

# Optimiranje postupka proizvodnje sireva od kravljeg mlijeka s dodatkom ekstrakta lista masline (*Olea europaea* L.)

---

Vranković, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:990233>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Lucija Vranković

**OPTIMIRANJE POSTUPKA  
PROIZVODNJE SIREVA OD  
KRAVLJEG MLIJEKA S  
DODATKOM EKSTRAKTA LISTA  
MASLINE (*Olea europaea* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Irene Barukčić Jurina te uz pomoć doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović, doc. dr. sc. Sandre Pedisić i tehničke suradnice Željke Mirković.

## *Projekt*

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



*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ireni Barukčić Jurina na svoj pruženoj potpori i savjetima tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, Elizabeti Zandona mag. ing. bioproc. i tehničkoj suradnici Željki Mirković na pruženoj pomoći i ugodnoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Hvala mojim curama, Sofiji i Katarini, što su bile uz mene i uljepšale moje fakultetske dane.*

*Na kraju najvažnije i najveće HVALA mojim roditeljima i bratu koji su uvijek tu za mene kao moja najveća podrška i bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

OPTIMIRANJE POSTUPKA PROIZVODNJE SIREVA OD KRAVLJEG MLIJEKA S  
DODATKOM EKSTRAKTA LISTA MASLINE (*Olea europaea* L.)

*Lucija Vranković*, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058211244

### Sažetak:

Zahvaljujući bogatom fenolnom sastavu, ekstrakt lista masline posjeduje brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje zbog čega se potencijalno može koristiti za obogaćivanje različitih prehrambenih proizvoda. Cilj ovog rada bio je ispitati koja metoda proizvodnje sira i koji trenutak dodatka ekstrakta lista masline će rezultirati njegovim boljim zadržavanjem u proizvedenom siru. Sirevi su proizvedeni enzimskom i kiselinskom koagulacijom, dok je ekstrakt dodavan direktno u mlijeko ili u gruš. Zadržavanje ekstrakta praćeno je određivanjem ukupne koncentracije fenola i flavonoida te antioksidacijskog kapaciteta sireva i sirutke dobivene u procesu proizvodnje sira. Dodatno je ispitan utjecaj ekstrakta lista masline na boju i teksturu sireva. Viša koncentracija fenola i viši antioksidacijski kapacitet postignut je kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, a viša koncentracija flavonoida postignuta je istom metodom proizvodnje, ali s dodatkom ekstrakta u mlijeko.

**Ključne riječi:** *sir, ekstrakt lista masline, fenoli, flavonoidi, antioksidacijski kapacitet*

**Rad sadrži:** 82 stranice, 14 slika, 12 tablica, 92 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović  
doc.dr.sc. Sandra Pedisić

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Irena Barukčić Jurina (mentor)
3. doc. dr. sc. Maja Repajić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Tomislava Vukušić Pavičić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 29. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

**Graduate Thesis**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

OPTIMISING THE PRODUCTION OF COW'S MILK CHEESE WITH THE ADDITION OF  
OLIVE LEAF EXTRACT (*Olea europaea* L.)

*Lucija Vranković*, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058211244

### **Abstract:**

Thanks to its rich phenolic composition, olive leaf extract has numerous positive effects on human health and can therefore potentially be used to enrich different food products. The aim of this work was to examine which method of cheese production and which moment of the olive leaf extract addition would result in its better retention in the produced cheese. The cheeses were produced by enzymatic and acid coagulation while the extract was added directly to the milk or curd. Retention of the extract was monitored by determining the total concentration of phenols, flavonoids and the antioxidant capacity in cheeses, as well as in the whey obtained in the cheese production process. In addition, the influence of olive leaf extract on the colour and texture of cheeses was also examined. A higher concentration of phenols and a higher antioxidant capacity were achieved in the cheeses produced by enzymatic coagulation with the addition of extract to the curd, and a higher concentration of flavonoids was achieved by the same production method but with the addition of extract to the milk.

**Keywords:** *cheese, olive leaf extract, phenols, flavonoids, antioxidant capacity*

**Thesis contains:** 82 pages, 14 figures, 12 tables, 92 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate professor

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

### **Reviewers:**

1. Katarina, Lisak Jakopović, PhD, Assistant professor (president)
2. Irena, Barukčić Jurina, PhD, Associate professor (mentor)
3. Maja, Repajić, PhD, Assistant professor (member)
4. Tomislava, Vukušić Pavičić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 29<sup>th</sup>, 2022



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. PROIZVODNJA SIRA I NJEGOVA PREHRAMBENA VRIJEDNOST</b> .....	2
<b>2.2. EKSTRAKT LISTA MASLINE (<i>Olea europaea</i> L.)</b> .....	5
2.2.1. Kemijski sastav ekstrakta lista masline .....	5
2.2.2. Učinak ekstrakta lista masline na ljudsko zdravlje .....	7
<b>2.3. METODE EKSTRAKCIJE</b> .....	11
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	16
3.1.1. Kemikalije .....	16
3.1.2. Aparatura .....	18
3.1.3. Pribor .....	19
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	20
3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline .....	20
3.2.2. Analiza sastava ekstrakta lista masline HPLC DAD metodom .....	21
3.2.3. Određivanje efektivnih koncentracije ekstrakta lista masline .....	23
3.2.4. Proizvodnja sira s dodatkom ekstrakta lista masline postupkom enzimske koagulacije ...	24
3.2.5. Proizvodnja sira s dodatkom ekstrakta lista masline postupkom kiselinske koagulacije ..	26
3.2.6. Određivanje prinosa sira .....	28
3.2.7. Određivanje aktiviteta vode sireva .....	28
3.2.8. Određivanje pH vrijednosti sira i sirutke .....	28
3.2.9. Određivanje titracijske kiselosti sira po Soxhlet-Henkel-u .....	28
3.2.10. Određivanje titracijske kiselosti sirutke po Soxhlet-Henkel-u .....	29
3.2.11. Određivanje indeksa boje sira .....	29
3.2.12. Određivanje teksture sira .....	30
3.2.13. Određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	30
3.2.14. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida .....	33
3.2.15. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom .....	36
3.2.16. Obrada podataka .....	38
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	39
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE</b> .....	40

<b>4.2. REZULTATI ANALIZA SIRA</b> .....	42
4.2.1. Prinos sira.....	42
4.2.2. Aktivitet vode sira, aktivna i titracijska kiselost sira i sirutke.....	43
4.2.3. Boja sira.....	48
4.2.4. Tekstura sira.....	52
<b>4.3. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA</b> .....	57
4.3.1. Koncentracija ukupnih fenola.....	57
4.3.2. Koncentracija ukupnih flavonoida.....	62
4.3.3. Antioksidacijski kapacitet.....	66
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	71
<b>6. LITERATURA</b> .....	73

## 1. UVOD

Potreba za novim, prirodnim izvorima nutritivnih i funkcionalnih spojeva dovela je u fokus znanstvenih istraživanja brojne biljne nusproizvode prehrambene industrije koje odlikuje visok udio fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost. Dokazano je kako fenolni spojevi imaju antioksidacijsko djelovanje zbog čega mogu inhibirati djelovanje slobodnih radikala, a time i oštećenja u stanicama koja nastaju njihovim djelovanjem. S ciljem smanjenja otpada prehrambene industrije i iskorištavanja neiskorištenog potencijala biljnih nusproizvoda započeta su brojna istraživanja o mogućnosti njihove implementacije u proizvodnji funkcionalnih prehrambenih proizvoda, odnosno proizvoda koji pridonose boljem zdravstvenom stanju i smanjuju rizik od razvoja raznih bolesti. Kao glavni predmet istraživanja našli su se ekstrakti raznih biljnih materijala među kojima je i list masline. List masline nastaje u velikim količinama kao nusproizvod procesa proizvodnje maslinovog ulja, a brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima dokazano je kako ekstrakt lista masline obiluje fenolnim spojevima koji zbog visoke antioksidacijske aktivnosti imaju brojne pozitivne učinke na fiziološke funkcije organizma. Upravo iz tog razloga porastao je interes za mogućim obogaćivanjem različitih prehrambenih proizvoda ekstraktom lista masline. Sirevi su kao i ostali mliječni proizvodi nutritivno bogata namirnica koja se učestalo konzumira i čija je upotreba široko rasprostranjena te zbog toga imaju visok potencijal za obogaćivanje nutritivno važnim spojevima. Većinom se sirevi konzumiraju zbog svojih karakterističnih senzorskih svojstava, stoga je važno da obogaćivanjem ne dođe do njihove promjene jer bi to moglo dovesti do smanjenja interesa potrošača.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati koja metoda koagulacije mlijeka te koji trenutak dodatka ekstrakta lista masline u procesu proizvodnje sira rezultiraju boljim zadržavanjem ekstrakta u siru, što je praćeno paralelno mjerenjem koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijske aktivnosti u proizvedenim sirevima i sirutki. Dodatno je ispitan utjecaj metode dodatka ekstrakta na teksturu i boju proizvedenih sireva

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA SIRA I NJEGOVA PREHRAMBENA VRIJEDNOST

Proizvodnja sira smatra se jednom od najstarijih metoda čuvanja mlijeka o čemu svjedoče brojni povijesni dokazi koji datiraju još iz vremena prije Krista (Tratnik i Božanić, 2012). Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (Pravilnik, 2009) u Republici Hrvatskoj sirevi se definiraju kao svježi proizvodi ili proizvodi različitog stupnja zrelosti koji se proizvode nakon koagulacije mlijeka, sirutke, vrhnja ili kombinacije prethodno navedenih sirovina. Navedenim Pravilnikom je za koagulaciju mlijeka dozvoljena upotreba sirila i drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima, mljekarske kulture i odgovarajućih kiselina za koagulaciju.

Proces proizvodnje sira u suštini je dehidrationski proces u kojem dolazi do koncentriranja kazeina i mliječne masti (Bintis i Papademas, 2018). Glavni cilj proizvodnje sira je koagulacija kazeina odnosno grušanje mlijeka, nakon čega slijede postupci sušenja dobivenog gruša i oblikovanja sirnih zrna. Ovo su postupci koji su zajednički u proizvodnji svih vrsta sireva, a razlike između vrsta sireva rezultati su određenih modifikacija u navedenim postupcima. Grušanje mlijeka moguće je provesti pomoću kiseline čime se dobije kisel gruš ili proteolitičkih enzima čime se dobije slatki gruš. Kiselina se kao sredstvo za koagulaciju mlijeka koristi u proizvodnji svježeg sira, a može biti direktno dodana u mlijeko ili nastaje u mlijeku procesom fermentacije koju provodi mezofilna kultura bakterija mliječne kiseline. Zakiseljavanje mlijeka provodi se do pH vrijednosti 4,6 što je pH vrijednost izoelektrične točke kazeina. Grušanje mlijeka proteolitičkim enzimima koristi se u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva, a u tu svrhu najčešće se koristi kimozijski pripravak poznatiji kao sirilo. Sirilo je enzimski pripravak životinjskog podrijetla koji se sastoji od kimozina i pepsina, a za njegovu koagulacijsku ulogu iznimno je važan kimozin čija struktura ga čini specifičnim za vezanje  $\kappa$ -kazeina i hidrolizu peptidne veze između fenilalanina i metionina koji se u peptidnom lancu nalaze na 105. i 106. mjestu. Osim enzima životinjskog podrijetla upotrebljavaju se i enzimi biljnog ili mikrobnog podrijetla. Za grušanje mlijeka djelovanjem enzima bitna je prisutna količina  $\text{Ca}^{2+}$  iona preko kojih se destabilizirane micle kazeina povezuju u mrežu gela. U procesu proizvodnje sira za grušanje mlijeka najčešće se koristi kombinacija topline, enzima i kiseline. Mlijeko se zagrije na temperaturu oko  $30^{\circ}\text{C}$  što je optimalna temperatura za djelovanje mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline koje potom sintetiziraju kiselinu i spuštaju pH mlijeka čime se poboljšava aktivnost enzimskih pripravaka (Tratnik i Božanić, 2012).

Kvaliteta proizvedenog sira u prvom redu ovisi o kvaliteti sirovine odnosno o kvaliteti mlijeka. Najčešće se koristi kravlje mlijeko, a osim njega koriste se još ovčje, kozje, bivolje mlijeko ili njihove mješavine. Za proizvodnju sira potrebno je osigurati higijenski proizvedeno mlijeko i adekvatno ga čuvati pri nižim temperaturama u slučaju da preradu u sir nije moguće provesti odmah. Čuvanje mlijeka treba biti što kraće, a cilj je očuvati svojstva kazeina i udjel topljivog kalcija te mikrobiološku ispravnost mlijeka. Proces prerade mlijeka u sir započinje standardizacijom mlijeka odnosno podešavanjem udjela mliječne masti u suhoj tvari mlijeka čime se osigurava ujednačena kvaliteta proizvoda. Nakon standardizacije može slijediti postupak homogenizacije mlijeka iako se on u pravilu u sirarstvu ne provodi, eventualno se homogenizira samo vrhnje. Toplinska obrada mlijeka u mljekarskoj industriji jedan je od najvažnijih procesa kojim se osigurava mikrobiološka ispravnost te lako kvarljive sirovine. Međutim, visoka toplinska obrada u sirarstvu nije poželjna jer rezultira mekim sirevima odnosno uzrokuje promjene u procesu grušanja mlijeka i povećava zadržavanje sirutke. Zbog zdravstvenih razloga toplinsku obradu nije moguće preskočiti pa se mlijeko u sirarstvu podvrgava pasterezacijskom režimu pri 72-73 °C sa zadržavanjem na toj temperaturi 15 do 20 sekundi. Nakon toplinske obrade u mlijeko se dodaju potrebni dodaci kao što su sirilo, mikroba kultura, kalcijev klorid, natrijev ili kalijev nitrat, pripravci lizozima, boje i dr. Sirilo se dodaje posljednje, a zatim slijedi grušanje mlijeka. Dobiveni gruš se potom reže i dogrijava na temperaturi od oko 40 °C kako bi se sirna zrna dodatno učvrstila. Dobivena sirna zrna pune se u kalupe i odvajaju od sirutke, prešaju i sole što se najčešće vrši postupkom salamurenja. Nakon salamurenja sirevi se cijede i transportiraju u zrionice na zrenje. Tijekom zrenja dolazi do brojnih fizikalnih, kemijskih i biokemijskih promjena u sirevima koje definiraju njihova senzorska svojstva. Duljina zrenja i uvjeti zrenja razlikuju se ovisno o vrsti sira, mekši sirevi zriju kraće dok tvrdi zriju znatno duže. Tijekom zrenja sirevi zahtijevaju adekvatnu njegu kako bi krajnji proizvod bio što bolje kvalitete (Kirin, 2016; Kalit, 2015; Havranek i sur., 2014; Tratnik i Božanić, 2012).

Sirevi pripadaju u skupinu hrane bogate nutrijentima jer su izvor visokokvalitetnih proteina, lipida, vitamina i minerala. Dnevnom konzumacijom 100 g svježeg sira moguće je kod odrasle osobe zadovoljiti 30 do 40 % dnevnih potreba za unosom proteina, dok 100 g tvrdog sira dnevno zadovolji 40 do 50 % potreba (Božanić, 2015). Dokazano je kako sirevi sadrže određene bioaktivne peptide koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, a isto tako u sirevima su prisutne bakterije za koje se pretpostavlja da mogu pozitivno utjecati na zdravlje gastrointestinalnog sustava. Sirevi su često percipirani kao nezdrava namirnica zbog povišenog

udjela zasićenih masnih kiselina koje se dovode u vezu s povišenim udjelom LDL (eng. *Low-density lipoprotein*) kolesterola u krvi, a posljedično i s povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Feeney i sur., 2021). Međutim, Ash i Wilbey (2010) u svom radu navode kako je danas poznato da nemaju sve zasićene masne kiseline prisutne u siru jednak efekt na povećanje kolesterola u krvi. Poznato je kako metabolizmom masnih kiselina u mlijeku može nastati konjugirana linolenska kiselina za koju su brojnim istraživanjima dokazani blagotvorni učinci na zdravlje ljudi (Božanić, 2015; Ash i Wilbey, 2010).

Udio mineralnih tvari i vitamina u sirevima varira i ovisi prvenstveno o načinu njihove proizvodnje. Sirevi se smatraju iznimno značajnim izvorom kalcija, a njegov udio znatno je viši u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom nego u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom. Razlog tomu je povećanje kiselosti tijekom fermentacije uslijed čega dolazi do otapanja kalcija i njegovog prelaska u sirutku (Božanić, 2015). Kalcij se u sirevima nalazi unutar kompleksa s kazeinom. Ti kompleksi koji nastaju tijekom sirenja mlijeka održavaju kalcij u topljivom obliku, onemogućuju njegovo taloženje u gastrointestinalnom sustavu i povećavaju njegovu biodostupnost, odnosno apsorpciju u organizam. Kalcij je jedan od najvažnijih spojeva za održavanje zdrave strukture kostiju što je osim kod djece u razvoj bitno i kod starije populaciju jer smanjuje rizik od nastanka osteoporoze, bolesti koja se očituje u promjenama koštanog tkiva i povećanom riziku od lomova. Sirevi tijekom procesa proizvodnje izgube većinu vitamina topljivih u vodi. Međutim, riboflavin, vitamin B<sub>12</sub>, niacin i folati zaostaju u značajnim količinama unutar sireva zbog čega se sirevi mogu smatrati izvorom navedenih vitamina. U sirevima također zaostaju značajne količine vitamina A kojem se pripisuju pozitivni učinci na zdravlje vida, rad imunološki sustav i regulaciju ekspresije gena (Ash i Wilbey, 2010).

Sirevi se smatraju i bogatim izvorom bioaktivnih peptida, to su specifični fragmenti proteina koji osim nutritivne vrijednosti pozitivno pridonose i određenim fiziološkim funkcijama. Bioaktivni peptidi posjeduju veliku strukturnu raznolikost, u organizmu se nalaze u malim koncentracijama, karakterizira ih visoka specifičnost i nizak toksikološki rizik. Do aktivacije bioaktivnih peptida dolazi metabolizmom proteina tijekom gastrointestinalne probave, enzimske hidrolize, mikrobiološke fermentacije i procesiranja mlijeka, a u proizvodnji sireva i tijekom enzimske koagulacije mlijeka. Sirevi sadrže veliki broj različitih bioaktivnih peptida koji imaju protuupalno, antikancerogeno, antioksidacijsko, antimikrobno i ACE inhibirajuće djelovanje (Rafiq i sur., 2020).

Proces proizvodnje tvrdih sireva, kod kojih tijekom zrenja dolazi do razgradnje laktoze zaostale u grušu, čini neke sireve pogodim za konzumaciju i od strane ljudi koji boluju od intolerancije na laktozu (Tratnik i Božanić, 2012).

## **2.2. EKSTRAKT LISTA MASLINE (*Olea europaea* L.)**

Uzgoj maslina i proizvodnja maslinovog ulja čine važan dio poljoprivrede Mediterana (Dobrinčić i sur. 2020), a upravo tradicionalna mediteranska prehrana, u kojoj dominira konzumacija maslinovog ulja, smatra se jednom od najzdravijih prehrana. Znanstvena istraživanja pokazala su kako konzumacija maslinovog ulja može doprinijeti smanjenju rizika od razvoja karcinom dojke te doprinijeti zaštiti od razvoja kardiovaskularnih oboljenja. Blagotvoran učinak maslinovog ulja na zdravlje povezuje se s povoljnim sastavom masnih kiselina, ali i spojevima koji su u njemu prisutni u malim koncentracijama kao što su fenoli, fosfolipidi, tokoferoli, karotenoidi i brojni drugi (Soler-Rivas i sur., 2000).

Proces proizvodnje maslinovog ulja rezultira stvaranjem velikih količina otpada, među kojima značajan udio čini list masline. Brojnim istraživanjima dokazano je kako list masline karakterizira bogat sastav fenola (Soler-Rivas i sur., 2000) što je potaknulo dodatna istraživanja o mogućnostima iskorištavanja ove dostupne i jeftine sirovine (Dobrinčić i sur., 2020). Povijest upotrebe ekstrakta lista masline seže sve do starog Egipta gdje postoje dokazi o njegovoj upotrebi u procesu mumifikacije faraona, a njegova ljekovita svojstva prepoznata su i u 19. st. kada se koristio za liječenje tropskih bolesti u britanskim kolonijama (Soler-Rivas i sur., 2000). Danas je poznato kako ekstrakt lista masline, zahvaljujući bogatom sastavu fenola, posjeduje izražena protuupalna, antioksidacijska, antimikrobna i antivirusna svojstva (Dobrinčić i sur., 2020).

### **2.2.1. Kemijski sastav ekstrakta lista masline**

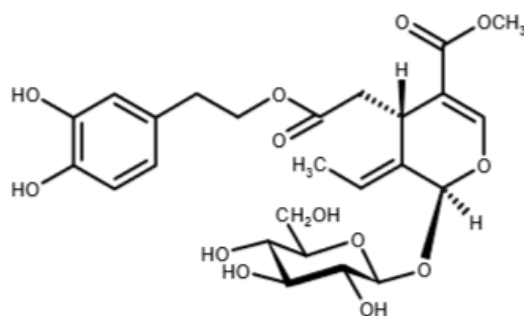
Ekstrakt lista masline tamnosmeđa je tekućina gorkog okusa koja osim bogatog sastava fenolnih spojeva (Dobrinčić i sur., 2020) sadrži i druge važne fitokemikalije kao što su triterpeni (Borjan i sur., 2020) poput oleanolne i maslinske kiseline (EMA 2017). Sastav ekstrakta lista masline ovisi o samoj sorti maslina, području i uvjetima njihovog uzgoja (Borjan i sur., 2020), ali i o metodi i parametrima ekstrakcije (Dobrinčić i sur., 2020). Ekstrakt sadrži brojne fenolne spojeve i njihove derivate, a najjednostavnije ih je podijeliti u sljedeće tri grupe - jednostavni

fenoli, flavonoidi i sekoiridoidi. Jednostavni fenoli su fenolni spojevi male molekulske mase. Flavonoidi su najzastupljenija grupa fenolnih spojeva u listu masline, a dijele se na flavone, flavanone, flavanole i flavan-3-ole. Sekoiridoidi su fenolni spojevi karakteristični samo za biljke iz obitelji *Oleaceae*, prisutni su u različitim koncentracijama u plodovima, ulju i listu masline (Borjan i sur., 2020).

Fenolni spojevi definiraju se kao sekundarni metaboliti koji se u biljkama sintetiziraju tijekom odvijanja metaboličkih reakcija pentoza fosfatnog i fenilpropanoidnog puta te puta šikiminske kiseline (Borjan i sur., 2020). Oni su nakon celuloze najzastupljenija grupa spojeva u biljkama, koji osim strukturne uloge imaju i važnu zaštitnu te senzorsku ulogu. Fenolni spojevi štite biljke od sunčevog zračenja, biljojeda, patogena i slično, a utječu i na okus, boju i gorčinu biljaka i njihovih plodova (De la Rosa i sur., 2019).

Brojnim istraživanjima određen je fenolni profil ekstrakta lista masline prema kojem su oleuropein, oleuropein aglikon, hidroksitirozol, rutin, verbaskozid, luteolin-7-glukozid, luteolin-4'-glukozid i ligstrozid aglikon najzastupljeniji fenolni spojevi među velikim brojem različitih spojeva prisutnih u ekstraktu (Dobrinčić i sur., 2020).

Oleuropein je najznačajniji spoj u ekstraktu lista masline, a ubraja se u skupinu sekoiridoida, točnije to je iridoidni monoterpen. Sekoiridoidi su spojevi čija struktura nalikuje strukturi kumarina, nastaju sekundarnim metabolizmom terpena, a služe kao prekursori za sintezu indolnih alkaloida. Po kemijskoj strukturi, prikazanoj na slici 1, oleuropein je ester 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozol) i  $\beta$ -glukolizirane elenične kiseline (Borjan i sur., 2020).



**Slika 1.** Kemijska struktura oleuropeina (Pereira i sur., 2007)



Oleuropein je u različitim koncentracijama prisutan u plodu i listu masline (Vogel i sur., 2015) i odgovoran je za njihov gorak okus (Otero i sur., 2021). Njegov udio u plodu masline može varirati između 0,005 i 0,12 %, dok je u listu masline prisutan u znatno višoj koncentraciji koja može varirati od 1 do 14 % (Vogel i sur., 2015). Dokazano je kako sa starenjem lista opada udio oleuropeina, pa tako udio oleuropeina u mladim listovima može iznositi do 140 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari lista, dok kod starih listova može varirati između 60 i 90 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari lista (Otero i sur., 2021). Djelovanjem povišene temperature, svjetla, kiselina ili lužina dolazi do hidrolize oleuropeina na njegove sastavne spojeve odnosno na hidroksitirozol i eleničnu kiselinu (Borjan i sur., 2020). Hidroksitirozol se smatra najznačajnijim spojem iz skupine jednostavnih fenola (Talhaoui i sur., 2015), posjeduju strukturu katehola i karakterizira ga topljivost u vodenim i lipidnim medijima (Borjan i sur., 2020).

#### 2.2.2. Učinak ekstrakta lista masline na ljudsko zdravlje

Dokazano je kako fenolni spojevi prisutni u listu masline imaju brojne povoljne učinke na zdravlje ljudi, kao što su snižavanje krvnog tlaka, snižavanje razine šećera i kolesterola u krvi, smanjenja rizika od razvoja kardiovaskularnih oboljenja i pretilosti, antioksidacijsko, protuupalno (Vogel i sur., 2015), antivirusno i antimikrobno djelovanje (Dobrinčić i sur., 2020). U fokusu većine znanstvenih istraživanja ekstrakta lista masline i njegovog utjecaja na ljudsko zdravlje nalazi se oleuropein, spoj koji je u najvećem udjelu zastupljen u ekstraktu.

Metaboličkim procesima u ljudskom tijelu dolazi do stalne produkcije reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala koji imaju važne funkcije u imunološkim reakcijama, staničnom signaliziranju i stvaranju energije. Pretjeranim stvaranjem reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala dolazi do oksidativnog stresa koji uzrokuje oštećenja stanične strukture, što može rezultirati raznim kroničnim, kardiovaskularnim ili onkološkim oboljenjima (Vogel i sur., 2015). Oksidirani radikali reduciraju fenolne spojeve, pri čemu fenolni spojevi doniraju jedan elektron, a kao rezultat nastaju reducirani fenolni radikali koji su stabilniji i manje reaktivni u odnosu na oksidirane radikale. Ovim mehanizmom fenolni spojevi mogu stabilizirati štetne slobodne radikalne međuprodukte i zaustaviti daljnje oksidacijske reakcije, a time i stanična oštećenja te bolesti koje se posljedično javljaju (Grace, 2005).

Oleuropein kao i drugi fenolni spojevi u svojoj strukturi sadrži hidroksilnu grupu koja može donirati vodik i tako spriječiti daljnju oksidaciju molekula što oleuropeinu daje važna

antioksidacijska svojstva (Otero i sur., 2021). Antioksidacijska svojstva ekstrakta lista masline ispitivana su u istraživanju koje su proveli Castillio i sur. (2010). Rezultati istraživanja pokazali su kako spojevi s katehinskom strukturom, odnosno flavanoli, flavan-3-oli i flavoni najučinkovitije neutraliziraju ABTS<sup>+</sup> radikal. Nadalje, zapažen je sinergistički učinak oleuropeina, flavonoida i supstituiranih fenola. Također, u navedenom istraživanju promatrana su i moguća zaštitna svojstva ekstrakta od radioaktivnog zračenja, a rezultati su pokazali kako je prije tretmana zračenjem više različitih spojeva pokazivalo određenu razinu radioprotekcije. Međutim, nakon tretmana zračenjem samo oleuropein je pokazivao određenu razinu radioprotekcije koja je bila značajno manja u odnosu na rezultate dobivene prije tretmana zračenjem (Castillo i sur., 2010).

Karcinomi su oboljenja karakterizirana pretvaranjem normalnih, zdravih stanica u maligne stanice čije su glavne osobine pretjerano umnožavanje i otpornost na apoptozu (poseban oblik stanične smrti). Brojnim istraživanjima dokazano je kako oleuropein djeluje na različite vrste stanica raka što otvara put potencijalnoj primjeni u svrhu prevencije razvoja karcinoma (Shamshoum i sur., 2017). Seçme i sur. (2016) proveli su ispitivanje utjecaja oleuropeina na stanice neuroblastoma, vrste pedijatrijskog tumora koji se javlja u ranom djetinjstvu i odgovoran je za oko 15 % smrtnih slučajeva kod djece oboljele od karcinoma. Rezultati ispitivanja pokazali su kako oleuropein inducira zaustavljanje staničnog ciklusa stanica neuroblastoma i kako smanjuje njihovu otpornost na apoptozu odnosno potiče staničnu smrt (Seçme i sur., 2016). Hassan i sur. (2012) svojim su istraživanjem pokazali kako oleuropein potencijalno može spriječiti razvoj metastaza raka dojke jer smanjuje ekspresiju gena za sintezu enzima metaloproteinaze koji pomaže u njihovom razvoju. *In vitro* istraživanjima dokazano je kako oleuropein osim na stanice neuroblastoma i raka dojke, djeluje i na stanice raka debelog crijeva, prostate, jetre, štitnjače, gušterače, osteosarkoma i mezotelioma. Djelovanje se najčešće očituje kao smanjenje vijabilnosti i proliferacije stanica te povećavanje apoptoze i citotoksičnosti. Osim *in vitro* istraživanja provedena su i *in vivo* istraživanja učinka oleuropeina na različite stanice karcinoma (Shamshoum i sur., 2017). Hamdi i Castellon (2005) proveli su istraživanje kojem je svrha bila ispitivanje antitumorskog djelovanja oleuropeina *in vivo*, a kao modelni organizmi korišteni su švicarski bijeli miševi oboljeli od sarkoma mekih tkiva. Oleuropein je dodavan u vodu koju su miševi pili u koncentraciji od 1 %. Naveli su kako bi bilo moguće primjenjivati i više koncentracije oleuropeina. Međutim, u ovom slučaju viša koncentracija dovodila je do promjene okusa vode pa su miševi odbijali konzumaciju. Nakon

12 dana tretmana došlo je do potpunog nestanka tumora, čak i onih tumora koji su imali promjer veći od 2 cm (Hamdi i Castellon, 2005).

Kolesterol je prirodno prisutan u ljudskom organizmu, nalazi se u sastavu staničnih membrana i kontrolira njihovu propusnost, sudjeluje kao prekursor u sintezi vitamina D, steroidnih hormona i želučane kiseline. Međutim, prekomjeren unos kolesterola hranom dovodi do povećanja razine kolesterola u krvi, a posljedično i u tkivu krvnih žila što rezultira arteriosklerozom i povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti. Danas je poznato kako nakupljanje kolesterola u krvnim žilama dovodi do povećanog stvaranja oksidiranih radikala koji oštećuju njihovu strukturu, odnosno postoji direktna poveznica između oksidativnog stresa i kardiovaskularnih bolesti. Provedeno je istraživanje u kojem su ispitivana antioksidacijska svojstva ekstrakta lista masline na štakorima koji su prethodno 16 tjedana hranjeni kolesterolom bogatom hranom. Rezultati su pokazali kako je ekstrakt, koji je sadržavao povišene udjele oleuropeina, hidroksitirosola i oleuropeina aglikona, doveo do smanjenja udjela ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola, dok se udio HDL-kolesterola (eng. *High-density lipoprotein*, HDL) povećao za oko 60 %. Nadalje, rezultati su pokazali kao je došlo do smanjenja procesa lipidne peroksidacije i pojačavanja antioksidacijskog obrambenog sustava. (Jemai i sur., 2008). Istraživanjem koje su proveli Susalit i sur. (2010) pokazano je kako osim na lipidni sastav, ekstrakt list masline povoljno utječe na snižavanje krvnog tlaka. Rezultati su pokazali da je kod pacijenata s povišenim krvnim tlakom koji su konzumirali 1000 mg dnevno ekstrakta lista masline, uz smanjenje udjela ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola, došlo i do smanjenja sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka. Postignuti efekt usporedili su s efektom koji postiže standardni farmaceutski lijek koji se koristi za liječenje povišenog krvnog tlaka (Susalit i sur., 2010).

Pretilost predstavlja jedan od glavnih rizika za razvoj brojnih zdravstvenih problema među kojima su najučestaliji kardiovaskularni problemi, povišeni krvni tlak i dijabetes tipa 2, a razvijaju se kao posljedica energetske neravnoteže u organizmu. Ključni enzim za energetske metabolizam je adenzin monofosfat aktivirana protein kinaza (eng. *Adenosine monophosphate activated protein kinase*, AMPK). Navedeni enzim ima ulogu kontrole unosa glukoze i lipida u stanice, njihovog skladištenja u mišićima, masnom tkivu i jetri te njihovog iskorištavanja za proizvodnju energije. AMPK također kontrolira rad peroksisom proliferator aktiviranog receptora gamma (eng. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* PPAR $\gamma$ ) koji je jedan od ključnih regulatora procesa stvaranja masnih stanica (Hadrich i sur., 2016). Hadrich i sur. (2016) ispitivali su utjecaj oleuropeina na razinu kolesterola kod štakora hranjenih hranom

bogatom kolesterolom. Rezultati su pokazali kako oleuropein smanjuje aktivnost PPAR $\gamma$ , dok povećava aktivnost AMPK u masnom tkivu što dovodi do smanjenja udjela masnog tkiva, ukupnih triglicerida u krvi i tjelesne mase (Hadrich i sur., 2016). Kasnijim istraživanjem kojeg su proveli Malliou i sur. (2018) dodatno je potvrđeno da oleuropein utječe na smanjenje razine kolesterola i triglicerida u krvi.

Dijabetes je kronično metaboličko stanje čija je glavna karakteristika povišena razina glukoze u krvi do koje dolazi zbog neosjetljivosti na inzulin ili nedovoljne produkcije inzulina. Glavna karakteristika dijabetesa tipa 2 je povećana rezistencija na inzulin u masnom i mišićnom tkivu te tkivu jetre (Zheng i sur., 2021). Wainstein i sur. (2012) proveli su ispitivanje utjecaja ekstrakta lista masline na metabolizam glukoze kod ljudi i štakora oboljelih od dijabetesa. Rezultati ispitivanja pokazali su kako ekstrakt lista masline ima potencijalnu primjenu u prevenciji razvoja dijabetesa jer promovira smanjenje razine glukoze u krvi (Weinstein i sur., 2012). Liu i sur. (2014) su u svom istraživanju zabilježili smanjene rezistencije na inzulin kao posljedicu djelovanja oleuropeina u organizmu štakora oboljelih od dijabetesa. Kasnijim istraživanjem Sangi i sur. (2015) također su dokazali utjecaj oleuropeina na smanjenje razine glukoze u krvi štakora oboljelih od dijabetesa. Benlarbi i sur. (2022) ispitivali su potencijal primjene oleuropeina i ekstrakta lista masline u liječenju dijabetičke retinopatije. Dokazali su kako oleuropein štiti stanice retine oka od štetnog utjecaja glukoze, a već oštećene stanice retine obnavlja. Nadalje, istražili su inhibirajuća svojstva oleuropeina i vodenog ekstrakta lista masline na enzim aldoza reduktazu. Aldoza reduktaza je enzim koji sudjeluje u razvoju dijabetičke retinopatije. Rezultati su pokazali kako i oleuropein i vodeni ekstrakt imaju inhibirajuća svojstva. Međutim, inhibirajuća svojstva vodenog ekstrakta pokazala su se bolja u odnosu na sam oleuropein (Benlarbi i sur., 2022). Zheng i sur. (2021) proveli su istraživanje u kojem su ispitali utjecaj oleuropeina na miševе oboljele od dijabetesa tipa 2. Dobiveni rezultati pokazali su pozitivan utjecaj oleuropeina na smanjenje razine glukoze u krvi i obnavljanje oštećenog tkiva jetre, gušterače i srca. Nadalje, zabilježili su kako oleuropein utječe na poboljšanje karakteristika gastrointestinalne mikroflore što bi također moglo pomoći u liječenju dijabetesa tipa 2 (Zheng i sur., 2021).

Upala je kompleksan biološki proces koji se javlja kao odgovor na ozljede, infekcije ili iritacije. Upalni proces može se opisati kao postupno otpuštanje proupalnih citokina u koje se ubrajaju interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 i tumorski faktor nekroze alfa (eng. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ). Inhibicija otpuštanja navedenih proupalnih citokina može dovesti do smanjenja upalnih procesa (Zhu i sur. 2018). Liu i sur. (2014) u svom su istraživanju, osim smanjenja

rezistencije na inzulin, dodatno zabilježili i protuupalni efekt oleuropeina koji se očitovao kroz smanjenje otpuštanja interleukina-6 i TNF- $\alpha$  (Liu i sur., 2014). Domitrović i sur. (2012) proveli su ispitivanje zaštitnog utjecaja oleuropeina na tkivo jetre miševa koji su tretirani hepatotoksičnim tetraklorugljikom (CCl<sub>4</sub>). Rezultati su pokazali kako oleuropein smanjuje upalne procese i dovodi do smanjenja nastalih oštećenja u jetri miševa. Pretpostavlja se kako je protuupalni efekt posljedica inducirajućeg djelovanja oleuropeina na enzim hem oksigenazu-1 koji djeluje inhibirajuće na rad TNF- $\alpha$  (Domitrović i sur., 2012).

Sve izraženija rezistencija mikroorganizama prema antibioticima dovela je do povećanog interesa znanstvenika za alternativnim proizvodima s inhibirajućim djelovanjem na mikroorganizme. Pokazalo se kako mnogi biljni ekstrakti pa tako i ekstrakt lista masline imaju visok potencijal primjene u navedenu svrhu. Postoje znanstveni dokazi kako ekstrakt lista masline djeluje protiv bakterija *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella Pneumonia*. Kada je riječ o gljivicama, dokazana je učinkovitost ekstrakta protiv *Cryptococcus neoformans* te većeg broja gljivica iz roda *Candida*, a neke od njih su *Candida albicans*, *Candida glabrata* i *Candida parapsilosis* (Borjan i sur., 2020). Nadalje, postoje znanstvena istraživanja koja su pokazala učinak ekstrakta lista masline na virus hemoragijske septikemije (eng. *viral hemorrhagic septicaemia virus*, VHSV) (Micol i sur., 2005) te na virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*, HIV) (Lee-Huang i sur., 2003).

Povoljni učinci ekstrakta lista masline na zdravlje ljudi prepoznati su i od strane Europske agencije za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Agency*, EFSA). To je otvorilo put mogućnosti primjene ekstrakta list za obogaćivanje prehrambenih proizvoda u svrhu prevencije raznih bolesti i očuvanja ljudskog zdravlja (Zoidu i sur., 2017).

### **2.3. METODE EKSTRAKCIJE**

Ekstrakcija je postupak tijekom kojeg se biljna ili životinjska tkiva tretiraju određenim otapalima prema prethodno razrađenim, standardnim procedurama s ciljem otapanja bioaktivnih spojeva, dok ostali sastojci tkiva ostaju neotopljeni. To je prvi korak u analizi bioaktivnih sastojaka koji otvara mogućnost za njihovu daljnju separaciju i karakterizaciju. Fenolni spojevi zbog već prethodno navedenih pozitivnih učinaka na zdravlje predmet su interesa farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije te se raznim metodama ekstrakcije

izoliraju iz biljnih tkiva. Ne postoji standardna metoda ekstrakcije fenolnih spojeva, već je potrebno izabrati adekvatnu metodu ekstrakcije razmatranjem određenih parametara, kao što su: svojstva i stabilnost spoja, svojstva otapala te terapijska vrijednost spoja (Manousi i sur., 2019).

Najraširenija metoda ekstrakcije je ekstrakcija pomoću otapala, koja se sastoji od četiri glavne faze, a to su: prodiranje otapala u uzorak iz kojeg se želi izolirati određeni spoj, otapanje spoja u otapalu, difuziju spoja iz uzorka i sakupljanje ekstrakta. Učinkovitost ekstrakcije pomoću otapala ovisi o veličini krutih čestica, vrsti otapala, omjeru otapala i krutih čestica, temperaturi i vremenu ekstrakcije. Smanjenjem veličine čestica materijala povećava se učinkovitost ekstrakcijskog procesa. Međutim, presitne čestice otežavaju daljnje postupke separacije kao što je na primjer filtracija. Kako bi se dodatno povećao učinak ekstrakcije važno je izabrati odgovarajuće otapalo, odnosno otapalo koje pokazuje slična svojstva polarosti kao i spoj koji se nastoji ekstrahirati. Povećani udio otapala u odnosu na udio krutih čestica također doprinosi povećanju učinka ekstrakcije. Međutim, upotreba prevelike količine otapala značajno će produljiti postupak koncentriranja dobivenog ekstrakta. Učinkovitost ekstrakcije povećava se i produljenjem vremena ekstrakcije. Navedeno vrijedi samo do postizanja ravnotežne koncentracije spoja u otapalu i uzorku. Nadalje, povišenjem temperature također se povećava ekstrakcijski učinak, ali previsoka temperatura može uzrokovati degradaciju ekstrahiranog spoja. Osim ekstrakcije pomoću otapala, postoje još ekstrakcije sublimacijom, destilacijom i prešanjem (Zhang i sur., 2018).

Metode ekstrakcije koje se primjenjuju za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljaka moguće je podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne (Manousi i sur., 2019). U konvencionalne metode ubrajaju se vodena destilacija, maceracija, ekstrakcija po Soxletu (Manousi i sur., 2019), perkolacija, refluksna ekstrakcija i dekokcija (Zhang i sur., 2018). Dugotrajnost, niska ekstrakcijska selektivnost, velike količine čistih, skupih otapala i temperaturna degradacija spojeva ako se koristi povišena temperatura, čine glavne nedostatke konvencionalnih ekstrakcijskih metoda. Upravo navedeni nedostaci konvencionalnih metoda potakli su razvoj novih, nekonvencionalnih ekstrakcijskih metoda u koje se ubrajaju: ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, enzimima, mikrovalovima, pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkritičnim fluidom, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku i subkritična vodena ekstrakcija. Nekonvencionalne metode ekstrakcije imaju značajno kraće operativno vrijeme u odnosu na konvencionalne. Nadalje, smatraju se ekološki prihvatljivijim jer je značajno

smanjena upotreba otapala, pružaju bolje iskorištenje procesa, a dobiveni ekstrakt je bolje kvalitete (Manousi i sur., 2019).

### 2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Upotreba energije mikrovalova u kemijskim analizama započela je 70-tih godina 20. stoljeća, a do danas je pronašla primjenu u različitim poljima kemije. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) novija je tehnika ekstrakcije koja kombinira energiju mikrovalova i klasičnu ekstrakciju pomoću otapala (Llompert i sur., 2019), a temelji se na oštećenju stanične strukture uzorka koju uzrokuju mikrovalovi (Gomez i sur., 2020).

Mikrovalovi su vrsta neionizirajućeg elektromagnetskog zračenje s frekvencijom koja varira u rasponu od 300 do 300 000 MHz. Mikrovalovi uzrokuju kretanje molekula pomoću dva mehanizma, i to provođenjem odnosno kretanjem iona i rotacijom dipola. Kretanje molekula posljedično dovodi do njihovog zagrijavanja, odnosno dolazi do pretvorbe energije mikrovalova u toplinsku energiju. Otopljeni ioni izloženi elektromagnetskom polju kreću se ovisno o smjeru polja, a promjene smjera kretanja polja i otpor medija dovode do oslobodenja energije u obliku topline (Llompert i sur., 2019). Kretanje iona važno je jer potiče prodiranje otapala u uzorak čime poboljšava ekstrakciju (Blekić i sur., 2011). Nadalje, mikrovalovi uzrokuju rotaciju dipola koja se javlja kao posljedica izlaganja polarnih molekula oscilirajućem električnom polju. Brze rotacije molekula dovode do vibracija i sudara što rezultira otpuštanjem energije i povišenjem temperature. Rotacija dipola značajniji je mehanizam zagrijavanja u procesu MAE (Llompert i sur., 2019). Kako bi zagrijavanje uzorka mikrovalovima bilo moguće važan je udio vode u uzorku. Voda ima izrazito polarna svojstva zbog kojih podliježe djelovanju mikrovalova. Tijekom tretmana mikrovalovima zagrijana voda isparava što dovodi do povećanja tlaka u stanicama, a posljedično do razaranja stanične strukture i ispuštanja staničnog sadržaja u otapalo (Gomez i sur. 2020). Osim prikladnog uzorka važno je odabrati i otapalo prikladno za MAE, odnosno važno je odabrati otapalo s visokom dielektričnom konstantom jer takvo otapalo bolje apsorbira energiju mikrovalova (Llompert i sur., 2019). Voda, metanol i etanol prikladna su otapala za MAE (Blekić i sur., 2011). Nadalje, na performanse MAE utječu još volumen otapala, snaga mikrovalova, vrijeme i temperatura ekstrakcije (Llompert i sur., 2019).

Uređaj za MAE obično se sastoji od 4 glavne komponente, i to generatora mikrovalova, valnog vodiča koji omogućava širenje mikrovalova, aplikatora ili posude s uzorkom i cirkulatora koji omogućava širenje mikrovalova prema naprijed. S obzirom na način dovođenja energije mikrovalova na uzorak uređaje za MAE moguće je klasificirati na *multi-mode* i *single-mode* sustave. *Multi-mode* sustave karakterizira raspršivanje mikrovalnog zračenja unutar prostora uređaja čime se postiže jednolik tretman uzroka, dok se kod *single-mode* sustava mikrovalovi primjenjuju isključivo na mjesto gdje je postavljen uzorak (Gomez i sur., 2020). Uređaji za MAE mogu biti otvoreni ili zatvoreni sustavi. Otvoreni uređaji sadrže kvarcne ekstrakcijske ćelije s kondenzatorom na vrhu. Ovaj tip uređaja radi pri atmosferskom tlaku, a maksimalna temperatura ekstrakcije određena je temperaturom vrelišta primijenjenog otapala. Zatvoreni uređaji rade pri povišenom tlaku i temperaturi te se najčešće upotrebljavaju za procese digestije ili mineralizacije. U ovakvim sustavima temperatura ekstrakcije je znatno viša od temperature vrelišta otapala. Otvoreni sustavi su sigurniji i jednostavniji za korištenje, dok zatvoreni sustavi pružaju veću učinkovitost ekstrakcije (Kaufmann i Christen, 2002).

Za razliku od konvencionalnih metoda ekstrakcije kod koji se toplina polagano prenosi iz okoline u unutrašnjost otapala i uzorka, kod MAE se toplina oslobađa unutar uzorka i otapala i prenosi prema okolini. Ovakav način zagrijavanja jedna je od glavnih prednosti MAE u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije (Lopez-Avila, 2000). Nadalje, MAE se od konvencionalnih metoda razlikuje i po smjeru prijenosa mase. Kod konvencionalnih metoda smjer prijenosa mase suprotan je smjeru prijenosa topline, dok se kod MAE prijenos mase i topline odvijaju u istom smjeru što pridonosi skraćenju vremena i povećanju prinosa ekstrakcije.

Prednosti MAE u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije dokazane su i brojnim istraživanjima. Li i sur. (2012) ispitali su učinkovitost MAE za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz rajčice i dobivene rezultate usporedili s klasičnom ekstrakcijom pomoću otapala. Rezultati su pokazali kako je pomoću MAE u kraćem vremenu ekstrahirano viši udio polifenolnih spojeva koji su imali viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na spojeve ekstrahirane klasičnom ekstrakcijom (Li i sur., 2012). Istraživanja koja su proveli Singh i sur. (2011) na krumpirovoj kori i Ballard i sur. (2010) na kožici kikirikija također su potvrdila bolju učinkovitost MAE u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Dobrinčić i sur. (2020) ispitali su učinkovitost tri različite nekonvencionalne ekstrakcijske metode (MAE, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija pri povišenom tlaku) za ekstrakciju spojeva iz lista masline. Rezultati su pokazali kako su sve tri metode postigle veću učinkovitost u odnosu na konvencionalnu



ekstrakciju. Nadalje, pokazalo se kako bolje rezultate postižu metode koje uzrokuju razaranje stanične strukture pri čemu su MAE i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pokazale bolje rezultate u odnosu na ekstrakciju pri povišenom tlaku (Dobrinčić i sur., 2020).

Iako MAE ima brojne prednosti u odnosu na konvencionalne metode postoje i neki nedostaci kao što su potreba za uvođenjem određenih separacijskih operacija nakon ekstrakcije, povišena temperatura koja može degradirati visokovrijedne spojeve i operativni uvjeti koji mogu značajno varirati ovisno o svojstvima uzorka (Gomez i sur., 2020). Kako bi se dodatno poboljšala učinkovitost razvile su se brojne varijacije u kojima se MAE kombinira s ultrazvukom, visokim tlakom ili se primjenjuje bez upotrebe otapala (Manousi i sur., 2019).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za proizvodnju ekstrakta korišteno je lišće masline sorte oblica koje je prikupljeno na području Zadra tijekom ljeta 2021. godine. Lišće je nakon prikupljanja osušeno na zraku i čuvano na suhom i tamnom mjestu do proizvodnje ekstrakta.

Za proizvodnju sireva korišteno je svježe, pasteurizirano i nehomogenizirano mlijeko s 3,2 % mliječne masti, koje na tržište stavlja mini mljekara Veronika d.o.o.

##### 3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene za HPLC DAD metodu:

- Acetonitril, 100 % HPLC čistoće (Honeywell Riedel-de Haën, Njemačka)
- Mravlja kiselina, 99 % HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Voda, redestilirana

Kemikalije korištene za određivanje efektivnih koncentracije ekstrakta lista masline DPPH metodom:

- $6,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil, Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom etanolu (Lach-Ner, Hrvatska)

Kemikalije korištene za određivanje titracijske kiselost metodom po Soxhlet-Henkelu su:

- 2 %-tni fenolftalein (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kobaltov sulfat CoSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner, Hrvatska)
- 0,1 M NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu:

- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 200 g anhidrida natrijevog karbonata (Gram-Mol, Hrvatska) otopljeno je u 800 ml vruće destilirane vode, a potom ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata i potom je odmjerna tikvica od 1 L nadopunjena do oznake. Otopina je profiltrirana nakon 24 h.

- Standard galne kiseline

Priprema: Odvagano je 500 mg galne kiseline (Sigma-Aldrich, Njemačka) u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 ml 96 %-tnog etanola (Lach-Ner, Hrvatska) kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopilo u danom volumenu, a potom je tikvica destiliranom vodom napunjena do oznake

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida:

- Otopina aluminijevog klorida anhidrida ( $\text{AlCl}_3$ ), 10 %-tna, (w/v), (VWR, Belgija)  
Priprema: Odgovarajuća odvaga aluminijevog klorida otopljena je u destiliranoj vodi jer je voda korištena kao otapalo pri ekstrakciji.
- Otopina kalijevog acetata, 1 M (Kemika, Hrvatska)  
Priprema: Odvagano je 4,907 g kalijevog acetata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno preneseno pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 50 mL, a potom je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom:

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Gram-Mol, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, 40 mM  
Priprema: Otpipetirano je 330  $\mu\text{L}$  37 %-tne klorovodične kiseline u odmjernu tikvicu od 100 mL, a potom je tikvica do oznake nadopunjena destiliranom vodom.
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM, (Sigma-Aldrich, Njemačka)  
Priprema: Odvagano je 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 10 mL koja je potom do oznake nadopunjena s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina, (Lach-Ner d.o.o., Češka)  
Priprema: Odvagano je 0,541 g željezo (III)-klorid heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je potom do oznake nadopunjena destiliranom vodom.
- Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COOH} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ), (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (100 % Merck, Darmstadt, Njemačka): pripremljeno razrjeđenje na koncentraciju 99 %
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: Odvagano je 3,1 g natrijeva-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno preneseno pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L u koju je potom otpipetirano 16 mL glacijalne octene kiseline i zatim je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremljen je FRAP reagens tako da je pomiješano 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- Standard Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma-Aldrich, Ruska Federacija)

Priprema: Za pripremu 2 mM otopine Trolox-a odvagano je 0,0501 g Trolox-a u plastičnu lađicu za vaganje i kvantitativno preneseno pomoću 2 mL 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu volumena 0,1 L. Tikvica je potom nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopinu Trolox-a potrebno je čuvati na tamnom zbog čega je tikvica omotana aluminijskim folijom, a potom je stavljena 5 min u ultrazvučnu kupelj kako bi se sadržaj homogenizirao.

### 3.1.2. Aparatura

- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (Ethos X, Milestone, Italija)
- Rotavapor (Heating Bath B-490, Büchi, Švicarska)
- (Digital pocket refractometer Pal-3, Atago, Japan)
- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) sa Nucleosil 100-5C18, 5 mm (250 mm×4.6 mm i.d.) kolonom (Macherey-Nagel)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)
- Ultrazvučna vodena kupelj (Elmasonic 4 H, Elma, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, SAD)
- Kolorimetar (CM-700d, Konica Minolta, Japan)
- Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., West Sussex, UK)
- Centrifuga (Rotina 380R, Hettich Zentrifugen GmbH, Njemačka)
- Vodena kupelj (WNE 45 Waterbath, Memmert, Njemačka)
- $a_w$ -metar (HygroPalm HP23  $a_w$  metar, Rotronic, Švicarska)
- pH-metar (ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka)

- Termostat (Inkolab, Hrvatska)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Analitička vaga (AB104, Mettler Toledo, SAD)
- Tehnička vaga (KB 3600-2N, Kern, Njemačka)

### 3.1.3. Pribor

- Membranski filter (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Njemačka)
- Filter papir
- Mikropipeta Kartell volumena od 100 do 1000  $\mu\text{L}$
- Odmjerne tikvice volumena 5, 10, 100, 500 i 1000 mL
- Pipete volumena 1 i 10 mL
- Menzura volumena 25 i 100 mL
- Falcon epruvete (50 mL)
- Laboratorijske čaše (25, 50, 150, 300)
- Staklene epruvete
- Kvarcne kivete
- Plastične lađice za vaganje
- Metalne žličice
- Metalne špatule

### 3.2.METODE RADA

#### 3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline

Lišće masline prije podvrgavanja ekstrakciji mikrovalovima usitnjeno je na fine, sitne komadiće (slika 2).



**Slika 2.** Usitnjeni list masline (*vlastita fotografija*)

Na tehničkoj vagi odvagano je po 6 g tako pripremljenog lista direktno u ekstrakcijske ćelije, a potom je u svaku ekstrakcijsku ćeliju dodan po jedan magnet i 80 mL destilirane vode. Napunjene ćelije zatvorene su čepom, stavljene u odgovarajuće okvire i postavljene u uređaj za MAE koji sadrži 15 ekstrakcijskih ćelija što je prikazano na slici 3. Ekstrakcija je provedena pri temperaturi 80 °C i tlaku 100 bara, a vrijeme ekstrakcije iznosilo je 2 min. Vrijeme potrebno za postizanje temperature ekstrakcije iznosilo je 2 min, miješanje je namješteno na 50 %, a hlađenje nakon ekstrakcije trajalo je 1 min. Dobrinčić i sur. (2020) su u svom ispitivanju prethodno optimirali korištene ekstrakcijske parametre (Dobrinčić i sur., 2020).



**Slika 3.** Uređaj za MAE Ethos X, Milestone (*vlastita fotografija*)

Po završetku ekstrakcije provedena je klasična filtracija preko filter papira kako bi se ekstrakt izdvojio od ostataka biljnog materijala. Profiltrirani ekstrakt pasteriziran je 5 min na 90 °C i čuvan u hladnjaku do uparavanja. Uparavanje ekstrakta provedeno je na rotavaporu pri 45 °C i 85 okretaja u minuti. Uparavanje je provedeno do otprilike 16 % suhe tvari, a za provjeru udjela suhe tvari u koncentriranom ekstraktu korišten je digitalni refraktometar. Koncentrirani ekstrakt čuvan je u smrznutom stanju do upotrebe.

### 3.2.2. Analiza sastava ekstrakta lista masline HPLC DAD metodom

Određivanje fenolnih spojeva u proizvedenom, koncentriranom ekstraktu lista masline provedeno je HPLC metodom uz UV/VIS-Diode Array detekciju koju su opisali Dragović-Uzelac i sur. (2012). Kontrola uređaja i obrada podataka provedena je pomoću Chemstation program (ver. C.01.03.).

Postupak određivanja:

Ekstrakt lista masline prije analize profiltriran je kroz membranski filter čija je veličina pora iznosila 0,45 μm. Za analizu je korišten HPLC uređaj koji sadrži UV-VIS/DAD detektor. Korištene mobilne faze su: 3 %-tna otopina mravlje kiseline u redestiliranoj vodi (otapalo A) i 3 %-tna otopina mravlje kiseline u 80 %-tnom acetonitrilu. Otapala korištena kao mobilne faze prethodno su odzračena 15 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji. Vrijeme uravnoteženja kolone iznosilo je 2 min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL. Provedeno je graduirano

eluiranje (tablica 1) u trajanju 35 min kroz kolonu temperature 20 °C, uz održavanje protoka od 0,9 mL min<sup>-1</sup>. Spektri su skenirani u rasponu od 278 do 340 nm.

**Tablica 1.** Gradijent za HPLC-UV/VIS/PDA analizu fenolnih spojeva

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )
0	90	10	0,9
25	60	40	0,9
30	30	70	0,9
35	90	10	0,9

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenima zadržavanja standarda, polarosti i usporedbom s karakterističnim UV/VIS-spektrima standarda. Kvantitativne vrijednosti fenolnih spojeva izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca.

Izrada baždarnih pravaca:

Standardi fenolnih spojeva otopljeni su u 100 %-tnom metanolu, a potom su razrijeđeni u 5 različitih koncentracija. Iz površine pikova i masenih koncentracija pripremljenih razrijeđenja standardnih otopina dobiveni su baždarni pravci iz kojih su izračunate njima pripadajuće jednadžbe pravaca (tablica 2). Izračunate jednadžbe pravaca korištene su za izračunavanje koncentracija spojeva u analiziranim uzorcima izražene kao mg L<sup>-1</sup>.

**Tablica 2.** Baždarni pravci za fenolne spojeve identificirane u ekstraktu lista maslina

Fenolni spojevi identificirani u ekstraktu lista masline	Baždarni pravac	
Klorogenska kiselina	$Y = 63,539 * X$	$R^2 = 0,9874$
Kava kiselina	$Y = 68,301 * X$	$R^2 = 0,9998$
Rutin	$Y = 35,218 * X$	$R^2 = 0,9986$
Tirosol	$Y = 35,519 * X$	$R^2 = 0,9952$
Oleuropein	$Y = 6,3607 * X$	$R^2 = 0,9962$



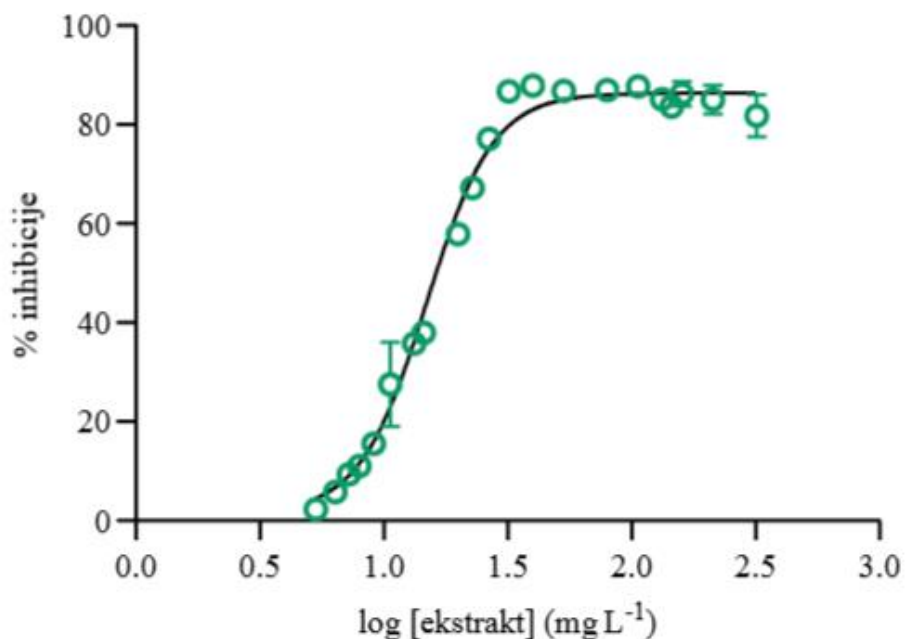
### 3.2.3. Određivanje efektivnih koncentracije ekstrakta lista masline

Za proizvodnju sireva s dodatkom ekstrakta lista masline korištene su 3 različite koncentracije ekstrakta. Korištene koncentracije ekstrakta određene su na temelju antioksidacijske aktivnosti, DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebnih za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa. Pripremljene su otopine ekstrakta lista masline poznatih koncentracija ukupnih fenola koje su se kretale od 15.935,00 mg GAE L<sup>-1</sup> (koncentracija u originalnom koncentriranom ekstraktu) do 5,31 mg GAE L<sup>-1</sup> (koncentracija u ekstraktu razrijeđenom 3000 puta). Pripremljenim otopinama određena je antioksidacijska aktivnost tako da je u epruvetu otpipetirano 3 mL (60 μM) otopine DPPH reagensa i 250 μL pripremljene otopine ekstrakta lista masline. Na isti način pripremljena je i slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala vodu. Epruvete s pripremljenim reakcijskim smjesama ostavljene su 20 min u mraku pri sobnoj temperaturi, a po završetku inkubacije izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru pri 517 nm (Tavakoli i sur., 2018).

Pomoću izmjerenih vrijednosti apsorbancije određen je postotak inhibicije DPPH reagensa prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_{\text{slijepa proba}} - A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{slijepa proba}}} * 100 \quad [1]$$

Iz određenih vrijednosti % inhibicije DPPH reagensa, pomoću računalnog programa Prism, nacrtana je krivulja inhibicije s vrijednostima % inhibicije na apscisi i vrijednostima logaritma koncentracije ukupnih fenola u ekstraktu na ordinati.



**Slika 4.** Krivulja inhibicije DPPH reagensa

Pomoću krivulje inhibicije (slika 4) određene su efektivne koncentracije ekstrakta lista masline koje inhibiraju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa, a redom iznose: 11,5; 16,6 i 26,3 mg GAE L<sup>-1</sup>. Te koncentracije korištene su dalje u postupku proizvodnje sireva te su pri tom korištene analogne oznake EC25, EC50 odnosno EC75.

#### 3.2.4. Proizvodnja sira s dodatkom ekstrakta lista masline postupkom enzimske koagulacije

Proizvedene su dvije serije sireva s dodatkom 3 različite koncentracije ekstrakta (EC25, EC50, EC75) i kontrolni sir (EK) bez dodatka ekstrakta. Ekstrakt je u jednoj seriji sireva dodavan direktno u mlijeko prije enzimske koagulacije (EM 25, EM 50, EM 75), dok je u drugoj seriji ekstrakt dodavan u dobiveni gruš (EG 25, EG 50, EG 75). Kod sireva kod kojih je ekstrakt dodavan u gruš svaka koncentracija povećana je za 20 % kako bi se smanjili gubici uslijed izdvajanja sirutke. Za proizvodnju svakog sira korištene su 2 L mlijeka.

Mlijeko je zagrijano na temperaturu oko 35 °C te je potom dodano 0,6 g kalcijevog klorida (CaCl<sub>2</sub>) (Gram-mol, Hrvatska) i oko 0,02 g sirila. Kod sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko dodani, u ovom koraku je u mlijeko dodan i odgovarajuća količina ekstrakta. Mlijeko je zatim stavljeno na 30 do 40 min u termostat temperiran na 37 °C kako bi došlo do koagulacije. Dobiveni gruš je nakon završene faze koagulacije izrezan na kockice i ostavljen neko vrijeme kako bi se što više sirutke izdvojilo, a po završetku je prebačen u kalupe prekrivene gazom. Kod sireva s dodatkom ekstrakta u gruš, u ovoj fazi je dodana odgovarajuća količina tako da je gruš prvo prebačen u pripremljeni kalup, a nakon što se jedan dio sirutke izdvojio ekstrakt je što ravnomjernije umiješan u gruš.

Sirevi su se potom cijedili pod vlastitom masom u trajanju 2 otprilike 2-4 sata te je zatim postavljen uteg mase 5 kg i sirevi su ostavljeni na prešanje kroz 24 sata uz povremeno okretanje. Po završetku procesa proizvodnje sirevi su izvađeni iz kalupa (slika 5), zapakirani u hermetički zatvorene, dezinficirane vrećice i skladišteni u hladnjaku na temperaturi između + 4 °C i + 8 °C.

Sirutka dobivena u opisanom procesu proizvodnje sireva (S<sub>EK</sub>, S<sub>EM 25</sub>, S<sub>EM 50</sub>, S<sub>EM 75</sub>, S<sub>EG 25</sub>, S<sub>EG 50</sub>, S<sub>EG 75</sub>) je prikupljena u falcon epruvete i skladištena u hladnjaku do analize.



**Slika 5.** Sirevi dobiveni enzimskom koagulacijom nakon vađenja iz kalupa (*vlastita fotografija*)

### 3.2.5. Proizvodnja sira s dodatkom ekstrakta lista masline postupkom kiselinske koagulacije

Postupkom kiselinske koagulacije također su proizvedene dvije serije sireva s 3 različite koncentracije ekstrakta (EC25, EC50, EC75) i kontrolni sir (KK) te je ekstrakt ponovno dodavan u mlijeko i u dobiveni gruš. Za proizvodnju svakog sira korištena je po 1 L mlijeka koje je zagrijano na 30 °C. U zagrijano mlijeko dodano je 10 DCU sirarske kulture (LYO 100 DCU, Danisco, Danska), a za sireve s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) u ovom koraku dodan je i ekstrakt. Mlijeko je potom stavljeno na fermentaciju u termostat temperiran na 30 °C kroz 24 sata. Po završetku fermentacije gruš je izrezan i dogrijava u vodenoj kupelji temperature 65 °C kako bi dodatno očvrstnuo. Dogrijava je trajalo oko 90 min, a potom je gruš prebačen na cjedila prekrivena gazom.

Kod sireva s dodatkom ekstrakta u gruš u ovom koraku je kao i kod sireva dobivenih enzimskom koagulacijom ravnomjerno umješan ekstrakt, također u 20 % višoj koncentraciji (KG 25, KG 50, KG 75). Sirevi su se cijedili po vlastitom masom 24 sata, a potom su zapakirani u hermetički zatvorene dezinficirane vrećice i čuvani u hladnjaku. Slika 6 prikazuje sireve dobivene postupkom kiselinske koagulacije.

Nakon proizvodnje sireva kiselinskom koagulacijom također su prikupljeni uzorci dobivene sirutke (S<sub>KK</sub>, S<sub>KM 25</sub>, S<sub>KM 50</sub>, S<sub>KM 75</sub>, S<sub>KG 25</sub>, S<sub>KG 50</sub>, S<sub>KG 75</sub>) i čuvani u hladnjaku do analize.



**Slika 6:** Sir dobiven kiselinskom koagulacijom (*vlastita fotografija*)

Proizvedeni sirevi, kao i pripadajući uzorci sirutke u daljnjem tijeku istraživanja su označeni kako je navedeno u tablici 3.

**Tablica 3.** Oznake uzoraka sira i sirutke

UZORCI SIREVA	OZNAKE	UZORCI SIRUTKE	OZNAKE
Kontrola dobivena <b>enzimskom koagulacijom</b>	EK	Sirutke kontrole dobivene <b>enzimskom koagulacijom</b>	S <sub>EK</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 25	EM 25	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 25	S <sub>EM 25</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 50	EM 50	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 50	S <sub>EM 50</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 75	EM 75	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 75	S <sub>EM 75</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 25	EG 25	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 25	S <sub>EG 25</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 50	EG 50	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 50	S <sub>EG 50</sub>
Sir dobiven enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 75	EG 75	Sirutka sira dobivenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 75	S <sub>EG 75</sub>
Kontrola dobivena <b>kiselinskom koagulacijom</b>	KK	Sirutka kontrole dobivene <b>kiselinskom koagulacijom</b>	S <sub>KK</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 25	KM 25	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 25	S <sub>KM 25</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 50	KM 50	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 50	S <sub>KM 50</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 75	KM 75	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u mlijeko</b> , EC 75	S <sub>KM 75</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 25	KG 25	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 25	S <sub>KG 25</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 50	KG 50	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 50	S <sub>KG 50</sub>
Sir dobiven kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 75	KG 75	Sirutka sira dobivenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta <b>u gruš</b> , EC 75	S <sub>KG 75</sub>

### 3.2.6. Određivanje prinosa sira

Sirevi su nakon vađenja iz kalupa izvagani na tehničkoj vagi. Prinos sireva odnosno količina sira dobivena od određene količine mlijeka izračunata je prema izrazu (Tratnik i Božanić, 2012):

$$\text{Prinos sira (\%)} = \frac{m_{sir}}{m_{mlijeko} \text{ ili } V_{mlijeko}} * 100 \quad [2]$$

### 3.2.7. Određivanje aktiviteta vode sireva

Određivanje aktiviteta vode sireva provedeno je laboratorijskim  $a_w$ -metrom. Posudica koja se spoji s  $a_w$ -metrom napunjena je usitnjenim uzorkom sira nakon čega je započeto mjerenje pritiskom na tipku uređaja. Vrijednost aktiviteta vode očitana je s ekrana uređaja nakon zvučnog signala koji je označio kraj mjerenja.

### 3.2.8. Određivanje pH vrijednosti sira i sirutke

pH vrijednost sira izmjerena je laboratorijskim pH-metrom. Na tehničkoj vagi odvagano je 3 g uzorka sira koji je potom usitnjen u tarioniku i pomiješan s 30 mL prokuhane i ohlađene destilirane vode. Prethodno očišćena elektroda pH-metra uronjena je u pripremljenu suspenziju sira i vode. Očitavanje pH vrijednosti izvršeno je nakon što se zapis na ekranu stabilizirao (Božanić i sur., 2010).

### 3.2.9. Određivanje titracijske kiselosti sira po Soxhlet-Henkel-u

Uzorak sira mase 5 g odvagano je na tehničkoj vagi i usitnjen u tarioniku uz polaganu dodavanje destilirane vode zagrijane na temperaturu 50 °C. Sadržaj je kvantitativno prenesen iz tarionika u Erlenmeyerovu tikvicu pazeći da ukupna količina vode bude 100 mL. Pripremljenoj emulziji u tikvici dodano je 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina, a potom je provedena titracija sa 0,1 M otopinom NaOH. Titracija je provedena do pojave blijedo crvene boje (Božanić i sur., 2010). Titracijska kiselost sira izračunata je prema formuli:

$$^{\circ}_{SH} = a * f * 8 \quad [3]$$

a – mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju

f – faktor otopine NaOH = 1

8 – razrjeđenje

### 3.2.10. Određivanje titracijske kiselosti sirutke po Soxhlet-Henkel-u

Titracijska kiselost sirutke određena je modificiranim postupkom koji se upotrebljava i za mlijeko. U jednoj Erlenmeyerovoj tikvici pripremljena je standardna boja koja predstavlja nijansu boje do koje je potrebno provesti titraciju. Za pripremu standardne otopine otpipetirano je 20 mL uzorka sirutke i 1 mL 5 %-tne otopine kobaltovog sulfata ( $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ). U drugu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirano je 20 mL sirutke i dodano 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina. Pripremljena smjesa titrirana je sa 0,1 M otopinom NaOH do pojave blijedo ružičaste boje (Božanić i sur., 2010). Titracijska kiselost sirutke izračunata je prema formuli:

$$^{\circ}_{SH} = a * f * 2 \quad [4]$$

a – mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju

f – faktor otopine NaOH = 1

2 – razrjeđenje

### 3.2.11. Određivanje indeksa boje sira

Boja sira određena je CIELAB metodom pomoću kolorimetra kojim su izmjereni parametri  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (Lancaster i sur., 1997).

Određivanje indeksa boje sira provedeno je kako bi se utvrdilo postoji li razlika u boji između sireva s dodatkom ekstrakta lista masline i kontrolnog sira. Iz dobivenih vrijednosti parametara  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  koji se odnose na sireve s dodatkom ekstrakta i parametara  $L_{ref}^*$ ,  $a_{ref}^*$  i  $b_{ref}^*$  koji se odnose na kontrolni sir, izračunata je ukupna promjena boje, izražena kao vrijednost  $\Delta E^*$ , prema niže navedenoj formuli. Tablica 4. prikazuje utjecaj razlike izmjerenih parametara na percepciju kod promatrača.

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

$L^*$  - svjetlina boje ispitivanog uzorka

$a^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka

$b^*$  - parametar boje ispitivanog uzorka

$L_{ref}^*$  - svjetlina boje kontrolnog uzorka

$a_{ref}^*$  - parametar boje kontrolnog uzorka

$b_{ref}^*$  - parametar boje kontrolnog uzorka

**Tablica 4.** Utjecaj izmjerenih vrijednosti kromatskih karakteristika ispitivanih uzoraka i kontrolnog uzorka izraženih kao vrijednost  $\Delta E^*$  na percepciju boje kod promatrača (prema Mokrzycki i Tatol, 2011)

$\Delta E^*$	Utjecaj na percepciju promatrača
0-1,0	Promatrač ne vidi razliku
1,0-2,0	Samo iskusan promatrač vidi razliku
2,0-3,5	Neiskusan promatrač vidi razliku
3,5-5,0	Vidljiva jasna razlika u boji
>5,0	Promatrač vidi dvije različite boje

### 3.2.12. Određivanje teksture sira

Određivanje teksture sira provedeno je teksturometrom. Uzorci sireva rezani su na kockice veličine 1 cm<sup>3</sup>, postavljeni na sredinu postolja teksturometra i potom podvrgnuti kompresiji dva puta do 50 % deformacije ćelijom mase 50 kg. Kompresija je provedena brzinom 1 m s<sup>-1</sup> s razmakom od 5 sekundi između dva ciklusa. Za obradu rezultata korišten je softver NexygenPlus pomoću kojeg su određeni sljedeći parametri: adhezivnost (Nmm), adhezivna sila, kohezivnost, tvrdoća, gumenost, žvakljivost (Nmm), vlaknastost (mm), lom, otpornost i odgođena elastičnost (mm).

### 3.2.13. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola korištena je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm (modificirano prema Shortle i sur., 2014). Koncentracija ukupnih fenola određena je u koncentriranom ekstraktu lista masline te u uzorcima sireva i sirutke.



Priprema uzorka sira:

Uzorak sira mase 20 g homogeniziran je s 20 mL destilirane vode 2 minute. Homogenizirani uzorak je centrifugiran 10 minuta, na 10 000 rpm, pri 5 °C, a po završetku je dobiveni supernatant izdvojen mikropipetom i skladišten na 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

Priprema uzorka vodenog ekstrakta lista masline:

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u koncentriranom ekstraktu lista masline bilo je potrebno razrjeđivanjem uzorka dobiti rezultat apsorbancije u rangu prihvatljivosti odnosno između 0 i 1. Mjerenjem apsorbancije različitih koncentracija ekstrakta ustanovljeno je kako je uzorak ekstrakta potrebno razrijediti 100 puta s destiliranom vodom.

Priprema uzorka sirutke:

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola u sirutki dobivenoj proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta bilo je potrebno razrijediti sirutku s destiliranom vodom 5 puta, dok sirutku kontrolnog sira nije bilo potrebno razrijediti.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom je otpipetirano 0,1 mL prethodno pripremljenog uzorka, 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i nakon nekoliko minuta 1 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata. Sve skupa je pomiješano pomoću Vortexa, a potom su uzorci stavljeni u vodenu kupelj na termostatanje 25 min pri temperaturi 50 °C. Po završetku termostatiranja izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru pri 765 nm. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali se umjesto uzorka dodavalo otapalo za ekstrakciju odnosno destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca prvo izvagano je na analitičkoj vagi 0,5 g galne kiseline. Galna kiselina je otopljena u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernej tikvici od 100 mL, a potom je tikvica do oznake napunjena destiliranom vodom.

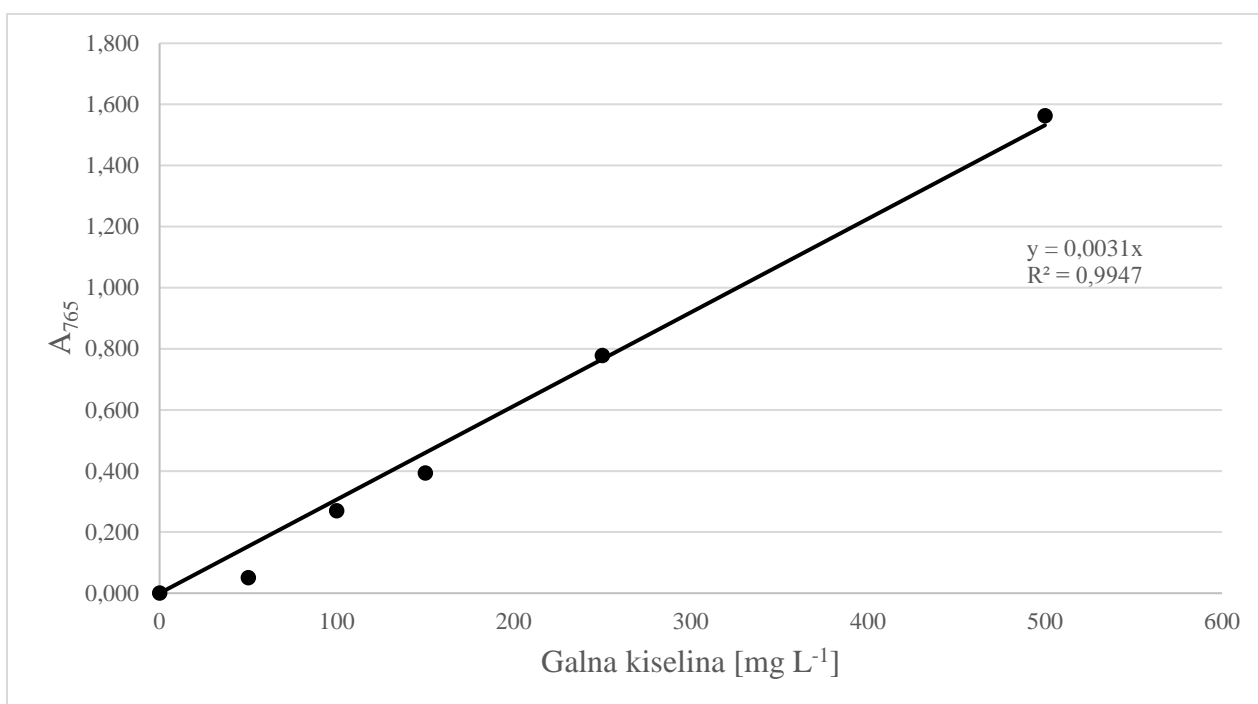
Od pripremljenog standarda galne kiseline pripremljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da su redom otpipetirani alikvoti standardne galne kiseline volumena 1, 2, 3, 5 i 10 mL, a tikvice su potom nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Tako su u dobivene

otopine koncentracije 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup>. Daljnji postupak pripreme reakcijskih smjesa i očitavanja apsorbancije jednak je kao i za prethodno opisane uzorke.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (tablica 5) nacrtan je baždarni pravac (slika 7) pomoću Microsoft Excel programa.

**Tablica 5.** Apsorbancija u ovisnosti o koncentraciji galne kiseline

Galna kiselina (mg L <sup>-1</sup> )	A <sub>765</sub>
50	0,051
100	0,270
150	0,394
250	0,778
500	1,563



**Slika 7.** Baždarni pravac za galnu kiselinu

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0031 * X$$

[6]

gdje je:

Y- apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima sireva, sirutke i ekstrakta koji nisu razrjeđivani izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Ukoliko su uzorci bili razrjeđivani koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema formuli:

$$X (\text{mg mL}^{-1}) = X' (\text{mg mL}^{-1}) * \text{razrjeđenje} \quad [7]$$

gdje je:

X- koncentracija ukupnih fenola u uzorku

X' – Y/0,0031 (iz jednadžbe pravca)

#### 3.2.14. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu lista masline, sirevima i sirutki određena je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji aluminijeva klorida i koja ima apsorpcijski maksimum pri 415 nm (Aryal i sur., 2019).

Priprema uzoraka:

Za određivanje ukupnih flavonoida sira korišten je supernatant dobiven postupkom koji opisan u prethodnom potpoglavlju.

Koncentrirani ekstrakt lista masline razrijeđen je destiliranom vodom 100 puta, dok su kod uzoraka sirutke, za koja nije bilo moguće postići odgovarajuća očitavanja apsorbancije, pripravljena razrjeđenja destiliranom vodom 5 puta.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom je otpipetirano 1 mL uzorka, 0,2 mL 10 %-tne otopine  $\text{AlCl}_3$ , 0,2 mL 1 M otopine kalijevog acetata i 5,6 mL destilirane vode. Sve skupa je pomiješano pomoću Vortexa i inkubirano na sobnoj temperaturi 30 min, a potom je očitana apsorbancija pri 415 nm. Slijepa proba je pripravljena na isti način, samo je umjesto uzorka dodana destilirana voda koja je korištena kao ekstrakcijsko otapalo.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca odvagano je 10 mg kvercetina i otopljeno u metanolu u odmjernoj tikvici od 50 mL koja je nadopunjena do oznake. Iz otopine kvercetina potom su pripravljena razrjeđenja u koncentracijama 0, 25, 50, 75, 100, 150 i 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Razrjeđenja su pripravljena tako da je u odmjerne tikvice redom otpipetirano 0; 1,25; 3,75; 5 i 7,5 mL alikvota otopine kvercetina te su tikvice do oznake nadopunjene metanolom

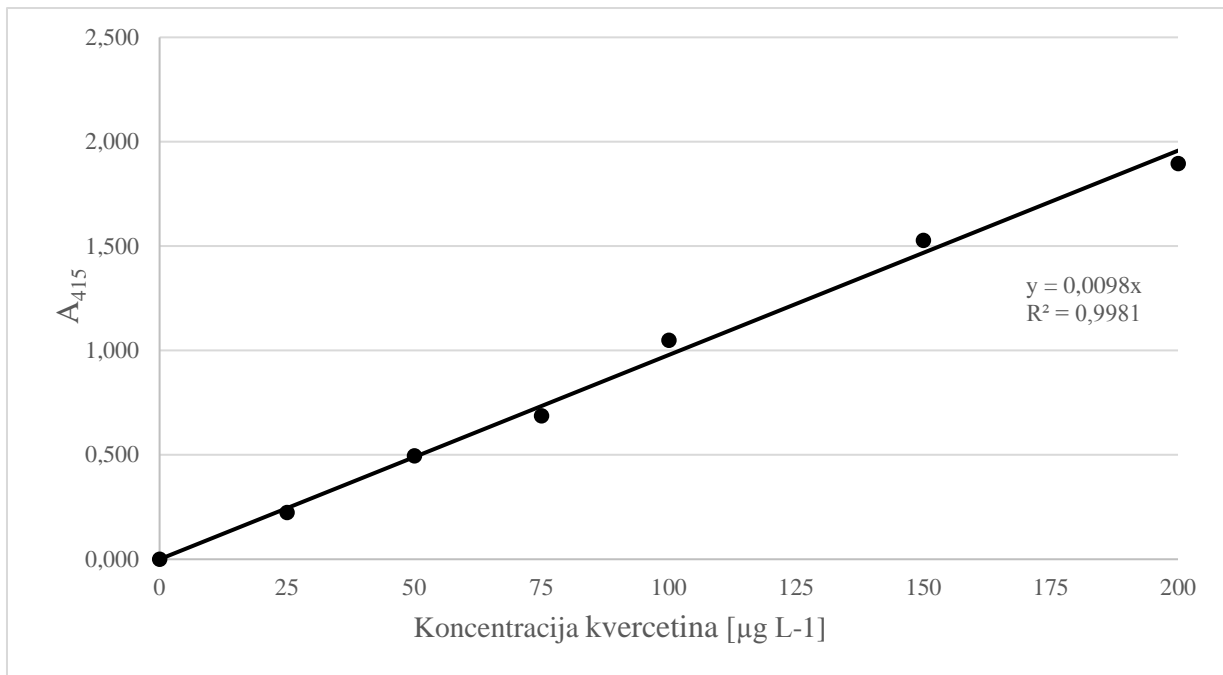
Daljnji postupak pripreme reakcijskih smjesa i očitavanja apsorbancije jednak je kao i za prethodno opisane uzorke.

Slijepa proba sadržavala je sve osim uzorka umjesto kojeg je dodana destilirana voda.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopine kvercetina nacrtan je baždarni pravac (slika 8) pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije kvercetina na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati. Tablica 6. prikazuje koncentracije kvercetina s izmjerenim vrijednostima apsorbancije.

**Tablica 6.** Apsorbancija u ovisnosti o koncentraciji kvercetina

Kvercetin ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$A_{415}$
25	0,225
50	0,496
75	0,688
100	1,049
150	1,528
200	1,895



**Slika 8.** Baždarni pravac za kvercetin

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0098 * X \quad [8]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm

X – koncentracija kvercetina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima sireva, sirutke i ekstrakta koji nisu razrjeđivani izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca.

Koncentracija ukupnih flavonoida u razrjeđivanim uzorcima izračunata je prema formuli:

$$X (\text{mg mL}^{-1}) = X' (\text{mg mL}^{-1}) * \text{razrjeđenje} \quad [9]$$

gdje je:

X- koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku

X' –  $Y/0,0098$  (iz jednadžbe pravca)

### 3.2.15. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakta lista masline te sireva i sirutke korištena je FRAP metoda kod koje u kiselom mediju dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), pri čemu se razvija intenzivno plavo obojenje zbog nastanka fero-tripiridiltirazin kompleksa koji ima apsorpcijski maksimumom pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Priprema uzoraka:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorci sira pripremljeni su istim postupkom kao i za prethodne dvije metode, dok su za uzorke ekstrakta i sirutke pripremljene odgovarajuća razrjeđenja.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog uzorka i 2080  $\mu\text{L}$  pripremljenog FRAP reagensa. Sve skupa je dobro promiješano pomoću Vortexa, a potom stavljeno 5 min na termostatiranje u vodenu kupelj pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon termostatiranja izmjerena je apsorbanacija pri 593 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodana destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca:

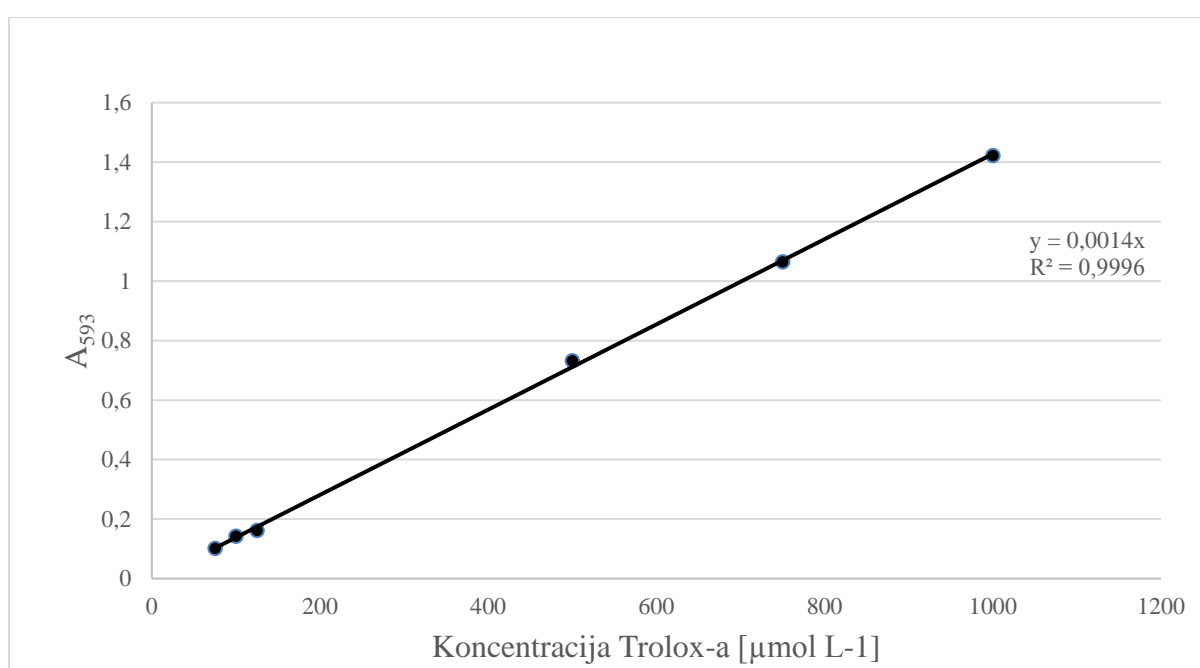
Za pripremu baždarnog pravca pripremljena je 2 mmol  $\text{L}^{-1}$  otopina Trolox-a od koje su potom pripremljen razrjeđenja u koncentracijama 75, 100, 125, 500, 750 i 1000  $\mu\text{M}$ .

Daljnji postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti pripremljenih razrjeđenja proveden je po prethodno opisanom postupku.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije otopine Trolox-a nacrtan je baždarni pravac (slika 9) pomoću računala (program Microsoft Office Excel) s vrijednostima koncentracije Trolox-a na apscisi i vrijednostima apsorbanacije na ordinati. Tablica 7. prikazuje koncentracije Trolox-a s izmjerenim vrijednostima apsorbanacije.

**Tablica 7.** Apsorbancija u ovisnosti o koncentraciji Trolox-a

Trolox ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$A_{593}$
75	0,101
100	0,142
125	0,161
500	0,732
750	1,064
1000	1,422



**Slika 9.** Baždarni pravac za Trolox

Dobivena jednačba pravca glasi:

$$y = 0,0014 * X \quad [10]$$

$$R^2 = 0,9996$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

Ukoliko su uzorci bili razrjeđivani antioksidacijski kapacitet izračunat je prema formuli:

$$X (\text{mg mL}^{-1}) = X' (\text{mg mL}^{-1}) * \text{razrjeđenje} \quad [11]$$

gdje je:

X – antioksidacijski kapacitet uzorka

X' – Y/0,0014 (iz jednadžbe pravca)

### 3.2.16. Obrada podataka

Rezultati mjerenja dobiveni u ovom radu su pomoću programa Microsoft Office Excel 365® izraženi kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajan utjecaj trenutka dodatka i koncentracije dodanog ekstrakta lista masline na boju i teksturu proizvedenih sireva dodatno je za rezultate boje i teksture, pomoću Microsoft Office Excel 365® programa, provedena dvosmjerna analiza varijance ANOVA (eng. *Analysis of variance*)



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je proizvesti sireve s dodatkom ekstrakta lista masline te odrediti metodu proizvodnje i trenutak dodatka ekstrakta kojim se ostvaruje bolje zadržavanje ekstrakta u siru. Za sirenje mlijeka koristile su se dvije metode, a to su enzimsko koagulacija pomoću sirila i kiselinska koagulacija pomoću sirarske kulture.

Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije koje su prethodno određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebnih za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa te koje su u nastavku rada prikazane oznakama EC25, EC50 i EC75, a koje redom iznose: 11,5; 16,6 i 26,3 mg GAE L<sup>-1</sup>.

Svim proizvedenim uzorcima sireva neposredno nakon proizvodnje određena je masa, pomoću koje je izračunat prinos, zatim pH, titracijska kiselost, aktivitet vode, boja, tekstura, koncentracija ukupnih fenola, koncentracija ukupnih flavonoida i antioksidacijski kapacitet. Osim sireva paralelno su analizirani i uzorci sirutke nastale proizvodnjom sireva u svrhu praćenja gubitka ekstrakta tijekom procesa cijedenja. Svim uzorcima sirutke određeni su pH, titracijska kiselost, koncentracija ukupnih fenola i flavonoida te antioksidacijski kapacitet, Tablica 4 prikazuje oznake dodijeljene analiziranim uzorcima sireva i sirutke koje su korištene u nastavku rada.

#### 4.1. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA LISTA MASLINE

Sastav koncentriranog ekstrakta lista masline određen je HPLC DAD metodom dok su udjel ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijski kapacitet određeni metodama opisanim u prethodnom poglavlju. Rezultati navedenih analiza prikazani su u tablici 8.

**Tablica 8.** Karakterizacija sastava proizvedenog ekstrakta lista masline

Sastav ekstrakta lista masline	Koncentracija
Oleuropein	1,70 mg g <sup>-1</sup>
Rutin	0,72 mg g <sup>-1</sup>
Tirosol	0,38 mg g <sup>-1</sup>
Kava kiselina	0,30 mg g <sup>-1</sup>
Klorogenska kiselina	0,26 mg g <sup>-1</sup>
Ukupni fenoli	35,23 ± 0,79 mg GAE g <sup>-1</sup>
Ukupni flavonoidi	3,56 ± 0,14 mg QE g <sup>-1</sup>
Antioksidacijski kapacitet	38,67 ± 1,35 mg TEQ g <sup>-1</sup>

*GAE – galna kiselina; QE – kvercetin; TEQ – Trolox*

Prisutnost svih detektiranih spojeva u proizvedenom ekstraktu lista masline potvrđena je prethodnim znanstvenim istraživanjima. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako je oleuropein najzastupljeniji fenolni spoj u ekstraktu lista masline i čini 4,89 % ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu. Rutin, tirosol, kava kiselina i klorogenska kiselina detektirani su u nižim koncentracijama i čine 2,04; 0,08; 0,85 i 0,74 % ukupnih fenola.

Koncentracija oleuropeina u proizvedenom ekstraktu lista masline znatno je niža od koncentracije koju su u svom radu naveli Lins i sur. (2018), a koja iznosi 25.5 ± 5.2 mg g<sup>-1</sup>. Jaski i sur. (2019) u svom radu također su naveli viši udio oleuropeina u proizvedenom ekstraktu lista masline, koji je varirao između 80,5 i 82,9 mg g<sup>-1</sup>.

Sánchez-Gutiérrez i sur. (2021) u svom radu prikazali su udjel ukupnih fenola za vodeni ekstrakt lista masline proizveden pomoću MAE u iznosu od 31,2 mg g<sup>-1</sup> što je približno vrijednosti dobivenoj za ekstrakt korišten u ovom radu. Dobiveni udjel nalazi se unutar raspona vrijednosti koje su u svom istraživanju za ekstrakt lista masline naveli Medina i sur. (2019), a koji iznosi od 7,5 do 249,81 mg g<sup>-1</sup>. Međutim, dobiveni udjel ukupnih fenola niži je u odnosu

na udjel koji su u svom radu prikazali Ahmad-Quasem i sur. (2013), a koji iznosi  $66 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$ . Talhaoui i sur. (2014) u svom radu naveli su viši udio fenolnih spojeva u ekstraktu lista masline koji je ovisno o sorti varirao između  $52,129 \text{ mg g}^{-1}$  i  $60,644 \text{ mg g}^{-1}$ . Dobrinčić i sur. (2020) su u svom radu, iz kojeg su preuzeti parametri za proizvodnju ekstrakta lista masline pomoću MAE, također prikazali viši udio ukupnih fenola u proizvedenom ekstraktu koji je iznosio  $79,76 \pm 1,92 \text{ mg g}^{-1}$  (Dobrinčić i sur., 2020).

Udjel ukupnih flavonoida u proizvedenom ekstraktu znatno je niži od vrijednosti koje su u svom radu naveli Salah i sur. (2012), a koji varira između  $56.57 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}$  i  $125.64 \pm 3.36 \text{ mg g}^{-1}$ . Viši udio ukupnih flavonoida u svom radu također su prikazali Lins i sur. (2018), a koji je iznosio  $19.4 \pm 1.3 \text{ mg g}^{-1}$ .

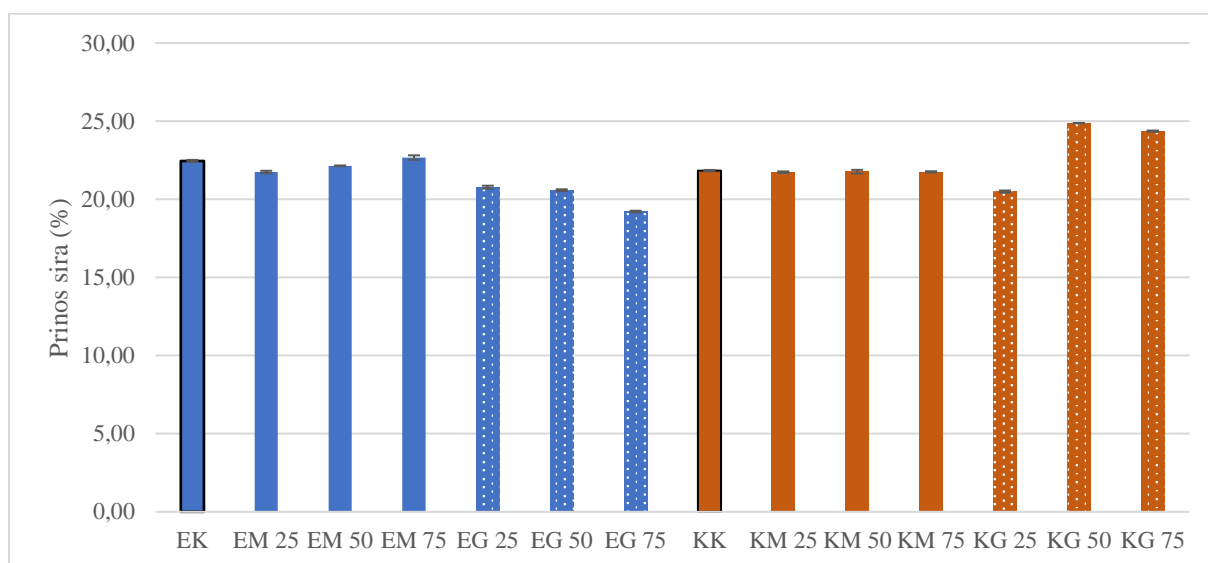
Antioksidacijski kapacitet proizvedenog ekstrakta lista masline nalazi se unutar raspona vrijednosti koje su u svom radu naveli Laguerre i sur. (2009), a koji za ekstrakt mladog lista masline varira u širokom rasponu od  $1,178 \pm 81$  do  $633 \pm 83 \mu\text{mol g}^{-1}$ . U svom radu Lins i sur. (2018) prikazali su znatno viši antioksidacijski kapacitet od vrijednosti dobivene u ovom radu, a koji je iznosio  $281.8 \pm 22.8 \text{ mg g}^{-1}$ . Ahmad-Quasem i sur. (2013) naveli su antioksidacijski kapacitet ekstrakta lista masline koji je iznosio  $102 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$  što je također više od vrijednosti dobivene u ovom radu.

Sorta masline, klima i geografsko područje uzgoja mogu utjecati na varijabilnost fenolnog sastava ekstrakta. Na udjel fenolnih spojeva u listu masline značajan utjecaj ima vrijeme berbe lista jer list masline sadrži najviši udio fenolnih spojeva za vrijeme hladnih dana, odnosno oko mjeseca prosinca (Medina i sur., 2019). Ekstrakt korišten u ovom radu proizveden je od lista prikupljenog u ljetnim mjesecima što je moglo utjecati na smanjeni udio ukupnih fenola. Osim svojstava upotrijebljenog lista masline na sastav ekstrakta može utjecati i primijenjena ekstrakcijska metoda što podrazumijeva ekstrakcijsku tehniku, svojstva otapala i vrijeme ekstrakcije (Salah i sur., 2012).

## 4.2. REZULTATI ANALIZA SIRA

### 4.2.1. Prinos sira

Prinos sireva proizvedenih iz kravljeg mlijeka najčešće se kreće u rasponu od 15 do 16 %, dok se kod sireva proizvedenih iz ovčjeg ili kozjeg mlijeka ovaj raspon kreće od 26 do 28 %. Varijacije u prinosu sira posljedica su promjenjivog udjela proteina i masti u mlijeku te udjela vode u proizvedenom siru (Hayaloglu, 2017). Prinos sireva proizvedenih u ovom radu prikazan je kao srednja vrijednost dvaju mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama (slika 10).



*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 10.** Prinos sireva (%) bez dodatka ekstrakta lista masline proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinskom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline dodavan je u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Prinos sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom varira u rasponu od  $19,22 \pm 0,05$  (EG 75) do  $22,67 \pm 0,15$  % (EM 75), dok se prinos sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom kreće

u rasponu od  $20,49 \pm 0,07$  (KG 25) do  $24,87 \pm 0,00$  % (KG 50). Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom postigli viši prinos prilikom dodatka ekstrakta u mlijeko u odnosu na one s dodatkom ekstrakta u gruš. Iz rezultata prikazanih za sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom vidljivo je kako su oni s dodatkom ekstrakta u mlijeko postigli prinos sličan kontrolnom siru, dok su sirevi s dodatkom ekstrakta u gruš (KG 50, KG 75) postigli više prinose u odnosu na ostale sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom.

Barukčić i sur. (2020) ispitali su utjecaj različitih selektiranih starter kultura na svojstva i trajnost svježeg sira, a navedeni prinos proizvedenih sireva viši je od vrijednosti dobivenih u ovom radu i kretao se u rasponu od 26 do 29 %. Također su usporedili prinose sireva dobivene kiselinskom i enzimskom koagulacijom te navode kako je dodatak sirila utjecao na povećanje tvrdoće gruša što je rezultiralo smanjenjem udjela vode i manjim prinosom (Barukčić i sur., 2020). Iz rezultata prikazanih u ovom radu također je moguće zamijetiti kako su u prosjeku nešto viši prinos postigli sirevi proizvedeni kiselinskom koagulacijom ( $22,40 \pm 0,04$  %) u odnosu na sireve proizvedene enzimskom koagulacijom ( $21,37 \pm 1,24$  %). U diplomskom radu Hrvatin (2018) prinos svježih sireva s dodatkom ekstrakt majčine dušice varirao je u rasponu od 19,7 do 22,5 % što je slično rezultatima dobivenim u ovom radu. Slične vrijednosti također su navedene u diplomskom radu Lovrić (2018) gdje se prinos svježih sireva s dodatkom ekstrakta majčine dušice kretao u rasponu od 19,7 do 21,9 %, dok se prinos svježih sireva s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge kretao u rasponu od 22,6 do 22,7 %. Rezultati dobiveni u ovom radu također se nalaze unutar raspona vrijednosti koje su u svom radu naveli Tratnik i sur. (1998) u kojem je prinos sireva tipa Feta proizvedenih od ultrafiltriranog mlijeka varirao od 12,2 do 24,1 %.

#### 4.2.2. Aktivitet vode sira, aktivna i titracijska kiselost sira i sirutke

Aktivitet vode smatra se jednim od glavnih čimbenika kvalitete u prehrambenoj industriji jer direktno utječe na mikrobiološku i enzimsku aktivnost u proizvodima. On značajno utječe na kvalitetu sireva, posebno tvrdih, kod kojih tijekom procesa zrenja dolazi do brojnih enzimskih reakcija koje rezultiraju specifičnim senzorskim karakteristikama (Kaya i Öner, 1996). Kiselost je moguće odrediti kao aktivnu i titracijsku kiselost. Aktivna kiselost izražava se kao pH vrijednost što predstavlja koncentraciju prisutnih vodikovih iona. Titracijska kiselost predstavlja volumen NaOH u mL potreban za neutralizaciju 100 mL uzorka uz indikator, a

može se izraziti u različitim kiselinskim stupnjevima (Tratnik i Božanić, 2012). U tablici 9 prikazani su aktivitet vode te aktivna i titracijska kiselost proizvedenih sireva.

**Tablica 9.** Aktivitet vode ( $a_w$ ) i kiselost (pH i  $^{\circ}\text{SH}$ ) sireva bez dodatka ekstrakta lista masline proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinskom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline dodavan je u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Uzorci sira	Aktivitet vode ( $a_w$ )*	pH*	$^{\circ}\text{SH}$ *
EK	0,94 ± 0,03	6,95 ± 0,06	14,55 ± 0,21
EM 25	0,91 ± 0,01	6,83 ± 0,03	9,55 ± 0,07
EM 50	0,94 ± 0,03	6,87 ± 0,01	20,85 ± 0,07
EM 75	0,91 ± 0,00	6,86 ± 0,03	18,65 ± 0,35
EG 25	0,95 ± 0,01	7,19 ± 0,00	17,55 ± 0,07
EG 50	0,94 ± 0,02	7,21 ± 0,01	17,60 ± 0,00
EG 75	0,95 ± 0,00	7,23 ± 0,02	16,24 ± 0,35
KK	0,93 ± 0,04	5,11 ± 0,01	69,80 ± 0,28
KM 25	0,95 ± 0,01	5,06 ± 0,02	99,10 ± 1,27
KM 50	0,94 ± 0,00	5,09 ± 0,01	101,15 ± 0,64
KM 75	0,84 ± 0,01	5,03 ± 0,03	71,65 ± 0,49
KG 25	0,95 ± 0,01	5,04 ± 0,01	99,25 ± 0,07
KG 50	0,95 ± 0,00	5,12 ± 0,03	59,75 ± 0,78
KG 75	0,96 ± 0,01	5,16 ± 0,02	55,90 ± 0,14

\*srednja vrijednost; EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)

Aktivitet vode proizvedenih sireva varira u rasponu od  $0,84 \pm 0,01$  (KM 75) do  $0,96 \pm 0,01$  (KG 75). Jedino veće odstupanje vrijednosti vidljivo je kod KM 75, dok za ostale uzorke sireva nema znatnih odstupanja. Nije vidljivo odstupanje u izmjerenim vrijednostima između sireva s i bez dodatka ekstrakta kao ni između sireva koji su dobiveni enzimskom koagulacijom i sireva dobivenih kiselinskom koagulacijom. Kaya i Öner (1996) utvrdili su aktivitet vode u polutvrdom tradicionalnom turskom siru koji je iznosio 0,95 što je u skladu s dobivenim rezultatima. Slične vrijednosti prikazali su Gomez i sur (2020) za tradicionalni meksički sir u kojem je  $a_w$  varirao u rasponu od 0,947 do 0,958.

pH vrijednost sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom kretala se u rasponu od  $6,83 \pm 0,03$  (EM 25) do  $7,23 \pm 0,02$  (EG 75), dok su se vrijednosti titracijske kiselosti kretale u rasponu od  $9,55 \pm 0,07$  (EM 25) do  $20,85 \pm 0,07$  °SH (EM 50). Sirevi dobiveni navedenom metodom s dodatkom ekstrakta u mlijeko imali su u prosjeku pH  $6,85 \pm 0,02$ , dok su sirevi s dodatkom ekstrakta u gruš imali nešto višu pH vrijednost koja je u prosjeku iznosila  $7,21 \pm 0,01$ . Kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom izmjerene su niže pH vrijednosti koje su se kretale u rasponu od  $5,03 \pm 0,03$  (KM 75) do  $5,16 \pm 0,02$  (KG 25) pri čemu su sirevi s dodatkom ekstrakta u mlijeko u prosjeku imali pH  $5,06 \pm 0,2$ , a oni s dodatkom ekstrakta u gruš  $5,11 \pm 0,02$ . Titracijska kiselost sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom kretala se u rasponu od  $55,90 \pm 0,14$  (KG 75) do  $101,15 \pm 0,64$  °SH (KM 50). Kod sireva dobivenih enzimskom koagulacijom najvišu titracijsku kiselost imao je EM 50, a kod sireva dobivenih kiselinskom koagulacijom KM 50. Odnosno, najviše vrijednosti titracijske kiselosti, za obje metode proizvodnje, postigli su sirevi kod kojih je direktno u mlijeko dodana koncentracija ekstrakta koja predstavlja EC50 vrijednost.

pH vrijednost mlijeka obično se kreće oko 6,7. Kod proizvodnje sira pH vrijednost mlijeka ima važnu ulogu jer utječe na aktivnost enzima sirila i količinu prisutnih  $Ca^{2+}$  iona. Prema Tratnik i Božanić (2012) sirenje mlijeka pomoću sirila preporučuje se pri pH vrijednosti od 6,0 do 6,3. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su pH vrijednosti dobivene za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom više od onih koje navode Tratnik i Božanić (2012). Mogući razlog tomu je što su u ovom radu navedeni sirevi proizvedeni samo upotrebom sirila, bez dodatka selekcionirane bakterijske kulture, koja se inače upotrebljava u proizvodnji sireva upravo kako bi podesila pH vrijednost na onu koja je optimalna za aktivnost enzima sirila. Stojiljković i Kakurinov (2011) u svom radu naveli su aktivnu kiselost sireva koje su proizveli u svrhu istraživanja, a navedene vrijednosti pH kretale su se u rasponu od 6,11 do 6,56. Uz to naveli su i vrijednosti titracijske kiselosti proizvedenih sireva koje su se kretale od 28,60 do 31,10

<sup>0</sup>SH. Vidljivo je kako su pH vrijednosti sireva koje navode Stojiljković i Kakurinov (2011) niže u odnosu na vrijednosti pH dobivene u ovom radu, dok su vrijednosti titracijske kiselosti više u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom radu.

pH vrijednost sireva proizvedenih kiselinom koagulacijom obično se kreće oko 4,6 obzirom da se proces fermentacije provodi do pada pH vrijednosti na vrijednost izoelektrične točke kazeina koja iznosi upravo 4,6 (Tratnik i Božanić, 2012). U diplomskom radu Hrvatin (2018) navedene su pH vrijednosti svježih sireva koje su se kretale u rasponu od 4,38 do 4,65, što je niže od vrijednosti koje su u ovom radu dobivene za sireve proizvedene kiselinom koagulacijom. U spomenutom diplomskom radu navedene su i vrijednosti titracijske kiselosti proizvedenih svježih sireva koje se kreću u rasponu od 49,60 do 65,10 <sup>0</sup>SH što je niže od vrijednosti dobivenih u ovom radu. Mogući razlog navedenom odstupanju je taj što je fermentacija, za sve sireve proizvedene kiselinom koagulacijom, prekinuta po isteku 24 sata, odnosno fermentacija nije trajala do pada pH vrijednosti na 4,6.

**Tablica 10.** Kiselost (pH i <sup>0</sup>SH) sirutke dobivene proizvodnjom sireva bez dodatka ekstrakta proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Uzorcji sirutke	pH*	<sup>0</sup> SH*
S <sub>EK</sub>	6,85 ± 0,02	4,26 ± 0,21
S <sub>EM 25</sub>	6,89 ± 0,01	4,09 ± 0,16
S <sub>EM 50</sub>	6,88 ± 0,02	6,25 ± 0,35
S <sub>EM 75</sub>	6,87 ± 0,00	6,85 ± 0,07
S <sub>EG 25</sub>	6,84 ± 0,01	9,15 ± 0,21
S <sub>EG 50</sub>	6,89 ± 0,01	10,35 ± 0,49
S <sub>EG 75</sub>	6,87 ± 0,03	9,65 ± 0,35
S <sub>KK</sub>	5,21 ± 0,01	25,95 ± 0,07
S <sub>KM 25</sub>	5,11 ± 0,01	31,00 ± 0,28
S <sub>KM 50</sub>	5,10 ± 0,00	36,20 ± 0,28



**Tablica 10.** Kiselost (pH i <sup>0</sup>SH) sirutke dobivene proizvodnjom sireva bez dodatka ekstrakta proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinskom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa - *nastavak*

Uzorci sirutke	pH*	<sup>0</sup> SH*
S <sub>KM 75</sub>	5,20 ± 0,02	35,95 ± 0,21
S <sub>KG 25</sub>	5,08 ± 0,01	31,35 ± 0,21
S <sub>KG 50</sub>	5,25 ± 0,01	31,80 ± 0,28
S <sub>KG 75</sub>	5,21 ± 0,02	31,95 ± 0,21

\*srednja vrijednost; S<sub>EK</sub> – sirutka kontrolnog sira proizvedenog enzimskom koagulacijom; S<sub>EM</sub> - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; S<sub>EG</sub> – sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; S<sub>KK</sub> - sirutka kontrolnog sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom; S<sub>KM</sub> – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; S<sub>KG</sub> – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)

Vrijednosti aktivne i titracijske kiselosti sirutke dobivene proizvodnjom sireva prikazane su u tablici 10. pH vrijednost sirutke dobivene proizvodnjom sireva enzimskom koagulacijom u prosjeku je iznosila 6,87 ± 0,01, dok je za sirutku dobivenu proizvodnjom sireva kiselinskom koagulacijom u prosjeku iznosila 5,17 ± 0,01. pH vrijednost sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko ne odudara od vrijednosti izmjerenih za sirutku dobivenu proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u gruš. Titracijska kiselost sirutke dobivene enzimskim postupkom proizvodnje sira kretala se u rasponu od 4,09 ± 0,16 (S<sub>EM 25</sub>) do 10,35 ± 0,49 <sup>0</sup>SH (S<sub>EG 50</sub>), a kod sirutke dobivene kiselinskim postupkom proizvodnje taj raspon varirao je od 25,95 ± 0,07 (S<sub>KK</sub>) do 36,20 ± 0,28 <sup>0</sup>SH (S<sub>KM 50</sub>).

Sirutka je zelenkasto žućkasta tekućina koja nastaje kao nusproizvod tijekom procesa sirenja. Sastav sirutke varira ovisno o vrsti mlijeka, procesu proizvodnje sira, stadiju laktacije, ishrani životinje te dobu godine. Ovisno o procesu proizvodnje sira razlikuju se dvije vrste sirutke, a to su slatka i kisela. Slatka sirutka nastaje procesom enzimske koagulacije mlijeka, dok kisela sirutka nastaje kiselinskom koagulacijom. pH vrijednost slatke sirutke obično se kreće od 5,9 do 6,6, dok se za kiselu sirutku pH vrijednost obično kreće od 4,3 do 4,6 (Barukčić i sur. 2019).

pH vrijednosti dobivene za sirutku iz procesa enzimske koagulacije približne su vrijednostima koje Barukčić i sur. (2019) navode za slatku sirutku. Međutim, pH vrijednosti dobivene za sirutku iz procesa kiselinske koagulacije znatno odstupaju od vrijednosti koje su Barukčić i sur. (2019) naveli za kiselu sirutku. Mogući razlog odstupanja pH vrijednosti kisele sirutke od onih koje navode Barukčić i sur. (2019) je već prethodno napomenuto prekidanje fermentacije prije postizanja pH vrijednosti 4,6.

Stojiljković i Kakurinov (2011) u svom radu također su naveli aktivne i titracijske kiselosti sirutki nastalih proizvodnjom prethodno spomenutih sireva. pH vrijednosti sirutke u navedenom radu kretale su se u rasponu od 6,46 do 6,64, dok su se vrijednosti titracijske kiselosti kretale u rasponu od 3,38 do 4,00 °SH. pH vrijednosti sirutke koje su naveli Stojiljković i Kakurinov (2011) približno su jednake vrijednostima koje su dobivene u ovom radu, dok su vrijednosti titracijske kiselosti približne samo za sirutku kontrolnog sira i sira s dodatkom najniže koncentracije ekstrakta u mlijeko (EK i EM 25). Postoji mogućnost kako je dodatak ekstrakta u mlijeko u višim koncentracijama (EC 50 i EC 75), kao i dodatak ekstrakta u gruš utjecao na povišenje titracijske kiselosti.

#### 4.2.3. Boja sira

Boja se u trodimenzionalnom sustavu izražava pomoću parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ .  $L^*$  vrijednost odnosi se na svjetlinu odnosno predstavlja skalu sive boje. Skala varira od vrijednosti 0 koja predstavlja crnu boju, do vrijednosti 100 koja predstavlja bijelu boju. Vrijednost parametra  $a^*$  kreće se u rasponu od -100 do +100, kretanje vrijednosti prema -100 označava približavanje zelenoj boji dok kretanje vrijednosti prema +100 označava približavanje crvenoj boji. Vrijednosti parametra  $b^*$  kreću se u istom rasponu kao i vrijednosti parametra  $a^*$ . Međutim, u ovom slučaju -100 označava plavu boju, dok +100 označava žutu boju (Lancaster i sur., 1997).

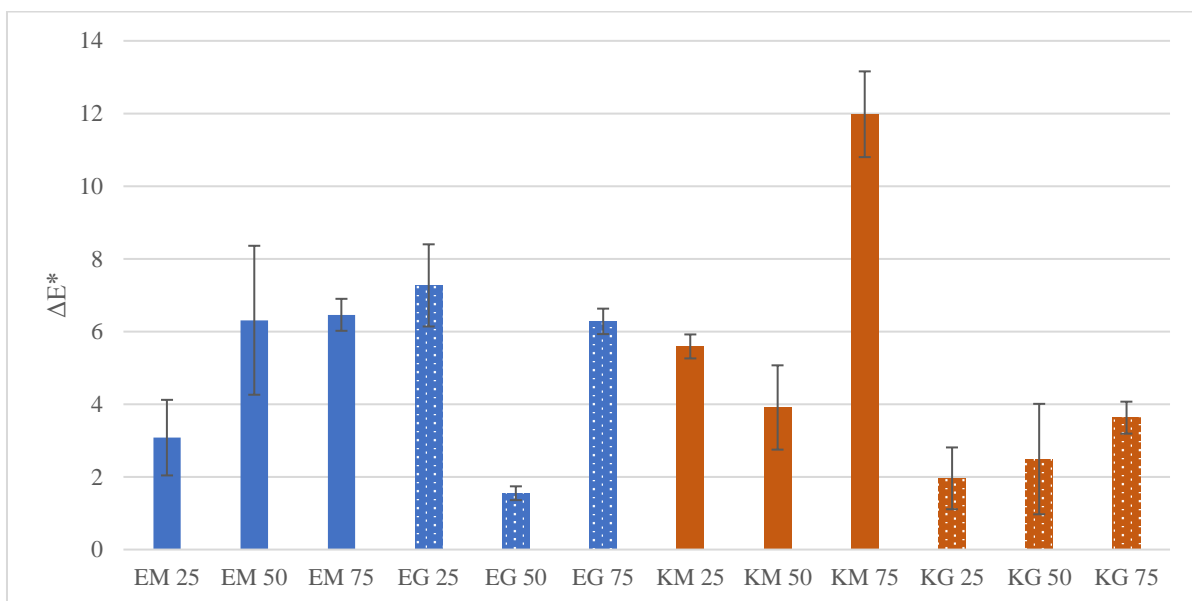
**Tablica 11.** L\*, a\* i b\* vrijednosti sireva bez dodatka ekstrakta proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinskom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Uzorcji sira	L*	a*	b*
EK	62,81 ± 2,23	-0,23 ± 0,06	7,83 ± 0,20
EM 25	58,78 ± 1,19	-0,03 ± 0,02	7,35 ± 0,18
EM 50	56,64 ± 4,20	-0,12 ± 0,02	6,53 ± 0,76
EM 75	56,49 ± 2,52	-0,05 ± 0,02	6,55 ± 0,52
EG 25	55,64 ± 3,30	-0,04 ± 0,06	6,67 ± 0,57
EG 50	64,35 ± 2,08	-0,10 ± 0,02	8,03 ± 0,32
EG 75	69,01 ± 1,89	-0,23 ± 0,03	8,82 ± 0,28
KK	73,25 ± 1,59	-0,77 ± 0,06	8,80 ± 0,17
KM 25	67,72 ± 1,89	-0,36 ± 0,04	8,08 ± 0,30
KM 50	69,38 ± 2,74	-0,25 ± 0,07	8,55 ± 0,28
KM 75	85,18 ± 2,77	-0,58 ± 0,16	9,88 ± 0,22
KG 25	75,18 ± 2,41	-0,70 ± 0,17	8,44 ± 0,36
KG 50	75,72 ± 3,09	-0,60 ± 0,10	8,58 ± 0,38
KG 75	76,85 ± 1,99	-0,62 ± 0,13	8,31 ± 0,33

*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

U tablici 11 prikazane su vrijednosti parametara L\*, a\* i b\* izmjerene za sireve s dodatkom ekstrakta lista masline. Iz vrijednosti parametra L\* vidljivo je kako su sirevi proizvedeni kiselinskom koagulacijom svjetliji od sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom vidljivo je kako su svi uzorci sireva, osim uzoraka EG 50 i EG 75, tamniji od kontrolnog sira (EK), dok su kod sireva dobivenih kiselinskom koagulacijom samo uzorci KM 25 i KM 50 tamniji od kontrolnog sira (KK). Opadanje svjetline sireva uslijed povećanja koncentracije dodanog ekstrakta zabilježeno je samo za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko. Sve izmjerene vrijednosti parametra a\* nalaze se u negativnom području što znači da proizvedeni

sirevi posjeduju zeleni ton. Zeleni ton najizraženiji je kod kontrolnih sireva (EK i KK) te kod sira EG 75. Sve izmjerene vrijednosti parametra  $b^*$  nalaze se u pozitivnom području što znači da proizvedeni sirevi sadrže žute nijanse. Žute nijanse izraženije su kod uzoraka sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom na što ukazuju više vrijednosti parametra  $b^*$ . Žuta nijansa najizraženija je za uzorak KM 75. Trenutak dodatka ekstrakta kao i koncentracija dodanog ekstrakta pokazali su statistički značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj na izmjerene vrijednosti parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom. Isto tako kod navedenih sireva statistički značajan pokazao se interakcijski utjecaj trenutka dodatka ekstrakta i njegove koncentracije. Kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom trenutak dodatka ekstrakta pokazao se značajnim ( $p \leq 0,05$ ) za vrijednosti parametara  $a^*$  i  $b^*$ , dok su se koncentracija ekstrakta pokazala značajnom ( $p \leq 0,05$ ) za vrijednosti parametara  $L^*$  i  $b^*$ . Za vrijednosti parametara  $L^*$  i  $b^*$  značajnim ( $p \leq 0,05$ ) se pokazao i interakcijski utjecaj trenutka dodatka ekstrakta i njegove koncentracije



*EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 11.** Razlika u boji ( $\Delta E^*$ ) sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Razlika u boji sireva s dodatkom ekstrakta lista masline u odnosu na kontrolne sireve izražena je pomoću parametra  $\Delta E^*$ , što prikazuje slika 11. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom najveća razlika u boji zabilježena je za uzorak sira EG 25, dok je kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom najveća razlika zabilježena za uzorak sira KM 75. Promatrajući rezultate dobivene za sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom vidljivo je kako je veća razlika u boji postignuta dodatkom ekstrakta u mlijeko u odnosu na dodatak u gruš, što ukazuje na moguće vezanje fenolnih spojeva na proteine mlijeka tijekom procesa fermentacije te posljedično njihovo zadržavanje u proizvedenom siru. Tomu u prilog ide snižavanje pH vrijednosti mlijeka tijekom procesa fermentacije. Navedeno u svojim radovima potvrdili su Barukčić i sur. (2020) koji navode moguće formiranje veza između proteina mlijeka i polifenolnih spojeva te Roseiro i sur. (2005) koji navode kako stvaranju navedenih veza pomaže snižavanje pH vrijednosti. Također je vidljivo kako su kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom uzorci EM 50 i EM 75 postigli veću razliku u boji u odnosu na sireve s dodatkom istih koncentracija u gruš (EG 50, EG 75), što također može biti posljedica stvaranja prethodno opisanih veza. Uspoređujući podatke navedene u tablici 1 s prikazanim vrijednostima parametara  $\Delta E^*$  možemo pretpostaviti kako bi promatrač jasno uočio razliku u boji za uzorke EM 50, EM 75, EG 25, EG 75, KM 25 i KM 75 jer vrijednosti parametara  $\Delta E^*$  za navedene uzorke prelaze 5.

Prirodna bijela boja mlijeka posljedica je refleksije svjetla na globulama masti, kazeina i kalcijevog fosfata koje su u njemu disperzirane. Mlijeko sadrži dvije različite vrste pigmenata od koji su jedni topljivi u vodi, a drugi u masti. Glavni pigment mlijeka topljiv u vodi je riboflavin, poznati i kao vitamin B<sub>2</sub>, koji je zaslužan za zelenkasto žućkasto boju sirutke. Karotenoidi, od kojih je  $\beta$ -karoten najznačajniji, čine pigmente mlijeka topljive u masti i odgovorni su za žućkasto boju mliječnih proizvoda s visokim udjelom mliječne masti. Boja mlijeka ovisi o prehrani, ali i zdravstvenom stanju životinja. Kod zrelih sireva prevladava žuta boja koja varira ovisno o udjelu masti u njima, a također ovisi i o koncentraciji karotenoida u prisutnoj mliječnoj masti. Boja sireva podložna je promjenama tijekom procesa proizvodnje i zrenja, a ovisi također o udjelu krute i tekuće faze u siru. S obzirom na to da i kruta i tekuća faza sira posjeduju komponente koje reflektiraju svjetlost, promjene u njihovim udjelima rezultiraju promjenom boje sireva. Tijekom zrenja sireva dolazi do razgradnje kazeina i njegovog prelaska u topljivo stanje što rezultira smanjenjem svjetlosti sireva (Chudy i sur., 2019). Chudy i sur (2019) također navode vrijednosti parametara boje za zrele sireve proizvedene enzimskom koagulacijom u iznosu 77,17 (L\*), 8,25 (a\*) i 32,16 (b\*). Na boju

sireva također utječu i dodaci koji osim raznih bojila mogu biti i biljni ekstrakti koji se dodaju u svrhu povećanja njihove nutritivne vrijednosti. Carvalho i sur. (2018) u svom radu opisali su utjecaj dodatka ekstrakta timijana na boju sira. Iz rezultata koje su prikazali u svom radu vidljivo je kako dodatak navedenog ekstrakta dovodi do značajnijih promjena u vrijednostima parametara  $a^*$  i  $b^*$ , pri čemu vrijednosti parametra  $a^*$  prelaze u pozitivno područje, odnosno dolazi do javljanja crvenih tonova u siru, dok povećanje vrijednosti parametra  $b^*$  ukazuje na intenziviranje žutih nijansi u siru (Carvalho i sur., 2018). Do istog zaključka kao Carvalho i sur. (2018) došli su Giroux i sur. (2013) prilikom ispitivanja utjecaja dodatka ekstrakta zelenog čaja na boju sira tipa Cheddar. Promjene u vrijednostima parametara boje sireva kakve navode Carvalho i sur. (2018) te Giroux i sur. (2013) nisu zabilježene u ovom radu.

#### 4.2.4. Tekstura sira

Tekstura se općenito definira kao senzorska manifestacija strukture proizvoda i način na koji struktura proizvoda reagira na primijenjenu silu. Tekstura sira razvija se tijekom procesa zrenja kao posljedica polaganih kemijskih, biokemijskih i mikrobioloških reakcija. Sirevi se prema teksturi općenito dijele na meke, polutvrde i tvrde, a same karakteristike teksture sireva unaprijed su određene proizvodnom tehnologijom (Kongo i Malcata, 2016).

Tekstura sira može se opisati različitim parametrima, a u ovom radu određeni su sljedeći parametri teksture: tvrdoća, adhezivna sila, kohezivnost, adhezivnost, gumenost, odgođena elastičnost, žvkljivost, otpornost, lom i vlaknastost. Vrijednosti navedenih parametara prikazane su u tablici 12.

Tvrdoća se definira kao sila koju je potrebno primijeniti kako bi se postigla deformacija. Kohezivnost predstavlja stupanj deformacije uzorka do kojeg dolazi prije njegovog pucanja. Adhezivnost predstavlja rad koji je potrebno obaviti kako bi se prevladale sile između različitih materijala. Gumenost predstavlja energiju potrebnu za razaranje hrane do razine pri kojoj je pogodna za gutanje. Odgođena elastičnost predstavlja stupanj do kojeg uzorak vraća svoj izvorni oblik nakon prve kompresije. Žvkljivost predstavlja energiju potrebnu za žvakanje krute hrane do trenutka kada je ona pogodna za gutanje. Otpornost predstavlja otpor koji uzorak pruža kako bi zadržao svoj oblik (Kongo i Malcata, 2016).

**Tablica 12.** Tekstura sireva bez dodatka ekstrakta proizvedenih enzimskom (EK) i kiselinskom (KK) koagulacijom, sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i u gruš (KG 25, KG 50, KG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa.

Uzorci	Tvrdoća (N)	Adhezivna sila (N)	Kohezivnost	Adhezivnost (Nmm)	Gumenost (N)	Odgođena elastičnost (mm)	Žvkljivost (Nmm)	Otpornost	Lom (N)	Vlaknastost (mm)
EK	7,14 ± 0,57	-0,11 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,10 ± 0,15	3,28 ± 0,34	-1,28 ± 0,40	5,95 ± 0,17	0,45 ± 0,03	7,01 ± 0,59	3,29 ± 1,90
EM 25	6,31 ± 1,72	-0,06 ± 0,07	0,41 ± 0,03	0,08 ± 0,17	2,62 ± 0,87	-1,21 ± 0,16	4,99 ± 2,98	0,40 ± 0,06	6,17 ± 1,73	3,95 ± 2,11
EM 50	7,49 ± 0,61	-0,08 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,11 ± 0,03	2,92 ± 0,29	-1,23 ± 0,44	5,86 ± 0,80	0,38 ± 0,04	6,94 ± 0,48	4,16 ± 1,93
EM 75	7,03 ± 1,12	-0,07 ± 0,03	0,43 ± 0,05	0,10 ± 0,05	3,04 ± 0,54	-1,26 ± 0,37	5,71 ± 1,57	0,44 ± 0,03	6,77 ± 1,19	3,66 ± 1,82
EG 25	4,83 ± 0,06	-0,05 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,09 ± 0,08	1,88 ± 0,12	-1,72 ± 0,08	2,46 ± 0,28	0,39 ± 0,04	4,73 ± 0,14	2,75 ± 1,36
EG 50	4,13 ± 0,37	-0,04 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,08 ± 0,06	1,71 ± 0,17	-1,87 ± 0,15	2,11 ± 0,37	0,39 ± 0,02	3,87 ± 0,39	3,78 ± 1,32
EG 75	3,91 ± 0,15	-0,03 ± 0,01	0,42 ± 0,03	0,11 ± 0,07	1,64 ± 0,13	-1,89 ± 0,07	2,03 ± 0,40	0,38 ± 0,01	3,80 ± 0,11	5,54 ± 0,77
KK	3,85 ± 0,64	-0,24 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,57 ± 0,18	1,20 ± 0,28	-3,51 ± 0,63	1,75 ± 0,39	0,25 ± 0,02	3,77 ± 0,67	5,53 ± 3,24
KM 25	5,46 ± 0,59	-0,13 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,60 ± 0,10	1,89 ± 0,40	-3,64 ± 0,57	5,65 ± 2,37	0,31 ± 0,04	5,31 ± 0,47	6,32 ± 1,64
KM 50	4,69 ± 1,35	-0,07 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,31 ± 0,13	1,57 ± 0,71	-4,30 ± 0,59	3,26 ± 1,94	0,28 ± 0,05	4,47 ± 1,34	8,36 ± 0,45
KM 75	3,57 ± 0,43	-0,13 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,47 ± 0,11	1,16 ± 0,16	-3,33 ± 0,21	1,74 ± 0,38	0,28 ± 0,01	3,40 ± 0,23	8,79 ± 1,86
KG 25	4,89 ± 0,55	-0,09 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,42 ± 0,05	1,42 ± 0,25	-4,23 ± 0,45	3,55 ± 0,82	0,24 ± 0,01	4,71 ± 0,61	7,69 ± 0,88
KG 50	4,59 ± 0,93	-0,16 ± 0,14	0,38 ± 0,02	0,79 ± 0,38	1,75 ± 0,38	-3,27 ± 0,57	3,35 ± 0,69	0,35 ± 0,00	4,49 ± 0,93	8,92 ± 3,70
KG 75	4,16 ± 0,64	-0,34 ± 0,11	0,34 ± 0,00	0,60 ± 0,30	1,42 ± 0,22	-3,09 ± 0,48	2,56 ± 0,79	0,30 ± 0,02	4,03 ± 0,54	3,82 ± 0,51

*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš, KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom pokazali veću tvrdoću u odnosu na sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom. Najvišu vrijednost tvrdoće kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom pokazao je EM 50, a kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom KM 25. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom vidljiva je razlika u tvrdoći između sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko i onih s dodatkom ekstrakta u grušu. Sirevi s dodatkom ekstrakta u mlijeko pokazali su se značajno ( $p \leq 0,05$ ) tvrdim od sireva s dodatkom ekstrakta u grušu. Mogući uzrok smanjenja tvrdoće sireva s dodatkom ekstrakta u grušu je miješanje gruša tijekom dodatka ekstrakta pri čemu se grušu brže hladio što je moglo utjecati na slabije povezivanje sirnih zrna. Smanjenje tvrdoće sireva s povećanjem koncentracije dodanog ekstrakta zabilježeno je kod svih sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom bez obzira na trenutak dodatka ekstrakta. Statističkom obradom podataka dodatno je potvrđen statistički značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj koncentracije dodanog ekstrakta na tvrdoću sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom.

Sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom pokazali su veću kohezivnost u odnosu na sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom. Nije vidljiv značajan utjecaj trenutka dodatka ekstrakta kao ni njegove koncentracije na kohezivnost svih sireva proizvedenih u ovom radu. Međutim, kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom zabilježen je statistički značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj interakcija između trenutka dodatka i koncentracije dodanog ekstrakta na kohezivnost navedenih sireva.

Adhezivnost sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom pokazala se viša u odnosu na sireve proizvedene enzimskom koagulacijom. Najvišu adhezivnost između sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom pokazao je KG 50, dok su najvišu adhezivnost kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom pokazali su EM 50 i EG 75. Statističkom obradom podataka zabilježeno je kako ni trenutak dodatka ekstrakta kao ni dodana koncentracija nemaju statistički značajan utjecaj na adhezivnost sireva proizvedenih u ovom radu.

Sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko pokazali su veću gumenost od onih s dodatkom ekstrakta u grušu kao i od svih sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom. Najveća gumenost zabilježena je za kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom (EK), a najmanja za KM 75. Trenutak dodatka ekstrakta u sireve proizvedene enzimskom koagulacijom pokazao se statistički značajnim ( $p \leq 0,05$ ), dok kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom nije zabilježena statistički značajan utjecaj, ni trenutka dodatka, ni dodane koncentracije ekstrakta.



Nadalje, iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom pokazali više vrijednosti za odgođenu elastičnost u odnosu na one proizvedene kiselinskom koagulacijom, što ukazuje na to da sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom nakon prve kompresije bolje zadržavaju izvorni oblik. Najviša vrijednost zabilježena je za EM 25, a najmanja za KM 50. Za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom zabilježen je značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj trenutka dodatka ekstrakta na dobivene vrijednosti za odgođenu elastičnost. Kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom na vrijednosti dobivene za odgođenu elastičnost značajan utjecaj pokazale su interakcije koncentracije dodanog ekstrakta i trenutka njegovog dodatka.

Vrijednosti za žvkljivost pokazale su se najvišim kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko, dok su za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš i sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom zabilježene niže vrijednosti. Najviša vrijednost zabilježena je za EK, a najniža za KM 75. Statističkom obradom zabilježeno je kako na žvkljivost sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom statistički značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj ima trenutak dodatka ekstrakta, dok na žvkljivost sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj ima koncentracija dodanog ekstrakta.

Otpornost sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom pokazala se viša u odnosu na sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom. Najveći otpor primijenjenoj sili pokazao je EK, a najmanji KM 75. Za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom nije zabilježen značajan utjecaj trenutka dodatka ekstrakta kao ni koncentracije u kojoj je dodan. Međutim, za sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom zabilježen je značajan utjecaj koncentracije dodanog ekstrakta na njihovu otpornost. Također, je zabilježen značajan ( $p \leq 0,05$ ) interakcijski utjecaj koncentracije ekstrakta i trenutka njegovog dodatka na otpornost sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom.

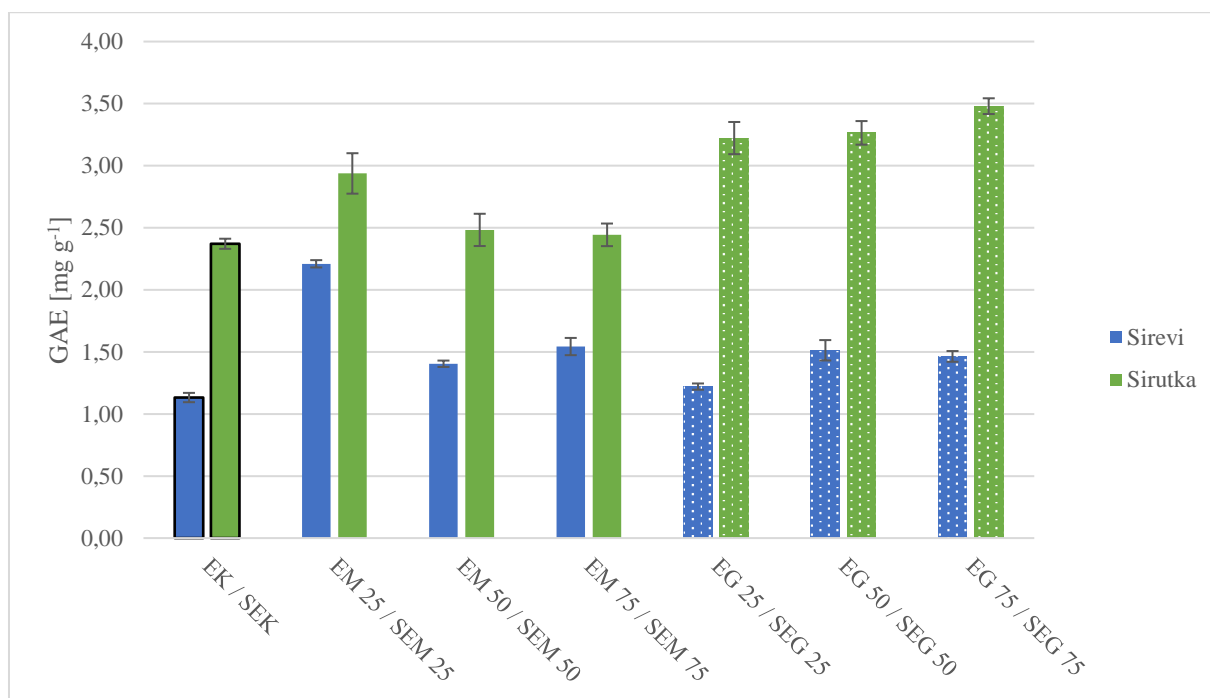
Tekstura se smatra jednim od glavnih čimbenik koji utječu na prihvatljivost sira među potrošačima, a ona je pod direktnim utjecajem same strukture sira. Sir je po svojoj strukturi viskoelastični materijal kojeg čini kazeinska mreža u koju su uklopljeni voda i globule mliječne masti. Tekstura sira uvelike ovisi o udjelu mliječne masti, zbog čega proizvodnjom sira od mlijeka sa smanjenim udjelom masti dolazio do promjena u njegovoj mikrostrukturi sira (Gwartney i sur, 2006). Gwartney i sur. (2006) dokazali su promjenu teksture sireva proizvedenih od mlijeka sa smanjenim udjelom masti. Sirevi koje su proizveli iz takvog mlijeka

pokazali su veću lomljivost, tvrdoću i žvakljivost, a manju kohezivnost i adhezivnost od sireva proizvedenih od punomasnog mlijeka. Osim promjena u udjelu osnovnih sastojaka mlijeka, na teksturu sira mogu utjecati i određeni dodaci. Giroux i sur. (2013) su u svom radu zabilježili kako obogaćivanje sira tipa Cheddar ekstraktom zelenog čaja dovodi do povećanja tvrdoće te smanjenja kohezivnosti i elastičnosti sira. Zabilježene promjene u teksturi pripisali su mogućim promjenama u strukturi parakazeinske matrice do kojih dolazi uslijed vezanja polifenola zelenog čaja na kazein, a također su naveli i kako su navedene promjene bile izraženije pri većim koncentracijama dodanog ekstrakta.

### 4.3. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA

#### 4.3.1. Koncentracija ukupnih fenola

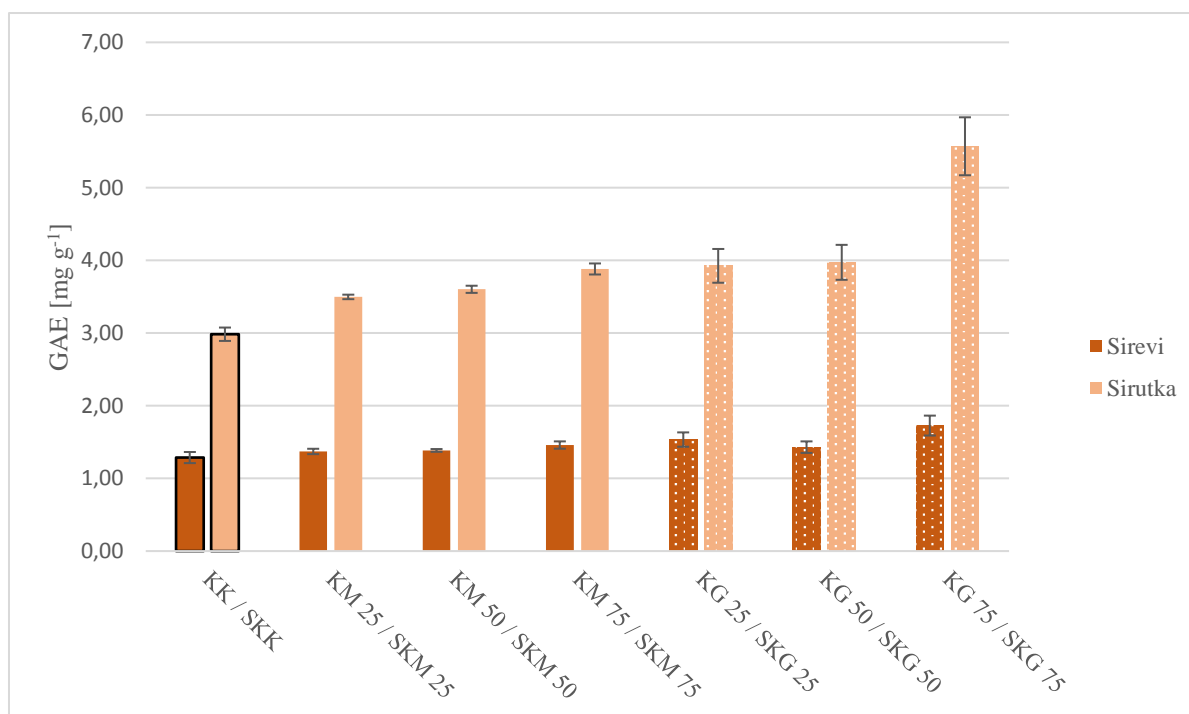
Koncentracija ukupnih fenola u proizvedenim uzorcima sireva i sirutke određena je prethodno opisanom metodom po Folin-Ciocalteu, a rezultati su grafički prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja s po dvije paralele i pripadajućim standardnim devijacijama. Koncentracija ukupnih fenola izražena je kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE g<sup>-1</sup>).



*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SEK - sirutka kontrolnog sira proizvedenog enzimskom koagulacijom; SEM - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SEG - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 12a).** Koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline GAE (mg g<sup>-1</sup>) u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (EK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te u njima pripadajućim sirutkama (SEK, SEM 25, SEM 50, SEM 75, SEG 25, SEG 50, SEG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa

Koncentracija ukupnih fenola u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom s i bez dodatka ekstrakta lista masline, kao i njihovim pripadajućim sirutkama, prikazana je na slici 12a). Koncentracija ukupnih fenola u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom kreće se u rasponu od  $1,13 \pm 0,04$  (EK) do  $2,21 \pm 0,03$  mg g<sup>-1</sup> (EM 25), dok se koncentracija fenola u uzorcima sirutke kreće u rasponu od  $2,37 \pm 0,04$  (S<sub>EK</sub>) do  $3,48 \pm 0,06$  mg g<sup>-1</sup> (S<sub>EG 75</sub>). Vidljivo je kako kontrolni sir (EK) ima najniži udjel ukupnih fenola i kako je kod svih uzoraka s dodatkom ekstrakta lista masline došlo do povećanja koncentracije fenola. Za uzorke sirutke također je vidljivo povećanje koncentracije ukupnih fenola uslijed dodatka ekstrakta lista masline u odnosu na koncentraciju fenola u sirutki kontrolnog sira. Promatrajući rezultate uzoraka sireva i sirutke s dodatkom ekstrakta u mlijeko vidljivo je kako je najviša koncentracija fenola u siru, ali i sirutki postignuta za uzorak s dodatkom najmanje koncentracije ekstrakta (EM 25). Uzorak EM 25 duže se cijedio u odnosu na ostale uzorke što je moglo dovesti do koncentriranja sastojaka u navedenom siru, a to je vidljivo kao izraženije odstupanje rezultata u odnosu na ostale uzorke. Kod sireva s dodatkom ekstrakta u gruš vidljivo je kako je najvišu koncentraciju fenola u siru postigao uzorak EG 50. Za uzorke sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u gruš zabilježen je porast koncentracije fenola sukladan povećanju koncentracije dodanog ekstrakta. Iz prikazanih rezultata nisu vidljive velike razlike u koncentraciji fenola postignutoj dodatkom ekstrakta u mlijeko i u gruš, osim već prethodno navedene iznimke (EM 25). Međutim, iz rezultata prikazanih za sirutku vidljivo je kako je dodatak ekstrakta u gruš, u odnosu na dodatak u mlijeko, rezultirao višim koncentracijama fenola, odnosno većim gubitkom fenolnih spojeva u sirutku.



*KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SKK - sirutka kontrolnog sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom; SKM – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SKG – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 12b).** Koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline GAE (mg g<sup>-1</sup>) u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (KK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (KG 25, KG 50, KG 75) te u njima pripadajućim sirutkama (SKK, SKM 25, SKM 50, SKM 75, SKG 25, SKG 50, SKG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa

Na slici 12b) prikazana je koncentracija ukupnih fenola u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom s i bez dodatka ekstrakta lista masline te njihovim pripadajućim sirutkama. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako je dodatkom ekstrakta lista masline došlo do blagog povećanja koncentracije ukupnih fenola u sirevima s dodatkom ekstrakta u odnosu na kontrolni sir. Raspon koncentracija fenola detektiran u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom kreće se od  $1,29 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ , što je vrijednost detektirana u kontrolnom siru, do  $1,73 \pm 0,14 \text{ mg g}^{-1}$  u uzorku KG 75. Kao ni kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom, niti kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom nije vidljiva velika razlika u koncentracijama

fenola između sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko i sireva s dodatkom u gruš. Vrijednosti koncentracija fenola za sirutku dobivenu proizvodnjom sireva kiselinskom koagulacijom kreću se u rasponu od  $2,98 \pm 0,09$  ( $S_{KK}$ ) do  $5,57 \pm 0,40$   $\text{mg g}^{-1}$  ( $S_{KG 75}$ ). Porast koncentracije ukupnih fenola u uzorcima sirutke sukladan je povećanju koncentracije dodanog ekstrakta, i kod dodatka u mlijeko, i kod dodatka u gruš. Promatrajući koncentraciju ukupnih fenola u sirutki nastaloj proizvodnjom kontrolnih sireva, i kiselinskom, i enzimskom koagulacijom vidljivo je kako sirutka dobivena proizvodnjom sireva kiselinskom koagulacijom pokazuje veću koncentraciju fenolnih spojeva u odnosu na onu proizvedenu enzimskom koagulacijom. Zbog toga sve sirutke dobivene proizvodnjom sireva kiselinskom koagulacijom pokazuju više udjele fenola od sirutki dobivenih enzimskim postupkom proizvodnje sireva. Također je vidljivo kako je i kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom kao i kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom došlo do većeg prelaska fenolnih spojeva u sirutku uslijed dodatka ekstrakta u gruš.

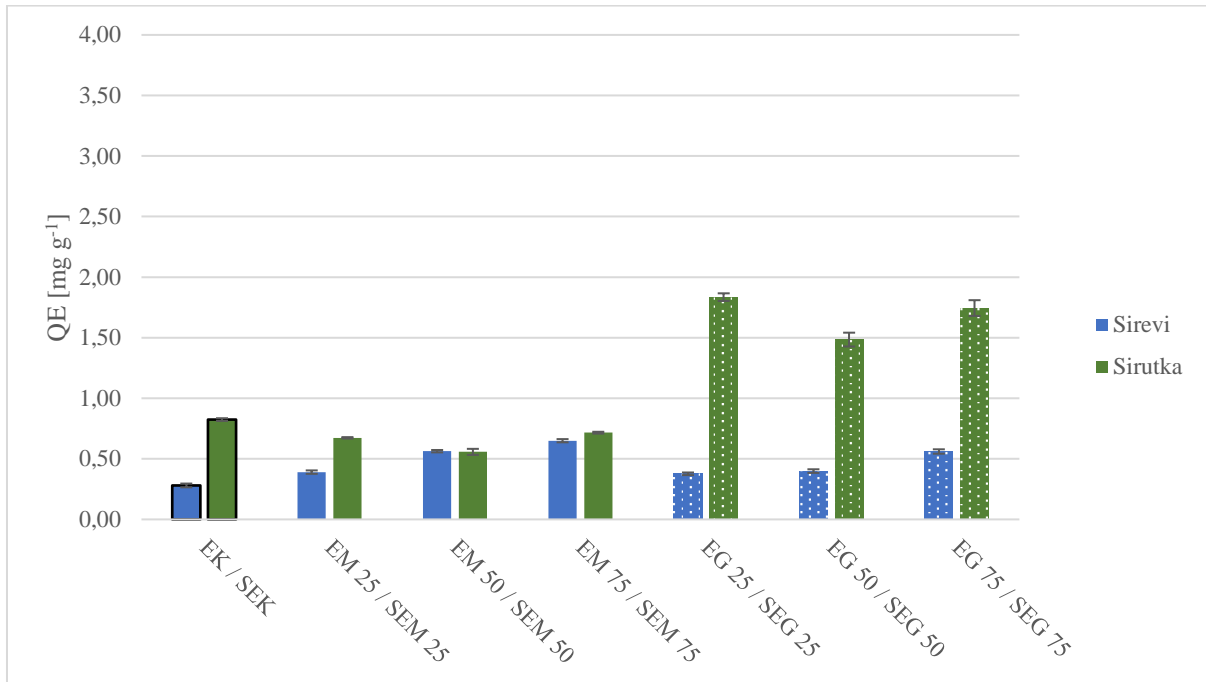
Pozitivni učinci fenolnih spojeva na zdravlje doveli su do povećanog interesa za njihovim dodatkom u različite prehrambene proizvode, među kojima je i sir. Upravo iz tog razloga postoje brojna istraživanja čiji je cilj bio otkriti utjecaj dodatka raznih biljnih ekstrakata u sireve. Ribeiro i sur. (2016) su tako proveli istraživanje o utjecaju dodatka ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) u zrnati sir, a kao glavni rezultat naveli su povećanje udjela fenolnih spojeva. Zabilježena su slična istraživanja s dodatkom ekstrakta origana (*Origanum vulgare* L.) (Santos i sur., 2022), timijana (*Thymus mastichina* L.) (Carvalho i sur., 2018) i brojnih drugih. Josipović i sur. (2016) dali su u svom radu detaljan pregled upotrebe začinskog bilja i njihovih fenolnih spojeva u proizvodnji sira.

Mogućnosti dodatka ekstrakta lista masline u sireve nisu detaljno istražene te je broj radova na tu temu malen. Međutim, postoje znanstvena istraživanja o dodatku ovog ekstrakta u druge mliječne proizvode. Barukčić i sur. (2022) su tako proveli istraživanje o mogućnosti implementacije ekstrakta lista masline u jogurt proizveden od kravljeg mlijeka. Osim lista masline predmet istraživanja su i drugi nusproizvodi prerade maslina u maslinovo ulje koji također imaju bogat fenolni sastav. Roila i sur. (2019) proveli su istraživanje s ciljem određivanja antimikrobnog utjecaja fenolnog ekstrakta nusproizvoda proizvodnje maslinovog ulja na mikrobiološko kvarenje tradicionalnog "Fior di Latte" sira.

Koeficijent zadržavanja iznimno je važan parametar u procesu obogaćivanja prehrambenih proizvoda funkcionalnim sastojcima kao što su fenolni spojevi. Fenolni spojevi male su molekulske mase i posjeduju dobro svojstvo topljivosti pa ako se dodaju u procesu proizvodnje sira dolazi do njihovog otapanja u sirutki. Zadržavanje fenolnih spojeva u sirevima uvjetovano je interakcijama između fenolnih spojeva i proteina, a te interakcije mogu biti hidrofobne, hidrofilne, ionske ili kovalentne. Mehanizam interakcija između proteina mlijeka i bioaktivnih spojeva nije u potpunosti poznat i predmet je interesa znanstvenika upravo s ciljem povećanja koeficijenta zadržavanja i mogućnosti proizvodnje funkcionalnih proizvoda (Han i sur., 2011).

#### 4.3.2. Koncentracija ukupnih flavonoida

Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima sireva i sirutke određena je prema prethodno opisanoj metodi, a rezultati su kao i za ukupne fenole prikazani grafički kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama. Koncentracija ukupnih flavonoida prikazana je kao ekvivalent standarda kvercetina ( $\text{mg QE g}^{-1}$ ).

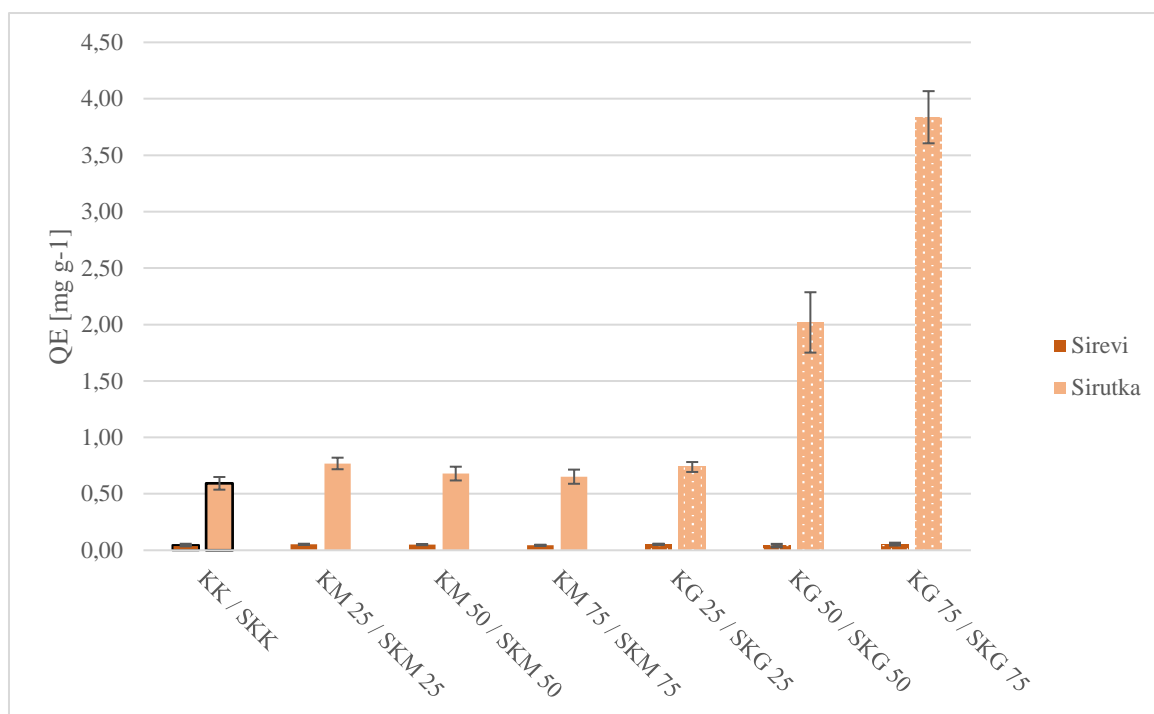


*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SEK - sirutka kontrolnog sira proizvedenog enzimskom koagulacijom; SEM - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SEG - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 13a).** Koncentracija ukupnih flavonoida izražena kao ekvivalent kvercetina QE ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (EK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te njima pripadajućim sirutkama ( $S_{EK}$ ,  $S_{EM 25}$ ,  $S_{EM 50}$ ,  $S_{EM 75}$ ,  $S_{EG 25}$ ,  $S_{EG 50}$ ,  $S_{EG 75}$ ). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa



Na slici 13a) prikazane su koncentracije ukupnih flavonoida zabilježene u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom s i bez dodatka ekstrakta lista masline kao i koncentracije flavonoida u sirutkama nastalim proizvodnjom navedenih sireva. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako svi sirevi s dodatkom ekstrakta pokazuju više koncentracije ukupnih flavonoida u odnosu na kontrolni sir ( $S_{EK}$ ). Koncentracija ukupnih flavonoida u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom varira u rasponu od  $0,28 \pm 0,02$  ( $S_{EK}$ ) do  $0,65 \pm 0,01$   $mg\ g^{-1}$  ( $S_{EM\ 75}$ ). Povećanje koncentracije dodanog ekstrakta rezultiralo je povećanjem koncentracije flavonoida u sirevima s dodatkom ekstrakta u mlijeko i u sirevima s dodatkom ekstrakta u gruš. Dodatak ekstrakta lista masline rezultirao je boljim zadržavanjem flavonoida u sirevima s dodatkom ekstrakta u mlijeko, u odnosu na dodatak ekstrakta u gruš. Boljem zadržavanju flavonoida u siru s dodatkom ekstrakta u mlijeko dodatno idu u prilog rezultati dobiveni analizom uzoraka sirutke iz kojih je vidljivo kako je u sirutkama sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko zabilježena manja koncentracija flavonoida u odnosu na sirutke sireva s dodatkom ekstrakta u gruš. Odnosno dodatkom ekstrakta u gruš došlo je do većeg gubitka flavonoida u sirutku nego dodatkom u mlijeko. Također je vidljivo kako sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko ( $S_{EM\ 25}$ ,  $S_{EM\ 50}$ ,  $S_{EM\ 75}$ ) imaju niže koncentraciju flavonoida od sirutke kontrolnog sira ( $S_{EK}$ ), dok su više koncentracije zabilježene za sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u gruš ( $S_{EG\ 25}$ ,  $S_{EG\ 50}$ ,  $S_{EG\ 75}$ ).



*KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SKK - sirutka kontrolnog sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom; SKM – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SKG – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 13b).** Koncentracija ukupnih flavonoida izražena kao ekvivalent kvercetina QE (mg g<sup>-1</sup>) u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (KK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (KG 25, KG 50, KG 75) te u njima pripadajućim sirutkama (SKK, SKM 25, SKM 50, SKM 75, SKG 25, SKG 50, SKG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa

Koncentracije ukupnih flavonoida u sirevima s i bez dodatka ekstrakta proizvedenim kiselinskom koagulacijom te sirutkama dobivenim njihovom proizvodnjom prikazane su na slici 13b). Promatrajući usporedno koncentracije flavonoida prikazane za sireve proizvedene enzimskom i kiselinskom koagulacijom može se primjetiti kako su koncentracije flavonoida izmjerene u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom znatno niže od koncentracija koje su izmjerene u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom. Koncentracija ukupnih flavonoida u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom kreće se u rasponu od 0,04 ± 0,01 (KG 50) do 0,06 ± 0,01 mg g<sup>-1</sup> (KG 75). Vidljivo je kako razlike u koncentraciji flavonoida

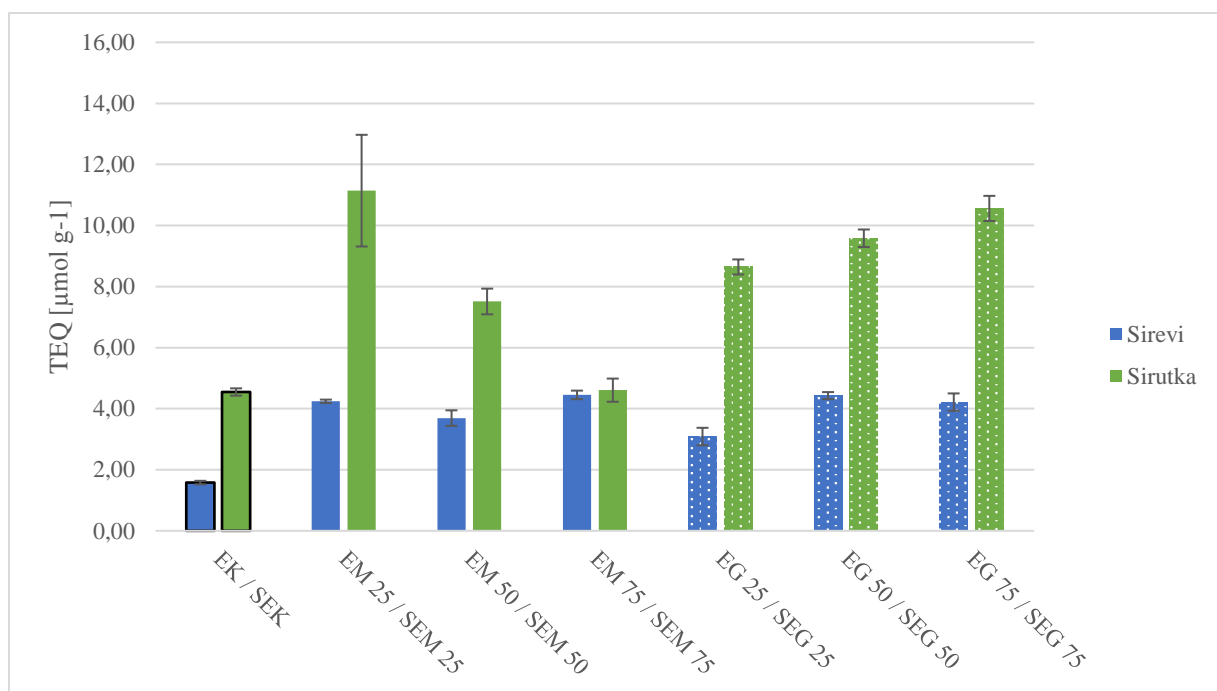
između kontrolnih sireva i sireva s dodatkom ekstrakta gotovo nema. Vrijednosti koncentracije ukupnih flavonoida u sirutki sireva proizvedenih kiselinom koagulacijom kreću se u rasponu od  $0,59 \pm 0,06$  ( $S_{KK}$ ) do  $3,84 \pm 0,23$   $\text{mg g}^{-1}$  ( $S_{KG 75}$ ). Vidljivo je kako su svi uzorci sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta pokazali višu koncentraciju flavonoida u odnosu na sirutku kontrolnog sira ( $S_{KK}$ ). Također je vidljivo kako je kod uzoraka sirutke, sireva s dodatkom ekstrakta u gruš, povećanje koncentracije dodanog ekstrakta rezultiralo povećanjem koncentracije flavonoida u sirutki. Dodatak ekstrakta u gruš rezultirao je višim koncentracijama flavonoida u sirutki od dodatka ekstrakta u mlijeko, što je također zabilježeno kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom.

Velika razlika u koncentraciji ukupnih flavonoida između sireva dobivenih enzimskom i kiselinom koagulacijom moguća je posljedica ulaska fenolnih spojeva u interakcije s proteinima mlijeka. Roseiro i sur. (2005) u svom radu navode kako interakcije između proteina mlijeka i fenolnih spojeva znatno ovise o pH vrijednosti te kako se navedene interakcije intenziviraju kada je pH vrijednost bliža izoelektričnoj točki proteina. Također navode kako flavonoidi u glikozidnom obliku formiraju najčvršće veze s kazeinom, dok jakost veza s  $\alpha$ -laktalbuminom,  $\beta$ -laktoglobulinom i albuminima krvnog seruma opada upravo navedenim redoslijedom. pH vrijednost sireva proizvedenih kiselinom koagulacijom u ovom radu bliža je izoelektričnoj točki kazeina od pH vrijednosti sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom što je potencijalno moglo uzrokovati formiranje kompleksa između kazeina i flavonoida te posljedično otežati analizu ukupnih flavonoida u sirevima proizvedenim kiselinom koagulacijom.

Frühbauerová i sur. (2020) proveli su istraživanje slično ovom u kojem su topljeni sir obogaćivali prahom pokožice grožđa, pri čemu je jedan dio praha proizveden od pokožice sušene u peći, a drugi od liofilizirane pokožice. Iz rezultata koje su prikazali vidljivo je kako je koncentracije ukupnih flavonoida u tako obogaćenim sirevima iznosila  $0,73 \pm 0,01$  (pokožica sušena u peći) i  $0,52 \pm 0,02$   $\text{mg g}^{-1}$  (liofilizirana pokožica), što ne odudara znatno od rezultata za sireve proizvedene enzimskom koagulacijom dobivene u ovom radu. Znatno više koncentraciju flavonoida postigli su Costa i sur. (2018) obogaćivanjem sireva različitim nusproizvodima prehrambene industrije, među kojima se komina nastala proizvodnjom crnog vina pokazala najboljom, a koncentracija flavonoida u takvom siru iznosila je  $12,99 \pm 0,39$   $\text{mg g}^{-1}$ .

### 4.3.3. Antioksidacijski kapacitet

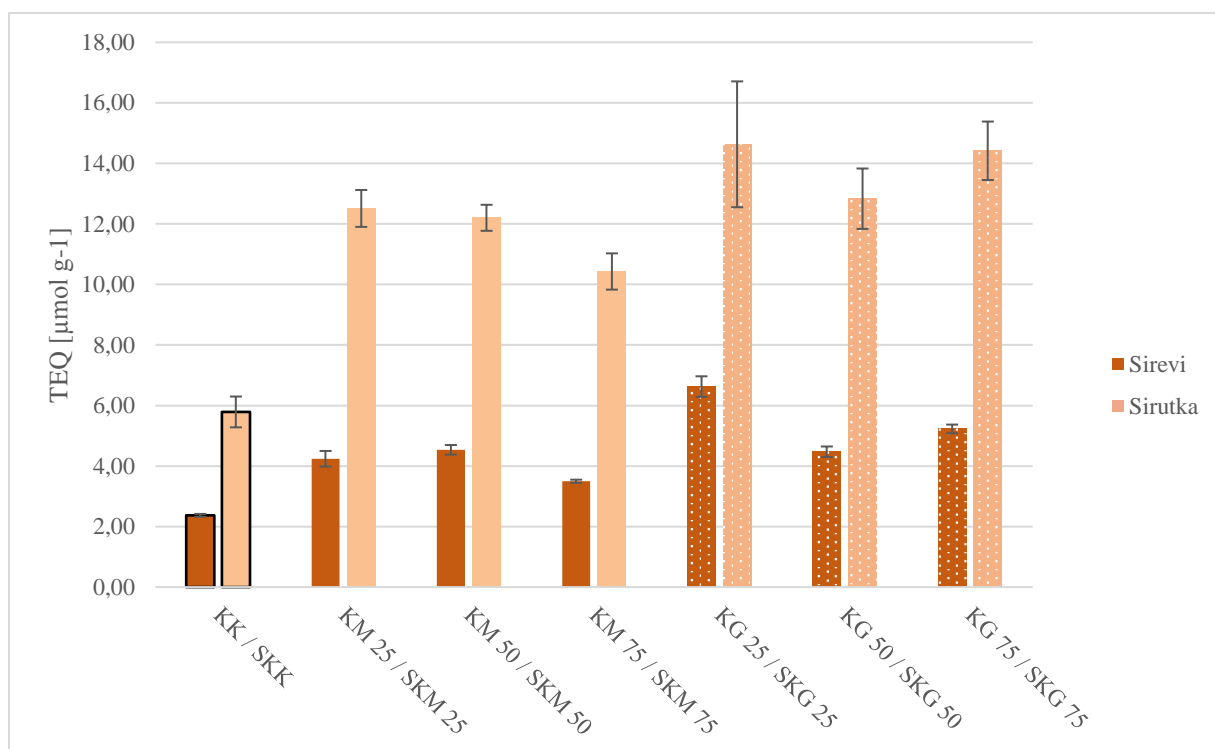
Antioksidacijski kapacitet proizvedenih sireva i pripadajućih uzoraka sirutke određen je i grafički prikazan kao srednja vrijednost dvaju mjerenja s dvije paralele i njihovim pripadajućim standardnim devijacijama. Izmjerene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prikazane su u  $\mu\text{mol (TE) g}^{-1}$ . Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta izmjerene u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom s i bez dodatka ekstrakta lista masline te antioksidacijski kapacitet sirutki dobiven proizvodnjom navedenih sireva prikazani su na slici 14 a).



*EK - kontrolni sir proizveden enzimskom koagulacijom; EM - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; EG - sir proizveden enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SEK – sirutka kontrolnog sira proizvedenog enzimskom koagulacijom; SEM - sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SEG – sirutka sira proizvedenog enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 14a).** Antioksidacijski kapacitet izražen kao Trolox ekvivalent TEQ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (EK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (EM 25, EM 50, EM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (EG 25, EG 50, EG 75) te njima pripadajućim sirutkama (SEK, SEM 25, SEM 50, SEM 75, SEG 25, SEG 50, SEG 75). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su svi sirevi s dodatkom ekstrakta lista masline pokazali viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na kontrolni sir. Antioksidacijski kapacitet sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom varira u rasponu od  $1,58 \pm 0,06$  (EK) do  $4,45 \pm 0,14$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  (EM 75). Dodatak ekstrakta u mlijeko rezultirao je sličnim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta kao i dodatak u gruš, te prema tome nije vidljiv utjecaj trenutka dodatka ekstrakta na antioksidacijski kapacitet sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom. Između sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko najviši antioksidacijski kapacitet pokazao je EM 75, odnosno sir s dodatkom najviše koncentracije ekstrakta (EC75), dok je dodatkom ekstrakta u gruš najviši antioksidacijski kapacitet postignu u EG 50. Također je vidljivo kako EM 25 ima viši antioksidacijski kapacitet od EM 50 i EM 75, što nije u skladu s očekivanim, a navedeno odstupanje moguća je posljedica prethodno navedene razlike u proizvodnom procesu u odnosu na ostale sireve. Znatno odstupanje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta također je vidljivo i za njemu pripadajuću sirutku ( $S_{EM\ 25}$ ) Antioksidacijski kapacitet sirutki dobivenih u procesu proizvodnje navedenih sireva kreće su u rasponu od  $4,55 \pm 0,12$  ( $S_{EK}$ ) do  $11,41 \pm 1,83$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  ( $S_{EM\ 25}$ ). Promatrajući vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u gruš vidljivo je kako vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta rastu u skladu s povećanjem koncentracije dodanog ekstrakta. Navedeno nije vidljivo kod sirutke dobivene proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko.



*KK - kontrolni sir proizveden kiselinskom koagulacijom; KM - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; KG - sir proizveden kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; SKK - sirutka kontrolnog sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom; SKM – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko; SKG – sirutka sira proizvedenog kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u gruš; 25, 50, 75 - efektivne koncentracije dodanog ekstrakta (EC25, EC50, EC75)*

**Slika 14b).** Antioksidacijski kapacitet izražen kao Trolox ekvivalent TEQ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) u sirevima proizvedenim kiselinskom koagulacijom bez dodatka ekstrakta lista masline (KK), s dodatkom ekstrakta u mlijeko (KM 25, KM 50, KM 75) i s dodatkom ekstrakta u gruš (KG 25, KG 50, KG 75) te u njima pripadajućim sirutkama ( $S_{KK}$ ,  $S_{KM\ 25}$ ,  $S_{KM\ 50}$ ,  $S_{KM\ 75}$ ,  $S_{KG\ 25}$ ,  $S_{KG\ 50}$ ,  $S_{KG\ 75}$ ). Ekstrakt lista masline u sireve je dodavan u 3 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa

Na slici 14b) prikazan je antioksidacijski kapacitet sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom s i bez dodatka ekstrakta lista masline kao i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta sirutki dobivenih njihovom proizvodnjom. Kao i kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom, sirevi proizvedeni kiselinskom koagulacijom pokazali su povišenje antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na kontrolni sir. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta sireva proizvedenih postupkom kiselinske koagulacije kreću se u rasponu od  $2,37 \pm 0,05$  (KK) do  $6,63 \pm 0,34 \mu\text{mol g}^{-1}$  (KG 25). Uspoređujući vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta sireva proizvedenih enzimskom i kiselinskom koagulacijom, vidljivo je kako su više vrijednosti postigli sirevi proizvedeni kiselinskom koagulacijom. Dodatkom ekstrakta u mlijeko najviši

antioksidacijski kapacitet postigao je KM 50, dok je dodatak ekstrakta u gruš rezultirao najvišim antioksidacijskim kapacitetom u KG 25. Za razliku od sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom, kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom vidljivo je kako je dodatak ekstrakta u gruš rezultirao višim antioksidacijskim kapacitetima od dodatka ekstrakta u mlijeko. Za proizvodnju sireva kiselinskom koagulacijom korištena je 1 L mlijeka, umjesto 2 L kao u procesu enzimske koagulacije, zbog čega je dobivena manja količina gruša u koju je bilo lakše umiješati ekstrakt. Prethodno navedeno mogući je uzrok zbog kojeg su bolje uočljive razlike između dodatka ekstrakta u mlijeko i u gruš kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom. Dodatak ekstrakta lista masline u proizvodnji sireva kiselinskom koagulacijom rezultirao je povećanjem antioksidacijskog kapaciteta njima pripadajućih sirutki. Antioksidacijski kapaciteti sirutki dobivenih proizvodnjom sireva kiselinskom koagulacijom kreću se u rasponu od  $5,79 \pm 0,51$  ( $S_{KK}$ ) do  $14,63 \pm 2,08 \mu\text{mol g}^{-1}$  ( $S_{KG 25}$ ). Sirutke sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom pokazale su nešto više antioksidacijske kapacitete u odnosu na sirutke sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom. Vidljivo je kako je dodatak ekstrakta u gruš rezultirao višim antioksidacijskim kapacitetima sirutke u odnosu na dodatak ekstrakta u mlijeko.

Znanstvenim istraživanjima dokazano je kako mlijeko i mliječni proizvodi posjeduju određeni antioksidacijski kapacitet što se pripisuje različitim spojevima koji se nalaze u sastavu mlijeka. Antioksidacijski kapacitet mlijeka pripisuje se prisutnosti cisteina, karotenoida, vitamina A i E te različitih enzima kao što su katalaza, glutation peroksidaza i superoksid dismutaza. Zabilježeno je kako fermentirani mliječni proizvodi posjeduju viši antioksidacijski kapacitet od nefermentiranih mliječnih proizvoda. Dokazano je kako kazein, kao glavni protein mlijeka, također posjeduje antioksidacijski kapacitet te inhibira oksidaciju lipida kataliziranu lipoksigenazom. Upravo zbog dobrih antioksidacijskih svojstava u prehrambenoj industriji se koriste filmovi na bazi kazeina za sprječavanje posmeđivanja voća i povrća. Antioksidacijski kapacitet mlijeka i mliječnih proizvoda moguće je dodatno povećati dodatkom različitih fitokemikalija, najčešće u obliku biljnih ekstrakata. Povećanje antioksidacijskog kapaciteta prehrambenih proizvoda osim sa zdravstvenog važno je i s tehnološkog aspekta jer pomaže u inhibiciji oksidacije lipida što je jedan od glavnih uzročnika kvarenja i promjene organoleptičkih svojstava proizvoda (Khan i sur., 2019).

Postoje različita znanstvena istraživanja čiji je cilj bio ispitati utjecaj dodatka biljnih ekstrakata na antioksidacijski kapacitet sira. Qureshi i sur. (2019) zabilježili su u svom radu antioksidacijski potencijal mekog sira, poznatog pod nazivom Paneer, s dodatkom ekstrakta datulje (*Phoenix dactylifera* L.) koji je iznosio  $9,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ . Odnosno dodatkom ekstrakta

datulje u sir Paneer, Qureshi i sur. (2019) su postigli viši antioksidacijski kapacitet od kapaciteta koji je u ovom radu postignut dodatkom ekstrakta lista masline. Singh i Immanuel (2014) su u svom radu ispitali utjecaj ekstrakta kore limuna, naranče i grejpa na antioksidacijski kapacitet Paneer sira, pri čemu su zabilježili kako ekstrakt kore grejpa dovodi do najznačajnijeg povećanja antioksidacijskog kapaciteta. Ribeiro i sur. (2016) zabilježili su povećanje antioksidacijskog kapaciteta znatog sira uslijed dodatka ekstrakta ružmarina. Međutim, također su zabilježili opadanje antioksidacijskog kapaciteta u prvih sedam dana nakon proizvodnje zbog čega su u svrhu očuvanja antioksidacijskog kapaciteta proveli mikroenkapsulaciju liofiliziranog ekstrakta ružmarina.

Iako utjecaj ekstrakta lista masline na antioksidacijski kapacitet sireva nije detaljno ispitan, postoje znanstvena istraživanja koja su dokazala kako dodatak ovog ekstrakta dovodi do povećanja antioksidacijskog kapaciteta u jogurtu (Barukčić i sur., 2022; Cho i sur., 2020).

Dokazano je kako hrana koja sadrži proteine sirutke posjeduje bolju antioksidacijsku aktivnost. Antioksidacijska aktivnost proteina sirutke pripisuje se laktoferinu i aminokiselinama koje sadrže sumpor. Proteini sirutke dovode i do povećanja udjela glutathion peroksidaze koji je jedan od najznačajnijih antioksidacijskih enzimskih sustava. Laktoferin, uz kazein, može inhibirati oksidaciju lipida, stvaranje peroksidnih radikala i spojeva koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom te unos slobodnih kisikovih radikala (Khan i sur., 2019).

Iz rezultata dobivenih u ovom radu vidljivo je kako je upotrebom ekstrakta lista masline u proizvodnji sireva moguće dodatno poboljšati i antioksidacijsku aktivnost sirutke što zbog njene široke upotrebe također otvara mogućnost razvoja novih funkcionalnih proizvoda.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih analizom sireva proizvedenih metodama kiselinske i enzimske koagulacije uz dodatak ekstrakta lista masline, u mlijeko prije sirenja ili u dobiveni gruš, te analizom uzoraka sirutke dobivenih u procesu proizvodnje, moguće je izvesti sljedeće zaključke:

1. Sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta lista masline (ELM) u mlijeko pokazali su niže pH vrijednosti u odnosu na sireve proizvedene istom metodom s dodatkom ekstrakta u gruš. Za sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom nije vidljiv utjecaj trenutka dodatka ekstrakta na pH vrijednost sira.
2. Najveća razlika u boji izražena kao vrijednost  $\Delta E^*$  zabilježena je za uzorke sireva proizvedene kiselinskom koagulacijom s dodatkom ekstrakta u mlijeko. Porast  $\Delta E^*$  vrijednosti rastao je s količinom dodanog ekstrakta te je najveća razlika boje utvrđena za uzorak KM 75. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom porast  $\Delta E^*$  vrijednosti rastao je s količinom dodanog ekstrakta za sireve s dodatkom ekstrakta u mlijeko. Nadalje, neovisno o načinu koagulacije, manja vrijednost  $\Delta E^*$  utvrđena je za uzroke sira kojima je ELM dodan u gruš.
3. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom zabilježen je značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj trenutka dodatka ELM na tvrdoću, gumenost, odgođenu elastičnost i žvakljivost, dok je kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom zabilježen značajan ( $p \leq 0,05$ ) utjecaj koncentracije ELM na žvakljivost i otpornost.
4. Dodatak ELM u svim proizvedenim sirevima doveo je do povećanja koncentracije ukupnih fenola, koja je rasla proporcionalno povećanju koncentracije dodanog ekstrakta. Jedina iznimka je uzorak EM 25, što je vjerojatno posljedica razlike u proizvodnom procesu. Kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom dodatak ekstrakta u gruš rezultirao je boljim zadržavanjem fenola u odnosu na dodatak ekstrakta u mlijeko.
5. Veća koncentracija ukupnih flavonoida zabilježena je u sirevima proizvedenim enzimskom koagulacijom u odnosu na sireve proizvedene kiselinskom koagulacijom. Kod sireva proizvedenih enzimskom koagulacijom vidljiv je proporcionalan porast koncentracije flavonoida s povećanjem koncentracije ekstrakta te bolje zadržavanje flavonoida dodatkom ekstrakta u mlijeko.
6. Kod svih sireva s dodatkom ELM zabilježeno je povećanje antioksidacijskog kapaciteta, a najviša vrijednost utvrđena je u uzorku KG 75. Dodatak ekstrakta u gruš

kod sireva proizvedenih kiselinskom koagulacijom, rezultirao je višim antioksidacijskim kapacitetom od dodatka ekstrakta u mlijeko.

7. Kod većine uzoraka sirutke dobivenih proizvodnjom sireva s dodatkom ekstrakta zabilježeno je povećanje vrijednosti ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta, pri čemu je dodatak ekstrakta u gruš rezultirao višim vrijednostima svih navedenih parametara u pripadajućim uzorcima sirutke.
8. Uzimajući u obzir rezultate svih spektrofotometrijskih analiza, dodatak ekstrakta u mlijeko bio bi prikladniji od dodatka u gruš koji je rezultirao većim gubicima fenolnih spojeva u sirutku. Tomu u prilog ide i veća razlika u boji kod sireva s dodatkom ekstrakta u mlijeko, što sugerira bolje vezanje fenolnih spojeva u odnosu na dodatak u gruš. Nadalje, kao prikladnija metoda proizvodnje pokazala se kiselinska koagulacija zbog kiselijih uvjeta koji bolje pogoduju vezanju fenolnih spojeva u odnosu na enzimsku koagulaciju.

## 6. LITERATURA

Ahmad-Qasem MH, Cánovas J, Barraji3n-Catal3n E, Micol V, C3rcela JA, Garc3a-P3rez JV (2013) Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. *Serrana*) by using power ultrasound. *Innov Food Sci Emerg* **17**, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.008>

Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K (2007) Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov Food Sci Emerg* **8**, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>

Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N (2019) Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* **8**, 96. <https://doi.org/10.3390/plants8040096>

Ash A, Wilbey A (2010) The nutritional significance of cheese in the UK diet. *Int J Dairy Technol* **63**, 305-319. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00606.x>

Ballard TS, Mallikarjunana P, Zhou K, O'Keefe S (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem* **120**, 1185-1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>

Baruk3i3 I, Filipan K, Lisak Jakobovi3 K, Božani3 R, Blažić M, Repaji3 M (2022) The Potential of Olive Leaf Extract as a Functional Ingredient in Yoghurt Production: The Effects on Fermentation, Rheology, Sensory, and Antioxidant Properties of Cow Milk Yoghurt. *Foods* **11**, 701. <https://doi.org/10.3390/foods11050701>

Baruk3i3 I, Keški3 M, Karlovi3 S, Božani3 R (2020) Effect of selected starter cultures on production, properties and shelf life of fresh type cheese. *CJFSAU* **15**, 124-132. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.3-4.4>

Baruk3i3 I, Lisak Jakobovi3 K, Božani3 R (2019) Whey and Buttermilk—Neglected Sources of Valuable Beverages. U: Grumezescue AM, Holban AM (ured.) *Natural Beverages*, 13. izd, Academic Press, Cambridge, str. 209-242.

Benlarbi M, Jemai H, Hajri K, Mbarek S, Amri E, Jebbari M (2022) Neuroprotective effects of oleuropein on retina photoreceptors cells primary culture and olive leaf extract and oleuropein inhibitory effects on aldose reductase in a diabetic model. *Arch Physiol Biochem* **128**, 593-600. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1708119>

Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bintis T, Papademas P (2018) An Overview of the Cheesemaking Process, U: Papademas P, Bintis T (ured.) *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 120 – 156.

Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 32-47. <https://hrcak.srce.hr/70918>

Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž, Knez Hrnčić M (2020) Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules* **25**, 1-27. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>

Božanić R (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi. U: Matijević B (ured.) *Sirarstvo u teoriji i praksi*. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 47-57.

Božanić R, Jeličić I, Bilušić T (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda*, Plejada, Zagreb, str. 27-31.

Carvalho F, Rodrigues A, Gomes DMGS, Ferreira FML, Dias SP, Pereira CJD i sur. (2018) Improvement of Ripened Cheese Quality and Safety With *Thymus mastichina* L. Bioactive Extracts. U: Holban AM, Grumezescu AM (ured.) *Advances in Biotechnology for Food Industry*, 14. izd, Academic Press, Cambridge, str. 197-211.

Castillo JJ, Alcaraz M, Benavente-García O (2010) Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. U: Preedy VR, Watson RR (ured.) *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Cambridge, str. 951-958.

Cho WY, Kim DH, Lee HJ, Yeon SJ, Lee CH (2020) Quality characteristic and antioxidant activity of yogurt containing olive leaf hot water extract. *CYTA-J Food* **18**, 43-50. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1640797>

Chudy S, Bliska A, Kowalski R, Teichert J (2019) Colour of milk and milk products in CIE L\*a\*b\* space. *Med Weter* **76**, 77-81. <https://doi.org/10.21521/mw.6327>

Costa C, Lucera A, Marinelli V, Del Nobile MA, Conte A (2018) Influence of different by-products addition on sensory and physicochemical aspects of Primosale cheese. *J Food Sci Tech Mys* **55**, 4174-4183. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3347-z>

De la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia EM (ured.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, Elsevier Inc., Amsterdam, str. 253-271.

Dobrinčić A, Repajić M, Elez Garofulić I, Tuđen L, Dragović-Uzelac V, Levaj B (2020) Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols, *Processes* **8**, 1008. <https://doi.org/10.3390/pr8091008>

Domitrović R, Jakovec H, Vasiljev Marchesi V, Šain I, Romić Ž, Rahelić D (2012) Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacol Res* **65**, 451 – 464. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.12.005>

Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Jukić M, Penić M, Dent M (2012) The Influence of Microwave-Assisted Extraction on the Isolation of Sage (*Salvia officinalis* L.) Polyphenols. *Food Technol Biotechnol* **50**, 377-383. <https://hrcak.srce.hr/86933>

EMA (2017) Assessment report on *Olea europaea* L., folium. EMA – European Medicines Agency, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-olea-europaea-l-folium-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-olea-europaea-l-folium-first-version_en.pdf) . Pristupljeno 31. svibnja 2022.

Feeney EL, Lamichhane P, Sofheehan J (2021) The cheese matrix: Understanding the impact of cheese structure on aspects of cardiovascular health- A food science and nutrition perspective. *Int J Dairy Technol* **74**, 656-670. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12755>

Frühbauerová M, Červenka L, Hájek T, Salek RN, Velichová H, Buňka F (2020) Antioxidant properties of processed cheese spread after freeze-dried and oven-dried grape skin powder addition. *Potravinarstvo* **14**, 203-238. <https://doi.org/10.5219/1310>

Giroux HJ, Grandpré GD, Fustier P, Champagne CP, St-Gelais D, Lacroix M i sur. (2013) Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. *Dairy Sci Technol* **93**, 241-254. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0119-4>

Gomez L, Tiwari B, Garcia-Vaquero M (2020) Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction U: Torres MD, Kraan S, Dominguez H (ured.) Sustainable Seaweed Technologies, Elsevier Inc., Amsterdam, str. 207-224.

Grace SC (2005) Phenolics as Antioxidants U: Smirnoff N (ured.) Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Blackwell Publishing Ltd., Hoboken, str. 141-168.

Gwartney EA, Foegeding EA, Larick DK (2006) The Texture of Commercial Full-Fat and Reduced-Fat Cheese. *J Food Sci* **67**, 812-816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10682.x>

Hadrich F, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Feki I, Isoda H, Fève B, Sayadi S (2016) Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chem-Biol Interact* **252**, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.026>

Hamdi HK, Castellon R (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 769-778. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.161>

Han J, Britten M, St-Gelais D, Champagne CP, Fustier P, Salmier S i sur. (2011) Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chem* **124**, 1589-1594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.021>

Hassan ZK, Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Al-Olayan EM, Elobeid MA i sur. (2012) Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pac J Cancer P.* **13**, 4555-4559. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.9.4555>

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

Hayaloglu AA (2017) Cheese Varieties Ripened Under Brine. U: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW (ured.) Cheese, 4. izd. Academic Press, Cambridge, str. 997-1040.

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

- Jaski JM, Pimentel TC, Barão CE, Ponte MS, Mariutti LRB, Bragagnolo N i sur. (2019) Extraction and Characterization of the Phenolic Compounds from Leaves of *Olea Europaea* L. via PLE. *Chem Engineer Trans* **74**, 1543-1548. <https://doi.org/10.3303/CET1974258>
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S (2008) Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem-Biol Interact*, **25**, 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.08.014>
- Josipović R, Markov K, Frece J, Stanzer D, Cvitković A (2016) Upotreba začina u proizvodnji tradicionalnih sireva. *Mljekarstvo* **66**, 12-25. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0102>
- Kalit S (2015) Opće sirarstvo. U: Matijević B (ured.) Sirarstvo u teoriji i praksi. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 29-45.
- Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anaysis* **13**, 105-113. <https://doi.org/10.1002/pca.631>
- Kaya S, Öner MD (1996) Water Activity and moisture sorption isotherms of Gaziantep cheese. *J Food Quality* **19**, 121-132. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1996.tb00409.x>
- Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ullah R, Ajmal M, Jaspal MH (2019) Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Dis* **18**. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Kirin S (2016) Sirarski priručnik. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Kongo JM, Malcata FX (2016) Cheese: Processing and Sensory Properties. U: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (ured.) Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Cambridge, str. 748-754.
- Laguerre M, López Giraldo LJ, Piombo G, Figueroa-Espinoza MC, Pina M, Benaissa M i sur. (2009) Characterization of Olive-Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay. *J Am Chem Soc* **86**, 1215-1225. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1452-x>
- Lancaster JE, Lister CE, Reay PF, Triggs CM (1997) Influence of Pigment Composition on Skin Color in a Wide Range of Fruit and Vegetables. *J Am Soc Hortic Sci* **122**, 594-598. <https://doi.org/10.21273/JASHS.122.4.594>

Lee-Huang S, Zhang L, Lin Huang P, Chang YT, Huang PL (2003) Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Bioph Res Co* **307**, 1029-1037. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01292-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01292-0)

Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R (2012) Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem* **130**, 928-936. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.019>

Lins PG, Piccoli Pugine SM, Scatolini AM, Pires de Melo M (2018) *In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon* **4**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00805>

Liu YN, Jung JH, Park H, Kim H (2014) Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet-induced diabetes. *Nutr Res* **34**, 450-457. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.04.007>

Llompart M, Garcia-Jarez C, Celeiro M, Dagnac T (2019) Extraction / Microwave-Assisted Extraction U: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M (ured.) Encyclopedia of Analytical Science, 3. izd., Elsevier Inc., Amsterdam, str. 67-77.

Lopez-Avila V (2000) Extraction / Microwave-Assisted Extraction U: Wilson ID (ured.) Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, Cambridge, str. 1389-1398.

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

Malliou F, Andreadou I, Gonzalez FJ, Lazou A, Xepapadaki E, Vallianou I i sur. (2018) The olive constituent oleuropein, as a PPAR $\alpha$  agonist, markedly reduces serum triglycerides. *J Nutr Biochem* **59**, 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.05.013>

Manousi N, Sarakatsianos I, Samanidou V (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) Engineering Tools in the Beverage Industry, 3. izd, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 283-314.



- Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A (2005) The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res* **66**, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.005>
- Medina E, Romero C, García P, Brenes M (2019) Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food Funct* **10**, 4716-4724. <https://doi.org/10.1039/C9FO00698B>
- Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Colour difference  $\Delta E$  - A survey. *Mach Graph Vis* **20**, 383-411. [https://www.researchgate.net/publication/236023905\\_Color\\_difference\\_Delta\\_E\\_-\\_A\\_survey](https://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey)
- Otero DM, Lorini A, Moreira Oliveria F, da Fonseca Antunes B, Moreira Oliveria R, Zambiasi RC (2021) Leaves of *Olea europaea* L. as a source of oleuropein: characteristics and biological aspects. *Res Soc Dev* **10**, 1-17. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21130>
- Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R i sur. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, **12**, 1153-1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Pravilnik (2009) Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva. Narodne novine 20, Zagreb [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_02\\_20\\_446.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_02_20_446.html) 25. svibnja2022.
- Qureshi TM, Amjad A, Nadeem M, Murtaza MA, Munir M (2019) Antioxidant potential of a soft cheese (paneer) supplemented with the extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars and its whey. *Asian-Australas J Anim* **32**, 1591-1602. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0750>
- Rafiq S, Gulzar N, Sameen A, Huma N, Hayat I, Ijaz R (2020) Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *Int J Dairy Technol* **74**, 1-16. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12732>
- Ribeiro A, Caleja C, Barros L, Santos-Buelga C, Barreiro MF, Ferreira ICFR (2016) Rosemary extracts in functional foods: extraction, chemical characterization and incorporation of free and microencapsulated forms in cottage cheese. *Food Funct* **5**, 2185-2196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C6FO00270F>

- Roila R, Valiani A, Ranucci D, Ortenzi R (2019) Antimicrobial efficacy of a polyphenolic extract from olive oil by-product against “Fior di latte” cheese spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol* **295**, 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.013>
- Roseiro LB, Viala D, Besle JM, Carnat A, Fraisse D, Chezal JM i sur. (2005) Preliminary observations of flavonoid glycosides from the vegetable coagulant *Cynara L.* in protected designation of origin cheeses. *Int Dairy J* **15**, 579-584. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.027>
- Salah MB, Abdelmelek H, Abderraba M (2012) Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Med Chem* **2**, 107-111. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000124>
- Sánchez-Gutiérrez M, Bascón-Villegas I, Rodríguez A, Pérez-Rodríguez F, Fernández-Prior A, Rosal A i sur. (2021) Valorisation of *Olea europaea L.* Olive Leaves through the Evaluation of Their Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Foods* **10**, 966. <https://doi.org/10.3390/foods10050966>
- Sangi SMA, Sulaiman MI, El-Wahab MFA, Ahmedani EI, Ali SS (2015) Antihyperglycemic effect of thymoquinone and oleuropein, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in experimental animals. *Pharmacogn Mag* **11**, 51-57. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.166017>
- Santos IC, Favetta PM, Silva GG, Legnani NGE (2022) *Origanum vulgare* extract as a natural additive in fresh cheese. *Semina Ciênc Agrár Londrina* **43**, 1705-1720. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n4p1705>
- Seçme M, Eroğlu C, Dodurga Y, Bağcı G (2016) Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene* **585**, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.038>
- Shamshoum H, Vlacheski F, Tsian E (2017) Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors* **8**, 517-528. <https://doi.org/10.1002/biof.1366>
- Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

- Singh S, Immanuel G (2014) Extraction of Antioxidants from Fruit Peels and its Utilization in Paneer. *Int J Food Process Technol* **5**. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000349>
- Singh A, Sabally K, Kubow S, Donnelly DJ, Garipey Y, Orsat V i sur. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Potato Peels. *Molecules* **16**, 2218-2232. <https://doi.org/10.3390/molecules16032218>
- Soler- Rivas C, Espin JC, Wichers HJ (2000) Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agr* **80**, 1013-1023. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C)
- Stojiljković J, Kakurinov D (2011) The dynamic of the number of coliform bacteria in white cheese. *Biotechnol Anim Husb* **27**, 1091-1096. <https://doi.org/10.2298/BAH1103091S>
- Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Dwi Nofiarny, Perrinjaquet-Moccetti T, Verbruggen M (2010) Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine* **18**, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.016>
- Talhaoui N, Gómez-Caravaca AM, León L, De la Rosa R, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2014) Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT-Food Sci Technol* **58**, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.014>
- Talhaoui N, Taamalli A, Gomez-Caravaca AM, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carettero A (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res Int* **77**, 92-108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Tavakoli H, Hosseini O, Jafari SM, Katouzian I (2018) Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Yogurt Enriched by Olive Leaf Phenolics within Nanoliposomes. *J Agric Food Chem* **66**, 9231-9240. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02759>
- Tratnik Lj, Božanić R (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 205-354.
- Tratnik Lj, Božanić R, Kozlek D (1998) Proizvodnja sira tipa Feta od ultrafiltriranog mlijeka U: Zbornik sažetaka XXXIV. znanstvenog skupa hrvatskih agronoma, Zagreb, str. 371-372.

Vogel P, Kaper Machado I, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S (2015) Polyphenol benefits of olive leaf (*Olea europaea L*) to human health. *Nutr Hosp* **3**, 1427-1433. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>

Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z, Madar Z (2012) Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *J Med Food* **15**, 605-610. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0243>

Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med-Uk* **13**, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zheng S, Wang Y, Fang J, Geng R, Li M, Zhao Y i sur. (2021) Oleuropein Ameliorates Advanced Stage of Type 2 Diabetes in db/ db Mice by Regulating Gut Microbiota. *Nutrients* **13**, 2131. <https://doi.org/10.3390/nu13072131>

Zhu F, Du B, Xu B (2018) Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit, Rev. Food Sci.* **58**, 1260-1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>

Zoidu E, Melliou E, Moatsou G, Magiatis P (2017) Preparation of Functional Yogurt Enriched With Olive-Derived Products. U: Shah NP (ured.) *Yogurt in Health and Disease Prevention*, Academic Press, London, str. 203-220.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Lucija Vranković

Vlastoručni potpis