

# Utjecaj dodatka ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka

---

Lovrić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:043196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 24. rujna 2018.

Katarina Lovrić

965/USH

**UTJECAJ DODATKA  
EKSTRAKATA MAJČINE DUŠICE  
I CVJETOVA BAZGE NA  
SVOJSTVA I TRAJNOST  
SVJEŽEG SIRA OD SIROVOG  
MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda i Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom *dr. sc. Irene Barukčić*, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uz pomoć *doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakobović* i *dr. sc. Maje Repajić* te tehničke suradnice *Snježane Šimunić*.

## *Zahvala*

*Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ireni Barukčić na vodstvu, strpljenju, susretljivosti i izuzetnoj suradnji tijekom izrade rada, na nesebičnoj pomoći te svakom savjetu i dobronamjernoj kritici.*

*Isto tako, hvala i doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović, dr. sc. Maji Repajić, tehničkoj suradnici Snježani Šimunić te mag. Goranu Bosancu koji su sudjelovali u izradi ovog rada, a kojima se ujedno zahvaljujem na razumijevanju, pristupačnosti, izdvojenom vremenu te brojnim pruženim stručnim i prijateljskim savjetima.*

*Zahvaljujem svim profesorima i asistentima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na nesebičnom prenošenju vlastitog znanja i iskustava.*

*Na kraju, želim se zahvaliti kolegama, prijateljima i svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tokom svih godina studiranja.*

# 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

## UTJECAJ DODATKA EKSTRAKATA MAJČINE DUŠICE I CVJETOVA BAZGE NA SVOJSTVA I TRAJNOST SVJEŽEG SIRA OD SIROVOG MLIJEKA

Katarina Lovrić, 965/USH

**Sažetak:** Trajnost svježeg sira proizvedenog od sirovog mlijeka je vrlo kratka i može se reći da je riječ o dnevnom proizvodu. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati hoće li se dodatkom vodenih ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge produljiti trajnost svježeg sira. Svježi sir je proizveden od sirovog mlijeka iz mljekomata, a fizikalno-kemijska, mikrobiološka i senzorska analiza su provedene određene dane čuvanja. Vodeni ekstrakti majčine dušice i cvjetova bazge su dobiveni visokotlačnom tekućinskom ekstrakcijom (eng. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) pri temperaturi od 160 °C, statičkom vremenu od 5 minuta kroz 3 ciklusa, a u mlijeko su dodani u koncentraciji od 2 % i 5 % (v/v). Na temelju mikrobiološke i senzorske analize, može se zaključiti kako su najbolji rezultati postignuti kod svježeg sira s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice.

**Ključne riječi:** svježi sir, trajnost, PLE, majčina dušica, bazga

**Rad sadrži:** 71 stranica, 15 slika, 15 tablica, 80 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Irena Barukčić,

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

dr. sc. Maja Repajić, asistent

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Verica Dragović Uzelac
2. Doc.dr.sc. Irena Barukčić
3. Doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović
4. Prof.dr.sc. Ksenija Markov (zamjena)

**Datum obrane:** 24. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Technology of Milk and Dairy Products**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **THE EFFECT OF THYME AND ELDERFLOWER EXTRACT ADDITION ON THE PROPERTIES AND SHELF LIFE OF FRESH CHEESE FROM RAW MILK**

Katarina Lovrić, 965/USH

**Abstract:** The shelf life of fresh cheese produced from raw milk is very short and it can be said that it is a daily product. Therefore, the aim of this thesis was to examine whether the addition of water extract of thyme and elderflower will extend the shelf life of fresh cheese. Fresh cheese was produced from raw milk purchased at vending machines, and physico-chemical, microbiological and sensory analysis were determined for certain storage days. The water extracts of thyme and elderflower were produced by pressurized liquid extraction (PLE) at the temperature of 160 °C, static time of 5 minutes over 3 cycles and were added in milk at the concentration of 2 % and 5 % (v/v). Based on microbiological and sensory analysis, it can be concluded that the best results were achieved by adding of thyme extract in the fresh cheese in the quantity of 2 %.

**Keywords:** fresh cheese, shelf life, PLE, thyme, elderflower

**Thesis contains:** 71 pages, 15 figures, 15 tables, 80 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Irena Barukčić, Assistant professor

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

PhD. Maja Repajić, Assistant

#### **Reviewers:**

1. PhD. Verica Dragović Uzelac, Full Professor
2. PhD. Irena Barukčić, Assistant Professor
3. PhD. Katarina Lisak Jakopović, Assistant Professor
4. PhD. Ksenija Markov, Full Professor (substitute)

**Thesis defended:** 24<sup>th</sup> September 2018.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Mlijeko .....	2
2.2. Svježi sir.....	2
2.2.1. Proizvodnja svježeg sira od sirovog mlijeka .....	3
2.2.2. Industrijska proizvodnja svježeg sira .....	4
2.3. Mikrobiološka kvaliteta .....	5
2.4. Upotreba biljnih ekstrakata u prehrambenoj industriji .....	8
2.4.1. Fenolni spojevi .....	10
2.4.2. Antioksidansi .....	11
2.4.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz hrane .....	11
2.4.3.1. Visokotlačna tekućinska ekstrakcija ( <i>Pressurized Liquid Extraction, PLE</i> ) .....	12
2.4.4. Majčina dušica ( <i>Thymus serpyllum L.</i> ).....	14
2.4.5. Bazga ( <i>Sambucus nigra L.</i> ) .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI .....	18
3.2. METODE RADA.....	18
3.2.1. Proizvodnja svježeg sira .....	18
3.2.2. Fizikalno-kemijske metode .....	19
3.2.2.1. Određivanje gustoće mlijeka .....	19
3.2.2.2. Određivanje pH vrijednosti mlijeka i sira.....	19
3.2.2.3. Određivanje titracijske kiselosti mlijeka i sira.....	20
3.2.2.4. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku .....	21
3.2.2.5. Određivanje udjela laktoze u mlijeku .....	22
3.2.2.6. Određivanje udjela proteina u mlijeku.....	24
3.2.2.7. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku .....	26
3.2.3. Priprema ekstrakata suhog cvijeta bazge i majčine dušice .....	27
3.2.3.1. Visokotlačna tekućinska ekstrakcija (PLE) .....	27
3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola u vodenim ekstraktima majčine dušice i cvjetova bazge.....	29
3.2.3.3. Određivanje ukupnih fenola u svježim sirevima .....	32
3.2.4. Određivanje indeksa boje .....	32
3.2.5. Mikrobiološke analize .....	34
3.2.5.1. Priprema hranjivih podloga .....	35
3.2.5.2. Priprema fiziološke otopine.....	36
3.2.5.3. Priprema 2 %-tne otopine natrij citrata.....	36
3.2.5.4. Priprema uzorka svježeg sira .....	37
3.2.5.5. Priprema decimalnih razrjeđenja .....	37
3.2.5.6. Nacjeppljivanje i inkubacija ploča.....	38
3.2.6. Senzorske analize .....	39
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>43</b>
4.1. Rezultati fizikalno-kemijske analize .....	44



4.2. Rezultati mikrobiološke analize .....	50
4.3. Rezultati senzorske analize .....	57
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>64</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>65</b>



# 1. UVOD

Domaći svježi sir se tradicionalno proizvodi spontanom grušanjem sirovog, termički neobrađenog kravljeg mlijeka, koji se prodaje isključivo na tržnicama (Kirin, 2009). Najvažnija razlika između industrijske i tradicionalne proizvodnje svježeg mekog sira je upotreba sirovog, termički neobrađenog mlijeka u tradicionalnoj proizvodnji. S obzirom na izostanak termičke obrade, autohtona mikroflora mlijeka uvjetuje specifične karakteristike sira (Sabljak i sur., 2013).

Mikrobiološka ispravnost tradicionalno proizvedenog sira vrlo često ne zadovoljava uvjete propisane Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13) posebice zbog prisutnosti koliformnih bakterija, stafilokoka, enterobakterija te kvasaca i plijesni. Na temelju mikrobiološke analize 12 uzoraka svježih sireva s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava iz okolice Zagreba, zaključeno je da je trajnost ovog sira svega jedan dan (Sabljak i sur., 2013).

Zbog zabrinutosti potrošača glede sigurnosti konzervansa, pozornost je usmjerena na razvoj prirodnih načina produljenja trajnosti u svrhu održavanja kvalitete hrane. Posebna je pažnja usmjerena na potencijalne primjene prirodnih ekstrakata iz biljaka. Biljni ekstrakti imaju potencijal kao prirodni konzervansi budući da se njihovom primjenom smanjuje broj patogena iz hrane i povećava inhibicija lipidne oksidacije (Shan i sur., 2011). Bazga i majčina dušica su ljekovite biljke kojima se zbog visoke koncentracije fenolnih spojeva pripisuje antimikrobno djelovanje naspram neželjenih, no čestih kontaminanta svježih sireva poput *C. albicans*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* ili *Salmonella* spp. (Ereš, 2010; Gaić, 2011).

Upravo iz navedenih razloga, cilj ovog rada bio je ispitati hoće li se dodatkom određene količine ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge produljiti trajnost tradicionalno proizvedenog svježeg sira.

Usporedbom dobivenih rezultata mikrobiološke analize s važećim Zakonom (NN 81/13) odredit će se broj dana kod kojih trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka s dodatkom ekstrakata zadovoljava uvjete Zakona. Također, senzorskom analizom odredit će se prihvatljivost proizvedenih sireva.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. MLJEKO**

Prema Pravilniku o mlijeku i mliječnim proizvodima (NN 64/17), sirovo mlijeko (kravlje, ovčje, kozje i bivolje) je prirodni sekret mliječne žlijezde dobiven jednom ili više mužnji zdravih životinja, kojemu ništa nije dodano ili oduzeto, koje nije zagrijavano na temperaturu veću od 40 °C niti je bilo podvrgnuto nekom drugom postupku koji ima isti učinak, a namijenjeno je konzumaciji kao tekuće mlijeko ili mlijeko za daljnju obradu, odnosno preradu.

Sirovo mlijeko mora potjecati od životinja u laktaciji kod kojih je od poroda prošlo minimalno osam dana ili je do poroda najmanje trideset dana. Mora imati svojstven izgled, boju i miris zavisno od vrste životinje od koje potječe. Sirovo mlijeko ne smije sadržavati rezidue ili druge kontaminante u količinama većim od najvećih dopuštenih, ostatke nedopuštenih tvari, detergente i druge tvari koje mogu imati štetan učinak za zdravlje ljudi ili koje mijenjaju organoleptička svojstva mlijeka (Pravilnik, 2017b).

Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17), mlijeko mora udovoljavati sljedećim zahtjevima kakvoće:

- da sadrži najmanje 3,0 %, a najviše 5,5 % mliječne masti,
- da sadrži najmanje 2,5 %, a najviše 4 % bjelančevina,
- da sadrži najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti,
- da mu je gustoća od 1,028 do 1,034 g/cm<sup>3</sup> na temperaturi od 20 °C,
- da mu je kiselinski stupanj od 6,6 do 6,8 °SH, a pH vrijednost od 6,5 do 6,7,
- da mu točka leđišta nije viša od -0,517 °C te
- da ima negativnu reakciju na alkoholnu probu sa 72 % etilnim alkoholom.

### **2.2. SVJEŽI SIR**

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina.

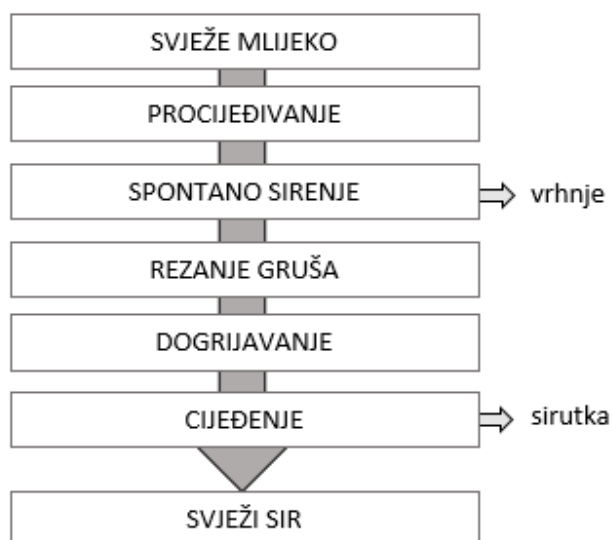
Prema tom Pravilniku, svježim sirom se podrazumijeva sir čiji je udio vode u bezmasnoj suhoj tvari 69-85 %. Osim visokog udjela vode, karakterizira ga i nizak udio mliječne masti u suhoj tvari. Boja mu je mliječno-bijela do žućkasta, konzistencija ravnomjerno mekana, a

okus i miris blago kiselkast. Sastav domaćeg sira je prilično neujednačen i na njega se ne može bitnije utjecati jer je uvjetovan načinom izrade i opremom koja se koristi. Zbog toga nastaju veće razlike u organoleptičkim osobinama i kvaliteti domaćeg svježeg sira (Kirin, 1980). Bitno je istaknuti da se u proizvodnji može koristiti samo sirovo mlijeko potpuno zdravih krava koje mora zadovoljiti zahtjeve propisane za fizikalno-kemijsku i mikrobiološku kakvoću (Markov i sur., 2009).

Proizvodnja svježeg sira zasniva se na spontanom postepenom zakiseljavanju sirovog kravljeg mlijeka do pH vrijednosti izoelektrične točke kazeina (pH 4,6). Stoga dobiveni sir pripada skupini kiselinskih sireva (Kirin, 2009).

### 2.2.1. Proizvodnja svježeg sira od sirovog mlijeka

Svježe pomuzeno mlijeko se procijedi preko gaze u visoke staklene ili plastične posude i ostavlja se da spontano kiseli na prohladnom mjestu. Sirenje, odnosno grušanje mlijeka, se provodi 36-48 sati (Kirin, 1980). Nakon formiranja gruša, izdvojeno vrhnje na površini se obere, a gruša se dogrijava na rubu štednjaka 2-3 sata (do pojave svijetle sirutke). Radi boljeg izdvajanja sirutke gruša se prije dogrijevanja može izrezati na kockice. Zatim se gruša prenese u cjediljke, zdjelice s gazom ili sirarske vrećice, koje služe za cijedenje gruša. Nakon toga se čuva do potrošnje ili prodaje na hladnom (Kirin, 2009). Tradicionalni način proizvodnje (slika 1) je prilično dugotrajan i zahtijeva mnogo rada i iskustva, što sve skupa uvjetuje neujednačenost kvalitete (Kirin 1980).



**Slika 1.** Tehnološki proces tradicionalne proizvodnje svježeg sira

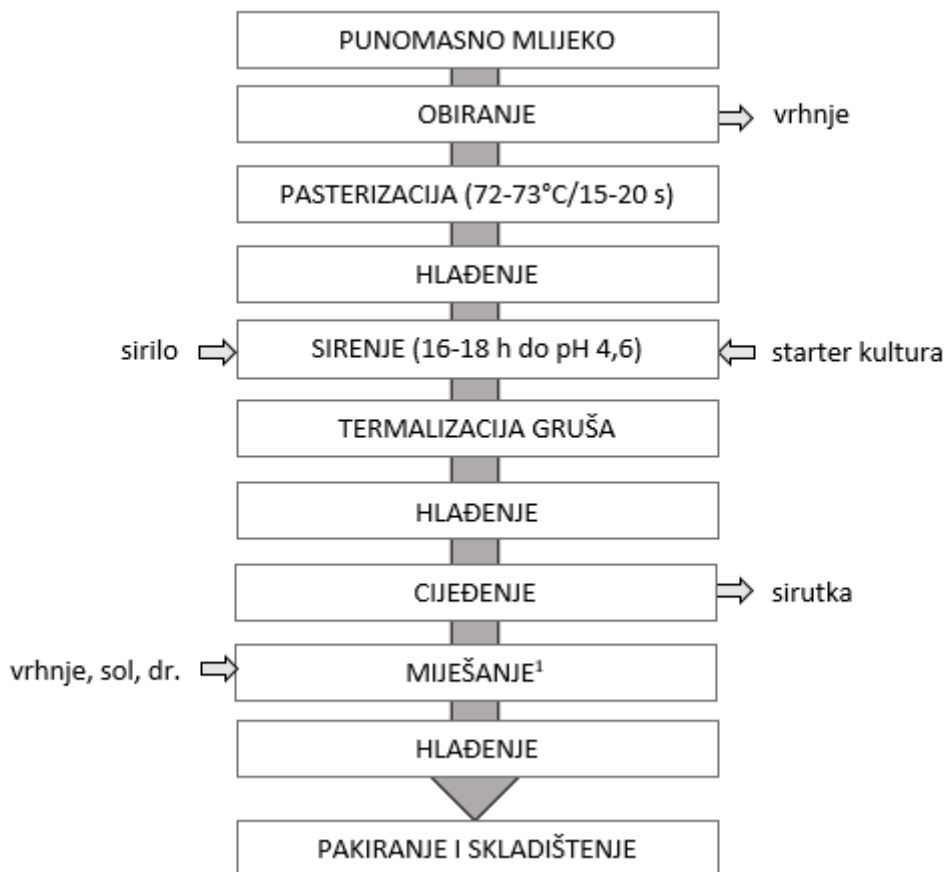
### 2.2.2. Industrijska proizvodnja svježeg sira

U industrijskoj proizvodnji (slika 2) se upotrebljava pasterizirano obrano mlijeko, za razliku od tradicionalne proizvodnje svježeg sira u kojoj se koristi sirovo termički neobrađeno mlijeko. Pasterizacija je proces tretiranja namirnice temperaturom nižom od 100 °C, koji se primjenjuje u svrhu uništenja patogenih mikroorganizama i smanjenja opasnosti proizvoda po zdravlje, a izaziva minimalne kemijske, fizikalne i/ili organoleptičke promjene proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012).

U industrijskoj proizvodnji svježeg sira se uglavnom dodaje mala količina enzimskog preparata, kako bi se poboljšala struktura nastalog kiselog gruša te postigla bolja sposobnost otpuštanja sirutke (Havranek i sur., 2014).

Obrano mlijeko se najprije pasterizira u izmjenjivačima topline pri 72-73 °C/15-20 sekundi, a zatim se hladi. Potom se tako pasterizirano i ohlađeno obrano mlijeko podsirava djelovanjem mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline uz dodatak male količine sirila do oblikovanja čvrstog gruša pri pH oko 4,6. Sirenje se provodi u zatvorenim spremnicima ili otvorenoj kadi pri 25-28 °C kroz 16-18 sati. Nastali gruš se zatim termalizira u izmjenjivaču topline pri temperaturi 56-60 °C do 3 minute, hladi na 37 °C i prebacuje u centrifugalni separator gdje se odvaja sirutka. Gruš se tada hladi u pločastom hladnjaku te prebacuje preko puferskog spremnika u uređaj za pakiranje. Završno hlađenje gruša ovisi o količini suhe tvari, odnosno o količini proteina. Pri 16-19 % suhe tvari sir se hladi na 8-10 °C, a sir s 19-20 % suhe tvari može biti ohlađen na 11-12 °C. Hlađenje se može provesti i preko cijevnog izmjenjivača topline, ali on je neekonomičan za mali kapacitet proizvodnje jer se tada veća količina gruša zadrži pri hlađenju što rezultira znatnim gubicima (Kirin, 2016).

Prednost industrijske proizvodnje svježeg sira je mogućnost standardizacije pojedinih sastojaka čime se dobiva svježiji sir ujednačenijeg kemijskog sastava i senzorskih karakteristika. Također, industrijski proizveden sir je uglavnom bolje mikrobiološke kvalitete (Tratnik i Božanić, 2012).



**Slika 2.** Tehnološki proces industrijske proizvodnje svježeg sira

### 2.3. MIKROBIOLOŠKA KVALITETA

Mikroorganizmi mogu izazvati raznovrsne poteškoće u mljekarstvu ako se pojavljuju nekontrolirano, odnosno ondje gdje nisu potrebni. Zato je osiguranje besprijekornih higijenskih uvjeta u proizvodnji i preradi mlijeka temeljni preduvjet dobivanja kvalitetnih i mikrobiološki ispravnih mliječnih proizvoda (Božanić i sur., 2010).

Sirovo mlijeko koje se koristi za proizvodnju svježeg sira mora zadovoljavati domaće i europske kriterije kvalitete sirovog mlijeka koje se koristiti za proizvodnju mliječnih proizvoda bez toplinske obrade mlijeka (Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13), Uredba (EZ) 2073/2005).

Mlijeko i mliječni proizvodi, zbog svog kemijskog sastava, predstavljaju izvanrednu hranjivu podlogu za rast i razmnožavanje mikroorganizama. U većini slučajeva mikroorganizmi uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda nemaju štetan utjecaj na

<sup>1</sup> Proizvedeni svježi sir može se miješati s vrhnjem ili punomasnim sirom da bi se postigao zadani udio mliječne masti za krem sir ili sirni namaz te se može soliti ili miješati s nekim povrćem ili voćem.

ljudsko zdravlje. Međutim, prisutnost te skupine mikroorganizama u većoj ili manjoj mjeri uvijek umanjuje kvalitetu proizvoda te je uzrokom značajnih ekonomskih gubitaka. Umanjena kvaliteta je posljedica prisutnosti različitih kemijskih i biokemijskih spojeva koji mijenjaju izgled, miris, teksturu, okus i aromu proizvoda. Redovita kontrola i identifikacija mikroorganizama uzročnika kvarenja u mljekarskoj industriji značajno doprinosi poboljšanju kvalitete proizvoda i povećanju dobiti (Samaržija i sur., 2007b).

Na temelju prosječnog broja mikroorganizama mlijeko se razvrstava u razrede prikazane tablicom 1 (Pravilnik, 2017b).

**Tablica 1.** Razvrstavanje sirovog mlijeka u razrede (Pravilnik, 2017b)

Razred	Broj mikroorganizama mL <sup>-1</sup>	Broj somatskih stanica
I	≤ 100.000	≤ 400.000
II	> 100.000	> 400.000

Mezofilne bakterije mliječne kiseline (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*) prirodna su i poželjna mikroflora svježeg tradicionalnog sira (Tratnik i Božanić, 2012). Međutim, zbog neprovođenja termičkog tretmana, ovaj sir može sadržavati i mnoge druge, nepoželjne mikroorganizme čije su dozvoljene količine propisane Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13) te Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2009).

Najčešći kontaminanti domaćeg svježeg sira su bakterije *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella* sp. Mikrobiološka kvaliteta tih proizvoda može biti upitna i zbog nedopuštenog broja kvasaca i plijesni, koji predstavljaju najbrojniju mikrofloru domaćeg svježeg sira (Kirin, 1980).

*Escherichia coli* je štapičasta Gram-negativna bakterija koja može biti prisutna u hrani i vodi i njena prisutnost je indikator fekalnog onečišćenja (Markov i sur., 2009), a njen najpatogeniji soj je *E. coli* O157:H7 koji uzrokuje hemolitički uremički sindrom. Prisutnost ove bakterije u hrani je posljedica kontaminacije sirovina kao što su meso, mlijeko, voće i povrće (Bolton i sur., 2000).

*Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna, katalaza pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija. Smatra se najopasnijim ljudskim patogenom, a ima sposobnost stvaranja



enterotoksina, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog gruša. U mlijeku i mliječnim proizvodima je *S. aureus* najčešće prisutan zbog toga što u više od 90 % slučajeva uzrokuje klinički i supklinički mastitis muznih životinja (Markov i sur., 2009). Vautor i suradnici (2003) su u svojim istraživanjima potvrdili kontaminaciju sireva proizvedenih od sirovog mlijeka bakterijom *S. aureus* zbog infekcije vimena. Također, u istraživanjima Samaržije i suradnika (2007a) 54 % uzoraka sireva bilo je pozitivno na prisutnost *S. aureus*, što autori objašnjavaju korištenjem mastitičnog mlijeka kao glavnim uzrokom prisutnosti te bakterije.

*Salmonella* sp. je Gram-negativna, nespороgenа, fakultativno anaerobna bakterija koja ima sposobnost kretanja pomoću flagela. Kod ljudi uzrokuje tri tipа bolesti – enteralne groznice, septikemije i gastroenteritise. Gotovo svi predstavnici roda *Salmonella* potencijalno su patogeni, а njihovo prirodno stanište je probavni sustav životinja, naročito peradi i goveda. Oko 95 % salmonela se prenosi hranom, а izvor infekcija mogu biti voda, mlijeko i mliječni proizvodi, jaja, rakovi, školjke i mesni proizvodi. Do kontaminacije mlijeka može doći tijekom prerade i rukovanja, а najveću opasnost predstavljaju nepasterizirano mlijeko, sladoled i sir (Cox, 2000).

Kvasci i plijesni ne preživljavaju pasterizaciju, а izolirani iz gotovog proizvoda uglavnom su posljedica naknadne kontaminacije (Sobota Šalamon i sur., 2010). Kvasci predstavljaju važnu skupinu kontaminanata, ponajviše u proizvodima s niskim udjelom soli kao što su krem sir i svježi sir. To su nepatogeni organizmi koji za razliku od plijesni ne produciraju toksine. U siru mogu biti uzročnici pojave nepoželjnog okusa te promjene u boji i teksturi (Hui i sur., 2004).

Prema navedenom Zakonu (81/13) u svježem siru od sirovog mlijeka ne smije biti prisutna *Salmonella* sp. u 25 g uzorka, а granična dopuštena vrijednost za *Staphylococcus aureus* je  $10^5$  stanica u 1 g uzorka. U Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) su preporučene granične dopuštene vrijednosti – za svježi sir od sirovog mlijeka: *Escherichia coli*  $10^3$  stanica  $g^{-1}$ , *Staphylococcus aureus*  $10^3$  stanica  $g^{-1}$ , kvasci i plijesni  $10^3$  stanica  $g^{-1}$ . Enterobakterije ili crijevne bakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja, а njihova prisutnost u namirnicama indikator je slabe higijene tijekom pripreme i čuvanja namirnica (Markov i sur., 2009).

U istraživanju grupe autora Markov i sur. (2009), kriterijima mikrobiološke ispravnosti od ukupno 120 uzoraka svježeg sira i vrhnja sa zagrebačke tržnice, 64 uzorka (53 %) bila su

kontaminirana patogenim mikroorganizmima, od čega 16 % uzoraka svježeg sira i 37 % uzoraka vrhnja. Od 60 analiziranih uzoraka svježeg sira, 16,7 % bilo je kontaminirano bakterijom *S. aureus*, 16,7 % *E. coli* bakterijom, a 4 uzorka bila su pozitivna na rod *Listeria*. *Salmonella* sp. nije bila dokazana ni u jednom uzorku. Propisane standarde nije zadovoljavalo čak 65 % uzoraka svježeg sira, primarno zbog kontaminacije kvascima i plijesnima u rasponu vrijednosti od  $10^3$  do  $5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>.

*Listeria monocytogenes* je u približno 1 % slučajeva uzročnik bolesti zbog trovanja hranom, pa je listerioza kao bolest koja se prenosi hranom podcijenjena u odnosu na salmoneloze i kampilobakterioze. Međutim, važno je istaknuti da se listerioza svrstava u bolesti s najčešćim smrtnim ishodom koji se procjenjuje na oko 30 % (Vazquez-Boland i sur., 2001).

#### **2.4. UPOTREBA BILJNIH EKSTRAKATA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

Biljni ekstrakti se dobivaju postupkom odjeljivanja sastavnica pojedinih biljnih dijelova na temelju njihove različite topljivosti u otapalu. Mogu se koristiti u farmaciji, kozmetici te kao sirovine za proizvodnju aroma i začina ili dodataka prehrani. Ovisno o njihovoj uporabi podliježu i različitim zakonskim propisima.

Zbog zabrinutosti potrošača glede sigurnosti konzervansa, pozornost je usmjerena na razvoj prirodnih načina produljenja trajnosti u svrhu održavanja kvalitete hrane. Posebna je pažnja usmjerena na potencijalne primjene prirodnih ekstrakata iz biljaka (Shan i sur., 2011).

Bilje i začini se koriste u različitim oblicima u hrani i tradicionalnoj medicini zbog njihovog pozitivnog utjecaja na zdravlje, uključujući konzerviranje hrane, farmaceutiku, alternativnu medicinu i prirodne terapije (Alejandro i sur., 2011).

Bilje i začini sadrže esencijalna aromatska ulja koja pokazuju antimikrobnu aktivnost i doprinose aromi i okusu hrane, kao i fenolne spojeve, jedne od najvažnijih skupina prirodnih antioksidansa (Veeru i sur., 2009). U proizvodnji hrane, fenoli mogu smanjiti oksidaciju lipida i povećati stabilnost hrane. Brojne su studije pokazale antioksidativna svojstva mnogih biljaka i začina, ali je ukupni sadržaj svih fenolnih spojeva u mnogima od njih nepoznat zbog složenog i različitog kemijskog sastava. Istraživana je antimikrobna aktivnost biljnih i začinskih ekstrakata protiv različitih tipova mikroba, uključujući neke patogene koji se prenose hranom. Ipak, antibakterijska aktivnost mnogih začina još je uvijek nedovoljno istražena, kao i njihova antimikrobna aktivnost u stvarnom sustavu hrane (Shan i sur., 2011).

U studiji Shan i sur. (2011) je ispitivana antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata cimeta, origana, klinčića, kore šipka te sjemenki grožđa protiv bakterija *Listeria*

*monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enterica* u siru pri sobnoj temperaturi. Dodatkom ovih ekstrakata povećala se stabilnost sira protiv oksidacije lipida. Klinčić je pokazao najveću antibakterijsku i antioksidativnu aktivnost.

U istraživanju Mostafa i sur. (2017) je ispitivana aktivnost etanolnih ekstrakata nara, klinčića, đumbira, timijana i kumina protiv bakterijskih sojeva *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhi*. Osim kumina, svi navedeni ekstrakti su bili potencijalno djelotvorni s promjenjivom učinkovitošću protiv testiranih bakterijskih sojeva. Ekstrakt kumina bio je učinkovit samo protiv *S. aureus*, a najučinkovitijim su se pokazali ekstrakti nara i klinčića.

U istraživanju Josipović i sur. (2015) se ispitivalo poboljšanje svojstava i mikrobiološke ispravnosti svježeg sira s dodatkom začina – svježeg i sušenog peršina, kopra, paprike, češnjaka i ružmarina. Suhi ružmarin je pokazao najveći antioksidacijski i antibakterijski učinak zbog velikih udjela kavene i ružmarinske kiseline, kao i flavona te fenolnih diterpena. Ispitivanjem *in vitro* i *in situ* je utvrđeno da biljni etanolni ekstrakti učinkovito smanjuju broj patogenih bakterija, poput *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*, te da mogu poslužiti kao prirodni konzervansi i antioksidansi.

Studija Bleoancă i sur. (2016) pokazala je kako se ekstrakt majčine dušice može koristiti u kombinaciji s visokim tlakom kako bi se inaktivirala *L. monocytogenes* u svježem siru. Dokazana je ubrzana inaktivacija kada je visoki tlak bio kombiniran s dodatkom ekstrakta majčine dušice, nego li kada je djelovao samo visoki tlak. Sukladno tome, ukoliko se koristi ekstrakt majčine dušice, moguće je namirnicu tretirati tlakom manjeg intenziteta kako bi se postigao isti učinak kao i tretiranjem samo visokim tlakom, a budući da visoki tlak negativno utječe na strukturu svježeg sira, kombiniranjem s ekstraktima taj je nedostatak moguće umanjiti.

U završnom radu Maje Ereš (2010), izrađenom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, ispitivao se utjecaj ekstrakata bazge i majčine dušice na rast patogenog kvasca *Candida albicans*. Istraživanja su provedena s uzorcima majčine dušice te cvijeta kultivirane i samonikle bazge ubranih na različitim geografskim područjima Republike Hrvatske, a inhibicija rasta kvasca odabranim ekstraktima je istraživana primjenom turbidimetrijske metode. Rezultati su pokazali da upotrijebljeni ekstrakti pokazuju inhibitorno djelovanje na rast kvasca *Candida albicans*, međutim brzina i jačina antimikrobnog djelovanja ovisi o različitoj koncentraciji ukupnih fenola.

U diplomskom radu Petra Gaića (2011), također izrađenom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, istraživala se inhibicija rasta patogenih

mikroorganizama (*Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*) pomoću ekstrakata cvjetova samonikle bazge ubranih na različitim geografskim područjima Republike Hrvatske. Rezultati su pokazali da svi ekstrakti samonikle bazge sadrže veću koncentraciju ukupnih fenola od ekstrakta kultivirane bazge, a na osnovi rezultata turbidimetrijske metode je zaključeno da svi ekstrakti bazge pokazuju određenu antimikrobnu aktivnost prema svim odabranim patogenim bakterijama.

Navedena istraživanja pokazuju kako biljni ekstrakti imaju potencijal kao prirodni konzervansi hrane budući da se njihovom primjenom smanjuje broj patogena iz hrane i povećava inhibicija lipidne oksidacije (Shan i sur., 2011). Mogu se koristiti kao prirodne alternative prevencije za kontrolu bolesti uzrokovanih trovanjem hrane i očuvanje hrane što sprječava opasnosti od primjene kemijskih i antimikrobnih sredstava (Mostafa i sur., 2017).

#### **2.4.1. Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksilna skupina direktno vezana na benzenski ili aromatski prsten, uz prisutne druge supstituente. To su sekundarni biljni metaboliti potrebni za normalan rast i razvoj (Hudec i sur., 2006). Podijeljeni su u grupe prema broju fenolnih prstenova i po strukturnim elementima koji povezuju te prstenove, a prema osnovnoj kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide (Han i sur., 2007).

Fenolni spojevi sudjeluju u mnogim važnim biokemijskim procesima tijekom zrenja i dozrijevanja, a u samim biljkama djeluju antioksidacijski, antimikrobno te kao fotoreceptori. Znatno utjecaj imaju i na boju, okus i miris hrane, obzirom da su uključeni u nastajanje tvari boje, formiranja okusa i arome svojstvene svakoj pojedinoj vrsti voća i njihovim proizvodima. Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama značajno utječu parametri okoliša kao što su svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja, obrade i prerade (Brglez Mojzer i sur., 2016).

Fenolni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske metode su jednostavnije i praktičnije, a za određivanje ukupnih fenola najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni (Tsao, 2010).

### **2.4.2. Antioksidansi**

Antioksidansi su kemijske tvari koje sprječavaju oksidaciju spojeva podložnih oksidaciji, a u biološkim sustavima onemogućuju djelovanje slobodnih radikala kad su u štetnom suvišku, tj. kad je koncentracija slobodnih radikala veća nego što je potrebno za odvijanje normalnih fizioloških procesa. Antioksidansi inaktiviraju djelovanje slobodnih radikala pa tako zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Osim što sprječavaju neželjene procese oksidacije, antioksidansi mogu doprinjeti smanjenju oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala (Halliwell, 1990).

Slobodni radikali su molekule koje imaju nespareni elektron i stoga su izuzetno reaktivni. Razlike u fizikalnim i kemijskim svojstvima antioksidanasa i slobodnih radikala uvjetuju različite mehanizme stupanja u reakcije, te su stoga razvijene različite metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta: metode koje se temelje na prijenosu protona te metode koje se temelje na prijenosu elektrona. Neke se metode ne mogu klasificirati niti u jednu od navedenih dviju skupina metoda iz razloga što u reakciji mogu djelovati putem oba mehanizma (Jimenez i sur., 2004). U ovu skupinu metoda ubraja se DPPH metoda za koju se smatra da se bazira na prijenosu elektrona, dok se prijenos protona zbiva tek kao popratna reakcija (Foti i sur., 2004; Huang i sur., 2005).

### **2.4.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz hrane**

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog izdvajanja neke tvari iz uzorka pomoću otapala pri čemu dolazi do prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo, a tvar koja se ekstrahira mora u otapalu biti topljivija nego u polaznoj fazi (Wang i Weller, 2006). Ekstrakcija predstavlja bitan korak u izdvajanju biološki aktivnih komponenata iz različitih dijelova biljke. Pravilan odabir ekstrakcijske tehnike, kao i optimalnih uvjeta ekstrakcije važni su čimbenici koji će utjecati na prinos izoliranih bioaktivnih komponenata. Za ekstrakciju je važno odabrati učinkovito otapalo, pri čemu se moraju pratiti određeni parametri i karakteristike samog otapala poput polarnosti, temperature vrelišta, viskoznosti, stabilnosti na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi, ali i cijena (Albu i sur., 2004).

Tradicionalne tehnike ekstrakcije često podrazumijevaju korištenje velikih količina organskih otapala koje se smatraju toksičnim. Osim toga, te su tehnike u usporedbi s naprednim tehnikama ekstrakcije dugotrajne, relativno nižih iskorištenja te ekonomski manje opravdane obzirom na veći utrošak otapala i energije. Nasuprot tome, nove, naprednije i ekološki prihvatljivije ekstrakcijske tehnike kao što su visokotlačna tekućinska ekstrakcija

(*Pressurized Liquid Extraction*, PLE) i superkrična tekućinska ekstrakcija (*Supercritical fluid extraction*, SFE), zbog svojih prednosti dobivaju važnost i imaju sve veću primjenu u ekstrakciji prirodnih materijala (Miron i sur., 2011).

#### **2.4.3.1. Visokotlačna tekućinska ekstrakcija (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE)**

Visokotlačna tekućinska ekstrakcija (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE) (u nastavku: PLE) je automatizirana tehnika ekstrakcije koja primjenom povišene temperature i tlaka postiže brzo i učinkovito ekstrahiranje ciljanih spojeva iz analiziranog materijala. Najveća prednost ove metode nad konvencionalnom ekstrakcijom otapalom pri atmosferskom tlaku je to što otapalo ostaje u tekućem stanju iznad svoje temperature vrelišta. Povišen tlak i temperatura koji se koriste u PLE utječu na otapalo, uzorak i interakciju među njima (Yong Ju i Howard, 2003).

Visoka temperatura dovodi do bolje topljivosti analita, brže difuzije i slabljenja veza između otopine i matrice uzorka. Osim toga, viskoznost otapala i površinska napetost se smanjuju pri visokoj temperaturi povećavajući time prodiranje otapala u matricu (Mustafa i Turner, 2011). Visoki tlak omogućuje da otapalo ostane u tekućem stanju i iznad točke vrenja čime se ubrzava cjelokupni proces ekstrakcije. Također, visoki tlak omogućava prodiranje otapala dublje u matricu uzorka, pospješujući ekstrakciju analita iz pora matrice (Fontana i sur., 2015).

Topljivost različitih polifenolnih spojeva razlikuje se od spoja do spoja, a ovisi o raznim parametrima poput polariteta, veličine i karakteristika ekstrakcijskog medija. Karakteristike otapala mogu se mijenjati podešavanjem koncentracija upotrebljenih otapala ili pak temperature pri kojoj će se koristiti. Izbor samog otapala je od velike važnosti za iskorištenje same ekstrakcije. Voda i etanol su glavna otapala koja se koriste u PLE polifenola. Koristeći samo vodu mogu se izbjeći pravila i propisi za upotrebu organskih otapala kao sredstva za ekstrakciju. Osim toga, korištenjem 100 % vode uklanja se trošak samog etanola i procesni trošak isparavanja organskih otapala (Wijngaard i sur., 2012).

Temperaturni raspon koji se može koristiti za SWE (*Subcritical water extraction* – PLE u kojoj se kao otapalo koristi 100 % voda) varira od točke vrenja (100 °C) vode do kritične točke (374 °C). Kritični tlak vode je 218 bara, a tlak potreban za održavanje vode u kondenziranom obliku ovisi o primijenjenoj temperaturi: za 200 °C potreban je minimalni tlak od 1,5 MPa, a ekstrakcija na 300 °C zahtijeva minimalni tlak od 8,5 MPa. Termodinamička svojstva vode dramatično se mijenjaju kada je temperatura povećana, posebno dielektrična

konstanta. Dielektrične konstante koje su slične organskim otapalima kao što je metanol mogu se postići na 200 °C (Wijngaard i sur., 2012).

Proces ekstrakcije najčešće završi kroz 15-25 minuta, uz volumni utrošak otapala od 15-45 mL, pri temperaturama od 25 °C do 200 °C i tlakovima do 20 MPa (Mottaleb i Sarker, 2012).

PLE osigurava brzu i učinkovitu izolaciju fenolnih spojeva uz mogućnost korištenja vode kao otapala čime se osigurava čist i siguran ekstrakt. Od prije je poznato da PLE može biti učinkovita za ekstrakciju velikog broja ekoloških onečišćivača iz zemlje, plastike, životinja, biljaka i ljudskog tkiva, a u novije vrijeme se ova inovativna metoda počela uspješno koristiti za ekstrakciju prirodnih spojeva, kao što su alkaloidi, steroidi, fenoli i terpeni. U usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije, ova metoda ekstrakcije omogućuje visok stupanj automatizacije uz veće prinose ekstrakcije i kraće trajanje cijelog procesa (Jentzer i sur., 2014).

### ***Priprema uzorka za ekstrakciju***

Bolja efikasnost ekstrakcije zahtjeva što manju veličinu čestica (manju od 1 mm), stoga je priprema uzoraka važan korak za svaku ekstrakciju. Priprema uzoraka za PLE uključuje mljevenje ili usitnjavanje analita i homogenizaciju. Kako bi se spriječilo stvaranje aglomeriranih nakupina materijala, koji umanjuju efikasnost ekstrakcije jer mogu dovesti do zaštopavanja ekstrakcijske ćelije, uzorak je potrebno pomiješati s Ottawa pijeskom ili dijatomejskom zemljom koja apsorbira vlagu. Tako pripremljen uzorak, postavlja se u ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika koja se postavlja na odgovarajuće mjesto na rotirajućem dijelu unutar ASE (eng. *Accelerated Solvent Extraction*) uređaja (slika 3), gdje je moguće postaviti ukupno 24 ekstrakcijske ćelije (Zaghdoudi i sur., 2015) različitih volumena (1, 5, 10, 22, 34, 66 i 100 mL) (Mottaleb i Sarker, 2012).

### ***Proces ekstrakcije***

Nakon postavljanja ekstrakcijskih ćelija i podešavanja ekstrakcijskih parametara (tip otapala, statičko vrijeme ekstrakcije, broj ciklusa ekstrakcije, temperatura ekstrakcije), proces je u potpunosti automatiziran. Ćelija se zagrijava u peći, puni otapalom za ekstrakciju i tlači programirano zadano vrijeme (statičko vrijeme ekstrakcije). Otapalo koje se koristi za ekstrakciju može biti različitih polarnosti, ali odabir prvenstveno ovisi o analitu koji se ekstrahira. Po provedenom režimu ekstrakcije, ekstrakcijska ćelija ispire se sa strujom dušika

(30–90 s) kako bi se posve osušila, a dobiveni ekstrakt je profiltriran te sakupljen u staklene prihvatne boce. Svježe otapalo se uvodi zadani broj puta (broj ciklusa) s ciljem otapanja preostale količine neekstrahiranog željenog spoja. Primjena većeg broja ciklusa poželjna je za uzorke s velikom koncentracijom analita, a može se prilagoditi kraćem statičkom vremenu ekstrakcije kako bi se skratilo ukupno vrijeme ekstrakcije. Visoke temperature i tlakovi povećavaju prodiranje otapala u materijal i povećavaju topljivost analita, ubrzavajući ekstrakcijski proces kao i prinos ekstrahiranih spojeva. Obzirom da je nakon ekstrakcije materijal osušen, moguće je vršiti ponovljene ekstrakcije s istim ili različitim otapalom ili primjeniti sukcesivnu ekstrakciju koristeći otapala s rastućom polarnosti (Mottaleb i Sarker, 2012).



**Slika 3.** Sustav za visokotlačnu tekućinsku ekstrakciju (Dionex ASE 350) (A) i ekstrakcijske ćelije različitih volumena (B) (Anonymous 1, 2018)

#### 2.4.4. Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.)

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) pripada rodu *Thymus* koji pak pripada porodici *Lamiaceae* (*Labiatae*). Majčina dušica pretežito je rasprostranjena u sjevernoj i srednjoj Europi (Stahl-Biskup, 2012).

Majčina dušica (slika 4) je trajni puzeći grmić iz porodice usnatica (*Lamiaceae*). Stabljike mogu biti uspravne ili prilegnute, okrugle ili četverokutaste. Tanke su, guste, u donjem dijelu odrvenjele, a rastu do 20 cm visine. Listovi su unakrsno nasuprotni, sitni, dugi 4-6 mm, široki 2-4 mm te jako variraju u obliku. Najčešće su okruglasto jajoliki, na vrhu



zaokruženi, čitava ruba, kožnati, goli ili na rubovima osnove trepljasti, a nalaze se na kratkim peteljka. Cvjetovi su sitni, dvospolni, aromatični i ugodna mirisa, a smješteni su u okruglastim cvatovima na vrhovima ogranaka. Čine ih dvousnata, zvonasta čaška duga oko 4 mm koja ima trepljaste zupce. Vjenčić je dvousnat, svijetloružičast ili rjeđe bijeli, donja usna je trodijelna i srenji režanj je veći od bočnih. Prašnici i njuška tučka strše van cvjetova. Cvate od svibnja do rujna. Plod je kalavac koji se raspada na 4 okruglasta plodića (Anonymous 2, 2018).



**Slika 4.** Majčina dušica (Anonymous 3, 2018)

Raste samoniklo po suhim i sunčanim mjestima često u velikim skupinama. Nalazimo je uz rubove šuma i putova, na suhim obroncima, livadama, pašnjacima i na stjenovitim terenima planinskih područja oko 1700 m nadmorske visine. Izbjegava sjenovita i vlažna mjesta. Zbog dubokog korijena i kožastih listova vrlo dobro podnosi sušu (Anonymous 2, 2018).

Kemijski sastav majčine dušice uključuje 0,2-0,6 % eteričnog ulja, od čega 20-40 %, karvakrola te 1-5 % timola. Sadrži i manje količine monoterpena: p-cimena,  $\gamma$ -terpinena, borneola, bornil-acetata, 1,8-kineola, linalola, citrala, geraniola i drugih. Prisutni su tanini (posebno ružmarinska kiselina), flavonoidi, mineralne soli – željezo, mangan te triterpeni (uključujući oleinsku i ursolinsku kiselinu) (Stahl-Biskup, 2012).

Upotrebljava se najviše kao začim u kulinarstvu, a antimikrobna i antioksidacijska svojstva smatraju se dodatnim prednostima prilikom dodavanja u hranu. Mogućnost uspješnog istodobnog iskorištenja svih navedenih prednosti, ovisi o zahtjevima samog proizvoda, parametrima prerade te vještini proizvođača hrane. Antioksidativna aktivnost etanolnih i vodenih ekstrakata proizlazi upravo iz nestabilnih fenolnih komponenti, od kojih

ružmarinska kiselina ima najsnažnije djelovanje. Također, za antioksidativnu snagu odgovorni su i bifenilni spojevi (Stahl-Biskup, 2012).

#### **2.4.5. Bazga (*Sambucus nigra* L.)**

Bazga (*Sambucus nigra* L.) pripada rodu *Sambucus*, odnosno porodici *Caprifoliaceae* (slika 5). Pripadnici roda *Sambucus* su malena drvca, grmlja, raslinje. Listovi bazge su dugi do 30 cm, neparno perasto sastavljeni od 3-7 duguljastih, zašiljenih, neravno nazubljenih, slabo dlakavih, svijetlozelenih liski neugodnog mirisa. Cvjetovi su smješteni na dršku, snažnog mirisa, s 5 latica, zbijeni u bogatim, plosnato proširenim vršnim cvatovima – pašticama promjera 15-25 cm. Čaška je zelenkasta, prevučena voskom, s kratkom cijevi i bjelkastim zubićima. Vjenčić koturast, od 5 sraštenih latica, do 9 mm promjera, žutobjelkast do bijel. Ima 5 prašnika, antere svijetložute do bjelkaste, plodnicu dijelom podraslu, vrat kratak i debeo te trodijelnu njušku. Plodovi bazge su, botanički gledano, kuglaste, crnoljubičaste, sjajne i sočne koštuničave bobice, 5-6 mm široke, sa 3 smečkaste koštice i crvenim sokom. Pojedinačne bobice dolaze u visećim, otežalim pašticastim nakupinama (Grlić, 2005).



**Slika 5.** Bazga (Anonymous 4, 2018)

Raširena je u umjerenom i subtropskom području sjeverne hemisfere (Europa, Sjeverna Amerika, dijelovi Azije), ali postoji i na južnoj hemisferi. Bazga uspijeva u područjima gdje prosječna mjesečna temperatura u listopadu varira od 7,2 do 15 °C. U Hrvatskoj je raširena gotovo posvuda, a dopire do 1,401 m nadmorske visine. *Sambucus nigra* otporna je na zimsku hladnoću, podnosi do -29 °C u razdoblju mirovanja. Bazga cvate dosta kasno, od svibnja do kolovoza, stoga rijetko strada od proljetnih mrazova (Jemrić, 2007).

Kemijski sastav bazge uključuje oko 0,01 % esencijalnog ulja. Cvjetovi sadrže više fenolnih sastojaka od plodova i listova, a glavnu skupinu fenolnih komponenti čine derivati hidroksicinamične kiseline, od kojih je najvažnija klorogena kiselina. Od ostalih fenolnih sastojaka najzastupljeniji je rutin, a u ekstraktima cvijeta bazge pojavljuju se i kvarcetin,

izokvarcetin, kaempferol i izorhamnetin. Od flavanola su najzastupljeniji katehin, epikatehin i procijanidin trimer, a od flavanona naringenin. Bazga sadrži i tanine, invertni šećer, željezo, natrij i neobično visok sadržaj kalijevih soli (Młynarczyk i sur., 2018).

Cvjetovi bazge su korisni kod infekcija dišnih puteva te imaju antiupalna svojstva. Koriste se za ublažavanje alergijskog osipa, kod crijevnih problema, imaju laksativno i diuretično djelovanje. Plodovi imaju široku uporabu, a djeluju laksativno, diuretično, antiupalno, antivirusno, antioksidativno te antibakterijski. Služe i za liječenje sinusa, prehlade, reumatizma. Još je mnogo nedovoljno istraženih područja ljekovite primjene bazge, kao npr. da sok bazge može smanjiti koncentraciju kolesterola u serumu i povećati lipoproteine niske gustoće (LDL) (Pleša, 2012).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za proizvodnju svježeg sira je korišteno kravlje mlijeko iz mljekomata, a za pripremu vodenih ekstrakata su korištene osušena majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) i suhi cvjetovi bazge (*Sambucus nigra* L.) kupljeni u biljnoj drogeriji Suban (Perkovčeva 4, Samobor). Neposredno prije provedbe ekstrakcije, čajevi su samljeveni pomoću električnog mlinca (Grundig CM3260, Njemačka) u prah, a dobiveni prah je korišten za ekstrakciju fenolnih spojeva.

#### 3.2. METODE RADA

##### 3.2.1. Proizvodnja svježeg sira

Kravlje mlijeko je zagrijano na 28 °C te je dodana određena količina ekstrakta i kulture (Choozit MA 4002 LYO 25 DCU, Danisco, France). Volumen dodanog ekstrakta i količina dodane kulture prikazani su u tablici 2. Potom je stavljeno na koagulaciju u termostatu na temperaturu od 28 °C te je koagulacija trajala oko 10 sati. Izdvojeno vrhnje je obrano ručno, a koagulum je izrezan na kockice veličine 1 cm. Nakon rezanja, slijedilo je dogrijavanje u vodenoj kupelji pri temperaturi 65 °C kako bi se izdvojila sirutka. Potom je koagulum prebačen u cjedila kako bi se i ostatak sirutke u potpunosti ocijedio. Cijedenje je trajalo oko 20 sati nakon čega je sir čuvan u hladnjaku.

**Tablica 2.** Plan proizvodnje svježeg sira

Količina mlijeka (L)	Količina kulture (g)	Dodani ekstrakt	Količina ekstrakta		Oznaka sira
			%	(mL)	
1,5	0,015	-	-	-	<b>Kontrolni uzorak</b>
		Majčina dušica	2	30	<b>M2-1</b>
					<b>M2-2</b>
			5	75	<b>M5-1</b>
					<b>M5-2</b>
		Cvjetovi bazge	2	30	<b>B2-1</b>
					<b>B2-2</b>
			5	75	<b>B5-1</b>
					<b>B5-2</b>

### 3.2.2. Fizikalno-kemijske metode

#### 3.2.2.1. Određivanje gustoće mlijeka

Areometrom (laktodenzimetrom) se gustoća određuje po načelu Arhimedova zakona prema kojem svako tijelo uronjeno u tekućinu prirodno gubi od svoje težine onoliko koliko teži njime istisnuti dio tekućine (Božanić i sur., 2010).

*Aparatura i pribor:*

1. Menzura
2. Poklopac od Petrijeve ploče
3. Laktodenzimetar

*Postupak:*

Mlijeko se nalije do vrha menzure koja je položena u poklopac Petrijeve ploče. Potom se u mlijeko uroni laktodenzimetar tako da pliva u njemu. Kada se plutanje laktodenzimetra smiri, očita se gustoća te temperatura mlijeka. Skala laktodenzimetra je baždarena pri 20 °C, pa ukoliko se temperatura mlijeka razlikuje od 20 °C, provodi se korekcija:

$$T > 20 \text{ °C} \rightarrow \text{°L}_{\text{korigirani}} = \text{°L}_{\text{očitani}} + \{(\text{°C} - 20 \text{ °C}) \times 2\} \quad [1]$$

$$T < 20 \text{ °C} \rightarrow \text{°L}_{\text{korigirani}} = \text{°L}_{\text{očitani}} - \{(\text{°C} - 20 \text{ °C}) \times 2\} \quad [2]$$

#### 3.2.2.2. Određivanje pH vrijednosti mlijeka i sira

*Aparatura i pribor:*

1. pH-metar s ugrađenim termometrom (pH3110, WTW, Weilheim, Germany)
2. Laboratorijska čaša
3. Staničevina
4. Menzura
5. Električni grijač (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
6. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
7. Porculanski tarionik s tučkom

*Reagensi:*

1. Otopina KCl
2. Pufer za kalibraciju elektrode pH-metra
3. Destilirana voda

#### *Priprema uzorka svježeg sira:*

Uzorak svježeg sira se priprema na način da se sir pomiješa s prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom u omjeru 3:10 te se dobro homogenizira.

#### *Postupak:*

Elektroda pH-metra se kalibrira prema uputama proizvođača te se prije početka mjerenja ispire destiliranom vodom i suši staničevinom. Da bi se izmjerila pH vrijednost, elektroda se uranja u čašu s uzorkom mlijeka, odnosno sira, te se očitava pH vrijednost. Između svakog mjerenja elektroda se ispire destiliranom vodom, suši staničevinom te uranja u otopinu KCl-a i tako čuva do iduće upotrebe (Božanić i sur., 2010).

#### **3.2.2.3. Određivanje titracijske kiselosti mlijeka i sira**

Titracijska kiselost se određuje titracijom uzorka s otopinom NaOH određenog molariteta uz indikator fenolftalein. Ovisno o postupku određivanja, titracijska kiselost se izražava u različitim kiselinskim stupnjevima koji odgovaraju broju mL NaOH određenog molariteta utrošenih za neutralizaciju 100 ml mlijeka uz indikator fenolftalein. U ovom radu se titracijska kiselost mjerila po Soxhlet-Henkeli (Božanić i sur., 2010).

#### *Aparatura i pribor:*

1. Bireta za lužinu od 50 mL
2. Erlenmeyerove tikvice od 100 mL
3. Pipete od 20 mL
4. Pipete od 1 mL
5. Termometar
6. Električni grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
7. Staklena zrnca
8. Porculanski tarionik s tučkom
9. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

#### *Reagensi:*

1. 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH)
2. 2 %-tna alkoholna otopina fenolftaleina
3. 5 %-tna otopina kobaltovog sulfata ( $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )
4. Destilirana voda

*Priprema otopine kobaltovog sulfata:*

U odmjenoj tikvici od 100 mL se otopi 5 g  $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  u destiliranoj vodi i nadopuni se do oznake.

*Priprema uzorka mlijeka:*

U Erlenmeyerovu tikvicu se otpipetira 20 mL mlijeka (temperiranog na 20 °C) i 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina.

*Priprema uzorka svježeg sira:*

5 g sira se odvaže u tarionik i homogenizira uz dodatak destilirane vode temperature 50 °C. Potom se dobivena otopina kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu tako da ukupna količina vode bude 100 mL. Dobivenoj emulziji se doda 1 mL 2 %-tne otopine fenolftaleina.

*Postupak:*

U Erlenmeyerovu tikvicu se otpipetira 20 mL uzorka mlijeka i 1 mL 5 %-tne otopine kobaltovog sulfata te se na taj način priprema standardna boja koja predstavlja nijansu do koje je potrebno titrirati uzorak mlijeka s NaOH. Smjesa pripremljenog uzorka mlijeka, odnosno sira, se titrira 0,1 M otopinom NaOH do postizanja blijedoružičaste boje, koja se uspoređuje sa standardnom bojom pripremljenom u drugoj Erlenmeyerovoj tikvici, a koja se zadržala 2 minute.

Izračun kiselosti mlijeka radi se prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 2 \times f, \quad [3]$$

a izračun kiselosti sira prema izrazu:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 8 \times f, \quad [4]$$

gdje je a = mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju, a f = faktor otopine NaOH koji iznosi 1.

**3.2.2.4. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku**

Metoda se zasniva na kemijskom otapanju proteina (kazeina) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Radi lakšeg odvajanja masti se dodaje izoamilni alkohol koji snizuje površinsku napetost mlijeka. Mast se odvoji centrifugiranjem, a količina se očita na skali butirometra pri točno određenoj temperaturi (65 °C) (Božanić i sur., 2010).

#### *Aparatura i pribor:*

1. Umjereni butirometar za mlijeko
2. Čep za butirometar
3. Nastavak za umetanje čepa u butirometar
4. Stalak za butirometre
5. Centrifuga po Gerberu
6. Pipeta od 10 mL za sumpornu kiselinu
7. Pipeta od 11 mL za mlijeko
8. Pipeta od 1 mL za izoamilni alkohol
9. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

#### *Reagensi:*

1. Koncentrirana sumporna kiselina (Gerberova;  $\varphi = 1,815 - 1,820$ )
2. Izoamilni alkohol

#### *Postupak:*

U butirometar se najprije otpipetira 10 mL sumporne kiseline, zatim 11 mL mlijeka i na kraju 1 mL izoamilnog alkohola. Butirometar se začepi čepom i dobro promućka. Potom se butirometar s uzorkom stavlja u centrifugu na 5 minuta pri 65 °C. Po završetku centrifugiranja izravno se očitava udio mliječne masti sa skale butirometra.

#### **3.2.2.5. Određivanje udjela laktoze u mlijeku**

Metoda za određivanje udjela laktoze u mlijeku metodom prema Loff-Schoorlu se temelji na sposobnosti reducirajućih ugljikohidrata (laktoza) da reduciraju metale iz alkalnih otopina njihovih soli zahvaljujući slobodnoj aldehidnoj, odnosno keto skupini. Dodatkom Luffove otopine (alkalna otopina bakra), nastaje crveno-smeđi, netopljivi talog bakrenog oksidula, a količina laktoze nakon nastanka taloga se može odrediti titracijom suviška nereduciranih iona bakra ili titracijom istaloženog i otopljenog bakrenog oksidula.

Dodatkom otopine kalijevog jodida u suvišku, u kiseloj sredini koja se postiže dodatkom sumporne kiseline, dolazi do reakcije joda i suviška bakrenih iona pri čemu se oslobađa molekularni jod. Oslobođeni jod titrira se otopinom natrijevog tiosulfata uz škrob kao indikator do prijelaza u boju puti (Božanić i sur., 2010).

#### *Aparatura i pribor:*

1. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)



2. Povratno hladilo
3. 2 tikvice s brušenim grlom
4. Električni grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
5. Štoperica
6. Pipete od 1 mL
7. Pipete od 25 mL
8. Pipete od 15 mL

*Reagensi:*

1. Luffova otopina
2. 0,1 M natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )
3. 1 M otopina kalijevog jodida (KI)
4. 25 % otopina sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
5. 2 % otopina škroba

*Priprema 2 % otopine škroba:*

2 g škroba otopi se u 100 ml hladne destilirane vode te se tako dobivena otopina zagrijava na električnom grijaču s magnetskom mješalicom do bistrenja.

*Postupak:*

U tikvicu s brušenim grlom se otpipetira 1 mL uzorka mlijeka. Potom se otpipetira 24 mL destilirane vode i 25 mL Luffove otopine. Tikvica se priključi na povratno hladilo i kuha uz lagano vrenje točno 10 minuta. Tada se tikvica skine, ohladi pod mlazom tekuće vode te se u smjesu otpipetira 15 mL 20 %-tne otopine kalijeva jodida. Potom se oprezno, uz miješanje, u smjesu otpipetira 25 mL 25 %-tne otopine sumporne kisline.

Izlučeni jod se titrira 0,1 M Na-tiosulfatom dok boja uzorka ne prijeđe u žutu, a zatim se otpipetira 1 mL svježe pripremljene 2 %-tne otopine škroba i lagano se nastavi titracija Na-tiosulfatom sve do prijelaza tamnoplave u putenastu boju koja se treba zadržati nekoliko minuta. U račun se uzima u obzir zbroj utrošenih mililitara tiosulfata u obje titracije.

Usporedno se radi slijepa proba gdje se umjesto 1 mL uzorka i 24 mL destilirane vode otpipetira 25 mL destilirane vode, a daljnji postupak je identičan kao i s uzorkom.

*Izračun:*

Slijepa proba troši X mL 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Uzorak troši Y mL 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

$$(X-Y) \times f(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = Z \text{ mL } 0,1 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \quad [5]$$

Iz tablice 3 se za Z mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> očitaju mg laktoze u 1 mL uzorka.

**Tablica 3.** Izračunavanje šećera po Schoorl-Loffu (Božanić i sur., 2010)

0,1 M Na-tiosulfat	Laktoza	
	mL	Mg
1	3,6	
2	7,3	3,7
3	11,0	3,7
4	14,7	3,7
5	18,4	3,7
6	22,1	3,7
7	25,8	3,7
8	29,5	3,7
9	33,2	3,7
10	37,0	3,8
11	40,8	3,8
12	44,6	3,8
13	48,4	3,8
14	52,2	3,8
15	56,0	3,8
16	59,9	3,9
17	63,8	3,9
18	67,7	3,9

### 3.2.2.6. Određivanje udjela proteina u mlijeku

Aparatura i pribor:

1. Pipeta (5 mL)
2. Kiveta za Kjelteltec sustav (500 mL)
3. Menzura
4. Erlenmeyerova tikvica

5. Blok za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska)
6. Digestor (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska)
7. Kjeltex I Destiling Unit sustav za destilaciju (2100 Distillation Unit, FOSS)
8. Bireta

*Reagensi:*

1. 96 %-tna sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ )
2. Katalizator: Kjeldahl-ove tablete
3. 4 %-tna borna kiselina ( $H_3BO_3$ )
4. 40 %-tni natrijev hidroksid (NaOH)
5. 0,1 M klorovodična kiselina (HCl)

*Postupak:*

*Spaljivanje*

Odvagne se 5 g (s točnošću  $\pm 0,0001$  g) homogeniziranog uzorka (koji odgovara oko 50 mg N) i prebaci u kivetu od 500 mL tako da grlo kivete ostane čisto. Zatim se u kivetu stavi 20 mL koncentrirane sumporne kiseline te 2 Kjeldahl-ove tablete kao katalizatori. Kiveta se u digestoru lagano zagrijava u bloku za spaljivanje (slika 6). Kad se reakcija u kiveti smiri, grije se jače. Spaljivanje je završeno kada zaostane bistra plavo-zelena tekućina bez neizgorenih crnih komadića uzorka. Kada se sadržaj u kiveti ohladi, oprezno se razrijedi destiliranom vodom te sa kivetom postavlja u Kjeltex I Destiling Unit sustav za destilaciju (slika 6).

*Destilacija*

Postupak destilacije se provodi u Kjeltex I Destiling Unit sustavu koji automatski vrši postupak destilacije. Na postolje u destilacijskoj jedinici se stavi Erlanmayerova tikvica u kojoj se nalazi 25 mL borne kiseline, i podigne u gornji položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta se stavi na predviđeno mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Dozira se 50 mL 40 % NaOH u Kjeldahlovu epruvetu. Destilacija se odvija 4 minute. Destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka. Destilat mora biti hladan jer će u protivnom doći do gubitka amonijaka (Božanić i sur., 2010).

*Titracija HCl-om*

Titracija se provodi direktno u prihvatnu tikvicu s 0,1 M HCl. U završnoj točki boja otopine postane blijedo ružičasta (kao što je bila borna kiselina u tikvici prije destilacije). Potpuno isti postupak provede se za tzv. "slijepu probu" u kojoj se nalaze svi reagensi osim uzorka.



(A)



(B)

**Slika 6.** Kjeltec I Destiling Unit sustav koji automatski vrši destilaciju (A) (Anonymous 5, 2018) te grijač s kivetama u kojem se provodi spaljivanje (B) (vlastita fotografija)

*Izračun:*

$$\% N = \frac{(V - V_s) \times c(\text{HCl}) \times 14,007 \times 100}{m(\text{uzorak})} \quad [6]$$

$$\% \text{ proteina} = \% N \times 6,38 \quad [7]$$

pri čemu je V utrošeni mL 0,1 M otopine HCl za titraciju uzorka,  $V_s$  utrošeni mL 0,1 M otopine HCl za titraciju slijepa probe  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ , a F faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode).

### 3.2.2.7. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku

Metoda se temelji na isparavanju vode iz uzorka za analizu sušenjem u sušioniku pri 105 °C do konstantne mase (Božanić i sur., 2010).

*Aparatura i pribor:*

1. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
2. Eksikator
3. Aluminijska posudica
4. Hvataljka za posudice
5. Sušionik
6. Pipeta od 10 mL

### *Postupak:*

U prethodno osušenu, ohlađenu i odvagnutu aluminijsku posudicu se otpipetira 10 mL mlijeka te se posudica ponovno stavlja na sušenje u sušionik na 105 °C tijekom 2 sata. Nakon sušenja, posudica se vadi iz sušionika u eksikator kako bi se ohladila te se važe na analitičkoj vagi. Postupak se ponavlja dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg, a postotak suhe tvari računa se prema formuli:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [8]$$

### **3.2.3. Priprema ekstrakata suhog cvijeta bazge i majčine dušice**

Priprema ekstrakata za analizu provedena je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom *dr. sc. Maje Repajić*.

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka osušene i samljevene majčine dušice, odnosno cvjetova bazge, provedena je primjenom visokotlačne tekućinske ekstrakcije (PLE) uz upotrebu destilirane vode kao ekstrakcijskog otapala. Provedene su ekstrakcije pri sljedećim uvjetima: temperaturama od 100 °C i 160 °C, vremenu trajanja ekstrakcije 5 minuta i 2, odnosno 3 ciklusa (tablica 4). Potom je uzorcima provedeno određivanje ukupnih fenola primjenom spektrofotometrijske metode.

#### **3.2.3.1. Visokotlačna tekućinska ekstrakcija (PLE)**

##### *Aparatura i pribor:*

1. Ultrazvučna kupelj (Sonorex Digitec, Bandelin, Njemačka)
2. Staklena boca
3. Laboratorijska čaša
4. Električni mlinac (Grundig CM3260, Njemačka)
5. Plastične čašice za vaganje
6. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
7. ASE uređaj – Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
8. Staklene boce za ekstrakciju (ThermoScientific, 250 mL)
9. Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika, volumena 34 mL
10. Filter celulozni papir (Cellulose Filters for ASE 300, 100 pk, Restek, SAD)

## 11. Odmjerne tikvice

### *Reagensi:*

#### 1. Destilirana voda

##### *Priprema otapala:*

Destiliranu vodu koja se koristi kao otapalo je potrebno prethodno odzračiti. U staklenu bocu volumena 2000 mL se ulije destilirana voda te se staklana boca stavi u ultrazvučnu kupelj. Odzračivanje se provodi 45 minuta.

##### *Priprema uzorka majčine dušice i cvjetova bazge:*

Uzorci majčine dušice i cvjetova bazge se usitne u prah pomoću električnog mlinca (Grundig CM3260, Njemačka) te se u takvom obliku koriste za daljnju analizu.

##### *Postupak:*

Na analičkoj vagi se, u plastičnoj čašici, odvaži 2,5 g uzorka praha majčine dušice, odnosno cvjetova bazge te 5 g dijatomejske zemlje. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika prvotno se postave 2 filter celulozna papira, a potom se doda tanak sloj dijatomejske zemlje. Zatim se u ćeliju doda homogenizirana smjesa praha majčine dušice, odnosno cvjetova bazge i dijatomejske zemlje. Ekstrakcijska ćelija se zatvori, očisti od nečistoća te ručno postavi u ASE uređaj. Prije početka same ekstrakcije, na displayu uređaja se ručno podese zadani parametri ekstrakcije – temperatura, vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije. U uređaj se postave pripremljene ekstrakcijske ćelije na pozicije označene brojevima, dok se za iste u donjem dijelu uređaja postavljaju staklene bočice za skupljanje ekstrakta. Eksperiment je rađen variranjem dvaju parametara – temperature (100 i 160 °C) i broja ciklusa (2 i 3) dok je statičko vrijeme ekstrakcije ostalo nepromijenjeno (5 min). Po završetku ekstrakcije se dobiveni ekstrakti prenesu u odmjerne tikvice volumena 50 mL te nadopune do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju (destilirana voda). Tako pripremljeni ekstrakti se skladište u zamrzivaču na -18 °C do provođenja analize.

**Tablica 4.** Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva visokotlačnom tekućinskom ekstrakcijom iz majčine dušice, odnosno cvjetova bazge

Otapalo	Uzorak	Statičko vrijeme ekstrakcije (min)	T (°C)	Broj ciklusa ekstrakcije	Oznaka
Destilirana voda	Majčina dušica	5	100	2	<b>M1</b>
				3	<b>M2</b>
			160	2	<b>M3</b>
				3	<b>M4</b>
	Cvjetovi bazge		100	2	<b>B1</b>
				3	<b>B2</b>
			160	2	<b>B3</b>
				3	<b>B4</b>

### 3.2.3.2. Određivanje ukupnih fenola u vodenim ekstraktima majčine dušice i cvjetova bazge

#### Princip metode:

Određivanje ukupnih fenola se provodi u vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (modificirano prema Shortle i sur., 2014).

#### Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
2. Staklene kivete
3. Vortex mješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
4. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
5. Pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Mikropipete Eppendorf (100 mL, 1000 mL i 5000 mL)
7. Odmjerne tikvice
8. Menzura
9. Stalak za epruvete
10. Termostat
11. Staklene epruvete

## 12. Plastična lađica za vaganje

*Reagensi:*

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
3. Standard galne kiseline

*Priprema zasićene otopine natrijeva karbonata:*

200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

*Priprema standarda galne kiseline:*

Odvaže se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

*Postupak:*

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 0,1 mL ekstrakta majčine dušice, odnosno cvjetova bazge koji je 50x razrijeđen, 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon nekoliko minuta 1 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50 °C. Nakon toga se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (destilirana voda).

*Izrada baždarnog pravca:*

Za pripremu baždarnog pravca se odvaže 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Od te otopine galne kiseline se rade razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup>. Iz svake tikvice se otpipetira 0,1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 0,2 mL F.C. reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta se doda 1 mL 20 %-tnog natrijeva karbonata. Sve se skupa pomiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50

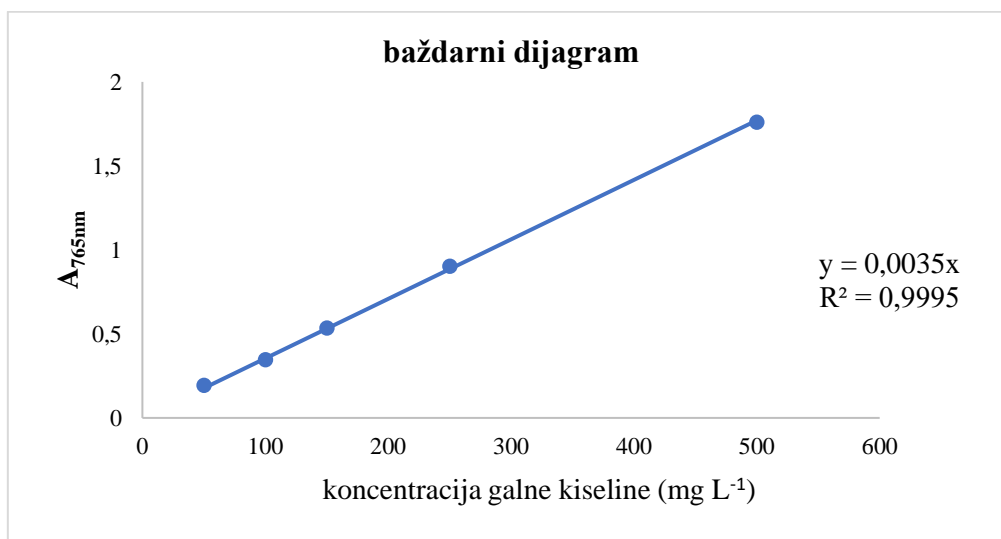


°C. Za slijepu probu se uzima 0,1 mL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm (tablica 5).

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacrtava baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 7).

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

$\text{mg L}^{-1}$	$A_{765}$
50	0,194
100	0,347
150	0,535
250	0,902
500	1,761



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

*Jednadžba pravca glasi:*

$$Y = 0,0035 \times X$$

[9]

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

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

$R^2$  – koeficijent determinacije,

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

gdje je:

X – koncentracija fenola u ekstraktu

X' – y/0,0035 (iz jednadžbe pravca)

### **3.2.3.3. Određivanje ukupnih fenola u svježim sirevima**

#### *Priprema uzorka*

Za određivanje ukupnih fenola u siru se uzorak priprema na način da se 40 g svježeg sira homogenizira s 20 mL vode 2 minute. Homogenizirani uzorak se centrifugira (Rotina 380R, Hettich Zentrifugen GmbH, Njemačka) 10 minuta i po završetku skladišti na 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

Određivanje ukupnih fenola se provodi po istoj metodi kao i određivanje ukupnih fenola u vodenim ekstraktima majčine dušice i cvjetova bazge.

### **3.2.4. Određivanje indeksa boje**

Određivanje indeksa boje se vršilo u Laboratoriju za tehnološke operacije na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom višeg tehničkog suradnika *ing. Gorana Bosanca*.

Danas se u svrhu instrumentalnog određivanja boje za prehrambene proizvode najčešće koristi CIELAB metoda koja je ustanovljena od strane Commission Internationale de L'Eclairage (Lancaster i sur., 1997). Prema njoj se boja mjeri u trodimenzionalnom sustavu ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) (slika 8) i to pomoću kolorimetra s mogućnošću određivanja čitavog vidljivog spektra. Takvo mjerenje boje izražava se u  $L^*a^*b^*$  vrijednostima.  $L^*$  predstavlja svjetlinu, odnosno skalu sive boje, pri čemu je vrijednost 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijela. Parametar  $a^*$  ima raspon vrijednosti od -100 do +100, gdje negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji (vrijednost -100 predstavlja čistu zelenu boju), dok pozitivne vrijednosti označavaju približavanje crvenoj boji. Parametar  $b^*$  ima isti raspon vrijednosti, gdje -100 označava čistu plavu, a +100 čistu žutu boju. Pomoću vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  moguće je dobiti  $\Delta E$ , odnosno ukupnu promjenu boje (Konica-Minolta, 1998).  $\Delta E$  izračuna se po sljedećoj formuli:

$$[11] \quad \Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2}$$

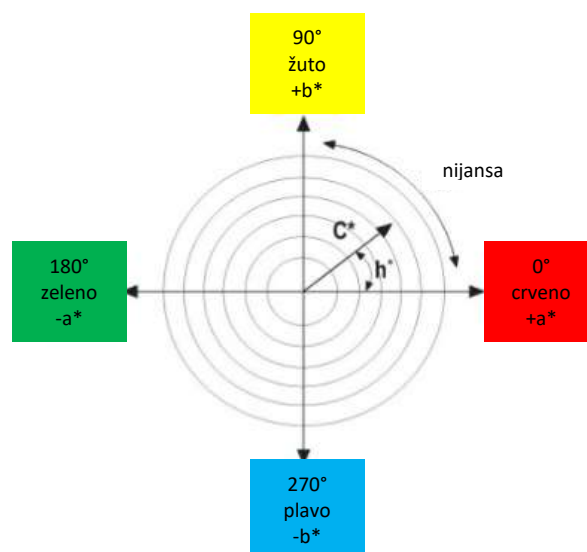


**Slika 8.** Određivanje boje u L\*a\*b\* sustavu (Konica-Minolta, 1998)

Kombinacijom parametara  $a^*$  i  $b^*$  dobivamo boju materijala, a boja koja se dobiva tom kombinacijom može se opisati sljedećom jednadžbom:

$$[12] \quad C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

L\*C\*h sustav boja koristi isti princip kao i L\*a\*b\* sustav boja, ali koristi cilindrične koordinate umjesto pravokutnih (slika 9). U ovom sustavu boja  $L^*$  ukazuje na svjetlinu i to je isto kao u L\*a\*b\* sustavu,  $C^*$  je metrična kroma, a  $h$  je kut nijanse. Vrijednost  $h$  se izražava u stupnjevima;  $0^\circ$  predstavlja  $+a^*$  (crveno),  $90^\circ$  predstavlja  $+b^*$  (žuto),  $180^\circ$  predstavlja  $-a^*$  (zeleno) i  $270^\circ$  predstavlja  $-b^*$  (plavo).



**Slika 9.** Određivanje boje u L\*C\*h sustavu (Konica-Minolta, 1998)

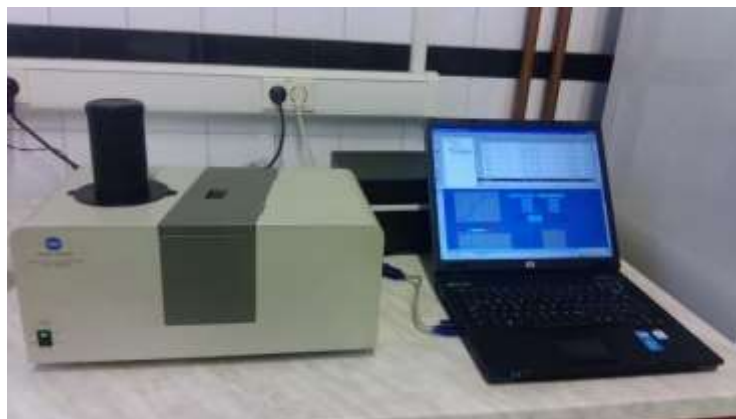
### *Aparatura i pribor:*

#### 1. kolorimetar CM-350d

##### *Postupak:*

Određivanje boje uzoraka se provodilo difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru CM-350d (Konica-Minolta, 1998) prikazanom na slici 10. Izvor svjetla je pulsirajuća ksenon lampa koja je dizajnirana da daje standardni izvor svjetla D65. Neovisno o valnoj duljini svjetlo reflektirano od uzoraka se sakuplja u integrirajućoj sferi te se normalizira prema svjetlu izvora reflektancije. Zbog toga se prije svakog seta mjerenja uređaj kalibrira s čisto bijelim standardom (100 %-tna refleksija) te crnim valjkom (0 % refleksije). U programu Spectramagic NX (Konica-Minolta, 1998) su se podesile sve potrebne postavke. Sva mjerenja vršena su u SCE (Specular Component Excluded) modu.

Komadić sira se postavi tako da prekriva cijeli otvor koji se zatim poklopa valjkom potpuno crne boje i maksimalne apsorpcije svjetlosti. Kao rezultat su dobivene  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti.



**Slika 10.** Kolorimetar CM-350d (vlastita fotografija)

#### **3.2.5. Mikrobiološke analize**

Uzorci mlijeka i mliječnih proizvoda za mikrobiološku kontrolu moraju biti pripremljeni u aseptičnim uvjetima kako bi izbjegli naknadnu kontaminaciju. Potrebno posuđe i pribor za uzorkovanje i pripremu uzorka mora biti sterilno. Također, prije i tijekom izvođenja mikrobiološke analize potrebno je sterilizirati radne površine alkoholom ili nekim drugim dezinficijensom te upaliti plamenike kako bi se postigli aseptični uvjeti. Prilikom vršenja mikrobioloških analiza ne smiju se konzumirati hrana i piće, a prozori moraju biti zatvoreni i klima uređaji ugašeni (Božanić i sur., 2010).

Određivanje broja mikroorganizama u siru je provedeno metodom naciepljivanja decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge. Broj mikroorganizama ustanovljen tom metodom ne predstavlja pravi broj živih mikroorganizama u pojedinom uzorku sira, nego samo broj onih koji su se mogli razviti u vidljive kolonije pod uvjetima rasta koje nalažu u prvom redu sastav supstrata, temperatura i trajanje inkubacije. Određuje se broj živih bakterija, uz pretpostavku da se iz svake pojedine stanice na čvrstom hranjivom supstratu u Petrijevim pločama razvila po jedna odvojena kolonija (Božanić i sur., 2010).

Mikrobiološka analiza je provedena prvog i petog dana hladnog čuvanja svježeg sira bez dodatka ekstrakata te prvog, sedmog, desetog i četrnaestog dana za sireve s dodatkom ekstrakata, a praćen je ukupan broj mikroorganizama, kvasaca i plijesni, enterobakterija te prisutnost koagulaza pozitivnih stafilokoka.

### ***3.2.5.1. Priprema hranjivih podloga***

#### *Aparatura i pribor*

1. Žlica
2. Erlenmeyerova tikvica
3. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
4. Električni grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
5. Magnet
6. Staklene boce
7. Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)

#### *Reagensi:*

1. Destilirana voda
2. Dehidratirane podloge
  - a. za ukupan broj mikroorganizama: Tryptic glucose yeast agar (Biolife, Milano)
  - b. za kvasce i plijesni: Sabourad dextrose agar CAF 50 (Biolife, Milano)
  - c. za enterobakterije: Violet red biel glucose agar (Biolife, Milano)
  - d. za koagulaza pozitivne stafilokoke: Baird Parker agar base + egg yolk tellurite emulsion (Biolife, Milano)

#### *Postupak:*

U laboratorijsku čašu se odvažuje određena količina dehidratirane podloge koja se potom kvantitativno prebaci u Erlenmeyerovu tikvicu te se doda destilirana voda (prema uputama proizvođača). Potom slijedi zagrijavanje na električnom grijaču s magnetskom mješalicom sve dok se sav sadržaj u tikvici ne otopi. Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broj te kvasaca i plijesni se izlijeva u infuzijske boce koje se potom autoklaviraju pri 121 °C/20 minuta. Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija se odmah razlijeva u Petrijeve ploče koje se ne autoklaviraju, nego se čuvaju u hladnjaku do korištenja, dok se hranjiva podloga za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka prije razlijevanja također autoklavira (Božanić i sur., 2010).

#### **3.2.5.2. Priprema fiziološke otopine**

##### *Aparatura i pribor:*

1. Žlica
2. Čaša
3. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
4. Stakleni štapić
5. Epruvete
6. Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)

##### *Reagensi:*

1. Natrijev klorid
2. Destilirana voda

##### *Postupak:*

Pripremi se 0,9 %-tna otopina NaCl-a na način da se 9 g natrijeva klorida otopi u 1000 mL destilirane vode. Po 9 mL fiziološke otopine razdijeljuje se u epruvete koje se začepljuju i steriliziraju u autoklavu pri 121 °C/20 minuta (Božanić i sur., 2010).

#### **3.2.5.3. Priprema 2 %-tne otopine natrij citrata**

##### *Aparatura i pribor:*

1. Žlica
2. Menzura

3. Električni grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
4. Erlenmeyerova tikvica
5. Digitalna vaga (KB 3600-2N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
6. Infuzijske boce
7. Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)

*Reagensi:*

1. Destilirana voda
2. Trinatrijev-dihidroksicitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )

*Postupak:*

20 g trinatrijevog-dihidroksicitrata se otopi u 1000 mL destilirane vode zagrijane na 45-50 °C. Nakon što se sva sol otopi, otopina se razdijeljuje u infuzijske boce (po 180 mL) koje se potom steriliziraju u autoklavu na 121 °C/20 minuta (Božanić i sur., 2010).

**3.2.5.4. Priprema uzorka svježeg sira**

*Aparatura i pribor:*

1. Žlica
2. Tarionik s pistilom
3. Vodena kupelj
4. Erlenmeyerova tikvica
5. Staklena zrnca
6. Digitalna vaga (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

*Reagensi:*

1. 2 %-tna otopina natrij citrata

*Postupak:*

Uzorak sira se pripremi usitnjavanjem 20 g sira u tarioniku uz postupno dodavanje 180 mL 2 %-tne otopine natrij citrata prethodno zagrijanog na 45 °C. Sadržaj tarionika se potom prenese u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima i prije pipetiranja snažno promućka čime se dobije osnovno razrjeđenje (Božanić i sur., 2010).

**3.2.5.5. Priprema decimalnih razrjeđenja**

*Aparatura i pribor:*

1. Stalak za epruvete
2. Epruvete
3. Vortex (MS2 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington, USA)
7. Bunsenov plamenik
8. Mikropipeta od 1000  $\mu\text{L}$

*Reagensi:*

1. Fiziološka otopina

*Postupak:*

Iz homogeniziranog uzorka sira, sterilnom mikropipetom se prenese 1 mL uzorka u epruvetu s pripremljenih 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nastalo je razrjeđenje  $10^{-1}$  koje se homogenizira. Potom se iz tog razrjeđenja čistom sterilnom pipetom prenese 1 mL u drugu epruvetu sa 9 mL fiziološke otopine pri čemu je dobiveno  $10^{-2}$  razrjeđenje polaznog uzorka. Daljnjim razrjeđivanjem na opisani način pripremaju se sva potrebna razrjeđenja – radila su se kako bi broj naraslih kolonija bio brojiv, odnosno u rasponu od 30 do 300 kolonija po ploči (Božanić i sur., 2010).

### **3.2.5.6. Nacjepljivanje i inkubacija ploča**

*Aparatura i pribor:*

1. Mikropipete podešene na 100  $\mu\text{L}$  i 1000  $\mu\text{L}$
2. Tipsevi za mikropipete
3. Štapić po Drigalskom
4. Staklene Petrijeve ploče
5. Plastične Petrijeve ploče
6. Bunsenov plamenik
7. Termostat (INKO, Zagreb, Hrvatska)

*Reagensi:*

1. Etanol
2. Hranjive podloge

*Postupak:*

Nacjepljivanje uzorka za dokazivanje ukupnog broja prisutnih bakterija, kao i prisutnosti kvasaca i plijesni, provedeno je na način da je 1000  $\mu\text{L}$  decimalnog razrjeđenja uzorka otpipetirano u praznu Petrijevu ploču nakon čega se pretilo pripremljenom hranjivom



podlogom zagrijanom na oko 45 °C. Nakon naciepljivanja Petrijeve ploče su stavljene na inkubaciju u termostat – za određivanje ukupanog broja mikroorganizama na 30 °C kroz 48 sati, a za određivanje kvasaca i plijesni na sobnoj temperaturi kroz 48 sati (Božanić i sur., 2010).

Naciepljivanje uzorka za dokazivanje enterobakterija i koagulaza pozitivnih stafilokoka je provedeno na način da je 100 µL decimalnog razrjeđenja uzorka otpipetirano na gotovu hranjivu podlogu te je pomoću štapića po Drigalskom uzorak ravnomjerno razmazan po podlozi. Nakon naciepljivanja Petrijeve ploče su stavljene na inkubaciju u termostat na 37 °C kroz 48 sati (Božanić i sur., 2010).

Nakon inkubacije je provedeno brojanje poraslih kolonija mikroorganizama. Broj poraslih kolonija pomnožen je sa faktorom razrjeđenja te je na taj način dobiven broj mikroorganizama u 1 mL uzorka (Božanić i sur., 2010).

### **3.2.6. Senzorske analize**

Senzorska (organoleptička) analiza je znanstvena disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica, a koja se određuju uz pomoć osjetila mirisa, okusa, njuha, dodira i sluha.

Prednosti senzorske analize jesu brzina i mogućnost rane detekcije mane proizvoda, točnost u procjeni kvalitete proizvoda, jednostavnost, niski troškovi te mnogostruka primjena. Nedostaci se uglavnom odnose na probleme pri interpretaciji rezultata i odabiru što objektivnijih metoda (Tratnik i Božanić, 2012).

Pri senzorskoj analizi mlijeka i mliječnih proizvoda se koriste metode ocjenjivanja s ponderiranim bodovima. U tom se slučaju svako navedeno svojstvo ocjenjuje ocjenom 1 do 5, a nedostatak takve procjene korigira se faktorom značajnosti ( $F_v$ ). Množenjem faktora značajnosti i ocjena dobiju se ponderirani bodovi (Tratnik i Božanić, 2012).

Termini koji određuju kvalitetu sireva su:

1. vanjski izgled – prejednoličan, previsok, deformiran, napuhnuto, konkavan, konveksan, nakrivljen, zemljan, prljav,
2. unutarnji izgled – bez sirnih očiju, premalo/previše sirnih očiju, premale, prevelike, napuhnute, netipične, nejednake oči, pukotine u siru, pljesniv s vanjske strane, nejednako pljesniv, strana plijesan, mrlje truljenja, strano tijelo,

3. kora/površina – debela, tanka, gruba, neizražene boje, popucana, suha, vlažna, trula, masna, zamazana, naborana, pljesniva, previše zamrljana, premalo zamrljana, premalo pljesniva, pljesniva ispod kore, rupičasta,
4. boja – bez boje, nejednake boje, prošaran, mramoriran, išaran pjegama, šarolika, blijed ispod površine, crven ispod površine,
5. konzistencija/tijelo i tekstura – tvrd, čvrst, grub, grudast, zgrušan, mrvičast, zrnast, pjeskovit, brašnast, kredast, krhak, jak, ljepljiv, drobljiv, dug, elastičan, gladak, mekan s vanjske strane, tanak, mokar, spužvast, slojevit, nejednak,
6. okus – strani, nekarakterističan, po trulom, po amonijaku, jednoličan, jednolično pljesniv, pljesniv, fermentiran, pjenušav, po maslačnoj kiselini, nečist, pokvaren, izgoren, užegao, mastan, sapunast, hranjiv, sladak, voćni, korovit, oštar, sladak, kiseo, gorak, hrapav, slan, metalik, kemijski, sulfitan, kuhan (Tratnik i Božanić, 2012).

Testovi prihvaćanja se koriste kada se treba odrediti sklonost potrošača prema proizvodu, odnosno koliko mu se sviđa. Razne hedonističke ljestvice (skale) najbolje izražavaju stupnjeve od neprihvatljivosti do prihvatljivosti, odnosno od nesviđanja do sviđanja. Osim hedonističkih ljestvica tu su i kategorijske ljestvice, linijske i ljestvice procjene veličine (jačine), a najboljim se smatraju one ljestvice s jednakim brojem pozitivnih i negativnih kategorija istih veličina (Stone i sur., 2012).

Senzorska analiza tradicionalno proizvedenog svježeg sira od kravljeg mlijeka s dodatkom vodenih ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge je provedena prvi dan hladnog čuvanja u svrhu ocjene prihvatljivosti sireva. Analizu je provodilo 5 senzorskih analitičara ocjenjujući boju, miris, teksturu i okus pomoću obrasca za ocjenjivanje (tablica 7). Navedeni parametri ocjenjeni su ocjenama od 1 do 5, a potom je srednja ocjena pojedinog parametra pomnožena sa faktorom značajnosti kako bi dobili ponderirane bodove. Faktori značajnosti za pojedino svojstvo prikazani su u tablici 6. Također, provedena je i hedonistička senzorska analiza prihvatljivosti proizvedenih sireva od strane 28 ocjenjivača, a obrazac koji se koristio prikazan je tablicom 8.

**Tablica 6.** Obrazac za senzorsko ocjenjivanje svježeg sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (Tomas, 2011)

Senzorsko svojstvo	Faktor značajnosti	Opisni parametri	Ocjena	Max. bodovi
Okus	1,5	Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma, umjereno slan	4-5	7,5
		Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma, umjereno slan	3	
		Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, preslan, potpuno neslan (bljutav), okus po plijesni	1-2	
Miris	0,5	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan po mlijeku, diskretan kiselkast miris, bez ikakvih stranih mirisa	4-5	2,5
		Prenaglašen miris, nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris mlijeka, tragovi užeglosti	3	
		Potpuno nekarakterističan za proizvod, stran, užegao, po plijesni	1-2	
Tekstura	1,0	Sir kompaktan, homogen, tvrdoća karakteristična za proizvod, cijela masa jednolična i bez grudica, ne lijepi se za usta	5	5
		Zamjetne male neravnine i udubljenja, malo pretvrd ili premekan	3-4	
		Pretvrd ili premekan sir, nejednolike granulacije, pjeskovit ili gnjecav, osjetno se lijepi za usta	1-2	
		Neravna površina, malo hrapava, zamjetno neujednačene boje	3-4	
		Površina ispucala, pooptuno neravna i hrapava, zamjetna zona različitih boja površine sira, strana i nekarakteristična boja ili površina sira	1-2	
Boja	1,0	Karakteristična bijela, sa laganim zelenkastim odsjajem, jednolična po cijeloj površini	5	5
		Zamjetno neujednačene boje, malo žuće nijanse	3-4	
		Zamjetna zona različitih boja i površine sira, strana i nekarakteristična boja	1-2	

**Tablica 7.** Obrazac za senzorsko ocjenjivanje svježeg sira

<b>Datum</b>				
<b>Ocjenjivač</b>				
<b>Ocjenjivano svojstvo</b>	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>			
	Uzorak	Uzorak	Uzorak	Uzorak
<b>Boja</b>				
<b>Miris</b>				
<b>Tekstura</b>				
<b>Okus</b>				

**Tablica 8.** Obrazac za hedonističku senzorsku analizu prihvatljivosti svježeg sira

Na ljestvici od 1 do 9 ocjenite sviđanje pojedinog uzorka, pri čemu je značenje ocjena:

- 1 – izrazito mi se ne sviđa,
- 2 – veoma mi se ne sviđa,
- 3 – umjereno mi se ne sviđa,
- 4 – neznatno mi se ne sviđa,
- 5 – niti mi se sviđa, niti mi se ne sviđa,
- 6 – neznatno mi se sviđa,
- 7 – umjereno mi se sviđa,
- 8 – veoma mi se sviđa,
- 9 – izrazito mi se sviđa.

<b>Uzorak</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Ocjena sviđanja</b>				

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati hoće li se dodatkom vodenih ekstrakata majčine dušice i cvjetova bazge produžiti trajnost tradicionalno proizvedenog svježeg sira. Budući da je trajnost takvog svježeg sira svega 1 dan, a navedeno bilje karakterizira snažno antimikrobno djelovanje, ispitivalo se hoće li 2 %-tni, odnosno 5 %-tni dodatak vodenog ekstrakta utjecati na mikrobiološka svojstva sira.

Ekstrakti majčine dušice i cvjetova bazge su dobiveni primjenom visokotlačne tekućinske ekstrakcije (PLE). PLE je provedena pri sljedećim uvjetima: statičko vrijeme ekstrakcije (5 minuta), te variranjem temperature ekstrakcije (100 °C i 160 °C) i broja ciklusa ekstrakcije (2 ili 3 ciklusa). Spektrofotometrijski je određen ukupan broj fenolnih spojeva u dobivenim ekstraktima te su ekstrakti majčine dušice i cvjetova bazge s najvećom koncentracijom fenola korišteni za daljnju analizu.

Ekstrakti su dodani u sirovo mlijeko u volumnim udjelima od 2 % i 5 %. Provedene su fizikalno-kemijske analize sirovog mlijeka te tradicionalno proizvedenog svježeg sira, odnosno svježeg sira s dodacima ekstrakata. Također, provedena je i mikrobiološka analiza za svaki od dobivenih sireva – za kontrolni uzorak prvi i peti dan, a za uzorke s dodatkom ekstrakata prvi, sedmi, deseti, četrnaesti i dvadeset i prvi dan. Svaki sir je proizveden u dvije paralele.

Senzorska analiza je provedena od strane 5 ocjenjivača prvi dan hladnog čuvanja za svježe sireve s dodatkom vodenih ekstrakata, a ocjenjivana su sljedeća svojstva: boja, konzistencija, miris i okus. Također, provedena je i hedonistička senzorska analiza prihvatljivosti proizvedenih sireva od strane 28 ocjenjivača.

Dodatno, u svrhu instrumentalnog određivanja indeksa boje, izmjerena je boja u trodimenzionalnom sustavu ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Dobivene vrijednosti su korištene za računanje promjene boje tijekom vremena te su pojedinačno uspoređene s referentnim uzorkom.

#### 4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE

Za 5 serija mlijeka provedeno je mjerenje kiselosti, udjela laktoze, mliječne masti, proteina te suhe tvari. Rezultati tih fizikalno-kemijskih analiza sirovog kravljeg mlijeka su prikazani u tablici 9 u obliku prosječne vrijednosti te standardne devijacije.

Ekstrakti majčine dušice i cvjetova bazge su podvrgnuti spektrofotometrijskom određivanju koncentracije fenola (slika 11), a rezultati su prikazani grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

Rezultati fizikalno-kemijskih analiza proizvedenog svježeg sira su prikazani u tablicama 10 i 11. Tablica 10 prikazuje prinos pojedinog sira, a u tablici 11 su prikazani rezultati mjerenja kiselosti kontrolnog uzoraka svježeg kravljeg sira, odnosno svježeg kravljeg sira s dodatkom ekstrakta majčine dušice i cvjetova bazge nakon određenog broja dana hladnog čuvanja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

Proizvedenim sirevima se također određivala koncentracija fenolnih spojeva, a rezultati su prikazani grafički kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja slikom 12.

##### *Fizikalno-kemijske analize sirovog mlijeka*

**Tablica 9.** Rezultati fizikalno-kemijskih analiza sirovog kravljeg mlijeka (n=5)

Sirovo mlijeko	pH	°SH	Gustoća	Udio mliječne masti	Udio laktoze	Udio proteina	Udio suhe tvari
			(g cm <sup>-3</sup> )	(%)			
Prosječna vrijednost	6,78	6,80	1,029	3,10	4,59	3,69	11,13
SD*	0,04	0,13	0,00	0,72	0,11	0,15	0,82

\*SD – standardna devijacija

Sirovom mlijeku korištenom za proizvodnju svježih sireva je određena kiselost, gustoća te udio mliječne masti, laktoze, proteina i suhe tvari. Ukupno je analizirano 5 serija uzoraka mlijeka (tablica 9).

Budući da prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17) mlijeko mora sadržavati najmanje 3,0 % mliječne masti, 2,5 % proteina, 8,5 % suhe tvari, te da mu je gustoća od 1,028 do 1,034 g cm<sup>-3</sup>, kiselinski stupanj od 6,6 do 6,8 °SH, a pH vrijednost od 6,5

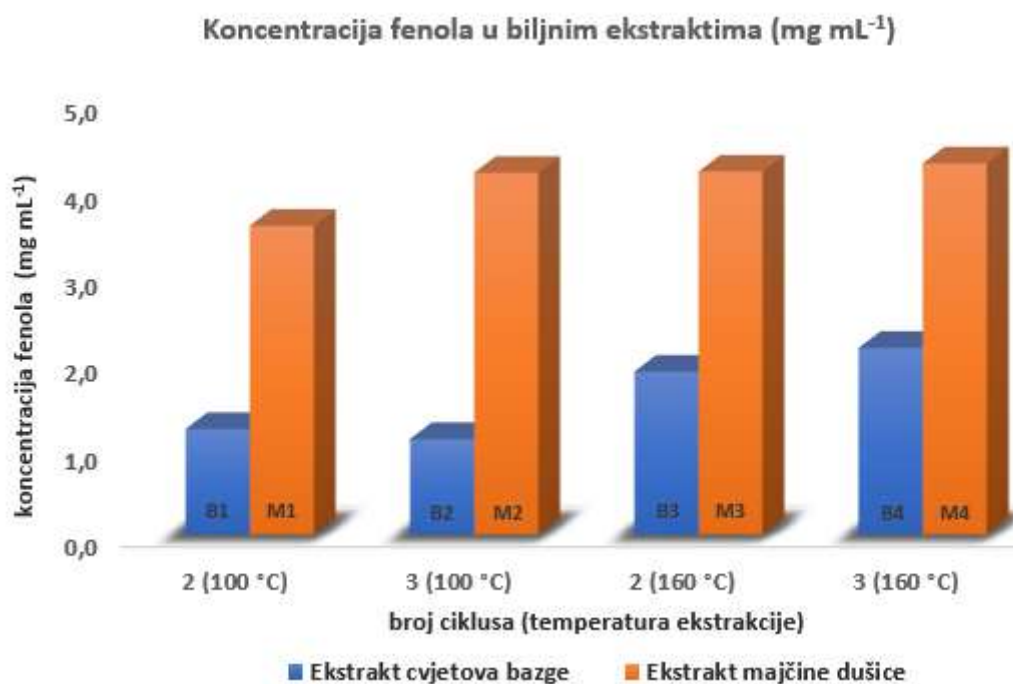
do 6,7, može se zaključiti da je mlijeko dobre kvalitete obzirom da su dobivene srednje vrijednosti ispitivanih svojstava u skladu sa zahtjevima Pravilnika te nema većih odstupanja (tablica 9).

Eventualno odstupanje je vidljivo kod rezultata vezanih za pH vrijednosti sirovog mlijeka koja je neznatno izvan granica (6,5-6,7) propisanih Pravilnikom (NN 27/17), međutim i dalje je u rasponu definiranom za prihvatljivu nativnu ili primarnu kiselost sirovog mlijeka. Ona potječe od kiselih svojstava kazeina, fosfata, citrata, askorbinske kiseline, CO<sub>2</sub> te slobodnih aminokiselina i masnih kiselina (Tratnik i Božanić, 2012). Tremonte i sur. (2014) su u svom istraživanju provedenom u Italiji zabilježili pH vrijednost sirovog mlijeka koja se kretala oko  $6,72 \pm 0,06$ , dakle slično kao i u ovom radu.

U diplomskom radu izrađenom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Telišman (2017) je ispitala kvalitetu mlijeka iz mljekomata na području Zagrebačke županije. Cilj istraživanja bio je utvrditi kemijski sastav i mikrobiološku ispravnost mlijeka prikupljenih iz 11 različitih mljekomata na području grada Zagreba i okolice, te ispitati odgovara li ona zakonski postavljenim kriterijima. Također, cilj je bio utvrditi razlike u uzorcima sirovog mlijeka prikupljenim u dva različita godišnja doba, zimi i ljeti. Jedan od analiziranih uzoraka bio je upravo iz mljekomata iz kojeg je uzeto sirovo mlijeko za proizvodnju svježeg sira u ovom diplomskom radu. Za usporedbu su iz spomenutog rada uzeti rezultati dobiveni u ljetnom razdoblju uzorkovanja budući da su analize u ovom radu provedene u istom. U tom radu, pH vrijednost za mlijeko iz navedenog mljekomata iznosila je u 6,79, a °SH vrijednost 8,95, udio proteina 3,31 %, udio laktoze 4,40 %, udio mliječne masti 3,75 %, a udio suhe tvari 8,70 %. Vidljivo je da su rezultati relativno slični, osim odstupanja °SH vrijednosti i udjela suhe tvari izmjerene u radu Telišman.

#### *Koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima majčine dušice i cvjetova bazge*

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzorka osušene i samljevene majčine dušice, odnosno cvjetova bazge, provedena je primjenom visokotlačne tekućinske ekstrakcije (PLE) uz upotrebu destilirane vode kao ekstrakcijskog otapala. Provedene su ekstrakcije variranjem dvaju parametara: temperatura ekstrakcije (100 °C i 160 °C) i broj ciklusa ekstrakcije (2 i 3), dok je statičko vrijeme ekstrakcije iznosilo 5 minuta. Određivanje ukupnih fenola je provedeno primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm.



**Slika 11.** Koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima majčine dušice i cvjetova bazge (mg mL<sup>-1</sup>) ovisno o parametrima provedbe ekstrakcije

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta bazge određena je u rasponu od 1,09 mg mL<sup>-1</sup> do 2,14 mg mL<sup>-1</sup>, a u ekstraktu majčine dušice u rasponu od 3,54 mg mL<sup>-1</sup> do 4,25 mg mL<sup>-1</sup>. Najveća koncentracija ukupnih fenola u oba uzorka, primjenom PLE, određena je u ekstraktima koji su dobiveni pri najvišoj temperaturi ekstrakcije (160 °C), kroz 3 ciklusa i statičko vrijeme od 5 minuta. Ta koncentracija se odnosi na ekstrakt cvijeta bazge B4 i iznosi 2,14 mg mL<sup>-1</sup>, odnosno majčine dušice M4 koja iznosi 4,25 mg mL<sup>-1</sup> (Slika 10), te su navedeni ekstrakti korišteni za daljnje istraživanje.

Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanim jer se porastom temperature povećava topljivost mnogih spojeva, ali i koeficijent difuzije vode, što pospješuje bolje prodiranje otapala u matriks te tako utječe na učinkovitost ekstrakcije (Hossain, 2011).

Porast ukupnih fenola uz porast temperature ekstrakcije ranije je zabilježen u rezultatima istraživanja Hossaina (2011) analizirajući dobivene ekstrakte ružmarina, origana i mažurana primjenom PLE. Temperature ekstrakcije (66, 75, 99, 120 i 129 °C) kombinirane su s različitim koncentracijama vodene otopine metanola (32, 40, 60, 80 i 88 %) uz konstantno statičko vrijeme od 5 minuta, a dobiveni rezultati pokazuju da su najveći udjeli ukupnih fenola ostvareni pri najvišoj temperaturi.



U prilog rezultatima ovog istraživanja ide i nekoliko drugih studija u kojima se također ispitala učinkovitost PLE te je zabilježen sličan učinak temperature na prinos izolacije fenola iz biljnog materijala (Santoyo i sur., 2009; Zaibunnisa i sur., 2009).

U diplomskom radu Obradović (2016), izrađenom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, najveća koncentracija ukupnih fenola u listu stevije primjenom PLE je određena u ekstraktima dobivenim pri najvišoj temperaturi ekstrakcije, uz dva ciklusa i statičko vrijeme od 5 minuta. Rezultati tog istraživanja ukazuju na pozitivno koreliranje broja ciklusa ekstrakcije s učinkovitošću izolacije ukupnih fenola iz lista stevije pa je tako evidentan porast udjela ukupnih fenola sa 6,55 na 8,07 mg g<sup>-1</sup> kada se broj ciklusa poveća sa 1 na 2. Takvi rezultati postignuti su i u ovom radu pri povećanju broja ekstrakcijskih ciklusa s 2 na 3.

*Prinos sira proizvedenog s i bez primjene ekstrakata*

**Tablica 10.** Prinos sira (prosječna vrijednost dvaju paralelnih određivanja)

Uzorak	Količina dodanog ekstrakta (%)	Prinos sira (%)
<b>Kontrolni uzorak</b>	-	22,5
<b>Svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice</b>	2	19,7
	5	21,9
<b>Svježi sir s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge</b>	2	22,6
	5	22,7

Prema Sabadošu (1996), prinos svježeg sira varira od 18 do 20 %. U navedenom rasponu je jedino prinos svježeg sira s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 2 %, dok su prinosi ostalih sireva 2-3 % veći. Osim navedenog, prinosi svježih kravljih sireva s i bez dodatka ekstrakata nisu se značajno razlikovali što je očekivano s obzirom da je upotrebljen jednak volumen svježeg mlijeka (1500 mL) i jednaka količina starter kulture (0,015 g).

Slični rezultati postignuti su i u istraživanju Vranko (2005) gdje je prinos probiotičkih sireva od svježeg obranog mlijeka iznosio oko 21,8 %. U istraživanju Otočan (2005), u kojem

je upotrebljen isti volumen mlijeka za proizvodnju sira kao i u ovom istraživanju (1500 mL), rezultati prinosa sira su također slični – od 20,1 do 22,7 %.

*Kiselost svježeg sira*

**Tablica 11.** Kiselost (pH i °SH vrijednosti) svježih sireva tijekom 21 dana hladnog čuvanja

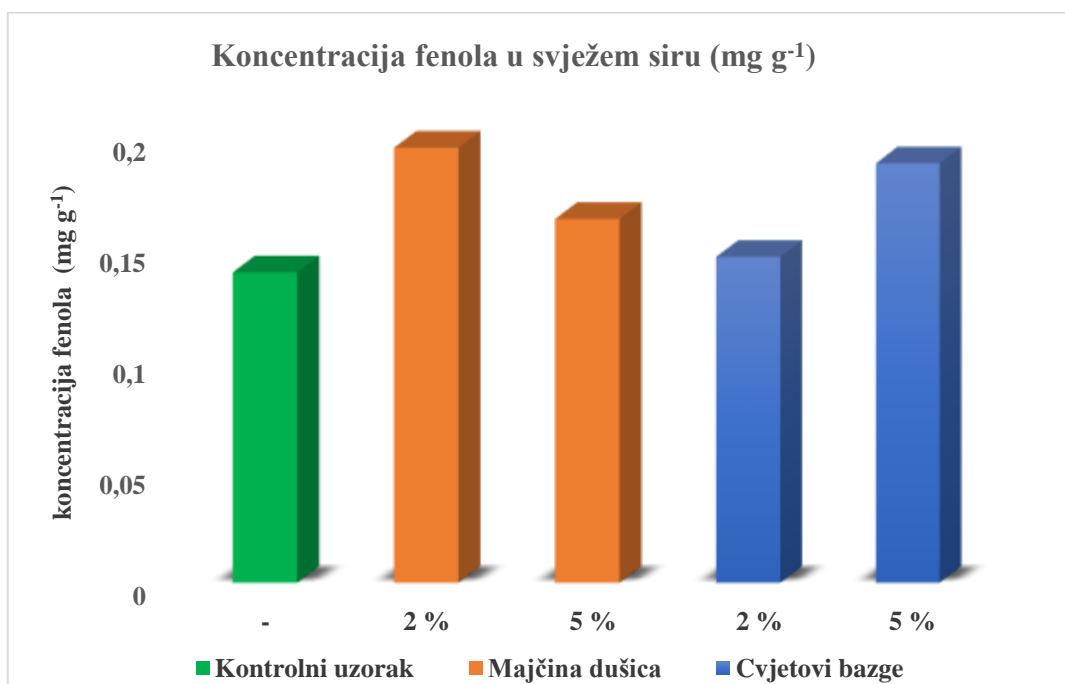
Uzorak	Dodatak ekstrakta (%)	Dan	pH	°SH
<b>Kontrolni uzorak</b>	-	1.	5,07	59,2
		5.	4,79	67,6
<b>Svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice</b>	2	1.	5,05	65,6
		7.	5,00	68,8
		10.	4,91	67,6
		14.	5,07	66,4
		21.	4,81	58,4
	5	1.	5,07	63,2
		7.	4,83	60,8
		10.	4,89	62,8
		14.	4,93	62,0
		21.	4,87	62,8
<b>Svježi sir s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge</b>	2	1.	4,88	58,4
		7.	4,69	66,4
		10.	4,77	60,4
		14.	5,03	62,4
		21.	4,94	57,6
	5	1.	4,85	62,4
		7.	4,69	62,4
		10.	4,83	64,0
		14.	4,90	65,2
		21.	4,81	58,0

Tijekom čuvanja je sirevima određivana kiselosti. pH vrijednost je, kao i titracijska kiselost svih sireva (tablica 11), bila stabilna sve dana čuvanja.

U istraživanju Sabljak (2013) pH vrijednosti svježih kravljih sireva prvog dana čuvanja kretale su se od 4,40 do 4,69, a šesti dan čuvanja od 4,31 do 4,64. Iako su pH vrijednosti nešto niže nego li u ovom radu, vidljivo je kako je pH također stabilan tijekom tih 6 dana čuvanja. Isti trend pokazao se i kod mjerenja titracijske kiselosti koja se prvog dana kretala od 41,6 do 59,1 °SH, a šestog dana od 41,6 do 59,5 °SH.

U istraživanju Sağdıç i sur. (2017) pH vrijednosti svježih sireva tijekom prvog dana čuvanja su se kretale od 5,52 do 5,63 za kontrolni uzorak koji je čuvan u salamuri, a za svježi sir skladišten u salamuri s 10 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice od 5,39 do 5,60, dakle nešto više nego li u ovom radu. U tom istraživanju analize su provedene 1., 15., 30., 60. te 90. dan hladnog čuvanja, te je tijekom tog razdoblja pH vrijednost kod svih sireva padala do otprilike 4,90. Razlog viših izmjerenih pH vrijednosti može biti čuvanje u salamuri, pri čemu su sirevi čuvani u salamuri s većim udjelom soli imali viši pH.

#### *Koncentracija ukupnih fenola u svježem siru*



**Slika 12.** Koncentracija ukupnih fenola u svježim sirevima (mg g<sup>-1</sup>) u ovisnosti o količini dodanog ekstrakta

Određivanje ukupnih fenola u uzorcima proizvedenih sireva je provedeno primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm.

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u siru bez dodatka ekstrakta majčine dušice ili cvjetova bazge je očekivano najniža te iznosi 0,140 mg g<sup>-1</sup>. Najveća koncentracija fenolnih spojeva se nalazi u svježem siru s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 2 % i iznosi 0,196 mg g<sup>-1</sup>. U svježem siru s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 5 % koncentracija iznosi 0,164 mg g<sup>-1</sup>. U uzorcima sireva s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge, zabilježen je suprotan slučaj, gdje je veća koncentracija fenolnih spojeva zabilježena u svježem siru s 5 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge te iznosi 0,189 mg g<sup>-1</sup>. Kod 2 %-tnog dodatka ona iznosi 0,147 mg g<sup>-1</sup>.

Obzirom da je određivanjem ukupnih fenola određena koncentracija fenola 0,140 mg g<sup>-1</sup> za svježi sir bez dodatka ekstrakata, postavlja se pitanje što je reagiralo s Folin-Ciocalteu reagensom budući da svježi sir ne sadrži fenolne komponente.

F.C. reagens ne reagira samo s fenolima, već i sa svim redukcijskim tvarima. Ovaj reagens će također reagirati s nekim spojevima koji sadržavaju dušik, poput hidroksilamina i gvanidina (Ikawa i sur., 2003). Međutim, u svježem siru je koncentracija amina i spojeva s dušikom vrlo mala (Tratnik i Božanić, 2012) pa je pretpostavka da su s navedenim reagensom reagirali neki drugi spojevi prisutni u siru.

Provedena je temeljita studija (Everette i sur., 2010) za testiranje reaktivnosti Folin-Ciocalteu reagensa prema različitim spojevima. Od testiranih aminokiselina u istraživanju Everette i sur. (2010), samo su tirozin, triptofan i cistein pokazali značajnu reaktivnost prema F.C. reagensu, a svježi sir može biti vrlo važan izvor esencijalnih aminokiselina, pri čemu se konzumacijom tradicionalno proizvedenog sira mogu zadovoljiti zahtjevi organizma za svim esencijalnim aminokiselinama, osim metionina i cisteina jer se oni nalaze u sastavu proteina sirutke koja se tijekom proizvodnje sira odvaja (Tratnik i Božanić, 2012). Budući da svježi sir sadrži i triptofan i tirozin u količini većoj od referentnog proteina, moguće je da su oni odgovorni za reakciju s F.C. reagensom.

Također, s količinom masti u siru povezana je količina u masti topljivih vitamina (A, D, E, K) kojih može biti 5-8 puta više nego u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012). Istraživanje Everette i sur. (2010) pokazalo je kako neki derivati vitamina pokazuju značajnu reakciju prema F.C. reagensu (askorbinska kiselina, folna kiselina (B<sub>11</sub>), piridoksin (B<sub>6</sub>), retinoična

kiselina (derivat vitamina A), tiamin (B<sub>1</sub>) i Trolox (derivat vitamina E)). Budući da svježi sir sadrži tiamin, piridoksin i folnu kiselinu, oni također mogu biti odgovorni za reakciju s F.C. reagensom te time pojavu apsobrancije prilikom određivanja ukupnih fenolnih spojeva u siru.

Rezultati određivanja ukupnih fenola u proizvedenim sirevima ukazuju na to da se najveći antimikrobni učinak, koji se pripisuje fenolima, očekuje kod dodatka ekstrakta majčine dušice u svježi sir u količini od 2 %, a što će se u nastavku i pokazati rezultatima mikrobiološke analize.

#### 4.2. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Rezultati mikrobioloških analiza sirovog kravljeg mlijeka su prikazani u tablici 12. Rezultati su prikazani kao logaritamske vrijednosti broja kolonija po mL mlijeka ( $\log_{10}$  CFU g<sup>-1</sup>).

U tablici 13. se nalaze rezultati mikrobiološke analize proizvedenih svježih sireva. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja te kao logaritamske vrijednosti broja poraslih kolonija po gramu sira ( $\log_{10}$  CFU g<sup>-1</sup>). Crveno su označeni uzorci van granica Zakona (NN 81/13), odnosno Vodiča (2009).

##### *Mikrobiološka analiza sirovog mlijeka*

**Tablica 12.** Prosječne vrijednosti ( $\log$  CFU mL<sup>-1</sup>) parametara mikrobioloških analiza sirovog mlijeka (n=5)

Sirovo mlijeko (serija)		Mikroorganizam			
		Ukupan broj	Kvasci i plijesni	Enterobakterije	KPS*
1	log CFU mL <sup>-1</sup>	5,45	4,63	0	0
2		6,30	6,11	3,34	2,66
3		2,49	2,57	2,73	2,94
4		2,83	2,40	2,62	2,96
5		4,71	4,51	3,04	1,00
<b>Prosječna vrijednost</b>		<b>5,67</b>	<b>5,44</b>	<b>2,93</b>	<b>2,65</b>

\*KPS – koagulaza pozitivni stafilokoki

Ukupan broj mikroorganizama u analiziranim uzorcima mlijeka kreće se od 2,49 do 6,30 log CFU mL<sup>-1</sup> (Tablica 12). Svrstavanjem analiziranih serija mlijeka iz mljekomata u

razrede prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17), 2 uzorka pripadaju razredu I s  $\leq 100.000$  mikroorganizama  $\text{mL}^{-1}$ , dok ostala 3 uzorka pripadaju razredu II zbog broja mikroorganizama  $\text{mL}^{-1}$  koji premašuje vrijednost 100.000.

U radu Pikutić (2015), u kojem je istraživana kvaliteta sirovog mlijeka iz mljekomata, ukupan broj mikroorganizama kretao se od 4,36 do 7,36 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  pri čemu je od ukupno 12 ispitivanih uzoraka, samo njih 4 pripadalo razredu I s  $\leq 100.000$  mikroorganizama  $\text{mL}^{-1}$ . U istraživanju Mikulec i sur. (2016) provedenom na uzorcima sirovog mlijeka s 28 mljekomata u RH, samo 29,1 % analiziranih uzoraka sadržavalo je manje od 100.000 mikroorganizama  $\text{mL}^{-1}$ . Mikrobiološka analiza sirovog mlijeka (Telišman, 2017) iz istog mljekomata iz kojeg je uzeto mlijeko za proizvodnju sireva u ovom istraživanju, provedena prošle godine, pokazala je kako je ukupan broj mikroorganizama iznosio oko 8,32 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Također, istraživanja drugih autora (Habeš, 2002) dokazuju povećan broj mikroorganizama (5,34 do 7,69 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) koji ukazuje na veliku kontaminaciju mlijeka. Ovako visok stupanj zastupljenosti živih aerobnih bakterija ukazuje na loše higijensko-mikrobiološke uvjete u životinjskoj nastambi.

Određene vrijednosti za broj stanica kvasaca i plijesni kretale su se od 2,40 do 6,11 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ . U istraživanju Pikutić (2015) broj stanica kvasaca i plijesni u sirovom mlijeku kretao se od 4,14 do 6,31 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ , a u istraživanju Telišman (2017) oko 3,24 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ , dakle slično kao i u ovom radu.

Kvasci i plijesni rastu i razmnožavaju se pri nižim pH vrijednostima (pH 4-5), stoga sirovo mlijeko nije pogodan medij za njihov rast (analiziranim uzorcima mlijeka se pH vrijednost kretala od 6,70-6,82). Povećana prisutnost može biti posljedica nedovoljne higijene i nepravilnog rukovanja sirovim mlijekom što podrazumijeva zagrijavanje mlijeka na temperature koje pogoduju rastu i razmnožavanju kvasaca i plijesni (20-30 °C) (Tratnik i Božanić, 2012).

Količina enterobakterija u sirovom mlijeku se kretala od 2,62 do 3,34 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Njihovo prisustvo u mlijeku ukazuje na moguću fekalnu kontaminaciju te kontaminaciju zemljom i vodom. Povećani broj enterobakterija također je znak nedovoljne higijene prilikom rukovanja sirovim mlijekom te neadekvatne čistoće mljekomata.

U drugim istraživanjima broj enterobakterija se kretao od 1,67 do 6,93 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  (Pikutić, 2015), što je nešto više nego li u ovom radu, odnosno oko 2,06 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  (Telišman, 2017) što je nešto manje, ali slično kao u ovom radu. Također, slični rezultati

dobiveni su analizom sirovog mlijeka u istraživanju Habeš (2002) gdje se broj enterobakterija kretao oko  $2,18 \log \text{CFU mL}^{-1}$ .

Namirnice u kojima se utvrdi prisustvo enterobakterija se smatraju zdravstveno neispravnim. U znanstvenom mišljenju o javno zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka (HAH, 2006) opisano je istraživanje u kojem je ispitana kvaliteta mlijeka sa svih tada dostupnih mljekomata u RH. Istraživanje je trajalo godinu dana, ukupno je prikupljeno 87 uzoraka. *E. coli* O175 (VTEC ili STEC) te *Salmonella* spp. nisu utvrđene u uzorcima sirovog mlijeka. Davis i sur. (2014) u svom radu navode kako je u Engleskoj i Walesu u razdoblju 1992.-2002. od 27 epidemija čak 15 bilo uzrokovano konzumacijom nepasteriziranog mlijeka, uglavnom zbog prisutnosti sojeva vrste *Salmonella* spp. i *E. coli* VTEC O157 (Telišman, 2017).

Koagulaza pozitivni stafilocoki u analiziranom svježem sirovom mlijeku su bili prisutni u rasponu od 1,00 do  $2,96 \log \text{CFU mL}^{-1}$ . U mlijeku i mliječnim proizvodima je *S. aureus* najčešće prisutan zbog toga što u više od 90 % slučajeva uzrokuje klinički i supklinički mastitis muznih životinja (Markov i sur., 2009).

U istraživanju Habeš (2002) broj koagulaza pozitivnih stafilocoka u sirovom mlijeku kretao se od 1,46 do  $1,88 \log \text{CFU g}^{-1}$  što je slično kao i u ovom radu.

#### *Mikrobiološka analiza svježeg sira*

Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) propisano je da u uzorku svježeg sira broj kvasaca i plijesni, kao i bakterijske vrste *Echerichia coli*, mora biti manji od  $10^3 \text{CFU g}^{-1}$  ( $\log_{10} \text{CFU g}^{-1} = 3$ ). Zakonom (81/2013) je definirana maksimalno dopuštena granična vrijednost za koagulaza pozitivne stafilocoke u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka te iznosi  $10^5 \text{CFU g}^{-1}$  ( $\log_{10} \text{CFU g}^{-1} = 5$ ).

Iz tablice 13 je vidljivo kako je siru bez dodatka ekstrakata (kontrolni uzorak) trajnost do 5 dana, budući da 5. dan  $\log \text{CFU g}^{-1}$  kvasaca i plijesni premašuje graničnu dopuštenu vrijednost.

**Tablica 13.** Broj mikroorganizama (log CFU g<sup>-1</sup>) u uzorcima svježeg kravljeg sira tijekom čuvanja u hladnjaku (n=5)

Dan	Mikroorganizam	Uzorak				
		Kontrolni uzorak	Svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice		Svježi sir s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge	
			2%	5%	2%	5%
			log CFU g <sup>-1</sup>			
1	Ukupan broj	1,70	2,29	3,26	2,60	2,98
	Kvasci i plijesni	0	2,63	2,58	2,23	1,48
	Enterobakterije	0	0	2,90	2,30	0
	KPS	0	-0,30	0	2,30	2,90
5	Ukupan broj	3,67				
	Kvasci i plijesni	3,46	-	-	-	-
	Enterobakterije	0				
	KPS	0				
7	Ukupan broj		2,60	2,57	2,59	2,81
	Kvasci i plijesni		2,37	0	1,48	1,18
	Enterobakterije	-	2,18	2,00	4,08	2,18
	KPS		4,49	1,70	0	2,90
10	Ukupan broj		4,47	2,91	3,04	4,21
	Kvasci i plijesni		4,58	2,56	1,00	4,06
	Enterobakterije	-	0	4,03	2,40	1,70
	KPS		3,64	0	2,60	0
14	Ukupan broj		5,08	6,31	4,52	5,02
	Kvasci i plijesni		5,15	3,73	4,51	4,82
	Enterobakterije	-	3,93	4,07	2,00	4,03
	KPS		0	0	0	0

"-" analiza nije provedena

Obzirom da su rezultati mikrobiološke analize za proizvedene sireve varijabilni, usporedbom rezultata s kontrolnim uzorkom te prethodno navedenim graničnim dopuštenim



vrijednostima možemo zaključiti da je trajnost sireva s dodatkom ekstrakata 7-10 dana, ovisno o primjenjenom ekstraktu. Sedmog dana hladnog čuvanja svježi sir s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge ne zadovoljava uvjete Vodiča (2009) obzirom na prisutnost enterobakterija. Isti slučaj je sa svježim sirom s 5 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice 10. dana hladnog čuvanja, dok se istog dana čuvanja svježi sir s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice i sir s 5 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge, smatraju mikrobiološki neispravnim zbog povećanog broja kvasaca i plijesni. Nakon 10. dana hladnog čuvanja, niti jedan proizvedeni sir ne zadovoljava mikrobiološke uvjete.

Navedeni rezultati mikrobiološke analize su u skladu s rezultatima određivanja ukupnih fenola u svježem siru gdje je najmanja koncentracija fenola zabilježena u svježem siru s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge (slika 12). To je mogući razlog najkraće trajnosti tog sira u usporedbi s ostalim sirevima kod kojih je zabilježena veća koncentracija fenolnih spojeva.

U istraživanju Ereš (2010) je ekstrakt majčine dušice pokazao najjače inhibitorno djelovanje u periodu od 24 sata na rast patogenog kvasca *Candida albicans* u odnosu na ekstrakte cvjetova kultivirane i samonikle bazge budući da je sadržavao najveću koncentraciju ukupnih fenola (oko 5,00 mg mL<sup>-1</sup>). U ovome radu je u ekstraktu majčine dušice također određena veća koncentracija ukupnih fenola (4,25 mg mL<sup>-1</sup>) nego li u ekstraktu cvjetova bazge (2,14 mg mL<sup>-1</sup>), međutim prvog dana čuvanja je broj stanica kvasaca i plijesni bio neznatno veći u sirevima s dodatkom ekstrakta majčine dušice nego li cvjetova bazge što je suprotno rezultatima zabilježenim u radu Ereš (2010). Uzimajući u obzir sveukupne rezultate, a ne djelovanje samo na kvasce i plijesni, ipak je ekstrakt cvjetova bazge pokazao slabije antimikrobno djelovanje budući da je najkraća trajnost zabilježena kod svježeg sira s 2 %-tnim dodatkom tog ekstrakta.

U istraživanju Gaić (2011) je koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima sušene bazge niža nego u ovome radu (0,19 – 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, ovisno o lokalitetu), no turbidimetrijskom metodom utvrđeno je kako ekstrakt cvjetova bazge pokazuje inhibicijsko djelovanje na *E.coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. te *L. monocytogenes*. Značajnija antimikrobna aktivnost zabilježena je prema bakteriji *S. aureus* tijekom čitavog vremena inkubacije (72 sata), dok je kod ostalih bakterija nakon 48 sati došlo do pada antimikrobne aktivnosti. Slični rezultati postignuti su i u ovome radu gdje broj koagulaza pozitivnih stafilokoka niti u jednom siru tijekom 14 dana čuvanja nije premašio graničnu dopuštenu vrijednost, dok je kod ostalih

mikroorganizama s duljim vremenom skladištenja došlo do njihovog porasta, što znači da vremenom antimikrobni učinak dodanih ekstrakata prema tim mikroorganizmima slabi.

Radi predostrožnosti, uzorci su naciepljivani i 14. dan, a rezultati su pokazali kako su se dodatno van granica istaknuli i drugi mikrobiološki parametri. Nakon 10. dana hladnog čuvanja broj mikroorganizama raste. U svim uzorcima premašene su dopuštene vrijednosti za kvasce i plijesni, odnosno, u svim uzorcima svježeg sira, osim onog s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge, broj enterobakterija bio je iznad granične dopuštene vrijednosti.

U studiji Sağdıç i sur. (2017) se istraživao utjecaj dodatka ekstrakata majčine dušice i češnjaka na mikrobiološka svojstva sira od svježeg mlijeka tijekom zrenja. Kontrolni uzorak čuvan je tijekom 90 dana u salamuri, a sirevi s dodatkom navedenih ekstrakata čuvani su u salamuri pomiješanoj s tim ekstraktima. Rezultati mikrobiološke analize pokazali su kako je ukupan broj mikroorganizama tijekom prvog dana čuvanja velik i kreće se od 7,42 do 9,09 log CFU g<sup>-1</sup>, dok su se 90. dan skladištenja te vrijednosti kretale između 7 i 8. Dodatak ekstrakata češnjaka i majčine dušice u salamuru nije značajno utjecao na ukupan broj mikroorganizama tijekom skladištenja, odnosno zrenja. U ovom istraživanju, ukupan broj mikroorganizama se tijekom prvog dana čuvanja kretao od 1,70 do 3,26 log CFU g<sup>-1</sup>, što je znatno niže nego li u istraživanju Sağdıç i sur., a tijekom čuvanja je u svim uzorcima zabilježen porast, najviše do 6,31 log CFU g<sup>-1</sup> (svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 5 %).

Broj stanica kvasaca i plijesni se kretao od 2,33 do 4,51 log CFU g<sup>-1</sup>, pri čemu je dodatak ekstrakta češnjaka u salamuru potpuno inhibirao rast kvasaca i plijesni nakon 60. dana skladištenja, dok je kod ostalih uzoraka zabilježen porast stanica (Sağdıç, 2017). U ovom istraživanju se broj stanica kvasaca i plijesni tijekom prvog dana kretao od 0,00 do 2,63 log CFU g<sup>-1</sup>, što je također znatno niže nego li u istraživanju Sağdıç i sur. U kontrolnom uzorku je broj stanica već 5. dan čuvanja premašivao graničnu dopuštenu vrijednost propisanu Vodičem (2009), dok je u sirevima s dodatkom ekstrakata takav slučaj zabilježen 10. dan čuvanja za svježe sireve s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice, odnosno 5 %-tnog dodatka ekstrakta cvjetova bazge. 14. dan hladnog čuvanja je kod svih uzoraka broj kvasaca i plijesni bio iznad granične dopuštene vrijednosti.

Broj stanica enterobakterija se u istraživanju Sağdıç i sur. tijekom prvog dana čuvanja kretao od 6,18 do 7,31 log CFU g<sup>-1</sup>, a tijekom skladištenja je uočeno značajno smanjenje kod svih uzoraka, pri čemu je najveći inhibitorni učinak postignut dodatkom mješavine ekstrakata majčine dušice i češnjaka. U ovom istraživanju se taj broj tijekom prvog dana čuvanja kretao

od 0,00 do 2,90 log CFU g<sup>-1</sup>, što je znatno niže, a povećan broj stanica enterobakterija zabilježen je najprije (7. dan čuvanja) u uzorku svježeg sira s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge. U ostalim uzorcima je porast zabilježen 10., odnosno 14. dan čuvanja (Tablica 13).

Broj stanica koagulaza pozitivnih stafilocoka se prvog dana čuvanja kretao od 5,18 do 6,74 log CFU g<sup>-1</sup>, a tijekom skladištenja je kod svih uzoraka došlo do smanjenja pri čemu se taj broj kretao ispod granice detekcije nakon 60. dana skladištenja (Sağdıç, 2017). Öner i sur. (2006) su utvrdili da, iako su sve mikrobne skupine (plijesni, kvasci, enterobakterije, sfafilokoki) i dalje bile pirustne u uzorcima sira, njihov broj se progresivno smanjivao tijekom zrenja. U ovom istraživanju broj stanica koagulaza pozitivnih stafilocoka niti jedan dan čuvanja nije premašivao graničnu dopuštenu vrijednost propisanu Zakonom (81/2013).

U istraživanju Sabljak i sur. (2013), od ukupno 12 ispitivanih uzoraka svježeg kravljeg sira, 3 uzorka nisu bila ispravna već prvog dana čuvanja. U sva 3 uzorka broj stanica koagulaza pozitivnih stafilocoka premašivao je graničnu dopuštenu vrijednost (5 log CFU g<sup>-1</sup>). Nakon šest dana čuvanja četiri uzorka sira bila su mikrobiološki ispravna, što znači da je od početnih 12 uzoraka 33,3 % ispravno nakon šestog dana čuvanja. U ovom se istraživanju proizvedeni svježi sir bez dodatka ekstrakata smatra mikrobiološki ispravnim do 5. dana čuvanja.

Usporedbom rezultata svih proizvedenih sireva, procijenjeno je da se mikrobiološki najboljim pokazao 2 %-tni dodatak ekstrakta majčine dušice.

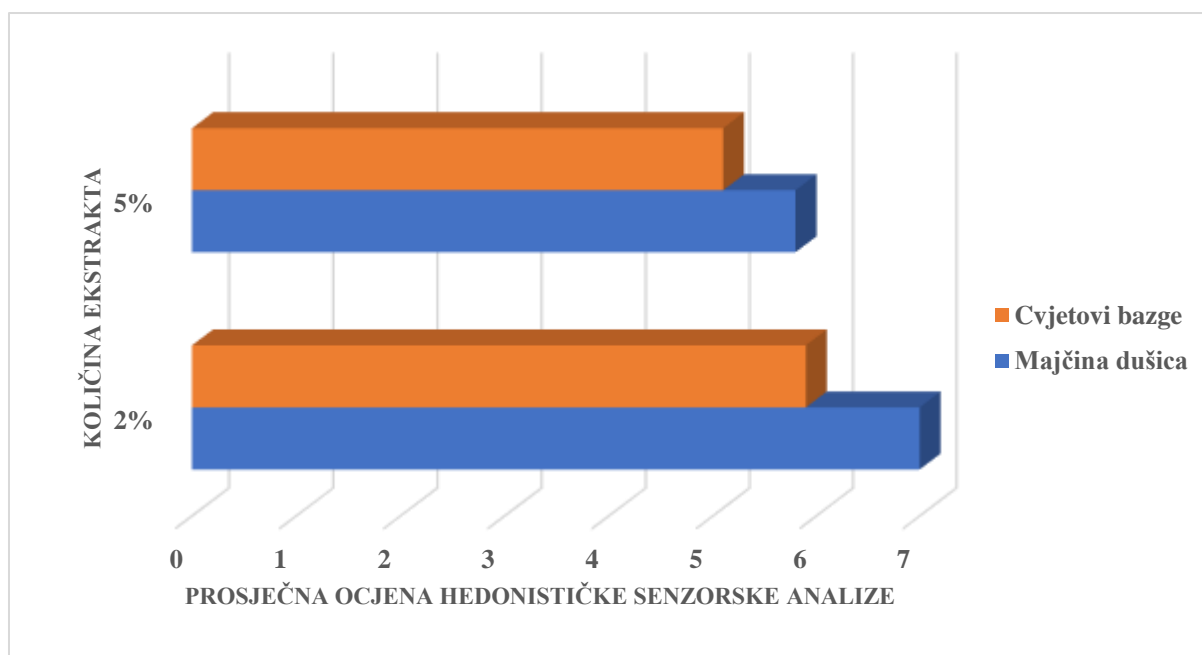
#### **4.3. REZULTATI SENZORSKE ANALIZE**

Senzorsku analizu je provodilo 5 ocjenjivača pri čemu je senzorski ocjenjivana boja sireva, konzistencija, miris i okus (tablica 14). Također, 28 ocjenjivača je provelo hedonističku senzorsku analizu prihvatljivosti sireva, a rezultati su prikazani slikom 13. Senzorska analiza je provedena samo prvog dana čuvanja sireva.

Od ukupno četiri uzorka sira, najveće ocjene u obje analize je postigao svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 2 %, dok je najlošije ocjenjen svježi sir s 5 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge (tablica 14). Hedonističkom senzorskom analizom (slika 13) se prihvatljivim pokazao jedino sir s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta majčine dušice budući da je ukupna prosječna ocjena iznosila 7,0 što se smatra minimalnom granicom kojom se proizvod smatra prihvatljivim. Obzirom da je prosječna ocjena za sve ostale sireve niža od 7, oni se kao takvi smatraju neprihvatljivim od strane potrošača (Stone i sur., 2012).

**Tablica 14.** Ocjene senzorskih karakteristika svježih sireva (n=4) prvog dana čuvanja

Uzorak	Dodatak ekstrakta (%)	Ocjenjivano svojstvo	Prosječna ocjena (max. 5)	Prosječan broj bodova	Ukupni postignuti ponderirani bodovi (max. 20)
Svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice	2	Boja	3,8	3,8	<b>16,9</b>
		Konzistencija	4,6	4,6	
		Miris	3,9	2,0	
		Okus	4,3	6,5	
	5	Boja	2,8	2,8	<b>14,9</b>
		Konzistencija	3,7	3,7	
		Miris	4,2	2,1	
		Okus	4,2	6,3	
Svježi sir s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge	2	Boja	3,8	3,8	<b>15,6</b>
		Konzistencija	4,6	4,6	
		Miris	3,7	1,9	
		Okus	3,5	5,3	
	5	Boja	2,6	2,6	<b>13,5</b>
		Konzistencija	4,0	4,0	
		Miris	3,8	1,9	
		Okus	3,3	5,0	



**Slika 13.** Hedonistička senzorska analiza privatljivosti sireva (n=4)

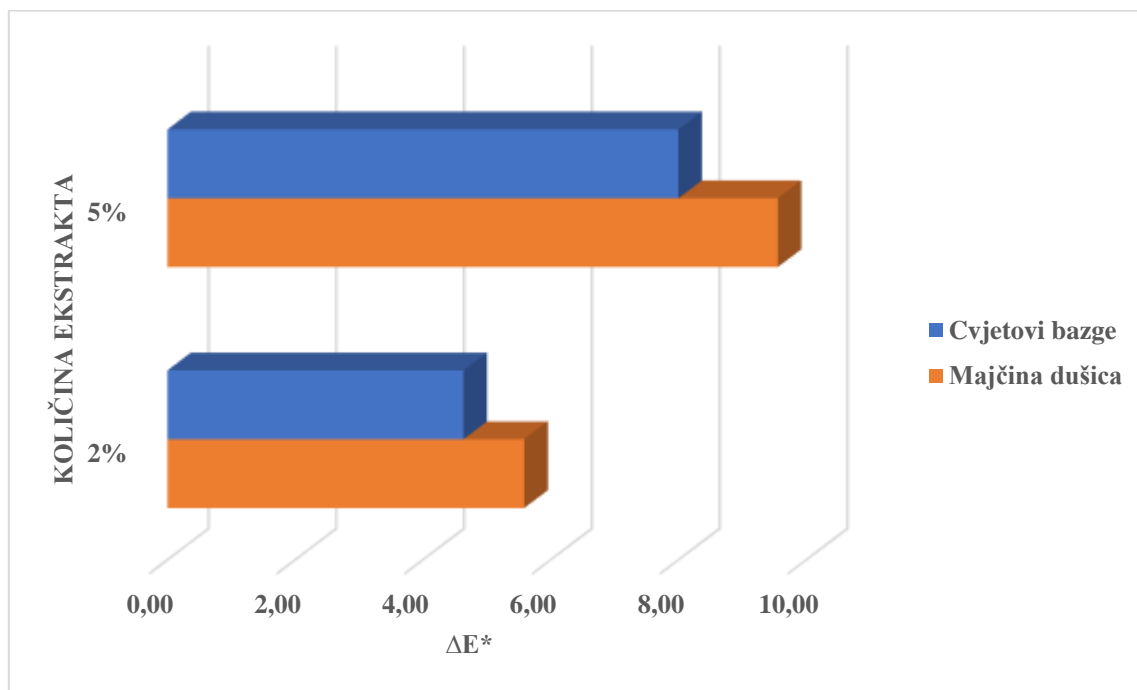
Kod senzorske analize su ocjenjivači naveli kako kod svježeg sira s 2 %-tnim dodatkom ekstrakta cvjetova bazge prevladava miris same bazge. Boja svježeg sira s 5 %-tnim dodatkom istog ekstrakta opisana je kao siva, a konzistencija gnjecava. Sveukupno, komentari ocjenjivača su se ponajviše odnosili na boju sireva, pri čemu su sirevi s dodatkom manje količine ekstrakata (2 %) bili bolje ocijenjeni. Obzirom na rezultate senzorske i mikrobiološke analize, može se zaključiti kako se najboljim pokazao 2 %-tni dodatak ekstrakta majčine dušice u svježi sir.

Senzorska analiza provedena u istraživanju Bleoancă i sur. (2016) pokazala je kako potrošači vole kombinaciju svježeg sira s ekstraktom majčine dušice, ali koja sadrži manje količine timola i karvakrola. Test je pokazao da je granica prihvatljivosti koncentracije ekstrakta majčine dušice dva puta niža od one minimalne koncentracije koja je potrebna da bi u siru izazvala inhibicijski učinak protiv *L. monocytogenes*. Ona iznosi 0,2 % (v/v) što je 10 puta niže od koncentracije korištene za proizvodnju sira s dodatkom ekstrakta majčine dušice u ovom radu, a koji se na temelju rezultata senzorske analize smatra jedinim prihvatljivim (2 %-tni dodatak).

#### *Rezultati mjerenja boje*

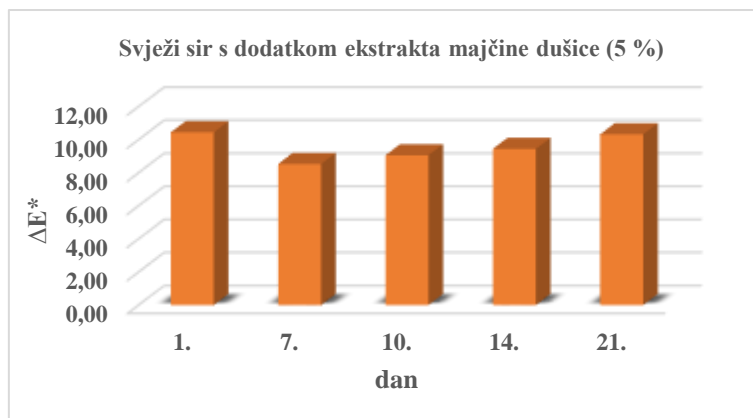
Promjena boje ( $\Delta E^*$ ) je izražena u odnosu na referentni uzorak, odnosno uzorak bez dodatka ekstrakta – promjena boje je manja kod svježih sireva s dodatkom manje količine ekstrakata (2 %) nego li kod onih s dodatkom veće količine (5 %), iz čega se može zaključiti

da su oni bojom sličniji referentnom uzorku (slika 14). U skladu s time su i rezultati senzorske analize prema kojima su sirevi s manjom količinom dodanog ekstrakta, pa tako i s manjom promjenom boje, ocijenjeni kao prihvatljiviji.

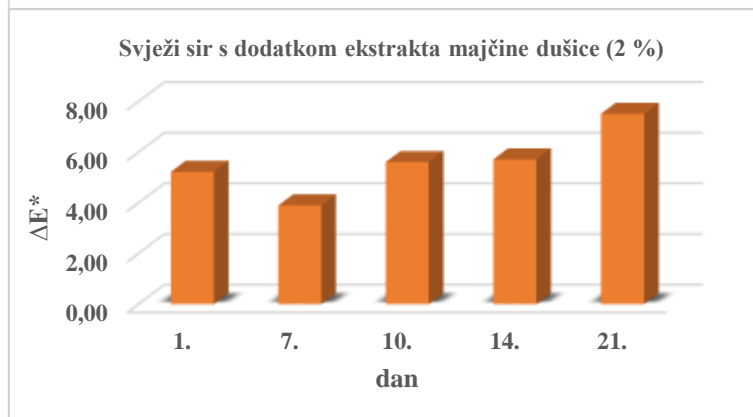


**Slika 14.** Prosječna vrijednost promjene boje ( $\Delta E^*$ ) u ovisnosti o količini dodanog ekstrakta (% v/v)

a)



b)



c)



d)



**Slika 15.** Promjena  $\Delta E^*$  u ovisnosti o trajanju skladištenja (dan) za proizvedene svježe sireve s dodatkom 5 % ekstrakta majčine dušice (a), odnosno bazge (c) ili s dodatkom 2% ekstrakta majčine dušice (b), odnosno bazge (d)

Iz grafova koji prikazuju promjenu boje (slika 15) u ovisnosti o trajanju skladištenja, vidljivo je da kod sireva s 5 %-tnim dodatkom ekstrakta nema značajnijih, naglih promjena boje tijekom vremena, dok se kod sireva s manjim dodatkom ekstrakta boja mijenja.  $\Delta E^*$  s vremenom raste, što znači da duljim vremenskim periodom čuvanja dolazi do većih promjena boje.

**Tablica 15.** Prosječne vrijednosti  $L^*a^*b^*$  sustava svježih sireva tijekom 21 dana čuvanja

Uzorak	Količina ekstrakta (%)	Prosječna vrijednost parametara $L^*a^*b^*$		
		$L^*$	$a^*$	$b^*$
Kontrolni uzorak	-	95,43	-0,78	9,37
Svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice	2	90,75	-0,17	12,35
	5	87,98	0,34	15,21
Svježi sir s dodatkom ekstrakta cvjetova bazge	2	91,29	0,03	11,11
	5	88,41	0,44	12,90

$L^*$  predstavlja svjetlinu, odnosno skalu sive boje, pri čemu je vrijednost 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijela – iz tablice 17. vidljivo je da su  $L^*$  vrijednosti sireva s dodatkom manje količine ekstrakta bliže vrijednosti 100, tj. bliže su bijeloj boji koja karakterizira svježi sir. Sukladno tome, referentni uzorak bez dodatka ikakvog ekstrakta ima najvišu vrijednost  $L^*$ .  $L^*$  vrijednost se tijekom vremena smanjuje, što znači da dužim čuvanjem sir postaje tamniji.

Parametar  $a^*$  ima raspon vrijednosti od -100 do +100, gdje negativne vrijednosti označavaju približavanje zelenoj boji, dok pozitivne vrijednosti označavaju približavanje crvenoj boji. Izmjerene vrijednosti parametra  $a^*$  su nešto veće za uzorke svježeg sira s većim dodatkom ekstrakta, ali za sve sireve se vrijednost kreće blizu 0 (tablica 15).

Parametar  $b^*$  ima isti raspon vrijednosti, gdje -100 označava čisto plavu, a +100 čisto žutu boju. Svim uzorcima je izmjerena vrijednost veća od 0, s time da je za referentni uzorak vrijednost najmanja, odnosno njega karakterizira manje žuta boja naspram ostalih uzoraka. Sirevi s 5 %-tnim dodatkom ekstrakata imaju veće izmjerene vrijednosti parametra  $b^*$ , što znači da se povećanjem količine dodanog ekstrakta povećava i vrijednost parametra  $b^*$ , odnosno sir je žući (tablica 15).



Vrijednosti  $L^*a^*b^*$  i  $\Delta E^*$  za uzorke s dodatkom ekstrakata u količini od 5 % više odstupaju od vrijednosti za referentni uzorak nego li one s manjim dodatkom ekstrakata, pa su sukladno tome i rezultati senzorske analize pokazali da su sirevi s 5 %-tnim dodatkom ekstrakata bojom, odnosno izglednom, manje prihvatljiviji.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata fizikalno-kemijske, mikrobiološke i senzorske analize uzoraka svježeg kravljeg sira proizvedenog na tradicionalan način uz dodatak vodenih ekstrakata, te provedene rasprave mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Povećan ukupan broj mikroorganizama ( $2,49 - 6,30 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) ukazuje na veliku kontaminaciju mlijeka te loše higijensko-mikrobiološke uvjete u proizvodnji mlijeka. Povećana prisutnost stanica kvasaca i plijesni ( $2,40 - 6,11 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) može biti posljedica nedovoljne higijene i nepravilnog rukovanja sirovim mlijekom, a povećana prisutnost enterobakterija ( $2,62 - 3,34 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) ukazuje na moguću fekalnu kontaminaciju te kontaminaciju zemljom i vodom.
- 2) Najveća koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima majčine dušice ( $4,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i cvjetova bazge ( $2,14 \text{ mg mL}^{-1}$ ) primjenom visokotlačne tekućinske ekstrakcija (PLE) postignuta je primjenom više temperature ekstrakcije ( $160 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te većeg broja ciklusa (3).
- 3) Trajnost svježeg kravljeg sira bez dodatka ekstrakata je procijenjena na 5 dana budući da je broj izraslih kolonija (kvasaca i plijenski) nakon petog dana bio iznad maksimalno dopuštenog.
- 4) Prema mikrobiološkim parametrima, trajnost svježih kravljih sireva s dodatkom 2% i 5% ekstrakata majčine dušice i 5% ekstrakta cvjetova bazge, je bila 10 dana, dok je trajnost sira s dodatkom 2% ekstrakta cvjetova bazge bila 7 dana. Sukladno tome može se zaključiti da se trajnost svježeg sira dodatkom navedenih ekstrakata produljuje.
- 5) Najveću koncentraciju ( $0,196 \text{ mg g}^{-1}$ ) fenolnih spojeva sadržavao je svježi sir s dodatkom ekstrakta majčine dušice u količini od 2 %, što je vjerojatno rezultiralo najduljom trajnošću ovog uzorka.
- 6) Senzorska analiza je pokazala da se prihvatljivim smatra samo svježi sir s 2 %-tnim dodatkom ekstrakt majčine dušice, dok ostali sirevi nisu zadovoljili minimalnu potrebnu ocjenu od 7,0 bodova.

## 6. LITERATURA

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 261-265.

Alezandro, M. R., Lui, M. C. Y., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. (2011) Commercial spices and industrial ingredients: evaluation of antioxidant capacity and flavonoids content for functional foods development. *Ciência. Tecnol. Aliment.* **31**, 527-533.

Anonymous 1 (2018) Dionex ASE 350, <[https://www.google.com/search?q=Unsurpassed+Extraction+Technology+Accelerated+Solvent+Extraction&client=opera&hs=D1o&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjG\\_NH9nczbAhUEJ1AKHSxFCrAQ\\_AUICigB&biw=1473&bih=731#imgdii=kFgsl2UjlrpOVM:&imgrc=HCN5Fj5hhnjcLM](https://www.google.com/search?q=Unsurpassed+Extraction+Technology+Accelerated+Solvent+Extraction&client=opera&hs=D1o&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjG_NH9nczbAhUEJ1AKHSxFCrAQ_AUICigB&biw=1473&bih=731#imgdii=kFgsl2UjlrpOVM:&imgrc=HCN5Fj5hhnjcLM)>. Pristupljeno 10. lipnja 2018.

Anonymous 2 (2018) Majčina dušica, <<https://www.plantea.com.hr/majcina-dusica/>>. Pristupljeno 17. svibnja 2018.

Anonymous 3 (2018) Majčina dušica, <[https://www.google.com/search?q=majčina+dušica&client=opera&hs=2zV&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiO6dnPjO\\_bAhUqKpoKHSwcBgMQ\\_AUICigB&biw=717&bih=664](https://www.google.com/search?q=majčina+dušica&client=opera&hs=2zV&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiO6dnPjO_bAhUqKpoKHSwcBgMQ_AUICigB&biw=717&bih=664)>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Anonymous 4 (2018) Bazga, <[https://www.google.com/search?q=bazga&client=opera&hs=K9T&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiS\\_9uQ8u7bAhUFGewKHX3TBTtoQ\\_AUICigB&biw=1473&bih=731#imgrc=DCIFAiWBg8iuaM](https://www.google.com/search?q=bazga&client=opera&hs=K9T&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiS_9uQ8u7bAhUFGewKHX3TBTtoQ_AUICigB&biw=1473&bih=731#imgrc=DCIFAiWBg8iuaM)>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.

Anonymous 5 (2018) Kjeltec sustav, <<https://www.ebay.co.uk/itm/FOSS-KJELTEC-SYSTEM-1002-DISTILLING-UNIT-/202260655956>>. Pristupljeno 10. lipnja 2018.

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Shetty, K. (2007) Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emerg.* **8**, 46-54.

Bleoancă, I., Saje, K., Mihalcea, L., Oniciuc, E-A., Smole-Mozina, S., Nicolau, A. I., Borda, D. (2016) Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese – A hurdle approach. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **38**, 7-14.

Bolton, F. J., Crozier, L., Wiliamson, J. K. (2000) Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 317-321.

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

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčić, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **21**, 1-38.

Cox, J. (2000) *Salmonella*. U: Encyclopedia of Food Microbiology (Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., ured). Accademic Press, Cambridge, str. 1928-1937.

Ereš, M. (2010) Utjecaj ekstrakata bazge i majčine dušice na rast patogenog kvasca *Candida albicans*. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010) Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes towards the Folin-Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8139-8144.

Fontana, A. R., Antonioli, A., Bottini, R. (2015) Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8987-9003.

Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C. (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH center dot radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **69**, 2309-2314.

Gaić, P. (2011) Inhibicija rasta patogenih mikroorganizama pomoću cvijeta bazge. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Grlić, Lj. (2005) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Ex libris, Rijeka.

Habeš, S. (2002) Kvalitativno-kvantitativna analiza biodiverziteta mikroorganizama sirovog i pasteriziranog mlijeka. *Mljekarstvo* **52**, 291-313

Halliwell, B. (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Res. Com.* **9**, 1-32.

Han X., Shen T., Lou H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int.. J. Mol. Sci.* **8**, 950-988

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

Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Brunton, N. P. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.* **126**, 339-346.

Huang, D. J., Ou, B. X., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856.

Hudec J., Bakoš D., Mravec D., Kobida L. U., Burdová M., Turianica I., Hlušek J. (2006) Content of phenolic compounds and free polyamines in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) after application of polyamine biosynthesis regulators. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3625-3628.

Hui, Y. H., Goddik, L. M., Hansen, A. S., Josephson, J., Nip, W., Stanfield, P. S., Toldra, F. (2004) *Handbook of food and beverage fermentation technology*, Marcel Dekker, New York.

Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., Sasner, J. J. (2003) Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **51(7)**, 1811-1815.

Jemrić, T. (2007) *Bazga: važnost, uporaba i uzgoj*. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.

Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garica, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2014) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561-567.

Jimenez, A., Selga, A., Torres, J. U., Julia, L., (2004). Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Org. Lett.* **6**, 4583-4586.

Josipović, R., Medverec Knežević, Z., Frece, J., Markov, K., Kazazić, S., Mrvčić, J. (2015) Improved Properties and Microbiological Safety of Novel Cottage Cheese Containing Spices. *Food Technol. Biotechnol.* **53**, 454-462.

Kirin, S. (1980) Domaće vrste sireva Bilogorsko-podravske regije i mogućnosti njihove industrijske proizvodnje. *Mljekarstvo* **30**, 111-116.

- Kirin, S. (2009) Bjelovarski domaći svježi meki sir. *Mljekarstvo* **59**, 148-154.
- Kirin, S. (2016) *Sirarski priručnik*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Konica-Minolta (1998) *Precise color communication: Color control from perception to instrumentation*, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka
- Lancaster, J. E., Lister, C. E., Reay, P. F., Triggs, C. M. (1997) Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **122**, 594-598.
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo* **59**, 225-231.
- Mikulec, N., Radeljević, B., Zamberlin, Š., Špoljarić, J., Kesić Horvat, I., Krga, M., Antunac, N., Dobranić, V., Zdolec, N. (2016) Kontrola kvalitete mlijeka iz mljekomata u cilju povećanja konkurentnosti proizvođača mlijeka. U: 42. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, (Volarić, V., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 73-74.
- Miron, T. L., Plaza M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *J. Chromatogr. A*, 4918-4927.
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., Łysiak, G. P. (2018) Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *J. Funct. Foods.* **40**, 377-390.
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., Bakri, M. M. (2017) Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi. J. Biol. Sci.* **25** (2), 361-366.
- Mottaleb, M. A., Sarker, S. D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. U: *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (Sarker, S. D. i Nahar, L., ured.), Springer Science & Business media, LLC, str. 75-87.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Act.* **703**, 8-18.

Obradović, D. (2016) Izolacija bioaktivnih spojeva iz stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Öner, Z., Karahan, A. G., Aloğlu, H. (2006) Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *Food. Sci. Technol.* **39**, 449-454.

Otočan, V. (2005) Kakvoća probiotičkog svježeg sira tijekom čuvanja. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Pleša, M. (2012) Razmnožavanje bazge (*Sambucus nigra* L.). Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.

Pikutić, M. (2015) Kvaliteta sirovog mlijeka iz mljekomata. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (2017a) *Narodne novine* **64**, Zagreb.

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009) *Narodne novine* **20**, Zagreb.

Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2017b) *Narodne novine* **27**, Zagreb.

Sabadoš, D. (1996) Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, 2. dopunjeno izdanje, Hrvatsko mljekarsko društvo RH, Zagreb.

Sabljak, V., Lisak-Jakopović, K., Barukčić, I., Pejaković, A., Božanić, R. (2013) Određivanje trajnosti tradicionalnog svježeg sira. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **8**, 115-122.

Sağdıç, O., Cankurt, H., Törnük, F., Arıcı, M. (2017) Effect of Thyme and Garlic Aromatic Waters on Microbiological Properties of Raw Milk Cheese. *J. Tekirdag Agr. Faculty.* **14**, 22-33.

Samaržija, D., Damjenović, S., Pogačić, T. (2007a) *Staphylococcus aureus* u siru. *Mljekarstvo* **57**, 31-48.

Samaržija, D., Podoreški, M., Sikota, S., Skelin, A., Pogačić, T., (2007b) Mikroorganizmi – uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **57**, 251-273.

Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy, R., G., Señorans, F. J. i sur. (2009) Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain

potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Food Sci. Technol.* **42**, 1213-1218.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Corke, H. (2011) Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *J. Med. Food.* **14**, 284-290.

Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Sobota Šalamon, B., Božanić, R., Dobša, J. (2010) Analiza varijabli koje utječu na mikrobiološku kvalitetu u proizvodnji svježeg sira. *Mljekarstvo* **60**, 252-259.

Stahl-Biskup, F. (2004) Thyme. U: Handbook of herbs and spices (Peter, K.V., ured.), Woodhead publishing Ltd., Cambridge, str. 499-525.

Stone, H., Bleibaum, R., Thomas, H. (2012) Sensory Evaluation Practices, 4. izd., Elsevier Academic Press, London/New York, 291-325.

Telišman, A. (2017) Kontrola kvalitete mlijeka iz mljekomata na području Zagrebačke županije. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Tomas, A. (2011) Karakterizacija proizvodnje autohtonih sireva na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.

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

Tremonte, P., Tiapldi, L., Succi, M., Pannella, G., Falasca, L., Capilongo, V., Coppola, R., Sorrentino, E. (2014) Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *J. Dairy Sci.* **97**, 5-6.

Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.

Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J. M., Huard, C., Pepin, M. (2003) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **96**, 69-79.



- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 584-640.
- Veeru, P., Kishor, M. P., Meenakshi, M. (2009) Screening of medicinal plant extract for antioxidant activity. *J. Med. Plants. Res.* **3**, 608-612.
- Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb.
- Vranko, M. (2005) Kontrola kvalitete probiotičkog svježeg sira. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Review Article, *Trends Food Sci.Tech.* **17** (6), 300-312.
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. (2012) Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.* **46**, 505-513.
- Yong Ju, Z., Howard, L. R. (2003) Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5207-5213.
- Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013) *Narodne novine* **81**, Zagreb.
- Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., AyadiTrabelsi, M., Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc'h, Y. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem.* **184**, 131-139.
- Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S., Osman, H. (2009) An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE). *Food Sci. Technol.* **42**, 233-238.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

---

Katarina Lovrić