

Kvaliteta polutvrđog kravljeg sira obogaćenog ekstraktom lista masline (*Olea europaea* L.) tijekom 60 dana zrenja

Madunic, Nicole

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:823693>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Nicole Madunic

**KVALITETA POLUTVRDOG KRAVLJEG
SIRA OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM LISTA
MASLINE (*Olea europaea L.*) TIJEKOM 60
DANA ZRENJA**

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

Projekt

Ovaj rad je nastao u sklopu projekta "Utjecaj primjene biljnih ekstrakata na svojstva i zrenje polutvrdog sira – SIROFONIJA", financiranog sredstvima Nacionalnog plana oporavka i otpornosti 2021.-2026.

ZAHVALA

Ova zahvala prvobitno je upućena sjajnoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ireni Barukčić Jurina, što mi je omogućila da završetak akademskog obrazovanja obilježim pod njezinim mentorstvom. Zahvalna sam na pružanim savjetima, neizmjerne pomoći i upućenoj potpori i brizi tijekom izrade diplomskog rada. Također bih se htjela zahvaliti izv. prof. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, Elizabeti Zandona, mag. ing. bioproc., tehničkoj suradnici Snježani Šimunić i kolegi Ivanu Miletiću što su kroz nesebičnu pomoć i stručne savjete olakšali provedbu eksperimentalnog dijela ovog rada. Nadalje, veliku zahvalu upućujem i profesorima te asistentima Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo na susretljivosti i omogućenom korištenju uređaja i opreme.

U konačnici, najveće hvala namijenjeno je dečku, obitelji i prijateljima, posebno mojoj nebeskoj ruži, što su bili moj stalni oslonac, podupirali me i motivirali tijekom svih veselih i stresnih trenutaka. I za kraju, zahvalu upućujem i Benu jer je kao strpljiv slušatelj učinio svako moje učenje lakšim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

KVALITETA POLUTVRDOG KRAVLJEG SIRA OBOGAĆENOG EKSTRAKTOM LISTA MASLINE
(*Olea europaea L.*) TIJEKOM 60 DANA ZRENJA

Nicole Madunic, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213938

Sažetak:

Iako je list masline nusprodukt proizvodnje maslinovog ulja, zahvaljujući bogatom polifenolnom sastavu, njegov dodatak u proizvodnji polutvrđog sira obogaćuje nutritivni sastav sira i tako pospješuje pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak dodatka ekstrakta lista masline u proizvodnji polutvrđog sira tijekom 60 dana zrenja. Proizveo se kontrolni sir, bez dodatka ekstrakta, te dva sira obogaćena različitim koncentracijama ekstrakta lista masline. Tijekom zrenja sireva praćena su fizikalna i kemijska svojstva, koncentracija ukupnih fenola i flavonoida, antioksidacijski kapacitet i aktivnost, intenzitet proteolize te mikrobiološka kvaliteta. Utvrđeno je da je dodatak ekstrakta lista masline rezultirao smanjenjem tvrdoće, gumenosti, elastičnosti i sposobnosti žvakanja sira, povećanjem intenziteta proteolize te povećanjem zelenog i žutog tona sira. Nakon 60. dana zrenja, sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline sadržavali su veće koncentracije ukupnih fenola te su zabilježene veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom.

Ključne riječi: polutvrđi sir, zrenje, ekstrakt lista masline, polifenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 67 stranica, 26 slika, 11 tablica, 67 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 20. prosinca 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

QUALITY OF SEMI-HARD COW'S MILK CHEESE FORTIFIED WITH OLIVE LEAF (*Olea europaea* L.) EXTRACT DURING A 60-DAY RIPENING PERIOD

Nicole Madunic, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058213938

Abstract:

Although olive leaves are a byproduct of olive oil production, their polyphenol-rich composition enhances the nutritional profile of semi-hard cheese when incorporated into its production, contributing to its positive effect on human health. The aim of this study was to evaluate the impact of incorporating olive leaf extract into semi-hard cheese production during a 60-day ripening period. A control cheese was produced, without the addition of the extract, and two cheeses fortified with different concentrations of olive leaf extract. Physical and chemical properties, total phenolic and flavonoid concentrations, antioxidant capacity and activity, proteolysis intensity, and microbiological quality of the cheeses were monitored throughout the ripening period. It was found that the addition of olive leaf extract resulted in a reduced hardness, gumminess, springiness and chewiness of the cheese, an increased proteolysis intensity, and deepened green and yellow hues of the cheese. After 60 days of ripening, the cheeses fortified with the olive leaf extract contained a higher total phenolic concentration and exhibited greater antioxidant capacity, as determined by the FRAP method.

Keywords: semi-hard cheese, ripening, olive leaf extract, polyphenolic compounds, antioxidant capacity

Thesis contains: 67 pages, 26 figures, 11 tables, 67 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Irena, Barukčić Jurina, PhD, Associate professor

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

Thesis defended: December 20th, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROIZVODNJA SIRA	2
2.1.1. Promjene tijekom zrenja sireva.....	4
2.2. PREHRAMBENA VRIJEDNOST SIRA	5
2.3. MASLINA (<i>Olea europaea L.</i>)	6
2.3.1. List masline	6
2.3.2. Ekstrakt lista masline	7
2.4. METODE EKSTRAKCIJE	9
2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	11
2.5. SUVREMENI PRISTUP ISKORIŠTENJU NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Aparatura.....	18
3.1.3. Pribor.....	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline	19
3.2.2. Proizvodnja polutvrdog sira s ekstraktom lista masline	20
3.2.3. Određivanje aktiviteta vode sireva	21
3.2.4. Određivanje kiselosti sireva	21
3.2.4.1. Određivanje pH-vrijednosti sireva.....	21
3.2.4.2. Određivanje titracijske kiselosti sireva metodom po Soxhlet-Henkelu	21
3.2.5. Određivanje kemijskog sastava sira.....	21
3.2.6. Određivanje teksture sireva	22
3.2.7. Određivanje indeksa boje sireva.....	22
3.2.8. Određivanje ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu i količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) metodom po Kjeldahlu	23
3.2.9. Provođenje natrij dodecil sulfat-poliakrilamidne gel elektroforeze proteina (SDS- PAGE)	24
3.2.10. Mikrobiološke analize sireva	25
3.2.11. Spektrofotometrijske metode analize	28
3.2.11.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	28
3.2.11.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	29

3.2.11.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu	31
3.2.11.4. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida.....	32
3.2.12. Obrada podataka.....	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZA SIRA.....	35
4.1.1. Aktivitet vode i udio vlage	35
4.1.2. Kiselost sira	37
4.1.3. Tekstura sira	39
4.1.4. Boja sira	43
4.1.5. Rezultati određivanja dušika topivog u vodenom ekstraktu (WSN) i trikloroctenoj kiselini (TCA-SN), proteolize te SDS-PAGE analize	48
4.1.6. Kemijski sastav sira	52
4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA	54
4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola određenih metodom po Folin-Ciocalteu	54
4.2.2. Koncentracija ukupnih flavonoida	55
4.2.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	56
4.2.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	57
4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIREVA.....	59
5. ZAKLJUČCI	62
6. LITERATURA.....	63

1. UVOD

Sirarstvo je važan segment mliječne industrije, koji se stalno razvija s ciljem povećanja raznolikosti sireva i unaprjeđenja tehnologija proizvodnje. Proizvodnja sireva temelji se na složenim fizikalno-kemijskim i biokemijskim procesima, pri čemu je ključno održavanje ujednačene kvalitete proizvoda. Kako bi se odvile potrebne promjene sastojaka mlijeka tijekom proizvodnje polutvrdih i tvrdih sireva, neophodno je provesti proces zrenja u kontroliranim uvjetima. Tijekom tog procesa odvijaju se biokemijske promjene koje utječu na aromu i teksturu sira te doprinose lakšoj probavljivosti sira što potvrđuje da je sir nutritivno bogata namirnica. Budući da je upotreba sireva široko rasprostranjena, oni su prikladna prehrambena namirnica namijenjena za obogaćivanje njihovog sastava bioaktivnim spojevima.

U posljednjih nekoliko godina obogaćivanje prehrambenih proizvoda bioaktivnim spojevima steklo je veliku popularnost zbog sve veće potražnje potrošača za prehrambenim proizvodima s dodanom vrijednošću. Bioaktivni spojevi mogu značajno doprinijeti zdravstvenoj vrijednosti hrane, ali i utjecati na njene senzorske karakteristike kao što su okus, boja i tekstura. U današnje vrijeme prisutno je sve više znanstvenih istraživanja koja za svoj cilj imaju ispitati nusproizvode prehrambene industrije te agronomije kao izvor bioaktivnih spojeva. Po završetku rezidbe i berbe maslina, lišće predstavlja otpad, a zahvaljujući bogatom polifenolnom sastavu i dokazanim pozitivnim učincima na fiziološke funkcije ljudskog organizma, ono ima potencijal postati sastavni dio mnogih prehrambenih proizvoda. Ipak, ekstrakt lista masline karakterizira gorak, opor okus i tamna boja te njegovo obogaćivanje prehrambenih proizvoda, pa tako i sira, predstavlja izazov. Tijekom razvoja tako obogaćenih namirnica bitno je postići ravnotežu između nutritivnog poboljšanja namirnice i očuvanja kvalitete proizvoda.

Namjera ovog istraživanja bila je proizvesti enzimski koagulirani sir s dodatkom dvije različite koncentracije ekstrakta lista masline. Određujući fizikalno-kemijske parametre, antioksidacijsku aktivnost i kapacitet te provodeći mikrobiološke analize, pratio se utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na zrenje sira tijekom 60 dana u kontroliranim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROIZVODNJA SIRA

Pokušavajući sačuvati hranjiva svojstva prirodne hrane, mlijeka, nastao je sir, o čijoj pojavi svjedoče brojni povijesni dokazi koji datiraju iz vremena prije Krista. Ovisno o načinu i modifikacijama tijekom proizvodnje, na svijetu postoji približno 2000 različitih vrsta sireva, no prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009) sir se definira kao svježi proizvod ili proizvod s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvodi odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka, vrhnja, sirutke ili kombinacijom navedenih sirovina. Obzirom na konzistenciju i građu sira te udio vode u bezmasnoj tvari sira (tablica 1), oni se definiraju kao ekstra tvrdi, tvrdi, polutvrđi, meki i svježi sirevi (Pravilnik, 2009).

Tablica 1. Naziv sira obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira (Pravilnik, 2009)

Naziv sira	Udio vode u bezmasnoj tvari sira (%)
Ekstra tvrdi sir	<51
Tvrdi sir	49 – 56
Polutvrđi sir	54 – 69
Meki sir	>67
Svježi sir	69 – 85

Usporedivši sir s ostalim mliječnim proizvodima, može se zaključiti kako on prednjači u raznovrsnosti i kompleksnosti njegove proizvodnje. Osim po udjelu vode u bezmasnoj suhoj tvari, sir se može kategorizirati i prema vrsti proteina, vrsti mlijeka, načinu grušanja, udjelu masti u suhoj tvari, sličnom procesu proizvodnje, načinu zrenja te prema području ili mjestu proizvodnje (Tratnik i Božanić, 2012).

Budući da je u proizvodnji sireva uvriježena upotreba sirila i drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima, mljekarskih kultura te kiselina za koagulaciju, može se navesti kako su osnovni sastojci sira mlijeko, enzimi za zgrušavanje (sirilo), bakterijske kulture i sol (Hill i Ferrer, 2021; Pravilnik, 2009). Proizvodnja sira obuhvaća proces uklanjanja vode, laktoze i nekih mineralnih tvari iz mlijeka kako bi se dobio koncentrat mliječne masti i proteina, odnosno sir je proizvod selektivne koncentracije mlijeka (Hill i Ferrer, 2021). Dobiveni koncentrat nastaje grušnjem mlijeka, nakon čega slijedi sušenje gruša, odnosno izdvajanje sirutke, i oblikovanje sirnih zrna. Navedeni postupci zajednički su u proizvodnji svih vrsta sireva, a sama tehnologija proizvodnje sira ima za cilj proizvesti sir željenih senzorskih osobina i postaviti tehnološki lako ponovljiv protokol koji garantira ujednačenu kvalitetu proizvoda (Kalit, 2015).

Proizvodnja sira započinje odabirom glavne sirovine, odnosno mlijeka, koje je najčešće kravlje, no ono može biti i ovčje, kozje, bivolje ili mlijeko ljame i deve. Svojstva i količina kazeina, proteina mlijeka, te količina topljivog kalcija bitni su parametri u odabiru mlijeka za proizvodnju sira. Budući da sir predstavlja mliječni proizvod u kojem su koncentrirani sastojci

mlijeka, kao što su proteini, važno je da mlijeko sadrži visok udio kazeina, ponajviše κ -kazeina, koji doprinosi većem prinosu i boljoj kvaliteti sira. Ionski kalcij (Ca^{2+}) tijekom sirenja mlijeka djelovanjem enzima, utječe na stvaranje veza između micela para- κ -kazeina, na čvrstoću nastalog gruš a te na vrijeme koagulacije i konačnu teksturu samoga sira (Galli i sur., 2023). Ipak, uz navedeni poželjan sastav mlijeka, bitno je da ono bude higijenski proizvedeno, odnosno mikrobiološki ispravno, te čuvano pri nižim temperaturama tijekom što kraćeg vremenskog perioda.

Nakon odabira mlijeka, slijedi njegova standardizacija, odnosno podešavanje udjela mliječne masti u suhoj tvari mlijeka. Prema Galli i suradnicima (2023) glavni ciljevi standardizacije su postići poželjan sastav mlijeka, koji se tijekom sezone mijenja, i tako umanjiti poteškoće tijekom prerade mlijeka, postići predvidljivost procesa proizvodnje sira i u konačnici proizvesti ujednačeno kvalitetne proizvode. Kako bi se postigao optimalan odnos kazeina i mliječne masti, provodi se obiranje mliječne masti iz punomasnog mlijeka ili se dodaje obrano mlijeko u prahu. Tehnologija proizvodnje sira ne zahtjeva nužno primjenu visokih temperatura tijekom toplinske obrade mlijeka jer ona oštećuje svojstvo sirenja, otpuštanje sirutke te uzrokuje vrlo meki sir, ali kako bi se spriječila zaraza potrošača patogenim bakterijama primjenjuje se proces pasterizacije. U industriji se najčešće provodi srednja pasterizacija pri 72-73 °C u trajanju 15-20 sekundi u pločastim izmjenjivačima topline. Procesu pasterizacije mogu prethoditi postupci baktofugacije ili mikrofiltracije mlijeka jer sama pasterizacija ne će uništiti spore sporogenih bakterija (Tratnik i Božanić, 2012).

U mlijeko se prije sirenja mogu dodati potrebni dodaci kao što su kalcijev klorid, natrijev klorid, natrijev ili kalijev nitrat, pripravci lizozima, ekstrakti boja, mikrobne kulture te sirilo, kako bi se poboljšala kvaliteta mlijeka i povećao prinos sira. Ukoliko se želi proizvesti polutvrđi ili tvrdi sir, sirenje mlijeka provodi se djelovanjem enzima sirila pri temperaturi od 28-34 °C. Sirilo je enzimski pripravak životinjskog podrijetla te se sastoji od kimozina i pepsina, koji provode kontroliranu i specifičnu proteolizu kazeina pri čemu mlijeko prelazi iz tekućeg u kruto agregatno stanje (Kalit, 2015). Kako bi nastao slatki gruš poželjne strukture, potrebno je podesiti i uskladiti parametre kao što su temperatura, pH i količina kalcijeva klorida. Za razliku od slatkog gruš a, kiseli gruš nastaje snižavanjem pH vrijednosti mlijeka do 4,6 što je pH vrijednost izoelektrične točke kazeina. Kiselina može biti direktno dodana u mlijeko ili može nastati u mlijeku kao posljedica fermentacije mezofilnih kultura bakterija mliječne kiseline. Zbog demineralizacije kazeina, ovako nastali gruš ima meku i lomljivu strukturu te je njegovo stvaranje prvi korak u proizvodnji svježeg sira (Tratnik i Božanić, 2012).

Nakon formiranja gruš a, unutar njega zaostaje „zarobljena“ vodena faza mlijeka, odnosno sirutka, koja se izdvaja s ciljem postizanja željenog stupnja koncentracije masti i kazeina u siru. Rezanje gruš a pospješuje uklanjanje sirutke jer se povećava površina i skraćuje put za njeno izdvajanje (Hill i Ferrer, 2021). Nakon što se formiraju sirna zrna, ona se prebacuju u

posebno oblikovana cjedila, gdje kroz perforacije na kalupu prolazi sirutka, a u kalupu se oblikuje sirna masa. Netom oblikovana sirna masa raspoređuje se u sirne kalupe za samoprešanje ili u kalupe za prešanje pod određenim tlakom koji se postepeno povećava i ovisi o vrsti sira. Prešanjem se dodatno izdvaja višak sirutke te oblikuje sir u željenu dimenziju i oblik. U konačnici, kako bi se zaustavio daljnji tijek fermentacije i produljila trajnost sireva, oni se sole pročišćenom kuhinjskom soli. Najčešći načini soljenja sira su utrljavanje soli po površini sira ili uranjanje sira u salamuru pri 10-15 °C. Tako oblikovana i posoljena sirna masa odlazi na zrenje, pakiranje i skladištenje (Kalit, 2015).

2.1.1. Promjene tijekom zrenja sireva

Kako bi se postigla karakteristična senzorska svojstva pojedinog sira potrebno je provesti proces zrenja, odnosno proces sazrijevanja sirne mase u zreli sir. Zahvaljujući provedenom zrenju, tijekom kojeg dolazi do biokemijskih promjena razgradnje složenih organskih spojeva u jednostavnije, sir poprima svojstven miris, aromu, boju, konzistenciju i oblik (Kalit, 2015).

Zrenje sirne mase odvija se u posebnim prostorijama (zrionama) koje omogućuju povoljnu temperaturu, relativnu vlažnost i sastav zraka kako bi se uspješno odvijali svi biokemijski procesi tijekom zrenja sira. Meki sirevi zriju na nižim temperaturama, a tvrdi sirevi pri višim temperaturama, dok relativna vlažnost zraka u zrioni varira između 85 i 95 %. Mnoge biokemijske promjene, koje se odvijaju tijekom zrenja, rezultat su djelovanja mikrobne kulture, sirila, sekundarne mikroflore ili njihovih enzima i autohtonih enzima u mlijeku. Supstrati proteolitičkih enzima su proteini, ponajviše kazein, dok lipaze djeluju na razgradnju masti. Zrenje u širem smislu započinje već tijekom procesa proizvodnje sira, odnosno nakon dodavanja kulture bakterija mliječne kiseline i sirila, te se nastavlja u zrioni. Tijekom proizvodnje sira dolazi do razgradnje laktoze djelovanjem bakterija mliječne kiseline kroz mliječno-kiselo vrenje. Razgradnja laktoze ovisi o udjelu soli i vode u siru. Ukoliko je više od 5 % soli u siru, doći će do inhibiranja aktivnosti kulture. Stoga, ako sir sadrži manji udio soli, zadržat će se više laktoze, i pH vrijednost sira bit će veća. Za razliku od masti i proteina, doprinos laktoze okusu sira je minimalna. Nastala mliječna kiselina djeluje antimikrobno, snižava redoks potencijal i pH te stabilizira sir, što garantira postepeno odvijanje enzimskih reakcija, uključujući proteolizu i lipolizu (Perko, 2015; Tratnik i Božanić, 2012).

Tijekom primarnog zrenja sireva u zrioni, pod utjecajem mliječne kiseline i soli u siru te djelovanjem proteolitičkih enzima, dolazi do promjena na proteinima. Mliječna kiselina vezuje dio kalcija iz Ca-parakazeinata i prevodi ga u mono-Ca-parakazeinat koji djelovanjem soli, pri povoljnoj pH vrijednosti (5,2-5,6) postaje dostupan djelovanju proteolitičkih enzima. Navedene promjene na proteinima, olakšavaju daljnju proteolizu te utječu na povoljnu konzistenciju sira jer sirno tijesto postaje plastično i gipko. U sirevima prije zrenja proteini su netopljivi, ali napredovanjem zrenja napreduje i hidroliza proteina u jednostavnije, topljive komponente.

Stoga, zrelost sira može se kontrolirati određivanjem udjela topljivog dušika u siru. Osim tijekom hidrolize proteina, topljive komponente nastaju i kroz propionsko-kiselo vrenje, a one su proteoze, peptoni, polipeptidi i aminokiseline. Nastali razgradni produkti proteina utječu na povećanje pH vrijednosti sira, što dovodi do smanjenja sinereze pa su gubici sira manji, a udio zaostale vode u siru bitno utječe na konzistenciju i teksturu. Tijekom zrenja polutvrdih i tvrdih sireva najčešće se razgradi približno 1/3 prisutne količine proteina (Perko, 2015; Tratnik i Božanić, 2012).

Iako do lipolize dolazi tijekom primarnog zrenja, razgradnja masti značajnije se odvija tijekom sekundarnog zrenja sireva. Lipoliza masti dovodi do oslobađanja masnih kiselina, što su prekursori tvari arome sira. O količini i vrsti produkata razgradnje proteina i masti, osobito produkata razgradnje aminokiselina i masnih kiselina, ovisi intenzitet okusa i mirisa sireva, odnosno aroma sira opisuje se kao prisutnost ili odsutnost određenih aminokiselina, masnih kiselina, aldehida, ketona i estera. U konačnici, što je sir zreliji boljih je senzorskih osobina i lakše je probavljiv (Perko, 2015; Tratnik i Božanić, 2012).

2.2. PREHRAMBENA VRIJEDNOST SIRA

Sir je nutritivno bogat mliječni proizvod, čiji sastav može varirati ovisno o vrsti upotrijebljenog mlijeka, postupcima proizvodnje i zrenju. Sir je koncentrat proteina i masti, odnosno bogat je tvarima topljivim u mastima, a sadrži relativno male količine sastojaka topivih u vodi (laktoza, proteini sirutke, vitamini topivi u vodi), koji se odvajaju sirutkom.

Sir je izvor visokokvalitetnih proteina, a unosom 100 g tvrdog sira može se osigurati oko 40-50 % proteina dnevno potrebnih u prehrani ljudi. Biokemijski procesi zrenja imaju ulogu prethodne probave pa su zreliji sirevi lakše probavljivi, a nastali peptidi i aminokiseline utječu na razvoj okusa i teksture sira. Smatra se da su proteini sira probavljiviji od proteina mlijeka, odnosno stvarna je probavljivost većine sireva približno 100 %. Iskorištenost aminokiselina od proteina sira veća je od proteina mlijeka, a približno ista kao od proteina jaja. Ako se indeksu esencijalnih aminokiselina za ukupne proteine u mlijeku dodjeli vrijednost 100 tada se proteinima sira može dodijeliti vrijednost 91-97. Ovisno o vrsti i stupnju zrelosti sira, pri konačnom zrenju sira može se povećati udio raspoloživog lizina, čak na više od 90 %. Kao i ostali mliječni proizvodi, sir je izvor i bioaktivnih peptida koji se ističu po antimikrobnom, protuupalnom, antioksidativnom i antikancerogenom djelovanju (O'Callaghan i sur., 2016; Božanić, 2015; Tratnik i Božanić 2012).

Zreli sirevi sadrže uglavnom između 30-50 % masti u suhoj tvari, a mliječna se mast u siru nalazi u obliku emulzije. Osim što mast utječe na razvoj arome, ona direktno doprinosi hranjivoj vrijednosti sira. Mliječna je mast vrlo probavljiva, sadrži više od 200 različitih masnih kiselina, a neke od dominantnih zasićenih masnih kiselina su palmitinska, miristinska i stearinska te glavna nezasićena masna kiselina je oleinska. Osim kratkolančanih masnih kiselina, sir je

također bogat izvor konjugirane linolenske kiseline (CLA) i fitanske kiseline. Konjugiranoj linolenskoj kiselini pripisani su mnogi zdravstveni benefiti kao što su antikancerogena i protuupalna svojstva, a fitanska se kiselina ističe po sposobnosti poboljšanja unosa glukoze u hepatocite i sprječava razvoj dijabetesa tipa II. S količinom masti u siru povezana je količina u masti topljivih vitamina te ih može biti 5-8 puta više, nego u mlijeku (O'Callaghan i sur., 2016; Božanić, 2015; Tratnik i Božanić 2012).

Ovisno o udjelu mliječne masti u siru, ovisi i koncentracija vitamina, no sir može biti važan izvor riboflavina (B₂), vitamina A i B₁₂. Količina vitamina B kompleksa uglavnom se mijenja tijekom zrenja sira jer ih mikrobnog kulture koriste ili sintetiziraju, kao na primjer tijekom zrenja ementalera bakterije propionske kiseline sintetiziraju veće koncentracije vitamina B₁₂.

Osim vitamina, sirevi sadržavaju također i bitnu količinu mineralnih tvari, kao što su kalcij, fosfor i magnezij. Bioraspoloživost kalcija iz sira može se usporediti s onom iz mlijeka, ali udio kalcija u siru ovisi o načinu proizvodnje sira. Kod sireva koji se proizvode kiselo mliječnom fermentacijom, kao što je svježi sir, dolazi do povećanja kiselosti i otapanja kalcija iz grušća koji se odvaja sirutkom. Stoga, sirevi proizvedeni enzimskom koagulacijom sadrže veći udio kalcija, pa 100 g tvrdog sira može 100 % zadovoljiti dnevnu potrebu kalcija u organizmu odrasle osobe (Božanić, 2015; Tratnik i Božanić 2012).

2.3. MASLINA (*Olea europaea L.*)

Maslina (lat. *Olea europaea*) slovi za najplemenitiju mediteransku kulturu, a njezina primjena može biti višestruka. Iako je maslinovo ulje glavna masnoća u mediteranskoj prehrani, plodovi masline mogu se, kao takvi, koristiti za konzumaciju, dok je drvo masline bilo vrlo cijenjeno i koristilo se za ogrjev, izradu pokućstva i umjetničkih rezbarija (Škevin, 2016).

Gledajući na svjetskoj razini, 98 % stabala maslina danas raste u području južne Europe te se tako i zove *Olea europaea*. Maslina je zimzeleno drvo s vrlo razgranatim korijenom i debelim stablom iz kojeg se razvija nekoliko glavnih i više sporednih grana te su one zaslužne za bogatu krošnju. Drvo masline uglavnom je rasprostranjeno u priobalnom pojasu Sredozemnog mora, gdje vlada sredozemna klima s dugim, suhim i toplim ljetima te blagom i kišovitom zimom. Za rast ove kulture potrebno je osigurati rahlo tlo koje može omogućiti stablu dovoljnu količinu vlage i ima odgovarajuću kiselost (pH između 7 i 8). Klasifikacija sorti maslina vrlo je složena, ali prema namjeni mogu se svrstati u uljne i stolne sorte. Hrvatska autohtona i najrasprostranjenija sorta masline je oblica, koja je ujedno poslužila kao sirovina u proizvodnji ekstrakta lista masline (Škevin, 2016).

2.3.1. List masline

List masline je duguljast, kopljast sa oštrim vrhom. Kožica mu je tvrda, gornja strana zelene boje, a donja zelenkasta sa srebrno bijelim odsjajem. Na grančicama listovi rastu jedni

nasuprot drugima, a oblik i boja lista različiti su za pojedinu sortu (Škevin, 2016). Povijesno gledano, svježi ili osušeni listovi masline koristili su se za pripremu čaja diljem Mediterana. Zahvaljujući bogatom polifenolnom sastavu lišća, čaj se isticao po zdravstvenim dobrobitima i oporom, gorkom okusu. Osim kao čaj, ono se koristilo i kao lijek za liječenje groznice i drugih infekcija, uključujući malariju, u mediteranskim i europskim zemljama kao što su Španjolska, Tunis, Grčka, Maroko, Italija, Turska, Palestina i Francuska (Selim i sur., 2022).

Nakon provedenih nekoliko istraživanja na životinjama, ustanovilo se da lišće masline djeluje na smanjenje aritmije i krvnog tlaka, utječe na povećanje protoka krvi te njegovom uporabom može se izbjeći grčenje crijevnih mišića. Listovima masline, također se pripisuje antimikrobno djelovanje protiv gljivica, bakterija i toksina. Navedeni pozitivni učinci konzumacije lista masline, posljedica su njegovog kemijskog sastava. Primarni i sekundarni biljni metaboliti, odnosno bioaktivni spojevi, nastaju u lišću kao primarnom mjestu odvijanja metaboličkih reakcija. Fenolni spojevi ili polifenoli su sekundarni metaboliti koji nastaju nizom reakcija kao zaštita biljci protiv napada insekata, mikroorganizama i gljivica. Osim jednostavnijih fenolnih spojeva i flavonoida (flavona, flavanona, flavonola i flavan-3-ola), lišće masline sadrži i složenijske sekoiridoide, karakteristične za masline. Ukupna koncentracija polifenola u stablu opada tijekom ljeta, ali progresivno raste u jesen i doseže višu razinu početkom zime. Upravo su to periodi godine kada se provodi berba i rezidba maslina, nakon čega zaostaje lišće kao najveći nusproizvod uzgoja maslina. Tijekom rezidbe maslina, s jednog stabla ukloni se do 25 kg lišća i grančica, a tijekom procesa berbe 10 % ukupnog ubranog sadržaja otpada na lišće. Iako se lišće i grančice nakon rezidbe mogu iskoristiti u proizvodnji nanoceluloze i tako pospješiti funkcionalnost polimernih materijala namijenjenih za pakiranje hrane, zbog bogatog polifenolnog sastava lišće je, ipak, prepoznato kao sirovina za proizvodnju ekstrakta (Silvestrini i sur., 2023; Selim i sur., 2022; Hajdinjak, 2017).

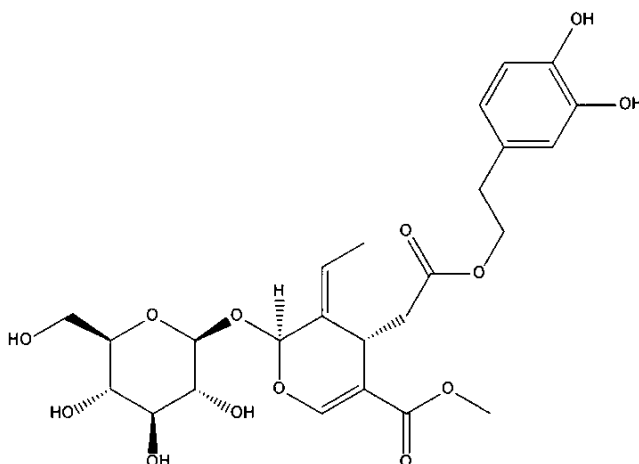
2.3.2. Ekstrakt lista masline

Polifenole iz lista masline moguće je izolirati ekstrakcijskim metodama, no postoji mnogo parametara koji utječu na učinkovitost procesa, kao što su temperatura, pH, omjer otapala i suhog lista masline, vrsta otapala i veličina čestica usitnjenog lista masline te broj ponavljanja ekstrakcije. Ekstrakt lista masline jedan je od najvrjednijih nusproizvoda prerade maslina. Ekstrakt se može okarakterizirati kao tamnosmeđa tekućina s gorkim okusom i velikim udjelom bioaktivnih spojeva, među kojima su sekoiridoidi, hidroksitirozoli, polifenoli, triterpeni i flavonoidi, čija koncentracija varira ovisno o sorti, području i uvjetima uzgoja maslina (Selim i sur., 2022)

Ekstrakt lista masline sadrži mnogo različitih spojeva koji se zajednički nazivaju biofenoli masline, za koje se smatra da ekstraktu daju različita terapijska svojstva (Borjan i sur., 2020). Fenolni se spojevi ubrajaju u specifične pigmente, a osnovnu strukturu čini aromatski prsten

na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Oni se, uz celulozu, uvrštavaju među najzastupljenije gradivne komponente biljaka, a osim strukturne uloge utječu na boju, okus i miris biljaka te njezinih ekstrakata. Glavna fenolna komponenta ekstrakta lista masline je oleuropein, ester 3,4-dihidroksi-feniletanola (hidroksitirozol) i β -glukozilirane elenolne kiseline, a pripada specifičnoj skupini spojeva sličnih kumarinu, nazvanih sekoiridoidi. Sekoiridoidi su biološki aktivni spojevi karakteristični za porodicu *Oleaceae* te se u listu masline nalaze kao derivati monoterpena s iridanskom strukturom. Također, oni su najčešće glikozidno vezani i sintetiziraju se sekundarnim metabolizmom terpena kao prekursora raznih indolnih alkaloida (De la Rosa i sur., 2019 ; Omar, 2010).

Oleuropein (slika 1) općenito je najistaknutiji fenolni spoj u porodici maslina. Iako je prisutan u koži, mesu i sjemenkama, najviše ga ima u lišću masline pa tako i u ekstraktu. U prosjeku čini 6-14 % suhe tvari lišća, no ovisno o sorti masline, tlu i vremenu berbe, sadržaj oleuropeina može porasti čak do 17-23 % suhe tvari (Hielscher Ultrasonics). Dio molekulske strukture oleuropeina je i orto-difenolna (katehol) struktura koja djeluje kao antioksidans te utječe na visoki antioksidacijski kapacitet oleuropeina (Hajdinjak, 2017). Ovaj biofenol odgovoran je za gorak okus maslina te sudjeluje u posmeđivanju zelenih maslina, do kojeg dolazi kao posljedica udarača tijekom berbe ili naknadne obrade.



Slika 1. Molekulska struktura oleuropeina (prema Şahin i Bilgin, 2018)

Kvaliteta ekstrakta lista masline, osim zbog razlike u koncentraciji oleuropeina, može ovisiti i o metodi provedene ekstrakcije i vrsti korištenog otapala, koncentraciji ukupnih fenola, pa tako i o udjelu hidroksitirozola, što direktno utječe na njegovo antibakterijsko i antioksidativno svojstvo (Selim i sur., 2022).

Glavne dokazane biološke aktivnosti oleuropeina su antioksidativni i protuupalni učinci, odnosno sposobnost liječenja bolesti povezanih s oksidacijom i upalom kao što su kardiovaskularne bolesti, poremećaj jetre, pretilost i dijabetes. Oleuropein pokazuje antiklastogenu aktivnost, svojstvo hvatanja slobodnih radikala i inhibiciju razvoja različitih vrsta tumorskih stanica (Borjan i sur., 2020).

Pod djelovanjem svjetla, visoke temperature, kiseline ili lužine, oleuropein se razlaže na hidrokšitirozol i elenolnu kiselinu. Hidrokšitirozol je molekula topljiva u vodi i lipidima te se kod ljudi može apsorbirati u tankom i debelom crijevu, te na taj način postići protuupalno i antimikrobno djelovanje (Borjan i sur., 2020; Granados-Principal, 2010).

Selim i suradnici (2022) navode kako je oleuropein u vodenom ekstraktu tijekom skladištenja u trajanju 7 dana ostao stabilan pri sobnoj temperaturi, ali je izgubio aktivnost i razgradio se nakon 17 dana. Također, savjetuju da se tekući ekstrakt lista masline čuva na niskoj temperaturi, bez svjetla, a ekstrakt u prahu može se čuvati pri sobnoj temperaturi. Uz to navode, da se ponekad komercijalno dostupnom ekstraktu lista masline u kapsulama mogu dodati antioksidansi, čime se produljuje rok trajanja na 2 godine.

Spoznaja o sinergističkim učincima svih fenolnih spojeva prisutnih u ekstraktu lista masline potaknula je farmaceutske i prehrambene industrije na dodatna znanstvena istraživanja, čime bi približili ovaj blagotvoran ekstrakt široj populaciji.

2.4. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva biljaka primarni je korak u njihovoj daljnjoj analizi i implementaciji, no odabir optimalne ekstrakcijske tehnike ovisi o analiziranom materijalu, odnosno vrsti biljnog tkiva i svojstvima analiziranog bioaktivnog spoja. Općenito, cilj ekstrakcije je izdvojiti topljive komponente od netopivih ili manje topljivih komponenata iz biljnog materijala ili matriksa, pomoću odgovarajućeg otapala. Osim razlike u svojstvima i stabilnosti analiziranog spoja, proces ekstrakcije ovisi o nizu drugih parametara koje treba uzeti u obzir prije provođenja separacije bioaktivnih spojeva.

Kako bi se proveo proces ekstrakcije potrebno je obraditi i pripremiti biljni materijal za istu. Priprema materijala podrazumijeva usitnjavanje, homogenizaciju, centrifugiranje, taloženje i hidrolizu te odmrzavanje ukoliko je potrebno. Biljke metaboliziraju fenolne spojeve u topljivom obliku u vakuoli, dok su netopljivi vezani fenolni spojevi lokalizirani u staničnoj stjenici. Tijekom procesa prethodne obrade, biljne se stanice i tkiva usitnjuju što utječe na povećanje dostupne biljne površine otapalu koje uspješno otapa topive fenole. Za vrijeme ekstrakcije, osušeni i usitnjeni biljni materijal okružen je slojem otapala, na primjer vodom. Kako bi se nadoknadio gubitak vode u osušenom biljnom materijalu, voda ulazi u materijal i dolazi do njegovog bubrenja. Topljivi fenoli koji se nalaze u biljnom materijalu otopit će se u vodi i migrirati prema masi otapala, odnosno doći će do procesa difuzije. Difuzija podrazumijeva spontani prijenos tvari iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije, a brzina difuzije ovisi o veličini dodirne površine otapala i materijala. Stoga, mljevenjem biljnog materijala povećava se dodirna površina i brzina prijenosa bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala u otapalo (Alwazeer i sur., 2023). Međutim, ukoliko je biljni materijal previše usitnjen, može doći do prevelike apsorpcije otapala u biljni materijal i otežane naknadne separacije ekstrakta. Osim

veličine čestica, na uspješno provedenu ekstrakciju utječe i trajanje ekstrakcije, temperatura te vrsta izabranog otapala. Trenutak u kojem se postigne ravnotežna koncentracija otopljenih tvari u otapalu i uzorku predstavlja faktor koji ograničava vrijeme provođenja ekstrakcije. No, na vrijeme potrebno za ekstrakciju utječe i temperatura, odnosno pri povišenoj temperaturi povećava se brzina otapanja komponente i raste brzina difuzije u volumenu otapala. Ekstrakcija se najčešće provodi pri sobnoj ili višim temperaturama, ali ona nikada ne prelazi 100 °C jer tada može doći do oštećenja željene komponente ili ekstrakcije nepoželjnih tvari te je tako provedena ekstrakcija ekonomski neisplativa (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Xu i suradnici (2017) navode da je otapalo najutjecajniji čimbenik pri provođenju ekstrakcije, odnosno izbor otapala ovisi o vrsti i svojstvima komponente koja se želi ekstrahirati. Brojna otapala koriste se za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljaka, no odabir otapala ponajviše ovisi o kemijskoj strukturi i polarnosti željene ekstrahirane komponente. Većina fenola, flavonoida i antocijana su hidrofilni antioksidansi, stoga se za njihovu ekstrakciju koriste polarna i srednje polarna otapala, kao što su voda, etanol, metanol, propanol, aceton i njihove vodene smjese. Dok su karotenoidi antioksidansi topljivi u lipidima, a za njihovu ekstrakciju se koriste uobičajena organska otapala, kao što su smjese heksana s acetonom, etanolom, metanolom ili smjese etil acetata s acetonom, etanolom ili metanolom. Viskoznost otapala ne smije biti previsoka jer ono utječe na protok otapala kroz sloj krutih čestica. Što je protok otapala kroz sloj krutih čestica veći, smanjuje se granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica te se povećava brzina ekstrakcije. Uz navedena poželjna svojstva otapala, također je bitno da je ono nereaktivno s ostalim spojevima, da ima nisku cijenu te da nije štetno za ljude i okoliš (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Bioaktivni spojevi biljaka mogu se ekstrahirati različitim metodama, a one se mogu klasificirati u dvije glavne kategorije: konvencionalne i nekonvencionalne ili nove tehnike. Konvencionalne tehnike ekstrakcije uključuju Soxhlet ekstrakciju, maceraciju (Sagar i sur., 2018), vodenu destilaciju, perkolaciju, ekstrakciju toplinskim refluksom i dekokciju (Vranković, 2022). Iako je Soxhlet ekstrakcija prvobitno bila namijenjena za ekstrakciju lipida, danas se koristi za ekstrakciju visokovrijednih bioaktivnih spojeva iz različitih prirodnih izvora te je upravo ova vrsta ekstrakcije temeljni model za razvoj novih tehnika ekstrakcije. Maceracija je najjednostavnija i najjeftinija tehnika, no tijekom njenog provođenja neophodno je stalno miješanje (Sagar i sur., 2018). Iako su ove metode ekstrakcije bile početne tehnike u separaciji bioaktivnih spojeva, njihovi nedostaci utjecali su na razvoj novih tehnika. Konvencionalne metode ekstrakcije najčešće se provode pri višim temperaturama, što utječe na stabilnost spojeva osjetljivih na toplinu, dugotrajne su, provode se pomoću organskih otapala koja su skupa i štetna za ljudsko zdravlje te se ističu po niskoj ekstrakcijskoj selektivnosti. U potrazi za komercijalno održivim, učinkovitim, energetski štedljivim i sigurnim metodama ekstrakcije, razvile su se nove tehnike ekstrakcije, kao što su ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim

električnim poljem (PEF), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (HPAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), vodena ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija potpomognuta hladnom atmosferskom plazmom (HVED) (Lloyd i Wyk, 2012). Navedene, nove tehnike ekstrakcije, moguće je provesti pri kraćem vremenu s manjom količinom kemikalija, koje su ujedno i manje štetne, što utječe na smanjenje otpada nakon provedenog procesa. Kod pojedinih tehnika mogu se koristiti obnovljive sirovine, dok općenito nekonvencionalne metode ekstrakcije pružaju bolje iskorištenje procesa i veću selektivnost (Azmir i sur., 2013).

2.4.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE) nekonvencionalna je metoda ekstrakcije koja u svojem radu kombinira energiju mikrovalova i klasičnu ekstrakciju pomoću otapala. Ova nova tehnika ekstrakcije danas se primjenjuje u ekstrakciji pesticida, pigmenata te bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala na temelju rada mikrovalova koji oštećuju staničnu strukturu uzoraka (Ramirez i Peters, 2018).

Mikrovalovi su vrsta elektromagnetskog zračenja te se sa frekvencijom u rasponu od 300 do 300 000 MHz nalaze između infracrvenog zračenja i radio valova unutar elektromagnetskog spektra. Djelovanje mikrovalova i njihovo zagrijavanje u osnovi uključuje dva mehanizma: dielektrični i ionski mehanizam. Voda u biljnim materijalima je u pravilu glavni sastojak odgovoran za dielektrično zagrijavanje. Molekule vode imaju dipolni karakter, stoga se u promjenjivom elektromagnetskom polju polariziraju. Uslijed gibanja molekula vode koje se okreću prema promjenama polova izmjenične struje dolazi do vibracije i trenja s drugim molekulama te pretvorbe kinetičke energije molekula u toplinu. Ionski mehanizam odnosi se na oscilatorno kretanje otopljenih iona pod utjecajem oscilirajućeg električnog polja, odnosno zbog promjene smjera kretanja polja i otpora medija tijekom ionskog protoka dolazi do oslobađanja energije u obliku topline. Promjenjivo kretanje iona utječe na prodiranje otapala u biljni materijal, čime se pospješuje ekstrakcija. Tijekom provođenja ekstrakcije pomoću mikrovalova, bitan je udio polarnih molekula, kao što je voda, jer one podliježu djelovanju mikrovalova i dovode do zagrijavanja uzorka. Razvijena toplina utječe na isparavanje vode iz uzorka i povećanje tlaka u stanicama što dovodi do razaranja stanične strukture i ispuštanja staničnog sadržaja u otapalo (Vranković, 2022; Lovrić, 2003).

Osim strukture biljnog materijala, odnosno uzorka, na učinkovitost ekstrakcije mikrovalovima utječu i karakteristike otapala, omjer otapala i uzorka, snaga mikrovalova te vrijeme i temperatura ekstrakcije. Izabrano otapalo, osim što bi trebalo moći otopiti ciljane komponente, poželjno je da ima visoku dielektričnu konstantu, odnosno mogućnost dobre apsorpcije energije mikrovalova te sposobnost da tu energiju preda okolnom mediju kao toplinu. Količina izabranog otapala mora biti dovoljna za potpuno natapanje biljnog materijala

u otapalu tijekom procesa mikrovalne ekstrakcije, dok veći omjer otapala i biljnog materijala ne bi pokazao veću učinkovitost ekstrakcije zbog nejednake raspodjele otapala i uzorka te nejednakog izlaganja mikrovalovima. Navedeno su dokazali i Dobrinčić i suradnici (2020), odnosno upotrebom nižeg omjera uzorak/otapalo postigli su više koncentracije polifenolnih spojeva ekstrahiranih iz lista masline te zaključili kako navedeno pozitivno utječe na okoliš budući da je potrošnja otapala manja. Parametri koji međusobno ovise jedan o drugome su snaga mikrovalova, temperatura i vrijeme ekstrakcije jer povećanjem snage poveća se i učinak zagrijavanja te se smanji potrebno vrijeme ekstrakcije. Dok upotreba više temperature obično pospješi iskorištenje ekstrakcije i skraćuje vrijeme ekstrakcije, ali u isto vrijeme intenzivna temperatura ili produljena izloženost visokoj temperaturi mogu izazvati degradaciju toplinski osjetljivih spojeva, što posljedično dovodi do slabog iskorištenja ekstrakcije (Dobrinčić i sur., 2020; Xu i sur., 2017).

Ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima mogu se brzo i učinkovito ekstrahirati bioaktivni spojevi za razliku od konvencionalnih metoda. Također, uz smanjeno vrijeme ekstrakcije, ova tehnika se ističe po većoj selektivnosti i prinosu ekstrakcije, povećanoj preciznosti, mogućnosti ekstrakcije više uzoraka istovremeno te smanjenoj uporabi otapala (Sagar i sur., 2018). Ipak, glavna prednost ekstrakcije mikrovalovima je oslobađanje topline unutar uzorka i otapala te prijenos prema okolini, što se kod konvencionalnih metoda odvija suprotnim smjerom. Povećan prinos mikrovalne ekstrakcije posljedica je istosmjernog prijenosa mase i topline (Vranković, 2022).

Iako, metoda ekstrakcije pomoću mikrovalova ima mnogo prednosti, ustanovljeni su i nedostaci. Budući da se tijekom ekstrakcije upotrebljavaju otapala, potrebno je provesti separacijsku metodu nakon ekstrakcije, na primjer filtraciju, kako bi se odvojio ekstrakt od krutog materijala. Ukoliko otapalo nije polarno ili je hlapljivo može prouzročiti smanjeno djelovanje mikrovalnog zračenja. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima nije primjerena za separaciju toplinski osjetljivih spojeva zbog toplinskog učinka mikrovalnog zračenja, što može rezultirati smanjenjem prinosa ekstrakcije (Xu i sur., 2017).

2.5. SUVREMENI PRISTUP ISKORIŠTENJU NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE

Budući da su otpad i nusproizvodi prehrambene industrije i agronomije ozbiljan prehrambeni, ekološki i ekonomski problem, njihovo iskorištenje postalo je glavni predmet istraživanja kako bi se poboljšala održivost prehrambenog lanca. Obogaćivanje prehrambenih proizvoda nusproizvodima omogućuje industrijama razvoj inovativnih i funkcionalnih proizvoda čije plasiranje na tržište pruža priliku ispunjavanja želja i potreba potrošača za proizvodima s dodanom vrijednošću. Uz saznanje da konzumacija mliječnih proizvoda poboljšava zdravlje kostiju i smanjuje rizik od brojnih oblika karcinoma, obogaćivanje tradicionalnih mliječnih

proizvoda bioaktivnim tvarima iz nusproizvoda, povećava njihovu nutritivnu vrijednost (Guiné i De Lemos, 2018). Prema Iriondo-DeHond i suradnicima (2018) mliječni se proizvodi mogu obogaćivati nusproizvodima prerade žitarica, uljarica, mesa i morskih plodova te nusproizvodima mliječne industrije, ali najistaknutije je obogaćivanje nusproizvodima nastalim preradom voća i povrća. Osim unapređivanja nutritivne vrijednosti i postizanja pogodnog utjecaja na ljudsko zdravlje, dodatak nusproizvoda mliječnim proizvodima može imati tehnološku svrhu, kao što je produljenje roka trajanja, stabilnosti i zdravstvene sigurnosti te postizanja boljih senzorskih karakteristika (Iriondo-DeHond i sur., 2018).

Tijekom istraživanja Shan i suradnici (2011) ustanovili su kako se dodatkom ekstrakta sjemenki grožđa i kore nara postiže učinkovita zaštita od oksidacije lipida u siru tijekom skladištenja. Formulacija mliječnih proizvoda obogaćenih nusproizvodima može predstavljati i izazov jer oni mogu dovesti do pozitivnih ili negativnih senzorskih svojstva namirnice. Iriondo-DeHond i suradnici (2018) usporedili su utjecaj dodatka karotenoida iz kore rajčice u sladoled i maslac. Karotenoidi iz kore rajčice u koncentracijama višim od 4 % dodani u sladoled utjecali su negativno na rezultate prihvatanja za okus, teksturu i boju. Ipak, dodatak nusproizvoda prerade rajčice u maslac značajno je poboljšao izgled proizvoda nakon 4 mjeseca hladnog skladištenja u usporedbi s kontrolnim uzorkom.

Kora, listovi i sjemenke voća i povrća sadrže velike količine fenolnih spojeva koji ukoliko se dodaju u mliječne proizvode mogu djelovati inhibirajuće prema patogenim mikroorganizmima, ali i pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje. Ekstrakt sjemenki grožđa i kore nara pokazao se učinkovitim prirodnim konzervansom inhibirajući *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enterica* u siru. Zabilježen je proporcionalan odnos između koncentracije ekstrakta i smanjenja patogena u sir (Shan i sur., 2011). Budući da fenolni spojevi djeluju kao antimikrobno sredstvo protiv patogenih mikroorganizama, njihovim obogaćivanjem produljuje se rok trajanja mliječnih proizvoda. Kao glavni izvor polifenolnih spojeva korišteni su nusproizvodi proizvodnje vina, ali i sjemenke i kora nara, kora badema, kora lješnjaka, komina maslina i rižine mekinje (Iriondo-DeHond i sur., 2018). Prudencio i suradnici (2008) pratili su utjecaj dodatka betalaina iz grožđa i cikle u polutvrđi sir tipa Petit-suisse te su ustanovili pozitivni utjecaj na boju sira. Stabilnost betalaina u siru i boje pripisuju niskom sadržaju vode, blago kiselom pH i ambalaži nepropusnoj za svjetlo tijekom skladištenja.

Budući da mnoga znanstvena istraživanja navode pozitivne učinke primjene nusproizvoda prerade voća i povrća te iskorištenje i pozitivno djelovanje polifenolnih spojeva na tehnološka, ali i nutritivna svojstva mliječnih proizvoda, ideja ovoga rada bila je ispitati utjecaj ekstrakta lista masline na svojstva polutvrđog sira tijekom 60 dana zrenja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Sirovina u proizvodnji sireva bilo je sirovo mlijeko s lokalne farme (OPG Đuričić). Lišće masline, sorte oblica (*Olea europaea L.*), prikupljeno je na području Zadra te je korišteno kao sirovina za izradu ekstrakta lista masline. Nakon provedenog prikupljanja lišća, ono je osušeno na zraku i pohranjeno na mračnom mjestu, zaštićenom od vlage.

3.1.1. Kemikalije

Kulture korištene u proizvodnji sira:

- Liofilizirana mliječna kultura (MYStarter CT 330 Series - *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*)
- Sirilo (MUCOREN 2000 - *Rhizomucor miehei*)

Kemikalije korištene za određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet-Henkel-u:

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

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom:

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

Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom:

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (*Gram-Mol*, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, 40 mM
Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano je 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake i sadržaj je homogeniziran.
- TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM, (*Sigma-Aldrich*, Njemačka)
Priprema: Na analitičkoj vagi u plastičnu lađicu za vaganje odvagano je 0,0312 g TPTZ-a i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL koja je do oznake nadopunjena s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina (*Lach-Ner d.o.o.*, Češka)

Priprema: Na analitičkoj vagi u plastičnu lađicu za vaganje odvagano je 0,541 g željezo (III)-klorid heksahidrata te je kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je do oznake nadopunjena destiliranom vodom. Kako svjetlo ne bi utjecalo na otopinu željezo (III)-klorid heksahidrata, tikvica je omotana aluminijskom folijom.

- 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 %-tna (*Merck KGaA*, Njemačka)
 - pripremljeno razrjeđenje na 99 %-tnu koncentraciju
- 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 navedenu odmjernu tikvicu otpipetirano je i 16 mL glacijalne octene kiseline te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- FRAP reagens

Priprema: U staklenu čašu volumena 50 mL otpipetirano je 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezova (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

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

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

- Folin-Ciocalteu reagens (*Sigma-Aldrich*, Njemačka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3), 20 %-tna otopina

Priprema: Izvagano je 200 g anhidrida natrijevog karbonata (*Gram-Mol*, Hrvatska) i otopljeno u 800 mL vruće destilirane vode te naposljetku ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata te je odmjerna tikvica volumena 1 L nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Nakon isteka 24 h od pripreme otopine, ista je profiltrirana.

- Etanol, 96 %-tni (*Gram-Mol*, Hrvatska)
- Standard galne kiseline (*Sigma-Aldrich*, Njemačka)

Kemikalije korištene za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida:

- Otopina aluminijevog klorida anhidrida (AlCl_3), 10 %-tna (w/v) (*VWR*, Belgija)
Priprema: U destiliranoj vodi otopljena je odgovarajuća količina aluminijevog klorida anhidrida.
- Otopina kalijeva acetata (CH_3COOK), 1 M (*Kemika*, Hrvatska)

Priprema: Na analitičkoj vagi u plastičnu lađicu za vaganje odvagano je 4,907 g kalijevog acetata i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 50 mL te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- Metanol (*Gram-Mol*, Hrvatska)
- Standard kvercetina

Kemikalije korištene za određivanje ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu i količine organskog dušika u tvarima topljivim u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) metodom po Kjeldahlu:

- 24 %-tna trikloroctena kiselina (TCA)

Priprema: Na tehničkoj vagi u plastičnu lađicu za vaganje odvagana je odgovarajuća količina TCA (*Fisher Scientific*, UK) i kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu volumena 200 mL, koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

- Sumporna kiselina (H_2SO_4), koncentrirana (96-98 %) (*Carlo Erba*, Francuska)
- Katalizator: Kjeldahl-ove tablete ili smjesa soli kalijevog sulfata (K_2SO_4) (*Gram-Mol*, Hrvatska) i bakrovog (II) sulfata ($CuSO_4$) (*Gram-Mol*, Hrvatska)
- Obojeni indikatori:

- Metil crveno

Priprema: Izvagano je i otopljeno 200 mg metil crveno u 100 mL 95 % etanola

- Bromkrezol zeleno

Priprema: Izvagano je i otopljeno 200 mg indikatora u 100 mL 95 % etanola

- 4 %-tna borna kiselina (H_3BO_3)

Priprema: Volumen od 800 mL destilirane vode se prokuha i ohladi na sobnu temperaturu. U ohlađenoj destiliranoj vodi otopi se 40 g borne kiseline (*T.T.T.*, Hrvatska) i promiješa te se doda 12,5 mL otopine bromkrezol zeleno i 8,75 mL otopine metil crveno. Odmjerna tikvica volumena 1 L nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- 40 %-tna otopina natrijevog hidroksida (NaOH)

Priprema: Na tehničkoj vagi odvagano je 400 g NaOH (*Lach-Ner d.o.o.*, Češka) te otopljeno u 1 L destilirane vode.

- 0,1 M klorovodična kiselina (HCl) (*Gram-Mol*, Hrvatska)

Kemikalije korištene za provođenje natrij dodecil sulfat-poliakrilamidne gel elektroforeze proteina (SDS-PAGE):

- Akrlamid (*Sigma*, SAD)
- Amonij-persulfat (APS) (*Kemika*, Hrvatska)

- Bromfenol plavo (*Sigma*, SAD)
- *Coomassie Brilliant Blue* (*Sigma*, SAD)
- Glicerol (*Alkaloid*, Makedonija)
- Glicin (*Gram-Mol*, Hrvatska)
- Izopropanol (*Kemika*, Hrvatska)
- Kloridna kiselina (*Kemika*, Hrvatska)
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, EDTA) (*Kemika*, Hrvatska)
- Natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Sigma*, SAD)
- Octena kiselina (*Carlo Erba*, Italija)
- Standard za elektroforezu proteina *ProSieve QuadColor* (molekulske mase 4,6-315 kDa) (*Lonza*, SAD)
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen) (*Sigma*, SAD)
- Tris (hidroksimetil)-aminometan (*Carlo Erba*, Italija)
- β -merkaptotanol (*Sigma*, SAD)

Kemikalije korištene za mikrobiološku analizu:

- 2 %-tna otopina natrijevog citrata ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) (*Gram-Mol*, Hrvatska)
Priprema: Na tehničkoj vagi u plastičnu lađicu za vaganje izvagano je 20 g natrijeva citrata koji je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 1 L. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.
- 0,9 %-tna otopina natrijevog klorida, NaCl (fiziološka otopina)
Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje izvagano je 9 g NaCl (*Lach-Ner d.o.o.*, Češka) i kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.
- Hranjiva podloga za određivanje kvasaca i plijesni – Sabouraud Dextrose Agar CAF 50 (*Biolife*, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja bakterija – Tryptic Glucose Yeast Agar (*Biolife*, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija – Violet Red Bile Glucose Agar (*Biolife*, Italija)
- Hranjiva podloga za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka – Baird Parker agar (*Biolife*, Italija)

3.1.2. Aparatura

U izradi ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći uređaji:

- Mlinac za kavu (SMK150WI, Gorenje, Hrvatska)
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (Ethos, Milestone, Italija)
- Rotavapor (Heating Bath B-490, Büchi, Švicarska)
- Digitalni refraktometar (Pocket refractometer Pal-3, Atago, Japan)
- Tehnička vaga (KB 3600-2N, Kern, Njemačka)
- Komora za zrenje sira (Model 700, Meatico, Italija)
- Spektrofotometar (UviLine 9400, Secomam, Francuska)
- Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)
- Termostat (Inkolab, Hrvatska)
- Analitička vaga (AB104, Mettler Toledo, SAD)
- Električni grijач s magnetskom miješalicom
- Vodena kupelj (WNE 45 Waterbath, Memmert, Njemačka)
- Centrifuga (Megafuge 16R, Thermo Scientific, SAD)
- a_w -metar (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska)
- Kolorimetar (CM-700d, Konica Minolta, Japan)
- Teksturometar (Ametek Lloyd Instruments Ltd., West Sussex, UK)
- pH-metar (ProfilLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka)
- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, 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)
- Brojač kolonija (Colony Counter CC-1, Boeco, Njemačka)
- Analizator mliječnih proizvoda (FoodScan™ 2 Dairy, FOSS, Danska)

3.1.3. Pribor

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovoga rada koristio se sljedeći pribor:

- Metalne žličice
- Metalne špatule
- Plastične lađice za vaganje
- Laboratorijske češe volumena 25, 50, 150, 300, 1000, 2000 mL
- Menzure volumena 100, 200, 500, 1000 mL
- Erlenmeyerove tikvice volumena 100, 250, 300, 1000 i 2000 mL
- Stakleni lijevci

- Filter papir
- Mikropipeta Kartell volumena 100-1000 μ L
- Pipete volumena 1, 5, 10, 20 i 25 mL
- Magneti
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Kvarcne kivete
- Falcon epruvete volumena 50 mL
- Odmjerne tikvice volumena 5, 10, 100, 500 i 1000 mL
- Tarionik s tučkom
- Bireta
- Infuzijske boce
- Staklena zrnca
- Štapić po Drigalskom
- Sterilne plastične Petrijeve zdjelice
- Plamenik
- Eksikator
- Stakleni štapić
- Termometar
- Kivete za Kjeltex sustav volumena 500 mL
- Iгла za nanošenje proteinskih uzoraka (*Hamilton, SAD*)
- Kadica za elektroforezu (*Bio-Rad, SAD*)
- Stakalca i češljici za pripremu gelova za SDS-PAGE (*Bio-Rad, SAD*)

3.2. METODE RADA

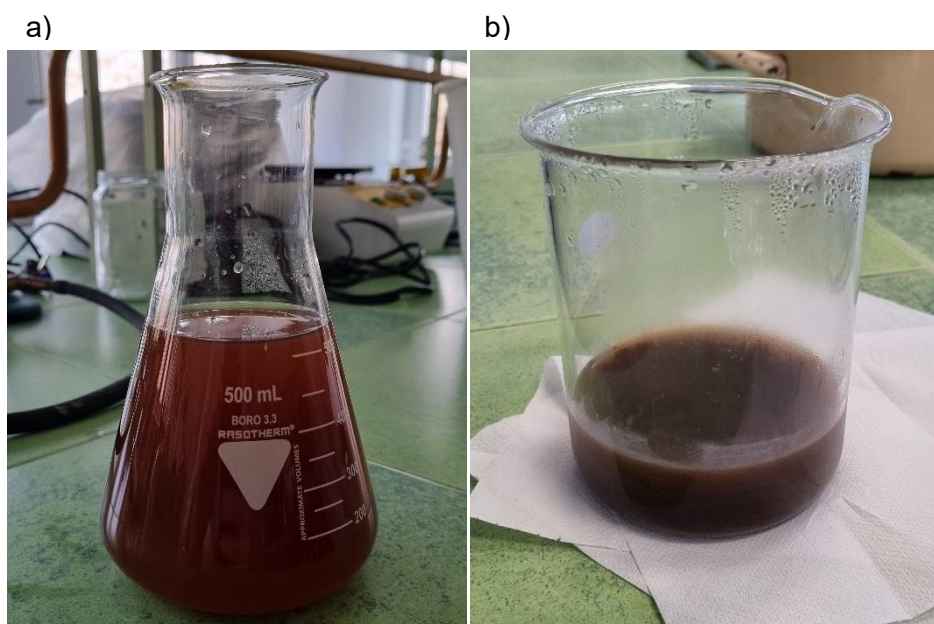
3.2.1. Proizvodnja ekstrakta lista masline

Ekstrakt lista masline proizveden je prema metodi korištenoj u diplomskom radu Vranković (2022). Osušeno lišće masline usitnjeno je pomoću mlinca za kavu i na tehničkoj vagi izvagano po 6 g usitnjenog lišća te preneseno u ekstrakcijsku ćeliju. Nakon što je svih 15 ćelija napunjeno usitnjenim lišćem, u svaku ćeliju dodao se magnet i 80 mL destilirane vode koja je služila kao ekstrakcijsko otapalo. Ćelije su se zatvorile i postavile u uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAE). Postizanje temperature (zagrijavanje) i proces ekstrakcije provodili su se prema parametrima u tablici 2. Nakon provedene ekstrakcije provelo se hlađenje ekstrakta.

Tablica 2. Procesni parametri primijenjeni u postupku mikrovalne ekstrakcije polifenola iz lista masline

	Vrijeme (min)	Snaga (kW)	Temperatura (°C)
zagrijavanje	7	1800	80
mikrovalna ekstrakcija	4	800	80

Kako bi se ekstrakt izdvojio od ostatka biljnog materijala, nakon vađenja magneta iz ćelija, provedena je klasična filtracija kroz filter papir. Radi postizanja većeg udjela suhe tvari, provelo se uparavanje filtrata na rotavaporu (Heating Bath B-490, Büchi, Švicarska) do 9,8 % suhe tvari, čiji je udio mjereno digitalnim refraktometrom (Pocket refractometer Pal-3, Atago, Japan). U konačnici, koncentrirani ekstrakt pasteriziran je pomoću vodene kupelji u trajanju 10 minuta pri konstantnoj temperaturi od 85 °C. Slika 2 a prikazuje ekstrakt nakon filtracije, a slika 2 b ekstrakt lista masline nakon uparavanja i pasterizacije. Pasterizirani i ohlađeni ekstrakt čuvan je u zamrzivaču do upotrebe.



Slika 2. Ekstrakt lista masline a) nakon filtracije kroz filter papir
b) koncentrirani i pasterizirani (*vlastite fotografije*)

3.2.2. Proizvodnja polutvrdog sira s ekstraktom lista masline

U sirovo mlijeko dodan je ekstrakt lista masline te je pasterizacija provedena pri nižim temperaturama, duže vrijeme (*LTLT pasteurization*), odnosno pri 63-65 °C u trajanju 25 do 30 minuta. Sir je proizveden u duplikatoru volumena 30 L gdje je voda bila medij za zagrijavanje i hlađenje. U pasterizirano mlijeko dodano je 0,546 g liofilizirane mliječne kulture i 2,33 g sirila. Proizvedeni se gruš izrezao i ocijedio te oblikovao i prešao pri 1-1,5 bara. Na kraju proizvodnje provedeno je salamurenje sira u otopini soli koncentracije 13 % i pH vrijednosti od 4,5-4,7,

tijekom 24 sata. Sir je dozrijevao u komori za zrenje s kontrolnom atmosferom (12 °C i 75 % vlažnosti).

3.2.3. Određivanje aktiviteta vode sireva

Laboratorijskim a_w -metrom (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska) provedeno je mjerenje aktiviteta vode sireva. Plastična posudica, koja je sastavni dio a_w -metra, napunjena je do vrha usitnjenim uzorkom sira te spojila sa samim uređajem. Mjerenje aktiviteta vode pokrenuto je pritiskom na tipku uređaja i provodilo se do zvučnog signala. Na kraju mjerenja je očitana vrijednosti aktiviteta vode.

3.2.4. Određivanje kiselosti sireva

3.2.4.1. Određivanje pH-vrijednosti sireva

Kako bi se odredila pH-vrijednost sira upotrebljavao se laboratorijski pH-metar (ProfilLine pH 3110, Xylem Analytics, Njemačka). 30 mL destilirane vode prokuhalo se i ohladilo te pomiješalo sa 3 g uzorka sira usitnjenog u tarioniku. U homogenu suspenziju sira i vode uronila se elektroda pH-metra i nakon što se pH vrijednost stabilizira, ista se očitava s ekrana uređaja (Božanić i sur., 2010).

3.2.4.2. Određivanje titracijske kiselosti sireva metodom po Soxhlet-Henkelu

Destilirana voda zagrijala se na temperaturu od 50 °C, a na tehničkoj vagi odvagano je 5 g uzorka sira. Izvagani uzorak sira usitnio se u tarioniku i pomiješao sa zagrijanom destiliranom vodom. Suspenzija je kvantitativno prenesena u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL i tikvica je nadopunjena zagrijanom destiliranom vodom do oznake. Na opisani način pripremile su se suspenzije u dvije Erlenmeyerove tikvice, u prvu tikvicu otpipetirao se 1 mL otopine kobaltovog sulfata. Dobivena otopina koristila se kao pokazatelj standardne boje do koje su se titrirali uzorci. U drugu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirao se 1 mL 2 %-tnog fenolftaleina i sadržaj tikvice se titrirao sa 0,1 M natrijevim hidroksidom (NaOH) do pojave blijedo ružičaste boje, identične boji u prvoj tikvici (Božanić i sur., 2010).

Titracijska kiselost sira izračunata je prema formuli:

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

gdje je a volumen 0,1 M NaOH utrošenog za neutralizaciju (mL), f faktor otopine NaOH (iznosi 1), 8 označuje stupanj razrjeđenja.

3.2.5. Određivanje kemijskog sastava sira

Analizatorom mliječnih proizvoda, FoodScan™ 2 s FOSS ANN kalibracijom, određen je

udio mliječne masti, vlage, soli, proteina, zasićenih masnih kiselina, udio mliječne masti u suhoj tvari i ukupne suhe tvari sira. Sam uređaj provodi analize pomoću NIR (eng. *near infrared*) transmisije i monokromatora pri valnoj duljini od 850 – 1100 nm, a analizatorom se upravlja pomoću povezanog vanjskog računala. Određivanje kemijskog sastava uzoraka sira započelo je uključivanjem vanjskog računala i pokretanjem *Food Scan 2* aplikacija. Kako bi se provela slijepa proba u kućište za analizu stavio se uzorak izrađen od bijele delrin plastike i pokrenula se aplikacija na računalu. Uređaj se kalibrirao prema uputama proizvođača ovisno o analiziranom uzorku. Prije provođenja analize uzoraka, 15 g sira naribalo se i stavilo u plastičnu Petrijevu posudu promjera 90 mm, kako bi se osigurala ravnomjerna analiza uzorka.

3.2.6. Određivanje teksture sireva

Uzorci sireva rezani su na kockice dimenzije 1 x 1 x 1 cm te se provodilo određivanje teksture svakog uzorka pojedinačno pomoću teksturometra (Ametek Lloyd Instruments Ltd., West Sussex, UK). Uzorak sira oblika kocke postavljen je na sredinu postolja teksturometra, nakon čega je podvrgnut 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. Obrada izmjerenih podataka provedena je pomoću NexygenPlus softvera te su određeni sljedeći parametri: tvrdoća (N), gumenost (N), elastičnost (mm), sposobnost žvakanja (Nmm).

3.2.7. Određivanje indeksa boje sireva

Boja sireva određena je pomoću kolorimetra (CM-700d, Konica Minolta, Japan) prema CIELAB metodi, koju je 1976. definirala Međunarodna komisija za regulaciju svjetla. Brojčane vrijednosti interpretirane ovom metodom opisuju sve boje koje može razlikovati ljudsko oko, a zasnivaju se na mjerenju tri dimenzije u prostoru boje. Mjerenje je provedeno na tri različita mjesta na svakom pojedinom uzorku sira, a kao konačni rezultat kolorimetrijskog mjerenja uzete su srednje vrijednosti parametara L* (označava svjetlinu, gdje je 0 crna boja, a 100 bijela boja), a* (označava crvenu i zelenu boju, odnosno -100 predstavlja zelenu, a +100 crvenu boju) i b* (označava plavu i žutu boju, gdje je -100 plava, a +100 žuta boja). Pomoću određenih parametara izračunala se promjena boje (ΔE) prema navedenoj formuli:

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

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 (-).

Izračunate vrijednosti promjene boje (ΔE) prema Mokrzycki i Tatol (2011) poslužile su za definiranje percepcije boje kod promatrača, kao što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Percepcija boje kod promatrača na temelju razlike u izračunatim ΔE^* vrijednostima (prema Mokrzycki i Tatol, 2011)

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

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

Priprema uzorka:

180 mL destilirane vode zagrijane na 50 °C doda se u 20 g usitnjenog sira. Smjesa se prenese u infuzijsku bocu i sadržaj se homogenizira 2 minute. Nakon toga, boca sa homogeniziranom suspenzijom stavlja se u vodenu kupelj s tresilicom, koja je prethodno zagrijana na 50 °C, u trajanju od 1 h. Uzorci se ohlade do sobne temperature i prebace u Falcon epruvete te centrifugiraju pomoću centrifuge (Megafuge 16R, Thermo Scientific, SAD) pri 2400 x g i 4 °C u trajanju 30 minuta. Konačni uzorak, vodeni ekstrakt, za navedenu analizu dobije se filtriranjem nadtaloga u Erlenmeyerovu tikvicu kroz filter papir S&S 597^{1/2}.

Postupak određivanja:

20 mL 24 %-tne trikloroctene kiseline (TCA) otpipetira se u 20 mL vodenog ekstrakta, kako bi u konačnici koncentracija TCA bila 12 %. Dobiveni sadržaj u Erlenmeyerovoj tikvici se snažno pomiješa te ostavi preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se odvojio talog (neproteinski dušični spojevi). Nakon 24 h smjesa se filtrira kroz filter papir S&S 602H^{1/2}.

Sutradan se otpipetira 20 mL vodenog ekstrakta i 20 mL ekstrakta obrađenog s TCA u 2 kivete za Kjeltex sustav koje se prebacuju u sušionik na 60 °C u trajanju 24 h. Nakon isteka 24 h, u osušene ekstrakte doda se 12 mL sumporne kiseline (96-98 %) i dvije tablete katalizatora (Kjeltabs – sastavljene od 3,5 g K₂SO₄ i 0,4 g CuSO₄ x 5H₂O) te se kivete sa navedenim sadržajem stave u blok za spaljivanje na 420 °C u trajanju 90 minuta.

Nakon provedenog spaljivanja, potrebno je pričekati da se kivete ohlade, te se tada u njih doda 80 mL destilirane vode i tako dobivena otopina ide na destilaciju u Kjeltex i Destiling Unit sustav za destilaciju. U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 mL otpipetira se 25 mL borne kiseline te se tikvica postavi na postolje u destilacijskoj jedinici tako da cjevčica bude uronjena u kiselinu. Kjeldahlova kiveta se postavi na predviđeno mjestu u uređaju i zatvore se sigurna vratašca. Uređaj sam dozira 70 mL 40 %-tne otopine natrijevog hidroksida u postavljenu kivetu. Tijekom provođenja destilacije, koja traje 4 minute, destilat poprima zelenu boju, što je indikator na prisustvo amonijaka. Nakon isteka 4 minute, Erlenmeyerova tikvica se ukloni iz uređaja i destilat u njoj se titrira 0,1 M klorovodičnom kiselinom do pojave boje kao što je bila borna kiselina prije destilacije.

Utrošen volumen klorovodične kiseline za titraciju i koncentracija titranata su podaci koji su potrebni za izračun količine dušika u vodenom ekstraktu, odnosno količine dušika topive u TCA, kao što je prikazano u formuli:

$$\text{Udio u vodi / TCA topljivog N u siru}(\%) = \frac{\text{mL titranta (0,1 M HCl)} \times \text{Ar}(N)}{20 \text{ mL}} \quad [3]$$

gdje je $\text{Ar}(N)$ relativna atomska masa dušika ($\text{Ar} = 14,007$).

No, kako bi se pratila proteoliza u uzorcima sira također je bitan podatak o postotku ukupnog dušika u siru koji je topljiv u vodi i prelazi u vodeni ekstrakt:

$$\text{Ekstrahirani N}(\%) = \frac{\text{N u vodenom ekstraktu}}{\text{ukupni N u siru}} * 100 \quad [4]$$

3.2.9. Provođenje natrij dodecil sulfat-poliakrilamidne gel elektroforeze proteina (SDS-PAGE)

SDS-PAGE analiza provedena je nakon 60 dana zrenja sireva, a početni uzorci za analizu bili su vodeni ekstrakt i vodeni ekstrakt obrađen s TCA. U 15 μL uzorka dodano je 15 μL 2 x koncentriranog Laemmli pufera (1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 mL SDS (10 % (w/v)), 2 mL glicerol (100 % (v/v)), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo, 0,2 mL β -merkaptotanol). Tako priređeni uzorci prokuhani su 2,5 min. U međuvremenu je izvađen češljic iz prethodno pripremljenog 10 %-tnog poliakrilamidnog gela te je pripremljena aparatura za elektroforezu. U komoru za elektroforezu stavljeno je 400 mL pufera za elektroforezu (1x). Nakon kuhanja, 20 μL uzorka je pomoću *Hamilton* igle nanešeno na 10 %-tni poliakrilamidni gel. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 190 V tijekom 45 min. Pritom je korišten standard *ProSieve QuadColor* Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6 – 315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % *Coomassie*

Brilliant Blue praša, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) tijekom 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.

Priprema 10 %-tnog poliakrilamidnog gela:

Poliakrilamidni gel za SDS-PAGE analizu sastoji se od donjeg gela ili gela za razdvajanje (eng. *separating gel*) i gornjeg gela ili gela za sabijanje (eng. *stacking gel*). Gel za razdvajanje pripremljen je prema kemijskom sastavu prikazanom u tablici 4. Nakon dodatka TEMED-a u pripremljenu smjesu, gel za razdvajanje je izliven u kalup između dva stakalca, dodan je izopropanol kako bi se gel jednoliko rasporedio, te je ostavljen da se polimerizira tijekom 45 minuta. Nakon uklanjanja izopropanola pomoću filter papira, u kalup je dodan gel za sabijanje, čiji je kemijski sastav prikazan u tablici 4, u koji je odmah uronjen češljic za stvaranje jažica te ostavljen da se polimerizira.

Tablica 4. Kemijski sastav 10 %-tnog poliakrilamidnog gela

V (otopina)	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 8,8	2,5 mL	-
Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer, pH 6,8	-	2,13 mL
30 % akrilamid	3 mL	0,3 mL
TEMED (N, N, N', N'-terametiletildiamin)	5 μ L	5 μ L
10 % APS (amonijev persulfat)	38 μ l	22,5 μ l
Destilirana voda	2,5 mL	-

Priprema pufera za elektroforezu:

Na tehničkoj vagi izvagalo se 3,0 g Tris-a, 14,4 g glicina i 1,0 g SDS-a, te je pripremljena smjesa nadopunjena do 100 mL destiliranom vodom.

3.2.10. Mikrobiološke analize sireva

Mikrobiološke analize sireva provodile su se 1., 15., 30., 45. i 60. dan od proizvodnje. U svim sirevima određivao se broj kvasaca i plijesni (KiP), ukupan broj bakterija (UB), broj enterobakterija (E) i broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (KPS). U sterilnim uvjetima pripremljena decimalna razrjeđenja uzoraka naciepljivala su se na hranjive podloge, koje su potom inkubirane pri temperaturama pogodnima za rast ispitivanih mikroorganizama (Božanić i sur., 2010).

Priprema 2 %-tne otopine natrijevog citrata:

Otopina natrijevog citrata (2 %) pripravljena je kao što je opisano u potpoglavlju 3.1.1. Kemikalije. Prije provođenja mikrobioloških analiza pripravljena otopina volumena 1 L prelije se u boce volumena 180 mL te se one prebace u autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska) pri 121 °C u trajanju 15 minuta.

Priprema fiziološke otopine:

Fiziološka otopina (0,9 %-tna otopina natrijevog klorida) pripravljena je kao što je opisano u potpoglavlju 3.1.1. Kemikalije. U čiste staklene epruvete otpipetira se po 9 mL tako pripravljene fiziološke otopine. Epruvete se zatvore i prenesu u autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska) pri 121 °C u trajanju 15 minuta.

Priprema hranjivih podloga:

Na ambalaži hranjivih podloga naznačena je uputa za pripremu prema kojoj je načinjena odgovarajuća količina svake podloge. Otopljena hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja bakterija, kvasaca i plijesni te enterobakterija se razlije u infuzijske boce. One se zatvore i steriliziraju u autoklavu na 121 °C u trajanju 15 minuta. Otopljena hranjiva podloga za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka se također sterilizira u autoklavu (121 °C / 15 minuta). No, nakon sterilizacije u ohlađenu hranjivu podlogu, temperature 50 °C, doda se *eggyolk*, dobro se promiješa te se tako pripravljena hranjiva podloga razlije u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon što se podloga u njima skrutne i ohladi, Petrijeve zdjelice se okreću naopako i pohranjuju u hladnjak do upotrebe.

Priprema uzoraka sira:

Na tehničkoj vagi izvaže se 10 g sira, tako što se sir zarezne po sredini i prenese u sterilnu lađicu za vaganje uzorak sira iz sredine i s vanjskog dijela sira. Uzorak se sira usitni u tarioniku uz dodavanje 180 mL 2 %-tne otopine natrijevog citrata zagrijane na 45 °C. Sadržaj tarionika kvantitativno se prenese u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima te se suspenzija dobro homogenizira pomoću Vortex-a (MS2 Minishaker, IKA, Njemačka).

Priprema decimalnih razrjeđenja uzoraka:

Sterilnom pipetom otpipetira se 1 mL pripravljenog homogeniziranog uzorka iz Erlenmeyerove tikvice u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine te se nastalo razrjeđenje homogenizira na Vortex-u. Novom sterilnom pipetom prenese se 1 mL netom pripravljenog razrjeđenja u novu epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine te se sadržaj homogenizira. Na ovaj način opisani proces provodi se dok se ne dobije željeni broj decimalnih razrjeđenja.

Postupak naciepljivanja i inkubacije podloga:

Kako bi se odredio ukupan broj bakterija, broj kvasaca i plijesni te enterobakterija potrebno je mikropipetom i sterilnim nastavkom uzeti 1 mL pripremljenog homogeniziranog decimalnog razrjeđenja (tablica 5) i otpustiti u sterilnu Petrijevu zdjelicu. Sadržaj Petrijeve zdjelice zalije se predviđenom hranjivom podlogom (10-12 mL), koja je prethodno rastopljena pri temperaturi višoj od 100 °C te ohlađena i temperirana u vodenoj kupelji na 45 °C. Petrijevom se zdjelicom kruži blagim pokretima kako bi se podloga i sadržaj homogenizirali. Nakon 10 do 15 minuta, kada se podloga potpuno skrutne, Petrijeve se zdjelice okreću naopako i odlažu na inkubaciju u termostat, pri određenoj temperaturi i vremenu inkubacije (tablica 5).

Za određivanje koagulaza pozitivnih stafilocoka u uzorku sira, potrebno je mikropipetom i sterilnim nastavkom otpipetirati 0,1 mL homogeniziranog decimalnog razrjeđenja na pripremljenu čvrstu hranjivu podlogu. Štapić po Drigalskom se dezinficira etanolom i prolaskom kroz plamen, te se ohladi i njime se ravnomjerno razmaže uzorak po cijeloj hranjivoj podlozi. Naciepljene podloge se okreću naopako i inkubiraju (tablica 5).

Tablica 5. Naciepljena decimalna razrjeđenja i parametri inkubacije za ispitane kulture mikroorganizama

Kultura mikroorganizama	Naciepljena decimalna razrjeđenja	INKUBACIJA	
		temperatura (°C)	vrijeme (h)
Ukupan broj bakterija (UB)	0, -2, -4	32	48
Kvasci i plijesni (KiP)	0, -2, -3	sobna temperatura	72
Enterobakterije (E)	0, -1, -2	37	24
Koagulaza pozitivni stafilocoki (KPS)	0, -1	32	48

Očitavanje rezultata:

Narastle kolonije broje se pod povećanjem na brojaču kolonija. Kolonije se broje na onim podlogama gdje ih je naraslo između 30 i 300. Prebrojane se kolonije pomnože s decimalnim razrjeđenjem i u konačnici se dobije broj mikroorganizama u 1 mL uzorka. Kako bi se iskazao broj kolonija u uzorku sira, potrebno je broj mikroorganizama u 1 mL uzorka pomnožiti s 10.

Tumačenje rezultata:

Mikrobiološki kriteriji za praćenje ispravnosti sireva preuzeti su iz Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) za ukupan broj bakterija, broj kvasaca i plijesni te enterobakterija. Za praćenje koagulaza pozitivnih stafilocoka kriteriji su preuzeti iz Zakona o higijeni hrane i

mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) te iz pripadajuće Uredbe 2073/2005. U tablici 6 prikazani su mikrobiološki kriteriji za praćenje kvalitete polutvrdih sireva.

Tablica 6. Kriterij za praćenje mikrobiološke ispravnosti sireva (prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu, 2009. Uredbi 2073/2005*)

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

3.2.11. Spektrofotometrijske metode analize

Na uzorcima sira i ekstrakta lista masline provodila su se spektrofotometrijska mjerenja, a ona su obuhvaćala određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom, određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom, određivanje koncentracije ukupnih fenola i koncentracije ukupnih flavonoida.

Priprema uzorka sira:

Na tehničkoj vagi izvagan je uzorak sira mase 20 g koji je homogeniziran s 20 mL destilirane vode u trajanju 2 minute. Homogenizirana suspenzija prelivena je u Falcon epruvete i centrifugirana 10 minuta na 10000 rpm pri 5 °C. Dobiveni supernatant izdvojen je mikropipetom u čiste Falcon epruvete i skladišten pri 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

Priprema vodenog ekstrakta lista masline:

Kako bi se provela spektrofotometrijska mjerenja bilo je potrebno razrjeđenjem uzorka postići apsorbanciju u rasponu između 0 i 1. Stoga, za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom i antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom potrebno je bilo uzorak ekstrakta razrijediti 150 puta s destiliranom vodom. Za određivanje koncentracije ukupnih fenola i ukupnih flavonoida ekstrakt se razrijedio 50 puta s destiliranom vodom.

3.2.11.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti polutvrdih sireva s ekstraktom lista masline primijenjena je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ili DPPH metoda. Metoda se temelji na sposobnosti antioksidanasa u uzorku da reduciraju aktivnost DPPH radikala, odnosno dolazi do sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa te nastaje reducirani oblik DPPH-H. Tijekom spomenute reakcije dolazi do promjene boje reakcijske smjese iz ljubičaste

u žutu i smanjenja apsorbancije koja se može očitati pomoću spektrofotometra pri 517 nm. Vrijednost očitane apsorbancije obrnuto je proporcionalna koncentraciji antioksidanasa u uzorku (Prior i sur., 2005).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete otpipetira se 2400 µL DPPH reagensa i 600 µL uzorka, sadržaj se homogenizira pomoću vortex-a i ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku kako ne bi došlo do smanjenja apsorbancije DPPH u metanolu. Slijepa proba sadrži DPPH reagens i umjesto uzorka dodaje se metanol u istoj količini. Apsorbancija uzorka mjeri se pomoću spektrofotometra (UviLine 9400, Secomam, Francuska) pri 517 nm (modificirano prema Al-Dhaheri i sur., 2017).

Sposobnost redukcije radikala izračunata je prema navedenoj formuli:

$$\text{Redukcija radikala (\%)} = \frac{A(\text{slijepa proba}) - A(\text{uzorak})}{A(\text{slijepa proba})} \times 100 \quad [5]$$

gdje je A očitana apsorbancija (-).

3.2.11.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Ova spektrofotometrijska metoda temelji se na kolorimetrijskoj reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ-a) u plavo obojen produkt. Do ove reakcije dolazi u kiselom mediju, a nastaje fero-tripiridiltirazin kompleks koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se 240 µL destilirane vode, 80 µL pripremljenog uzorka i 2080 µL pripremljenog FRAP reagensa, a za izradu slijepe probe umjesto uzorka dodano je 80 µL destilirane vode. Sadržaj epruvete dobro se homogenizira na vortex-u i odlaže u vodenu kupelj zagrijanu na 37 °C u trajanju 5 minuta. Nakon termostatanja izmjeri se apsorbancija pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996).

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca na analitičkoj vagi izvagano je 0,05006 g Trolox-a i kvantitativno preneseno pomoću 2 mL 96 %-tnog etanola u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake, odnosno pripremljena je 2 mmol L⁻¹ otopina Trolox-a. Tikvica je omotana aluminijskom folijom jer je otopinu Trolox-a potrebno

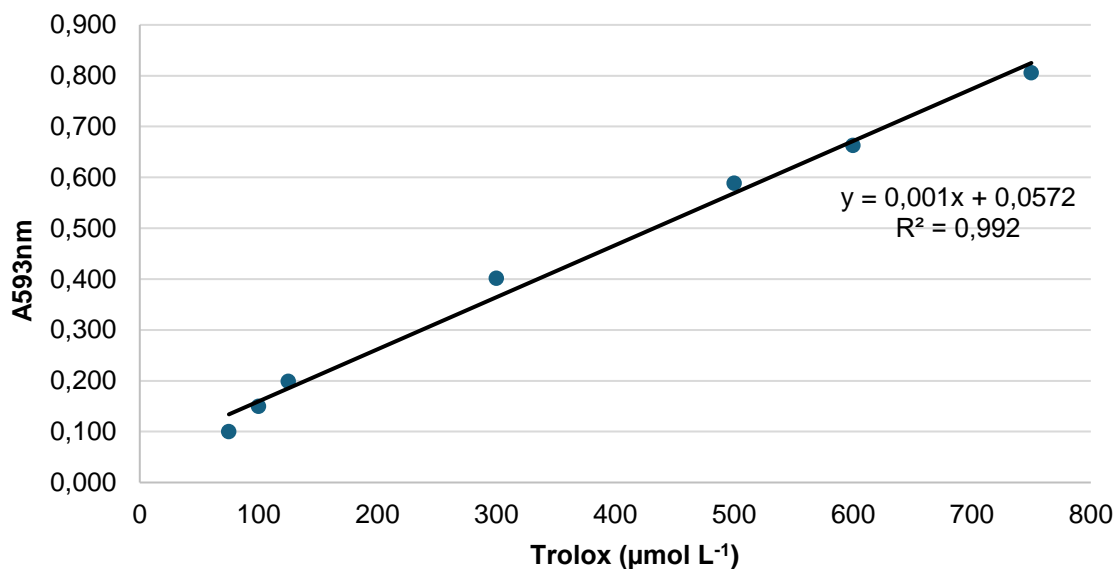
čuvati na tamnom. Pomoću otopine Trolox-a, pripremila su se njezina razrjeđenja u koncentracijama 75, 100, 125, 300, 500, 600, 750 μM .

Daljnji postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom pripremljenih razrjeđenja Trolox-a proveden je na isti način kao i postupak za uzorke sira.

Pomoću računalnog programa *Microsoft 365 Excel* i izmjerenih vrijednosti apsorbancije otopine Trolox-a nacrtan je baždarni pravac s vrijednostima koncentracije Trolox-a na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati (slika 3). U tablici 7 prikazane su izmjerene vrijednosti apsorbancije različitih koncentracija otopine Trolox-a.

Tablica 7. Izmjerene apsorbancije u ovisnosti o koncentracijama Trolox-a

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



Slika 3. Baždarni pravac za Trolox

Dobivena jednadžba pravca je:

$$y = 0,001 * x + 0,0572 \quad [6]$$

gdje je y apsorbancija pri 593 nm (-), x ekvivalent Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Budući da su uzorci bili razrijeđeni, antioksidacijski kapacitet izračunat je prema formuli:

$$x = x' * \text{razrjeđenje} \quad [7]$$

gdje je x antioksidacijski kapacitet uzorka (mg mL^{-1}), x' je $\frac{y - 0,0572}{0,001}$ (iz jednadžbe pravca) (mg mL^{-1}).

3.2.11.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu

Ova spektrofotometrijska metoda temelji se na kolorimetrijskoj reakciji fenola u uzorku s Folin-Ciocalteu reagensom. Do izračunate koncentracije ukupnih fenola dolazi se mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri valnoj duljini od 765 nm.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se 0,1 mL pripremljenog uzorka, 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode i nakon nekoliko minuta 1 mL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3). Slijepa proba napravljena je na isti način, no umjesto uzorka, dodano je 0,1 mL destilirane vode. Sadržaj epruvete homogenizira se na vortex-u te se epruvete prebacuju u vodenu kupelj zagrijanu na 50 °C u trajanju 25 minuta. Nakon termostatanja izmjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri 765 nm (modificirano prema Shortle i sur., 2014).

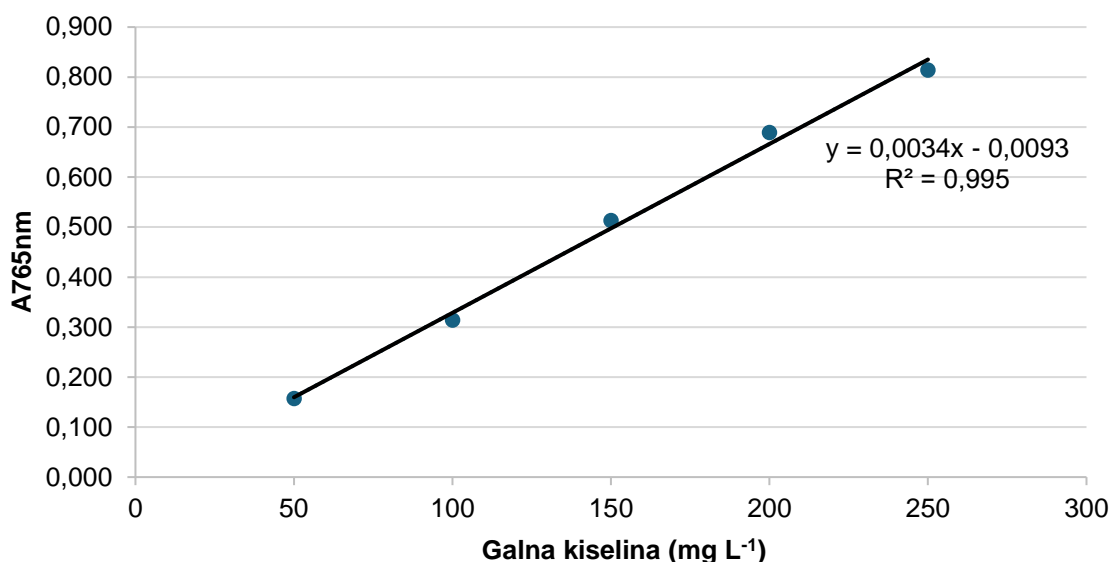
Izrada baždarnog pravca:

Na analitičkoj vagi izvaže se 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te se ona nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pomoću pripremljenog standarda galne kiseline pripremljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL. Kako bi se pripremile otopine koncentracija 50, 100, 150, 200 i 250 mg L^{-1} , otpipetirani su alikvoti standarda galne kiseline volumena 1, 2, 3, 4 i 5 mL te su tikvice nadopunjene destiliranom vodom do oznake. Daljnji postupak pripreme reakcijskih smjesa i očitavanja apsorbancija jednak je kao i za uzorke sira.

Pomoću *Microsoft 365 Excel* programa nacrtan je baždarni pravac (slika 4) iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (tablica 8).

Tablica 8. Izmjerene apsorbancije u ovisnosti o koncentracijama galne kiseline

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



Slika 4. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Dobivena jednačba pravca glasi:

$$y = 0,0034 * x - 0,0093 \quad [8]$$

gdje je y apsorbancija pri 765 nm (-), x je ekvivalent galne kiseline (mg L⁻¹).

Budući da su uzorci bili razrijeđeni, koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema formuli:

$$x = x' * \text{razrjeđenje} \quad [9]$$

gdje je x koncentracija ukupnih fenola u uzorku (mg mL⁻¹), x' je $\frac{y+0,0093}{0,0034}$ (iz jednačbe pravca) (mg mL⁻¹).

3.2.11.4. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida

Metoda određivanja koncentracije ukupnih flavonoida zasniva se na kolorimetrijskoj reakciji aluminijeva klorida, čiji produkt ima apsorpcijski maksimum pri 415 nm.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetirano je 1 mL pripremljenog uzorka, 0,2 mL 10 %-tne otopine aluminijevog klorida (AlCl₃), 0,2 mL 1 M otopine kalijevog acetata (CH₃COOK) i 5,6 mL destilirane vode. Za slijepu probu, umjesto uzorka, dodana je destilirana voda koja je korištena

kao ekstrakcijsko otapalo. Sadržaj epruvete homogenizirao se pomoću vortex-a i epruveta se pohranila na tamno mjesto pri sobnoj temperaturi u trajanju 30 minuta. Apsorbancija je izmjerena pri 415 nm pomoću spektrofotometra (Aryal i sur., 2019).

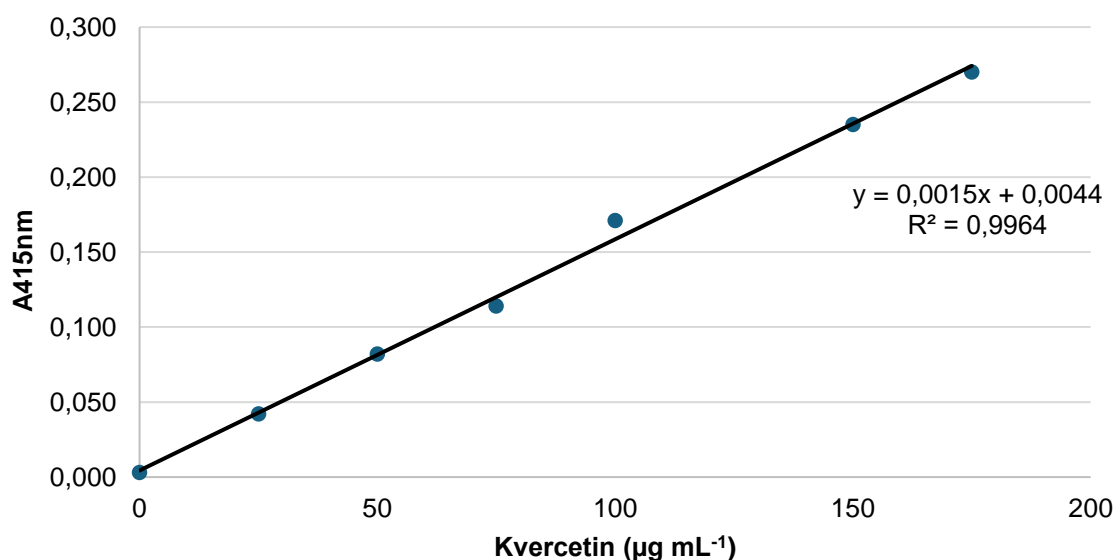
Izrada baždarnog pravca:

Na analitičkoj vagi odvagano je 10 mg kvercetina koji se otopio u metanolu i kvantitativno prenio u odmjernu tikvicu volumena 50 mL koja je nadopunjena metanolom do oznake. Pomoću pripremljenog standarda kvercetina pripremljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL. Kako bi se pripremile otopine koncentracija 0, 25, 50, 75, 100, 150 i 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$, otpipetirani su alikvoti standarda kvercetina volumena 0, 1,25, 2,5, 3,75, 5, 7,5 i 8,75 mL te su tikvice nadopunjene metanolom do oznake. Daljnji postupak pripreme reakcijskih smjesa i očitavanja apsorbancija jednak je kao i za uzorke sira.

Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancije standarda kvercetina (tablica 9) u programu *Microsoft 365 Excel* izradio se baždarni pravac (slika 5) te se pomoću jednadžbe pravca izračunala koncentracija ukupnih flavonoida.

Tablica 9. Izmjerene apsorbancije u ovisnosti o koncentracijama kvercetina

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



Slika 5. Baždarni pravac za kvercetin

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0015 * x + 0,0044 \quad [10]$$

gdje je y apsorbancija pri 415 nm (-), x je ekvivalent kvercetina ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Budući da su uzorci bili razrijeđeni, koncentracija ukupnih flavonoida izračunata je prema formuli:

$$x = x' * \text{razrjeđenje} \quad [11]$$

gdje je x koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku (mg mL^{-1}), x' je $\frac{y - 0,0044}{0,0015}$ (iz jednadžbe pravca) (mg mL^{-1}).

3.2.12. Obrada podataka

Za potrebe analize podataka i obradu istih, koristio se program *Microsoft 365 Excel* (verzija 2408), a konačne vrijednosti prikazane su kao prosječne vrijednosti triju mjerenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Prvobitni cilj ovoga rada bio je ispitati mogućnost primjene vodenog ekstrakta lista masline u proizvodnji polutvrdog kravljeg sira. Također, pratio se utjecaj ekstrakta lista masline na trajnost polutvrdog sira tijekom zrenja u kontroliranim uvjetima, pri temperaturi od 12 °C i relativnoj vlažnosti od 75 %, te utjecaj na kvalitetu tako proizvedenog sira.

Vodeni ekstrakt lista masline proizveo se mikrovalnom ekstrakcijom te je u sireve dodan u dvije različite koncentracije, koje su određene prema rezultatima rada Vranković (2022). Odnosno, nakon što se ekstraktu lista masline odredila koncentracija ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu, izračunale su se efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebnih za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa. Efektivne koncentracije u nastavku rada označene su kao EC_{50} i EC_{75} , a volumen ekstrakta koji se dodao za postizanje EC_{50} iznosi je 1,32 mL na 1 litru mlijeka te za postizanje EC_{75} iznosio je 2,09 mL na 1 litru mlijeka. Prilikom proizvodnje sira, proizveo se i kontrolni sir (K), bez dodatka ekstrakta lista masline.

Svim proizvedenim uzorcima sira određeni su aktivitet vode i udio vlage (slika 6), pH (slika 7), titracijska kiselost (slika 8), tekstura (slike 9, 10, 11, 12), indeks boje (tablica 10, slike 13-16), udio mliječne masti i udio zasićenih masnih kiselina (slika 21) te udio ukupne suhe tvari i udio mliječne masti u suhoj tvari (slika 22). Također, provele su se mikrobiološke analize sireva (tablica 11). Navedena mjerenja i analize provele su se na uzorcima sira 1., 15., 30., 45. i 60. dan nakon proizvodnje, odnosno dan zrenja. Spektrofotometrijske analize, kao što su određivanje koncentracije ukupnih fenola (slika 23) i flavonoida (slika 24), antioksidacijski kapacitet (slika 25) i antioksidacijska aktivnost (slika 26), provedene su 1., 30., 45. i 60. dan zrenja. Istodobno, pratila se i proteoliza u sirevima nakon 1. i 60. dana provedenog u zrioni (slike 17-20).

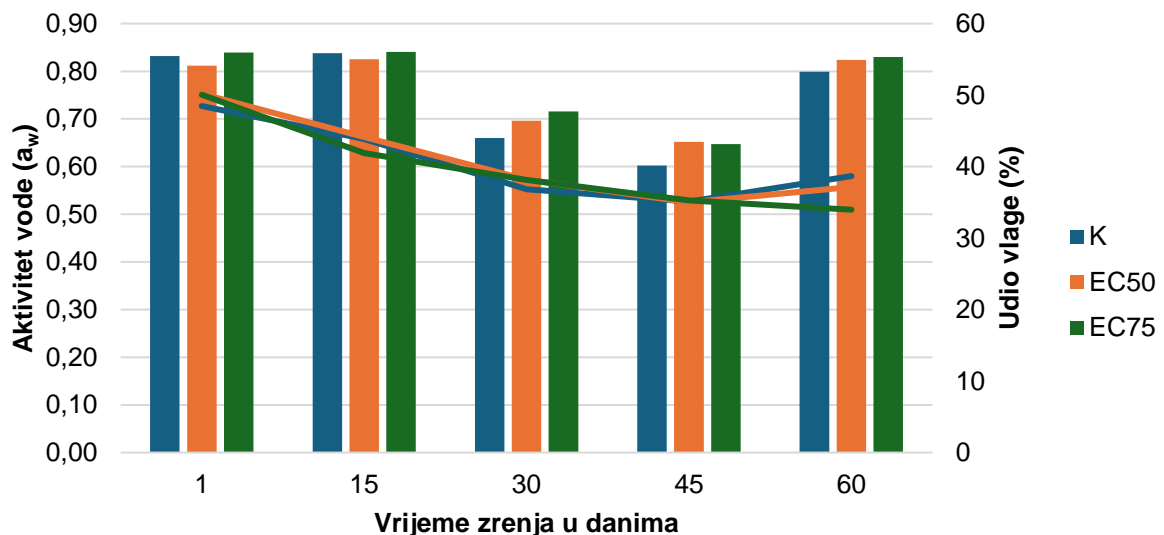
4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZA SIRA

4.1.1. Aktivitet vode i udio vlage

Slobodna voda ima važan utjecaj na stabilnost i održivost namirnica jer djeluje kao otapalo za kemijske, mikrobiološke i enzimske reakcije. Aktivitet vode je fizikalni parametar, pomoću kojeg se može kontrolirati rast i razvoj mikroorganizama, odnosno ono se definira kao omjer tlaka vodene pare u namirnici i tlaka para čiste vode pri istim uvjetima (Pitt i Hocking, 2009). U sirarstvu praćenjem aktiviteta vode tijekom zrenja sira, istovremeno se prati dostupnost slobodne vode za enzimsku aktivnost koja dovodi do razvoja specifičnih osobina sira. Uz navedeno, može se pretpostaviti struktura sira, odnosno elastičnost, čvrstoća i viskoznost sira.

Slika 6 prikazuje ovisnost vrijednosti aktiviteta vode (a_w) i udjela vlage o vremenu zrenja uzoraka sira proizvedenih i analiziranih u ovome radu. Tijekom uzorkovanja sireva u trajanju 60 dana vrijednosti aktiviteta vode nisu se značajnije mijenjale između različitih uzoraka sira,

odnosno dodatak ekstrakta lista masline nije značajnije utjecao na vrijednost aktiviteta vode usporedno s vrijednosti kontrolnog uzorka sira. Međutim, zrenje sireva u trajanju 60 dana pri kontroliranim uvjetima utjecalo je na smanjenje vrijednosti aktiviteta vode kod svih uzoraka sira. Iako je u periodu između 45. i 60. dana zrenja došlo do povećanja aktiviteta vode kod svih uzoraka sira. Također, trend udjela vlage sukladan je trendu aktiviteta vode, odnosno vrijednosti udjela vlage bile su stabilne i nisu varirale između različitih uzoraka. Zabilježen je pad udjela vlage proporcionalno s danima zrenja, no kao i kod aktiviteta vode primijećeno je blago povećanje udjela vlage 60. dan zrenja. Hickey i suradnici (2013) analizirajući kemijski sastav sira tipa Cheddar tijekom zrenja u trajanju 270 dana, također su zabilježili pozitivnu korelaciju između aktiviteta vode i sadržaja vlage. Mezo-Solís i suradnici (2020) pad udjela vlage tijekom zrenja meksičkog sira tipa Manchego pripisuju djelovanju bakterija mliječne kiseline koje fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu te povišenoj temperaturi zrenja, koja je u njihovom radu iznosila 10 °C. El-Nimr i suradnici (2010) utvrdili su kako sa zrenjem u trajanju 60 dana opada aktivitet vode u egipatskom siru tipa Gouda, ali se odvijanje proteolize pospešuje. Iako voda prisutna u porama sira zadržava sposobnost otapala, ona ima nižu a_w vrijednost u usporedbi sa čistom vodom zbog prisutnosti NaCl, laktoze i drugih otopljenih tvari male molekulske mase. Stoga se vrijednost aktiviteta vode tijekom zrenja polutvrdih i tvrdih sireva smanjuje jer nastaju u vodi topljivi dušikovi spojevi kao produkti proteolize te kao posljedica hidrolize peptidne veze dolazi do vezanja molekula vode vodikovim vezama sa slobodnim amino i karboksilnim skupinama (Hickey i sur., 2013).

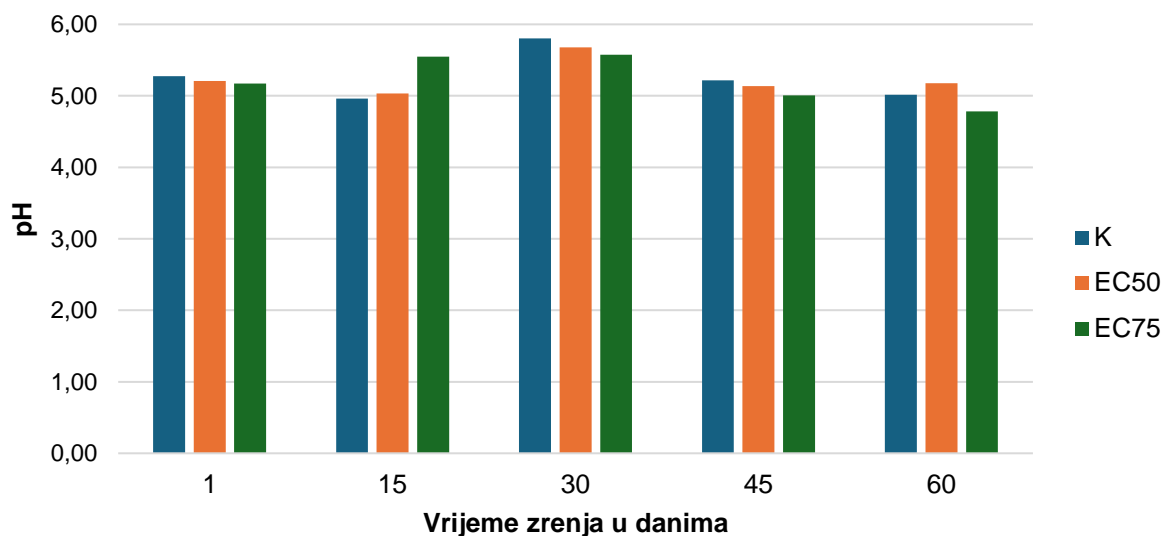


Slika 6. Prikaz ovisnosti aktiviteta vode (a_w) (stupci) i udjela vlage (%) (linije) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅) K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

4.1.2. Kiselost sira

Kiselost sira može se odrediti kao aktivna kiselost, tj. pH vrijednost, ili kao titracijska kiselost. Aktivna kiselost izražava se koncentracijom vodikovih iona, a titracijska kiselost pomoću utrošenog volumena NaOH potrebnog za neutralizaciju 100 mL uzorka uz indikator te se titracijska kiselost može izraziti u različitim kiselinskim stupnjevima (Tratnik i Božanić, 2012).

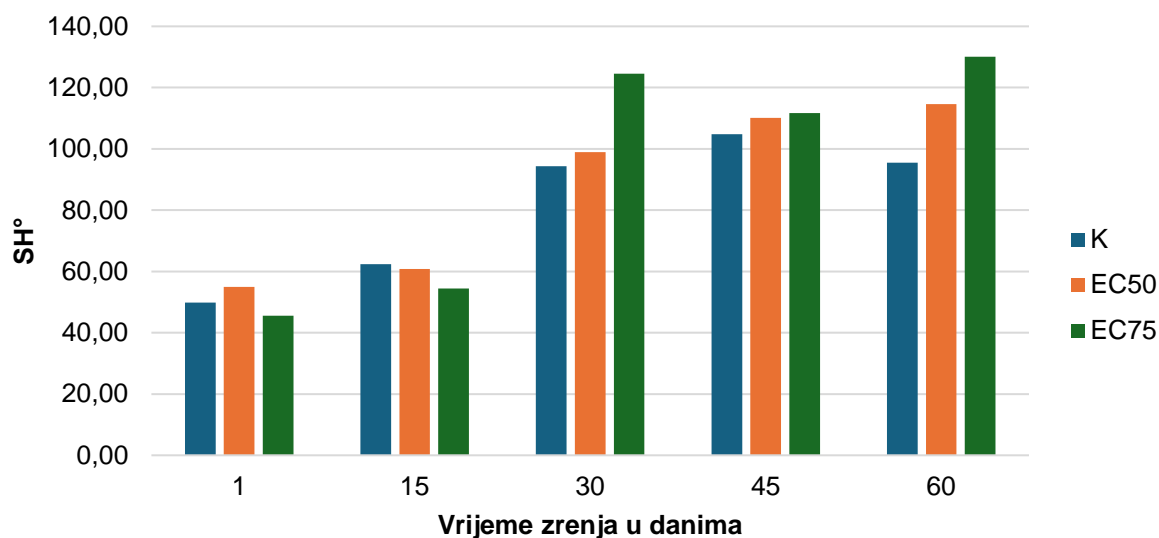
Na slici 7 prikazana je ovisnost pH vrijednosti o vremenu zrenja sireva. Dodatak ekstrakta lista masline nije značajnije utjecao na promjenu pH vrijednosti između različitih vrsta sireva, odnosno prema prikazanim rezultatima može se zaključiti da je uzorak sira EC₇₅ imao najmanju zabilježenu pH vrijednost tijekom 60 dana zrenja. Također, ukoliko se preciznije promotre rezultati 1., 30. i 45. dana zrenja, može se uočiti da uzorci sireva EC₅₀ imaju nešto nižu pH vrijednost u usporedbi sa kontrolnim uzorkom. U konačnici, pH vrijednost između različitih vrsta sireva nije mnogo varirala, no vidljiv je obrnuto proporcionalni odnos između koncentracije ekstrakta lista masline i pH vrijednosti. U diplomskom je radu Filipan (2021) pratila utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na fizikalno-kemijske karakteristike i fermentaciju kravljeg mlijeka te navodi kako dodatak biljnih ekstrakata (lišće masline, chia sjemenke) utječe na povećanje broja bakterija mliječne kiseline tijekom fermentacije što rezultira većom proizvodnjom laktata i ubrzanim padom pH. Također Giroux i suradnici (2013) navode kako natrijevi ioni, nastali disocijacijom natrijevog klorida, reagiraju s hidroksilnom skupinom aromatskog prstena fenola i formiraju natrijev fenoksid, dok se H⁺ ioni oslobađaju i utječu na smanjenje pH vrijednosti u siru obogaćenom ekstraktom zelenog čaja. U prvih dva tjedna nakon proizvodnje sira, razvoj mliječne kiseline pomoću dodanih bakterija doveo je do smanjenja pH vrijednosti, no daljnji razvoj proteolize utjecao je na povećanje pH vrijednosti, odnosno došlo je do vezanja mliječne kiseline i kalcija (Tratnik i Božanić, 2012). Tijekom provedenog istraživanja Hickey i suradnika (2013), također je pH vrijednost varirala u različitim fazama zrenja te navode kako su te varijacije povezane s promjenama u omjeru laktata i proteina u siru.



Slika 7. Prikaz ovisnosti pH vrijednosti o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Ovisnost vrijednosti titracijske kiselosti, prikazane u stupnjevima Soxhlet Henkela, o trajanju zrenja proizvedenih sireva prikazana je na slici 8. Tijekom provedenog uzorkovanja, vrijednost titracijske kiselosti za kontrolni uzorak sira (K) bila je u rasponu od 49,87 do 104,80 °SH, za uzorak sira EC₅₀ u rasponu od 54,93 do 114,67 °SH i za uzorak EC₇₅ u rasponu od 45,60 do 130,13 °SH. Zrenje u trajanju 60 dana utjecalo je na porast titracijske kiselosti kod svih uzoraka sira, no najveći porast zabilježen je kod sira EC₇₅, a najmanji porast titracijske kiselosti kod kontrolnog uzorka (K). Utjecaj zrenja na porast titracijske kiselosti, također su zabilježili i Cichoscki i suradnici (2002) u svojem istraživanju fizikalno-kemijskih promjena tijekom zrenja brazilskog tradicionalnog polutvrđog sira. Na povećanje titracijske kiselosti utječe udio bezmasne suhe tvari, a budući da procesi tijekom zrenje dovode do gubitka udjela vode u siru i paralelnog porasta suhe tvari, kao što su proteini, peptidi, aminokiseline te soli, izračunate vrijednosti titracijske kiselosti potkrjepljuju navedeno. Također, kod sireva s ekstraktom lista masline mogle su se pretpostaviti veće vrijednosti titracijske kiselosti zbog povećanog udjela suhe tvari, odnosno obogaćenog sastava polifenolima.



Slika 8. Prikaz ovisnosti vrijednosti titracijske kiselosti ($^{\circ}\text{SH}$) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75})
 K – kontrolni uzorak, EC_{50} i EC_{75} – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

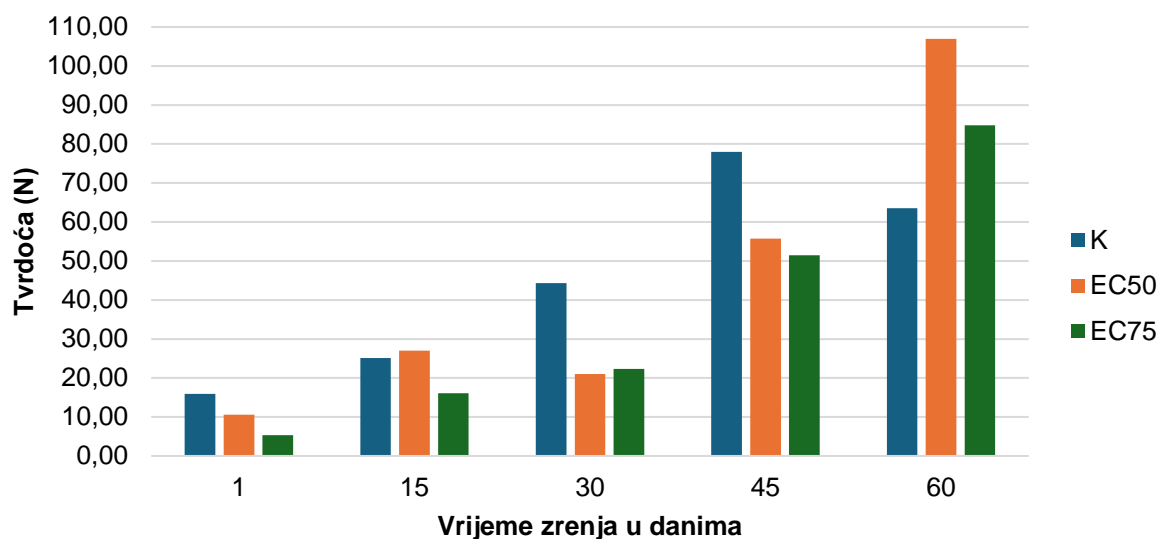
4.1.3. Tekstura sira

Tekstura je skupina fizikalno-kemijskih svojstava karakterističnih za određeni prehrambeni proizvod, a instrumentalnim analizama teksture mjere se sile i deformacije koje odgovaraju prvom zagrizu prilikom konzumacije. Tijekom procesa zrenja sireva dolazi do razvoja specifične teksture koja je rezultat većeg broja faktora, kao što su temperatura i trajanje zrenja, dodatak emulgirajućih soli, mliječnih i nemliječnih sastojaka u proizvodnji sira. Na razvoj poželjne teksture sira, snažan utjecaj ima i povezanost između pH vrijednosti, udjela kalcija, soli i vode (Petrović, 2017; Karlović i sur., 2009).

Kao što je navedeno u potpoglavlju 2.1. Proizvodnja sira, prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009) sirevi se mogu podijeliti na ekstra tvrde, tvrde, polutvrde, meke i svježeh, a tijekom analiziranja teksture uzoraka sira u ovome radu određeni su slijedeći parametri: tvrdoća (N), gumenost (N), elastičnost (mm), sposobnost žvakanja (Nmm).

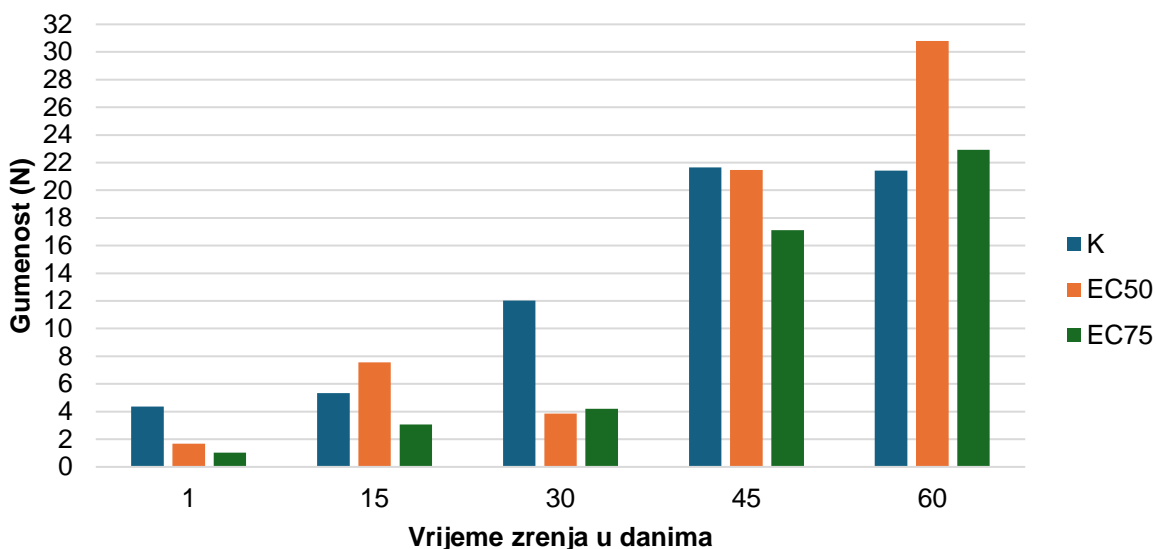
Tvrdoća sira može se opisati kao sila potrebna da izazove deformaciju sira, odnosno kao najveća sila izmjerena prilikom kompresije, rezanja ili probijanja uzoraka sira (Karlović i sur., 2009). Određena tvrdoća (N) svih uzoraka sira u ovome radu tijekom zrenja, definiranih u danima, prikazana je na slici 9. Tijekom perioda zrenja u trajanju 60 dana, tvrdoća svih sireva je porasla. Tvrdoća sira ovisi o sadržaju vlage, masti i proteina, odnosno na povećanje tvrdoće tijekom zrenja utječe povećanje udjela proteina, intenzivna proteolitička aktivnost, povećanje udjela soli te smanjenje udjela vode u bezmasnoj suhoj tvari sira (Zandona i sur, 2024; Petrović 2017). Kao što navodi Petrović (2017) na smanjenu tvrdoću sira u prvih 15 dana zrenja utječe niža pH vrijednost koja potiče veću kimozičku aktivnost. Proteinski fragmenti nastali

hidrolizom kazeina potiču omekšavanje gumene i elastične mase sira. Nakon 30. dana zrenja vidljive su značajne razlike tvrdoće između različitih uzoraka sira. Pretpostavka Zandona i suradnika (2024) da viši udio ekstrakta lista masline utječe na veće zadržavanje vlage u siru i proporcionalno smanjenje tvrdoće sira, pokazala se ispravnom, kao što je prikazano na slici 9.



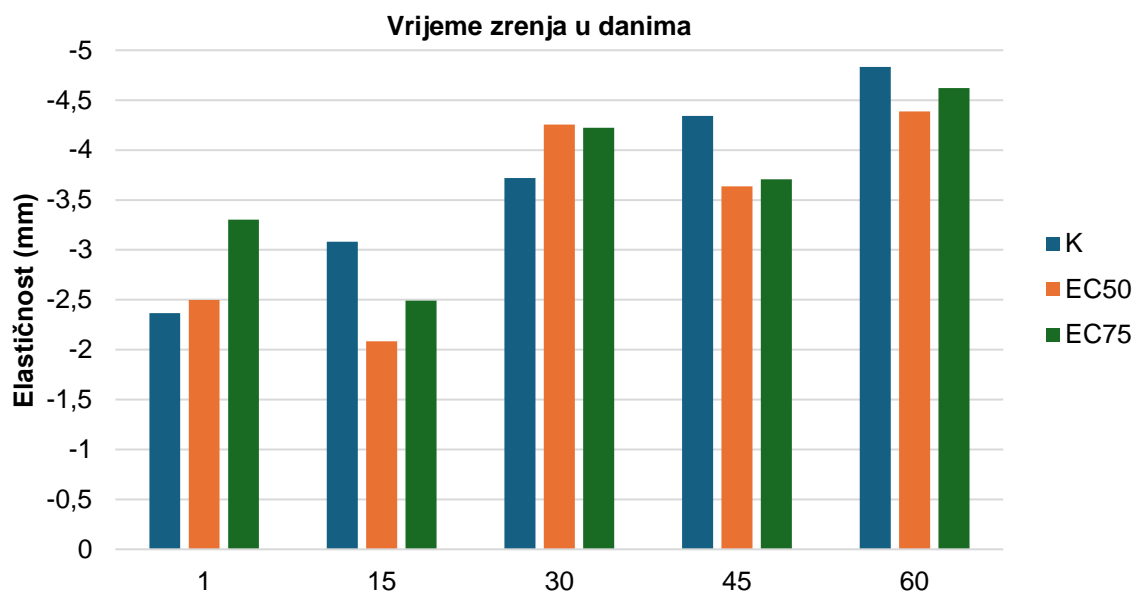
Slika 9. Prikaz ovisnosti tvrdoće (N) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)
 K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Gumenost predstavlja energiju potrebnu da se sir zgnječi do razine koja omogućuje njegovo nesmetano gutanje, te je povezana s tvrdoćom i otpornošću sira (Zandona i sur., 2024; Berti i sur., 2019). Slika 10 prikazuje ovisnost gumenosti o trajanju zrenja svih vrsta sireva proizvedenih u ovome radu. Zrenje sireva u trajanju 60 dana utjecalo je na povećanje gumenosti kod svih uzoraka sira. Tijekom prvih 30 dana zrenja, kod uzoraka sira s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅) zabilježena je niža gumenost, nego kod kontrolnog uzorka (K). Ipak, 60. dana zrenja određena je viša vrijednost gumenosti za uzorke EC₅₀ i EC₇₅, nego za kontrolni uzorak sira, što dovodi do zaključka da je kod sireva s ekstraktom lista masline potrebno uložiti više energije za njihovo gnječenje i gutanje. Usporedivši sliku 9 i 10, primjetno je da su vrijednosti tvrdoće i gumenosti za sve uzorke sira kroz analizirane dane zrenja u porastu kroz isti princip, što potvrđuje napisano, da je gumenost povezana s tvrdoćom. Drugim riječima, na porast gumenosti također utječe veći udio proteina i soli u siru te manji udio vode. Zabilježen i opisan pad sadržaja vlage u potpoglavlju 4.1.1. Aktivitet vode i udio vlage tijekom zrenja sira analiziranog u ovome radu, potkrjepljuje navedenu tvrdnju.



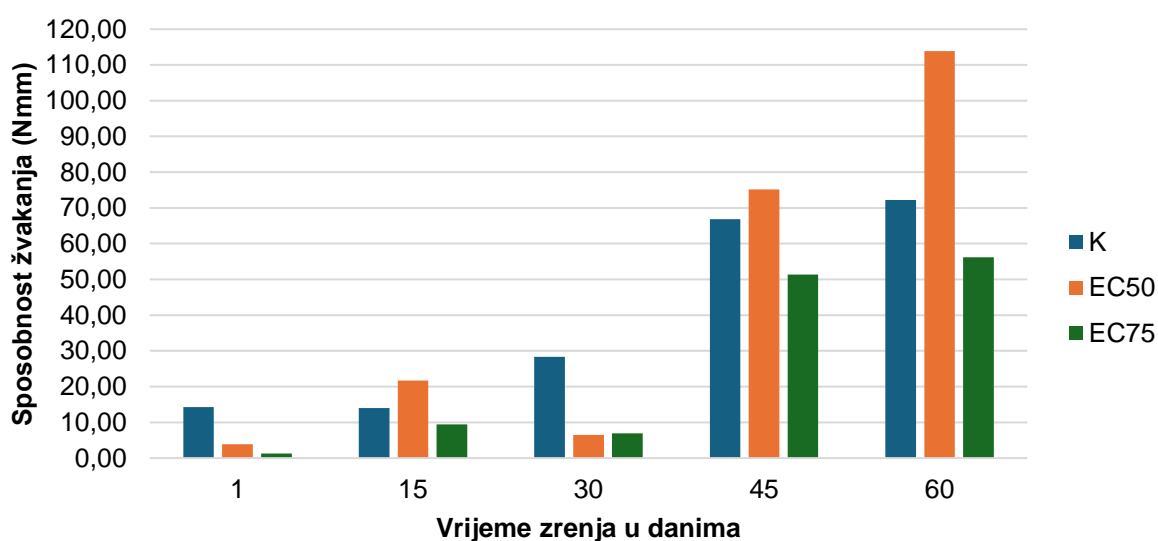
Slika 10. Prikaz ovisnosti gumenosti (N) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)
 K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Elastičnost se odnosi na sposobnost sira da povрати svoj izvorni oblik nakon početnog stlačivanja (Zandona i sur, 2024). Na slici 11 prikazana je ovisnost elastičnosti (mm) o trajanju zrenja sireva te za razliku od ispitane tvrdoće i gumenosti, vrijednosti elastičnosti smanjuju se s vremenom zrenja od 60 dana. Navedeno su zaključili i Ercan i suradnici (2011) u svome radu, što su pripisali proteolitičkoj razgradnji proteinske mreže. Prema prikazanim podacima, može se zaključiti kako sirevi ispitani 15. dan zrenja najbolje zadržavaju izvorni oblik nakon prvog stlačivanja. Razlika u dodanoj koncentraciji ekstrakta lista masline na elastičnost sireva, vidljiva je u prvih 15 dana zrenja. Nakon 30. dana zrenja utjecaj koncentracije ekstrakta lista masline na elastičnost je minimalna.



Slika 11. Prikaz ovisnosti elastičnosti (mm) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa



Slika 12. Prikaz ovisnosti sposobnosti žvakanja (Nmm) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Sposobnost žvakanja može se definirati kao potrebna energija za žvakanje sira do konzistencije prikladne za gutanje, odnosno mjera otpornosti sira na žvakanje (Zandona i sur, 2024). Energija potrebna za žvakanje sireva analiziranih u ovome radu povećavala se sa zrenjem sireva (slika 12). Do 30. dana zrenja sposobnost žvakanja za sireve s ekstraktom lista masline bila je manja od kontrolnog uzorka, izuzevši uzorak EC₅₀ 15. dan zrenja. Nadalje, uzorak EC₅₀ pokazuje veću sposobnost žvakanja od ostalih uzoraka tijekom 45. i 60. dana

zrenja. Uz navedeno, isti uzorak pokazao je i veću tvrdoću (107 N) od ostalih uzoraka, zadnji dan zrenja, što upućuje da na sposobnost žvakanja također utječe povećanje proteina i smanjenje vode.

Analizirani parametri teksture dovode do zaključka da povećana koncentracija ekstrakta lista masline u siru utječe na smanjenje tvrdoće, gumenosti, elastičnosti i sposobnosti žvakanja kravljenog sira koji je zrio 60 dana.

4.1.4. Boja sira

Uz teksturu, boja je jedan od parametara koja se osim senzorskim metodama može odrediti i analitičkim te ona ima snažan utjecaj na prihvatljivost prehrambenog proizvoda kod potrošača. Promjena boje mliječne masti mlijeka utječe na boju sira, ali boja sira formira se i tijekom njegovog zrenja (Matijević, 2015). Mjerenjem boje sira određeni su parametri L^* , a^* i b^* , čija je srednja vrijednost prikazana u tablici 10. Parametar L^* označava svjetlinu uzorka, odnosno predstavlja skalu sive boje. Navedena skala varira od 0, što predstavlja crnu boju, do vrijednosti 100, koja se odnosi na bijelu boju. Parametar a^* podrazumijeva raspon vrijednosti od -100, koja se interpretira kao zelena boja, do +100 koja označava crvenu boju. Kod parametra b^* skala vrijednosti ista je kao i kod a^* , no -100 pripisuje se plavoj boji, a +100 žutoj.

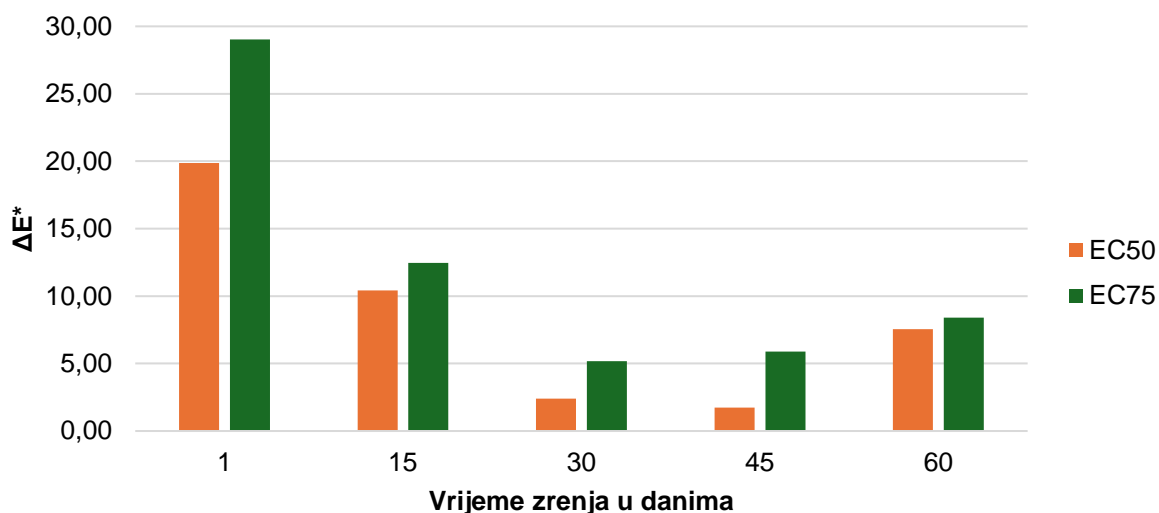
Tablica 10. Prikaz ovisnosti prosječnih izmjerenih L^* , a^* i b^* vrijednosti o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75})

Vrijeme zrenja u danima	Uzorak	L^*	a^*	b^*
1.	K	70,71	-0,39	13,03
	EC_{50}	50,86	0,50	13,41
	EC_{75}	41,69	0,67	13,00
15.	K	85,77	-1,25	13,18
	EC_{50}	75,77	-0,82	16,09
	EC_{75}	73,74	-0,76	16,42
30.	K	80,31	-0,63	14,75
	EC_{50}	79,73	-1,09	17,03
	EC_{75}	75,27	-0,65	15,92
45.	K	76,56	-0,57	14,98
	EC_{50}	77,70	-0,70	16,27
	EC_{75}	71,02	-0,62	16,96
60.	K	88,17	-0,87	16,65
	EC_{50}	80,66	-0,59	17,43
	EC_{75}	79,76	-0,54	16,97

K – kontrolni uzorak, EC_{50} i EC_{75} – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Zrenje sireva u trajanju 60 dana utjecalo je na promjenu vrijednosti parametra L^* , odnosno na svjetlinu uzoraka. Svim uzorcima sireva vrijednost parametra L^* se približila vrijednosti 100, čime su oni postali svjetliji. Kod sireva s ekstraktom lista masline zabilježena je najveća promjena svjetline tijekom zrenja. Usporedivši uzorke međusobno po danima uzorkovanja, uzorku s većom koncentracijom ekstrakta lista masline (EC_{75}) pripisuje se manja vrijednost L^* , odnosno veća sklonost crnoj boji. Tijekom prvog dana nakon proizvodnje, određen parametar a^* ukazao je na prisutnost zelenog tona kod kontrolnog uzorka i crvenog tona kod uzoraka s ekstraktom lista masline. Tijekom ostalog perioda zrenja, svi uzorci su sadržavali zeleni ton koji se je do kraja zrenja pojačao kod svih sireva. Prema izmjerenim vrijednostima parametra a^* , dodatak ekstrakta lista masline nije imao utjecaj na povećanje zelene nijanse. Sve određene vrijednosti parametra b^* nalaze se u pozitivnom rasponu što upućuje da proizvedeni sirevi sadrže žute nijanse, koje su se tijekom zrenja povećavale. U konačnici, kod uzoraka EC_{50} i EC_{75} došlo je do najvećeg povećanja žute nijanse, no uzorak s manjom koncentracijom ekstrakta lista masline (EC_{50}) ima jače izražen zeleni i žuti ton od uzorka EC_{75} .

Promjena vrijednosti parametra L^* tijekom zrenja je nespecifična u usporedbi s ostalim istraživanjima i praćenjima boje sira s dodatkom ekstrakta. Chudy i suradnici (2019) navode kako boja sira ovisi o udjelu krute i tekuće faze u siru čiji se omjer mijenja tijekom zrenja te sukladno tome i boja. Tijekom zrenja sireva dolazi do razgradnje kazeina te njegovim prelaskom u topljivo stanje dolazi do nastanka tamnijih tonova sira, što u ovome radu nije potvrđeno. Navedenu tvrdnju potvrdili su Licón i suradnici (2012) tijekom praćenja boje sireva od ovčjeg mlijeka s dodatkom šafrana u periodu zrenja od 180 dana. Vrijednosti parametra L^* smanjivale su se tijekom zrenja te je navedena promjena vrijednosti bila izraženija kod sireva sa dodatkom šafrana, nego kod kontrolnih sireva. Smanjenje svjetline sireva pripisuju reakcijama neenzimskog posmeđivanja. U radu Giroux i suradnika (2013), također je navedeno smanjenje svjetline sira tipa Cheddar obogaćenog ekstraktom zelenog čaja tijekom zrenja od 29 dana. Međutim, za vrijednosti parametra b^* navedeno je kako su se tijekom zrenja povećale, što je ostvareno i u ovom radu. Gubitak vode tijekom zrenja utječe na promjenu koncentracije masti te posebice na promjenu vrijednosti parametra b^* jer je dokazan utjecaj masti na povećanje žute boje sireva (Licón i sur., 2012).

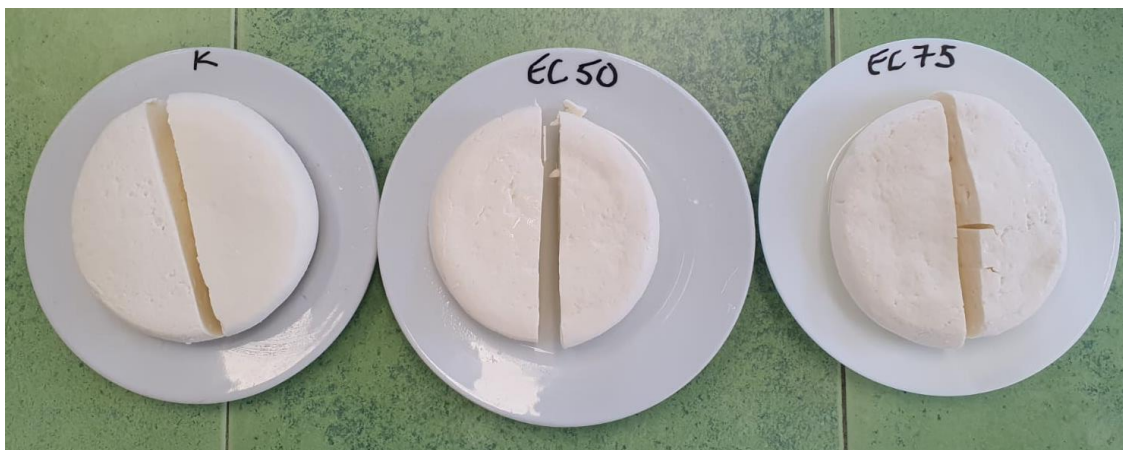


Slika 13. Prikaz ovisnosti ΔE^* vrijednosti o trajanju zrenja u uzorcima sira obogaćenih s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75})

EC_{50} i EC_{75} – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Slika 13 prikazuje ovisnost ΔE^* vrijednosti o trajanju zrenja u uzorcima sira s dodatkom ekstrakta lista masline, odnosno prikazana je razlika u boji sireva s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75}) u odnosu na kontrolne sireve (K). Prema izračunatim vrijednostima ΔE^* može se zaključiti kako postoji značajna razlika u boji sireva s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75}) u odnosu na kontrolni sir tijekom 1. i 15. dana zrenja te je navedena razlika veća u odnosu na 60. dan zrenja, što se ne podudara sa slikom 14. Na slici 14 prikazani su sirevi proizvedeni u ovome radu, slika 14 a odnosi se na sireve nakon prvog dana proizvodnje, a slika 14 b na sireve koji su bili u zrioni 60 dana. Prikaz na slici 14 a ne odgovara izračunatim vrijednostima ΔE^* za prvi dan zrenja jer prema izračunatom, promatrač bi trebao vidjeti dvije različite boje između kontrolnog sira te sireva s ekstraktom lista masline. Međutim, vrijednosti ΔE^* za 60. dan zrenja mogu se potvrditi slikom 14 b jer, uistinu, promatrač može vidjeti dvije različite boje između uzoraka K i EC_{50}/EC_{75} .

a)



b)



Slika 14 Prikaz kontrolnog sira (K) i sira obogaćenog s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)
a) prvog dana zrenja b) 60. dana zrenja (*vlastite fotografije*)

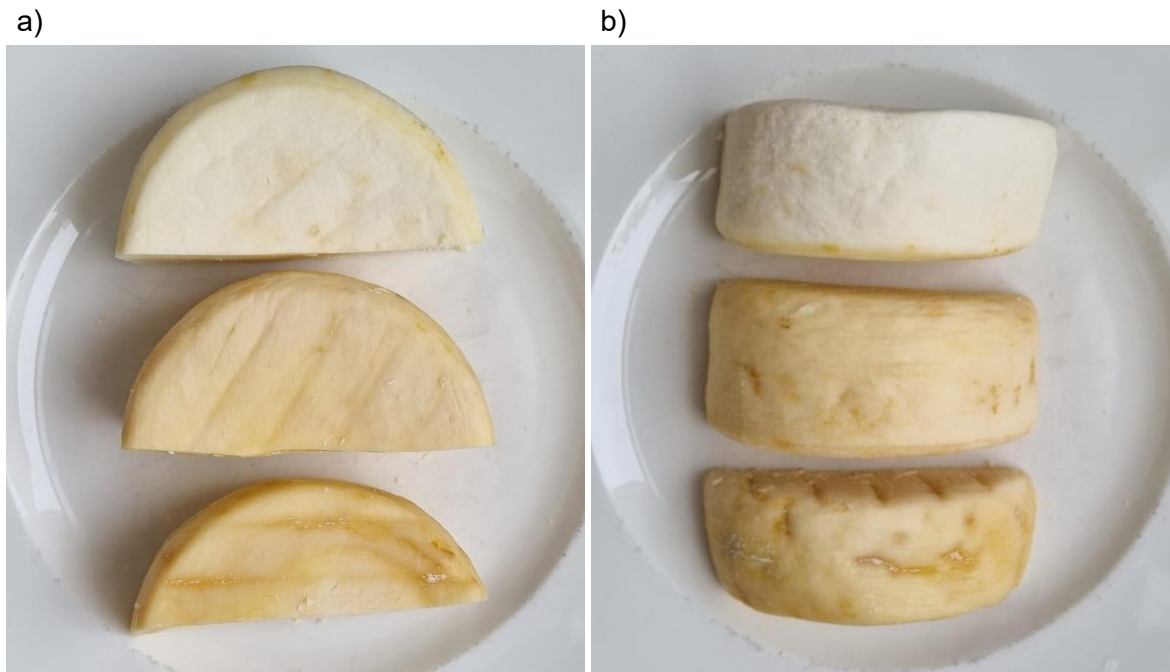
K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa



Slika 15. Prikaz presjeka sireva nakon 60. dana zrenja: kontrolni sir (K), sir s oznakom EC₅₀ i sir s oznakom EC₇₅ (gledano s lijeva na desno) (*vlastite fotografije*)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Na slici 15 prikazan je presjek proizvedenih sireva nakon 60. dana zrenja. Među navedenim uzorcima sireva vidljiva je razlika u boji te je primjetan žućkasti ton kod sireva s ekstraktom lista masline. Tijekom proizvodnje sireva došlo je do pada pH vrijednosti te se posljedično povećao broj slobodnih vezanih mjesta na proteinima mlijeka. Kao što navode Zandona i suradnici (2024) postoji mogućnost kako je došlo do stvaranja veza između polifenola ekstrakta lista masline i proteina mlijeka, osobito kazeina. Navedeno se može potkrijepiti vidljivim tamnijim prstenom na presjeku sireva (slika 15).



Slika 16. a) i b) Prikaz kore sira nakon 60. dana zrenja: kontrolni sir (K), sir s oznakom EC₅₀ i sir s oznakom EC₇₅ (gledano odozgo prema dolje) (*vlastite fotografije*)
K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Prikaz izraženije razlike u svjetlini i tonu žute boje između kontrolnog sira i sireva s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅) može se uočiti na kori sireva, kao što je prikazano na slici 16. Ukoliko se uspoređi slika 14 a i slika 16 može se zaključiti da određene vrijednosti parametra L* uistinu nisu precizne jer primjetna je razlika u svjetlini sireva 1. i 60. dan zrenja.

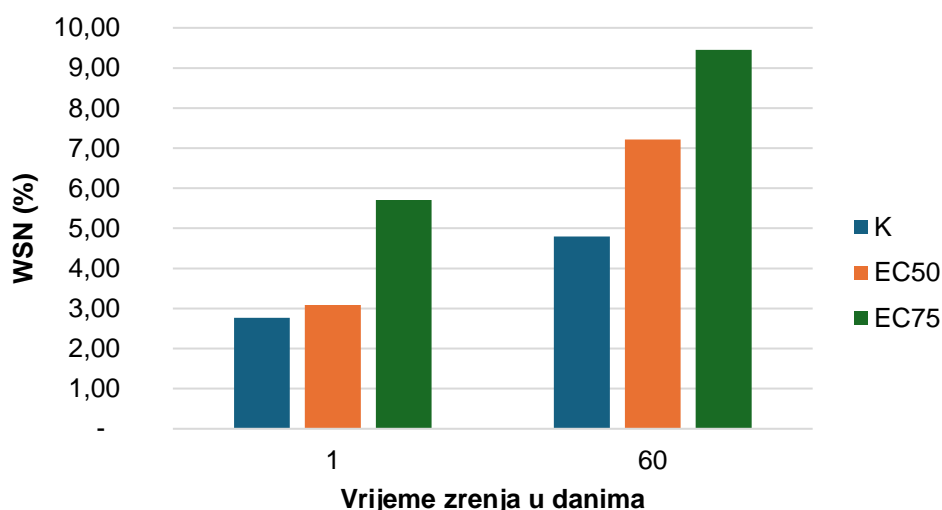
Prema navedenim vrijednostima analize boje sireva, sugerira se ponovo određivanje svih parametara (L*, a*, b*), pogotovo parametra L*, čime bi se provjerile i vrijednosti ΔE^* . Poželjno bi bilo provesti analizu kroz više izmjerenih paralela istoga uzorka, pogotovo na uzorcima 60. dana zrenja jer postoji razlika u boji između kore i unutrašnjosti sira. No, prema podacima u tablici 10 može se zaključiti da manja koncentracija ekstrakta lista masline, utječe više na pojavu zelenog i žutog tona, ali i povećava svjetlinu uzoraka.

4.1.5. Rezultati određivanja dušika topivog u vodenom ekstraktu (WSN) i trikloroctenoj kiselinu (TCA-SN), proteolize te SDS-PAGE analize

U sirevima prije zrenja proteini su netopljivi, no napredovanjem zrenja, napreduje i hidroliza u jednostavnije, topljive komponente te se zrelost sira može kontrolirati određivanjem udjela topljivog dušika u siru (Tratnik i Božanić, 2012).

Stupanj proteolize može se pratiti određujući udio dušičnih tvari topivih u vodenom ekstraktu (WSN, eng. *water soluble nitrogen*). Navedeni udio dušičnih tvari odnosi se na udio polipeptida male i srednje duljine, slobodnih aminokiselina te njihovih soli koji nastaju tijekom primarne proteolize hidrolizom kazeina pomoću kimoizina i plazmina, odnosno enzima sirila (Petrović, 2017).

Kao što je bilo za pretpostaviti, udio ukupnog organskog dušika topivog u vodenom ekstraktu povećao se tijekom zrenja (slika 17). Kao posljedica proteolitičkih reakcija nastale su frakcije dušika topive u vodi čiji je najviši porast zabilježen u uzorku sira EC₇₅. Vrijednosti WSN (%) za kontrolni uzorak kretale su se od 2,77 do 4,80, za uzorak EC₅₀ od 3,09 do 7,21 te za uzorak EC₇₅ od 5,71 do 9,45.



Slika 17. Prikaz ovisnosti količine ukupnog organskog dušika u vodenom ekstraktu (WSN) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenih s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

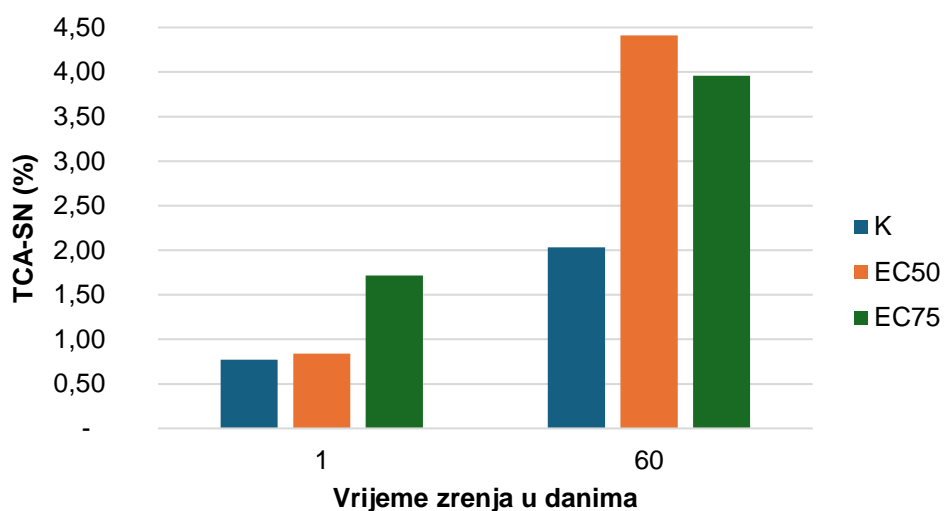
K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Praćenjem zrenja sira tipa Cheddar, Giroux i suradnici (2013) ustanovili su kako dodatak ekstrakta zelenog čaja utječe na smanjenje udjela ukupnog dušika topivog u vodenom ekstraktu u odnosu na kontrolni uzorak sira, što je suprotno od podataka dobivenih u ovome radu. Također, u radu Licón i suradnika (2012) ustanovljeno je kako kontrolni uzorci sira pokazuju više vrijednosti WSN usporedno s ovčjim sirevima obogaćenih šafranom. No, Mezo-Solís i suradnici (2020) navode kako se aktivnost kimoizina povećava pri niskim pH vrijednostima, što može biti razlog veće vrijednosti WSN (%) u sirevima s ekstraktom lista

masline u odnosu na kontrolni uzorak sira jer su kod sireva s ekstraktom lista masline zabilježene niže pH vrijednosti.

Nastali proteinski fragmenti tijekom primarne proteolize supstrati su za sekundarnu proteolizu, čime se povećava udio dušičnih tvari topivih u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN, eng. *trichlor-acetic soluble nitrogen*). Dušične tvari topive u vodenom ekstraktu hidroliziraju se endogenim i egzogenim enzimima nestarterske populacije i bakterijama mliječne kiseline dodanih u formi startera, pri čemu nastaju kratki peptidi i aminokiseline (Petrović, 2017).

Podaci na slici 18 prikazuju povećanje udjela dušičnih tvari topivih u TCA tijekom zrenja sira u trajanju 60 dana. Kao i kod praćenja primarne proteolize, veći porast dušičnih tvari topivih u TCA zabilježen je kod sireva s ekstraktom lista masline. Navedeni udio dušičnih tvari kretao se od 0,77 % do 2,03 % za kontrolni uzorak, od 0,84 % do 4,41 % za uzorak EC₅₀ i od 1,72 % do 3,96 % za uzorak EC₇₅.

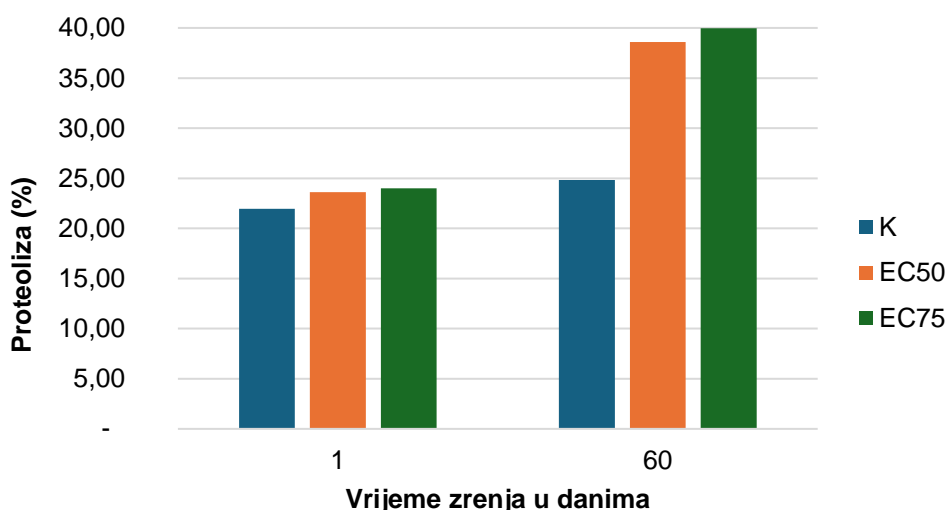


Slika 18. Prikaz ovisnosti količine organskog dušika u tvarima topljivim u TCA (TCA-SN) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Mezo-Solís i suradnici (2020) zabilježili su povećanje udjela dušičnih tvari topivih u TCA tijekom zrenja meksičkog sira tipa Manchego, ali nižim opsegom nego povećanje udjela dušičnih tvari topivih u vodenom ekstraktu. Razlog navedenom pronalaze u smanjenju vode u nemasnoj suhoj tvari sira te smanjenju omjera soli i vlage tijekom zrenja, što dovodi do smanjene aktivnosti nestarterskih i starterskih bakterija mliječne kiseline. Obogaćivanje sira tipa Cheddar ekstraktom zelenog čaja nije značajno utjecalo na sekundarnu proteolizu (Giroux i sur., 2013).

Slika 19 prikazuje promjene intenziteta proteolize tijekom zrenja svih vrsta sireva. Tijekom zrenja sireva u trajanju 60 dana, zabilježeno je povećanje intenziteta proteolize u svim uzorcima sira, uz to primijećen je i utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na povećanje postotka proteolize. Znanstvenici Sardiñas-Valdés i suradnici (2021) također su zabilježili intenzivniji porast proteolize u meksičkom siru tipa Manchego obogaćenog kurkuminom, nego u kontrolnom siru. Smatraju da je navedeno posljedica utjecaja kurkumina na oslobađanje vrlo malih peptida, aminokiselina i drugih manjih dušikovih spojeva kao što su urea, amini i amonijak. Slično se može utvrditi i za sireve obogaćene ekstraktom lista masline koji su istraživani u ovom radu. Kao što je prikazano na slici 20, SDS PAGE analizom je utvrđeno da su u uzorcima sireva nastali dušični spojevi niskih molekulskih masa koji se mogu povezati s nastalim peptidima tijekom zrenja što je utjecalo na povećanje intenziteta proteolize. Također uzorci s ekstraktom lista masline pokazuju jače izražene pruge na slici 20, što potvrđuje utjecaj polifenola na oslobađanje peptida nižih molekulskih masa.



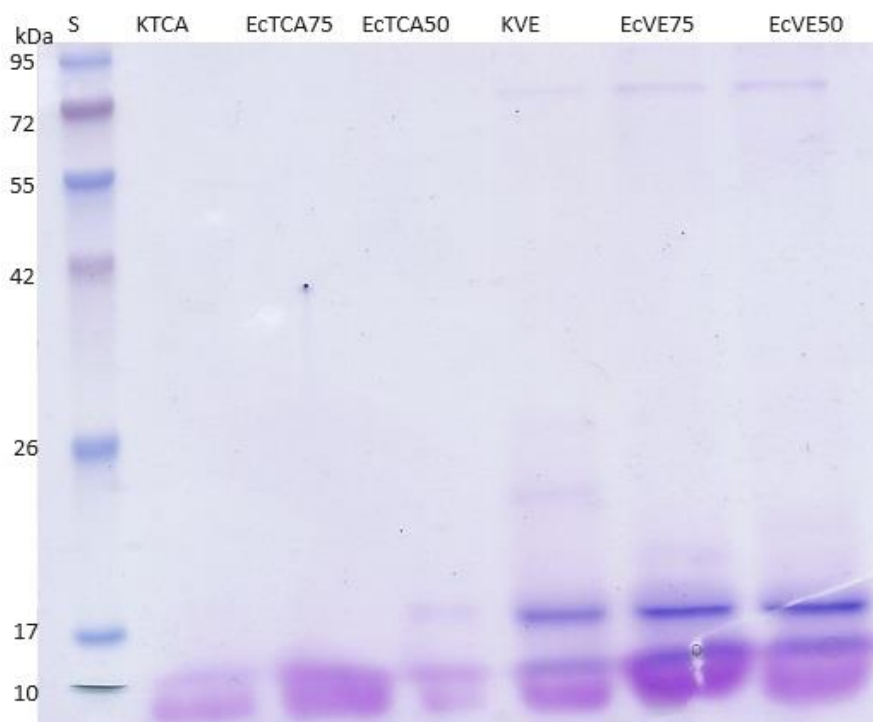
Slika 19. Prikaz ovisnosti proteolize (%) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Analitička metoda natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) značajno doprinosi istraživanju mliječnih proteina. Ova metoda omogućuje razdvajanje proteina prema različitoj molekulskoj masi u električnom polju. Prije provođenja elektroforeze, proteini se uz dodatak detergenta, natrij dodecil sulfata (SDS), denaturiraju te poprime negativan naboj. Nastali SDS-protein kompleks ima negativan naboj, a količina tog naboja je proporcionalna molekulskoj masi proteina. Budući da je gustoća naboja svih prisutnih SDS-protein kompleksa u uzorku jednaka, brzina kretanja denaturiranih proteina prema pozitivnoj elektrodi u električnom polju ovisi o njihovoj molekulskoj masi (Kostelac, 2016). Na slici 20, kolona označena sa slovom S

predstavlja otopinu standarda u kojoj su jasno označene molekulske mase pojedinih proteinskih frakcija koje se kreću od 10 do 95 kDa. Jasno ocrtni bandovi za vodeni ekstrakt uzoraka sira predstavljaju peptide niske molekulske mase oko 17 kDa koji su produkti primarne proteolize. Kod uzoraka vodenog ekstrakta obrađenog s TCA, na slici 20, jedino su prisutne pruge koje odgovaraju molekulskoj masi od 10 kDa te su njima zabilježene proteinske frakcije vrlo niske molekulske mase koje se odnose na produkte sekundarne proteolize.

U konačnici može se zaključiti kako obogaćivanje sira tvarima koje sadrže polifenolne spojeve utječe na intenzivnije razaranje proteinske strukture i bolju probavljivost tako obogaćenih sireva.



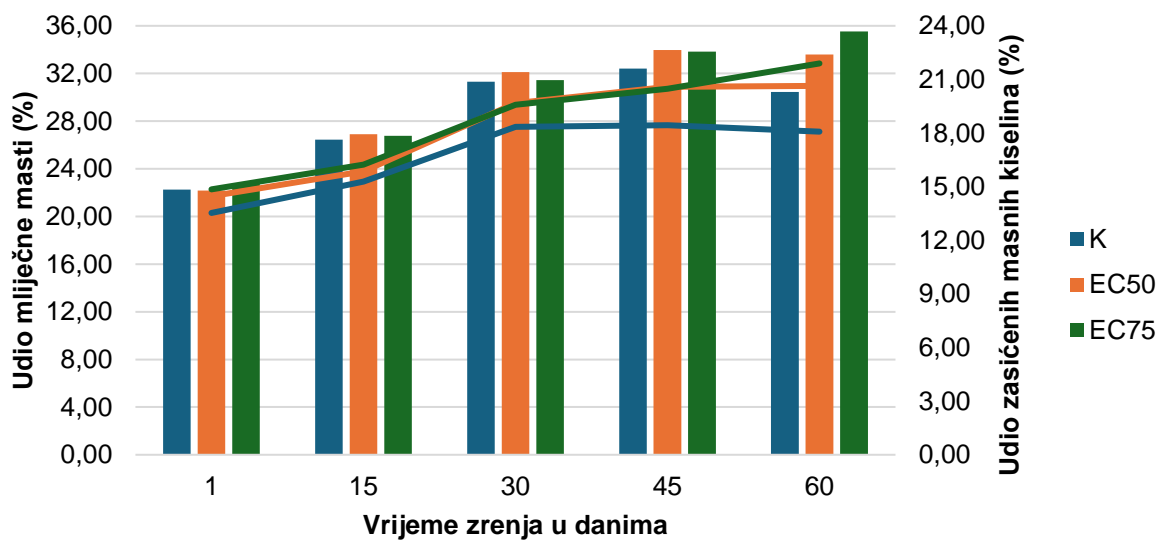
Slika 20. SDS-PAGE elektroforeza sira nakon 60 dana zrenja

S – standard, KTCA, EcTCA75, EcTCA50 – vodeni ekstrakt obrađen s TCA od uzoraka sira K, EC₇₅ i EC₅₀; KVE, EcVE75, EcVE50 – vodeni ekstrakt uzoraka sira K, EC₇₅ i EC₅₀; K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa, TCA - trikloroctena kiselina

4.1.6. Kemijski sastav sira

Zrenje polutvrđih i tvrdih sireva uz promjenu senzorskih osobina utječe i na kemijski sastav početnog nezrelog sira. Kemijski sastav proizvedenih sireva u ovome radu praćen je tijekom zrenja u trajanju 60 dana određujući udio vlage (potpoglavlje 4.1.1. Aktivitet vode i udio vlage), udio ukupne suhe tvari, udio mliječne masti, zasićenih masnih kiselina i udio mliječne masti u suhoj tvari.

Slika 21 prikazuje utjecaj zrenja na udio mliječne masti i zasićenih masnih kiselina u svim uzorcima sira. Zabilježeno je povećanje postotka mliječne masti tijekom zrenja kod svih uzoraka sira te je dodatak ekstrakta lista masline utjecao na veći udio mliječne masti u obogaćenim sirevima u odnosu na kontrolni sir. Paralelno s povećanjem udjela mliječne masti zabilježeno je i povećanje udjela zasićenih masnih kiselina, kako tijekom zrenja, tako i obogaćivanjem sireva ekstraktom lista masline. Tijekom istraživanja Licón i suradnici (2012) nisu ustanovili značajne razlike udjela mliječne masti u siru obogaćenom ekstraktom šafrana u odnosu na kontrolni sir, ali su uočili utjecaj smanjenja udjela vlage na povećanje postotka mliječne masti tijekom zrenja te je isto primijećeno i u ovome radu. Osim proteolize, tijekom zrenja sireva odvija se i lipoliza mliječne masti na masne kiseline i glicerol. Izmjereno povećanje udjela zasićenih masnih kiselina posljedica je intenzivne enzimske aktivnosti lipaza tijekom zrenja sireva, na čiju aktivnost nije inhibirajuće utjecao polifenolni sastav ekstrakta lista masline.

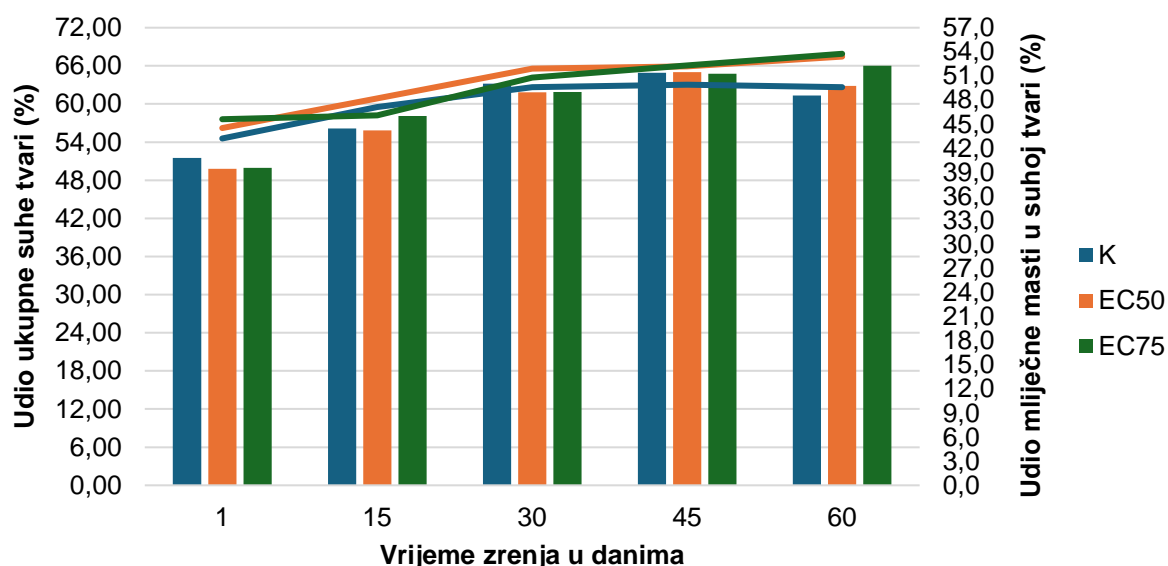


Slika 21. Prikaz ovisnosti udjela mliječne masti (%) (stupci) i udjela zasićenih masnih kiselina (%) (linije) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Na slici 22 prikazana je ovisnost udjela ukupne suhe tvari i udjela mliječne masti u suhoj tvari o trajanju zrenja tijekom 60 dana. Kontinuirano smanjenje udjela vlage tijekom 60 dana

zrenja utjecalo je na koncentriranje otopljenih tvari i rast udjela ukupne suhe tvari u svim analiziranim uzorcima sira. Vrijednosti udjela suhe tvari nisu značajno varirale između kontrolnog i uzoraka obogaćenih ekstraktom lista masline, no 60. dan zrenja primjetan je blagi utjecaj ekstrakta na povećanje udjela suhe tvari. Postotak mliječne masti u suhoj tvari paralelno se povećavao s povećanjem udjela suhe tvari tijekom zrenja. Izračunate vrijednosti udjela mliječne masti u suhoj tvari upućuju na proizvodnju masnih sireva, no nakon zrenja i povećanja udjela mliječne masti u suhoj tvari na 49,6 % – 53,8 % proizvedeni sirevi pripali su kategoriji punomasnih sireva (Pravilnik, 2009). Vrijednosti udjela mliječne masti u suhoj tvari veće su kod sireva obogaćenih ekstraktom lista masline, nego u kontrolnom uzorku, što je prikazano i na slici 21. Cichoscki i suradnici (2002) također su utvrdili pozitivni odnos između vremena zrenja u trajanju 60 dana tradicionalnog Prato sira i udjela suhe tvari. Udio suhe tvari nakon zrenja Prato sira iznosi je 69,15 %, što je nešto viša vrijednost od one dobivene u ovome radu. Slične vrijednosti udjela mliječne masti u suhoj tvari zabilježili su i Giroux i suradnici (2013) tijekom analize sira tipa Cheddar obogaćenog ekstraktom zelenog čaja.



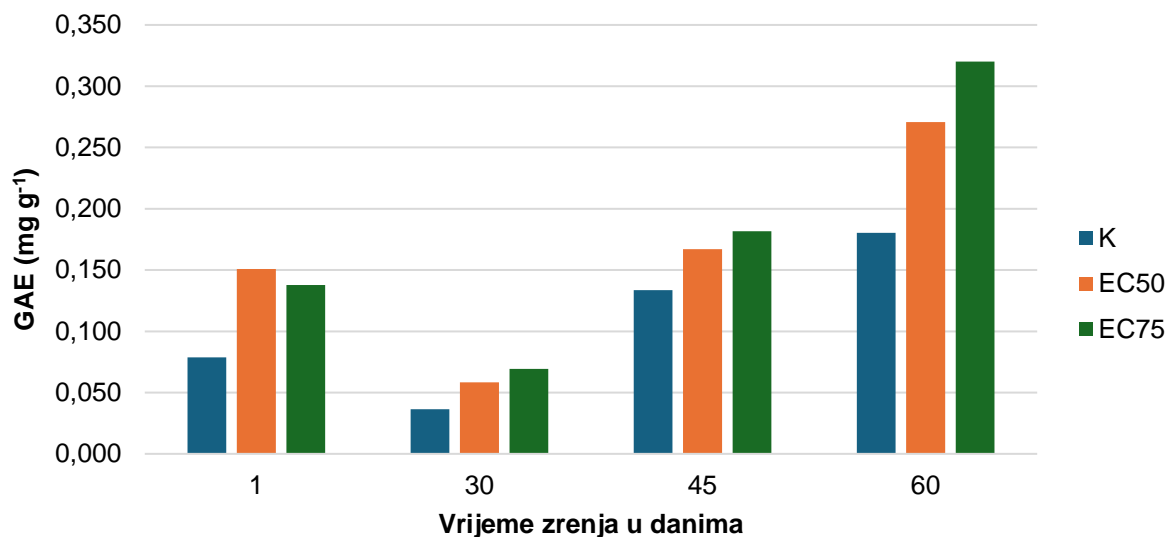
Slika 22. Prikaz ovisnosti udjela ukupne suhe tvari (%) (stupci) i udjela mliječne masti u suhoj tvari (%) (linije) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

4.2. REZULTATI SPEKTROFOTOMETRIJSKIH MJERENJA

4.2.1. Koncentracija ukupnih fenola određenih metodom po Folin-Ciocalteu

Koncentracija ukupnih fenola u svim uzorcima sira određena je prethodno opisanom metodom po Folin-Ciocalteu, a konačne koncentracije ukupnih fenola izražene su kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE g^{-1}). Ovisnost vrijednosti koncentracija fenola o vremenu zrenja sireva prikazana je na slici 23.



Slika 23. Prikaz ovisnosti koncentracije ukupnih fenola izražene kao ekvivalent galne kiseline GAE (mg g^{-1}) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

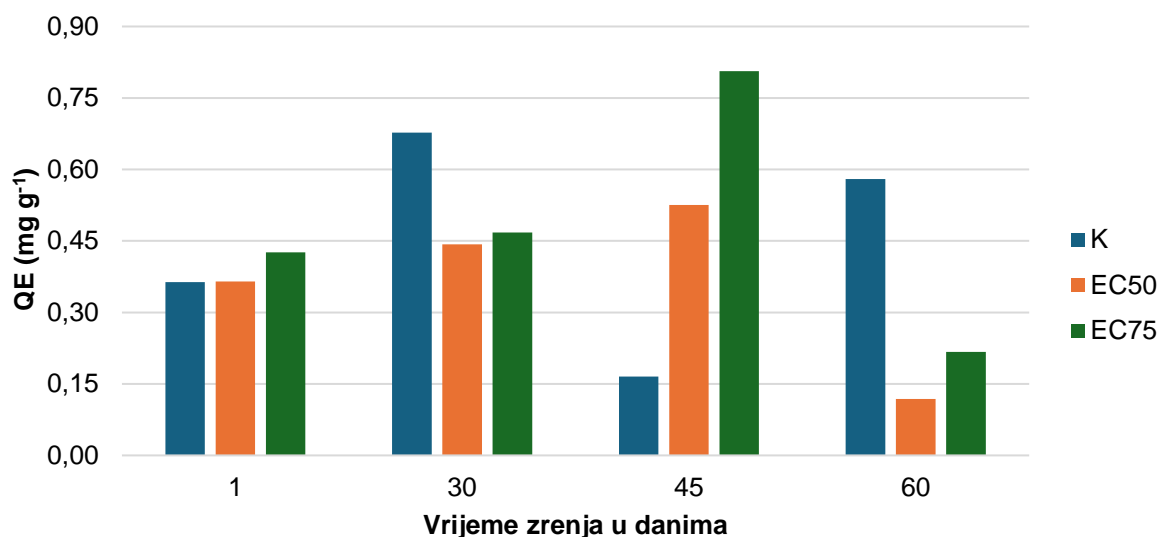
K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Koncentracije ukupnih fenola tijekom zrenja sireva bile su nestabilne i varirale su ovisno o danu uzorkovanja, no u konačnici može se primijetiti trend povećanja koncentracije ukupnih fenola u svim uzorcima sira. Najveća zabilježena koncentracija fenola postignuta je 60. dan zrenja u uzorku sira EC₇₅ te je iznosila $0,32 \text{ mg GAE g}^{-1}$. Tijekom perioda uzorkovanja od 30. dana zrenja do 60., primijećen je utjecaj povećanja koncentracije ekstrakta lista masline na povećanje koncentracije ukupnih fenola što je bilo za očekivati jer ekstrakt lista masline u svome sastavu sadrži osim oleuropeina mnogo drugih fenolnih tvari (luteolin-4'-O-glukozid, luteolin-7'-O-glukozid, luteolin, tirozol, hidroksitirozol) (Tavakoli i sur., 2018). Tijekom istraživanja Sardiñas-Valdés i suradnika (2021) također je uočena proporcionalna ovisnost koncentracije ukupnih fenola u meksičkom siru tipa Manchego o koncentraciji dodanog kurkumina. Tijekom grušanja mlijeka dolazi do hidrofobnih, hidrofilnih, ionskih te kovalentnih interakcija između fenolnih spojeva i proteina mlijeka što utječe na zadržavanje fenolnih tvari u siru. Ipak, fenoli su topljivi spojevi niske molekularne težine te se tijekom proizvodnje sira lako mogu izdvojiti sirutkom (Zandona i sur, 2024). Navedeno je ustanovljeno i u ovome radu jer je početna koncentracija fenola u ekstraktu lista masline iznosila $7,72 \text{ mg GAE mL}^{-1}$, a u

sirevima s dodatkom ekstrakta između 0,14 i 0,15 mg GAE g⁻¹.

4.2.2. Koncentracija ukupnih flavonoida

Osim ukupne koncentracije fenola, u ovome radu određena je i koncentracija ukupnih flavonoida prema prethodno opisanoj metodi. Konačne koncentracije ukupnih flavonoida izražene su kao ekvivalenti standarda kvercetina ($\mu\text{g QE g}^{-1}$) te je njihova ovisnost o trajanju zrenja sireva prikazana na slici 24.



Slika 24. Prikaz ovisnosti koncentracije ukupnih flavonoida izražene kao ekvivalent kvercetina QE (mg g^{-1}) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

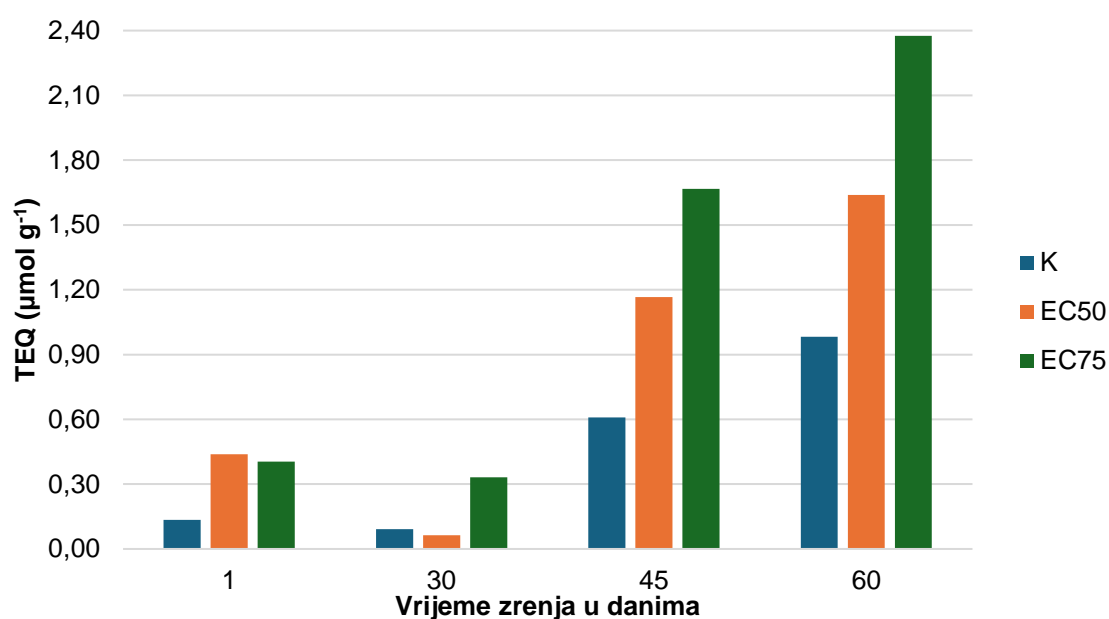
K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Kao i kod vrijednosti koncentracija ukupnih fenola, koncentracije flavonoida tijekom zrenja sireva bile su nestabilne, no u konačnici uočeno je smanjenje koncentracija flavonoida sa trajanjem zrenja. Najveće povećanje koncentracije flavonoida zabilježeno je 30. dan zrenja za kontrolni uzorak (K) s vrijednosti od 1,34 mg QE g⁻¹, a za uzorke EC₅₀ i EC₇₅ zabilježeno je najveće povećanje koncentracije flavonoida 45. dan zrenja. Ukoliko se usporede koncentracije flavonoida u sirevima s dodatkom lista masline, može se uočiti, kao i kod određivanja fenola, pozitivna korelacija između koncentracije ekstrakta lista masline i udjela flavonoida. Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva niske molekulske mase, a u ekstraktu lista masline ističu se luteolin, apigenin, rutin koji doprinose antioksidativnom i protuupalnom djelovanju (Oliveira i sur., 2024). Također, istraživanja su dokazala da je antioksidativna aktivnost prirodnih antioksidanasa uglavnom posljedica flavonoida, fenolnih kiselina i tanina (Khan i sur., 2018). Međutim, uz navedena pozitivna djelovanja, flavonoidi su nestabilni spojevi te smanjenje njihove koncentracije tijekom zrenja sireva pripisuje se raspadu na druge stabilnije spojeve.

Uz kemijsku nestabilnost, također su topljivi u vodi, što je utjecalo na njihovu nižu koncentraciju u uzorcima sira s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75}) u odnosno na ekstrakt lista masline. Izračunata koncentracija flavonoida u ekstraktu iznosila je $2,83 \text{ mg QE mL}^{-1}$, a u sirevima je oscilirala između $0,37$ i $0,43 \text{ mg QE g}^{-1}$.

4.2.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Antioksidacijski kapacitet uzoraka sira određen je prema prethodno opisanoj FRAP metodi. Dobivene vrijednosti apsorbancije preračunate su pomoću jednadžbe baždarnog pravca [6] u koncentraciju izraženu kao ekvivalent standarda Trolox-a ($\mu\text{mol TEQ g}^{-1}$). Grafički prikaz ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta sireva o trajanju zrenja prikazan je na slici 25.



Slika 25. Prikaz ovisnosti antioksidacijskog kapaciteta izraženog kao Trolox ekvivalent TEQ ($\mu\text{mol g}^{-1}$) o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75})

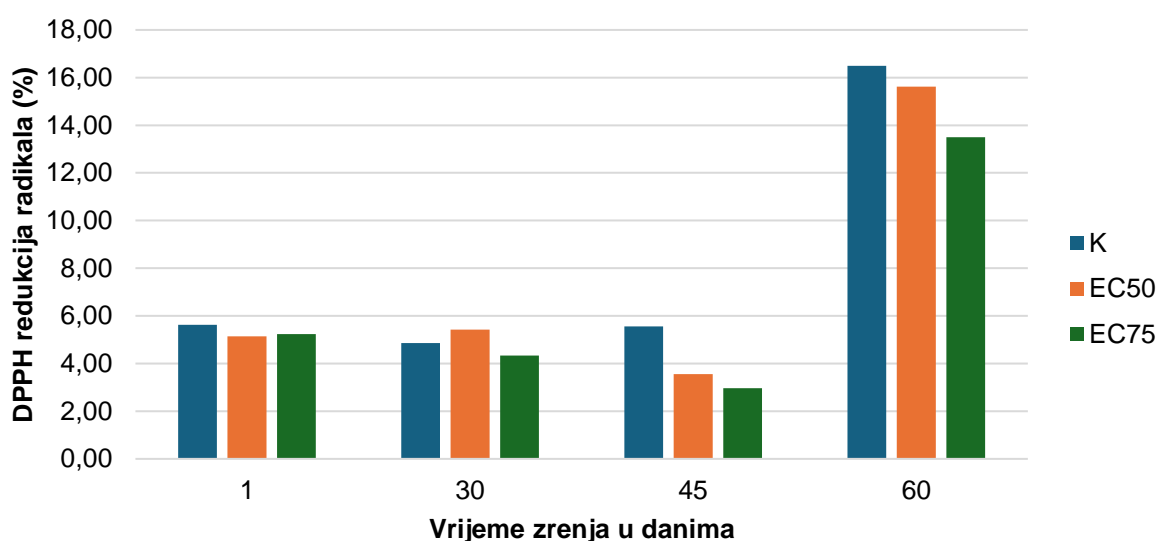
K – kontrolni uzorak, EC_{50} i EC_{75} – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Tijekom prvih 30 dana zrenja antioksidacijski kapacitet svih uzoraka sira bio je vrlo niski ($< 0,44 \mu\text{mol TEQ g}^{-1}$), no do kraja zrenja povećao se i u konačnici za uzorak EC_{75} iznosio $2,38 \mu\text{mol TEQ g}^{-1}$. Povećanje koncentracije ekstrakta lista masline utjecalo je na povećanje antioksidacijskog kapaciteta, što se podudara sa dobivenim vrijednostima koncentracije ukupnih fenola. Khan i suradnici (2018) navode kako interakcija između hidroksilne skupine fenolnih kiselina, proteina i polisaharida može utjecati na apsorpciju prirodnih antioksidansa u strukturu sira. Istraživanje Zandone i suradnika (2024) potvrđuje pozitivnu korelaciju između koncentracije ekstrakta lista masline i vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

Antioksidacijski kapacitet proizvedenog ekstrakta lista masline iznosio je 121,02 $\mu\text{mol TEQ mL}^{-1}$, a vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u sirevima s ekstraktom lista masline 1. dan nakon proizvodnje varirale su između 0,40 i 0,44 $\mu\text{mol TEQ g}^{-1}$, što potvrđuje, navedeno, da veliki udio polifenolnih tvari postane topljivo i odvoji se sirutkom tijekom proizvodnje sira.

4.2.4. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka sira određena je pomoću prethodno opisane metode, odnosno pomoću mjerenja intenziteta obojenja nastalog redukcijom DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa pri valnoj duljini od 517 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije preračunate su pomoću formule [5] u postotak reduciranih radikala, što je prikazano na slici 26.



Slika 26. Prikaz ovisnosti antioksidacijske aktivnosti izražene kao postotak DPPH redukcije radikala o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenim s ekstraktom lista masline (EC₅₀ i EC₇₅)

K – kontrolni uzorak, EC₅₀ i EC₇₅ – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Provedbom DPPH metode zabilježeno je povećanje antioksidacijske aktivnosti kod svih uzoraka sira tijekom perioda zrenja. Osim 30. dana uzorkovanja, najveća antioksidacijska aktivnost evidentirana je u kontrolnom siru (K), koji je u konačnici imao i najveći porast u postotku DPPH redukcije radikala. Iako je dokazano da neke komponente mlijeka, poput kazeina, imaju antioksidacijska svojstva, veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kontrolnog sira u usporedbi sa sirom obogaćenim ekstraktom lista masline, protive se vrijednostima koncentracije fenola i antioksidacijskog kapaciteta te ostalim znanstvenim istraživanjima (Giroux i sur., 2013). No, FRAP metodom mjeri se antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva, a DPPH metoda služi za određivanje svih biološki aktivnih spojeva koji mogu ući u reakciju i reducirati DPPH radikal (Filipan, 2021). Sardiñas-Valdés i suradnici (2021) u svome radu

navode povećanje koncentracije antioksidativnih spojeva nastalih proteolizom, kao što su bioaktivni peptidi i slobodne aminokiseline, koji su posljedično utjecali na povećanje antioksidacijske aktivnosti. Također su zabilježili povećanje koncentracije fenola, antioksidacijske aktivnosti i antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom tijekom zrenja meksičkog sira tipa Manchego obogaćenog kurkuminom. Khan i suradnici (2018) utvrdili su da povećanje koncentracije masnoća iz koštica manga u siru tipa Gouda utječe na porast postotka DPPH redukcije radikala, isto su utvrdili i Lee i suradnici (2016) prilikom obogaćivanja sira tipa Cheddar ekstraktom cvijeta *Inule britannice*. Budući da tijekom zrenja sira dolazi do povećanja koncentracije ukupnih fenola, a smanjenja koncentracije flavonoida, može se zaključiti da povećanje antioksidacijskog kapaciteta i aktivnosti nije posljedica udjela flavonoida, već ostalih fenolnih tvari u siru, odnosno najznačajnijeg polifenolnog spoja ekstrakta lista masline, oleuropina.

4.3. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE SIREVA

Iako se bez mikrobnih kultura ne bi mogao proizvesti sir, ipak neke naknadno razvijene mikrobne kulture mogu negativno utjecati na mikrobiološku ispravnost čime se narušava zdravstvena ispravnost i rok trajanja sira. Tablica 11 prikazuje vrijednosti mikrobiološke analize sireva tijekom zrenja u trajanju 60 dana.

Tablica 11. Prikaz ovisnosti prosječnih vrijednosti ($\log \text{CFU g}^{-1}$) mikrobioloških parametara o trajanju zrenja u kontrolnom siru (K) i uzorcima sira obogaćenog s ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75})

$\log \text{CFU g}^{-1}$					
Ukupan broj bakterija					
uzorak/vrijeme zrenja u danima	1	15	30	45	60
K	5,86	2,24	1,98	2,11	2,33
EC₅₀	5,89	2,65	2,91	2,40	2,87
EC₇₅	5,92	2,86	2,31	2,73	2,80
Kvasci i plijesni					
K	1,48	0,79	1,74	1,20	1,84
EC₅₀	1,00	0,85	1,48	1,33	1,78
EC₇₅	1,00	0,90	0,80	1,39	1,39
Enterobakterije					
K	3,13	2,20	2,54	2,70	2,26
EC₅₀	1,65	1,18	1,00	0,90	0,96
EC₇₅	2,71	2,16	2,00	1,98	1,88
Koagulaza pozitivni stafilokoki					
K	3,41	2,60	2,30	2,06	2,35
EC₅₀	2,85	2,40	2,48	4,41	2,28
EC₇₅	2,90	2,30	2,81	2,18	2,51

K – kontrolni uzorak, EC_{50} i EC_{75} – uzorci s dodatkom ekstrakta efektivne koncentracije ukupnih fenola potrebne za inhibiciju 50 i 75 % DPPH reagensa

Kako je prikazano u tablici 11, ukupan broj bakterija tijekom prvog dana nakon proizvodnje viši je u odnosu na ostale dane uzorkovanja. Na povećanje ukupnog broja bakterija utjecao je dodatak mikrobnih kultura tijekom proizvodnje sira te prisutnost endogenih bakterija mlijeka koje su preživjele pasterizaciju. Prema prikazanim vrijednostima ukupnog broja bakterija, dodatak ekstrakta lista masline nije djelovao antimikrobno jer su mikrobiološkim analizama kroz period zrenja ustanovljene veće vrijednosti ukupnog broja bakterija kod sireva s ekstraktom lista masline. Prvi dan uzorkovanja zabilježene su najveće vrijednosti ukupnog broja bakterija, koje su varirale između 5,86 i 5,92 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Vrijednosti ukupnog broja bakterija za prvi dan zrenja prelaze granicu definiranu Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) u kojem je preporučena vrijednost 3 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Generalno je uočeno smanjenje ukupnog broja bakterija tijekom zrenja što može biti posljedica smanjenja pH vrijednosti te

prilagodbe bakterija novoj mikrookolini. Licón i suradnici (2012) mikrobiološkom analizom sireva od ovčjeg mlijeka s dodatkom šafrana također su ustanovili smanjenje vrijednosti ukupnog broja bakterija tijekom zrenja u trajanju 180 dana.

Vrijednosti broja kvasaca i plijesni tijekom 15. dana zrenja bile su najniže za sve uzorke sira, a mikrobiološkom analizom 60. dana zrenja ustanovljene su najviše vrijednosti. Vrijednosti praćene do 60. dana zrenja varirale su između 1,00 i 1,84 log CFU g⁻¹, što je sukladno vrijednostima definiranim Vodičem (2009), u kojem su navedene maksimalne vrijednosti do 3 log CFU g⁻¹. Prema vrijednostima u tablici 11, utjecaj dodatka ekstrakta lista masline na smanjenje broja kvasaca i plijesni zabilježen je tijekom cijelog perioda zrenja, pri čemu je kod uzorka sira EC₇₅ koji je sadržavao najveću koncentraciju ekstrakta lista masline uočena i najviša redukcija. Slično dodatku šafrana u istraživanju koje su proveli Licón i suradnici (2012) i dodatak ekstrakta lista masline u ovom radu, utjecao je na smanjenu vrijednost kvasaca i plijesni u siru te su ostale fizikalno-kemijske promjene u siru utjecale na smanjenje broja kvasaca i plijesni tijekom zrenja. Ukoliko se sirovo mlijeko kontaminira kvascima i plijesnima, oni tada čine njegovu sekundarnu mikrofloru, a u samo mlijeko mogu dospjeti iz hrane za stoku, opreme za mužnju, ljudi, vode ili zraka (Tratnik i Božanić, 2012). Pasterizacija sirovog mlijeka omogućuje smanjenje kvasaca i plijesni, no ukoliko nije primijenjena dobra proizvođačka praksa i potrebni higijenski standardi u sirani, moguća je prisutnost kvasaca i plijesni u siru. Također, moguće je povećanje kvasaca tijekom soljenja sira jer je uočen povoljan utjecaj veće količine soli na rast kvasaca i plijesni, čime se može objasniti variranje u vrijednostima tijekom zrenja. Smanjenje udjela vode i zbijenost strukture sira, koja utječe na smanjenu dostupnost kisika, mogu inhibirajuće utjecati na kvasce i plijesni. Povećanje pH vrijednosti 30. dana zrenja, može biti posljedica metaboličke aktivnosti kvasaca koji koriste mliječnu kiselinu kao izvor ugljika te tijekom proteolize sintetiziraju alkalne spojeve, što dovodi do ponovnog povećanja broja kvasaca i plijesni 30. dan zrenja (Levkov i sur., 2014).

Kao i kod ukupnog broja bakterija, broj enterobakterija bio je najviši tijekom prvog dana zrenja. Porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća rodove: *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* i druge, a prisutnost enterobakterija u namirnicama je indikator fekalnog zagađenja ili doticaja namirnice sa kontaminiranom zemljom ili vodom (Djurđević, 2014). Iako je prisutnost enterobakterija česta u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka, njihova prisutnost u siru uglavnom je povezana s nedostatkom higijenske prakse tijekom mužnje i proizvodnje sira, skladištenjem bez hlađenja te s niskom proizvodnjom kiseline tijekom fermentacije mlijeka (Sánchez-Gamboa i sur., 2018). Vrijednosti enterobakterija iznad 2 log CFU g⁻¹ nisu sukladne vrijednostima definiranim Vodičem (2009), no nisu obvezujući parametar prema Uredbi EU 2073/2005. Namirnice u kojima se utvrdi prisutnost enterobakterija smatraju se potencijalno zdravstveno neispravnim. Lovrić (2018) je u svome diplomskom radu, također zabilježila povećanje broja enterobakterija tijekom

skladištenja svježeg sira s dodatkom ekstrakta majčine dušice i cvjetova bazge tijekom 14 dan. Promjena pH vrijednosti tijekom zrenja nije imala značajan utjecaj na promjenu broja enterobakterija. Isto je zabilježeno i u radu Levkov i suradnika (2014), no ustanovili su kako sadržaj soli djeluje inhibirajuće na enterobakterije. Međutim, zabilježeni porast enterobakterija 5. dana zrenja može se pripisati potencijalnoj naknadnoj kontaminaciji sira tijekom manipulacije poput operacija rezanja i soljenja. U radu Licón i suradnika (2012) i Sánchez-Gamboa i suradnika (2018) zabilježeno je smanjenje broja enterobakterija tijekom zrenja polutvrđog sira, a kao razlog tome navode smanjenje pH vrijednosti i inhibirajuće djelovanje antimikrobnih spojeva sintetiziranih metabolizmom bakterija mliječne kiseline, kao što su bakteriocini, organske kiseline, etanol i H_2O_2 te utjecaj svih ostalih fizikalno-kemijskih promjena tijekom zrenja sira. Promatrajući vrijednosti u Tablici 11, sirevi obogaćeni ekstraktom lista masline (EC_{50} i EC_{75}) mogu se smatrati ispavanima, dok je kontrolni sir (K) imao vrijednosti iznad $2 \log CFU g^{-1}$ i nije odgovarao postavljenom kriteriju. Međutim bilo bi potrebno provesti dodatne analize na svim uzorcima sireva kojima bi trebalo odrediti prisutnost *E.coli* kao obvezujućeg parametra higijene hrane prema Uredbi EU 2073/2005 kako bi se mogao donijeti konačan zaključak o zdravstvenoj ispravnosti i sigurnosti ispitivanih uzoraka sireva.

Tijekom zrenja sireva broj koagulaza pozitivnih stafilocoka varirao je između 2,28 i 4,41 $\log CFU g^{-1}$ te navedene vrijednosti za sve uzorke sireva nisu sukladne vrijednostima uvjetovanim Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2022). Prisutnost u siru i ostalim prehranbenim namirnicama koagulaza pozitivnih stafilocoka iznad dozvoljene granice, predstavlja zabrinutost za javno zdravlje zbog sposobnosti nekih sojeva da proizvode stafilokokne enterotoksine koji su topivi u vodi i otporni na toplinu. Ukoliko je koncentracija enterotoksina u namirnici između 5-10 $\log CFU g^{-1}$, može doći do njihovog akumuliranja i trovanja hranom (Sánchez-Gamboa i sur., 2018). Morea i suradnici (1999) zabilježili su prisutnost koagulaza pozitivnih stafilocoka u siru tipa Mozzarella nakon zrenja u trajanju 41 dan. Ukoliko se usporede vrijednosti broja koagulaza pozitivnih stafilocoka za sve uzorke sireva, može se zaključiti kako dodatak ekstrakta lista masline ima utjecaj na smanjenje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka. U radu Sánchez-Gamboa i suradnika (2018) uočeno je smanjenje broja koagulaza pozitivnih stafilocoka u siru tipa Chihuahua tijekom zrenja u trajanju 270 dana te navedeno pripisuju utjecaju sintetiziranih bakteriocina bakterija mliječne kiseline.

Budući da su zabilježene povišene početne vrijednosti nekih analiziranih parametara te su vrijednosti istih dosta varirale tijekom 60 dana zrenja, potrebno bi bilo provesti pasterizaciju pri višim temperaturama, posvetiti veću pažnju higijenskim uvjetima u proizvodnji te ispitati sireve na sve obvezujuće parametre prema Uredbi EU 2073/2005 kako bi se mogao donijeti zaključak o utjecaju dodatka ekstrakta lista masline na mikrobiološku kvalitetu sireva.

5. ZAKLJUČCI

Sukladno rezultatima dobivenim analizama polutvrdih kravljih sireva obogaćenih ekstraktom lista masline, provedenim tijekom 60 dana zrenja, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Zrenje je utjecalo na koncentriranje tvari, što je rezultiralo smanjenjem aktiviteta vode (a_w) i udjela vlage kod svih uzoraka sira tijekom zrenja. Nisu zabilježene velike razlike aktiviteta vode ni udjela vlage između kontrolnog sira i sireva s dodatkom ekstrakta lista masline, ali je primijećeno da ekstrakt ima blagi utjecaj na povećanje aktiviteta vode i udjela vlage.
2. pH vrijednosti su varirale u različitim fazama zrenja, ali je u konačnici zabilježeno smanjenje pH kod svih uzoraka sira i obrnuto proporcionalni odnos između koncentracije ekstrakta lista masline i pH vrijednosti. Vrijednosti titracijske kiselosti rasle su tijekom zrenja i uočen je proporcionalni odnos između koncentracije ekstrakta lista masline i titracijske kiselosti.
3. Parametri teksture su se kod svih uzoraka sira mijenjali tijekom zrenja te se može zaključiti da povećanje koncentracije ekstrakta lista masline u siru utječe na smanjenje tvrdoće, gumenosti, elastičnosti i sposobnosti žvakanja kravljeg sira.
4. Nakon 60 dana zrenja najveća promjena boje zabilježena je kod sira EC₇₅ te se može zaključiti da dodatak ekstrakta lista masline utječe na povećanje zelenog i žutog tona sira.
5. Više koncentracije ekstrakta lista masline proporcionalno su utjecale na povećanje postotka proteolize, stoga nakon 60 dana zrenja uzorak EC₇₅ imao je najveći intenzitet proteolize. SDS-PAGE analizom detektiran je razvoj dušičnih spojeva niskih molekulskih masa nakon 60. dana zrenja kod svih uzoraka sira.
6. Zrenje sireva je utjecalo na povećanje udjela mliječne masti, zasićenih masnih kiselina, udjela ukupne suhe tvari i mliječne masti u suhoj tvari. Zabilježen je proporcionalni odnos između koncentracije ekstrakta lista masline i udjela mliječne masti te zasićenih masnih kiselina. Nisu zabilježene velike razlike udjela suhe tvari između kontrolnog sira i sireva obogaćenih ekstraktom.
7. Dodatak ekstrakta lista masline tijekom proizvodnje sira uzrokovao je povećanje koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta određenog FRAP metodom, a smanjenje koncentracije flavonoida i antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom.
8. Vrijednosti parametara određenih mikrobiološkim analizama varirale su tijekom perioda zrenja, a nakon 60. dana zrenja zabilježen je broj koagulaza pozitivnih stafilokoka iznad zakonski dopuštenih granica u svim uzorcima sireva. Uočen je određen inhibitorni utjecaj dodanog ekstrakta lista masline na sve ispitivane mikrobiološke parametre, međutim potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio utjecaj na zdravstvenu ispravnost i sigurnost sireva.

6. LITERATURA

Al-Dhaheri AS, Al-Hemeiri R, Kizhakkayil J, Al-Nabulsi A, Abushelaibi A, Shah NP (2017) Health-promoting benefits of low-fat akawi cheese made by exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk. *J Dairy Sci* **100(10)**, 7771-7779. doi:10.3168/jds.2017-12761

Alwazeer D, Elnasanelkasim MA, Engin T, Çiğdem A (2023) Use of hydrogen-rich water as a green solvent for the extraction of phytochemicals: Case of olive leaves. *J Appl Res on Medicinal and Aromatic Plants* **35**, 100472. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100472>

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

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

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117(4)**, 426-436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

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

Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž, Knez Hrnčič M (2020) Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules* **25(24)**, 5946. <https://doi.org/10.3390/molecules25245946>

Božanić R (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević B, ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 55-57.

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

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

Cichoscki AJ, Valduga E, Valduga AT, Tornadijo ME, Fresno JM (2002) Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control* **13(4-5)**, 329-336. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00039-7)

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

Djurdjević I (2014) Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* (završni rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

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

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2(2)**, 22-33.

EI-Nimr AA, Eissa HA, El-Abd MM, Mehriz AA, Abbas HM, Bayoumi HM (2010) Water Activity, Color Characteristics and Sensory Properties of Egyptian Gouda Cheese during Ripening. *J Am Sci* **6(10)**, 447-453.

Ercan D, Korel F, Karagül Yüceer Y, Kınık Ö (2011) Physicochemical, textural, volatile, and sensory profiles of traditional Sepet cheese. *J Dairy Sci* **94(9)**, 4300-4312. doi:10.3168/jds.2010-3941

Filipan K (2021) Utjecaj dodatka ekstrakta lista masline (*Olea europaea*) na fizikalnokemijske karakteristike i fermentaciju kravljeg mlijeka (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Galli BD, Hamed AM, Sheehan JJ, King N, Abdel-Hamid M, Romeih E (2023) Technological solutions and adaptive processing tools to mitigate the impact of seasonal variations in milk composition on Cheddar cheese production-A review. *Int. J Dairy Technol* **76(3)**, 449-467. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12951>

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

Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC (2010) Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev* **68(4)**, 191–206. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>

Guiné RPF, De Lemos ET (2018) Development of New Dairy Products with Functional Ingredients. *Journal of Culinary Science & Technology* **18(3)**, 159–176. <https://doi.org/10.1080/15428052.2018.1552901>

Hajdinjak I (2017) Stabilnost napitka od lista masline tijekom skladištenja pri povišenoj temperaturi (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hickey DK, Guinee TP, Hou J, Wilkinson MG (2013) Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening. *Int Dairy J* **30(1)**, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.006>.

Hielscher Ultrasonics Ultrasonic Extraction of Olive Leaf Polyphenols. <https://www.hielscher.com/hr/ultrasonic-extraction-of-olive-leaf-extract.htm> Pristupljeno 9. listopada 2024.

Hill A, Ferrer MA (2021) Standardisation of Milk for cheese making. U: Hill A, Ferrer MA (ured.) *Cheese Making Technology e-Book*, 1. izd., University of Guelph, Guelph. <https://books.lib.uoguelph.ca/cheesemakingtechnologyebook/chapter/3-3-standardization-of-milk-for-cheese-making/> Pristupljeno 1. listopada 2024.

Iriondo-DeHond M, Miguel E, Del Castillo MD (2018) Food Byproducts as Sustainable Ingredients for Innovative and Healthy Dairy Foods. *Nutrients* **10(10)**, 1358. <https://doi.org/10.3390/nu10101358>

Kalit S (2015) Opće sirarstvo. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević B, ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 29-45.

Karlović S, Šimunek M, Ježek D, Tripalo B, Bosiljkov T, Brnčić M, Blažić M (2009) Određivanje teksturnih svojstava Gouda sira. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4 (3-4)**, 98-103. <https://hrcak.srce.hr/49978>

Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ajmal M, Ali S (2018) Antioxidant activity, fatty acids characterization and oxidative stability of Gouda cheese fortified with mango (*Mangifera indica* L.) kernel fat. *J Food Sci Tech* **55(3)**, 992-1002. doi:10.1007/s13197-017-3012-y

Kostelac D (2016) Proizvodnja i karakterizacija alfa-amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zgrebu, Zagreb.

Levkov V, Srbinovska S, Gjorgovska N (2014) Microbiological and chemical characteristics of traditional ewe's milk cheese from Mariovo region. *Mljekarstvo* **64(3)**, 195-206. doi:10.15567/mljekarstvo.2014.0307

Licón CC, Carmona M, Molina A, Berruga MI (2012) Chemical, microbiological, textural, color, and sensory characteristics of pressed ewe milk cheeses with saffron (*Crocus sativus* L.) during ripening. *J Dairy Sci* **95(8)**, 4263-4274. doi:10.3168/jds.2012-5389

Lloyd PJ, Wyk Jv (2012) Introduction to extraction in food processing. U: Lebovka N, Vorobiev E, Chemat F (ured.) Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, 1. izd., CRC Press, Florida, str. 1–24.

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

Lovrić T (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str. 274.

Matijević B (2015) Dodaci u proizvodnji sira i njihov značaj. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević B, ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 103-112.

Mezo-Solís JA, Moo-Huchin VM, Sánchez-Zarate A, Gonzalez-Ronquillo M, Estrada-León RJ, Ibáñez R i sur. (2020) Physico-Chemical, Sensory and Texture Properties of an Aged Mexican Manchego-Style Cheese Produced from Hair Sheep Milk. *Foods* **9(11)**, 1666. <https://doi.org/10.3390/foods9111666>

Mokrzycki WS, Tatol M (2011) Colour difference ΔE - A survey. *Mach Graph Vis* **20(4)**, 383-411.

Morea M, Baruzzi F, Cocconcelli PS (1999) Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *J Appl Microbiol* **87(4)**, 574-582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00855.x>

- O'Callaghan YC, O'Connor TP, O'Brien NM (2016) Nutritional Aspects of Cheese. U: Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH (ured.) *Fundamentals of Cheese Science*, 2. izd., Springer, New York, str. 715-730. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Oliveira NMD, Machado J, Chéu MH, Lopes L, Criado MB (2024) Therapeutic Potential of Olive Leaf Extracts: A Comprehensive Review. *Applied Biosciences* **3(3)**, 392-425. <https://doi.org/10.3390/applbiosci3030026>
- Omar SH (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm* **78(2)**, 133-154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>
- Perko B (2015) Najnovija dostignuća u proizvodnji sira. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević B, ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 133-148.
- Petrović D (2017) Proteoliza i promjene teksture sira iz mišine tijekom zrenja (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*, 3. izd., Springer, London/New York.
- 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 1. listopada 2024.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53(10)**, 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Prudencio ID, Prudêncio ES, Gris EF, Tomazi T, Bordignon-Luiz MT (2008) Petit suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. *LWT-Food Sci. Technol.* **41(5)**, 905–910. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.019>
- Ramirez C, Peters K (2018) *Extraction Techniques for Food Processing*, ED-Tech Press, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 6-7.
- Sagar NA, Pareek S, Sharma S, Yahia EM, Lobo MG (2018) Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Compr Rev Food Sci F* **17(3)**, 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Şahin S, Bilgin M (2018) Olive Tree (*Olea Europaea L.*) Leaf as a Waste By-product of Table Olive and Olive Oil Industry: A Review. *J Sci Food Agric* **98(4)**, 1271–1279. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8619>
- Sánchez-Gamboa C, Hicks-Pérez L, Gutiérrez-Méndez N, Heredia N, García S, Nevárez-Moorillón GV (2018) Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods* **7(9)**, 153. <https://doi.org/10.3390/foods7090153>
- Sardiñas-Valdés M, García-Galindo HS, Chay-Canul AJ, Velázquez-Martínez JR, Hernández-Becerra JA, Ochoa-Flores AA (2021) Ripening Changes of the Chemical Composition, Proteolysis, and Lipolysis of a Hair Sheep Milk Mexican Manchego-Style Cheese: Effect of Nano-Emulsified Curcumin. *Foods* **10(7)**, 1579. <https://doi.org/10.3390/foods10071579>

Selim S, Albqmi M, Al-Sanea MM, Alnusaire TS, Almuhayawi MS, AbdElgawad H i sur. (2022) Valorizing the usage of olive leaves, bioactive compounds, biological activities, and food applications: A comprehensive review. *Front Nutr.* **9**, 1008349. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1008349>

Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H (2011) Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *J Med Food* **14(3)**, 284-290. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0009>

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Silvestrini A, Giordani C, Bonacci S, Giuliani A, Ramini D, Matakchione G i sur. (2023) Anti-Inflammatory Effects of Olive Leaf Extract and Its Bioactive Compounds Oleacin and Oleuropein-Aglycone on Senescent Endothelial and Small Airway Epithelial Cells. *Antioxidants (Basel)* **12(8)**, 1509. <https://doi.org/10.3390/antiox12081509>

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

Tavakoli H, Hosseini O, Jafari SM, Katouzian I (2018) Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *J Agr Food Chem* **66(35)**, 9231-9240. doi:10.1021/acs.jafc.8b02759

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

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

Vodič (2009) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/vodic-za-mikrobioloske-kriterije-za-hranu.pdf> Pristupljeno 10. rujna 2024.

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

Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ i sur. (2017) Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci* **18(1)**, 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>

Zakon (2022) Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 83, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022_07_83_1248.html Pristupljeno 10. rujna 2024.

Zandona E, Vranković L, Pedisić S, Vukušić Pavičić T, Dobrinčić A, Marušić Radovčić N i sur. (2024) Production of Acid and Rennet-Coagulated Cheese Enriched by Olive (*Olea europaea L.*) Leaf Extract - Determining the Optimal Point of Supplementation and Its Effects on Curd Characteristics. *Foods* **13(4)**, 616. <https://doi.org/10.3390/foods13040616>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Nicole Madunic 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