

Učinci primjene jestivog premaza na bazi proteina sirutke obogaćenog ekstraktom lista masline (*Olea europea* L.) na kvalitetu polutvrđog sira tijekom 60 dana zrenja

Vukelić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:545650>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Maja Vukelić

**UČINCI PRIMJENE JESTIVOG
PREMAZA NA BAZI PROTEINA
SIRUTKE OBOGAĆENOG
EKSTRAKTOM LISTA MASLINE
(*Olea europea* L.) NA KVALITETU
POLUTVRDOG SIRA TIJEKOM
60 DANA ZRENJA**

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

Projekt

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



Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Opremanje poluindustrijskog praktikuma za razvoj novih prehrambenih tehnologija“ (KK.01.1.1.02.0001), Fondovi Europske Unije, u okviru poziva „Ulaganje u organizacijsku reformu i infrastrukturu u sektoru istraživanja, razvoja i inovacija“, koji se financira u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija za razdoblje 2014-2020“ iz Europskog fonda za regionalni razvoj.



Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Ireni Barukčić Jurina na stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada, te na njenim savjetima i velikoj potpori. Također se zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Katarini Lisak Jakobović te tehničkoj suradnici Snježani Šimunić na pruženoj pomoći, podršci i obiteljskoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim kolegicama i prijateljima koji su bili uz mene tijekom mog studiranja i učinili ga posebnim.

*Na kraju se najviše želim zahvaliti svojim **roditeljima** i bratu koji su uvijek bili uz mene. Hvala vam što ste mi sve ovo omogućili!*

Ovaj rad posvećujem vama!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

*UČINCI PRIMJENE JESTIVOG PREMAZA NA BAZI PROTEINA SIRUTKE OBOGAĆENOG
EKSTRAKTOM LISTA MASLINE (*Olea europea L.*) NA KVALITETU POLUTVRDOG SIRA
TIJEKOM 60 DANA ZRENJA*

*Maja Vukelić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058208621*

Sažetak:

Zbog izvrsnih funkcionalnih svojstava i hranjive vrijednosti proteina sirutke, u posljednje vrijeme se sve češće istražuje njihova primjena u izradi jestivih filmova i premaza. Time se otvaraju nove mogućnosti iskorištavanja sirutke, a primjena ovakvih premaza mogla bi povećati funkcionalna svojstva sireva. Cilj ovog rada bio je razvoj jestivog premaza na bazi proteina sirutke s dodatkom ekstrakta lista masline kao izvorom visokovrijednih polifenola te praćenje parametara kvalitete polutvrđog sira na koji je nanesen. Ukupno su proizvedena četiri različita uzorka (kontrolni, uzorak s jestivim premazom na bazi proteina sirutke, 2 uzorka s jestivim premazom uz dodatak ekstrakta lista masline koncentracije polifenola 26,3 mg L⁻¹, odnosno 159,35 mg L⁻¹). Svi uzorci su dozrijevali 60 dana tijekom kojih su praćena fizikalna i kemijska svojstva, koncentracija ukupnih fenola i flavonoida, antioksidacijski kapacitet, parametri proteolize te mikrobiološka kvaliteta. Uzorci koji su sadržavali ekstrakt lista masline imali su veću koncentraciju ukupnih fenola i ukupnih flavonoida te veći antioksidacijski kapacitet.

Ključne riječi: *sir, jestivi premaz, proteini sirutke, ekstrakt lista masline, zrenje*

Rad sadrži: 58 stranica, 21 slika, 7 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: 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. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

*EFFECTS OF THE APPLICATION OF AN EDIBLE COATING BASED ON WHEY PROTEIN ENRICHED WITH OLIVE LEAF (*Olea europea* L.) EXTRACT ON THE QUALITY OF SEMI-HARD CHEESE DURING 60 DAYS OF RIPENING*

Maja Vukelić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058208621

Abstract:

Due to their excellent functional and nutritional properties, whey proteins are extensively being investigated as a basis for production of edible coatings. Such approach provides new possibilities for whey utilisation, while application of such coatings could increase the functional properties of cheeses. The aim of this study was to develop a whey-protein based edible coating enriched with olive leaf extract as a source of high-value polyphenols and monitoring quality parameters of the semi-hard cheese on which it was applied. Four different samples were produced (control, sample with edible coating based on whey protein, 2 samples with edible coating enriched with olive leaf extract, polyphenol concentration 26.3 mg L⁻¹ and 159.35 mg L⁻¹). All samples ripened for 60 days, during which physico-chemical properties, total phenols and flavonoids, antioxidant capacity, proteolysis and microbiological quality were monitored. Samples that contained olive leaf extract had higher concentration of total phenols and flavonoids and higher antioxidant capacity.

Keywords: *cheese, edible coating, whey proteins, olive leaf extract, ripening*

Thesis contains: 58 pages, 21 figures, 7 tables, 48 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Irena Barukčić Jurina, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Katarina Lisak Jakopović, PhD, Associate 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. Mario, Ščetar, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 25th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PROIZVODNJA SIRA.....	2
2.2. PREHRAMBENA VRIJEDNOST SIRA.....	3
2.3. JESTIVI PREMAZI	4
2.3.1. Svojstva proteina sirutke	6
2.3.2. Jestivi premazi na bazi proteina sirutke	6
2.3.3. Načini nanošenja jestivih filmova	7
2.3.4. Jestivi premazi u tehnologiji proizvodnje sira.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. Kemikalije.....	10
3.1.2. Aparatura.....	13
3.1.3. Pribor.....	14
3.2. METODE.....	15
3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline.....	15
3.2.2. Priprema jestivog premaza na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline	15
3.2.3. Proizvodnja polutvrđog sira s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline postupkom enzimske koagulacije	17
3.2.4. Određivanje aktiviteta vode sireva.....	18
3.2.5. Određivanje kiselosti sira.....	19
3.2.6. Određivanje pepela u siru	20
3.2.7. Određivanje ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu i količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kisleini (TCA-SN) metodom po Kjeldahlu..	20
3.2.8. Određivanje ukupnih fenola u polutvrđom siru s Folin-Ciocalteu reagensom	22
3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uzorku sira FRAP metodom.....	24
3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida	26
3.2.11. Određivanje indeksa boje kolorimetrom.....	28
3.2.12. Određivanje teksture sira	29
3.2.13. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda	29
3.2.14. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom.....	32
3.2.15. Statistička obrada rezultata	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. REZULTATI ANALIZA FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA SIRA	34

4.1.1. Aktivitet vode sira, kiselost sira, udio mliječne masti u siru te udio pepela u siru.	34
4.1.2. Boja sira	38
4.1.3. Tekstura sira.....	40
4.1.4. Rezultati određivanja količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) i ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu (WSN) te proteolize	43
4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA NA UZORCIMA SIREVA.....	46
4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom	46
4.2.2. Antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom	47
4.2.3. Koncentracija ukupnih flavonoida	48
4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIREVA I ODREĐIVANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	49
4.3.1. Rezultati mikrobiološke analiza sireva	49
4.3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti spojeva	50
5. ZAKLJUČAK	52
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Sirarska tehnologija je danas među najrazvijenijim prehrambenim industrijama svijeta. Sirevi sadržavaju vrijedne hranjive tvari i to u potpunom sastavu koji je potreban organizmu. Rezultat je to fizikalnih i biokemijskih promjena sastojaka mlijeka koje se događaju tijekom zrenja sireva. Današnje društvo sve je više orijentirano prema minimalno procesiranoj i čim prirodnijoj hrani, a isto tako se pokušava sve nusproizvode proizvodnje ukomponirati u neki drugi proizvod te ih nekako iskoristiti kako bi se smanjila količina otpada.

Interes za korištenje jestivih materijala u pakiranju hrane posljednjih godina je u porastu. Sirarska industrija je jedna od industrija gdje se jestivi materijali mogu dobro iskoristiti, a to pokazuje količina nedavnih istraživanja na tu temu. Tijekom skladištenja sireva može doći do mikrobiološke kontaminacije bakterijama, plijesnima ili kvascima koji mogu uzrokovati neželjena organoleptička svojstva te narušiti kvalitetu sira. Jestivi premazi i filmovi, osim što su jestivi, koriste se u cilju smanjenja gubitka težine, imaju svojstvo sprječavanja mikrobiološkog kvarenja kroz kontrolu brzine izmjene plinova te imaju funkciju nositelja antimikrobnih komponenti. Mogu djelovati kao pojedinačni materijali ili kao dodatna zaštita ako ih se koristi u kombinaciji s nekim drugim ambalažnim materijalima.

Jestive premaze i filmove moguće je proizvesti na bazi polisaharida, lipida ili proteina. Najčešći proteini koji se koriste kao baza za jestive filmove i premaze su proteini sirutke. Sirutka je sporedni proizvod u proizvodnji sireva, nastaje u velikim količinama te je poželjno da ju se na neki način iskoristi. Sirutka je nutritivno vrlo bogata namirnica, a njeni proteini su hranjivo najvrjedniji zbog velikog udjela esencijalnih aminokiselina.

Cilj ovog istraživanja bio je razvoj jestivog premaza na bazi proteina sirutke te praćenje određenih parametara kvalitete enzimski koaguliranog sira s razvijenim jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline tijekom 60 dana zrenja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNJA SIRA

Proizvodnja sireva jedan je od najstarijih postupaka konzerviranja lako pokvarljive hrane te o tome postoje zapisi iz vremena prije Krista (Tratnik i Božanić, 2012). Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009), sirevi se definiraju kao svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem od sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. Istim Pravilnikom je u sirarstvu dozvoljena upotreba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima i/ili dozvoljenih kiselina za koagulaciju (Pravilnik, 2009).

Sir obuhvaća najrazličitiju skupinu mliječnih proizvoda. Karakteriziraju ga različite dimenzije, teksture, arome i okusi kao rezultati specifične proizvodnje te procesa zrenja. Njegov složeni sastav i uvjeti okoline koji prevladavaju tijekom proizvodnje, rukovanja i skladištenja često dovode do razvoja kvasaca i plijesni na površini sira što posljedično dovodi do smanjenja kvalitete takvog sira te u konačnici do ekonomskih gubitaka poduzeća. Najveći problem i posljedica razvoja mikroorganizama na površini je ugrožavanje zdravlja potrošača (Ramos i sur., 2012; Ayana i Turhan, 2009).

Tehnologiju sireva karakteriziraju dva temeljna procesa, koncentriranje i konzerviranje sastojaka mlijeka koji su zatim oblikovani u sir (Kirin, 2016). Osnovu proizvodnje sireva čine postupci izdvajanja sirutke i standardizacije udjela vode u bezmasnoj suhoj tvari sira. Tim se tehnološkim postupcima koncentriraju prvenstveno bjelančevine – kazein te ostali sastojci mlijeka koji onda kao krajnji rezultat daju sir karakterističnog oblika, okusa i mirisa (Kirin, 2016). Za proizvodnju sira, bitno je provesti koagulaciju proteina, tj. grušanje mlijeka te oblikovanje sirnog gruša uz izdvajanje sirutke. Koagulacija proteina moguća je djelovanjem kiseline gdje nastaje kiseli gruš ili djelovanjem proteolitičkih enzima gdje se nastaje slatki gruš (Tratnik i Božanić, 2012).

Tehnologija proizvodnje sireva općenito obuhvaća odabir mlijeka, standardizaciju mlijeka, homogenizaciju mlijeka (samo kod mekih sireva), toplinsku obradu mlijeka, sirenje mlijeka, obradu gruša, oblikovanje sira, prešanje sira, soljenje sira te u konačnici zrenje. Mlijeko koje se koristi za proizvodnju sira mora biti higijenski proizvedeno te čim prije prerađeno u sir. Ukoliko to nije moguće, mlijeko je potrebno termalizirati te ga nakon toga čuvati pri niskim temperaturama i što prije preraditi u sir. Standardizacija mlijeka se provodi obiranjem mliječne

masti iz punomasnog mlijeka ili dodatkom obranog mlijeka u prahu, a postupak se provodi kako bi se dobio optimalan odnos kazeina i masti u mlijeku za sirenje. Cilj toplinske obrade je standardizacija kvalitete mlijeka za sirenje, a u industriji se najčešće provodi srednja pasterizacija u izmjenjivačima topline na 72-73 °C/15-20 sekundi. Prethodno se preporuča provesti baktofugaciju ili mikrofiltraciju pošto se na temperaturi od 72-73 °C neće uništiti sve spore bakterija. Nakon toplinske obrade mlijeka dodaju se potrebni dodaci (sirilo, mikrobnna kultura, kalcijev klorid, boje i dr.). Sirilo je smjesa enzima koja vrši proteolizu na kazeinu uslijed čega dolazi do formiranja gruš a i izdvajanja sirutke. Sirilo se dodaje zadnje te se sirenje mlijeka provodi pri temperaturi oko 30 °C. Dobiveni gruš se reže te se nakon završene sinereze prebacuje u posebno oblikovana cjedila. Sir se dalje dodatno preša kako bi se izdvojila zaostala sirutka i kako bi se dobio konačan oblik i tekstura sira. Cilj soljenja sira je konzerviranje i sušenje sira te stvaranje željenog okusa. Najčešći načini soljenja su utrljavanje soli po površini sira, soljenje sira u kalupu kod punjenja sirnim tijestom te uranjanje sira u salamuru koja je ustvari zasićena otopina soli (oko 23 %), odgovarajućeg pH (4,5 - 5,1) i sadržaja kalcija (0,2 – 0,3 %). Zrenje sira odvija se u prostorijama sa povoljnom klimom određene temperature, relativne vlažnosti i protoka zraka. Glavni cilj zrenja je pretvaranje sirne mase u sireve karakteristične arome, teksture i oblika, a to se postiže adekvatnom negom sireva tokom zrenja (Kirin, 2016; Kalit i sur., 2015; Havranek i sur., 2014; Tratnik i Božanić, 2012).

2.2. PREHRAMBENA VRIJEDNOST SIRA

Prehrambena vrijednost sira ovisi o hranjivoj i energetskejoj vrijednosti svih njegovih sastojaka (Tratnik i Božanić, 2012) te je usko vezana uz njegovu resorpciju i iskorištenje u organizmu (Kirin, 2016). Sir je lako probavljiva namirnica, a njegov temeljni sastav, osim vode, čine i proteini, masti, ugljikohidrati, vitamini, mineralne tvari i drugi sastojci u tragovima (Kirin, 2016). Sirevi predstavljaju prirodnu namirnicu koja je najbogatija proteinima, najviše kazeinom, te od tud proizlazi njegova bogata vrijednost u prehrani i mogućnost zadovoljavanja dnevnih potreba za proteinima. Što je sir zreliji, to je udio proteina veći, a još jedna njegova važnost u prehrani je što sadrži 8 esencijalnih aminokiselina koje su bitne za izgradnju i obnovu dijelova ljudskog organizma (Kirin, 2016). Mliječna mast sadrži veće koncentracije kratkolančanih masnih kiselina (Kirin, 2016) što doprinosi boljoj probavljivosti sira te se smatra da je udio kolesterola u siru mali (Tratnik i Božanić, 2012). Sir je također vrlo bogat vitaminima od kojih su najvažniji vitamini A, B₂ i B₁₂. Sadržaj vitamina je vezan uz sadržaj masti i vode pošto su neki vitamini topljivi u vodi, a neki u mastima. Dakle, snižavanjem udjela vode u siru,

snižava se koncentracija u vodi topljivih vitamina i obrnuto. Sir je uz to i namirnica bogata mineralnim tvarima, posebno kalcijem, fosforom i magnezijem (Kirin, 2016).

Tratnik i Božanić (2012) navode kako zreli sir može biti izvor znatne količine proteina i esencijalnih aminokiselina, riboflavina i vitamina A. Nadalje, najbogatiji je izvor kalcija, namirnica je za osobe netolerantne na laktozu te je vrlo poželjna namirnica uz svaki obrok u danu (Tratnik i Božanić, 2012).

2.3. JESTIVI PREMAZI

Razgradnja plastike traje dugi vremenski period, a kako je ona jedna od glavnih materijala za ambalažu hrane, industrija se usmjerila na smanjenje otpada povezanog s tim materijalom. Polietilen, poliamid i polipropilen su neki od materijala koji se koriste kao ambalaža za pakiranje sira. Bio nerazgradivi su i nejestivi te mogu dovesti do migracije materijala u siru. Iz toga razloga njihova upotreba može biti ograničena sukladno zakonodavstvu. Premazi također nisu idejno rješenje jer migracija također može biti problem. Nakon nanošenja premaza na sir te njegovog skrućivanja, u slučaju voskova, može doći do migracije sastojaka premaza u sir. Navedeni problemi naveli su prehrambenu industriju u istraživanje i traženje alternativnih rješenja u vidu jestivih materijala za pakiranje (Robalo i sur., 2022; Costa i sur., 2018; Ramos i sur., 2011a). Industrija hrane i pakiranja, kao i potrošači, žele prirodne i biorazgradive materijale za pakiranje hrane koji će produžiti rok trajanja bez upotrebe prehrambenih aditiva (Seydim i sur., 2020; Ayana i Turhan, 2009).

Kao alternativa za razvoj novih materijala pojavili su se biopolimeri, prirodni lipidi i voskovi te proteini. Jestivi filmovi i premazi na bazi ovih spojeva jamče kvalitetu, a u isto vrijeme su i polupropusni za kisik, ugljikov dioksid i vodenu paru te omogućuju smanjenje gubitka vode. Velika prednost takvih jestivih filmova i premaza je u tome što se mogu koristiti kao nosači raznih antimikrobnih spojeva koji sprječavaju rast mikroorganizama na površini sira (Seydim i sur., 2020; Costa i sur., 2018). Stoga, iako nisu namijenjeni za potpunu zamjenu sintetičkih materijala, imaju puno poželjnih karakteristika te doprinose kvaliteti konačnog proizvoda. Vrlo je bitno da se dokaže njihova netoksičnost te da sastav bude u skladu sa zakonima i propisima koji vrijede za hranu (Ramos i sur., 2011a).

Osim poboljšanja kvalitete i sigurnosti hrane u vidu produljenja roka trajanja, jestivi premazi doprinose održavanju okusa, boje i hranjivosti sira. Njihova prednost je u tome što se mogu konzumirati sa sirom pri čemu se smanjuje otpad jer su biorazgradivi, mogu poboljšati nutritivna i organoleptička svojstva ovisno o tome što na kojoj bazi su pripremljeni te koje

dodatke imaju, odnosno mogu djelovati kao nosači bioaktivnih spojeva antimikrobnih i antioksidativnih svojstava čiji su izvor neke organske kiseline, esencijalna ulja, enzimi, začini, fungicidi, bakteriocini i biljni ekstrakti. List masline se koristio u narodnoj medicini na području Sredozemlja pa je tako i ekstrakt lista masline pokazao antibakterijsko djelovanje koje usporava rast mikroorganizama te inhibira neke enzime. Danas je ekstrakt lista masline (eng. *olive leaf extract*, OLE) poznat po svom visokom antioksidativnom, antimikrobnom i antibakterijskom djelovanju. Antioksidativno i antimikrobno djelovanje OLE-a izravno je povezano s njegovim polifenolima. Postoje istraživanja koja pokazuju da polifenoli mogu inhibirati rast patogenih mikroorganizama. Toplinska obrada, tehnike hladne pasterizacije, dodavanje konzervansa i nekih antimikrobnih sredstava u hranu ili primjena ovih aditiva na površine hrane mogu se koristiti za sprječavanje patogena (Erdohan i Turhan, 2012). S ove točke gledišta, raste i raznolikost materijala koji se mogu koristiti u sustavima premaza. Učinkovitost jestivih filmova i premaza ovisi o korištenim materijalima i njihovim ključnim svojstvima, kao što su topljivost, gustoća, viskoznost i površinska napetost. Obično se lipidi koriste za smanjenje prijenosa vode, polisaharidi za kontrolu prolaska kisika i drugih plinova, a proteini za osiguravanje mehaničke čvrstoće filmova. Ovi materijali su prihvaćeni kao glavne skupine sastojaka za stvaranje bilo koje vrste premaza ili filma. Uz ova tri glavna sastojka, u proizvodnji premaza i filmova također se koriste otapala, plastifikatori, emulgatori, antioksidansi i antimikrobna sredstva. Najvažnije svojstvo mnogih polisaharida i njihovih derivata je da su strukturno stabilni i sporo propuštaju kisik. Zbog niske cijene, jednostavne dostupnosti i dobrih svojstava stvaranja filma, naširoko se koriste za pripremu jestivih filmova i premaza. Škrob i njegovi derivati, celuloza i njegovi derivati, alginat, pektin, kitozan i guma koriste se u proizvodnji jestivih filmova i premaza za hranu na bazi polisaharida (Božanić i sur., 2022; Costa i sur., 2018).

Lipidi su dobre barijere protiv gubitka vlage, učinkoviti su za površinski sjaj voća i povrća te su otporni na prolaz plinova i pare. S druge strane, pri obradi lipida kao premaza treba uzeti u obzir otapala i visoke temperature. Lipidni spojevi kao što su prirodni i sintetski voskovi i gliceroli uglavnom su baze za jestive premaze od lipida. Od posebnog interesa su jestivi filmovi i premazi na bazi proteina. Premazi na bazi proteina su najmanje razvijeni materijali za premaze jer su općenito hidrofilni i osjetljivi na upijanje vlage. Iz tog razloga na njih jako utječu vlaga i vanjska temperatura. Imaju dobra barijerna svojstva za mehaničku otpornost, prijenos kisika, ugljikovog dioksida, arome i lipida te su otporni na propusnost vodene pare. Glavni biljni proteini su zein kukuruza, proteini pšenice, proteini soje, a proteini životinjskog porijekla su keratin, kolagen, želatina, kazein, protein miofibrila ribe, protein bjelanjaka i protein sirutke.

(Seydim i sur., 2020; Costa i sur., 2018; Ulusoy i sur., 2018; Ramos i sur., 2011b; Ramos i sur., 2012b; Ayana i Turhan, 2009).

2.3.1. Svojstva proteina sirutke

Mlijeko u svom proteinskom sastavu u najvećem postotku ima protein kazein (80 %) te zatim proteine sirutke (20 %). Proteini sirutke dobivaju se kao nusproizvod proizvodnje sira te sadrže različite koncentracije proteina s posebnim svojstvima. Postoje dvije vrste sirutke: kisela sirutka, koja se dobiva izravnim zakiseljavanjem mlijeka (kao što je slučaj kod proizvodnje svježeg sira) te slatka sirutka, koja se dobiva nakon enzimske koagulacije, tj koagulacije pomoću sirila koja se koristi u većini procesa proizvodnje sira (Ramos i sur., 2011). Sirutku čini ~ 94 % vode (6 % ukupne suhe tvari), 4,5 % laktoze, 0,8 % proteina i 0,7 % minerala. Ovakva sirutka se može sušiti kako bi se dobila sirutka u prahu (Kilara i Vaghela, 2018). U tablici 1 prikazan je udio proteina u sirutki.

Tablica 1. Udjel proteina u sirutki (Maćej i sur., 2007)

Proteinska frakcija	Prosječna koncentracija u sirutki (g L ⁻¹)
β-laktoglobulin	3,0
α-laktalbumin	0,7
Imunoglobulini	0,6
Proteoze peptoni	1,4
Albumin krvnog seruma	0.3
Ostalo (tragovi mnogih)	-
Ukupni proteini sirutke	6,0

2.3.2. Jestivi premazi na bazi proteina sirutke

Na tržištu su proteini sirutke dostupni u dva oblika, kao koncentrat proteina sirutke (WPC, eng. *whey protein concentrate*) koji sadrži 35, 50, 65 i 80 % (w/w) proteina ili izolati proteina sirutke (WPI, eng. *whey protein isolate*) koji sadrže najmanje 90 % proteina (Ramos i sur., 2012b). Koncentrati i izolati proteina sirutke mogu se dobiti različitim postupcima (uparavanje i sušenje, ultrafiltracija, reverzna osmoza, koagulacija toplinom i kiselinom), a najviše istraživani postupci dobivanja istih su membranski procesi ultrafiltracije i reverzne osmoze (Barukčić, 2013).

Posljednjih godina povećan je interes za proizvode koji sadrže proteine sirutke. Budući da proteini sirutke imaju dobru sposobnost stvaranja filma te predstavljaju dobru barijeru, posebno

za kisik. WPI može poslužiti kao nositelj raznih antimikrobnih spojeva koji pridonose produženju trajnosti te sigurnosti hrane na način da održavaju visoku koncentraciju bioaktivnih tvari na površini sira kroz dulji period vremena (Seydim i sur., 2020; Ramos i sur., 2012a). Jestivi filmovi na bazi proteina sirutke, osim što su jestivi i biorazgradivi, nutritivno obogaćuju sir sirutkom koja je glavni nusproizvod proizvodnje sireva (Seydim i sur., 2020; Costa i sur., 2018; Ulusoy i sur., 2018; Ramos i sur., 2012a; Ramos i sur., 2011b; Ayana i Turhan, 2009).

Potrebno je naglasiti da bi se jestivi film ili premaz na bazi proteina sirutke mogao smatrati jestivim, također i proces stvaranja ovojnice treba biti prikladan za rukovanje hranom, tj. sve što se dodaje kao aditiv mora biti kompatibilno s biopolimerima (Ramos i sur., 2012c).

Priprema filma na bazi proteina uključuje toplinsku obradu za denaturaciju proteina, nakon čega slijedi isparavanje otapala (lijevanje). Filmovi na bazi proteina mogli bi pokazati impresivna svojstva barijere za plin i mehanička svojstva u usporedbi s filmovima na bazi polisaharida i lipida jer proteini imaju jedinstvenu strukturu koja daje širi raspon funkcionalnih svojstava, posebno visok potencijal među molekularnog vezanja (Campos i sur., 2010). Međutim, zbog svoje topljivosti u vodi, imaju slaba barijerna svojstva protiv prijenosa vodene pare te to ograničava njihovu primjenu (Božanić i sur., 2022). Proteini mlijeka su među najčešćim izvorima proteina koji se koriste u proizvodnji filmova i premaza. Kazein i proteini sirutke, glavne frakcije proteina mlijeka (80 %, odnosno 20 %), od posebnog su interesa jer mogu pružiti visoku hranjivu vrijednost i dobar okus. U sustavima s jestivim filmom i sustavima s jestivim premazima, zabilježeno je da se antimikrobni agens polako prenosi sa filma na hranu, ostavljajući visoku koncentraciju antimikrobnog agensa u premazu i na površini hrane, čime se osigurava dugotrajno aktivnost protiv mikroorganizama (Kavas i sur., 2015).

2.3.3. Načini nanošenja jestivih filmova

Jestivi filmovi i premazi razlikuju se po načinu proizvodnje. Jestivi premazi se pripremaju u tekućem obliku te se kao takvi izravno nanose na površinu hrane nakon čega idu na sušenje. Jestivi filmovi se, za razliku od premaza, suše odvojeno te se nakon sušenja nanose na proizvod (Costa i sur., 2018).

Sir je najraznovrsnija skupina mliječnih proizvoda koju karakteriziraju različiti oblici, teksture, mirisi i okusi te složen sastav. Rok trajanja sira ograničen je zbog nekontroliranog i intenzivnog razvoja gljivica i bakterija na njegovoj površini, što može utjecati na njegovu kvalitetu.

Antimikrobni premazi nanoseni na površinu sira jedan su od načina da se ograniče negativne promjene do kojih može doći tijekom rukovanja i skladištenja. Ove jestive hidrokoloidne

prevlake također mogu zamijeniti nejestive komercijalne prevlake kao što je polivinil acetat (Galus i Kadzinska, 2015).

Jestivi premaz se može nanijeti na više način, a to ovisi o vrsti i veličini sira. Način nanošenja utječe na cijenu i učinkovitost premaza te bi trebao biti prilagođen procesu proizvodnje, tj. ovisno o procesu proizvodnje, može se nanositi na kraju proizvodnje, prije ili poslije sazrijevanja. Jestivi premaz se na sireve može nanositi uranjanjem, prskanjem ili mazanjem pomoću kistova ili četki, dok se jestivi film nanosi pojedinačno na proizvod. Način nanošenja koji garantira potpunu i ravnomjernu pokrivenost te pridonosi produženju roka trajanja je onaj koji će se koristiti. Tijekom odabira načina nanošenja premaza, bitno je u obzir uzeti vrstu sira, pa će se tako u sirarskoj industriji gdje se proizvode sirevi manjih dimenzija najčešće koristiti metoda mazanja pomoću kistova, a kod proizvodnje sireva većih dimenzija će se koristiti ili metoda prskanja (za sireve gdje je poželjno nanijeti tanji sloj premaza) ili metoda uranjanja (za sireve nepravilnih oblika) (Costa i sur., 2018).

Postoji nekoliko izazova koje treba savladati pri upotrebi jestivih filmova i premaza u prehrambenoj industriji:

- njihov učinak na neka organoleptička svojstva (boja i okus) sira može biti neprivačan potrošačima
- postizanje homogenizirane prekrivenosti površine namirnice
- potreba za većom količinom bioaktivnih spojeva u cilju razvoja učinkovitih premaza i filmova
- visoke cijene korištenih materijala, odnosno sastojaka koji povećavaju troškove proizvodnje (Costa i sur., 2018).

Idealan film ili premaz ne bi trebao ometati biokemijske i mikrobiološke promjene tijekom zrenja sira, već zaštititi površinu te produžiti trajnost sira (Youssef i sur., 2017).

Istraživanja su pokazala kako je dodatak antimikrobnih sredstava u jestivi film ili premaz puno učinkovitiji način obogaćivanja proizvoda u odnosu na izravan dodatak antimikrobnim sredstava u proizvod (Bagheripoor i sur., 2018).

2.3.4. Jestivi premazi u tehnologiji proizvodnje sira

Provode se istraživanja o ovom alternativnom sustavu pakiranja, posebno za korištenje s raznim vrstama sireva. Kvasci, plijesni i bakterije mogu se pojaviti na površini sira zbog vanjskih uvjeta okoline, što značajno smanjuje kvalitetu sira i zahtijeva razvoj prilagođenih materijala za pakiranje kako bi se spriječilo kvarenje. Kao alternativno pakiranje sira, jestivi premazi i filmovi nude poboljšanje organoleptičkih i nutritivnih svojstava sira i produljenje roka trajanja proizvoda zahvaljujući sastavu korištenog jestivog premaza i filma (Ulusoy i sur., 2018). Također je vrlo bitno da na neseni premazi budu neutralni s obzirom na senzorske karakteristike jer bi u protivnom mogli utjecati na senzorska svojstva tog sira (Ščetar i sur., 2019)

Antimikrobno pakiranje je inovativan način za sprječavanje rasta mikroorganizama u hrani uz očuvanje kvalitete, svježine i sigurnosti. Iako je interes za istraživanje u ovom području porastao, dostupnost antimikrobnih sredstava i novih polimernih materijala, regulatorna pitanja i odgovarajuće metode ispitivanja ograničavaju razvoj. Antimikrobna ambalaža strogo je regulirana u cijelom svijetu i istraživači moraju uzeti u obzir sve te propise (Erdohan i Turhan, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Ekstrakt lista masline je pripremljen po uzoru na rad Vranković (2022) koristeći lišće masline sorte oblice s područja Zadra gdje je lišće nakon skupljanja sušeno na zraku te skladišteno na mjestu zaštićenom od vlage i svjetlosti do proizvodnje ekstrakta.

Za proizvodnju jestivog premaza kao baza su korišteni proteini sirutke (Impact Whey Isolate) proizvođača The Hut.Com Ltd., Engleska. Nutritivna tablica korištenog izolata proteina sirutke nalazi se u tablici 2.

Tablica 2. Nutritivna tablica – Impact Whey Isolate (The Hut.Com Ltd., Engleska)

Prosječne hranjive vrijednosti na	100 g
Energetska vrijednost	1584 kJ / 373 kcal
Masti	0,3 g
- od kojih zasićene masne kiselina	0,3 g
Ugljikohidrati	2,5 g
- od kojih šećeri	2,5 g
Vlakna	0 g
Bjelančevine	90 g
Sol	0,50 g

Za proizvodnju sireva je korišteno svježe mlijeko proizvođača mini mljekara Veronika d.o.o. koje je pasterizirano i nehomogenizirano s udjelom mliječne masti od 3,2 %.

3.1.1. Kemikalije

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

- 2 %-tni fenolftalein (Gram-Mol, Hrvatska)
- Kobaltov sulfat ($\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) (Lach-Ner, Hrvatska)
- 0,1 M NaOH (Gram-Mol, Hrvatska)

Kemikalije korištene za određivanje udjela mliječne masti metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu:

- Sumporna kiselina (Gerberova, gustoće $1,520 \text{ g cm}^{-3}$)
- Izoamilni alkohol

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

- Galna kiselina
- Etanol (96 %-tni) (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 odmjerne tikvica od 1 L nadopunjena do oznake. Tako pripremljena otopina je nakon 24 h profiltrirana.

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

- Kvercetin
- Metanol (Gram-Mol, Hrvatska)
- Otopina aluminijevog klorida anhidrida (AlCl_3), 10 %-tna (w/v), (VWR, Belgija)

Priprema: Odgovarajuća količina AlCl_3 je otopljena u destiliranoj vodi.

- Otopina kalijeva acetata, 1 M (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 antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

- Trolox, 2 mM otopina
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Gram-Mol, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (HCl), 40 mM

Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano je $330 \mu\text{L}$ 37 %-tne HCl te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

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

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

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 ($\text{CH}_3\text{COOH} \times 3 \text{H}_2\text{O}$), (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (100 % Merck, Darmstadt, Njemačka): pripremljeno razrjeđenje na koncentraciju 99 %

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

Priprema: 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 reagensu u omjeru 10:1:1.

Kemikalije korištene za određivanje ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu i količinu organskog dušika u tvarima topljivim u TCA metodom po Kjeldahlu:

- 24 %- tna trikloroctena kiselina (TCA)

Priprema: Odgovarajuća količina TCA je odvagana i kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 200 mL te nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- Obojeni indikatori:

- Metil crveno – otopiti 200 mg u 100 mL 95 % etanola
- Bromkrezol zeleno – otopiti 200 mg u 100 mL 95% etanola

- Sumporna kiselina (H_2SO_4), koncentrirana (96-98 %)

- Natrijev hidroksid (NaOH), 40 %-tna otopina

Priprema: Na tehničkoj vagi je odvagano 400 g NaOH te otopljeno u 1 L destilirane vode.

- 4 %-tna borna kiselina (H_3BO_3)

Priprema: U cca 800 mL prokuhane destilirane vode otopi se 40 g borne kiseline i promiješa. Tako pripremljena otopina se ohladi na sobnu temperaturu te se doda 12,5 mL bromkrezol zelene otopine i 8,75 mL otopine metil crveno. Odmjerna tikvica od 1 L se zatim dopuni do oznake destiliranom vodom.

- Katalizator: Kjeldahl-ove tablete ili soli kalijev sulfat (K_2SO_4) i bakrov (II) sulfat ($CuSO_4$)
- HCl, 0,1 M titrival

Kemikalije potrebne 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 laduicu 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)

Kemikalije potrebne za proizvodnju jestivog premaza:

- Glicerol (GramMol, Zagreb, Hrvatska)
- Tween20 (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Suncokretovo ulje (Zvijezda plus d.o.o., Hrvatska)

3.1.2. Aparatura

- Spektrofotometar (UV-1600PC Spectrophotometer, VWR, SAD)
- Kolorimetar (CM-700d, Konica Minolta, Japan)

- Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., West Sussex, UK)
- Uređaj za centrifugu (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)
- Blok za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska)
- Digestor (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska)
- Kjeltec i Destiling Unit sustav za destilaciju (2100 Distillation Unit, FOSS)
- Električni grijač s magnetskom mješalicom
- Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Centrifuga po Gerberu
- Homogenizator (IKA- Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Mufolna peć

3.1.3. Pribor

- Filter papir S&S 597^{1/2}
- Mikropipeta Kartell volumena 100-1000 μ L
- Odmjerne tikvice volumena 10, 100, 500 i 1000 mL
- Pipete volumena 1, 5, 10, 20 i 25 mL
- Menzura volumena 100, 200, 500 i 1000 ml
- Falcon epruvete (50 mL)
- Laboratorijske čaše 50, 300, 1000, 2000 ml
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Kvarcne kivete
- Plastične lađice za vaganje
- Metalne žličice

- Kiveta za Kjeltec sustav (500 mL)
- Tarionit s tučkom
- Bireta
- Staklene boce
- Štapić po Drigalskom
- Staklena zrnca
- Sterilne Petrijeve zdjelice
- Infuzijske boce
- Plamenik
- Porculanske zdjelice
- Aluminijske posude
- Eksikator
- Termometar
- Stakleni štapić
- Butirometar
- Čep za butirometar
- Erlenmeyerove tikvice od 100, 250, 300, 1000 i 2000 mL

3.2 METODE

3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline

Ekstrakt lista masline je proizveden po uzoru na rad Vranković (2022). Usitnjeni list masline je podvrgnut ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE), a otapalo koje se koristilo je bilo destilirana voda. Ekstrakcija je provedena pri uvjetima temperature od 80 °C i tlaka 100 bara, a vrijeme trajanja ekstrakcije bilo je 2 minute. Kako bi se ekstrakt odvojio od ostatka biljnog materijala, nakon ekstrakcije je provedena filtracija, a dobiveni filtrat je pasteriziran (90 °C / 5 min) te skladišten u hladnjaku do uparavanja. Uparavanje se provelo na rotavaporu i to do otprilike 16 % suhe tvari (Vranković, 2022). Takav koncentrirani ekstrakt skladišten je u zamrzivaču do upotrebe.

3.2.2. Priprema jestivog premaza na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline

Pripremljene su tri vrste jestivih premaza. Za pripremu jestivog premaza, 8 g izolata proteina sirutke (Impact Whey Isolate) kvantitativno je preneseno u Erlenmeyerovu tikvicu te je dodano

100 ml destilirane vode. Erlenmeyerova tikvica je postavljena na električni grijač s magnetskom miješalicom. Smjesa je zagrijana na 80 °C kako bi se proteini denaturirali te je ta temperatura održavana 20 minuta uz konstantno miješanje. Erlenmeyerova tikvica je uklonjena sa grijača te je sadržaj ohlađen do sobne temperature. Nakon hlađenja je u Erlenmeyerovu tikvicu kao plastifikator dodano 4 g glicerola te je tikvica vraćena na električni grijač sa magnetskom miješalicom gdje se smjesa dalje miješala još 20 minuta, ali bez zagrijavanja. Nakon 20 minuta dodano je 0,8 g suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.) te približno 0,016 g Tween20 te se miješalo još 20 minuta.

Plastifikatori su sredstva koja unaprjeđuju fleksibilnost i rastezljivost jestivih premaza na bazi proteina sirutke. Ramos i sur. (2011b) navode da plastifikatori olakšavaju nanošenje takvih jestivih filmova i premaza jer se postavljaju između proteinskih lanaca, smanjujući tako međumolekulske sile na način da se povećavaju fleksibilnost i elastičnost. Također navode i da posljedica dodavanja plastifikatora može biti povećanje koeficijenta difuzije za plinove i vodenu paru te smanjenje kohezije i čvrstoće tih filmova. Jestivi filmovi i premazi na bazi proteina sirutke u pravilu zahtijevaju udio plastifikatora u rasponu od 30 do 60 % (w/w), a ta razina ovisi o izboru plastifikatora i željenim svojstvima filmova ili premaza (Ramos i sur., 2011b).

Suncokretovo ulje je dodano kako bi se smanjila propusnost vodene pare, tj. kako bi se smanjila dehidracija sira. Drugi razlog dodatka suncokretovog ulja je postizanje veće kompatibilnosti u smislu polariteta između ovojnice i površine sira koja je hidrofobna. Tween20 se dodaje kao površinski aktivna tvar kako bi se prevladala tendencija razdvajanja faza između polimerne smjese WPI te kao emulgator za pomoć u otapanju eteričnih ulja ili biljnih ekstrakata prilikom pripreme jestivih filmova ili premaza (Ramos i sur., 2011d).

U dvije vrste premaza je nakraju dodan ekstrakt na način da je u jedan premaz dodan ekstrakt gdje je koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, a u drugi premaz ekstrakt koncentracije polifenola u iznosu od 159,35 mg L⁻¹. Treći premaz je pripremljen bez dodatka ekstrakta lista masline.

3.2.3. Proizvodnja polutvrdog sira s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline postupkom enzimske koagulacije

Proizvedene su četiri vrste uzoraka sireva: kontrolni sir, sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke bez dodatka ekstrakta lista masline, sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola = $26,3 \text{ mg L}^{-1}$) te sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola = $159,35 \text{ mg L}^{-1}$).

Za proizvodnju sireva korišteno je 12 L svježeg pasteuriziranog i nehomogeniziranog mlijeka sa 3,2 % mliječne masti. Svježe mlijeko je zagrijano na $35 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega je dodano 3,6 g CaCl_2 (Gram-mol, Hrvatska) prethodno otopljenog u malo toplog mlijeka i 120 mL kulture (Jogurt Fortia koji sadržava kulturu *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus casei* 431). Nakraju je dodano 2,4 mL sirila (BioRen® Classic 80LHA150 tekuće sirilo) otopljenog u 10 puta većoj količini prokuhane i ohlađene destilirane vode. Kako bi došlo do koagulacije, mlijeko je stavljeno na otprilike sat vremena u termostat na temperaturu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobiveni gruš izrezan je na kockice i ostavljen neko vrijeme kako bi se izdvojila sirutka. Nakon što se sirutka izdvojila gruš je prebačen u male kalupe prekrivene gazom.

Sirevi su se prvo cijedili pod vlastitom težinom otprilike 6 sati, a zatim su postavljeni utezi te su sirevi ostavljeni na prešanje 24 sata uz okretanje. Nakon prešanja, sirevi su izvađeni iz kalupa te su stavljani u prethodno pripremljenu salamuru na soljenje. Salamura je pripremljena na način da se napravi 18 %-tna otopina NaCl (Kirin, 2016) te se provede pasterizacija na $72 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 15 minuta. Potom se odvagne i doda 0,15 % CaCl_2 . Salamura se ohladi na $11 \text{ }^\circ\text{C}$ te se u njoj sirevi drže otprilike 3 sata nakon čega idu na sušenje (Kirin, 2016).

Na sireve se zatim nanose filmovi sa obje strane uz sušenje na svakoj strani otprilike 12 sati. Nakon što se film osuši, sirevi se pakiraju u plastične vrećice te kao takvi idu na zrenje. Uvjeti zrenja su temperatura $11\text{-}13 \text{ }^\circ\text{C}$ te vlažnost 75-85 % (Kirin, 2016). Slika 1 prikazuje proizvedene uzorke.



Slika 1. Uzorci pakirani u plastične vrećice (*vlastita fotografija*)

Proizvedeni sirevi su označeni kako je opisano u tablici 3.

Tablica 3. Oznake uzoraka sireva

UZORCI SIREVA	OZNAKE
Sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke, bez dodatka ekstrakta lista masline	Uzorak A
Sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola = 26,3 mg L ⁻¹)	Uzorak B
Sir s jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline (koncentracija polifenola 159,35 mg L ⁻¹)	Uzorak C
Kontrolni uzorak sira	Uzorak K

3.2.4. Određivanje aktiviteta vode sireva

Aktivitet vode sireva određen je laboratorijskim a_w -metrom (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska). a_w -metar se spoji s posudicom u koju je prethodno dodan usitnjeni uzorak sira te se započne mjerenje. Mjerenje se započinje pritiskom na tipku uređaja, a gotovo je nakon zvučnog signala. Vrijednost a_w se očitava s ekrana uređaja.

3.2.5. Određivanje kiselosti sira

a) Određivanje pH-vrijednosti sira

Uzorak sira se usitni u tarioniku i pomiješa sa prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom u omjeru 3:10. Elektroda pH-metra se uroni u homogeniziranu smjesu te se očita pH-vrijednost s pH-metra (ProfiLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka) (Božanić i sur., 2010).

b) Određivanje titracijske kiselosti sira metodom po Soxhlet-Henkelu

U dvije Erlenmeyerove tikvice odvaži se po 5 g sira koji se prethodno usitni i otopi u tairioniku uz dodatak manje količine destilirane vode zagrijane na 50 °C. Dobivene smjese kvantitativno se prenesu u Erlenmeyerove tikvice tako da ukupna količina bude 100 mL. U prvu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 1 mL otopine kobaltovog sulfata i tu otopinu koristimo kao standardnu boju do koje se moraju titrirati uzorci. U drugu Erlenmeyerovu tikvicu se doda 1 mL 2 %-tnog fenolftaleina i titrira sa 0,1 M NaOH do pojave blijedocrvene boje identične boji u prvoj tikvici (Božanić i sur., 2010).

Izračun kiselosti sira radi se prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 8 \times f \quad [1]$$

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

f = faktor otopine NaOH

8 = razrjeđenje

1.1.1. Određivanje udjela mliječne masti u siru metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu

Ova metoda zasniva se na kemijskom otapanju kazeina i zaštitne opne globula mliječne kiseline koristeći sumpornu kiselinu. Kako bi se masti lakše odvojile dodaje se izoamilni alkohol koji snizuje površinsku napetost. Mast se odvoji centrifugiranjem i količina masti se očita na skali butirometra pri 65 °C.

Postupak:

U staklenu čašu se odvaži 2-2,5 g sira i otpipetira 10 mL sumporne kiseline (Gerberova, gustoće 1,520 g cm⁻³) te se sadržaj zagrijava u vodenoj kupelji. Sadržaj je potrebno stalno miješati, a kada se sir otopi, sadržaj iz staklene čaše se prenese u butirometar za sir, a čaša ispere sa 9 mL sumporne kiseline. Nakon toga se u butirometar otpipetira 1 mL izoamilnog alkohola i zatvori čepom za butirometar. Uzorci se zatim u centrifugi po Gerberu centrifugiraju 5 minuta pri 1200-

1300 okretaja/min. Butirometar se nakon centrifugiranja stavi na 5 minuta u vodenu kupelj pri 65 °C nakon čega se očita postotak masti (Božanić i sur., 2010).

Izračun udjela mliječne masti u siru:

$$\% \text{ masti u siru} = m \times 11,33 / A \quad [2]$$

Gdje je m = očitani postotak masti na butirometru

A = odvaga sira u gramima

3.2.6. Određivanje pepela u siru

Određivanje udjela pepela u namirnicama temelji se na karbonizaciji uzorka. Mineralni ostatak namirnice nakon spaljivanja predstavlja udio pepela. Pepeo predstavlja anorganski dio namirnice koji je zaostao nakon što je sva organska tvar spaljena (Božanić i sur., 2010).

Postupak:

U prethodno izarenu, u eksikatoru ohlađenu i izvaganu porculansku zdjelicu odvagano je 3 g uzorka. Uzorak se zagrijava na plameniku u porculanskoj zdjelici dok potpuno ne pougljeni. Zatim se takav uzorak prebacuje u Mufolnu peć zagrijanu na 550 °C i ostavi peći do postizanja jednolično svijetlo sivog pepela. Nakon spaljivanja, porculanska zdjelica s pepelom je prenesena u eksikator gdje je ohlađena te izvagana. Postupak se ponavlja do konstantne mase.

Izračun:

$$\% \text{ pepela} = \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna zdjelica}}{\text{odvaga uzorka}} * 100 \quad [4]$$

3.2.7. Određivanje ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu i količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) metodom po Kjeldahlu

Metode određivanja ukupnog dušika u vodenom ekstraktu i količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) odvijaju se kroz tri koraka. Ti koraci su spaljivanje (mineralizacija), destilacija i titracija. U toku zagrijavanja uzorka uz dodatak

sumporne kiseline i katalizatora dolazi do razaranja organskih tvari u uzorku (Marković i sur., 2017).

Priprema uzorka:

U 20 g odvaganog i naribanog sira doda se 180 mL destilirane vode zagrijane na 50 °C. Sadržaj se homogenizira 2 minute te se nakon toga stavlja u vodenu kupelj s tresilicom koja je prethodno zagrijana na 50 °C u trajanju od 1 h. Uzorci se zatim ohlade do sobne temperature te se centrifugiraju 30 minuta pri 2400 x g i 4 °C. Nadtalog se zatim filtrira u Erlenmeyerovu tikvicu kroz filter papir S&S 597^{1/2}.

Postupak određivanja:

Za analizu se koristi 24 %-tna TCA. U 20 mL vodenog ekstrakta doda se 20 mL 24 %-tne TCA da konačna koncentracija TCA bude 12 %. Sadržaj se snažno miješa te se smjesa ostavi na sobnoj temperaturi preko noći kako bi se odvojio talog (neproteinski dušični spojevi). Sutradan se smjesa filtrira kroz filter papir S&S 602H^{1/2}.

20 mL vodenog ekstrakta i 20 mL ekstrakta obrađenog s TCA suši se preko noći u sušioniku na 60 °C. U osušene ekstrakte doda se 12 mL sumporne kiseline i dvije tablete katalizatora (Kjeltabs sastavljene od 3,5 g K₂SO₄ i 0,4 g CuSO₄ x 5H₂O) te se stavi u blok za spaljivanje na 420 °C u trajanju od 90 minuta.

Nakon spaljivanja, uzorci se analiziraju Kjeltec analizatorom na način da se u ohlađenu kivetu doda 80 mL destilirane vode, a tako dobivena otopina ide na destilaciju. Na postolje u destilacijskoj jedinici postavi se Erlenmeyerova tikvica od 250 mL, u koju je prethodno otpipetirano 25 mL borne kiseline, tako da cjevčica bude uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta se stavi na svoje mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Dozira se 70 mL 40 %-tne NaOH u Kjeldahlovu epruvetu. Destilacija se odvija 4 minute, a destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka. Destilat se zatim titrira sa 0,1 M HCl dok boja ne postane ista kao što je bila borna kiselina prije destilacije.

Iz utrošenih mL i koncentracija titranata izračuna se količina dušika u vodenom ekstraktu prema formuli:

$$\text{Udio u vodi topljivog N u siru}(\%) = \frac{\text{mL titranta}(0,1 \text{ M HCl}) \times \text{Ar}(\text{N})}{20 \text{ mL}} \quad [5]$$

Gdje je Ar (N) - relativna atomska masa dušika = 14,007

Za praćenje proteolize relevantan je podatak o postotku ukupnog N u siru koji je topljiv u vodi i prelazi u vodeni ekstrakt.

$$\text{Ekstrahirani N (\%)} = \frac{\text{N u vodenom ekstraktu}}{\text{ukupni N u siru}} * 100 \quad [6]$$

3.2.8. Određivanje ukupnih fenola u polutvrdom siru s Folin-Ciocalteu reagensom

Određivanje ukupnih fenola se provodi na ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolorimetrijskom reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem apsorbancije pri 765 nm (modificirano prema Shortle i sur., 2014).

Priprema uzorka:

20 grama uzorka sira homogenizira se s 20 mL destilirane vode. Tako homogeniziran uzorak ide na centrifugiranje 10 minuta na 10 000 rpm pri 5 °C. Dobiveni ekstrakt se izdvoji mikropipetom i skladišti na 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

Postupak određivanja:

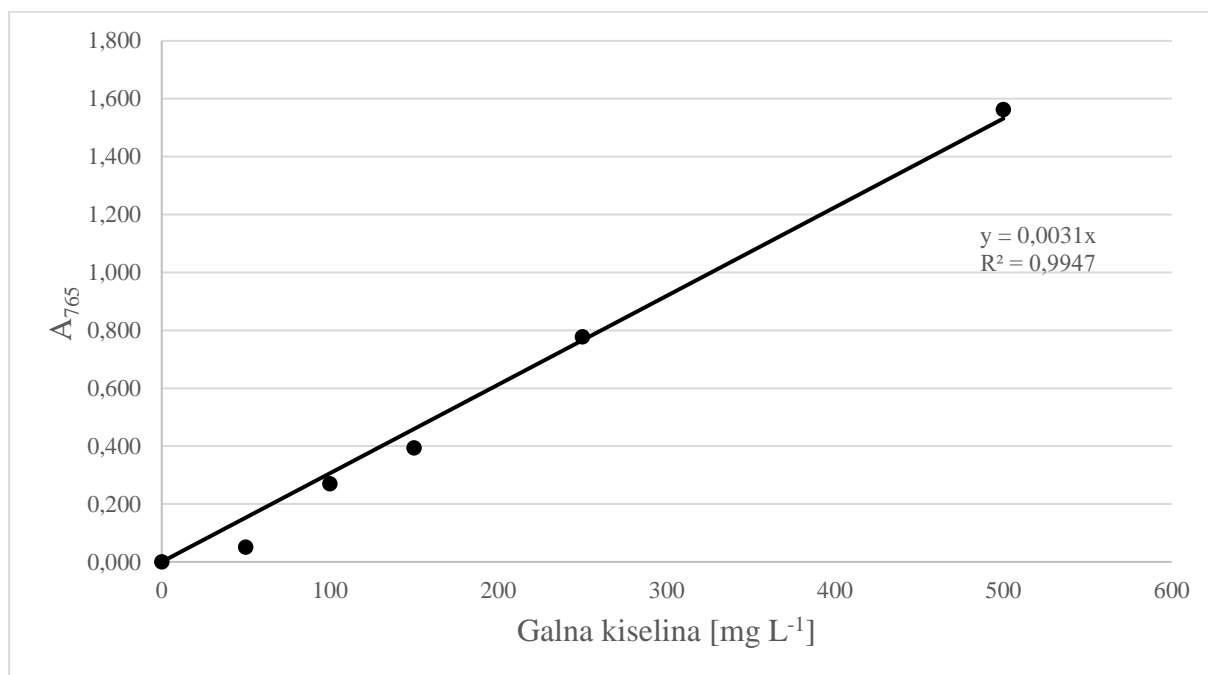
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,1 mL ekstrakta uzorka, 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te se nakon nekoliko minuta opipetira još i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %-tna). Sadržaj u epruveti se dobro promiješa na vortexu te se stavi u vodenu kupelj na termostatiranje 25 minuta na temperaturi 50 °C. Nakon termostatiranja se na spektrofotometru mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način je pripremljena slijepa proba s tim da se umjesto 0,1 mL uzorka doda 0,1 mL destilirane vode.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca na analitičkoj vagi je odvagano 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici volumena 100 mL, a zatim se ona do oznake nadopuni destiliranom vodom. Od pripremljene otopine se zatim rade razrjeđenja u odmjernim tikvicama volumena 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standarda galne kiseline te se zatim tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake. Koncentracije tako pripremljene galne kiseline iznose redom 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹.

Iz svake tikvice se otpipetira 0,1 mL otopine standarda u staklene epruvete. U njih se zatim dodaje redom 0,2 mL F.C. reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta doda se još 1 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata. Sve se skupa pomiješa pomoću Vortexa te se

uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50 °C. Za slijepu probu se uzorak priprema na isti način samo što se umjesto otopine standarda otpipetira 0,1 mL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 765 nm te se na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtaju baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel. Koncentracija ukupnih fenola se zatim izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca (Slika 2).



Slika 2. Baždarni pravac za galnu kiselinu (GAE)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0031x \quad [7]$$

Gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm,

x – ekvivalent GAE (mgL⁻¹)

Uzorci su bili razrjeđivani pa je koncentracija ukupnih fenola izračunata prema formuli:

$$X \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = X' \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} * \text{razrjeđenje} \quad [8]$$

Gdje je:

X – koncentracija ukupnih fenola u uzorku,

X' – Y/0,0031

3.2.9. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uzorku sira FRAP metodom

Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojen produkt. FRAP vrijednosti se najčešće izražavaju preko askorbinske kiseline, FeSO_4 ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

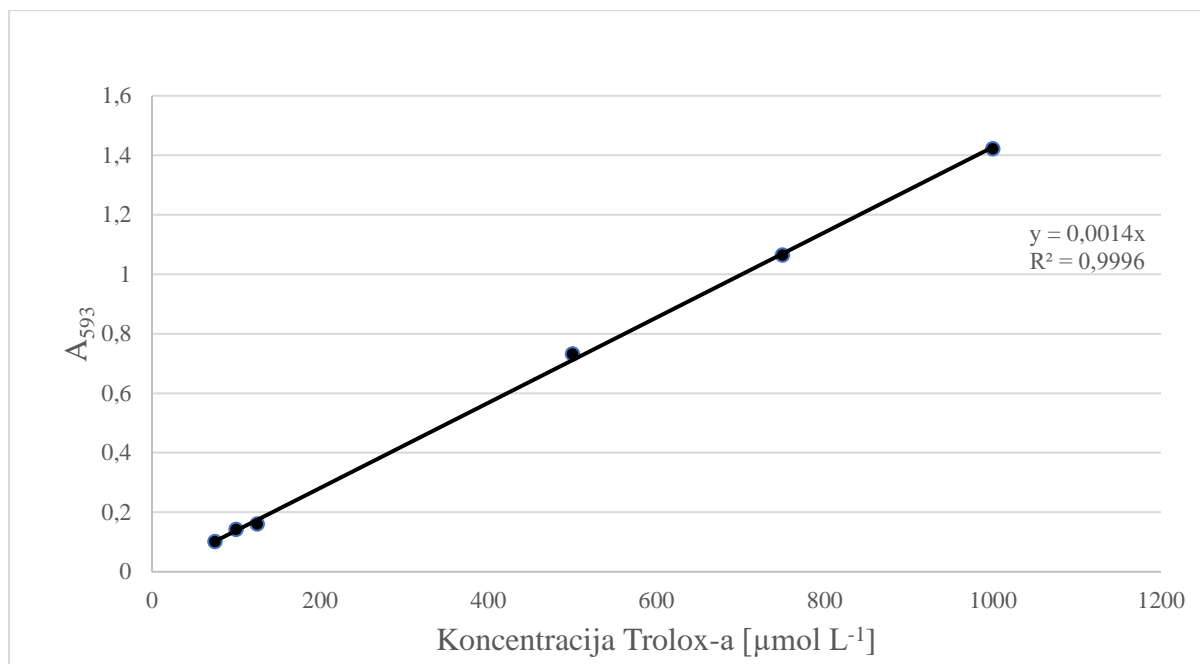
Postupak:

Uzorak se priprema na isti način kao i za određivanje ukupnih fenola. U staklene epruvete otpipetira se redom 240 μL destilirane vode, 80 μL prethodno pripremljenog ekstrakta uzorka i 2080 μL FRAP reagensa. Sadržaj se dobro promiješa na Vortexu te se 5 minuta termostatira u vodenoj kupelji na temperaturi 37 °C. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 593 nm. Na isti način se priprema i slijepa proba koja u sebi sadrži sve osim uzorka, umjesto kojeg je u istoj količini otpipetirana destilirana voda.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremljena je 2 mmol L^{-1} otopina Trolox-a od koje su pripremljena razrjeđenja koncentracija 75, 100, 125, 500, 750 i 1000 μM .

Iz svake tikvice otpipetira se redom 240 μL destilirane vode, 80 μL pripremljene otopine te 2080 μL FRAP reagensa. Sve skupa se dobro promiješa pomoću Vortexa te se stavi na termostatiranje u vodenu kupelj pri 37 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon termostatiranja je na 593 nm izmjerena apsorbanca te se iz dobivenih rezultata pomoću programa Microsoft Excel izradio baždarni dijagram prikazan na slici 3 iz kojeg je onda određen antioksidacijski kapacitet uzorka.



Slika 3. Baždarni pravac za Trolox

Na temelju dobivenih rezultata apsorbancije jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0014x \quad [9]$$

Gdje je:

y – apsorbancija pri 593 nm,

x – ekvivalent Trolox-a

Uzorci su bili razrjeđivani pa je antioksidacijski kapacitet izračunat prema formuli:

$$X \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = X' \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} * \text{razrjeđenje} \quad [10]$$

Gdje je:

X – koncentracija ukupnih fenola u uzorku,

X' – Y/0,0014

3.2.10. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

Koncentracija ukupnih flavonoida u siru određena je spektrofotometrijski, a metoda se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji aluminijskoga klorida koja ima apsorpcijski maksimum pri 415 nm (Aryal i sur, 2019). Vrijednosti ukupnih flavonoida iskazuju se preko kvercetina.

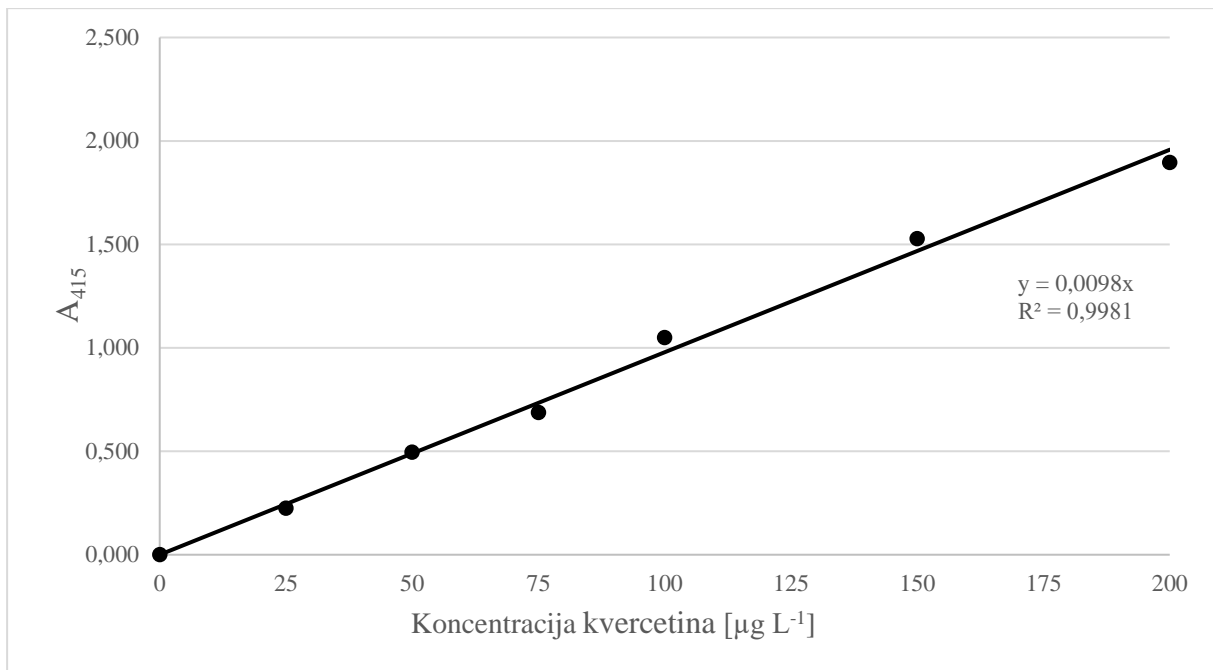
Postupak određivanja:

Za određivanje ukupnih flavonoida korišten je isti supernatant kao i za određivanje ukupnih fenola i određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom. U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 1 mL uzorka, 0,2 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 , 0,2 mL, 0,2 mL 1 M otopine kalijevog acetata te 5,6 mL destilirane vode. Sve skupa je prije stavljanja na inkubiranje promiješano pomoću Vortexa. Sadržaj je inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je očitana apsorbanca pri 415 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način samo je umjesto uzorka otpipetirana destilirana voda u istoj količini.

Izrada baždarnog pravca:

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

Iz svake tikvice se u staklene epruvete otpipetira redom 1 mL pripremljene otopine kvercetina, 0,2 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 , 0,2 mL 1 M otopine kalijevog acetata te 5,6 mL destilirane vode. Sve skupa se pomiješa pomoću Vortexa te se inkubira na sobnoj temperaturi 30 min, a zatim se očitava apsorbanca pri 415 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način samo što se umjesto otopine kvercetina doda 1 mL destilirane vode. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbanca se u programu Microsoft Excel izradi baždarni pravac prikazan na slici 4 te se iz njega izračuna koncentracija ukupnih flavonoida.



Slika 4. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih rezultata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0098x \quad [11]$$

Gdje je:

y – apsorbancija pri 415 nm,

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

Uzorci su također bili razrjeđivani pa je koncentracija ukupnih flavonoida izračunata prema formuli:

$$X (\text{mg mL}^{-1}) = X' (\text{mg mL}^{-1}) * \text{razrjeđenje} \quad [12]$$

Gdje je:

X – koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku,

X' – Y/0,0098

3.2.11. Određivanje indeksa boje kolorimetrom

Boja sira određuje se CIELAB metodom koja je ustanovljena od strane Commission Internationale de L'Eclairage (Lancaster i sur., 1997). U današnje vrijeme, to je najčešće korištena metoda. Zasniva se na mjerenju tri dimenzije u prostoru boje. Mjerenje se izražava pomoću nekoliko parametara – L^* , a^* i b^* vrijednost. L^* označava svjetlinu gdje je 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijelu boju. Parametar a^* ima raspon od -100 do +100 gdje -100 označava čisto zelenu boju, a +100 čisto crvenu boju. Parametar b^* također ima raspon od -100 do +100, ali ovdje pak -100 označava čisto plavu boju, a +100 čisto žutu boju. Ukupnu promjenu boje (ΔE) moguće je dobiti iz formule:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_{ref}^*)^2 + (a^* - a_{ref}^*)^2 + (b^* - b_{ref}^*)^2} \quad [13]$$

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

U tablici 4. navedeno je kako se interpretira razlika u boji preko ΔE^* .

Tablica 4. Percepcija boje kod promatrača 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

3.2.12. Određivanje teksture sira

Određivanje teksture sira provedeno je teksturometrom. Uzorci sireva rezani su na kockice veličine 1 cm³, postavljeni na sredinu postolja teksturometra i podvrgnuti kompresiji dva puta (metoda dvostrukog zagriža) do 50 % deformacije ćelijom mase 50 kg. Kompresija je provedena brzinom 1 m s⁻¹ s razmakom od 5 sekundi između dva ciklusa. Za obradu podataka korišten je softver NexygenPlus.

3.2.13. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda

U ovom radu provodila se mikrobiološka analiza polutvrđih sireva. U svim sirevima određivao se broj kvasaca i plijesni (KiP), broj enterobakterija (E), ukupan broj bakterija (UB) te broj koagulaza pozitivnih stafilocoka (S). Mikrobiološka analiza sireva provodila se 1. i 60. dan skladištenja u plastičnim vrećicama u kontroliranim uvjetima zrenja sireva. Mikrobiološke analize provodile su se direktnom metodom nacjepljivanja decimalnih razrjeđenja na hranjive podloge te potom inkubacijom na temperaturama pogodnim za rast analiziranih mikroorganizama (Božanić i sur., 2010). Kao referentne vrijednosti za ukupan broj bakterija, kvasce i plijesni te enterobakterije 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 te usitnjeno u tarioniku uz postupno dodavanje 90 mL 2 %-tne otopine natrijevog citrata koji je prethodno zagrijan na oko 45 °C. Sadržaj tarionika kvantitativno se prenio u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima i prije pipetiranja, te pripreme decimalnih razrjeđenja, sadržaj se dobro homogenizira.

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, začepile su se te su autoklavirane pri 121 °C 15 minuta.

Priprema 2 %-tne otopine natrijevog citrata:

Odvagano je 20 g soli i otopljeno u 1000 mL destilirane vode. Destilirana voda se zagrije na 45 – 50 °C i nakon toga se doda 20 g soli. Tako pripremljena otopina prelije se u boce po 180 mL te autoklavira pri 121 °C 15 minuta.

Priprema decimalnih razrjeđenja:

Iz prethodno pripremljenog homogeniziranog uzorka se sterilnom pipetom otpipetira 1 mL uzorka u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine te se nastalo razrjeđenje dobro homogenizira na Vortexu. Nakon toga se 1 mL homogeniziranog razrjeđenja sterilnom pipetom prenese u 9 mL fiziološke otopine te se sadržaj dobro homogenizira na Vortexu. Opisani postupak se ponavlja dok se ne dobije željeni broj decimalnih razrjeđenja.

Priprema hranjivih podloga:

Točno određena količina hranjive podloge, koja je navedena od strane proizvođača, se odvažte kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu. Erlenmeyerova tikvica se zagrije na električnom grijaču s magnetskom miješalicom kako bi se sav sadržaj tikvice otopio. Nakon što se sav sadržaj otopi, dobivena hranjiva podloga (za određivanje ukupnog broja bakterija i broja kvasci i plijesni) se razlije u infuzijske boce, začepi i sterilizira u autoklavu na 121 °C 15 minuta. Dobivena hranjiva podloga za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka se sterilizira

u autoklavu na 121 °C 15 minuta, nakon toga se doda *eggyolk*, promiješa se te se nakon toga razlije u sterilne Petrijeve zdjelice u kojima se na hladnom mjestu čuva do upotrebe. Hranjiva podloga za enterobakterije se pripremala na način kao i za određivanje ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni.

Nacijepljivanje i inkubacija ploča:

Da bi odredili broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorku sira, mikropipetom se otpipetira 100 µL homogeniziranog decimalnog razrjeđenja na čvrstu hranjivu podlogu. Uzorak se jednoliko razmaže 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. Nacijepljena ploča za enterobakterije se inkubira 24h na temperaturi 37 °C, a nacijepljena ploča za koagulaza pozitivne stafilokoke se inkubira 48 sati na temperaturi od 32 °C.

Za određivanje ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni, mikropipetom se uzme 1 mL prethodno homogeniziranog decimalnog razrjeđenja te otpusti u sterilnu Petrijevu zdjelicu. Nakon pipetiranja razrjeđenja u sterilne Petrijeve zdjelice, u svaku se dodaje 10-12 mL hranjive podloge koja je prethodno rastopljena na temperaturi višoj od 100 °C te ohlađena u vodenoj kupelji na 45 °C. Nakon izlijevanja hranjive podloge, ploča se promiješa blagim kružnim pokretima te se pričekava 10 do 15 minuta da se podloga potpuno skrutne. Ploče se zatim okreću naopako te inkubiraju i to nacijepljena ploča za ukupan broj bakterija na 32 °C 48 h, a nacijepljena ploča za broj kvasaca i plijesni na sobnoj temperaturi 72 sata.

Očitavanje rezultata:

Na brojaču kolonija broje se narasle kolonije. U slučaju da su kolonije presitne, broje se pod određenim povećanjem. Za brojanje se odabiru ploče na kojima je naraslo između 30 i 300 kolonija. Broj kolonija se zatim pomnoži s decimalnim razrjeđenjem te se na taj način odredi broj mikroorganizama u 1 mL uzorka.

Interpretacija rezultata:

Kriteriji za praćenje mikrobiološke kvalitete sira preuzeti su za enterobakterije i kvasce i plijesni iz Vodič 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

3.2.14. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom

Antimikrobna aktivnost jestivog premaza na bazi proteina sirutke obogaćenog ekstraktom lista masline određivana je disk difuzijskom metodom. Svo korišteno posuđe, pribor i otopine prethodno je sterilizirano, a svi postupci određivanja provedeni su u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu.

Princip metode:

Metoda se temelji na određivanju promjera zone inhibicije koja se pojavljuje oko diska prethodno natopljenog ispitivanim spojem koji je postavljen na čvrstu hranjivu podlogu prethodno inokuliranu test mikroorganizmom. Medij u kojem rastu patogeni, uvjeti, vrijeme inkubacije te koncentracija mikroorganizama određeni su prema CLSI (eng. The Clinical & Laboratory Standards Institute) standardima. Rezultati ove metode su kvalitativni i omogućavaju razvrstavanje test mikroorganizama na umjereno osjetljive, osjetljive i rezistentne u odnosu na korišteno antimikrobno sredstvo (Balouiri i sur., 2016).

Postupak određivanja:

Pripremljene homogenizirane suspenzije čiste mikrobne kulture test mikroorganizma naciepljuje se na prethodno nanešeni sloj Mueller – Hintonovog agara u Petrijevoj zdjelici pomoću vatenog štapića prethodno namočenog u suspenziju test mikroorganizma. Kulture se naciepljuju unutar 15 minuta od pripreme bakterijske suspenzije. Nakon toga se na agar pomoću

sterilne pincete postavljaju dijagnostički filter diskovi promjera 6 mm. Diskove treba postaviti na površinu agara unutar 15 minuta od inokulacije te disk mora cijelom površinom prianjati uz agar, a njihov raspored mora osiguravati dobro vidljive zone inhibicije, jasne za očitavanje i bez preklapanja zona inhibicije. Na diskove se zatim aplicira 10 μ L jednog od pripremljenih jestivih premaza na bazi proteina sirutke obogaćenih ekstraktom lista masline te pozitivna kontrola. Nakon postavljanja diskova, Petrijeva zdjelica se stavlja u hladnjak na 20 minuta kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu i potom se inkubira u termostatu pri 37 °C, 32 °C odnosno 28 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma. Nakon završetka inkubacije, rezultati se očitavaju mjerenjem inhibicijske zone izražene u mm oko svakog diska.

3.2.15. Statistička obrada rezultata

Rezultati mjerenja dobiveni u ovom radu su pomoću programa Microsoft Office Excel 365® izraženi kao prosječne vrijednosti tri mjerenja uz standardnu devijaciju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

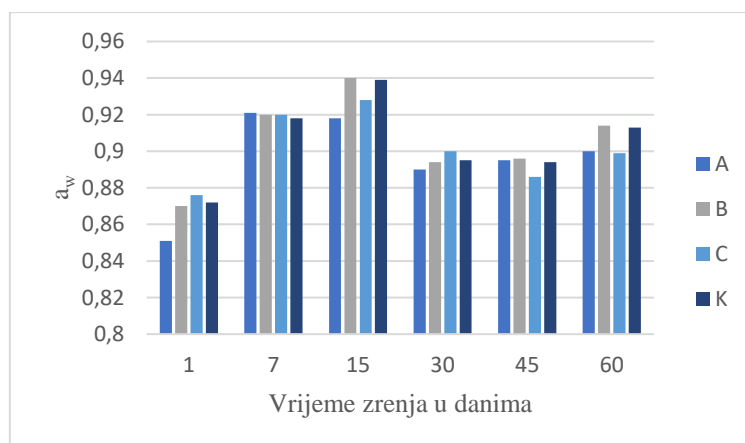
Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene jestivog premaza na bazi proteina sirutke s ekstraktom lista masline u proizvodnji polutvrdog sira te kvaliteta tako proizvedenog sira.

Svi proizvedenim uzorcima izmjeren je aktivitet vode (slika 5), pH (slika 6), titracijska kiselost (slika 7), indeks boje (slika 10), tekstura (slika 11, slika 12, slika 13 i slika 14), koncentracija ukupnih fenola (slika 18), koncentracija ukupnih flavonoida (slika 20), antioksidacijski kapacitet (slika 19) i to u periodu 1., 7., 15., 30., 45. i 60. dan zrenja. Udio mliječne masti (slika 8), udio pepela (slika 9) i mikrobiološka analiza (tablica 7) rađeni 1. i 60. dan zrenja, a proteoliza (slika 17) je praćena 15., 30. te 60. dan zrenja.

4.1. REZULTATI ANALIZA FIZIKALNIH I KEMIJSKIH SVOJSTAVA SIRA

4.1.1. Aktivitet vode sira, kiselost sira, udio mliječne masti u siru te udio pepela u siru

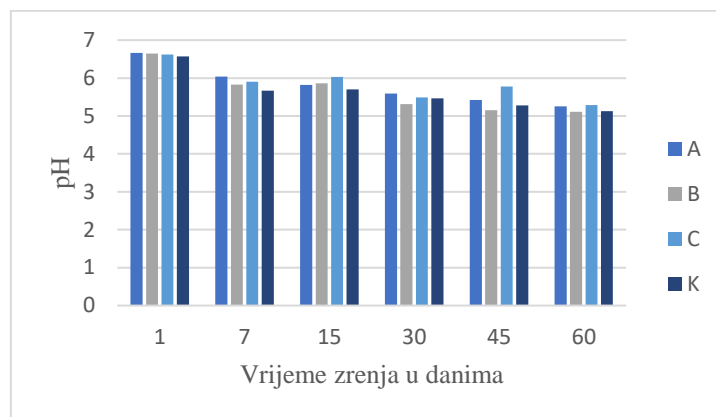
Aktivitet vode jedan je od glavnih parametara kvalitete u prehrambenoj industriji jer utječe na mikrobiološku kvalitetu te enzimsku aktivnost u gotovim proizvodima (Kaya i Öner, 1996), a u ovom slučaju utječe na stabilnost sira tijekom zrenja (Henriques i sur., 2013). To je zapravo raspoloživa količina vode potrebna za rast mikroorganizama, a definira se kao omjer tlaka vodene pare iznad površine sira i vodene pare prisutne u vodi na istoj temperaturi (Havranek i sur., 2014).



Slika 5. Prikaz ovisnosti vrijednosti aktiviteta vode (a_w) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mgL}^{-1}$)

Na slici 5 prikazana je ovisnost vrijednosti aktiviteta vode o vremenu zrenja uzoraka sira ispitivanih u ovom istraživanju. Vrijednosti aktiviteta vode (a_w) u ovom radu su se tijekom

vremena zrenja od 60 dana u pravilu smanjivale. Prvi dan zrenja su bile nešto niže u odnosu na tjedan dana nakon. a_w vrijednosti među različitim uzorcima nisu se puno razlikovale. Henriques i sur. (2013) su u svom radu također imali smanjenje aktiviteta vode tijekom vremena. Smanjenjem a_w vrijednosti mijenja se krivulja rasta određenih mikroba, smanjuje se njihov omjer rasta, produžuje se lag-faza, smanjuje se broj stanica u stacionarnoj fazi, a veći broj stanica odumire u fazi odumiranja (Havranek i sur., 2014).

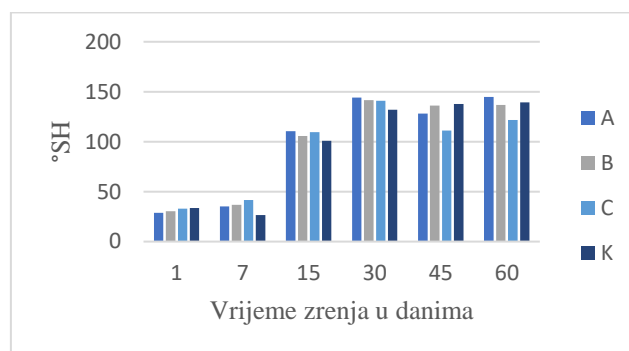


Slika 6. Prikaz ovisnosti vrijednosti pH o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Bagheripoor i sur. (2018) navode da je pH vrijednost ključan parametar za optimalan proces proizvodnje sira jer je kiselost uvelike utječe kako na okus proizvoda tako i inhibira rast nekih mikroorganizama što je bitno kako bi se produžila trajnost proizvoda. Na slici 6 prikazana je ovisnost vrijednosti pH o vremenu zrenja. pH vrijednosti sireva u ovom radu kretale su se u rasponu od 6,66 do 5,25 za uzorak A, od 6,65 do 5,14 za uzorak B, od 6,62 do 5,29 za uzorak C te od 6,57 do 5,13 za kontrolni uzorak (K). Iz rezultata je vidljivo kako se kod svih uzoraka sireva pH vrijednost smanjuje tijekom razdoblja zrenja sireva. Najveći ukupni pad vrijednosti pH je bio kod uzorka B. Mikroorganizmi prisutni u sirevima mogli su dovesti do smanjenja pH vrijednosti (Mahcene i sur., 2020) isto kao i proteoliza koja rezultira formiranjem malih polipeptida, slobodnih aminokiselina i spojeva niske molekulske mase (Tumbarski i sur., 2021).

U istraživanju provedenom od strane Kampf i Nussinovitch (2000) pH vrijednost sira bez jestivog filma više se snizila u odnosu na sir presvučen alginatom nakon 18 dana skladištenja. Isto je vidljivo i iz rezultata ovog rada gdje je nakon 60 dana zrenja najnižu pH vrijednost dosegao kontrolni uzorak (K), dok su oni prekrivenim jestivim filmom na bazi proteina sirutke imali nešto višu pH vrijednost. Mahcene i sur. (2020) proveli su istraživanje na siru sa jestivim

filmom uz dodatak različitih eteričnih ulja (bijeli pelin, bosiljak, menta, ružmarin). Kao i u ovom radu vidljiva je promjena pH vrijednosti u rasponu od 6,39 do 5,83 ovisno o vrsti eteričnog ulja kroz vremenski period od 10 dana. Kavas i sur. (2015) su proučavali utjecaj jestivog filma na bazi proteina sirutke obogaćenog eteričnim uljem timijana i klančića. Promjene pH vrijednosti u uzorcima obogaćenim eteričnim uljima bile su manje u odnosu na kontrolni uzorak, a međusobno se nisu znatno razlikovale te su bile u rasponu od 4,44 do 4,07. Vrijednosti pH su se tijekom skladištenja od 60 dana smanjivale isto kao i u ovom radu. Henriques i sur. (2013) su za cilj imali zamijeniti konvencionalne premaze za sireve sa prirodnim jestivim premazom na bazi proteina sirutke uz dodatak mliječne kiseline i natamicina kao antimikrobika. Što se tiče promjene pH vrijednosti, nisu primijećena značajna odstupanja među različitim uzorcima.

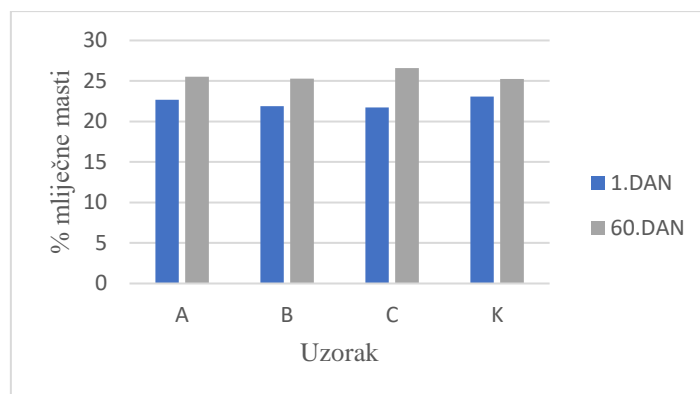


Slika 7. Prikaz ovisnosti vrijednosti titracijske kiselosti ($^{\circ}\text{SH}$) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Na slici 7 prikazana je ovisnost vrijednosti titracijske kiselosti ($^{\circ}\text{SH}$) o vremenu zrenja. U ovom radu, vrijednosti titracijske kiselosti po Soxhlet Henkelu kretale su se u rasponu od 28,8 do 144,8 $^{\circ}\text{SH}$ za uzorak A, od 30,4 do 136,8 $^{\circ}\text{SH}$ za uzorak B, od 32,8 do 121,6 za uzorak C te za kontrolni uzorak sira (K) od 33,6 do 139,2 $^{\circ}\text{SH}$. Kod svih uzoraka je vidljivo da titracijska kiselost raste kroz vrijeme. Najveća vrijednost titracijske kiselosti vidljiva je kod uzorka A i kontrolnog uzorka (K) dok uzorci u koje je dodan ekstrakt lista masline pokazuju nešto niže vrijednosti.

Yangilar (2016) je istraživao efekte jestivog filma, u koji je dodan natamicin te eterična ulja origana i ružmarina, na parametre kvalitete Kashar sira. Vrijednosti titracijske kiselosti su

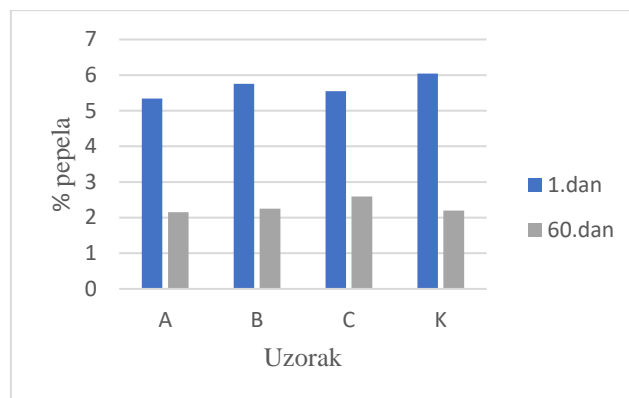
također rasle tijekom zrenja, a bile su u rasponu od 125 do 227 °SH ovisno o vrsti uzorka. Kavas i sur. (2015) su također proveli istraživanje na Kashar siru gdje je u jestivi film na bazi proteina sirutke dodano ulje đumbira. Vrijednosti °SH bile su slične onima u radu Yangilar (2016) tijekom trajanja zrenja. Nottagh i sur. (2019) su također uočili kako se titracijska kiselost povećava s vremenom.



Slika 8. Udio mliječne masti (%) u uzorcima 1. i 60. dan zrenja (K – kontrolni uzorak, uzorak s jestivim premazom na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹))

Na slici 8 prikazan je udio mliječne masti (%) u uzorcima 1. i 60. dan zrenja. Vrijednosti udjela mliječne masti kretale su se u rasponu 22,66 do 25,54 % za uzorak A, od 21,88 do 25,54 % za uzorak B, od 21,75 do 26,59 % za uzorak C te od 23,09 do 25,24 % za kontrolni uzorak (K). Kod svih uzoraka je vidljiv porast udjela mliječne masti tijekom vremena, bez velikih odstupanja od međusobnih vrijednosti.

U istraživanju koje je proveo Yangilar (2016) na Kashar siru, udio mliječne masti je rastao tijekom perioda od 60 dana zrenja, a zadnjih 30 dana je bio nešto niži. Sarioglu and Öner (2006) su također proveli istraživanje na Kashar siru te su se njihove vrijednosti udjela mliječne masti kretale u rasponu od 31,37 do 43,25 %.

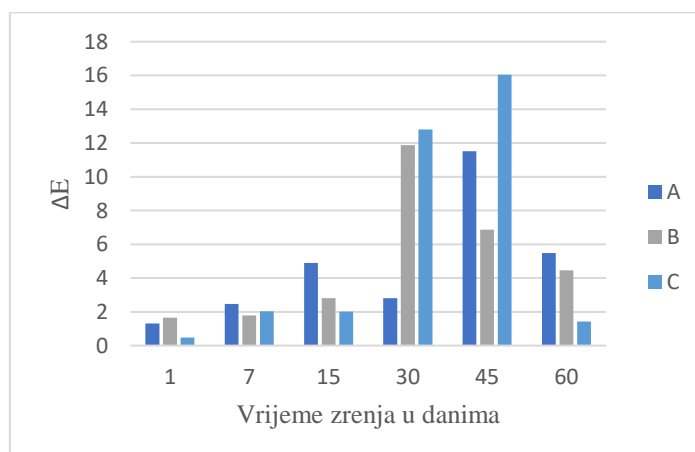


Slika 9. Udio pepela (%) u uzorcima 1. i 60. dan zrenja (K – kontrolni uzorak, uzorak s jestivim premazom na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹))

Na slici 9. je vidljivo da se udio pepela u svim sirevima smanjio tijekom zrenja. Vrijednosti se nisu znatno razlikovale među uzorcima te su se u prosjeku kretale u rasponu 5,34 do 6,07 % na početku odnosno od 2,15 do 2,59 % na kraju zrenja.

Şengül i sur. (2009) određivali su udio pepela u Cecil siru tijekom njegovog zrenja od 90 dana. Udjeli pepela su se povećavali tijekom zrenja sira. Najniža vrijednost od 9,22 % izmjerena je 1. dan, a najviša vrijednost 90. dan i iznosila je 10,59 %. U ovom radu se događalo suprotno, udio pepela se tijekom vremena zrenja smanjivao, ali je također i početni udio pepela bio mnogo manji u odnosu na rad Şengül i sur. (2009).

4.1.2. Boja sira



Slika 10. Prikaz ovisnosti ΔE* vrijednosti o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

Na slici 10 prikazana je ovisnost ΔE^* vrijednosti o vremenu zrenja sireva. Najveću promjenu boje tijekom zrenja, u odnosu na uzorak K, pokazao je uzorak C koji je sadržavao ekstrakt lista masline u najvećoj koncentraciji od $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ polifenola te uzorak B sa nešto manjom koncentracijom polifenola ($26,3 \text{ mg L}^{-1}$) ekstrakta lista masline. Sukladno podacima iz tablice 4, možemo zaključiti kako je vidljiva jasna razlika u boji kod svih uzoraka sireva te da promatrač vidi dvije različite boje nakon zrenja u trajanju 60 dana.

Tablica 6. Vrijednosti $L^*a^*b^*$ za ispitivanje uzoraka kroz određeni period zrenja

VRIJEME ZRENJA U DANIMA	UZORAK	L^*	a^*	b^*
1.dan	A	89,43	-2,24	14,78
	B	89,39	-2,56	15,62
	C	91,01	-2,38	14,96
	K	90,71	-2,47	14,61
7.dan	A	93,15	-2,56	17
	B	93,57	-2,19	16,45
	C	93,13	-2,15	16,48
	K	94,26	-2,39	14,81
15.dan	A	87,5	-1,56	19,4
	B	89,38	-2,03	14,55
	C	89,58	-2,12	17,41
	K	91,38	-2,25	16,51
30.dan	A	59,85	-0,33	12,78
	B	74,33	-1,87	13,36
	C	75,27	-1,26	14,45
	K	62,5	-0,79	13,59
45.dan	A	77,07	-1,63	27,48
	B	84,37	-2,46	22,23
	C	69,76	-1,76	28,25
	K	80,76	-1,02	16,58
60.dan	A	67,34	0,39	9,18
	B	68,61	0,08	8,65
	C	73,56	0,13	10,87
	K	72,48	-0,79	10,67

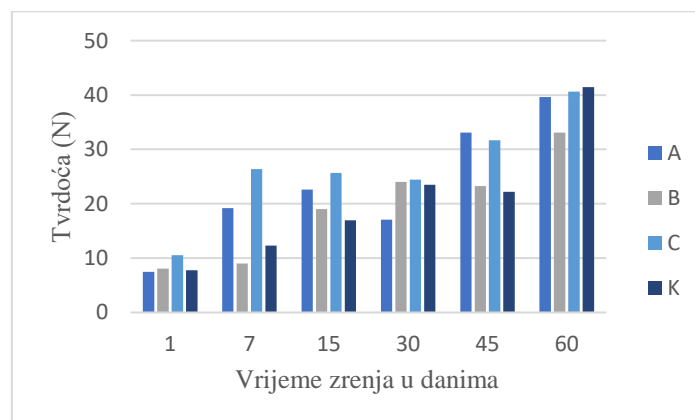
L^* predstavlja svjetlinu u rasponu 0 – 100 pri čemu je vrijednost 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijela boja. Parametar a^* ima raspon vrijednosti -100 – 100. Negativne vrijednosti parametra a^* označavaju približavanje zelenoj boji, a pozitivne vrijednosti označavaju približavanje crvenoj boji. Parametar b^* ima isti raspon kao i parametar a^* samo

što -100 označava čisto plavu boju, a +100 čisto žutu boju. U tablici 6 prikazane su vrijednosti parametara L^* , a^* i b^* za određivane uzorke. Svi uzorci su tijekom vremena zrenja potamnili, a iz dobivenih rezultata, vidljivo je kako su svi uzorci tamniji od kontrolnog uzorka, te se taj rezultat proteže kroz cijelo vrijeme zrenja.. Izmjerene vrijednosti parametra b^* su u području žute boje čime dolazimo do zaključka kako sirevi sadrže žutu nijansu. Ta žuta nijansa se tijekom vremena povećava i to najviše kod uzorka C i B koji u sebi sadrže ekstrakt lista masline koji također utječe na pojavu žute boje. Izmjerene vrijednosti parametra a^* su u području zelene boje te ukazuju na postojanje zelenkaste boje. Kao i kod rezultata za parametar b^* , kod uzorka B i C je vidljiva izraženija zelena nijansa u odnosu na kontrolni uzorak K. Carvalho i sur. (2018) su u svom radu prikazali kako dodatak ekstrakta timijana također utječe na boju sira, dok su Mahcene i sur. (2020) u svom radu zaključili kako i dodatak raznih eteričnih ulja također utječe na boju gotovog proizvoda.

4.1.3. Tekstura sira

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009), sirevi se mogu podijeliti na ekstra tvrdi, tvrdi, polutvrdi, meki i svježiji sir (Pravilnik, 2009). U ovom radu određivani su tvrdoća, gumenost, elastičnost i otpornost.

Na slici 11 prikazana je ovisnost vrijednosti tvrdoće (N) o vremenu zrenja. Kod svih uzoraka je vidljivo povećanje tvrdoće tijekom skladištenja, a među uzorcima nema velikih odstupanja u tvrdoći nakon zrenja od 60 dana.

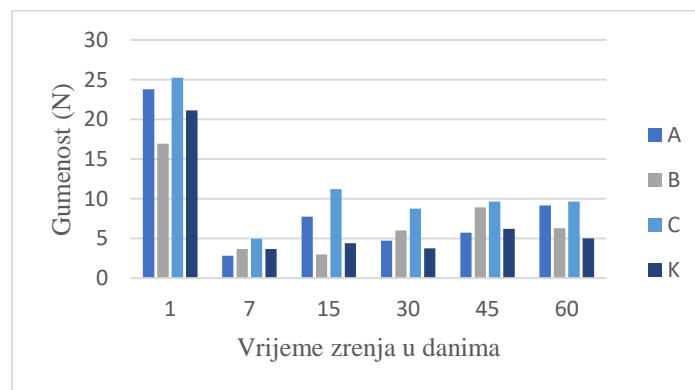


Slika 11. Prikaz ovisnosti tvrdoće (N) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

Petrović (2017) navodi da su uzroci povećanja tvrdoće tijekom zrenja povećanje udjela proteina, intenzivna proteolitička aktivnost te smanjenje udjela vode. Smanjenje udjela vode tijekom zrenja je vidljivo i među ranije navedenim rezultatima u ovom radu.

Vrijednost tvrdoće u radu Petrović (2017) se kretala u rasponu od 14,18 do 19,80 N kroz vrijeme zrenja od 30 dana. Nottagh i sur. (2019) su proveli istraživanje na iranskom siru gdje su nanijeli jestivi premaz na bazi citozana i natamicina gdje je također uočeno kako se tvrdoća sira tijekom zrenja povećava (Nottagh i sur., 2019). Iste rezultate su dobili i Ramos i sur. (2012) te Henriques i sur. (2013).

Na slici 12 prikazana je ovisnost gumenosti (N) o vremenu zrenja. Gumenost se definira kao energija potrebna za narušavanje teksture polutvrde hrane do stanja gutanja te je povezana sa tvrdoćom i otpornošću (Berti i sur., 2019).

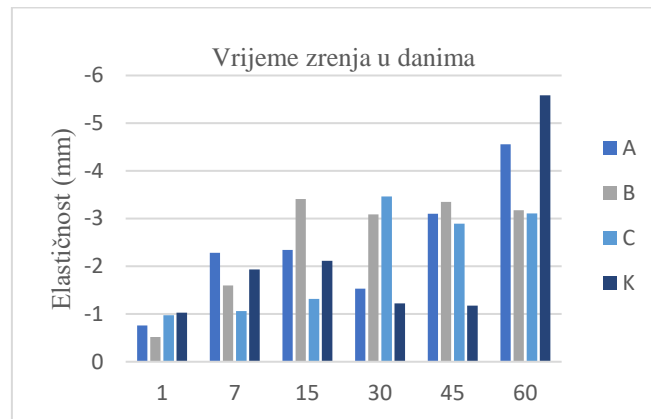


Slika 12. Prikaz ovisnosti gumenosti (N) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

U istraživanju koje su proveli 2019. godine zamijećeno je povećanje gumenosti tijekom perioda zrenja, dok se u ovom radu gumenost nakon prvih 7 dana drastično smanjila, a daljnjim zrenjem se održavala konstantnom, odnosno uz manja povećanja.

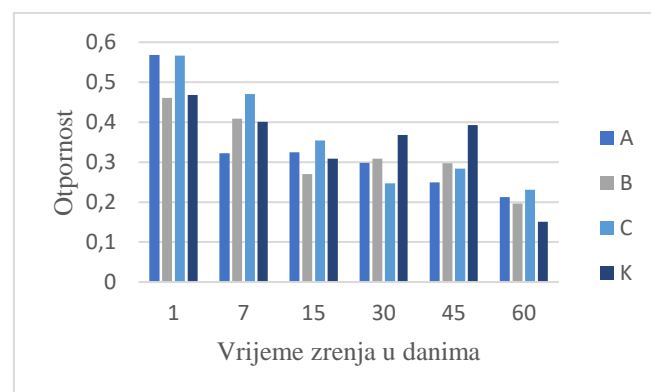
Elastičnost predstavlja stupanj do kojeg uzorak vraća svoj izvorni oblik (Kongo i Malcata, 2016). Tijekom zrenja sireva očekivano je da se elastičnost sireva povećava zbog djelovanja koagulansa koji je odgovoran za primarnu proteolizu. Također, druge promjene mogu utjecati na rezultate (Berti i sur., 2019). Berti i sur. (2019) navode da proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline može dovesti do nastanka peptida male molekulske mase koji onda tvore slabu proteinsku mrežu, a samim time daju i nižu elastičnost. Na slici 13 prikazana je ovisnost

elastičnosti (mm) o vremenu zrenja te je vidljivo kako se elastičnost ispitivanih uzoraka s vremenom smanjuje, odnosno sirevi teže zadržavaju svoj prvotni oblik.



Slika 13. Prikaz ovisnosti elastičnosti (mm) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Otpornost predstavlja otpor koji uzorak pruža kako bi zadržao svoj oblik (Kongo i Malcata, 2016). Na slici 14 prikazana je ovisnost otpornosti o vremenu zrenja. Iz rezultata je vidljivo kako se ona tijekom vremena zrenja od 60 dana smanjivala kod svih uzoraka sireva.



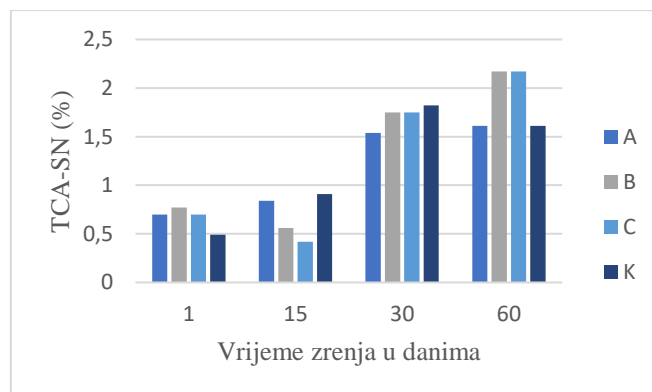
Slika 14. Prikaz ovisnosti otpornosti o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Uspoređujući rezultate sa rezultatima Vranković (2022), vidljive su slične vrijednosti otpora sira primijenjenoj sili i to za sir koji je također proizveden enzimskom koagulacijom kao i sir u ovom radu. Sir proizveden kiselinom koagulacijom je pokazivao nešto niže vrijednosti otpornosti (Vranković, 2022).

4.1.4. Rezultati određivanja količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroacetoj kiselinu (TCA-SN) i ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu (WSN) te proteolize

Udio dušičnih tvari topljivih u trikloroacetoj kiselinu (TCA-SN, eng. *trichlor-acetic soluble nitrogen*) pokazuje količinu neproteinskog dušika i slobodnih aminokiselina koje nastaju nakon proteolitičke aktivnosti starterske i nestarterske mikrobne populacije te u manjoj mjeri kimozijske aktivnosti (Jovanović i sur. 2007).

Iz podataka prikazanih na slici 15. vidljivo je kako je udio TCA-SN rastao tijekom zrenja. Dobiveni rezultati pokazuju da je uslijed procesa proteolize, koji se odvija tijekom zrenja, došlo do razgradnje većih lanaca proteina na manje peptide i slobodne aminokiseline. Uzorci B i C, koji su imali dodan ekstrakt lista masline, pokazali su najveći porast udjela TCA-SN.

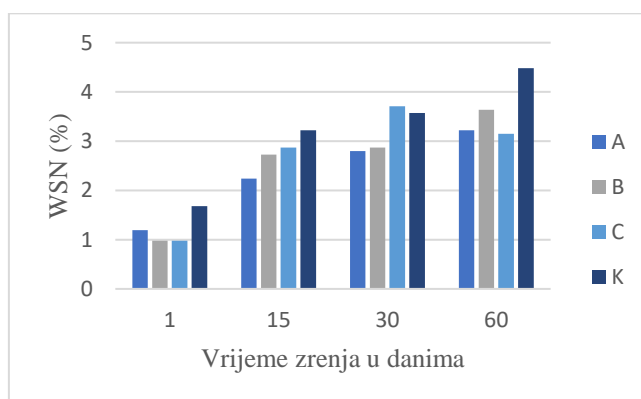


Slika 15. Prikaz ovisnosti količine organskog dušika u tvarima topljivim u TCA (TCA-SN) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Uspoređujući dobivene rezultate sa rezultatima iz rada Yangilar (2016), koji je radio sa Kashar sirom, udio TCA-SN u ovom radu je manji u odnosu na Kashar sir sa raznim dodacima biljnih ekstrakata. Udio TCA-SN u ovom radu se kretao u rasponu od 0,7 do 1,51 % za uzorak A, od 0,77 do 2,17 % za uzorak B, od 0,7 do 2,17 % za uzorak C te od 0,49 do 1,6 % za kontrolni uzorak. U radu Yangilar (2016) vrijednosti udjela TCA-SN su se, ovisno o uzorku kretale u rasponu od 2,47 do 7,25 %. Petrović (2017) je u svom radu pratio proteolizu i promjene teksture sira iz mišine tijekom zrenja. Vrijednosti udjela TCA-SN u njegovom radu su se kretale u

rasponu od 9,00 do 18,60 % za vrijeme zrenja od 30 dana što su znatno veće vrijednosti u odnosu na ovaj rad.

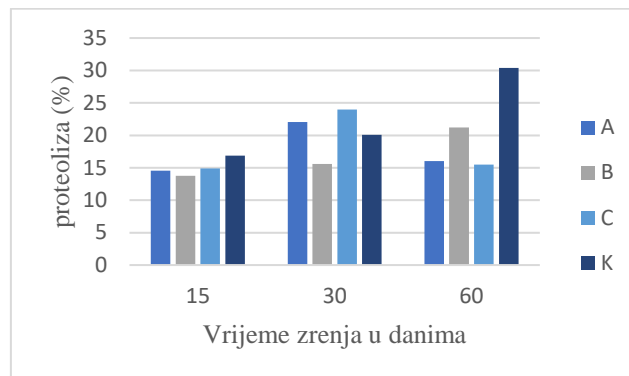
Udio dušičnih tvari topljivih u (WSN, eng. *water soluble nitrogen*) opisuje količinu polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina i njihovih soli, a nastaju kao posljedica kimozijske aktivnosti te u manjoj mjeri plazmitske aktivnosti (Jovanović i sur., 2007). Na slici 16 je vidljivo da udio WSN tijekom zrenja također raste što ukazuje da je tijekom vremena došlo do proteolitičkih reakcija koje su rezultirale povećanjem udjela frakcija dušika topivog u vodi. Najveći porast udjela WSN vidljiv je kod uzorka B te kod kontrolnog uzorka, a vrijednosti su se kretale u rasponu od 0,98 do 3,64 % za uzorak B te od 1,68 do 4,48 % za kontrolni uzorak.



Slika 16. Prikaz ovisnosti količine ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu (WSN) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

Dobiveni rezultati slični su rezultatima istraživanja koje je proveo Yangilar (2016) gdje su se vrijednosti udjela WSN kretale u rasponu od 2,7 do 5,34 % ovisno o uzorku kroz period zrenja od 90 dana. Vrijednosti udjela WSN su se u radu Petrović (2017) kretale u rasponu od 15,98 do 28,79 % što je znatno više od rezultata u ovom radu.

Na slici 17 prikazana je ovisnosti % proteolize o vremenu zrenja. Proteoliza u sirevima tijekom zrenja ima važnu ulogu za razvoj teksture i okusa. Soussa i sur. (2001) navode kako proteoliza doprinosi promjenama teksture sira zbog njenog razaranja proteinske mreže i smanjenja aktiviteta vode. Također navode kako proteoliza izravno doprinosi razvoju okusa sira kroz stvaranje manjih peptida i slobodnih aminokiselina kao supstrata za sekundarne kataboličke promjene (Soussa i sur., 2001).



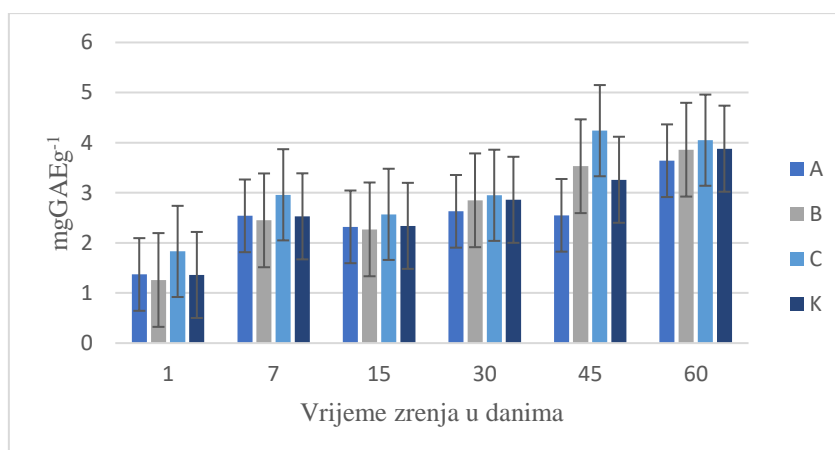
Slika 17. Prikaz ovisnosti proteolize (%) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola 26,3 mg L⁻¹, C – koncentracija polifenola 159,35 mg L⁻¹)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je proteoliza tijekom zrenja postajala intenzivnija, odnosno, došlo je do razaranja proteinske mreže i stvaranja manjih peptida i slobodnih aminokiselina. Proteoliza je najintenzivnija bila u kontrolnom uzorku, dok je u ostalim uzorcima bila više-manje podjednaka.

4.2.REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA NA UZORCIMA SIREVA

4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola s Folin-Ciocalteu reagensom

Koncentracija ukupnih fenola izračunata je iz baždarnog pravca, a izražava se preko ekvivalenta galne kiseline (GAE). Na slici 18 vidljivo je da je koncentracija ukupnih fenola kod svih uzoraka rasla tijekom perioda zrenja.



Slika 18. Prikaz ovisnosti koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline GAE (mg g^{-1}) u sirevima o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

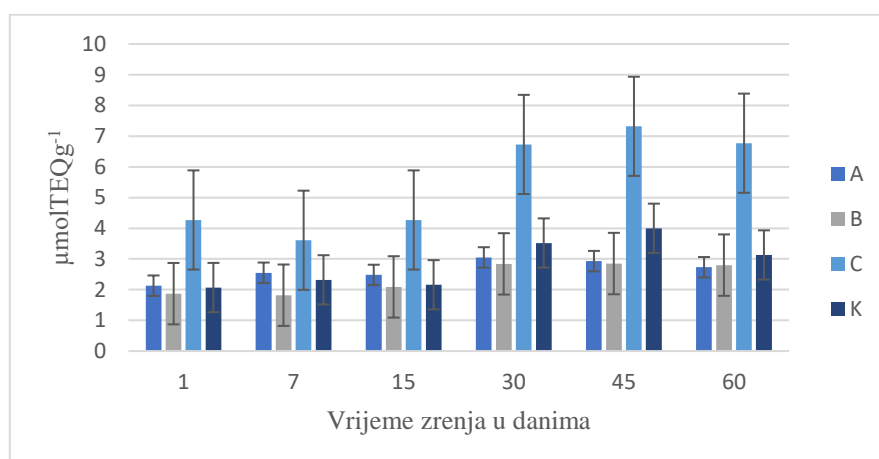
Najveća izmjerena koncentracija ukupnih fenola bila je kod uzorka B i C što je bilo i za očekivati. Uzorci B i C sadrže ekstrakt lista masline koji je bogat bioaktivnim komponentama koje dovode do visoke koncentracije ukupnih fenola u odnosu na uzorak A i na kontrolni uzorak koji u sebi nemaju dodan ekstrakt lista masline. Vrijednosti koncentracije ukupnih fenola kretale su se u rasponu od 1,26 do 3,64 za uzorak A, od 1,37 do 3,88 za uzorak B, od 1,83 do 4,24 za uzorak C te od 1,36 do 3,86 mgGAE g^{-1} za kontrolni uzorak.

Vranković (2022) je u svom istraživanju ekstrakt lista masline dodavala direktno u gruše te je koncentracija ukupnih fenola mjerena samo 1.dan zrenja, a kretala se u rasponu od $1,13 \pm 0,04$ do $2,21 \pm 0,03 \text{ mgGAE g}^{-1}$ ovisno o vrsti uzorka. Osim ekstrakta lista masline, u sireve se pokušavaju inkorporirati i drugi biljni ekstrakti te začini, oboje s istim ciljem, a to je povećanje udjela bioaktivnih komponenti prehrambenih proizvoda.

Antimikrobna svojstva eteričnih ulja i začina poznata su već duže vrijeme. Eterična ulja imaju jače antimikrobno djelovanje protiv patogenim mikroorganizama zbog viših koncentracija fenolnih spojeva kao što su eugenol, timol i karvakrol (Seydim i sur., 2020).

4.2.2. Antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet uzoraka sireva određen je prema prethodno opisanom postupku, a izmjerene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta prikazane su kao Trolox ekvivalent ($\mu\text{molTEQ g}^{-1}$). Na slici 19 prikazane su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ovisnosti o vremenu zrenja.



Slika 19. Prikaz ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta izraženog kao Trolox ekvivalent TEQ ($\mu\text{mol g}^{-1}$) u sirevima o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

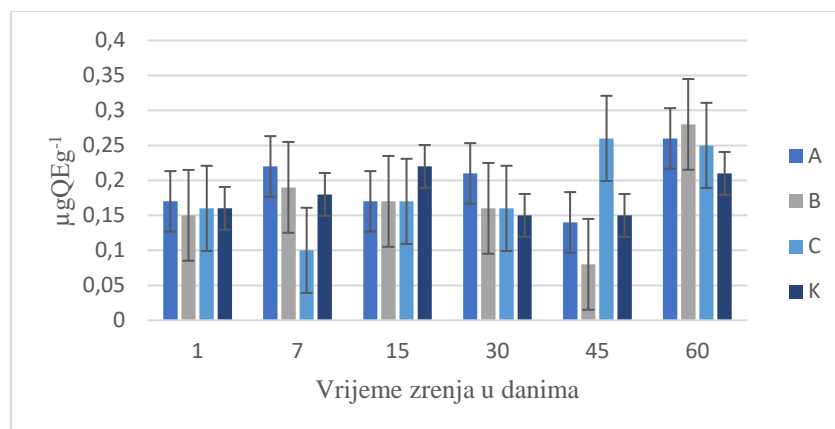
Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako najveću vrijednost antioksidacijskog kapaciteta kroz cijelo vrijeme zrenja pokazuje uzorak C koji je sadržavao ekstrakt lista masline u najvećoj koncentraciji. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta kretale su se u rasponu od 2,13 do 2,73 za uzorak A, od 1,87 do 2,8 za uzorak B, od 4,27 do 6,77 za uzorak C te od 2,07 do 3,13 $\mu\text{mol TEQ g}^{-1}$ za kontrolni uzorak K.

Hrvatini (2018) je u svom istraživanju dodavala ekstrakt majčine dušice i protektivne kulture u svježi sir te je također zabilježena veća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima s

biljnim ekstraktom u odnosu na kontrolne uzorke. Vranković (2022) je donijela iste zaključke sa dodatkom ekstrakta lista masline u uzorak sira.

4.2.3. Koncentracija ukupnih flavonoida

Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima sireva određena je prema prethodno opisanoj metodi, a prikazana je kao ekvivalent standarda kvercetina ($\mu\text{gQE g}^{-1}$). Na slici 20 prikazane su vrijednosti koncentracije ukupnih flavonoida u ovisnosti o vremenu zrenja.



Slika 20. Prikaz ovisnosti koncentracija ukupnih flavonoida izražena kao ekvivalent kvercetina QE ($\mu\text{g g}^{-1}$) u sirevima o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima s jestivim premazima na bazi proteina sirutke bez (A) ili s dodatkom ekstrakta lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$)

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako sirevi sa dodatkom ekstrakta lista masline pokazuju nešto veće koncentracije ukupnih flavonoida u odnosu na kontrolni uzorak. Koncentracija ukupnih flavonoida u sirevima se kretala u rasponu od 0,17 do 0,26 za uzorak A, od 0,15 do 0,28 za uzorak B, od 0,16 do 0,25 za uzorak C te od 0,16 do 0,21 $\mu\text{gQE g}^{-1}$ za kontrolni uzorak K.

Vranković (2022) je u svom radu ekstrakt lista masline dodavala direktno u gruše te su u tom radu vrijednosti koncentracija ukupnih flavonoida u sirevima veće od vrijednosti u ovom radu, a kretale su se u rasponu od $0,28 \pm 0,02$ do $0,65 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1} \text{ QE}$.

4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIREVA I ODREĐIVANJA ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

4.3.1. Rezultati mikrobiološke analiza sireva

Tablica 7 prikazuje rezultate mikrobiološke analize sireva 1. i 60. dan zrenja. U sirevima su određivane enterobakterije, ukupan broj bakterija, koagulaza pozitivni stafilocoki te kvasci i plijesni.

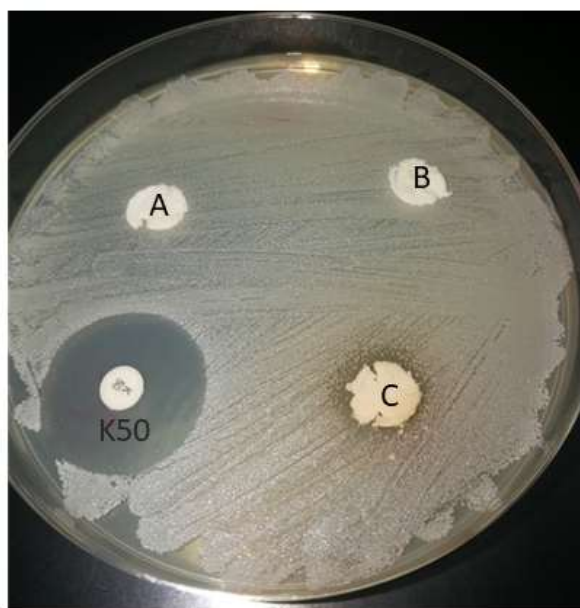
Tablica 7. Prosječne vrijednosti ($\log \text{CFU g}^{-1}$) mikrobioloških parametara u uzorcima sireva 1. dan nakon proizvodnje, odnosno nakon 60 dana zrenja.

log CFU g ⁻¹								
Uzorak	Enterobakterije		Ukupan broj bakterija		Koagulaza pozitivni stafilocoki		Kvasci i plijesni	
	1.DAN	60.DAN	1.DAN	60.DAN	1.DAN	60.DAN	1.DAN	60.DAN
A	1,50	1,24	3,18	4,58	0	0	3,15	3,09
B	1,77	1,65	3,53	5,22	0	0	3,22	3,03
C	1,81	1,81	3,61	4,88	0	0	3,59	3,73
K	1,59	1,38	3,25	5,04	0	0	3,22	0,89

Broj enterobakterija se kod svih uzoraka tijekom zrenja smanjio, osim kod uzorka C gdje je ostao nepromijenjen. Za smanjenje broja nekih mikroorganizama tijekom vremena vjerojatno je zaslužan ekstrakt lista masline koji u teoriji ima antimikrobna svojstva te je vidljivo kako inhibira rast nekih mikroorganizama. Ukupan broj bakterija je rastao tijekom vremena, a najveći porast je vidljiv kod kontrolnog uzorka (K). Koagulaza pozitivni stafilocoki nisu narasli na hranjivim podlogama, dok se broj kvasaca i plijesni tijekom zrenja smanjivao ili ostao više-manje isti kod svih uzoraka osim kod uzorka C gdje je vidljivo povećanje broja kvasaca i plijesni. Koagulaza pozitivni stafilocoki su jedini od ispitivanih kriterija koji su uvjetovani Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) te pripadajućom Uredbom 2073/2005, dok su svi ostali kriteriji preuzeti iz Vodiča (2009) i predstavljaju preporučene vrijednosti.

4.3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti spojeva

Na uzorcima jestivih premaza na bazi proteina sirutke sa i bez dodatka ekstrakta lista masline nanesenih na uzorke sireva određivana je antimikrobna aktivnost. Na slici 21 prikazana je zona inhibicije rasta bakterije *Staphylococcus aureus* primjenom uzorka jestivog premaza na bazi proteina sirutke bez i s ekstraktom lista masline.



Slika 21. Prikaz zona inhibicije rasta bakterije *Staphylococcus aureus* primjenom uzorka jestivog premaza na bazi proteina sirutke bez (A) i s ekstraktom lista masline (B – koncentracija polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$, C – koncentracija polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$) sa zonama inhibicije pozitivne kontrole (K50)

Zona blage inhibicije rasta bakterije *Staphylococcus aureus* pojavila se samo na dijelu gdje je apliciran jestivi premaz na bazi proteina sirutke obogaćen ekstraktom lista masline koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$. Za ostala dva uzorka jestivog premaza bez (A) i s ekstraktom lista masline koncentracije polifenola $26,3 \text{ mg L}^{-1}$ (B) nije zabilježena zona inhibicije.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo kako su vrijednosti za enterobakterije i koagulaza pozitivne stafilokoke u skladu s preporukama Vodiča (2009) odnosno broj koagulaza pozitivnih stafilokoka je u skladu s obaveznim kriterijem definiranim Zakonom (2022) i pripadajućom Uredbom (EU 2073/2005). Međutim, broj kvasaca i plijesni kao i ukupan broj bakterija je nešto veći od preporučenih vrijednosti (Vodič, 2009), što može biti posljedica proizvodnje u nesterilnim uvjetima koji bi spriječili početnu mikrobiološku kontaminaciju sireva. Ramos i

sur. (2011a) navode kako su potrebna daljnja istraživanja koja bi se razvio jestivi premaz koji bi se kraće sušio te bi se njegova učinkovitost protiv kvasaca i plijesni povećala. Također navode i da bi trebalo raditi i na boljem prijanjanju premaza na površinu sira.

Antibakterijska i antimikrobna svojstva esencijalnih ulja privukla su pozornost u konzerviranju hrane. Pokazalo se kako dodatak jestivog filma obogaćenog esencijalnim uljima origana (*Origanum minutiflorum*) i ružmarina (*Rosmarinus officianalis L.*) utječe na rast mikroorganizama te produžuje rok trajanja Kashar sira (Yangilar, 2016). Đumbir se dugo koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojih protuupalnih, antimikrobnih i antiseptičkih svojstava (Kavas i sur., 2015) te je u istraživanju 2015. godine dokazano kako zbilja ima antimikrobna svojstva koristeći se kao dodatak u obliku ekstrakta u jestivi film na bazi proteina sirutke koji je zatim nanesen na Kashar sir (Kavas i sur., 2015). Ramos i sur. (2012c) navode kako komercijalni premazi inhibiraju rast jedino kvasaca i plijesni (Ramos i sur., 2012c). Ramos i sur. (2011c) su u svom radu također dokazali kako je sir sa premazom na bazi proteina sirutke imao bolje rezultate mikrobiologije na *Staphylococcus spp.* te na *Enterobacteriaceae* u odnosu na kontrolni sir. Došli su i do zaključka kako antimikrobni učinci različitih kemijskih sredstava ovise o vrsti ciljanog mikroorganizma te samom antimikrobnom sredstvu – neka antimikrobna sredstva će npr. djelovati inhibirajuće na gram-negativne, dok na gram-pozitivne bakterije neće (Ramos i sur., 2011c).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih analizom pripremljenih uzoraka sireva, može se zaključiti sljedeće:

1. Aktivitet vode, pH vrijednost i udio pepela su se kod svih uzoraka smanjivali tijekom zrenja, dok su titracijska kiselost i udio mliječne masti rasli. Vrijednosti navedenih parametara nisu se bitno razlikovale među ispitivanim uzorcima sireva. Iznimno, u uzorku sira s premazom na bazi proteina sirutke obogaćenim dodatkom ekstrakta lista masline koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ zabilježen je najmanji pad pH vrijednosti.
2. Kod svih uzoraka je vidljiva jasna razlika u boji (ΔE^*), u odnosu na kontrolni uzorak nakon 60 dana zrenja, a najveća ΔE^* vrijednost utvrđena je kod uzorka s jestivim premazom obogaćenim dodatkom ekstrakta lista masline s koncentracijom polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$.
3. Parametri teksture su se tijekom skladištenja mijenjali u svim uzorcima sireva, a na njih nije značajnije utjecao dodatak ekstrakta lista masline u jestivi premaz.
4. Uzorci s premazom obogaćenim dodatkom ekstrakta lista masline koncentracije $159,35 \text{ mg L}^{-1}$ pokazali su najveći porast udjela TCA-SN, što upućuje na intenzivnije proteolitičke promjene uzorkovane aktivnošću bakterija. Najveći porast udjela WSN vidljiv je kod kontrolnog uzorka što ukazuje na intenzivnije proteolitičke promjene uzrokovane djelovanjem sirila.
5. Dodatak ekstrakta lista masline jestivom premazu uzrokovao je povećanje koncentracije ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta određivanog FRAP metodom, a koji je bio recipročan dodanoj koncentraciji polifenola.
6. Svi uzorci sireva već prvog dana pokazuju povećane vrijednosti ukupnog broja bakterija i broja kvasaca i plijesni, a koji se povećao ili ostao približno isti tijekom 60 dana zrenja, što je moguća posljedica neadekvatnog režima pasterizacije mlijeka ili nepoštivanja hladnog lanca tijekom transporta u maloprodaju. Broj enterobakterija u svim ispitivanim uzorcima sira bio je u skladu s preporučenim vrijednostima tijekom zrenja, a u ni jednom uzorku nije utvrđena prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka što odgovara Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu.
7. U odnosu na pozitivnu kontrolu, zona inhibicije rasta bakterije *Staphylococcus aureus* je niža samo kod uzorka jestivog premaza na bazi proteina sirutke uz dodatak ekstrakta lista masline koncentracije polifenola $159,35 \text{ mg L}^{-1}$.

6. LITERATURA

Ayana B, Turhan KN (2009). Use of antimicrobial methylcellulose films to control *Staphylococcus aureus* during storage of Kasar cheese. *Packag Technol Sci*, 22(8), 461–469. <https://doi.org/10.1002/pts.870>

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>

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Barukčić I (2013). Optimiranje djelotvornosti procesa mikrofiltracije i ultrafiltracije sirutke primjenom keramičkih membrana (Disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:423690>

Benzie IFF, Strain JJ (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Berti S, Ollé Resa CP, Basanta F, Gerschenson LN, Jagus RJ (2019). Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, 31, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100447>

Bonilla J, Sobral PJA (2019). Gelatin-chitosan edible film activated with Boldo extract for improving microbiological and antioxidant stability of sliced Prato cheese. *Int J Food Sci Tech*, 54(5), 1617–1624. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14032>

Božanić R, Breški M, Barukčić I, Lisak Jakopović K (2022). Primjena jestivih filmova i prevlaka u proizvodnji sira. *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, 17(1–2), 40–46. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.17.1-2.2>

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

Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Tech*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>

Cerqueira MA, Sousa-Gallagher MJ, Macedo I, Rodriguez-Aguilera R, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *J Food Eng*, 97(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.019>

Costa MJ, Maciel LC, Teixeira JA, Vicente AA, Cerqueira MA (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Res Int*, 107, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>

Fajardo P, Martins JT, Fuciños C, Pastrana L, Teixeira JA, Vicente AA (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *J Food Eng*, 101(4), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>

Galus S, Kadzińska J (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends Food Sci Tech*, 45(2), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>

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

Henriques M, Santos G, Rodrigues A, Gomes DMGS, Pereira C, Gil M (2013). Replacement of conventional cheese coatings by natural whey protein edible coatings with antimicrobial activity. *J Hyg Eng Design*, 3, 34-47.

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

Irfan S, Murtaza MA, Mueen ud Din G, Hafiz I, Murtaza MS, Rafique S, Ameer K, Abrar M, Mohamed Ahmed IA (2023). Physicochemical, microbial, and functional attributes of processed Cheddar cheese fortified with olive oil–whey protein isolate emulsion. *Food Sci Nutr*, 11(3), 1247–1256. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3159>

Jovanović S, Maćej O, Barać M, Vučić T (2007). Promjene dušičnih tvari tijekom zrenja polutvrđog sira proizvedenog na temelju koagregata proteina mlijeka. *Mljekarstvo*, 57 (3), 169-193. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/17439>

Kampf N, Nussinovitch A (2000) Hydrocolloid coating of cheeses. *Food Hydrocolloids* 14:531–537

Kavas G, Kavas N, Saygili D (2015). The Effects of Thyme and Clove Essential Oil Fortified Edible Films on the Physical, Chemical and Microbiological Characteristics of Kashar Cheese. *J Food Quality*, 38(6), 405–412. <https://doi.org/10.1111/jfq.12157>

Kavas N, Kavas G, Saygili D (2016). Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *CyTA - J Food*, 14(2), 317–323. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1109001>

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

Kilara A, Vaghela MN (2018). Whey proteins. In *Proteins in Food Processing* (pp. 93–126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>

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

Kongo JM, Malcata FX (2016) Cheese: Processing and Sensory Properties. U: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (ured.) *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Cambridge, str. 748-754.

Maćej O, Jovanović S, Barać Lj (2007): *Proteini mleka*, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.

Mahcene Z, Khelil A, Hasni S, Bozkurt F, Goudjil MB, Tornuk F (2021). Home-made cheese preservation using sodium alginate based on edible film incorporating essential oils. *J Food Sci Tech*, 58(6), 2406–2419. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04753-3>

Marković K, Vahčić N, Hruškar M (2017) *Analitika prehrambenih proizvoda*, Interna skripta Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

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

Morr, CV (1979). Functionality of whey protein products. *New Zeal J Dairy Sci*.

Nottagh S, Hesari J, Peighambardoust SH, Rezaei-Mokarram R, Jafarizadeh-Malmiri H (2020). Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. *Biologia*, 75(4), 605–611. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00378-w>

Petrović D (2017) Proteoliza i promjene teksture sira iz mišine tijekom zrenja, (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

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 28. svibnja 2023.

Ramos ÓL, Fernandes JC, Silva SI, Pintado ME, Malcata FX (2012a). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Sci Nutr*, 52(6), 533–552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>

Ramos ÓL, Pereira JO, Silva SI, Fernandes JC, Franco MI, Lopes-da-Silva JA, Pintado ME, Malcata FX (2012b). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *J Dairy Sci*, 95(11), 6282–6292. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5478>

Ramos ÓL, Silva SI, Soares JC, Fernandes JC, Poças MF, Pintado ME, Malcata FX (2012c). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Res Int*, 45(1), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.016>

Ramos OL, Pereira JO, Silva SI, Amorim MM, Fernandes JC, Lopes-da-Silva JA, Pintado ME, Malcata FX (2011a). Effect of composition of commercial whey protein preparations upon gelation at various pH values. *Food Science and Technology*

Ramos OL, Pereira JO, Silva SI, Fernandes JC, Franco MI, Lopes-da-Silva JA, Pintado ME, Malcata FX (2011b). Development and evaluation of active edible whey protein isolate coatings to improve the storability of Saloio cheese. *Food Chemistry*

Sengul M, Degirmenci M, Erkaya T (2009) Compositional and Microbiological Characteristics During Ripening of Çeçil Cheese, a Traditional Turkish Cheese. *Asian J Chem* Vol. 21, No.4, 3087-3093

Seydim AC, Sarikus-Tutal G, Sogut E (2020). Effect of whey protein edible films containing plant essential oils on microbial inactivation of sliced Kasar cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100567>

Ščetar M, Barukčić I, Kurek M, Lisak Jakopović K, Božanić R, Galić K (2019) Packaging perspective of milk and dairy products, *Mljekarstvo* 69 (1), 3-20.

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 15. srpnja 2023.

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2009), <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/vodic-za-mikrobioloske-kriterije-za-hranu.pdf> pristupljeno 15. svibnja 2023.

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

Yangilar F (2017). Effects of natamycin edible films fortified with essential oils on the safety and quality parameters of Kashar cheese. *J Food Safety*, 37(2), e12306. <https://doi.org/10.1111/jfs.12306>

Youssef AM, Assem FM, El-Sayed SM, Salama H, Abd El-Salam MH (2017). Utilization of Edible Films and Coatings as Packaging Materials for Preservation of Cheeses. *J Packaging Tech Res*, 1(2), 87–99. <https://doi.org/10.1007/s41783-017-0012-3>

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 15. svibnja 2023.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis