

Kvaliteta svježeg kravljeg sira obogaćenog ekstraktom lista masline (*Olea europaea* L.) tijekom 28 dana skladištenja

Miletić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:272846>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

Ivan Miletić

**KVALITETA SVJEŽEG KRAVLJEG SIRA
OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM LISTA
MASLINE (*Olea europaea* L.) TIJEKOM 28
DANA SKLADIŠTENJA**

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 izv. prof. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović i tehničke suradnice Snježane Šimunić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ireni Barukčić Jurina na svojoj pruženoj potpori i savjetima tijekom izrade ovog rada. Također zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, Elizabeti Zandona mag. ing. bioproc., tehničkoj suradnici Snježani Šimunić i kolegici Nicole Madunic na pruženoj pomoći i ugodnoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada. Hvala svim profesorima, tehničarima i asistentima iz Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo što su mi osigurali pristup potrebnim laboratorijima, opremi te na nesebičnoj pomoći.

Hvala mojim prijateljima i kolegama na konstantnoj potpori i motivaciji te što su bili uz mene i uljepšali mi fakultetske dane.

Na kraju najvažnije i najveće HVALA mojoj obitelji, posebice roditeljima i sestrama koji su uvijek tu za mene kao moja najveća podrška i bez kojih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

KVALITETA SVJEŽEG KRAVLJEG SIRA OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM LISTA MASLINE (*Olea europaea* L.) TIJEKOM 28 DANA SKLADIŠTENJA

Ivan Miletić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215696

Sažetak:

Ekstrakt lista masline karakterizira bogati fenolni sastav zbog kojeg ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Iz tog razloga posjeduje veliki potencijal kao dodatak prehrambenim proizvodima, pogotovo danas kada je funkcionalna hrana sve popularnija. Svježi kravljji sir je tradicionalni prehrambeni proizvod koji se često konzumira zbog bogatog nutritivnog sastava. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline u svježi kravljji sir na fizikalno kemijska i senzorska svojstva, antioksidativnu aktivnost i mikrobiološku stabilnost. Nakon 28 dana skladištenja, utvrđeno je da je dodatak ekstrakta lista masline rezultirao promjenama u nutritivnom sastavu i okusu sireva, smanjenjem tvrdoće i povećanjem ljepljivosti, tamnijim nijansama boje te boljom mikrobiološkom stabilnošću sireva. Kod sireva obogaćenih ekstraktom lista masline određen je najveći udio ukupnih fenola i flavonoida, kao i veća antioksidacijska aktivnost FRAP i DPPH metodom. Senzorska analiza ukazuje na nisku prihvatljivost sireva obogaćenih ekstraktom lista masline od strane potrošača.

Ključne riječi: sir, ekstrakt lista masline, antioksidacijska aktivnost, flavonoidi, fenoli

Rad sadrži: 56 stranica, 19 slika, 11 tablica, 77 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 19. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

QUALITY OF FRESH COW'S CHEESE FORTIFIED WITH OLIVE LEAF (*Olea europaea* L.)
EXTRACT DURING 28 DAYS OF STORAGE

Ivan Miletić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215696

Abstract:

Olive leaf extract is characterized by rich phenolic composition, which has positive effect on human health. Therefore, it has great potential as an additive in food products, especially today when functional foods are increasingly popular. Fresh cow cheese is a traditional food product often consumed due to its rich nutritional composition. The aim of this study was to examine impact of adding olive leaf extract to fresh cow cheese on the physicochemical and sensory properties, antioxidant activity, and microbiological stability. After 28 days of storage, it was found that the addition of olive leaf extract resulted in changes of nutritional composition and taste, reduction of hardness and increase of stickiness, darker colour, and better microbiological stability of cheeses. Cheeses fortified with olive leaf extract had the highest content of total phenols and flavonoids, as well as higher antioxidant activity as determined by FRAP and DPPH methods. Sensory analysis indicates low acceptability of cheeses fortified with olive leaf extract.

Keywords: cheese, olive leaf extract, antioxidant capacity, flavanoids, phenols

Thesis contains: 56 pages, 19 figures, 11 tables, 77 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb 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

Reviewers:

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

Thesis defended: July 19th, 2024

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SVJEŽI KRAVLJI SIR	2
2.1.1. Proizvodnja svježeg kravljeg sira	2
2.1.2. Mikrobiološka svojstva svježeg kravljeg sira	3
2.1.3. Nutritivna i zdravstvena vrijednost svježeg kravljeg sira	4
2.2. EKSTRAKT LISTA MASLINE (<i>Olea europaea</i> L.).....	5
2.2.1. Listovi masline	5
2.2.2. Metode ekstrakcije biološki aktivnih sastojaka iz lista masline.....	6
2.2.3. Svojstva ekstrakta lista masline	7
2.2.4. Biološka aktivnost ekstrakta lista masline i mogućnosti primjene u obogaćivanju prehrambenih proizvoda	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Aparatura.....	12
3.1.3. Pribor	13
3.2. METODE RADA	14
3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline	14
3.2.2. Proizvodnja svježeg kravljeg sira	14
3.2.3. Određivanje prinosa sira	15
3.2.4. Određivanje aktiviteta vode sira	15
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti sira	15
3.2.6. Određivanje titracijske kiselosti sira po Soxhlet-Henkel-u.....	16
3.2.7. Određivanje indeksa boje sira	16
3.2.8. Određivanje teksture sira	17
3.2.9. Određivanje kemijskog sastava sira	17
3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	17
3.2.11. Određivanje koncentracije ukupnih flavanoida	19
3.2.12. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	21
3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	23
3.2.14. Mikrobiološke analize mlijeka i sireva.....	24
3.2.15. Senzorska analiza pomoću testa prihvatljivosti	26
3.2.16. Obrada podataka	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH MJERENJA	29
4.1.1. Prinos sira.....	29
4.1.2. Aktivitet vode	30

4.1.3. pH vrijednost i titracijska kiselost sira	31
4.1.4. Indeks boje sira.....	32
4.1.5. Tekstura sira	33
4.1.6. Kemijski sastav sira	35
4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA.....	38
4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola	38
4.2.2. Koncentracija ukupnih flavanoida.....	39
4.2.3. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom	40
4.2.4. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom	42
4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZA.....	42
4.4. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	47
6. LITERATURA	48

1. UVOD

Svježi kravliji sir predstavlja tradicionalni prehrambeni proizvod za područje Sjeverne Hrvatske i Slavonije. Prema tradicionalnoj recepturi, za proizvodnju svježeg kravljeg sira koristi se svježe, nepasterizirano mlijeko, dok se u industrijskom mjerilu koristi pasterizirano kravlje mlijeko. U oba slučaja, dobiva se prehrambeni proizvod koji pogodno utječe na ljudsko zdravlje te ima visoku nutritivnu vrijednost koja proizlazi od visokovrijednih proteina, lipida, vitamina i mineralnih tvari kao što je kalcij. Zbog toga se u današnje vrijeme, kada sve više raste popularnost funkcionalne i minimalno procesirane hrane, svježi kravliji sir često konzumira. Nedostatak ovog prehrambenog proizvoda je kratak rok trajanja koji se kreće od 3 do 7 dana ukoliko je dobiven tradicionalnim postupkom. Kako bi se produljio rok trajanja svježeg sira te povećala njegova nutritivna vrijednost, kontinuirano se radi na razvoju raznih receptura koje uključuju raznolike dodatke u svježi sir kao što su začini i biljni ekstrakti ne bi li se postigao željeni efekt. Često se istražuje utjecaj dodatka začina i biljnih ekstrakata koji imaju izraženo antioksidativno i antimikrobno djelovanje kao što su cimet, origano, klinčić, ekstrakt stevije, masline, češnjaka, borovih iglici i slično (Lucić, 2021).

Kao jedan od novijih trendova u prehrambenoj industriji nametnulo se iskorištavanje nusproizvoda nastalih preradom hrane u svrhu razvoja novih prehrambenih proizvoda te smanjenja količine otpada nastalog u prehrambenoj industriji. Tako se unazad par godina istražuje moguća primjena raznih nusproizvoda kao što su komina i koštice grožđa, pogače nastale proizvodnjom ulja ili vina, kore raznog voća i povrća i slično. S obzirom da u Republici Hrvatskoj postoji značajna proizvodnja maslinovog ulja, ispostavilo se da nastaju velike količine nusproizvoda - maslinovog lišća. Mnoga istraživanja pokazala su kako je lišće masline bogat izvor različitih fenolnih spojeva i triterpenoida za koje je dokazano da posjeduju jak antioksidacijski učinak i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Žuntar i sur., 2019; Dobrinčić i sur., 2020).

Mlijeko i mliječne proizvode kao što je svježi sir, karakterizira nizak udio fenolnih spojeva pa su mnoga znanstvena istraživanja usmjerena prema obogaćivanju postojećih mliječnih proizvoda biljnim materijalima koji predstavljaju izvor fenola, ali i drugih biološki aktivnih spojeva (Barukčić i sur., 2022; Lucić 2021; Zandona i sur., 2024).

S obzirom na navedene trendove u prehrambenoj industriji, karakteristike svježeg kravljeg sira i ekstrakta lista masline, cilj ovog rada bio je razviti svježi kravliji sir s dodatkom ekstrakta lista masline. Tijekom hladnog skladištenja tog sira, ispitan je utjecaj dodanog ekstrakta u mlijeko prije grušanja na konačnu nutritivnu vrijednost sireva, antioksidacijsku aktivnost, mikrobiološku stabilnost, boju, teksturu i senzorska svojstva sireva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SVJEŽI KRAVLJI SIR

Pravilnik (2009) o sirevima i proizvodima od sireva u Republici Hrvatskoj sireve definira kao svježe proizvode ili proizvode različitog stupnja zrelosti koji se proizvode koagulacijom mlijeka, sirutke, vrhnja ili kombinacijom tih sirovina. Pravilnik također navodi kako je za koagulaciju mlijeka dozvoljeno korištenje sirila i drugih adekvatnih koagulacijskih enzima, mljekarskih kultura i odgovarajućih kiselina.

Svježi kravljji sir je sir proizveden od kravljeg mlijeka, a koji sadrži 65-85 % vode te se proizvodi mliječno kiselom fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline (Božanić, 2015). Svježi sirevi kategoriziraju se s obzirom na sadržaj masti u suhoj tvari, odnosno konzistenciju koja može biti pastozna (npr. *Quark*), zrnata (npr. *Cottage cheese*) ili lisnata. Svježi sirevi mogu pripadati svim stupnjevima masnoće ovisno o udjelu masti, s tim da svježi sirevi s većim udjelom masnoće imaju manji udio laktoze i proteina (Kirin, 2016).

2.1.1. Proizvodnja svježeg kravljeg sira

Svježi sir u mnogim zemljama predstavlja tradicionalni prehrambeni proizvod koji se proizvodio od raznih vrsta mlijeka. U Republici Hrvatskoj ova vrsta sira je tradicionalna za područje Sjeverne Hrvatske i Slavonije gdje se najčešće proizvodio od kravljeg mlijeka. Tradicionalni postupak proizvodnje svježeg kravljeg sira uključuje spontano kiseljenje neobrađenog sirovog punomasnog mlijeka kroz 2 do 3 dana. Slijedi površinsko obiranje izdvojenog vrhnja, a preostalo mlijeko se blago zagrijava na rubu štednjaka tijekom 2-3 sata uslijed čega dolazi do koagulacije (Sabljak i sur., 2013). Formirani gruši se zatim nožem reže na kockice dimenzija otprilike 5 x 5 cm čime se potiče izdvajanje sirutke što je prikazano na slici 1, a potom slijedi cijedenje preko sirnih gaza ili cijedila (Kalit, 2016).



Slika 1. Izrezani gruši i izdvojena sirutka (Anonymous 1, 2020)

S druge strane, industrijska proizvodnja svježeg sira koristi standardizirano, homogenizirano i pasteurizirano mlijeko. Sam proces započinje zgrušavanjem koje se u ovom slučaju ne odvija spontano, već se potiče dodavanjem pogodnog soja bakterija mliječne kiseline i manje količine sirila s ciljem da se postigne željena konzistencija gruš (Kirin, 2009). Slijedi podsirivanje u kontroliranim uvjetima, a ono može biti hladno (20-26 °C) i toplo (27-32 °C). U ovom periodu prati se kiselost koja kada dostigne željenu vrijednost označava da se treba prekinuti fermentacija. Formirani gruš se reže i ostavlja kako bi se izdvojila sirutka. U industriji se, ovisno o pogonu, cijedenje gruš provodi preko sirne marame, vreće, setova perforiranih posudica ili postupkom Schulenberg, itd. Proizvodnja se završava kada se postigne udio vode u siru koji je propisan Pravilnikom (2009). Slijedi pakiranje i skladištenje na +4 °C (Kirin, 2009).

Oba opisana postupka proizvodnje svježeg sira temelje se na dehidrationskom procesu u kojem dolazi do koncentriranja kazeina i mliječne masti (Bintis i Papademas, 2018). U oba postupka dolazi do koagulacije kazeina odnosno grušanja mlijeka, nakon čega slijedi postupak sušenja formiranog gruš i oblikovanje sirnih zrnca. Također, neovisno kojim postupkom proizvodnje je svježi sir dobiven, on ne prolazi fazu zrenja, već je odmah nakon proizvodnje spreman za konzumaciju (Božanić, 2015).

2.1.2. Mikrobiološka svojstva svježeg kravljeg sira

Mikroorganizmi u svježem siru prvenstveno potječu iz sirovine, odnosno mlijeka. Izvori kontaminacije mlijeka, odnosno sira, su mnogi a mogu uključivati upalu vimena, nisku razinu higijene radnika i opreme za transport, preradu ili skladištenje (Sabljak i sur., 2013). Kako bi se kontrolirala mikrobiologija svježeg sira potrebno je tijekom proizvodnje nadzirati parametre pasteurizacije mlijeka, brzinu zakiseljavanja i temperaturu dogrijavanja gruš. Pasteurizacija je postupak kojim se inaktiviraju mnogi štetni mikroorganizmi ili njihov broj smanjuje na dozvoljenu razinu. Tijekom zgrušavanja dolazi do naglog pada pH vrijednosti što rezultira značajnim opadanjem broja nepoželjnih mikroorganizama u siru. No, treba naglasiti kako temperature grušanja, koje se kreću od 20 do 30 °C, pogodno utječu na rast svih mikroorganizama, pa tako i patogenih (HAH, 2016). Primjerice, iako enterobakterije predstavljaju uobičajen dio mikroflore probavnog sustava ljudi, one mogu biti opasne za ljudsko zdravlje ukoliko prevladaju ostatak mikroflore domaćina zbog toga što luče endo- i egzotoksine. Najčešće prisutne enterobakterije u mlijeku i svježem siru su *Salmonella* sp., *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (Markov i sur., 2009). Od ostalih patogenih mikroorganizama koji mogu biti prisutni u svježem siru vrijedi istaknuti Gram negativne bakterije kao što su rodovi *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus* i *Aerobacter*. Njihova prisutnost u svježem siru rezultira cijelim nizom negativnih promjena kao što je sluzavost, teksturalne promjene, neugodan miris i promjene okusa (Mannheim i Soffer, 1996).

2.1.3. Nutritivna i zdravstvena vrijednost svježeg kravljeg sira

Svježi kravljji sir može se okarakterizirati kao visokovrijedan prehrambeni proizvod jer je bogat visokokvalitetnim proteinima, lipidima, mineralnim tvarima i vitaminima. Božanić (2015) navodi kako je dnevnom konzumacijom 100 g svježeg sira moguće zadovoljiti 30 do 40 % dnevnih potreba za unosom proteina kod odrasle osobe. Također, sirevi su bogat izvor bioaktivnih peptida - specifičnih fragmenata proteina koji pozitivno pridonose i određenim fiziološkim funkcijama. Bioaktivni peptidi se u organizmu nalaze u malim koncentracijama, ali posjeduju veliku strukturnu raznolikost, visoku specifičnost i nizak toksikološki rizik. Bioaktivni peptidi koji se pronalaze u sirevima imaju protuupalno, antimikrobno, antikancerogeno, antioksidacijsko i ACE inhibirajuće djelovanje (Rafiq i sur., 2020).

Visoki udio zasićenih masnih kiselina u sirevima dovodi se u vezu s povišenim udjelom LDL (eng. *Low-density lipoprotein*) kolesterola u krvi. Posljedično se sirevi često smatraju nezdravim proizvodom koji se povezuje s povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Feeney i sur., 2021). No treba napomenuti kako je dokazano da nemaju sve zasićene masne kiseline jednak učinak na povećanje koncentracije kolesterola u krvi (Ash i Wilbey, 2010). Kukina (2017) je u svome istraživanju naveo kako na povećanje koncentracije kolesterola u krvi najznačajnije utječu dugolančane zasićene masne kiseline kao što su palmitinska, stearinska i laurinska kiselina. No, dokazano je i kako metabolizmom masnih kiselina u mlijeku i mliječnim proizvodima može nastati konjugirana linolenska kiselina poznata po blagotvornim učincima na zdravlje ljudi (Božanić, 2015; Ash i Wilbey, 2010).

Sirevi se smatraju značajnim izvorom kalcija koji se nalazi u sastavu kazeinske mreže gela. Taj kompleks formira se tijekom sirenja mlijeka te održava kalcij u topljivom obliku, sprječava njegovo taloženje u gastrointestinalnom traktu te povećava njegovu bioraspoloživost u organizmu. Kalcij-kazein kompleks odgovoran je i za samu teksturu svježeg sira. Naime, kako u svježem siru nastaju visoke koncentracije mliječne kiseline, dolazi do slabijeg vezanja kalcija za kazein što rezultira rastresitom teksturom, lomljivom i krutom konzistencijom, a sam sir dobiva izrazito bijelu boju (Kirin, 2009; 2016). Kalcij je jedan od mineralnih tvari koje su odgovorne za održavanje zdravlja kostiju što je osim kod djece u razvoj bitno i kod starije populaciju jer smanjuje rizik od nastanka osteoporoze.

Vitamini koji su topljivi u vodi se tijekom proizvodnje svježih sireva u značajnoj mjeri gube izdvajanjem sirutke. Međutim, riboflavin, vitamin B12, niacin i folati zadržavaju se u sirevima u značajnim količinama te se sirevi mogu smatrati dobrim izvorima tih spojeva. U sirevima su također zabilježene značajne količine vitamina A kojeg karakterizira pozitivan učinak na zdravlje vida, rad imunološkog sustava i regulaciju ekspresije gena (Ash i Wilbey, 2010).

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

Maslina (lat. *Olea europaea* L.) se ubraja među najstarija kultivirana stabla na svijetu te može preživjeti u različitim okolišnim uvjetima (Ray i sur., 2015). Uzgoj maslina čini važan dio poljoprivrede Mediterana (Dobrinčić i sur. 2020), a proces proizvodnje maslinovog ulja rezultira stvaranjem značajnih količina biootpada od kojeg je veliki udio list masline.

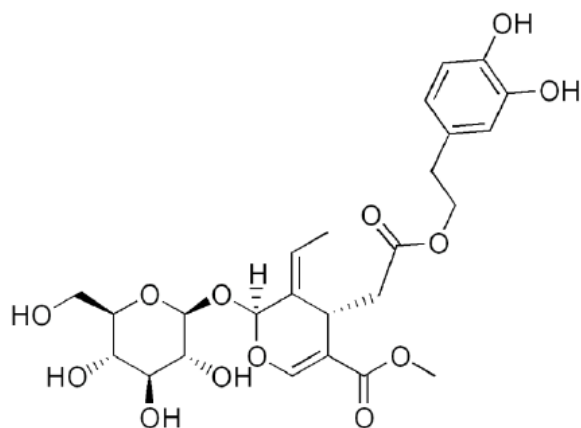
2.2.1. Listovi masline

Listovi masline su srebrno zelene boje, debeli i kožasti (Guerrero Maldonado i sur., 2016). Oni čine oko 10 % mase maslina prikupljenih za ekstrakciju maslinovog ulja od čega se najveći dio koristi za stočnu hranu ili se spaljuje zajedno sa obrezanim granama. Kao takvi, listovi masline predstavljaju lako dostupnu i jeftinu sirovinu. Listovi masline bogati su raznolikim kemijskim spojevima koje karakterizira značajno biološki djelovanje. To su prije svega fenolni spojevi, zatim triterpenoidi, pigmenti i tokoferoli.

Pavišić (2020) u svome radu navodi kako se u listu masline nalazi 5 grupa fenolnih spojeva:

- sekoiridoidi (oleuropein, dimetiloleuropein, verbaskozid, ligstrozid)
- flavoni (luteolin, diosmetin, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid)
- flavonoli (rutin, kvercetin, kamferol)
- flavan-3-oli (katehin)
- supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, kafeinska kiselina)

Vogel i sur. (2015) navode kako je oleuropein najzastupljeniji spoj u listu masline, a slijede ga hidroksitirozol, luteolin-7-glukozid i apigenin-7-glukozid. Oleuropeinu se pripisuju mnogobrojni zdravstveni učinci kao što je zaštita membrane od lipidne oksidacije, doprinos smanjenju aritmije te poboljšavanje metabolizma lipida i zaštite enzima od oksidacijskog oštećenja (Somova i sur., 2003). Oleuropein pridonosi snižavanju krvnog tlaka inhibiranjem razine angiotenzin konvertirajućeg enzima odgovornog za pretvorbu hormona angiotenzina I u aktivni vazokonstriktor angiotenzin inducirajući vazodilataciju i povećavajući protok krvi u krvnim žilama (Parisi i sur., 2014). Treba naglasiti kako uz oleuropein i drugi spojevi ekstrakta lista masline sudjeluju u vazodilataciji (Talhaoui i sur., 2018). Također, oleuropein smanjuje formiranje i povećavanje postojećih aterosklerotičkih plakova u krvnim žilama na način da se veže na LDL inhibirajući njegovu oksidaciju. Po kemijskoj strukturi, prikazanoj na slici 2, oleuropein je ester 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozol) i β -glukolizirane elenoične kiseline (Borjan i sur., 2020).



Slika 2. Strukturni prikaz molekule oleuropeina (prema Al-Rimawi i sur., 2017)

Antikancerogeno djelovanje spojeva iz lista masline, pogotovo triterpena (uvaol, maslinska kiselina i eritrodio) i fenolnih spojeva (oleuropein i hidroksitirozol), dokazano je za mnoge tipove tumora - debelog crijeva, dojke i mokraćnog mjehura (Mushtaq i sur., 2020; Talhaoui i sur., 2018). Ti spojevi imaju značajnu ulogu u procesu karcinogeneze jer imaju sposobnost inhibicije staničnog ciklusa i umnožavanja stanica raka. Također, oleuropein djeluje na smanjenje oštećenja kože, odnosno pridonosi regresiji tumora kože, a dokazana je i njegova kemoprotektivna uloga kod raka jezika (Talhaoui i sur., 2018).

2.2.2. Metode ekstrakcije biološki aktivnih sastojaka iz lista masline

Ekstrakcija je tehnološka operacija koja se zasniva na separaciji bioaktivnih komponenti iz biljnog ili životinjskog materijala primjenom selektivnog otapala. Faktori o kojima ovisi sam proces ekstrakcije su svojstva matriksa biljnog ili životinjskog materijala, karakteristike otapala, primijenjena temperatura, tlak i vrijeme. Postoje mnoge metode ekstrakcije koje se mogu podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne (alternativne) metode (Azmir i sur., 2013).

U konvencionalne metode ekstrakcije se ubrajaju maceracija, perkolacija, infuzija, dekokcija te metoda po Soxhlet-u. Zajedničko svim konvencionalnim metodama ekstrakcije je to što koriste jeftina otapala uz primjenu topline i/ili miješanja. Često zahtijevaju složene i dugotrajne postupke koji se sastoje od više koraka što dovodi do niske selektivnosti metoda, onečišćenja, velike potrošnje organskih otapala i energije te gubitka analita (Giacometti i sur., 2018; Azwandia, 2015). Kako bi se izbjegli navedeni nedostaci konvencionalnih metoda, razvijene su raznovrsne nekonvencionalne, alternativne metode ekstrakcije.

U nekonvencionalne metode ekstrakcije ubrajaju se ultrazvučna ekstrakcija (*Ultrasound-assisted extraction, UAE*), mikrovalna ekstrakcija (*Microwave assisted extraction, MAE*), ekstrakcija superkritičnim fluidima (*Supercritical fluid extraction, SFE*), ekstrakcija

subkritičnim fluidima (*Subcritical Fluid Extraction*, SFE), ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (*Pressurized liquid extraction*, PLE), ubrzana ekstrakcija otapalima (*Accelerated solvent extraction*, ASE), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (*Pulsed electric field*, PEF) i ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (*High voltage electrical discharge*, HVED) (Giacometti i sur., 2018; Poojary i sur., 2016; Azwandia, 2015). Osnovna prednost svih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije je povećanje prinosa u kraćem vremenu uz minimalnu potrošnju otapala za ekstrakciju.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) spada u novije tehnike ekstrakcije, a temelji se na kombinaciji energije mikrovalova i klasične ekstrakcije pomoću otapala (Llompert i sur., 2019), gdje oštećenje stanične strukture ispitivanog uzorka uzrokuje mikrovalovi (Gomez i sur., 2020).

Mikrovalovi se svrstavaju u dio neionizirajućeg elektromagnetskog zračenje s frekvencijom koja se nalazi u rasponu od 300 do 300 000 MHz. Mehanizam djelovanja mikrovalova zasniva se na kretanju iona i rotaciji dipola. Kretanje iona posljedično dovodi do zagrijavanja materijala te potiče prodiranje otapala u uzorak čime se povećava efikasnost ekstrakcije (Blekić i sur., 2011). Llompert i sur. (2019) navode kako je rotacija dipola značajniji mehanizam zagrijavanja u procesu MAE. Voda ima izrazito polarna svojstva te tijekom tretmana mikrovalovima, voda prisutna u uzorku isparava što dovodi do povećanja tlaka u stanicama, što rezultira razaranjem stanične strukture i ispuštanjem staničnog sadržaja u otapalo (Gomez i sur. 2020). Tijekom provođenja MAE potrebno je koristiti otapala s visokom dielektričnom konstantom jer takva otapala efikasnije apsorbiraju energiju mikrovalova (Llompert i sur., 2019). Blekić i sur. (2011) ističu vodu, metanol i etanol kao prikladna otapala za MAE.

Kod MAE se toplina uzorka i otapala oslobađa iz unutrašnjosti prema okolini te se i prijenos mase odvija u tome smjeru što skraćuje vrijeme metode te povećava prinos ekstrakcije čime se ova metoda bitno razlikuje od konvencionalnih. Dobrinčić i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojemu su ispitali učinkovitost ekstrakcije spojeva iz lista masline pomoću tri različite nekonvencionalne ekstrakcijske metode: MAE, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija pri povišenom tlaku. Rezultati istraživanja potvrdili su literaturne navode kako su nekonvencionalne metode učinkovitije od konvencionalnih te su ukazali na to kako su MAE i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom efikasnije od ekstrakcije pri povišenom tlaku. Vranković (2022) kao nedostatke MAE navodi povišenu temperaturu koja može degradirati visokovrijedne spojeve, potrebu za uvođenjem raznih separacijskih operacija nakon same ekstrakcije te ovisnost operativnih uvjeta o specifičnim svojstvima uzorka.

2.2.3. Svojstva ekstrakta lista masline

Ekstrakt lista masline je tekućina koju karakterizira tamnosmeđa boja te gorak okus.

Posjeduje bogat sastav fenolnih spojeva (Dobrinčić i sur., 2020), koji su nositelji antioksidacijske aktivnosti, ali sadrži i druge fitokemikalije kao što su triterpeni (Borjan i sur., 2020) između kojih se ističu oleanolne i maslinske kiseline (EMA 2017). Vranković (2022) navodi kako sastav ekstrakta lista masline ovisi o faktorima kao što su sorta masline, područje i uvjeti uzgoja te metode i parametri ekstrakcije. Prema raznim istraživanjima, složeniji sustavi kao što su ekstrakti, pokazuju veću djelotvornost, nego izolirane komponente, pa tako ekstrakt lista masline pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na vitamin C i E, što je posljedica sinergijskog djelovanja flavonoida, oleuropeozida i fenola (Žuntar i sur., 2019; Sahin i Bilgin, 2017). Osim fenolnih spojeva, kao nosioci antioksidacijskih svojstava se u literaturi navode i triterpeni (Seçmeler i Galanakis, 2019; Talhaoui i sur., 2018).

Antioksidansi su kemijski spojevi koji imaju sposobnost sprječavanja ili usporavanja oštećenja stanica. To su svi spojevi koji mogu donirati elektrone i neutralizirati na taj način slobodne radikale. Slobodni radikali izuzetno su reaktivne molekule iz razloga jer imaju nespareni elektron te oštećuju i uzrokuju oksidaciju DNA, lipida i proteina. Antioksidansi se dijele na one koji mogu reagirati s lipidnim radikalom tvoreći stabilni produkt (fenoli, mineralne tvari, vitamini, flavonoidi) te na one koji mogu promijeniti funkciju slobodnog radikala što rezultira zaustavljanjem lančanih reakcija (propil galat). Antioksidansi se također mogu podijeliti na enzimске i ne enzimске, od kojih su mnogi dobiveni iz hrane, gdje su najpoznatiji predstavnici polifenoli od kojih se u ekstraktu lista masline ponajviše ističe već spomenuti oleuropein. Ukoliko neka namirnica ima visoki udio spojeva koji se svrstavaju u antioksidanse, kao što to ima ekstrakt lista masline, kaže se da ima veliku antioksidacijsku aktivnost.

2.2.4. Biološka aktivnost ekstrakta lista masline i mogućnosti primjene u obogaćivanju prehrambenih proizvoda

Za ekstrakt lista masline, uz antioksidacijsko djelovanje, dokazano je i antimikrobno, antihipertenzivno, hipoglikemijsko, antiseptičko, kardioprotektivno i antikancerogeno djelovanje (Sahin i Bilgin, 2017; El i Karakaya, 2009). Sukladno tome u posljednje vrijeme sve više raste interes za iskorištavanjem ekstrakta lista masline kao dodatka raznim prehrambenim proizvodima.

Han (2020) navodi kako se danas ekstrakt lista masline sve češće dodaje u razna ulja i masti kao zamjena za sintetičke antioksidanse koji mogu imati toksični učinak. Ta ulja dokazano pokazuju bolju oksidativnu stabilnost i antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ulja bez dodanog ekstrakta.

Cappelin i sur. (2024) proveli su istraživanje u kojem su promatrali utjecaj dodatka ekstrakta lista masline u svjetlo pivo na njegove nutritivne i fizikalno kemijske karakteristike. Dodatak ekstrakta rezultirao je povećanjem udjela bioaktivnih komponenti i antioksidativne aktivnosti. Uočeno je da su veće koncentracije ekstrakta narušile kvalitetu i stabilnost pjene.

Munekata i sur. (2020) istražili su utjecaj dodatka raznih biljnih ekstrakata u meso i mesne prerađevine te su zaključili kako je dodatak ekstrakta lista masline u pureća prsa rezultirao redukcijom lipidne oksidacije.

Lucić (2021) je u svom radu prezentirala trendove korištenja biljnih ekstrakata u hrani gdje je naglasila često korištenje ekstrakta lista masline u proizvodnji sireva zbog antioksidacijskog, antifugalnog i antibakterijskog djelovanja. Taj trend rezultirao je mnogim istraživanjima usmjerenim na proučavanje utjecaja dodatka lista masline u sireve i druge mliječne proizvode.

Zandona i sur. (2024) određivali su optimalnu fazu proizvodnje svježeg sira za dodatak ekstrakta lista masline te su s obzirom na odabrane faze proučavali utjecaj ekstrakta na svojstva dobivenog sir. Rezultati istraživanja ukazali su na to da je optimalnije dodati ekstrakt lista masline u mlijeko prije faze grušanja. Također, zabilježen je viši udio fenolnih spojeva u sirevima u koje je dodana veća koncentracija ekstrakta lista masline. Kod tih sireva zabilježene su značajnije promjene boje te porast udjela masnoće, zasićenih masnih kiselina, proteina i ukupne čvrste tvari kao posljedica formiranja polifenol-kazein kompleksa.

Vukelić (2023) je u svome radu proučavala učinke primjene jestivog premaza na bazi proteina sirutke obogaćenog ekstraktom lista masline na kvalitetu polutvrdog sira tijekom 60 dana zrenja te je zaključila kako je dodatak ekstrakta lista masline jestivom premazu uzrokovao povećanje koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i antioksidacijske aktivnosti. Također, određeno je i antibakterijsko djelovanje u sirevima s premazom obogaćenim ekstraktom lista masline.

Barukčić i sur. (2022) proučavali su učinak ekstrakta lista masline na reološka svojstva, fermentaciju, senzorska i antioksidativna svojstva jogurta od kravljeg mlijeka. Dodatak ekstrakta lista masline rezultirao je smanjenjem pH vrijednosti, izraženijom sinerezom, smanjenjem vremena fermentacije te povećanjem udjela fenola i antioksidativne aktivnosti. Razlika u boji uzoraka povećavala se sukladno povećanju koncentracije ekstrakta lista masline. Panelisti senzorske analize jogurte obogaćene ekstraktom lista masline opisali su kao kisele i gorke, s netipičnim biljnim okusom.

El Dessouky Abdel-Aziz i sur. (2020) istražili su potencijal vodenog ekstrakta lista smokve, lista masline i njihove mješavine kao prirodnog konzervansa za produljenje roka trajanja pasteriziranog bivoljeg mlijeka. Kod ekstrakta lista masline određen je veći udio polifenola i veća antioksidativna aktivnost.

S obzirom da rezultati mnogih istraživanja ukazuju na to da obogaćivanje raznih mliječnih proizvoda ekstraktom lista masline ima značajne prednosti, u eksperimentalnom dijelu ovog rada ispitan je utjecaj dodatka ekstrakta lista masline u proizvod kao što je svježi kravljji sir.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za pripremu ekstrakta lista masline korišteno je lišće masline sorte oblica prikupljeno s područja Zadra. Nakon sakupljanja, lišće masline je osušeno na zraku te je skladišteno na tamnom i suhom mjestu do uporabe.

U svrhu proizvodnje sireva korišteno je svježe nehomogenizirano pasterizirano mlijeko s 3,2% mliječne masti proizvođača Mini mljekara Veronika d.o.o.

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene za određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henkelu:

- 2 %-tni fenolftalein, $C_{20}H_{14}O_4$ (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kobaltov sulfat, $CoSO_4 \times 7 H_2O$ (Lach-Ner, Hrvatska)
- 0,1 M natrijev hidroksid, NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom

- Galna kiselina, $C_7H_6O_5$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Etanol (96 %-tni), C_2H_5OH (Gram-Mol, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens), (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, Na_2CO_3 , (20 %-tna otopina)

Priprema: U 800 mL vruće destilirane vode otopljeno je 200 g anhidrida natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te ohlađeno na sobnu temperaturu. Zatim je dodano nekoliko kristalića Na_2CO_3 nakon čega je odmjerna tikvica od 1 L nadopunjena do oznake. Tako pripremljena otopina je nakon 24 h profiltrirana.

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

- Kvercetin, $C_{15}H_{10}O_7$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Metanol, CH_3OH (Gram-Mol, Hrvatska)
- 10 %-tna (w/v) otopina aluminijskog klorida anhidrida, $AlCl_3$ (VWR, Belgija)

Priprema: Odgovarajuća količina $AlCl_3$ je otopljena u destiliranoj vodi.

- 1 M otopina kalijeva acetata, CH_3CO_2K (Kemika, Hrvatska)

Priprema: Na analitičkoj vagi je u plastičnoj lađici za vaganje odvagano 4,907 kalijevog acetata i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 50 mL pomoću lijevka i destilirane vode te je tikvica nadopunjena do oznake.

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

- 2 mM Trolox otopina, $C_{14}H_{18}O_4$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 37 %-tna klorovodična kiselina, HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- 40 mM klorovodična kiselina, HCl (Gram-Mol, Hrvatska)

Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano je 330 μ L 37 %-tne HCl te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), $C_{18}H_{12}N_6$ (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje je, na analitičkoj vagi, odvagano 0,0312 g TPTZ-a i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL te je do oznake nadopunjeno 40 mM klorovodičnom kiselinom

- 20 mM otopina željezo (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$

Priprema: Na analitičkoj vagi je odvagano 0,541 g željezo (III) klorida heksahidrata i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je zatim nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- Natrij-acetat trihidrat, $CH_3COOH \times 3 H_2O$ (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Ledena octena kiselina, CH_3COOH (100 % Merck, Darmstadt, Njemačka): pripremljeno razrjeđenje na koncentraciju 99 %
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: U plastičnu lađicu za vaganje odvagano je 3,1 g natrijeva-acetata trihidrata i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 1 L. U odmjernu tikvicu od 1 L je zatim otpipetirano 16 mL glacijalne octene kiseline te je tikvica nadopunjena do oznake destiliranom vodom.

- FRAP reagens

Priprema: FRAP reagens je pripremljen na način da je u staklenu čašu volumena 50 mL otpipetirano 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL željezo (III) klorida heksahidrata te 2,5 mL TPTZ reagensa u omjeru 10:1:1.

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

- 95 %-tni metanol, CH_3OH (KEFO, Hrvatska)
- $6,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} DPPH (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil, Sigma-Aldrich, Njemačka) otopljen u 95 %-tnom metanolu (KEFO, Hrvatska) – priprema se svježe.

Kemikalije korištene za mikrobiološku analizu:

- 0,9 %-tna fiziološka otopina, NaCl

Priprema: Na laboratorijskoj vagi odvagano je 9 g NaCl te kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom.

- 2 %-tna otopina natrijevog citrata, $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (GramMol, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: U plastičnu ladu za vaganje odvagano je 20 g natrijevog citrata koji je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 1 L te je ona nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija – Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje kvasaca i plijesni – Sabouraud Dextrose Agar CAF 50 (Biolife, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka – Baird Parker agar (Biolife, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja bakterija – Tryptic Glucose Yeast Agar (Biolife, Italija)

Kultura korištena za sirenje: Choozit® Probat 222 LYO 100 DCU (IFF Danisco, Njemačka) sadrži sojeve:

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

Lactococcus cremoris subsp. *cremoris*

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *Cremoris*

3.1.2. Aparatura

- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, SAD)
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (Ethos X, Milestone, Italija)
- Rotavapor (Heating Bath B-490, Büchi, Švicarska)
- Digitalni refraktometar (Atago PAL-3, 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)
- pH-metar (ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka)
- a_w -metar (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska)
- Termostat (Inkolab, Hrvatska)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka)
- Analitička vaga (AB104, Mettler Toledo, SAD)
- Tehnička vaga (KB 3600-2N, Kern, Njemačka)

- Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- FoodScan 2 Dairy (FOSS, Danska)

3.1.3. Pribor

- Filter papir S&S 597^{1/2}
- Mikropipeta Kartell volumena od 100 do 1000 μ L
- Odmjerne tikvice volumena 5, 10, 100, 500 i 1000 mL
- Erlenmeyerove tikvice od 100, 250, 300, 1000 i 2000 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
- Stalak za epruvete
- Kvarcne kivete
- Plastične lađice za vaganje
- Metalne žličice
- Metalne špatule
- Škare
- Tarionik s tučkom
- Bireta
- Staklene boce
- Štapić po Drigalskom
- Staklena zrnca
- Sterilne Petrijeve zdjelice
- Infuzijske boce
- Plamenik
- Porculanske zdjelice
- Eksikator
- Termometar
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapić

3.2. METODE RADA

3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline

Lišće masline prvotno je usitnjeno na sitne komadiće kao što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Usitnjen list masline (vlastita fotografija)

Na tehničkoj vagi izvagano je po 6 g tako usitnjenog lišća koje je potom kvantitativno preneseno u ekstrakcijske ćelije u koje je dodan po jedan magnet i 80 mL destilirane vode. Ćelije su zatvorene čepovima te postavljene u odgovarajuće okvire uređaja za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) koji sadrži 15 ekstrakcijskih ćelija. Zandona i sur. (2024) su u svojem istraživanju definirali parametre ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, prema kojima je ekstrakcija provedena na 80 °C i tlaku od 100 bara. Vrijeme potrebno da se postignu parametri ekstrakcije iznosilo je 7 minuta, sama ekstrakcija trajala je 4 minute te je hlađenje po završetku ekstrakcije trajalo 1 minutu.

Nakon ekstrakcije, provedena je klasična filtracija preko filter papira čime je ekstrakt izdvojen od ostataka biljnog materijala. Ekstrakt je potom uparavan na rotavaporu pri 45 °C i 85 okretaja u minuti (Vranković, 2022). Uparavanje je prekinuto kada je ekstrakt postigao 9,8 % suhe tvari što se provjerilo korištenjem digitalnog refraktometra. Kako bi se osigurala mikrobiološka ispravnost ekstrakta, provedena je pasterizacija na 90 °C u trajanju od 5 minuta. Koncentrirani ekstrakt skladišten je u zamrznutom stanju do upotrebe.

3.2.2. Proizvodnja svježeg kravljeg sira

Za proizvodnju sireva korišteno je 12 L svježeg nehomogeniziranog pasteriziranog mlijeka s 3,2 % mliječne masti proizvođača Mini mljekara Veronika d.o.o. Mlijeko je temperirano na sobnu temperaturu te je razdijeljeno na 3 posude tako da se u svakoj nalazilo po 4 L mlijeka. Zandona i sur. (2024) su u svome istraživanju definirali efektivne koncentracije ekstrakta lista masline koje inhibiraju 25, 50 i 75 % DPPH reagensa te ih sukladno označila sa EC25, EC50 i EC75. U svrhu provođenja ovog istraživanja proizvedene su tri vrste sira. Siru proizvedenom od 4 L mlijeka bez dodatka ekstrakta lista masline dodijeljena je oznaka K (kontrola). Siru proizvedenom od 4 L mlijeka kojemu je dodano 52,8 mL ekstrakta lista masline

dodijeljena je oznaka EC50, a siru proizvedenom od 4 L mlijeka kojemu je dodano 83,6 mL ekstrakta lista masline dodijeljena je oznaka EC75 što je sukladno efektivnim koncentracijama definiranim u istraživanju koje je provela Zandona i sur. (2024). Nakon dodavanja ekstrakata, u svaku posudu dodano je i po 0,06 g kulture za sirenje (Probat 222LYO 100 DCU). Posude sa uzorcima su potom stavljene na sirenje koje se provodilo 17 h na 28 °C. Po završetku sirenja gruše se u posudama izrezao na kockice te se zagrijavao 4 sata na 55 °C što je rezultiralo izdvajanjem sirutke. Dobiveni sir prebačen je u kalupe za ocjeđivanje te se cijedio narednih 24 sata (slika 4). Nakon što su se sirevi ocijedili i formirali željenu teksturu i oblik, u sterilnim uvjetima su zapakirani u polimerne vrećice koje su potom hermetički zatvorene. Tako zapakirani sirevi su skladišteni u hladnjaku na 4 °C.



Slika 4. Cijedenje sireva u kalupima (*vlastita fotografija*)

3.2.3. Određivanje prinosa sira

Nakon vađenja iz kalupa sirevi su izvagani na tehničkoj vagi. Prinos sireva predstavlja količinu sira dobivenu od određene količine mlijeka, a izračunat je prema izrazu (Tratnik i Božanić, 2012):

$$\text{Prinos sira (\%)} = \frac{m(\text{sir})}{m(\text{mlijeko}) \text{ ili } V(\text{mlijeko})} \times 100 \quad [1]$$

3.2.4. Određivanje aktiviteta vode sira

Aktivitet vode sireva određen je pomoću laboratorijskog a_w -metra (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska). Posudica je napunjena usitnjenim uzorkom sira, postavljena u uređaj te se mjerenje započelo pritiskom gumba. Završetak mjerenja signaliziran je zvučnim signalom a vrijednost aktiviteta vode je očitana s ekrana uređaja.

3.2.5. Određivanje pH vrijednosti sira

pH vrijednost sireva određena je korištenjem pH-metra (ProfiLine pH 3110, Xylem

Analytics, Njemačka). Uzorci su pripremljeni tako da se na tehničkoj vagi izvagalo 3 g sira koji je potom usitnjen u tarioniku i pomiješan s 30 mL prokuhane i ohlađene destilirane vode. Elektroda pH-metra je uronjena u pripremljenu suspenziju te se pH vrijednost očitala s ekrana uređaja nakon što se njen iznos stabilizirao (Božanić i sur., 2010).

3.2.6. Određivanje titracijske kiselosti sira po Soxhlet-Henkel-u

Kako bi se odredila titracijska kiselost sira po Soxhlet-Henkel-u, u dvije Erlenmeyerove tikvice odvagano je po 5 g sira koji je prethodno usitnjen i otopljen u taironiku uz dodatak manje količine destilirane vode zagrijane na 50 °C. Erlenmeyerove tikvice su potom nadopunjene destiliranom vodom od 50 °C tako da je ukupna količina suspenzije u tikvicama iznosila 100 mL. U prvu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirano je 1 mL otopine kobaltovog sulfata te je ta otopina korištena kao standard na čiju se boju referiralo tijekom titriranja. U drugu Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 1 mL 2 %-tnog fenolftaleina te se titriralo sa 0,1 M NaOH do pojave blijedo crvene boje identične boji u tikvici sa standardom (Božanić i sur., 2010).

Kiselost sira računata je prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 8 \times f \quad [2]$$

gdje je a = mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju

f = faktor otopine NaOH

8 = razrjeđenje

3.2.7. Određivanje indeksa boje sira

Indeks boje sireva određen je CIELAB metodom pomoću kolorimetra kojim su izmjereni parametri L^* , a^* , b^* (Lancaster i sur., 1997). Cilj ove analize bio je ustvrditi postoji li razlika u boji između sireva s dodatkom ekstrakta lista masline i kontrolnog sira. Dobivene vrijednosti parametara L^* , a^* , b^* odnose na sireve s dodatkom ekstrakta, a parametri L_{ref}^* , a_{ref}^* i b_{ref}^* se odnose na kontrolni sir. Na temelju vrijednosti tih parametara izračunata je ukupna promjena boje, izražena kao vrijednost ΔE^* , prema niže navedenoj formuli. Tablicom 1 prikazan je utjecaj razlike izmjerenih parametara na percepciju kod promatrača.

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{\text{ref}}^*)^2 + (a^* - a_{\text{ref}}^*)^2 + (b^* - b_{\text{ref}}^*)^2} \quad [3]$$

Gdje je:

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 1. Percepcija boje kod promatrača opisana pomoću vrijednosti ΔE^* prema modelu Mokrzycki i Tatol (2011).

ΔE^*	Percepcija 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

3.2.8. Određivanje teksture sira

Određivanje teksture sira provedeno je korištenjem teksturometra. Uzorak sira prebačen je u laboratorijsku čašu od 50 mL koja je potom postavljena na sredinu postolja teksturometra i podvrgnuti kompresiji dva puta do 50 % deformacije ćelijom mase 50 kg. Kompresija se provodila brzinom 1 m s^{-1} s razmakom od 5 sekundi između dva ciklusa što se definiralo pomoću računala. Rezultati su zabilježeni u računalu a za njihovu obradu korišten je softver NexygenPlus.

3.2.9. Određivanje kemijskog sastava sira

Kemijski sastav sireva određen je pomoću FoodScan™ 2 Lab uređaja s FOSS ANN kalibracijom za mliječne proizvode (FOSS Analytical A/S) pri čemu su određivani udjeli mliječne masti, zasićenih masnih kiselina, mliječne masti u suhoj tvari, proteina, soli, vlage i ukupne suhe tvari. Uređaj provodi analizu korištenjem NIR (eng. *near infrared*) zračenja valne duljine u području od 850 do 1100 nm. Mjerenje se provelo tako da se uključilo računalo i uređaj te se pokrenula Food Scan 2 aplikacija. Prvo se provela slijepa proba tako da se u kućište uređaja stavio uzorak izrađen od bijele delrin plastike i pokrenula aplikacija na računalu. Potom je bilo potrebno kalibrirati uređaj prema uputama proizvođača ovisno o ispitivanom uzorku, a nakon toga se provela analiza uzorka. Mjerenja su provedena na 15 g usitnjenog sira u plastičnoj Petrijevoj posudi promjer 90 mm.

3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je primjenom spektrofotometrijske metode 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). Analiza je provedena na koncentriranom ekstraktu lista masline te na supernatantima uzoraka sireva. Koncentrirani ekstrakt lista masline bilo je potrebno razrijediti 50 puta destiliranom vodom kako bi se dobio rezultat apsorbancije u rangu prihvatljivosti, odnosno vrijednost između 0 i 1.

Supernatanti su pripremljeni na način da se uzorak sira mase 20 g homogenizirao s 20 mL destilirane vode 2 minute. Homogenizirani uzorak je potom 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).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom je otpipetirano 0,1 mL 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 homogenizirano pomoću Vortexa, a potom su uzorci stavljeni u vodenu kupelj na termostatisiranje 25 min pri temperaturi 50 °C. Po završetku termostatisiranja 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:

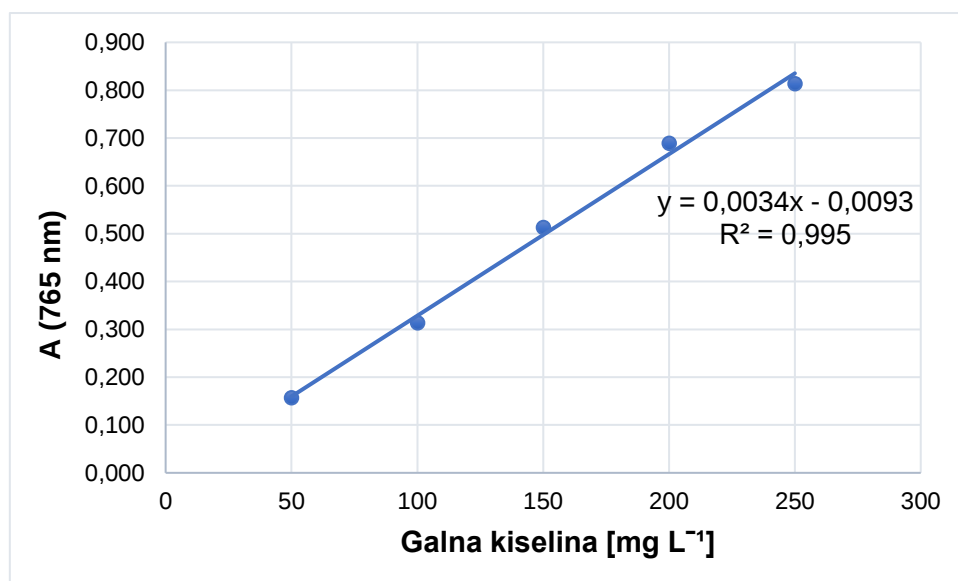
Kako bi se izradio baždarni pravac prvo je izvagano 0,5 g galne kiseline na analitičkoj vagi. Galna kiselina je otopljena u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL, a potom je tikvica do oznake napunjena destiliranom vodom.

Od pripremljenog standarda galne kiseline pripremljena su razrjeđenja s destiliranom vodom u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da su u dobivene otopine koncentracije 50, 100, 150, 200 i 250 mg L⁻¹. Daljnji postupak pripreme reakcijskih smjesa i očitavanja apsorbancije jednak je kao i za prethodno opisane uzorke.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (tablica 2) dobiven je baždarni pravac (slika 5) pomoću Microsoft Excel programa.

Tablica 2. Apsorbancija pri 765 nm u ovisnosti o koncentraciji galne kiseline

Galna kiselina (mg L⁻¹)	A (765)
50	0,157
100	0,314
150	0,513
200	0,689
250	0,814



Slika 5. Baždarni pravac za galnu kiselinu.

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0034X - 0,0093 \quad [4]$$

gdje je:

Y- apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima sireva i ekstraktu lista masline koji nisu razrjeđivani izračunata je prema dobivenoj jednadžbi pravca, a ukoliko su uzorci bili razrjeđivani koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema formuli:

$$X \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = X' \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} * \text{razrjeđenje} \quad [5]$$

gdje je:

X- koncentracija ukupnih fenola u uzorku

X' – (Y+0,0093)/0,0034 (iz jednadžbe pravca)

3.2.11. Određivanje koncentracije ukupnih flavanoida

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

Uzorak ekstrakta lista masline je priređen tako da je razrijeđen destiliranom vodom 50 puta, a supernatanti sireva dobiveni su postupkom koji opisan u poglavlju 3.2.10.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom je otpipetirano 1 mL uzorka, 0,2 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 , 0,2 mL 1 M otopine kalijevog acetata i 5,6 mL destilirane vode. Sadržaj epruveta je potom homogeniziran pomoću Vortexa i inkubiran na sobnoj temperaturi 30 min, a potom je očitana apsorbancija pri 415 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način, samo je umjesto uzorka dodana destilirana voda u istoj količini.

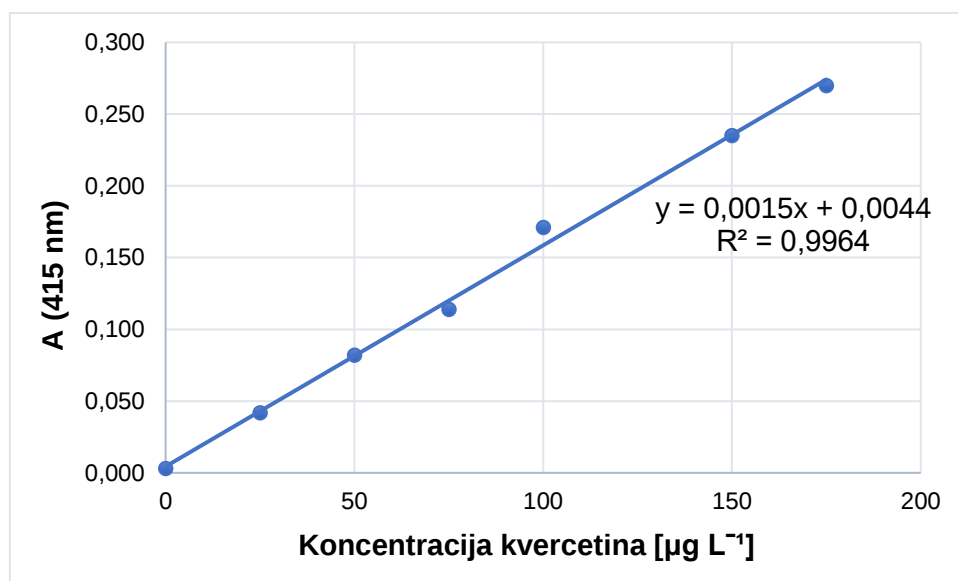
Izrada baždarnog pravca:

U svrhu izrade 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 pripremljena razrjeđenja s metanolom u koncentracijama 0, 25, 50, 75, 100, 150 i 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 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.

Tablica 3 prikazuje koncentracije kvercetina s izmjerenim vrijednostima apsorbancije. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopine kvercetina izrađen je baždarni pravac (slika 6) pomoću računalnog programa (Microsoft Office Exce).

Tablica 3. Apsorbancija pri 415 nm u ovisnosti o koncentraciji kvercetina

Kvercetin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	A(415)
0	0,003
25	0,042
50	0,082
75	0,114
100	0,171
150	0,235
175	0,270



Slika 6. Baždarni pravac za kvercetin.

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0015X + 0,0044 \quad [6]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 415 nm

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

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

Koncentracija ukupnih flavonoida u razrjeđivanim uzorcima izračunata je prema formuli:

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

gdje je:

X- koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku

X' – $(Y - 0,0044) / 0,0015$ (iz jednadžbe pravca)

3.2.12. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline i sireva primijenjena je FRAP metoda koja se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojen produkt koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorci sira pripremljeni su istim postupkom

kao i za prethodne dvije metode, dok je ekstrakt lista masline bilo potrebno razrijediti destiliranom vodom 150 puta.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 240 μL destilirane vode, 80 μL prethodno pripremljenog uzorka i 2080 μL pripremljenog FRAP reagensa. Sve skupa je dobro homogenizirano pomoću Vortexa, a potom stavljeno 5 min na termostatiranje u vodenu kupelj na 37 °C. Nakon termostatiranja izmjerena je apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali je umjesto uzorka dodana destilirana voda u istoj količini.

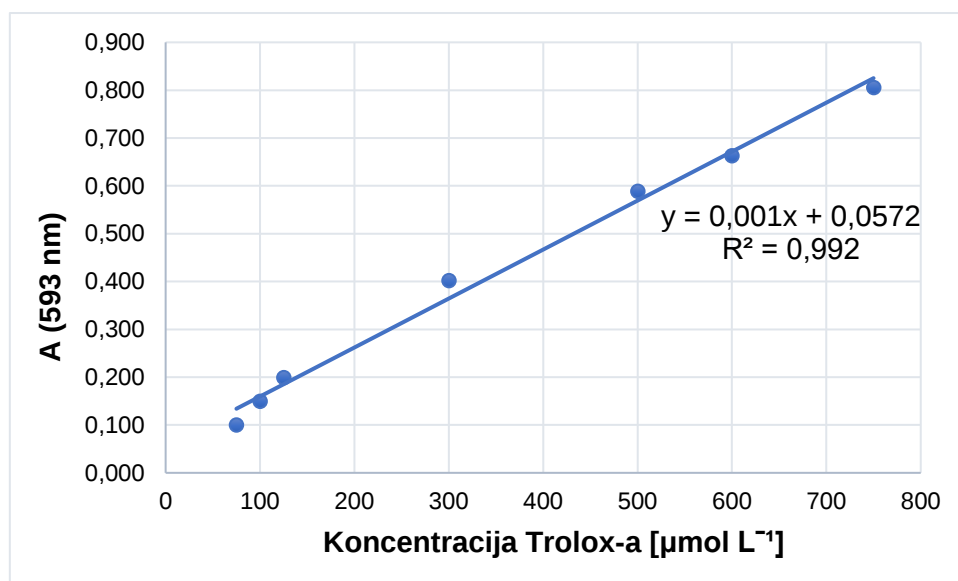
Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca pripremljena je 2 mmol L⁻¹ otopina Trolox-a od koje su potom pripremljeni razrjeđenja u koncentracijama 75, 100, 125, 300, 500, 600 i 750 μM . Daljnji postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti pripremljenih razrjeđenja proveden je po prethodno opisanom postupku.

Tablica 4 prikazuje koncentracije Trolox-a s izmjerenim vrijednostima apsorbancije. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopine Trolox-a izrađen je baždarni pravac (slika 7) pomoću računalnog programa (Microsoft Office Excel).

Tablica 4. Apsorbancija pri 593 nm u ovisnosti o koncentraciji Trolox-a

Trolox ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	A(593)
75	0,100
100	0,150
125	0,199
300	0,402
500	0,589
600	0,663
750	0,806



Slika 7. Baždarni pravac za Trolox.

Dobivena jednačba pravca glasi:

$$Y = 0,001X + 0,0572 \quad [8]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

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

Antioksidacijska aktivnost u uzorcima ekstrakta lista masline i sireva koji nisu razrjeđivani izračunat je prema dobivenoj jednačbi pravca, a ukoliko su uzorci bili razrjeđivani antioksidacijska aktivnost izračunat je prema formuli:

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

gdje je:

X – antioksidacijska aktivnost uzorka

X' – $(Y - 0,0572) / 0,001$ (iz jednačbe pravca)

3.2.13. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda je spektrofotometrijska metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na sposobnosti uklanjanja radikala antioksidansom DPPH koji donira jedan vodik dušiku s jednim nesparenim elektronom odgovarajućeg hidrazina. DPPH ne dimerizira kao ostali slobodni radikali već je stabilan radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule. Upravo ta delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 520 nm u otopini etanola (Pregiban, 2017).

Uzorak ekstrakta lista masline priređen je tako da je razrijeđen destiliranom vodom 150 puta, a uzorci sireva tako da se supernatanti, koji su priređeni na već opisan način u poglavlju 3.2.10., razrijeđeni 15 puta destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom je otpipetirano 800 µL DPPH reagensa (0.1 mM DPPH pripremljen u 95% metanolu) i 200 µL uzorka, uzorci su zatim homogenizirani na vortexu i stavljani na inkubaciju 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami. Slijepa proba pripremljena je na isti način osim dodavanja uzorka - umjesto njega dodan je metanol u istoj količini. Po isteku vremena inkubacije, izmjerena je apsorbancija uzoraka na valnoj duljini od 517 nm.

Sposobnost redukcije radikala izračunata je prema jednadžbi:

$$\% \text{ DPPH redukcije radikala} = \frac{\text{Asp}-\text{Au}}{\text{Asp}} \times 100 \quad [10]$$

gdje je:

Asp – apsorbancija slijepe probe

Au – apsorbancija uzorka (Sangsopha i sur., 2019)

Dobivene vrijednosti za uzorke sireva potom su pomnožene s 15 zbog toga što su bili razrijeđeni 15 puta, a vrijednost dobivena za ekstrakt lista masline pomnožena je s 150 također zbog razrjeđenja uzorka.

3.2.14. Mikrobiološke analize mlijeka i sireva

U svrhu izrade ovog rada provedene su i mikrobiološke analize svježih sireva. U svim uzorcima sireva određivao se broj kvasaca i plijesni (KIP), broj enterobakterija (E), ukupan broj bakterija (UB) te broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (S). Mikrobiološka analiza sireva provodila se 1., 7., 14., 21. i 28. dan skladištenja u plastičnim vrećicama na 4 °C u hladnjaku. Mikrobiološke analize provedene su direktnom metodom naciepljivanja decimalnih razrjeđenja na hranjive podloge te inkubacijom na temperaturama pogodnim za rast analiziranih mikroorganizama (Božanić i sur., 2010). Kao referentne vrijednosti za ukupan broj bakterija, kvasaca i plijesni te enterobakterija korišteni su kriteriji nacionalnog Vodiča (2011), dok su za koagulaza pozitivne stafilokoke korištene vrijednosti definirane Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) s pripadajućom Uredbom 2073/2005.

Priprema uzorka sira:

Na tehničkoj laboratorijskoj vagi odvagano je 10 g sira koji je potom usitnjen u tarioniku uz postupno dodavanje 90 mL 2 %-tne otopine natrijevog citrata koji je prethodno zagrijan na oko 45 °C. Sadržaj tarionika kvantitativno je prenesen u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima i prije pipetiranja, te pripreme decimalnih razrjeđenja, sadržaj se dobro homogenizirao.

Priprema fiziološke otopine:

Odvagano je 9 g natrijevog klorida (NaCl) i otopljeno u 1000 mL destilirane vode. Zatim

je po 9 mL pripremljene fiziološke otopine razdijeljeno u staklene epruvete koje su se potom začepile te autoklavirale na 121 °C 15 minuta.

Priprema 2 %-tne otopine natrijevog citrata:

Odvagano je 20 g soli i pripremljeno 1000 mL destilirane vode. Destilirana voda se zagrijala na 45 – 50 °C i nakon toga se u nju dodalo 20 g soli. Tako pripremljena otopina prelivena je u boce po 180 mL te autoklavirana na 121 °C 15 minuta.

Priprema decimalnih razrjeđenja:

Iz prethodno pripremljenog homogeniziranog uzorka se sterilnom pipetom otpipetiralo 1 mL uzorka u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine te se nastalo razrjeđenje dobro homogeniziralo na vortexu. Potom se 1 mL homogeniziranog razrjeđenja sterilnom pipetom prenjelo u 9 mL fiziološke otopine te se sadržaj dobro homogenizirao na vortexu. Opisani postupak se ponavljao dok se nije dobio željeni broj decimalnih razrjeđenja.

Priprema hranjivih podloga:

Definirana količina hranjive podloge, koja je navedena od strane proizvođača, je odvagana i prenesena u Erlenmeyerovu tikvicu. Erlenmeyerova tikvica se zagrijavala na električnom grijaču s magnetskom miješalicom tako da se sav sadržaj tikvice miješao i u konačnici otopio. Dobivena hranjiva podloga (za određivanje ukupnog broja bakterija i broja kvasci i plijesni) se kvantitativno prenijela u infuzijske boce koje su se potom zatvorile i sterilizirale u autoklavu na 121 °C 15 minuta. Dobivena hranjiva podloga za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka se sterilizirala u autoklavu na 121 °C 15 minuta, nakon toga se dodao *egg yolk*, sve se pomiješalo te se nakon toga razlilo u sterilne Petrijeve zdjelice u kojima se na hladnom mjestu čuvala do upotrebe. Hranjiva podloga za enterobakterije se pripremala na način kao i one za određivanje ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni.

Nacijepljivanje i inkubacija ploča:

Kako bi se odredio broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorku sira, mikropipetom se otpipetiralo 100 µL homogeniziranog decimalnog razrjeđenja na čvrstu hranjivu podlogu. Uzorak se jednoliko razmazao po cijeloj podlozi pomoću štapića po Drigalskom koji je prije toga umočen u etanol te spaljen na plameniku. Nacijepljene ploče su okrenute naopako te inkubirane. Nacijepljene ploče za enterobakterije se se inkubirale 24 h na temperaturi 37 °C, a nacijepljene ploče za koagulaza pozitivne stafilokoke su se inkubirale 48 h na temperaturi od 32 °C.

Za određivanje ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni, mikropipetom se izuzelo 1 mL prethodno homogeniziranog decimalnog razrjeđenja te ispustilo u sterilnu

Petrijevu zdjelicu. Nakon pipetiranja svih razrjeđenja u sterilne Petrijeve zdjelice, u svaku se dodalo 10-12 mL hranjive podloge koja je prethodno rastopljena na temperaturi višoj od 100 °C te ohlađena u vodenoj kupelji na 45 °C. Nakon izlivanja hranjive podloge, sadržaj ploče se homogenizirao blagim kružnim pokretima te se pričekalo 10 do 15 minuta da se podloga potpuno skrutne. Ploče su zatim okrenute naopako te inkubirane tako da su nacijepljene ploče za ukupan broj bakterija inkubirane na 32 °C 48 h, a nacijepljene ploče za broj kvasaca i plijesni na sobnoj temperaturi 72 h.

Očitavanje rezultata:

Narastle kolonije izbrojane su na brojaču kolonija. U slučaju kada da su kolonije bile presitne, brojale su se pod određenim povećanjem. Za brojanje su odabrane ploče na kojima je naraslo između 30 i 300 kolonija. Broj kolonija se zatim pomnožio s decimalnim razrjeđenjem te se na taj način odredio broj mikroorganizama u 1 mL uzorka.

Interpretacija rezultata:

Kriteriji za praćenje mikrobiološke kvalitete sira preuzeti su za enterobakterije i kvasce i plijesni iz Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2009), a za koagulaza pozitivne stafilokoke iz Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) i pripadajuće Uredbe 2073/2005. Navedeni kriteriji su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Kriteriji za praćenje mikrobiološke kvalitete sireva (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2009. Uredba 2073/2005*).

PARAMETAR	KRITERIJI (Maksimalno dopuštena vrijednost)
Kvasci i plijesni	10^3 CFU g ⁻¹
Koagulaza pozitivni stafilokoki* (<i>Staphylococcus aureus</i>)	10^2 CFU g ⁻¹
Enterobakterije	10^2 CFU g ⁻¹
Ukupan broj bakterija	10^3 CFU g ⁻¹

3.2.15. Senzorska analiza pomoću testa prihvatljivosti

Prije plasiranja novog prehrambenog proizvoda na tržište, vrlo je važno procijeniti prihvatljivost tog proizvoda među potrošačima. Iz tog razloga provodi se ocjena prihvatljivosti potrošača, koja uključuje veliku skupinu ispitanika koji predstavljaju potencijalne potrošače i koji pripadaju ciljnoj skupini kojoj je proizvod namijenjen. Za ocjenjivanje sireva korištena je hedonistička skala prema Peryamu, koja se sastoji od devet mogućih odgovora, jednostavna

je i pruža velike mogućnosti za statističku obradu rezultata (Tratnik i Božanić, 2012).

Hedonistička skala prema Peryamu:

- naročito visoko poželjan (9)
- visoko poželjan (8)
- osrednje poželjan (7)
- neznatno poželjan (6)
- neutralan (5)
- neznatno nepoželjan (4)
- osrednje nepoželjan (3)
- visoko nepoželjan (2)
- naročito visoko nepoželjan (1)

Iz dobivenih rezultata senzorske analize hedonističkom skalom, izračunati su statistički parametri: aritmetička sredina, standardna devijacija, koeficijent varijabilnosti i poželjnost, prema sljedećim formulama:

Aritmetička sredina (A):

$$A = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{n} \quad [11]$$

gdje je $x_1 + x_2 + \dots + x_i$ brojevni niz podataka, n ukupan broj ispitanika za svaki uzorak.

Standardna devijacija (s):

$$s = \sqrt{s^2} \quad [12]$$

pri čemu je s^2 :

$$s^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - A)^2 \quad [13]$$

gdje je n ukupan broj ispitanika za svaki uzorak, A aritmetička sredina, $x_1, \dots, x_n$ brojevni niz podataka.

Koeficijent varijabilnosti (c_v):

$$c_v = \frac{s}{A} \cdot 100 (\%) \quad [14]$$

gdje je s standardna devijacija, A aritmetička sredina.

Postotak nepoželjnosti (N):

$$N = \frac{I}{Y} \cdot 100 \quad [15]$$

gdje je I broj ispitanika koji su uzorku dali ocjenu nižu od pet, Y ukupan broj ispitanika.

Postotak poželjnosti (P):

$$P = 100 - N \quad [16]$$

gdje je N postotak nepoželjnosti.

Kako bi se uzorak okarakterizirao kao prihvatljiv mora biti ocijenjen minimalno s ocjenom 7 (Božanić i sur., 2001; Vahčić i sur., 1993).

3.2.16. Obrada podataka

Rezultati mjerenja dobiveni u ovom radu izraženi su kao prosječne vrijednosti tri mjerenja uz standardnu devijaciju pomoću programa Microsoft Office Excel 365®. Provedena je analiza varijance (One-Way ANOVA) i Duncanov test rezultata dobivenih senzorskom analizom prihvatljivosti kod potrošača.

4. REZULTATI I RASPRAVA

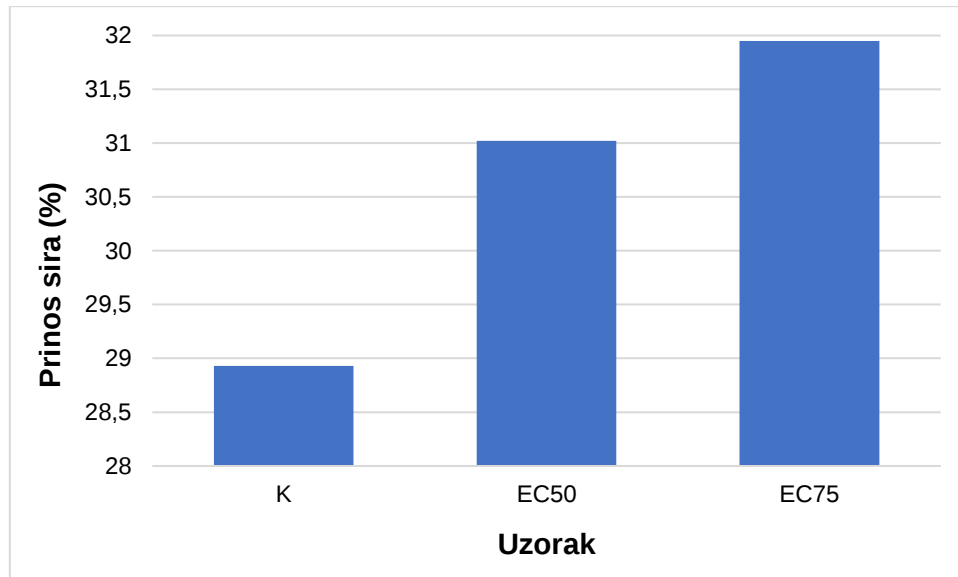
Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na kvalitetu svježeg kravljeg sira skladištenog na 4 °C tijekom 28 dana.

Svim proizvedenim uzorcima određen je aktivitet vode (slika 9), pH i titracijska kiselost (slika 10), indeks boje (tablica 6, slika 11), tekstura (tablica 7), kemijski sastav (slike 12–15), koncentracija ukupnih fenola (slika 16), koncentracija ukupnih flavonoida (slika 17), antioksidacijska aktivnost (slika 18, slika 19) te su provedene mikrobiološke analize (tablica 8, tablica 9) u periodu 1., 7., 14., 21. i 28. dan skladištenja. Prinos sira (slika 8) određen je 1. dan nakon proizvodnje, a senzorska analiza (tablica 10, tablica 11) 3. dan nakon proizvodnje sireva.

4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH MJERENJA

4.1.1. Prinos sira

Prinos sireva proizvedenih iz kravljeg mlijeka najčešće se kreće u rasponu od 15 do 16 %. Varijacije u prinosu sira posljedica su varijacija samog sastava sira, odnosno udjela komponenti kao što su proteini, mast i voda (Hayaloglu, 2017). Prinos sireva proizvedenih u sklopu izrade ovog rada prikazan je slikom 8.



Slika 8. Prinos sira (%) bez dodatka ekstrakta lista masline K te sireva s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75. Ekstrakt lista masline dodavan je u 2 različite koncentracije određene DPPH metodom kao efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa.

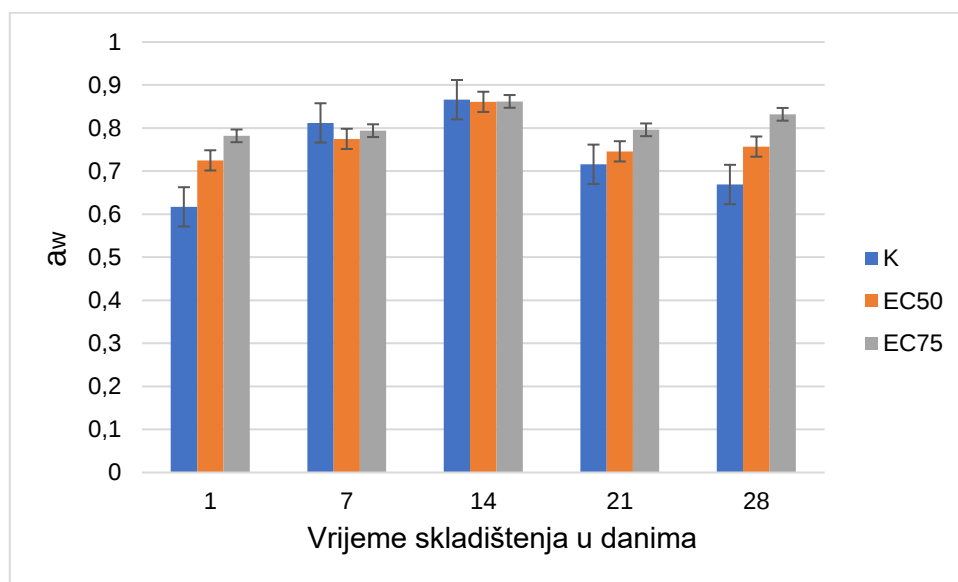
Prinosi sireva proizvedenih u sklopu ovog rada kreću se u rasponu od 28,93 do 31,95 % na temelju čega se može zaključiti kako dodatak ekstrakta lista masline nije značajnije utjecao na prinos sireva. Do istog zaključka došli su Zandona i sur. (2024) u svom istraživanju

na svježem siru te Barukčić i sur. (2022) u istraživanju provedenom na jogurtu od kravljeg mlijeka.

U istraživanju iz 2020b koje su proveli Barukčić i sur. ispitan je utjecaj različitih selektiranih starter kultura na svojstva i trajnost svježeg sira te je u njemu zabilježen prinos sireva u rasponu od 26 do 29 % što se podudara s rasponom dobivenom u ovom radu. U diplomskom radu Hrvatinić (2018) prinos svježih sireva s dodatkom ekstrakta majčine dušice varirao je u rasponu od 19,7 do 22,5 %, a slične vrijednosti također su dobivene u diplomskom radu Lovrić (2018) gdje se prinos svježih sireva s dodatkom ekstrakta majčine dušice kretao u rasponu od 19,7 do 21,9 % što su nešto niži rasponi u odnosu na raspon prinosa dobiven u ovom radu. Viši prinosi sireva od onih pronađenih u literaturi mogu biti rezultat provođenja pasterizacije mlijeka uslijed koje je došlo do interakcija između denaturiranih proteina sirutke i κ -kazeina (Marasović, 2017).

4.1.2. Aktivitet vode

Aktivitet vode definira se kao omjer tlaka vodene pare iznad površine sira i vodene pare prisutne u siru na istoj temperaturi (Havranek i sur., 2014). To jedan je od značajnijih parametara kvalitete u prehrambenoj industriji jer uvelike utječe na mikrobiološku kvalitetu te enzimsku aktivnost u gotovim proizvodima (Kaya i Öner, 1996). Na slici 9 prikazana je ovisnost vrijednosti aktiviteta vode o vremenu skladištenja uzoraka sira.



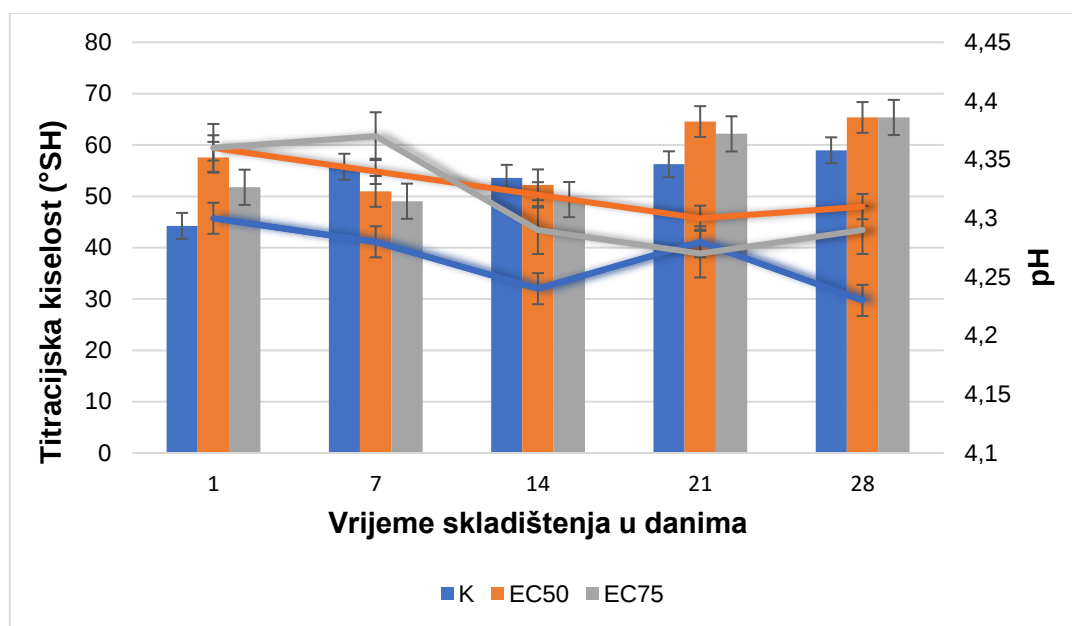
Slika 9. Ovisnosti vrijednosti aktiviteta vode (a_w) o trajanju skladištenja za kontrolni sir K i uzorke s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75.

Tijekom skladištenja kroz 28 dana vrijednosti aktiviteta vode (a_w) bile su stabilne za sve sireve i kretale su se od 0,62 do 0,89. Rezultat su u skladu s onima koje su dobili Zandona i sur. (2024) te Kaya i Öner (1996). Aktivitet vode usko je povezan s udjelom vode u siru koji

uvelike ovisi o koracima proizvodnje kao što su soljenje, cijedenje i vrijeme skladištenja. S obzirom da su sirevi proizvedeni bez dodatka soli i da su cijedeni pod vlastitom težinom, u njima je zaostao veliki udio vode što je rezultiralo stabilnim i visokim vrijednostima aktiviteta vode u svim sirevima tijekom skladištenja.

4.1.3. pH vrijednost i titracijska kiselost sira

U sirarstvu pH vrijednost mlijeka je značajan parametar koji utječe na aktivnost enzima i količinu prisutnih Ca^{2+} iona, a obično se kreće oko 6,7. Izmjerena pH vrijednost mlijeka korištenog za proizvodnju sireva u ovom istraživanju iznosila je 6,48. Bagheripoor i sur. (2018) navode kako su pH i kiselost ključni parametri za karakteristike gotovog proizvoda, odnosno sira, jer uvelike utječu na okus proizvoda ali i inhibiranje rasta mnogih mikroorganizama što posljedično utječe na trajnost sira. Na slici 10 prikazana je ovisnost titracijske kiselosti i pH vrijednosti sireva o vremenu skladištenja.



Slika 10. Prikaz ovisnosti titracijske kiselosti (stupci) i pH vrijednosti (linije) kontrolnog sira K i sireva s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 o vremenu skladištenja.

pH vrijednosti sireva tijekom skladištenja kretale su se u rasponu od 4,23 do 4,37 što je sukladno rezultatima istraživanja koje su proveli Barukčić i sur. (2020a) gdje je zabilježen raspon pH vrijednosti svježih sireva od 4,32 do 4,54. Kontrolni sir K imao je niže pH vrijednosti u odnosu na sireve EC50 i EC75 što može biti posljedica raspada fenolnih spojeva u sirevima EC50 i EC75 kod kojih je bila povećana koncentracija tih spojeva zbog dodatka ekstrakta lista masline. Zandona i sur. (2024) također su zabilježili viši pH u sirevima koje su proizveli iz mlijeka u koje je dodan ekstrakt lista masline. Titracijska kiselost kretala se u rasponu od 44,24 do 65,36 °SH što se podudara s rezultatima istraživanja koje je provela Hrvatin (2018) na

svježem siru a koji su iznosili 49,60 do 65,10 °SH. Kao što je prikazano na slici 10, u svim sirevima je tijekom skladištenja došlo do pada pH vrijednosti koji je bio popraćen porastom titracijske kiseline. Pad pH vrijednosti tijekom skladištenja može biti rezultat povećanja koncentracije mliječne kiseline koja nastaje tijekom fermentacije, ali i formiranja ugljične kiseline koja nastaje otapanjem CO₂ u kiselom mediju. Babić (2009) navodi kako su visoke vrijednosti titracijske kiseline često rezultat većeg udjela proteina, fosfata i kalcija u mlijeku. Sant'Ana i sur. (2013) u svom istraživanju pratili su nutritivne i senzorske karakteristike svježih sireva proizvedenih od kozjeg i kravljeg mlijeka te su također zabilježili pad pH vrijednosti i usporedni rast titracijske kiseline tijekom skladištenja svježih sireva.

4.1.4. Indeks boje sira

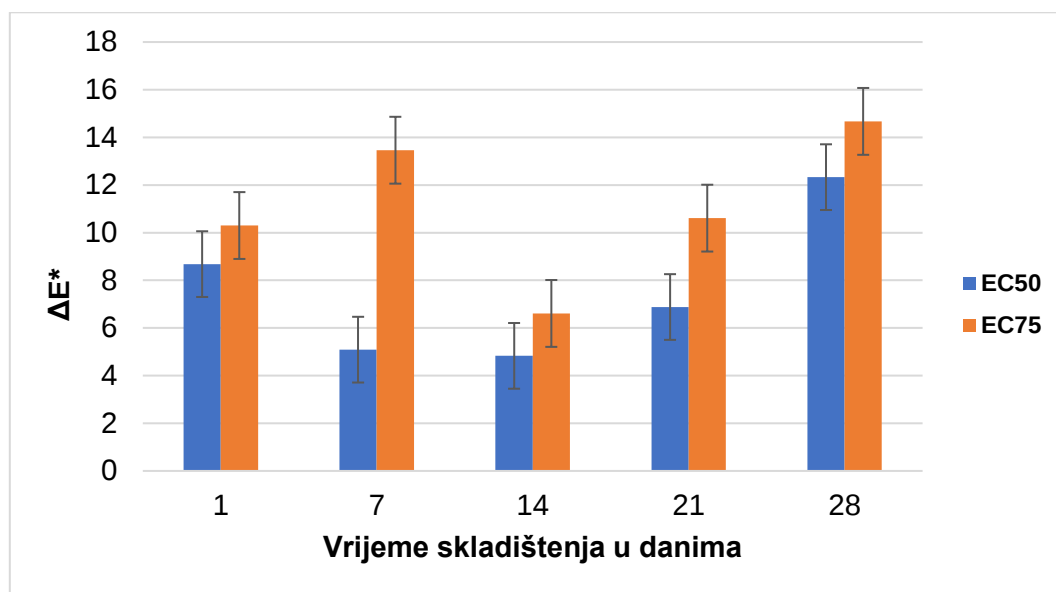
L*, a* i b* su parametri pomoću kojih se boja izražava u trodimenzionalnom sustavu. L* vrijednost označava svjetlinu uzorka, a skala se kreće od 0 (crna boja) do 100 (bijela boja). Vrijednosti parametra a* kreću se u rasponu od -100 (zelena boja) do +100 (crvena boja). Vrijednosti parametra b* također se kreću u rasponu od -100 (plava boja) do +100 (žuta boja) (Lancaster i sur., 1997). Tablicom 6 prikazani su parametri L*, a* i b* određen za uzorke sireva K, EC50 i EC75 tijekom skladištenja.

Tablica 6. L*, a* i b* vrijednosti za kontrolni sir K i sireve s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom skladištenja kroz 28 dana.

VRIJEME SKLADIŠTENJA	UZORAK	L*	a*	b*
1. DAN	K	88,61	-1,82	9,56
	EC50	80,05	-0,45	9,08
	EC75	78,41	-0,43	9,93
7. DAN	K	86,18	-1,59	8,84
	EC50	81,3	-0,79	10,06
	EC75	72,79	-0,77	9,96
14. DAN	K	84,96	-1,72	10,01
	EC50	80,25	-1,03	10,82
	EC75	78,82	-0,55	12,17
21. DAN	K	88,36	-1,71	10,51
	EC50	81,49	-1,35	10,28
	EC75	77,79	-1,01	9,97
28. DAN	K	95,53	-2,16	9,06
	EC50	83,39	-1,65	11,16
	EC75	81,01	-1,24	10,96

Prema dobivenim rezultatima kontrolni sir K je svjetliji od uzoraka EC50 i EC75 što je

bilo i za očekivati s obzirom da je u uzorke EC50 i EC75 dodan ekstrakt lista masline. Također, sir EC75 je tamniji od sira EC50 s obzirom da je u njega dodana veća količina ekstrakta lista masline. Promatrajući a^* i b^* parametre vidljivo je da u svim sirevima prevladavaju zelene i žute nijanse. Dobiveni rezultati iskorišteni su za izračun parametra ΔE^* (razlika u boji) pomoću kojeg se može opisati percepcija promatrača. Ovisnost izračunatih vrijednosti ΔE^* parametar o vremenu skladištenja prikazana je na slici 11.



Slika 11. Ovisnost razlike u boji (ΔE^*) sireva s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 u odnosu na kontrolni sir K o vremenu skladištenja kroz 28 dana.

Sir EC50 manje se razlikovao u boji od kontrolnog sira K jer je u njega stavljena manja količina ekstrakta lista masline, dok se sir EC75 značajnije razlikovao od kontrolnog sira K jer je u njega stavljena veća količina ekstrakta. Tijekom skladištenja sireva zabilježen je porast razlike u boji sireva što se može pripisati različitim procesima koji su se odvijali tijekom skladištenja sireva kao što su oksidacija, enzimska i mikrobiološka aktivnost. Najniža izračunata ΔE^* vrijednosti iznosi 4,83 za sir EC50 nakon 14 dana skladištenja, a najviša 14,67 za sir EC75 nakon 28 dana skladištenja. Na temelju tih rezultata i informacija iz tablice 1, može se zaključiti kako je vidljiva jasna razlika u boji kod svih uzoraka sireva te da promatrač može vidjeti dvije različite boje nakon skladištenja sireva kroz 28 dana.

4.1.5. Tekstura sira

Tekstura se obično opisuje kao osjetilni dojam strukture proizvoda i način na koji ta struktura odgovara na primijenjenu silu. U slučaju sira, tekstura se mijenja tijekom skladištenja zbog raznih kemijskih, biokemijskih i mikrobioloških reakcija (Kongo i Malcata, 2016). Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009), sirevi se kategoriziraju na ekstra tvrde,

tvrde, polutvrde, meke i svježe sireve. U ovom radu određeni su sljedeći parametri teksture: tvrdoća, adhezivnosti, konzistencija i ljepljivost. Tvrdoća je definirana kao sila koju je potrebno primijeniti na uzorak kako bi se postigla deformacija, a adhezivnost kao rad koji je potrebno obaviti kako bi se nadišle sile između različitih materijala (Kongo i Malcata, 2016). Konzistencija se definira kao fizičko svojstvo materijala koje opisuje njegovu unutarnju strukturu i stupanj kohezivnosti, a ljepljivost kao svojstvo materijala da se privremeno ili trajno pridržava drugih površina prilikom kontakta (Hrvatska enciklopedija, 2024). Izmjereni parametri teksture prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Ovisnost parametara teksture kontrolnog siru K i sireva s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 o vremenu skladištenja.

Uzorak	1. dan	7.dan	14. dan	21. dan	28. dan
Tvrdoća (N)					
K	1,31 ± 0,02	1,62 ± 0,05	4,30 ± 0,05	2,66 ± 0,20	0,71 ± 0,07
EC50	1,27 ± 0,00	1,45 ± 0,00	2,05 ± 0,03	1,52 ± 0,03	0,67 ± 0,05
EC75	0,96 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,63 ± 0,14	1,01 ± 0,01	0,55 ± 0,02
Adhezivnost (N)					
K	3,22 ± 0,85	5,01 ± 0,18	8,96 ± 5,30	10,56 ± 1,64	1,21 ± 0,66
EC50	3,81 ± 0,00	3,40 ± 0,00	7,02 ± 2,09	7,22 ± 1,12	2,50 ± 0,41
EC75	4,43 ± 0,00	2,83 ± 0,00	10,30 ± 0,30	5,02 ± 0,20	2,46 ± 0,45
Konzistencija (Nmm)					
K	13,18 ± 0,03	12,70 ± 2,25	34,46 ± 7,89	19,61 ± 6,66	5,79 ± 0,11
EC50	11,32 ± 0,00	13,40 ± 0,00	16,13 ± 3,80	11,98 ± 2,00	5,87 ± 0,04
EC75	9,33 ± 0,00	10,99 ± 0,00	13,45 ± 4,21	8,33 ± 1,13	4,71 ± 0,80
Ljepljivost (J)					
K	0,0008 ± 0,0002	0,0014 ± 0,0006	0,0009 ± 0,0008	0,0043 ± 0,0022	0,0002 ± 0,0001
EC50	0,0008 ± 0,00	0,0012 ± 0,00	0,0013 ± 0,00	0,0017 ± 0,0002	0,0012 ± 0,0010
EC75	0,0011 ± 0,00	0,0008 ± 0,00	0,0060 ± 0,0009	0,0033 ± 0,0002	0,0004 ± 0,00

Rezultati prikazani u tablici 7 ukazuju na to kako su sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline imali manju tvrdoću od kontrolnog siru K tijekom cijelog perioda skladištenja. Vrijednosti tvrdoće kretale su se u rasponu od 0,55 ± 0,02 do 4,30 ± 0,05 N što su niže vrijednosti od onih koje su odredili Zandona i sur. (2024) u svom istraživanju na sirevima, a

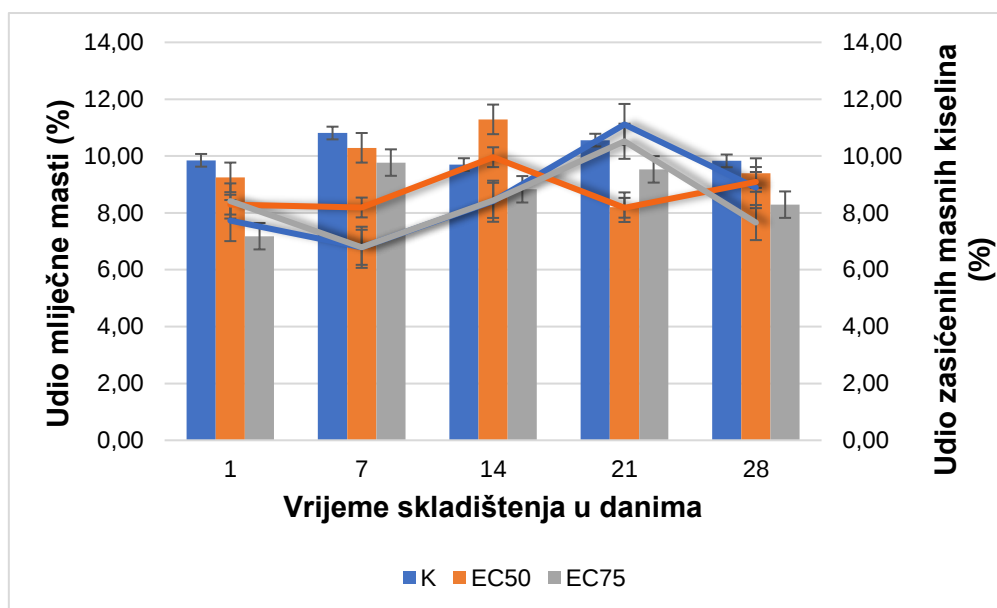
koje su iznosile od $3,57 \pm 0,43$ do $7,49 \pm 0,61$ N. Ovako niske vrijednosti tvrdoće mogu biti rezultati zadržavanja vlage u sirevima koji su dodatno obogaćeni ekstraktom lista masline, a koje je potvrđeno i kemijskom analizom sireva (poglavlje 4.1.6.). Tijekom skladištenja sireva došlo je do pada vrijednosti tvrdoće kod svih sireva što je popraćeno i padom vrijednosti adhezivnosti i konzistencije. Također, treba naglasiti kako je kontrolni sir K imao veće vrijednosti konzistencije od sireva s dodatkom ekstrakta lista masline što je sukladno rezultatima određivanja tvrdoće. Što se tiče ljepljivosti, generalno su sirevi s dodatkom ekstrakta lista masline pokazivali veće vrijednosti od kontrolnog sira K. Najviša vrijednost ljepljivosti zabilježena je kod sira EC75 14. dan skladištenja, dok su sirevi K i EC50 najveću ljepljivost postigli 21. dan skladištenja nakon čega je slijedio nagli pad vrijednosti kod svih sireva.

Ovi rezultati sukladni su rezultatima istraživanja koje su proveli Zandona i sur. (2024) a prema kojima sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline proizvedeni kiselinom koagulacijom imaju značajno nižu tvrdoću, gumenost i žvakljivost te veću lomljivost od onih proizvedenih enzimskom koagulacijom, što sugerira na utjecaj ekstrakta na proteinsku mrežu.

Osim udjela vlage, masti i proteina, Lucey (2017) navodi kako na teksturu sireva značajno utječe i kiselost. Ta ovisnost zabilježena je i u ovom istraživanju gdje je određeno kako je tijekom skladištenja došlo do pada pH vrijednosti i povećanja kiselosti što je bilo popraćeno smanjenjem tvrdoće i konzistencije te povećanjem ljepljivosti u svim sireva. Također, kod sireva s dodatkom ekstrakta lista masline, kod kojih je zabilježen niži pH i veća kiselost, zabilježena je manja tvrdoća i veća ljepljivost. Naime, u kiselom mediju se smanjuje sposobnost vezivanja kalcija u kazeinsku mrežu što za posljedicu ima narušavanje teksture sireva. Prema tome, može se zaključiti kako je dodatak ekstrakta lista masline uzrokovao zakiseljavanje i posljedično smanjenje tvrdoće i konzistencije sireva.

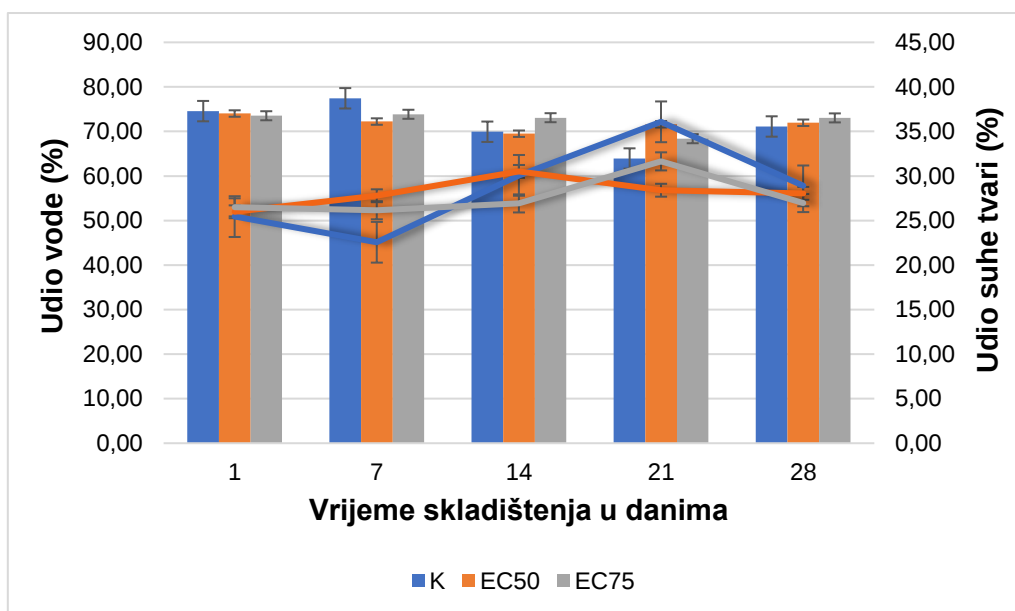
4.1.6. Kemijski sastav sira

Sirevi se kategoriziraju u razne skupine s obzirom na određene parametre. Najčešće se kategoriziraju s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira na ekstra tvrdi sir (67 %), tvrdi sir (49-56 %), polutvrdi sir (54-59 %), meki sir (>67 %) i svježi sir (69-85 %). Česta je podjela i s obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari na ekstrapasne (≥ 60 %), punomasne (≥ 45 i < 60 %), masne (≥ 25 i < 45 %), polumasne (≥ 10 i < 25 %) i posne (< 10 %) (Pravilnik, 2009). U sklopu izrade ovog rada u sirevima je tijekom 28 dana skladištenja određivan udio vode u bezmasnoj tvari, ukupne suhe tvari, mliječne masti u suhoj tvari, mliječne masti, zasićenih masnih kiselina, proteina i soli. U eksperimentalnom dijelu ovog rada izrađeni su masni svježi sirevi čiji se udio vode u bezmasnoj tvari sira 1. dan nakon proizvodnje kretao od 73,52 do 74,56 %, a udio mliječne masti u suhoj tvari od 27,10 do 35,60 %.



Slika 12. Udjel mliječne masti (stupci) i zasićenih masnih kiselina (linije) kontrolnog sira K i sireva EC50 i EC75 s dodatkom ekstrakta lista masline tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

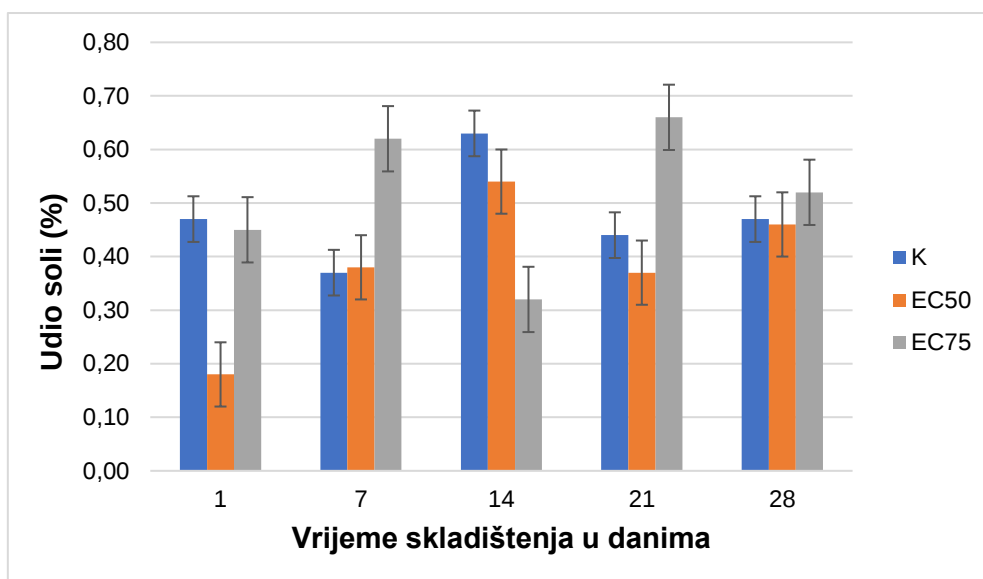
Slikom 12 prikazani su rezultati određivanja udjela mliječne masti i zasićenih masnih kiselina u sirevima tijekom skladištenja. Dobiveni rezultati sugeriraju da tijekom skladištenja sireva nije došlo do značajnijih promjena u udjelu mliječne masti svih sireva iako je generalno gledajući došlo do pada vrijednosti nakon 14. i 21. dana skladištenja. Trend opadanja udjela mliječne masti u svježim sirevima tijekom skladištenja zabilježili su i Barukčić i sur. (2020b) koji ga povezuju s lipolizom, odnosno razgradnjom masti na komponente kao što su slobodne masne kiseline. Slikom 12 prikazan je i porast udjela zasićenih masnih kiselina o vremenu skladištenja što ide u prilog teoriji da je tijekom skladištenja došlo do lipolize mliječne masti kojom su nastale masne kiseline među kojima i zasićene masne kiseline. Treba naglasiti kako su sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline na kraju skladištenja imali manji udio zasićenih masnih kiselina u odnosu na kontrolni uzorak K u koji nije dodan ekstrakt. Na temelju toga može se pretpostaviti kako su polifenoli iz ekstrakta lista masline imali inhibirajući učinak na enzime lipolize što je rezultiralo smanjenjem udjela zasićenih masnih kiselina u sirevima EC50 i EC75.



Slika 13. Udjel vode (stupci) i suhe tvari (linije) kontrolnog sira K i sireva EC50 i EC75 s dodatkom ekstrakta lista masline tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

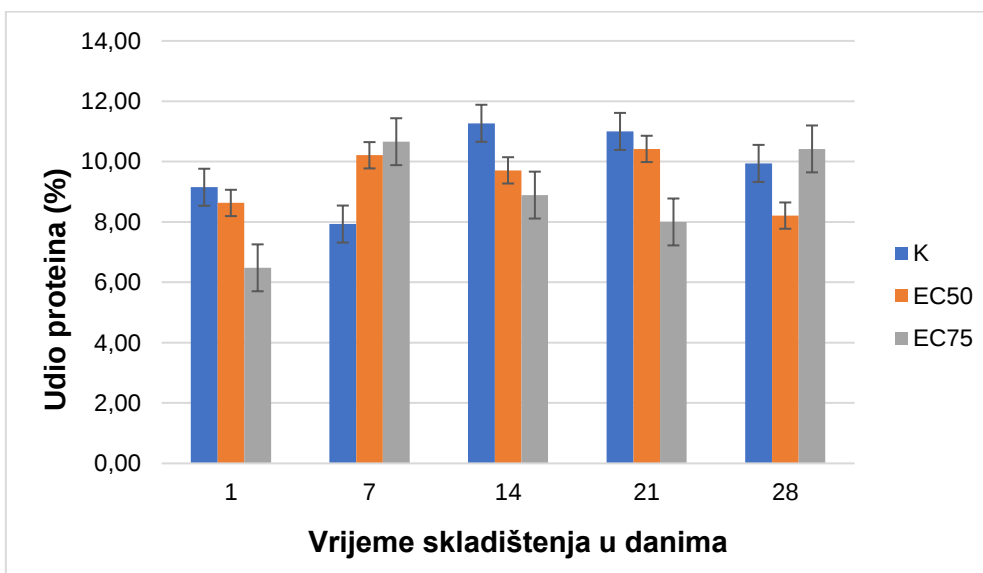
Na slici 13 prikazana je ovisnost udjela vode i ukupne suhe tvari sireva o vremenu skladištenja. Vrijednosti udjela vode su u pravilu bile stabilne te nisu značajno varirale između uzoraka niti tijekom skladištenja iako je zabilježen određeni pad vrijednosti popraćen proporcionalnim porastom udjela ukupne suhe tvari kroz 28 dana skladištenja. Takvi rezultati se mogu pripisati izdvajanju sirutke tijekom skladištenja te su sukladni rezultatima prijašnjih istraživanja (Kizilirmak i sur., 2009). Visoki udio vezane vode u sirevima rezultat je procesa proizvodnje ovih sireva koji je proveden bez dodatka soli koja ima sposobnost vezanja vode te je cijedenje sireva provedeno vlastitom težinom bez dodanog tereta. Visok i stabilan udio vode koji je određen, sukladan je visokom i stabilnom aktivitetu vode određenom u sirevima tijekom skladištenja (poglavlje 4.1.2.). Također, vidljivo je da su sirevi s dodatkom ekstrakta lista masline pred kraj skladištenja imali nešto viši udio vode od kontrolnog uzorka što ide u prilog teoriji da su polifenolni spojevi iz ekstrakta lista masline utjecali na formiranje kazeinske mreže s manjim porama i većom mogućnošću vezanja vode (Barukčić i sur., 2022).

Udio soli u sirevima tijekom skladištenja prikazan je slikom 14. S obzirom da je sir proizveden bez dodane soli, udio soli je u svim sirevima bio nizak tijekom cijelog perioda skladištenja te se kretao u rasponu od 0,18 do 0,66 %.



Slika 14. Udjel soli kontrolnog sira K i sireva EC50 i EC75 s dodatkom ekstrakta lista masline tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

Slikom 15 prikazana je ovisnost udjela proteina u sirevima o vremenu skladištenja. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako se udio proteina u sirevima nije značajno mijenjao. Stabilnost proteina u sirevima može biti rezultat formiranja kompleksa s polifenolima iz ekstrakta lista masline (posebice s kazeinom) (Barukčić i sur., 2022).



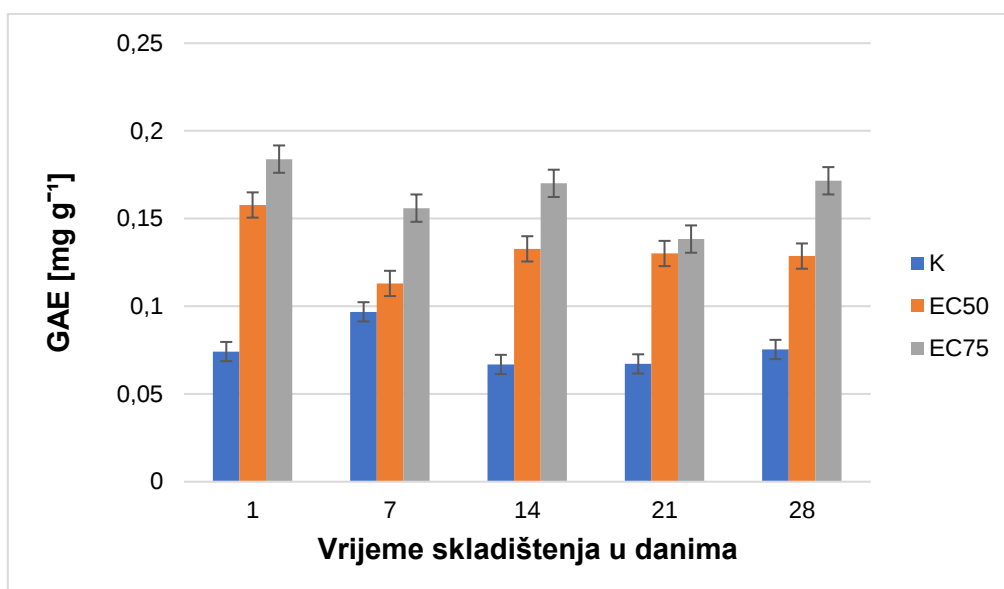
Slika 15. Udjel proteina kontrolnog sira K i sireva EC50 i EC75 s dodatkom ekstrakta lista masline tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA

4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola u proizvedenim sirevima određena je prethodno

opisanom metodom po Folin-Ciocalteu. Rezultati su izračunati pomoću baždarnog pravca te su grafički prikazani slikom 16.

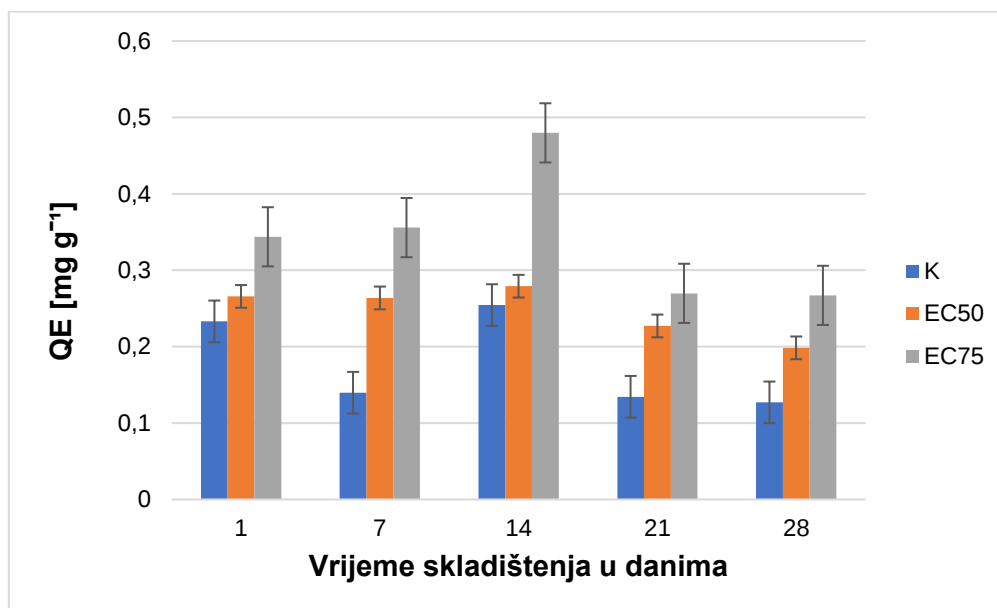


Slika 16. Udjel ukupnih fenola u kontrolnom siru K i sirevima s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

Udio ukupnih fenola u sirevima se kretao od 0,06 do 0,18 mg (GAE) g⁻¹ gdje je najviša vrijednost zabilježena kod uzorka EC75 prvi dan skladištenja. Ovi rezultati sukladni su rezultatima istraživanja koje su proveli Barukčić i sur. (2022), a koji su iznosili 0,08 do 0,1 mg (GAE) g⁻¹ u jogurtima kravljeg mlijeka. S obzirom da je u ekstraktu lista masline koji je dodavan u sireve određen udio ukupnih fenola od 13,08 mg (GAE) mL⁻¹ može se zaključiti kako je značajna količina fenola izgubljena izdvajanjem sirutke tijekom cijedenja sireva. U uzorcima EC50 i EC75 zabilježena je veća koncentracija fenolnih spojeva od kontrolnog uzorka K, sukladno efektivnim koncentracijama ekstrakta lista masline dodanog u te sireve. Zandona i sur. (2024) također su zabilježili veće udjele fenola u sirevima obogaćenima ekstraktom lista masline. Zadržavanje fenola u sirevima opisali su kao rezultat hidrofilinih, hidrofobnih, ionskih ili kovalentnih interakcija fenolnih spojeva i mliječnih proteina. Lagano smanjenje udjela fenola u svim sirevima tijekom skladištenja može se pripisati raspadu nestabilnih fenola te izdvajanju sirutke putem koje se izdvojio i određeni dio fenola iz sireva, a što su također zabilježili i Zandona i sur. (2024).

4.2.2. Koncentracija ukupnih flavanoida

Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima sireva određena je prema prethodno opisanoj metodi, a rezultati su grafički prikazani kao ekvivalenti standarda kvercetina (μgQE g⁻¹) na slici 17.

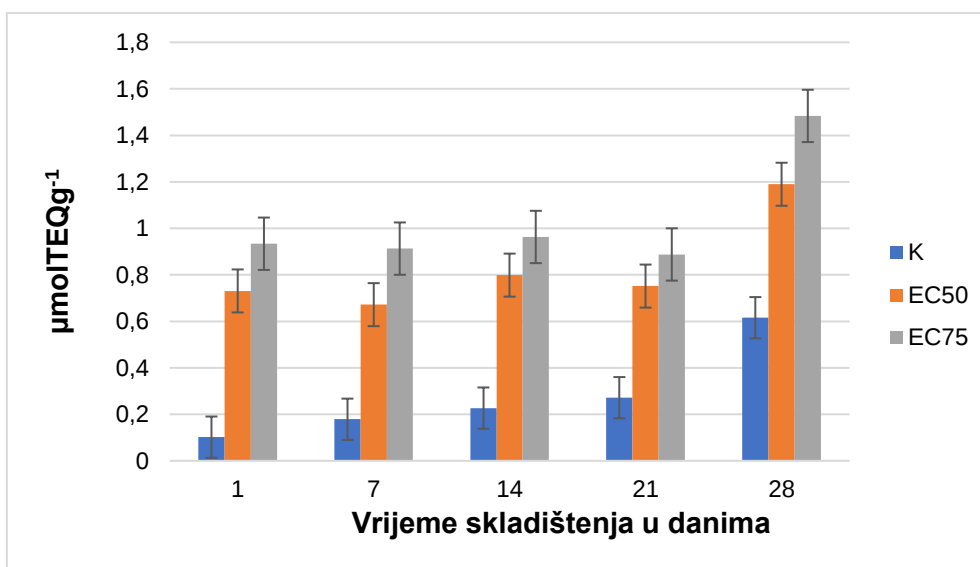


Slika 17. Udjel ukupnih flavanoida u kontrolnom siru K i sirevima s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

Udio ukupnih flavanoida u sirevima se kretao od 0,13 do 0,48 mg (QE) g⁻¹ gdje je najviša vrijednost zabilježena kod uzorka EC75 14. dan skladištenja. Zandona i sur. (2024) je u svome istraživanju također odredila da je povećanje koncentracije ukupnih flavanoida sukladno efektivnim koncentracijama ekstrakta lista masline dodanog u te sireve. Ukupan udio flavanoida određen je i u ekstraktu lista masline koji se dodao u sireve EC50 i EC75 te je iznosio 5,07 mg (QE) g⁻¹. Može se zaključiti kako je došlo do značajnog gubitka flavanoida tijekom cijedenja sireva. Tijekom skladištenja zabilježen je pad udjela flavanoida što se može pripisati početku njihovog raspadanja na druge spojeve i izdvajanju putem sirutke što su zabilježili i Zandona i sur. (2024). Ovi rezultati sukladni su rezultatima određivanju ukupnih fenola iz poglavlja 4.2.1. ovog rada.

4.2.3. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka sireva određena je prethodno opisanom FRAP metodom, a rezultati su grafički prikazani na slici 18 kao Trolox ekvivalent (μmolTEQ g⁻¹).



Slika 18. Antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom i izražena kao Trolox ekvivalent TEQ ($\mu\text{mol g}^{-1}$) u kontrolnom siru K i sirevima s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

FRAP metodom je zabilježena najveća antioksidacijska aktivnost kod uzorka EC75 a iznosila je $1,48 \mu\text{mol (TEQ) g}^{-1}$ što je i bilo za očekivati s obzirom da je u njega dodan veći volumen ekstrakta lista masline koji je bogat spojevima kao što su polifenoli a koji su nositelji antioksidacijske aktivnosti. Rezultati, prema kojima sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline imaju značajno veću antioksidacijsku aktivnost od kontrolnog sira, u skladu su s literaturom koja ističe pozitivnu povezanost između antioksidacijske aktivnosti i ukupnih polifenolnih spojeva (Zandona i sur., 2024).

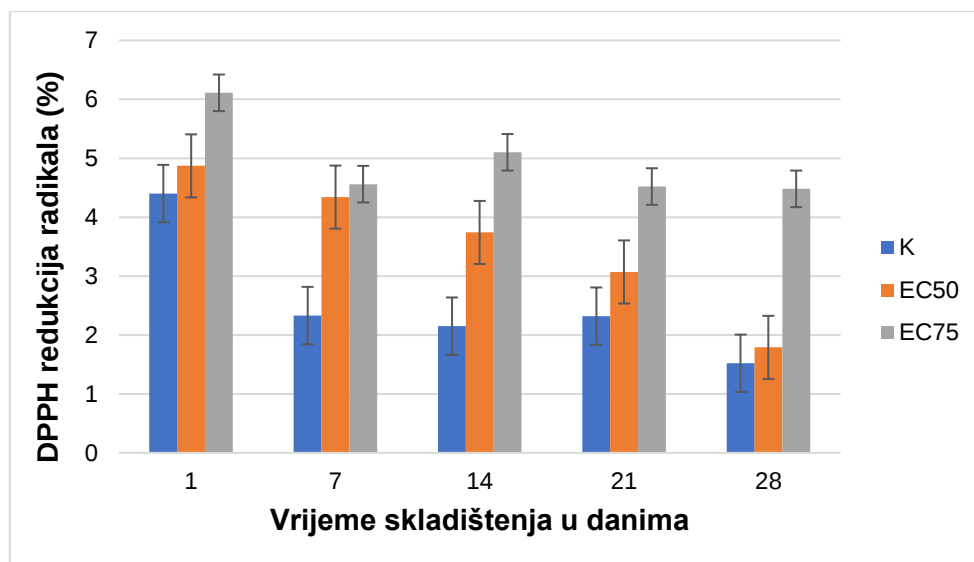
Kroz vrijeme skladištenja antioksidacijska aktivnost svih sireva bila je stabilna i sukladna određenim koncentracijama ukupnih fenola i flavanoida. No, 28. dan skladištenja zabilježen je značajan porast antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima što može biti rezultat interakcije fenolnih spojeva i mliječnih proteina. Naime, Roseiro i sur. (2005) u svom radu ističu kako interakcije između polifenola i proteina mlijeka izrazito ovise o pH vrijednosti te kako te interakcije jačaju kada je pH vrijednost bliža izoelektričnoj točki proteina. Kao što je prikazano slikom 10. u poglavlju 4.1.3. ovog rada, tijekom skladištenja došlo je do pada pH vrijednosti sireva čime su se te vrijednosti udaljavale od izoelektrične točke kazeina. Posljedično, došlo je do destabilizacije polifenol-protein kompleksa te je moguće kako su oslobođeni fenoli uzrokovali zabilježeni nagli porast antioksidacijske aktivnosti pred kraj skladištenja. Tome ide u prilog i zabilježeni lagani porast udjela ukupnih fenola u sirevima između 21. i 28. dana skladištenja (slika 16).

Antioksidacijska aktivnost je određena i za ekstrakt lista masline koji je dodavan u sireve EC50 i EC75 te je iznosio $121,02 \mu\text{mol (TEQ) g}^{-1}$. Značajna razlika antioksidacijske aktivnosti ekstrakta lista masline i sireva u koje je on dodan podudara se sa zabilježenim

značajnim gubicima ukupnih fenola i flavanoida sirutkom tijekom cijedenja i skladištenja sireva.

4.2.4. Antioksidacijska aktivnost određena DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka sireva određena je prethodno opisanom DPPH metodom, a rezultati su grafički prikazani na slici 19 kao postotak reduciranih radikala.



Slika 19. Antioksidacijska aktivnost izražena kao postotak DPPH redukcije radikala u kontrolnom siru K i sirevima s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

DPPH metodom je zabilježena najveća antioksidacijska aktivnost kod uzorka EC75 1. dan nakon proizvodnje te je iznosila 6,11 % redukcije radikala što je i bilo za očekivati s obzirom da je za taj uzorak određen najveći udio ukupnih fenola. Veća antioksidacijska aktivnost u uzorcima u koje je dodan ekstrakt lista masline u odnosu na kontrolni uzorak, zabilježena je i u istraživanju koje su proveli Barukčić i sur. (2022) na jogurtu kravljeg mlijeka obogaćenom ekstraktom lista masline. Tijekom skladištenja antioksidativna aktivnost svih sireva bila je stabilna uz lagani pad, što je sukladno rezultatima određenim FRAP metodom i određivanja udjela ukupnih fenola i flavanoida. Antioksidacijska aktivnost određena je i za ekstrakt lista masline koji se dodavao u sireve EC50 i EC75 te je iznosila 13,21 % redukcije radikala. Uočavamo kako je u samim sirevima antioksidacijska aktivnost značajno niža kao posljedica gubitka velikog udjela spojeva, koji su nositelji antioksidacijske aktivnosti, kroz sirutku tijekom cijedenja i skladištenja sireva.

4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZA

Mikrobiološka ispravnost i stabilnost jedan je od ključnih faktora tijekom razvoja novih prehrambenih proizvoda jer na njima se temelji zdravstvena ispravnost i rok trajanja novog

proizvoda. Stoga su u svrhu izrade ovog rada provedene mikrobiološke analize na sirevima K, EC50 i EC75 čiji su rezultati prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Prosječne vrijednosti ($\log \text{CFU g}^{-1}$) mikrobioloških parametara kontrolnog sira K i sireva s dodatkom ekstrakta lista masline EC50 i EC75 tijekom 28 dana hladnog skladištenja.

$\log \text{CFU g}^{-1}$					
ENTEROBAKTERIJE					
	1.DAN	7.DAN	14.DAN	21.DAN	28.DAN
K	0	2,88	2,16	2,42	0
EC50	0	1,65	2,53	1	0
EC75	0	1,18	1,4	0	0
UKUPAN BROJ BAKTERIJA					
K	3,2	2,3	2,11	2,7	0
EC50	2,8	1,81	3,18	3,4	1,6
EC75	3,26	2,18	2,57	2,7	1,0
KOAGULAZA POZITIVNI STAFILOKOKI					
K	3,3	1,18	1,88	2,19	3,15
EC50	0	2,23	1,95	1,81	3,58
EC75	0	1,95	1,4	1,85	3,44
KVASCI I PLIJESNI					
K	0,7	2,61	2,5	1,3	1,74
EC50	2,23	0	1,48	0	1,54
EC75	1,85	0	0	0	0,7

Kao što je prikazano u tablici 8., ukupan broj bakterija tijekom skladištenja sireva kretao se u rasponu od 0 do 3,4 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Ovi rezultati nešto su niže vrijednosti od onih koje su zabilježili Barukčić i sur. (2020b) u svježim sirevima gdje je ukupan broj bakterija u svježem siru iznosio 5,5 $\log \text{CFU g}^{-1}$ prvog dana skladištenja, dok je najveća zabilježena vrijednost iznosila 7,5 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Maksimalna vrijednost zabilježena u ovom istraživanju prelazi granicu definiranu Vodičem (2009) prema kome maksimalan broj ukupnih bakterija u sirevima ne smije prelaziti 3 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Također, tijekom skladištenja sireva došlo je do pada ukupnog broja bakterija u sirevima što se može pripisati antimikrobnom djelovanju ekstrakta lista masline.

Broj enterobakterija u sirevima kretao se u rasponu od 0 do 2,88 $\log \text{CFU g}^{-1}$ gdje je maksimalna vrijednost zabilježena za kontrolni sir K 7. dan hladnog skladištenja. Uzorak EC75, u koji je dodana najveća količina ekstrakta lista masline, jedini je sir u kojem je tijekom cijelog perioda skladištenja broj enterobakterija bio unutar kriterija propisanog Vodičem (2009) prema

kojem taj broj ne smije biti veći od $2 \log \text{CFU g}^{-1}$. Takvi rezultati mogu se povezati s antibakterijskim djelovanjem ekstrakta lista masline koje mu se pripisuje u literaturi. Tijekom skladištenja sireva, zabilježen je porast broja enterobakterija, no u konačnici na kraju skladištenja došlo je do pada vrijednosti na $0 \log \text{CFU g}^{-1}$ kod svih sireva što je sukladno zabilježenom padu ukupnog broja bakterija. Barukčić i sur. (2020b) navode kako povećanje kiselosti djeluje inhibirajuće na enterobakterije što je sukladno rezultatima ovog rada u kojem je zabilježen porast kiselosti sireva tijekom skladištenja određivanjem pH vrijednosti i titracijske kiselosti (poglavlje 4.1.3.).

Broj kvasaca i plijesni u svim sirevima tijekom skladištenja kretao se u rasponu od 0 do $2,61 \log \text{CFU g}^{-1}$ gdje je maksimalna vrijednost zabilježena kod kontrolnog sira 7. dan nakon proizvodnje. Ovaj određeni raspon ulazi u kriterije određene Vodičem (2009) prema kojem broj kvasaca i plijesni u sirevima ne smije biti veći od $3 \log \text{CFU g}^{-1}$. Generalno gledano tijekom perioda skladištenja najniži broj kvasaca i plijesni zabilježen je u siru EC75 u koji je dodana najveća količina ekstrakta lista masline. Također, za kontrolni sir K se ne može donijeti jasan zaključak o ovisnosti broja kvasaca i plijesni o vremenu skladištenja, dok je za sireve EC50 i EC75 u koje je dodan ekstrakt lista masline, uočen pad vrijednosti nakon 28 dana skladištenja u odnosu na prvotne vrijednosti. Inhibirajuće djelovanje ekstrakta lista masline na kvasce i plijesni odredila je i Vukelić (2023) koja je pratila utjecaj primjene jestivog premaza na bazi proteina sirutke obogaćenog ekstraktom lista masline (*Olea europea* L.) na kvalitetu polutvrdog sira tijekom 60 dana zrenja. Također, na smanjenje broja kvasca i plijesni tijekom skladištenja sireva može se pripisati i inhibirajućem djelovanju smanjenja udjela vode i povećanja kiselosti sireva.

Tijekom skladištenja, broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirevima se kretao od 0 do $3,58 \text{CFU g}^{-1}$. Na kraju skladištenja je u svim sirevima broj koagulaza pozitivnih stafilocoka bio znatno veći od $2 \log \text{CFU g}^{-1}$ propisanih Vodičem (2009). Takvi rezultati mogu biti posljedica proizvodnje sireva u nesterilnim uvjetima i neadekvatne sirovine odnosno mlijeka koje nije pravilno obrađeno prije proizvodnje sireva. Stoga je provedena i mikrobiološka analiza na mlijeku korištenom za proizvodnju sireva, a rezultati su prikazani tablicom 9.

Tablica 9. Prosječne vrijednosti ($\log \text{CFU g}^{-1}$) mikrobioloških parametara u mlijeku korištenom za proizvodnju sireva K, EC50 i EC75.

$\log \text{CFU g}^{-1}$			
ENTEROBAKTERIJE	UKUPAN BROJ BAKTERIJA	KOAGULAZA POZITIVNI STAFILOKOKI	KVASCI I PLIJESNI
0	3,52	1,48	0

Određena je visoka vrijednost ukupnog broja bakterija te prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka u mlijeku korištenom za proizvodnju sireva što je zasigurno utjecalo i na rezultate mikrobioloških analiza samih sireva. U mlijeku nije određena prisutnost enterobakterija te kvasaca i plijesni što ukazuje na to da je došlo do naknadne kontaminacije sireva ovim mikroorganizmima tijekom proizvodnje i/ili skladištenja.

4.4. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE

Određivanje prihvatljivosti potrošača provedeno je testiranjem 23 ispitanika različite dobne starosti (20-45 godina). Ocjenjivano je 3 uzorka – kontrolni uzorak K koji je proizveden bez dodatka ekstrakta lista masline te uzorci EC50 i EC75 s dodatkom ekstrakta. Sastav i distribucija ocjena primjenom Peryam-ove hedonističke skale svježih kravljih sireva prikazan je tablicom 10. Ocjene potrošača su sumirane, te je izračunata prosječna vrijednost ($\bar{x}$), standardna devijacija (s) i koeficijent varijabilnosti (C_v) te postotak poželjnosti koji su također prikazani u tablici 10. Rezultati analize varijance (tablica 11) ukazuju da postoji značajna razlika između uzorka K i ostalih uzoraka jer izračunati F koeficijent ima veću vrijednost od granične vrijednosti očitanih iz statističkih tablica.

Tablica 10. Ocjene prihvatljivosti sireva od strane potrošača pomoću hedonističke skale.

Ocjena	Uzorci sireva		
	K	EC50	EC75
9	1	0	0
8	3	0	1
7	12	0	0
6	4	0	0
5	1	1	0
4	1	5	2
3	0	7	8
2	0	9	7
1	1	1	5
Σ^*	23	23	23
$\bar{x}^*$	6,57	2,83	2,57
s^*	1,59	0,98	1,50
C_v^*	24,23	34,82	58,56
Poželjnost	73,00 %	31,44 %	28,56 %

* Σ = Ukupan broj ispitanika; $\bar{x}$ = Prosječna vrijednost; s = Standardna devijacija;
 C_v = koeficijent varijabilnosti

Pomoću Duncanovog testa utvrđeno je da se uzorci značajno razlikuju tako da je uzorak K statistički značajno različiti od ostalih ispitivanih uzoraka. Uzorak K je značajno bolji od uzoraka EC50 i EC75. Određeno je kako se uzorci EC50 i EC75 statistički ne razlikuju.

Tablica 11. Analiza varijance podataka iz tablice 10.

Izvor varijance	Sume kvadrata	Stupnjevi slobode	Prosjeci kvadrata	F
Između proizvoda	230,38	2	115,19	60,05
Analitička greška	126,61	66	1,92	/
Ukupno	356,99	68	/	/

$F_{0.05}(2/66) = 3,14$

Na temelju rezultata može se zaključiti kako je ukupna prihvatljivost ispitivanih sireva niska pošto svi uzorci imaju manju prosječnu vrijednost od 7. To se može pripisati visokim intenzitetom osjetilnih svojstava ili prisutnosti neočekivanih osjetilnih karakteristika. Značajno niža poželjnost zabilježena je kod sireva EC50 i EC75 za koji su panelisti kao glavni nedostatak naveli izraženu gorčinu i kiselost. To je svakako rezultat dodatka ekstrakta lista masline kojeg karakterizira izražena gorčina (Vranković, 2022) i nerazmjera između očekivanja potrošača i stvarnog osjetilnog doživljaja. Uzevši u obzir sve rezultate senzorske analize iz ovog rada, može se zaključiti kako postoji interes potrošača za svježim sirevima obogaćenih ekstraktom lista masline no također kako je i potrebno provesti daljnja istraživanja koja se trebaju usmjeriti na rješavanju negativnih senzorskih svojstava kako bi se postigla veća prihvatljivosti od strane potrošača.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata analiza provedenih u ovom istraživanju može se zaključiti sljedeće:

1. Prinos proizvedenih sireva kretao se u rasponu od 28,93 do 31,95 % što su nešto više vrijednosti od literaturnih. Sirevi u koje je dodan ekstrakt lista masline (EC50 i EC75) imali su viši prinos od kontrolnog sira K.
2. Rezultati fizikalno-kemijskih mjerenja upućuju na najviši aktivitet vode (0,89) u kontrolnom uzorku sira. Najviša pH vrijednost (4,37) zabilježena je kod sira EC75 nakon 7 dana, a najniža (4,23) kod kontrolnog uzorka nakon 28 dana skladištenja. Tijekom skladištenja u svim sirevima je došlo do pada pH vrijednosti i porasta titracijske kiselosti. Nakon 28 dana skladištenja najveća promjena boje zabilježena kod sira EC75. Sirevi s ekstraktom lista masline (EC50 i EC75) imaju manju tvrdoću, konzistenciju i adhezivnost, te veću ljepljivost zbog veće sposobnosti zadržavanja vode, veće kiselosti i manjeg udjela mliječne masti.
3. Sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline (EC50 i EC75) imaju niži udio mliječne masti i zasićenih masnih kiselina zbog inhibicijskog djelovanja polifenola na enzime lipolize. Ti sirevi imaju veću sposobnost vezanja vode kao posljedica formiranja polifenol-kazein kompleksa zbog kojeg je u njima i udio proteina bio stabilan.
4. Najveći udio ukupnih fenola (0,18 mg GAE g⁻¹) i flavanoida (0,48 mg QE g⁻¹) određen je kod sireva obogaćenih ekstraktom lista masline (EC50 i EC75). Sukladno tome, kod tih sireva je zabilježena veća antioksidacijska aktivnost FRAP i DPPH metodom.
5. Mikrobiološkom analizom sireva određen je manji broj enterobakterija, kvasaca i plijesni u sirevima s dodatkom ekstrakta lista masline (EC50 i EC75) u odnosu na kontrolni sir čime je potvrđeno antimikrobno djelovanje ekstrakta lista masline.
6. Prema rezultatima hedonističke senzorske analize najvišu prihvatljivost postigao je kontrolni uzorak sira, dok su sirevi s dodatkom ekstrakta lista masline (EC50 i EC75) ocjenjeni značajno nižim ocjenama te su okarakterizirani kao gorki i kiseli.
7. Uzimajući u obzir sve dobivene rezultate može se zaključiti kako je dodatak ekstrakta lista masline u sireve utjecao na okus, teksturu, boju i sastav te bolja antioksidacijska i mikrobiološka svojstva sireva. Senzorska analiza ukazuje na nisku prihvatljivost od strane potrošača, stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja s naglaskom na poboljšanje senzorskih svojstava svježih sireva obogaćenih ekstraktom lista masline.

6. LITERATURA

Al-Rimawi F, Tarawa M, Elama C (2017) Oleuropein from Olive Leaf Extract as Natural Antioxidant of Frozen Hamburger. *J. Food Eng.* **7**, 406-412.

<https://dspace.alquds.edu/handle/20.500.12213/5083>

Anonymous 1 (2020): <https://www.savjetodavna.hr/category/dopunske-djelatnosti/prerada/sirarstvo/page/2/> Pristupljeno 11.lipnja 2024.

Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K (2007) Inhibitory potential of herb, fruit, and fungalenriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **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>

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN., Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426–436
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Azwandia NN (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med. Aromat. Plants.* **4** [doi:10.4172/2167-0412.1000196](https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196)

Babić M (2009) Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka baterijom *Lactobacillus casei* – 01. (diplomski rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Bagheripoor N, Khoshgozaran-Abras S, Sohrabvandi S, Khorshidian N, Mortazavian AM, MollaKhalili N, Jazaeri S (2018). Application of Active Edible Coatings to Improve the Shelf-life of Cheese. *Food Sci Technol Res*, **24**(6), 949–962. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.949>

Barukčić I, Filipan K, Lisak Jakopović K, Božanić R, Blažić M, & Repajić 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**(5), 701. <https://doi.org/10.3390/foods11050701>

Barukčić I, Keškić M, Karlović S, Božanić R (2020a) 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>

Barukčić I, Ščetar M, Marasović I, Lisak Jakopović K, Galić K i Božanić R (2020b) Evaluation of quality parameters and shelf life of fresh cheese packed under modified atmosphere. *J Food Sci Technol* **57**, 2722–2731. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04308-6>

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. [10.1002/9781119046165.ch04](https://doi.org/10.1002/9781119046165.ch04)

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: *Sirarstvo u teoriji i praksi* (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 54

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

Božanić R, Tratnik Lj, Parat M (2001) Prihvatljivost jogurta i probiotičkog jogurta od kozjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **51** (4), 317-326. <https://hrcak.srce.hr/1915>

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>

El Dessouky Abdel-Aziz M, Samir Darwish M, Mohamed AH, El-Khateeb AY & Hamed SE (2020). Potential activity of aqueous fig leaves extract, olive leaves extract and their mixture as natural preservatives to extend the shelf life of pasteurized buffalo milk. *Foods*, **9**(5), 615. [doi:10.3390/foods9050615](https://doi.org/10.3390/foods9050615)

El SN, Karakaya S (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* **67**, 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>

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 . Pristupljeno 8. lipnja 2024.

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>

Giacometti J, Bursać Kovačević D, Putnik P, Gabrić D, Bilušić T, Krešić G, Stulić V, Barba FJ, Chemat F, Barbosa-Cánovas G, Režek Jambrak A (2018) Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int.* **113**, 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817943-7.00008-1>

Guerrero Maldonado N, López MJ, Caudullo G, de Rigo D (2016) *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species (San-Miguel-Ayán J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, ured.). Publ. Off. EU, Luxembourg. [10.2788/4251](https://doi.org/10.2788/4251)

Han L (2020) Optimizacija ekstrakcije polifenola iz lista masline i procjena antimikrobne

aktivnosti (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hrvatska agencija za hranu (2016) Znanstveno mišljenje o mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrdim sirevima na tržnicama RH i njihovim kemijskim parametrima (Zahtjev HAH-Z-2016-1), Zagreb

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**. Academic Press, Cambridge, str. 997-1040.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00039-9>

Hrvatinić 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.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024.
<https://www.enciklopedija.hr> Pristupljeno 8.6.2024.

Kalit S (2016) Svježi sir. U: *The Oxford Companion to Cheese* (Donnelly, C., ured.) Oxford University Press, New York, SAD, str. 687-688

Kaya S, Öner MD (1996). Water Activity And Moisture Sorption Isotherms Of Gaziantep Cheese. *J Food Qual.*, **19**(2), 121–132. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1996.tb00409.x>

Kirin S (2016) Sirarski priručnik, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Kirin S (2009) Bjelovarski domaći svježi sir. *Mljekarstvo* **59**, str. 148-154.
<https://hrcak.srce.hr/37639>

Kizilirmak Esmer O, Balkir P, Seckin KA, Irkin R (2009) The Effect of Modified Atmosphere and Vacuum Packaging on the Physicochemical, Microbiological, Sensory and Textural Properties of Crottin de Chavignol Cheese. *Food Sci. Technol. Res.* **15** (4) str. 367- 376.
<http://dx.doi.org/10.3136/fstr.15.367>

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. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00136-7>

Kukina L (2017) Modeli odnosa masnih kiselina i kolesterola u krvi (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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>

Llompert 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. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14442-7>

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.

Lucey JA (2017) Formation, structural properties, and rheology of acid-coagulated milk gels. *In Cheese*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 179–197.

Lucić N (2021) Trendovi u korištenju biljnih ekstrakata u hrani (Završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Mannheim CH, Soffer T (1996) Shelf-life Extension of Cottage Cheese by Modified Atmosphere Packaging. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **29**, str. 767-771. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0120>

Marasović I (2017) Održivost svježeg sira pakiranog u vakuumu i modificiranoj atmosferi (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Markov K, Frece J, Čvek D, Delaš F (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja Zagreba. *Mljekarstvo* **59** (3), str 225-231. <https://hrcak.srce.hr/40514>

Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Colour difference ΔE - A survey. *Mach Graph Vis* **20**, 383-411.

<https://www.researchgate.net/publication/236023905> Color difference Delta E - A survey

Munekata PES, Rocchetti G, Pateiro M, Lucini L, Dominguez R, Lorenzo JM (2020) Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and healthpromoting attributes: an overview. *Food Bioprocess Technol.* **31**, 81–87.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.003>

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

Parisi OI, Casaburi I, Sinicropi MS, Avena P, Caruso A, Givigliano F, Pezzi V, Puoci F (2014) Most Relevant Polyphenols Present in the Mediterranean Diet and Their Incidence in Cancer Diseases. U: Polyphenols in Human Health and Disease, **1** (Watson, R.R., Preedy V.R., Zibadi, S., ured.), Academic Press, London/Waltham/San Diego, str. 1341-1351.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00101-8>

Pavišić Z (2020) Utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na puferski kapacitet jogurta (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet ,Sveučilište u Zgrebu, Zagreb

Poojary MM, Roohinejad S, Barba FJ, Koubaa M, Puértolas E, Režek Jambrak A, Greiner R, Oey I (2016) Application of Pulsed Electric Field Treatment for Food Waste Recovery Operations. Handbook of Electroporation. [doi:10.1007/978-3-319-26779-1_185-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_185-1)

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 Pristupljeno 9. lipnja 2024.

Pregiban K (2017) Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

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>

Ray NB, Lam NT, Luc R, Bonvino NP, Karagiannis TC (2015) Cellular and Molecular Effects of Bioactive Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. U: Olive and Olive Oil Bioactive

Constituents, (Boskou, D., ured.), AOCS Press, Urbana, str. 53-91.

<https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-041-2.50009-4>

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>

Sabljak V, Lisak-Jakopović K, Barukčić I, Pejaković A, Božanić R (2013) Određivanje trajnosti tradicionalnog svježeg sira. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **8**, str. 115-122.

Sahin S, Bilgin M (2017) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *J. Sci. Food Agric.* **98**, 1271–1279.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8619>

Sangsopha J, Moongngarm A, Pratheepawanit Johns N, Grigg NP (2019) Optimization of pasteurized milk with soymilk powder and mulberry leaftea based on melatonin, bioactive compounds and antioxidant activity using response surface methodology.
[doi.org/ 10.1016/j.heliyon.2019.e02939](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02939)

Sant'Ana AMS, Bezerril FF, Madruga MS, Batista ASM, Magnani M, Souza EL, & Queiroga RCRE (2013). Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *J Dairy Sci*, **96**(12), 7442-7453.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-6915>

Seçmeler Ö, Galanakis CM (2019) Olive Fruit and Olive Oil. U: *Innovations in Traditional Foods*, **1**, (Galanakis CM, ured.), Woodhead publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 193-220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00008-3>

Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A (2003) Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 299-305.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00332-X)

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>

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

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00012-0>

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

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32005R2073>
Pristupljeno 10. lipnja 2024.

Vahčić N, Ritz M, Vojnović V, Hruškar M (1993.) Potrošačka ocjena prihvatljivosti komercijalnog jogurta primjenom hedonističke skale. *Mljekarstvo* **43** (2), 153-159.

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2009), <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/vodic-za-mikrobioloske-kriterije-za-hranu.pdf>
Pristupljeno 1. lipnja 2024.

Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Terezinha Zani V, de Souza D, Morelo Dal Bosco S (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L.) to human health. *Nutr. Hosp.* **31**: 1427-1433. [10.3305/nh.2015.31.3.8400](https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400)

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

Vukelić M (2023) Učinci primjene jestivog premaza na bazi proteina sirutke obogaćenog ekstraktom lista masline (*Olea europea* L.) na kvalitetu polutvrdog sira tijekom 60 dana zrenja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zgrebu, Zagreb

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22), https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022_07_83_1248.html Pristupljeno 5. lipnja 2024.

Zandona E, Vranković L, Pedisić S, Vukušić Pavičić T, Dobrinčić A, Marušić Radovčić N, Lisak Jakopović K, Blažić M & Barukčić Jurina I (2024). Production of Acid and Rennet-Coagulated

Cheese Enriched by Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract—Determining the Optimal Point of Supplementation and Its Effects on Curd Characteristics. *Foods*, **13**(4), 616. <https://doi.org/10.3390/foods13040616>

Žuntar I, Putnik P, Bursać Kovačević D, Nutrizio M, Šupljika F, Poljanec A, Dubrović I, Barba FJ, Režek Jambrak A (2019) Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts (*Olea europaea* L.) Obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods* **8**. [10.3390/foods8070248](https://doi.org/10.3390/foods8070248)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Ivan Miletić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ivan Miletić

Vlastoručni potpis