaraju promjeru manjih peptida. U tom području slatka sirutka je imala najveći udio čestica promjera 70 μm (2,5 %), kisela sirutka (mezofilna kultura) je također imala najveći udio čestica promjera 70 μm (5,2 %), dok je kisela sirutka (octena kiselina) imala najveći udio čestica promjera 2,5 μm (4,2 %). Iz

dobivenih rezultata može se zaključiti da je slatka sirutka bolji izvor α -laktalbumina, dok kisela sirutka sadrži veći udio manjih peptida.



Slika 8.: Usporedba distribucije veličine čestica u kiseloj i slatkoj sirutki

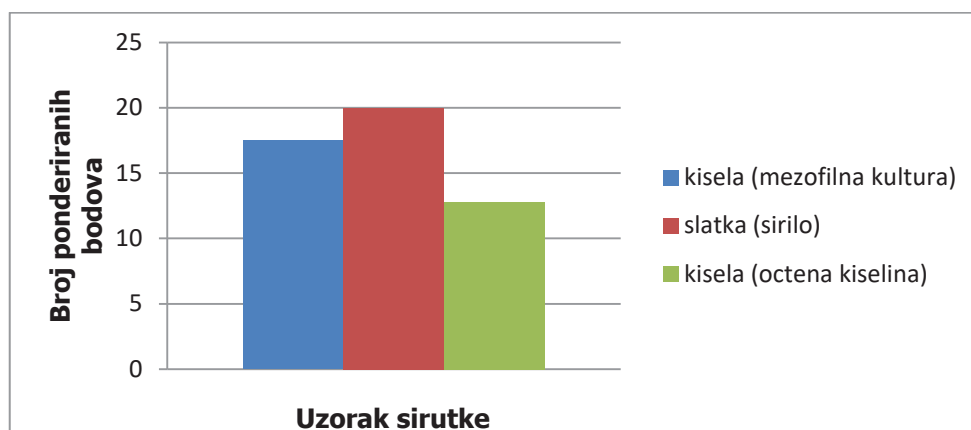
3.4. Senzorska analiza sirutke

Rezultati senzorske analize sirutke prikazani su tablicom 10 te slikom 9.

Svi uzorci sirutke su za senzorsko svojstvo za boju i talog dobili prosječnu ocjenu 5 što je i maksimalna ocjena. Izgled slatke i kisele (octena kiselina) sirutke je također ocijenjen prosječnom ocjenom 5, dok je kisela sirutka dobivena podsiravanjem mezofilnom kulturom ocijenjena ocjenom 4,5 zbog prisutne kazeinske prašine. Miris slatke sirutke i kisele (mezofilna kultura) sirutke je ocijenjen ocjenom 5, dok je kisela sirutka (octena kiselina), zbog jakog mirisa na kiselinu, ocijenjena ocjenom 3. Najveća razlika u ocjenama je bila za okus, koji ujedno i najviše utječe na ukupnu ocjenu uzorka sa faktorom značajnosti 1,6 i nosi 40 % ponderiranih bodova. Jedino je slatka sirutka bila karakterističnog okusa pa je ocijenjena ocjenom 5. Kisela sirutka (mezofilna kultura) je zbog blago kiselog okusa ocijenjena ocjenom 3,5, dok je kisela sirutka (octena kiselina), zbog prekiselog okusa, ocijenjena ocjenom 1. Prema dobivenim rezultatima slatka sirutka pripada odličnoj kategoriji kakvoće (20 ponderiranih bodova), kisela sirutka (mezofilna kultura) dobroj kategoriji kakvoće (17,5 ponderiranih bodova), dok je kisela sirutka (octena kiselina) još prihvatljiva (12,8 ponderiranih bodova).

Tablica 10.: Senzorska svojstva kisele i slatke sirutke

Senzorsko svojstvo	Broj mjerenja	Vrsta sirutke		
		kisela (mezofilna kultura)	slatka (sirilo)	kisela (octena kiselina)
okus	1	4	5	1
	2	3	5	1
	srednja vrijednost	3,5	5	1
	Max. bodovi	5,6	8	1,6
miris	1	5	5	3
	2	5	5	3
	srednja vrijednost	5	5	3
	Max. bodovi	2	2	1,2
boja	1	5	5	5
	2	5	5	5
	srednja vrijednost	5	5	5
	Max. bodovi	2	2	2
talog	1	5	5	5
	2	5	5	5
	srednja vrijednost	5	5	5
	Max. bodovi	7	7	7
izgled	1	5	5	5
	2	4	5	5
	srednja vrijednost	4,5	5	5
	Max. bodovi	0,9	1	1
KATEGORIJA KAKVOĆE		DOBRA	ODLIČNA	JOŠ PRIHVATLJIVA



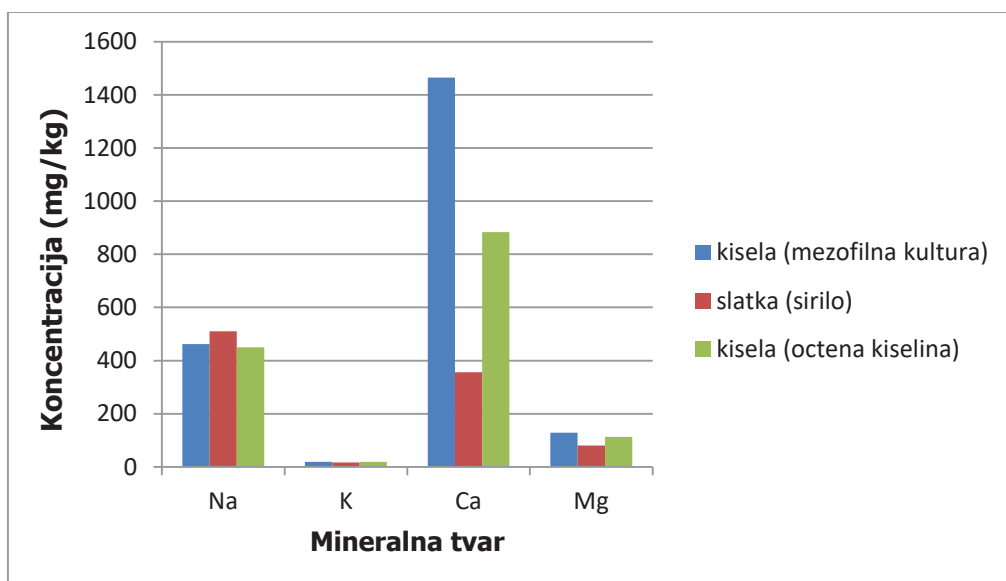
Slika 9.: Usporedba broja ponderiranih bodova kisele i slatke sirutke

4.5. Profil mineralnih tvari u sirutki

Rezultati analize mineralnog sastava uzoraka sirutke prikazani su u tablicama 11 i 12, te na slici 10.

Tablica 11.: Koncentracija (mg/kg) makroelemenata u kiseloj i slatkoj sirutki

Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj mjerjenja	Vrsta sirutke		
		kisela (mezofilna kultura)	slatka (sirilo)	kisela (octena kiselina)
Na	1	436,66	508,96	430,98
	2	488,32	510,68	468,66
	srednja vrijednost	462,49	509,82	449,82
K	1	18,25	17,48	18,47
	2	19,45	16,57	18,80
	srednja vrijednost	18,85	17,03	18,64
Ca	1	1385,24	362,03	952,09
	2	1544,42	350,42	814,29
	srednja vrijednost	1464,83	356,23	883,19
Mg	1	121,22	81,37	112,05
	2	136,02	80,77	113,21
	srednja vrijednost	128,62	81,07	112,63



Slika 10.: Usporedba profila mineralnih tvari u kiseloj i slatkoj sirutki

Tablica 12.: Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$) elemenata u tragovima u kiseloj i slatkoj sirutki

Koncentracija ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Broj mjerenja	Vrsta sirutke		
		kisela (mezofilna kultura)	slatka (sirilo)	kisela (octena kiselina)
Al	1	102,53	90,37	85,65
	2	162,78	89,47	226,87
	srednja vrijednost	132,66	89,92	156,26
Fe	1	146,16	74,36	92,61
	2	119,34	117,97	104,91
	srednja vrijednost	132,75	96,16	98,76
Cu	1	39,26	15,47	23,53
	2	14,38	88,71	16,90
	srednja vrijednost	26,82	52,09	20,21
Zn	1	4824,28	87,04	833,61
	2	5113,34	143,83	537,02
	srednja vrijednost	4968,81	115,44	685,32
Se	1	10,42	12,89	9,73
	2	9,71	9,59	8,99
	srednja vrijednost	10,07	11,24	9,36
Mo	1	41,58	49,04	45,94
	2	48,83	52,26	55,99
	srednja vrijednost	45,21	50,65	50,97
Ba	1	77,35	<10	25,80
	2	85,65	<10	18,85
	srednja vrijednost	81,50	<10	22,32
V, Cr, Mn, Co, Ni, As, Ag, Cd, Pb	1	<10	<10	<10
	2	<10	<10	<10
	srednja vrijednost	<10	<10	<10

Podaci iz tablice 11 prikazuju koncentraciju makroelemenata (Na, K, Ca i Mg) u analiziranim uzorcima sirutke, a podaci iz tablice 12 prikazuju koncentraciju elemenata u tragovima. Iz dobivenih rezultata (tablica 11 i 12; slika 10) vidljivo je da su uzorci kisele sirutke sadržavali veću koncentraciju mineralnih tvari od slatke sirutke, a kalcij je bio zastupljen u najvećoj količini. Najveću koncentraciju kalcija je sadržavala kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom (1464,83 mg/kg), dok kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom sadržavala 883,19 mg/kg. Koncentracija kalcija u slatkoj sirutki je bila četiri puta manja (356,23 mg/kg). Iz podataka iz tablice 11 i slike 10 vidljivo je da je kisela sirutka (mezofilna kultura) sadržavala najveću koncentraciju makroelemenata (Ca, Mg i K), osim natrija. Najveću koncentraciju natrija je sadržavala slatka sirutka (509,82 mg/kg). Dobiveni rezultati se slažu sa podacima iz literature (Božanić i Tratnik, 2012; Jelen, 2011).

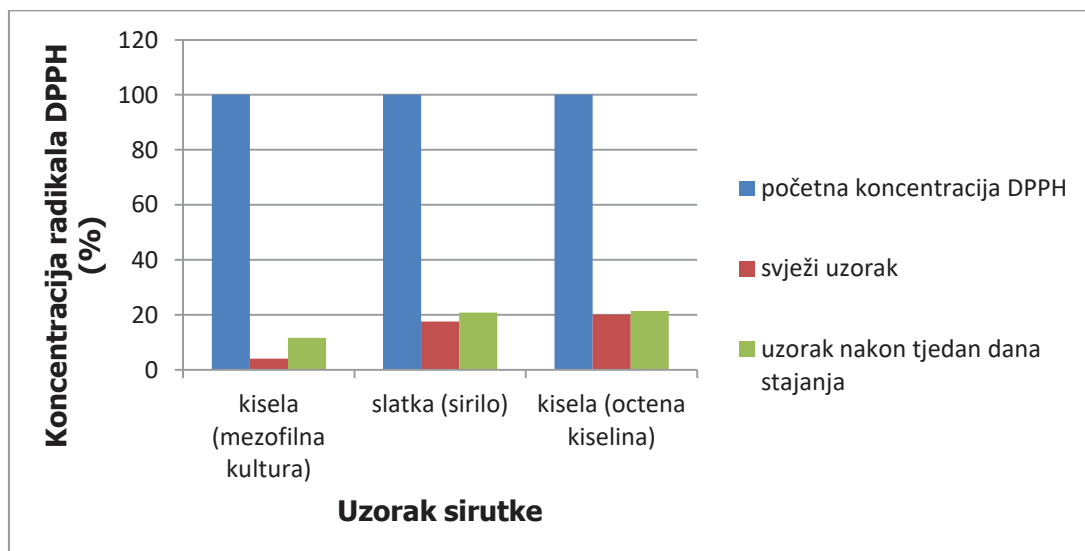
Podaci iz tablice 12 pokazuju da je od elemenata u tragovima, u najvećoj koncentraciji bio prisutan cink i to u uzorku kisele sirutke (mezofilna kultura) u koncentraciji od 4968,81 µg/kg, a kisela sirutka (mezofilna kultura) je sadržavala i najveću koncentraciju željeza (132,75 µg/kg) i barija (81,50 µg/kg). Kisela sirutka (octena kiselina) je sadržavala najveću koncentraciju aluminijsa (156,26 µg/kg) i molibdena (50,97 µg/kg), a slatka sirutka najveću koncentraciju bakra (52,09 µg/kg) i selenija (11,24 µg/kg). Koncentracija ostalih elemenata (V, Cr, Mn, Co, Ni, As, Ag, Cd i Pb) je u svim uzorcima sirutke bila manja od 10 µg/kg. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je kisela sirutka bolji izvor topljivih mineralnih tvari (osobito kalcija) od slatke sirutke jer je način koagulacije kazeina kod ta dva postupka sirenja potpuno različit. Kod kisele koagulacije kazeina dolazi do otapanje Ca- fosfatnih mostova pa je količina kalcija u sirutki značajno veća nego kod enzimske koagulacije. Kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, sadrži veću količinu mineralnih tvari od kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom.

4.6. Antioksidacijska aktivnost sirutke određena DPPH metodom

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

Tablica 13.: Usporedba ukupnoga pada koncentracije radikala DPPH u 20 minuta u svježim uzorcima kisele i slatke sirutke te u istim uzorcima čuvanim 7 dana pri temp. hladnjaka

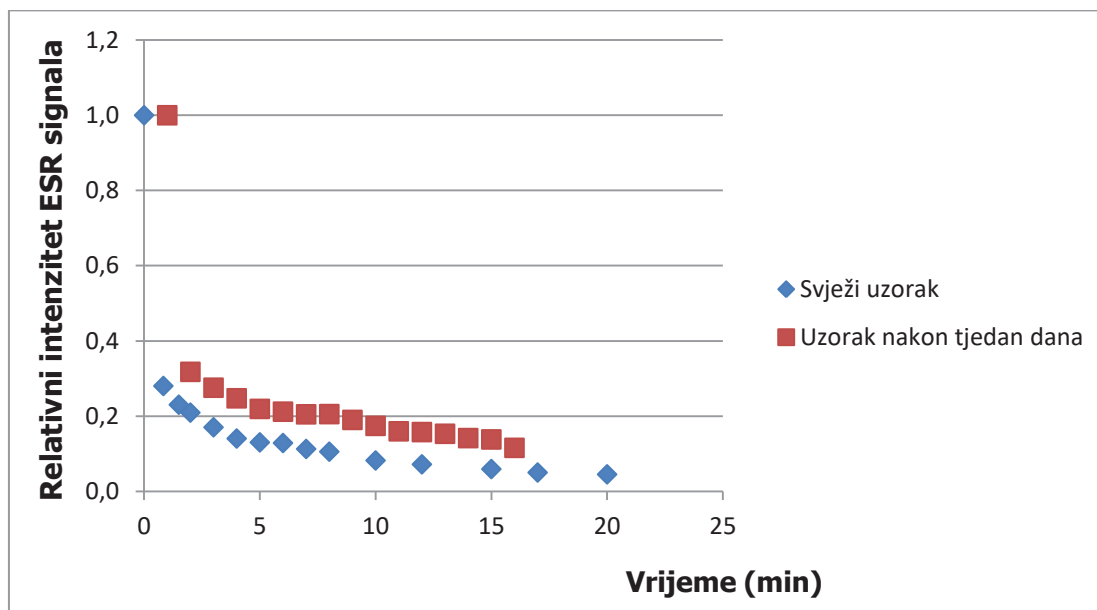
Vrsta sirutke	Početna koncentracija DPPH (%)	Svježi uzorak (% DPPH)	Uzorak nakon 7 dana (% DPPH)
kisela (mezofilna kultura)	100	4,000	11,6362
slatka (sirilo)	100	17,510	20,8080
kisela (octena kiselina)	100	20,139	21,4074



Slika 11.: Usporedba ukupnog pada koncentracije radikala DPPH u 20 minuta u svježim uzorcima kisele i slatke sirutke te u istim uzorcima čuvanim 7 dana pri temp. hladnjaka

Tablica 14.: Relativni intenzitet ESR signala za svježi uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom te za isti uzorak nakon 7 dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka

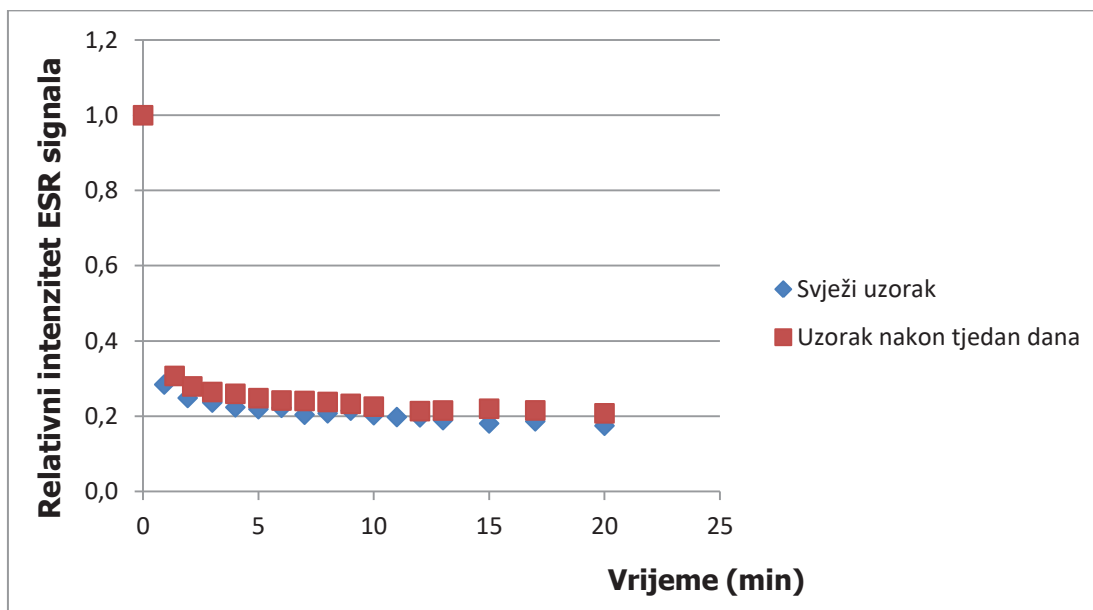
Kisela sirutka (mezofilna kultura)			
Svježi uzorak		Uzorak nakon 7 dana	
Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala	Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala
0,0	1,000	0,0	1,000
0,8	0,281	1,0	0,318
1,5	0,231	2,0	0,276
2,0	0,210	3,0	0,248
2,5	-	4,3	0,220
3,0	0,171	5,1	0,213
4,0	0,141	6,0	0,206
5,0	0,131	7,0	0,206
6,0	0,129	8,0	0,191
7,0	0,114	9,0	0,175
8,0	0,106	10,0	0,160
10,0	0,083	12,0	0,158
12,0	0,073	13,5	0,154
15,0	0,060	15,0	0,142
17,0	0,051	17,0	0,139
20,0	0,046	20,0	0,116



Slika 12.: Pad relativnog intenziteta ESR signala tijekom 20 min u svježem uzorku kisele sirutke (mezofilna kultura) i u istom uzorku nakon 7 dana čuvanja pri temp. hladnjaka

Tablica 15.: Relativni intenzitet ESR signala za svježi uzorak slatke sirutke dobivene sirenjem mlijeka sirilom te za isti uzorak nakon 7 dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka

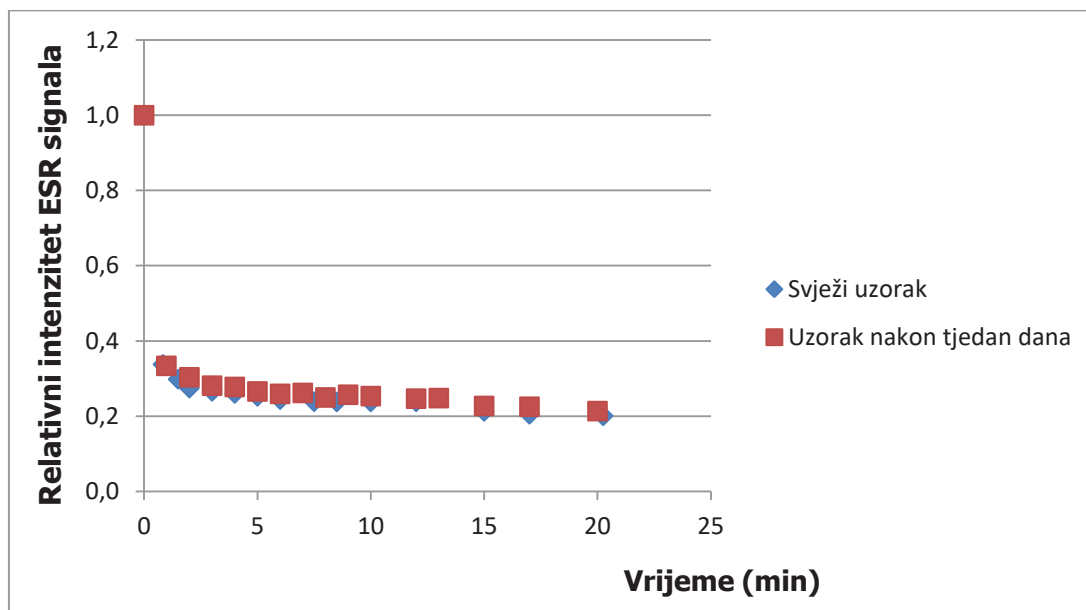
Slatka sirutka (sirilo)			
Svježi uzorak		Uzorak nakon 7 dana	
Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala	Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala
0,0	1,000	0,0	1,000
0,9	0,285	1,4	0,307
1,9	0,249	2,1	0,280
3,0	0,237	3,0	0,265
4,0	0,224	4,0	0,260
5,0	0,219	5,0	0,248
6,0	0,223	6,0	0,242
7,0	0,204	7,0	0,241
8,0	0,208	8,0	0,238
9,0	0,215	9,0	0,233
10,0	0,203	10,0	0,226
11,0	0,198	12,0	0,214
12,0	0,197	13,0	0,216
13,0	0,190	15,0	0,220
15,0	0,181	17,0	0,216
17,0	0,187	20,0	0,208
20,0	0,175	-	-



Slika 13.: Pad relativnog intenziteta ESR signala tijekom 20 min u svježem uzorku slatke sirutke (sirilo) i u istom uzorku nakon 7 dana čuvanja pri temp. hladnjaka

Tablica 16.: Relativni intenzitet ESR signala za svježi uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom te za isti uzorak nakon 7 dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka

Kisela sirutka (octena kiselina)			
Svježi uzorak		Uzorak nakon 7 dana	
Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala	Vrijeme (min)	Relativni intenzitet ESR signala
0,0	1,000	0,0	1,000
0,8	0,338	1,0	0,334
1,5	0,299	2,0	0,304
2,0	0,275	3,0	0,282
3,0	0,266	4,0	0,278
4,0	0,261	5,0	0,266
5,0	0,253	6,0	0,260
6,0	0,245	7,0	0,262
7,5	0,239	8,0	0,250
8,5	0,238	9,0	0,258
10,0	0,238	10,0	0,254
12,0	0,239	12,0	0,247
15,0	0,213	13,0	0,249
17,0	0,206	15,0	0,228
20,3	0,201	17,0	0,226
-	-	20,0	0,214



Slika 14.: Pad relativnog intenziteta ESR signala tijekom 20 min u svježem uzorku kisele sirutke (octena kiselina) i u istom uzorku nakon 7 dana čuvanja pri temp. hladnjaka

Prema podacima iz tablice 13, može se zaključiti da najveću antioksidacijsku aktivnost ima uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, zatim slijedi uzorak slatke sirutke pa uzorak kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom. Dobiveni rezultati (tablica 14, 15, 16; slika 12, 13, 14) prikazuju da već nakon prve minute reakcije svi uzorci pokazuju najveći pad intenziteta signala. U uzorku kisele sirutke (mezofilna kultura) nakon prve minute dolazi do pada intenziteta signala za 72 %, u uzorku slatke sirutke također za 72 %, a uzorak kisele sirutke (octena kiselina) nakon prve minute pokazuje najslabiji pad intenziteta signala, tj. pad za 66 %. Nakon dvadesete minute, uzorak kisele sirutke (mezofilna kultura) pokazuju najveći pad intenziteta (96 %), zatim slijedi uzorak slatke sirutke (pad intenziteta za 82,5 %) i uzorak kisele sirutke (octena kiselina) koji pokazuje najslabiji pad intenziteta signala (79,9 %).

Kako bi se utvrdilo pada li antioksidacijska aktivnost s vremenom, izmjerena je i antioksidacijska aktivnost u istim uzorcima sirutke nakon sedam dana čuvanja pri temperaturi hladnjaka.

Dobiveni rezultati (tablica 13; slika 11) prikazuju da nakon sedam dana stajanja uzoraka sirutke dolazi do pada antioksidacijske aktivnosti. Najveću antioksidacijsku aktivnost i dalje pokazuje uzorak kisele sirutke (mezofilna kultura), dok uzorci slatke i kisele sirutke (octena kiselina) pokazuju približno jednak pad koncentracije DPPH radikala. Do najvećeg pada intenziteta signala u svim uzorcima također dolazi već nakon prve minute reakcije. U uzorku kisele sirutke (mezofilna kultura) nakon prve minute dolazi do pada intenziteta signala za 69

%, u uzorku slatke sirutke za 70 %, a uzorak kisele sirutke (octena kiselina) nakon prve minute pokazuje najslabiji pad intenziteta signala, tj. pad za 66 %. Nakon dvadesete minute, uzorak kisele sirutke (mezofilna kultura) pokazuje najveći pad intenziteta (88,4 %), zatim slijedi uzorak slatke sirutke (pad intenziteta za 79,2 %) i uzorak kisele sirutke (octena kiselina) koji pokazuje najslabiji pad intenziteta signala (78,6 %). Uspoređujući podatke iz tablice 13 i slike 11 za ukupan pad koncentracije DPPH radikala u svježim uzorcima i uzorcima sirutke nakon sedam dana stajanja, može se zaključiti da najveće antioksidacijsko djelovanje ima kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, dok ona dobivena sirenjem mlijeka octenom kiselinom ima najmanje antioksidacijsko djelovanje. Također se može primijetiti da antioksidacijska aktivnost s vremenom najviše opada u uzorku kisele sirutke (mezofilna kultura), tj. pad intenziteta signala u uzorku starom sedam dana je za 7,6 % manji nego u svježem uzorku. U uzorcima slatke i kisele sirutke (octena kiselina) nije došlo do značajnog pada antioksidacijskog djelovanja nakon sedam dana. U uzorku slatke sirutke, pad intenziteta signala je za 3,3 % manji u odnosu na svježi uzorak, dok je u uzorku kisele sirutke (octena kiselina) manji za 1,3 %.

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Praćenjem kinetike vezanja DPPH radikala, dokazano je da kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, posjeduje najjača antioksidacijska svojstva, dok je slatka sirutka pokazala nešto slabija, a kisela sirutka, dobivena sirenjem octenom kiselinom, najslabija antioksidacijska svojstva.
2. Antioksidacijska aktivnost sirutke opada s vremenom. Nakon tjedan dana stajanja došlo je do pada antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima sirutke, ali kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, je i dalje pokazivala najjače antioksidacijsko djelovanje.
3. Određivanjem mineralnog sastava kisele i slatke sirutke, dokazano je da kisela sirutka sadrži veću količinu mineralnih tvari nego slatka sirutka. Kisela sirutka, dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom, je bolji izvor kalcija (1464,83 mg/kg) i ostalih elemenata (Mg, K, Zn, Fe) od kisele sirutke dobivene sirenjem mlijeka octenom kiselinom, dok je slatka sirutka najbolji izvor natrija (509,82 mg/kg).
4. Prema svim analiziranim parametrima, najboljim izvorom sirutke može se smatrati kisela sirutka dobivena sirenjem mlijeka mezofilnom kulturom jer posjeduje najjača antioksidacijska svojstva, najbolji je izvor kalcija i ostalih važnih elemenata, a također je i dobre senzorske kakvoće.

6. Literatura

1. Anonymus 1,
http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Polifenoli_Vino/loghi/DPPH.gif,
Pristupljeno: 18. lipnja 2017.
2. Anonymus 2,
http://www.globalspec.com/learnmore/manufacturing_process_equipment/inspection_tools_instruments/color_appearance_instruments, Pristupljeno: 12. lipnja 2017.
3. Anonymus 3, <http://www.ceramicindustry.com/articles/86527-online-exclusive-measuring-particles-with-laser-diffraction>, Pristupljeno: 30. lipnja 2017.
4. Anonymus 4, <http://health-hazard-mercury.blogspot.hr/>, Pristupljeno: 30. lipnja 2017.
5. Beaty R. D., Kerber J. D. (1993) Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin - Elmer Corporation.
6. Bilušić T., Božanić R., Jeličić I. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada, Zagreb.
7. Božanić R., Jeličić I., Tratnik Lj. (2008) Napitci na bazi sirutke – nova generacija mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **58** (3), 257-274.
8. Božanić R., Tratnik Lj. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
9. Đorđević J., Maćej O. (1982) Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka. *Mljekarstvo* **32** (8), 233-242.
10. Filajdić M., Ritz M., Vojnović V. (1988) Senzorska analiza mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **38**, 295-301.
11. Herceg Z., Režek A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56** (4), 379-396.

12. Jašić M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet.
13. Junk J. N. M. (2012) Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy. Springer, Berlin.
14. Lisak K. (2012) Zdravlje iz sirutke. *Mlijeko i Ja* **1** (15), 28-29.
15. Lučan M. (2015) Sirutka. Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek.
16. Marenjak T. S., Poljičak-Milas N., Delaš I. (2006) Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Mljekarstvo* **56** (2), 119-137.
17. Mihoci M. (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Osvrti Kem. Ind.* **64** (11-12), 681-694.
18. Popović-Vranješ A., Vujičić I. F. (1997) Tehnologija sirutke. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
19. Ranimol S., Sabu T. (2010) Rubber Nanocomposites: Preparation, Properties and Applications. John Wiley & Sons, 391.
20. Tratnik Lj. (2013) Neke spoznaje o mlijeku i mliječnim proizvodima. *Mlijeko i Ja* **1** (17), 10-11.
21. Tratnik Lj. (2009) Sirutka- izvor najvrjednijih funkcionalnih sastojaka. *Mlijeko i ja* **4** (8), 6-8.
22. Tratnik Lj. (2003) Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo* **53** (4), 325-352.

Prilozi

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

SENZORSKO SVOJSTVO	OPISNI PARAMETRI	OCJENA	FAKTOR ZNAČAJNOSTI	MAX. BODOVI
Okus	Jasno izražen, karakterističan za kiselu/slatku sirutku, bez stranih okusa, dobro ili vrlo dobro izražena aroma i okus, dobro ili vrlo dobro izražena svježina, slatkoća	4 - 5	1,6	8
	Tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, tragovi stranih okusa	3		
	Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, okus po plijesni	1 - 2		
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan za kiselu/slatku sirutku, bez ikakvih stranih mirisa	4 - 5	0,4	2
	Prenaglašen miris ili nedovoljno izražen, tragovi užglosti	3		
	Potpuno nekarakterističan za kiselu/slatku sirutku, stran, užegao, po plijesni	1 - 2		
Boja	Boja karakteristična za kiselu/slatku sirutku, jednolična, bez vidljivih nepravilnosti	4 - 5	0,4	2
	Dobra, ali prisutna prošaranost	3		
	Neprihvatljiva ili netipična	1 - 2		
Talog	Bez taloga	5	1,4	7
	Prisustvo taloga u manjim količinama	3 - 4		
	Puno taloga, neprihvatljivo	1 - 2		
Izgled	Odličan, tipičan za kiselu/slatku sirutku, bez nepoželjnih karakteristika	4 - 5	0,2	1
	Manje izražene nepoželjne karakteristike	3		
	Neprihvatljiv, strane boje, prisutna strana tijela	1 - 2		
MAKSIMALAN BROJ PONDERIRANIH BODOVA UKUPNO:				20

Prilog 2.: Obrazac za ocjenjivanje sirutke

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

Izjava o izvornosti

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

Karmela Trebnjak

ime i prezime studenta