

Biokemijske promjene tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži

Lojbl, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:802159>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**BIOKEMIJSKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA
SIREVA U ŽIVOTINJSKOJ KOŽI**

DIPLOMSKI RAD

Tihana Lojbl

Zagreb, rujan, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

**BIOKEMIJSKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA
SIREVA U ŽIVOTINJSKOJ KOŽI**

DIPLOMSKI RAD

Tihana Lojbl

Mentor: doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit

Zagreb, rujan, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Tihana Lojbl**, JMBAG 0178103054, rođena dana 25.05.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

BIOKEMIJSKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA SIREVA U ŽIVOTINJSKOJ KOŽI

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Tihana Lojbl**, JMBAG 0178103054, naslova

BIOKEMIJSKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA SIREVA U ŽIVOTINJSKOJ KOŽI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Milna Tudor Kalit mentor

2. prof. dr. sc. Samir Kalit član

3. doc. dr. sc. Nataša Mikulec član

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Milni Tudor Kalit na predloženoj temi, uloženom trudu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj kolegici i prijateljici Dani Jandi koja je iz mene izvukla ono najbolje i pokazala mi što znači biti prijatelj.

Iskreno hvala mojoj dragoj osobi Isrenu na potpori i razumijevanju. Hvala ti što si bio moj oslonac tijekom ovih godina studiranja.

Osobito želim zahvaliti svojim roditeljima Mariju i Mirjani i baki Mariji koji su mi pružili bezuvjetnu ljubav i podršku kroz sve godine mog školovanja. Vi ste moj dokaz da su upornost i odgovornost vrline velikih ljudi. Ovaj rad naš je zajednički uspjeh i posvećujem ga Vama.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Zrenje sira.....	3
2.1. Djelovanje enzima tijekom zrenja sira	3
2.2. Primarno zrenje.....	4
2.3. Sekundarno zrenje	5
3. Biokemijski procesi tijekom zrenja sira.....	6
3.1. Proteoliza.....	6
3.1.1. Katabolizam aminokiselina	7
3.2. Lipoliza	8
3.3. Glikoliza	8
3.3.1. Metabolizam citrata	9
4. Tradicionalni sirevi	11
4.1. Siraštvo u Hrvatskoj.....	12
4.2. Kvaliteta mlijeka za sirenje	12
5. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži.....	14
5.1. Priprema kože u kojoj sir zrije.....	14
5.2. Sir iz mišine	17
5.2.1. Karakteristike sira.....	17
5.2.2. Proizvodnja sira iz mišine.....	19
5.3. Sir iz mijeha	20
5.3.1. Karakteristike sira.....	20
5.4. Tulum sir	21
5.4.1. Karakteristike sira.....	21
5.4.2. Proizvodnja tulum sira.....	23
5.5. Darfiyeh sir	23
5.5.1. Karakteristike sira.....	23
5.5.2. Proizvodnja darfiyeh sira	24
5.6. Bouhezza sir	25
5.6.1. Karakteristike sira.....	25
5.6.2. Proizvodnja bouhezza sira.....	25
6. Fizikalno-kemijske karakteristike sireva koji zriju u životinjskoj koži.....	26
7. Biokemijske promijene tijekom zrenja sira u koži	29
7.1. Proteoliza.....	29

7.2. Lipoliza	34
8. Aromatski spojevi u sirevima koji zriju u životinjskoj koži.....	37
9. Mikrobiološke karakteristike sireva koji zriju u koži	41
10. Zaključak	43
11. Literatura	44
12. Životopis autora.....	48

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Tihane Lojbl** naslova

BIOKEMIJSKE PROMJENE TIJEKOM ZRENJA SIREVA U ŽIVOTINJSKOJ KOŽI

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži proizvode se u nekoliko zemalja svijeta i pripadaju tradicionalnim vrstama sireva. Tehnologija proizvodnje nije standardizirana, a i razlikuje se ovisno o državi proizvodnje i vrsti mlijeka koja se koristi za sirenje. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži proizvode se na području Hrvatske (sir iz mišine), Bosne i Hercegovine, Crne Gore (sir iz mijeha), Turske (tulum), Alžira (bouhezza) i Libanona (darfiyeh). Zajednička posebnost ovih vrsta sireva upravo je zrenje u jarećoj/janjećoj koži. Životinjska koža predstavlja medij u kojem sir zrije u anaerobnim uvjetima uz prisustvo prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline, drugih bakterija nestarterske mikroflore te kvasaca i plijesni koji zbog permeabilnosti životinjske kože čine sekundarnu mikrofloru sira. Takvu vrstu sireva karakterizira pikantan i izraženi okus, miris i aroma te specifična tekstura. Svojstva sireva koji zriju u koži zamjetno se razlikuju od sireva koji zriju u kori. Intenzivni procesi lipolize i proteolize koji se odvijaju u siru tijekom zrenja u životinjskoj koži odgovorni su za ta karakteristična svojstva. Cilj ovog rada je prikazati specifičnosti proteolitičkih i lipolitičkih promjena tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži te njihov utjecaj na senzorne karakteristike okusa, mirisa i teksture.

Ključne riječi: zrenje sira, senzorne karakteristike, životinjska koža, mišina, proteoliza, lipoliza

Summary

Of the master's thesis – student **Tihana Lojbl**, entitled

BIOCHEMICAL CHANGES DURING CHEESE RIPENING IN ANIMAL SKIN

Cheeses ripened in animal skin are produced in several countries around the world and belong to the group of traditional types of cheese. The technology of production is not standardized and depends on the country of production and the type of milk which is used for cheese making. Cheeses ripened in animal skin are produced in Croatia (Sir iz mišine), Bosnia and Herzegovina, Montenegro (Sir iz mijehe), Turkey (Tulum), Lebanon (Darfiyeh) and Algeria (Bouhezza). The common of these cheeses is ripening in lamb/goat skin. Animal skin presents a medium in which cheese ripened in anaerobic conditions in a presence of natural microbiota lactic acid bacteria, other non starter lactic acid bacteria, yeasts and molds that present a secondary microflora due to permeability of animal skin. This type of cheese is characterized by a piquant and expressed taste, smell, aroma and specific texture. Cheese in a sack have different characteristics in comparison with cheese ripened in a rind. Intensive processes of lipolysis and proteolysis that take place in the cheese during ripening in the animal skin are responsible for creating characteristics of this type of cheese. The aim of this paper is to show the specificities of proteolytic and lipolytic changes during cheese ripening in animal skin and their influence on the sensory characteristics of taste, smell and texture.

Keywords: cheese ripening, sensory properties, cheese in a sack, animal skin, proteolysis, lipolysis

1.Uvod

U svijetu se proizvodi nekoliko vrsta sireva čije se zrenje odvija u životinjskoj koži. Postoje određene razlike u tehnologiji proizvodnje i vrsti mlijeka koje se koristi. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži proizvode se na području Hrvatske (sir iz mišine), Bosne i Hercegovine, Crne Gore (sir iz mijeha), Turske (tulum), Alžiru (bouhezza) i Libanona (darfiyeh). Tehnologija proizvodnje još uvijek nije standardizirana, te se često mogu naći razlike u određenim fazama proizvodnje ovisno o gospodarstvu na kojem se sir proizvodi. Izuzetno je važna i kvaliteta mlijeka za sirenje, jer u konačnici ona utječe na kvalitetu sira. S obzirom na navedeno, kod sireva koji zriju u koži zbog intenzivnih biokemijskih procesa zrenja sira posebnu pažnju treba pridati kvaliteti mlijeka ukoliko se ne primjenjuje toplinska obrada mlijeka.

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži pripadaju skupini tradicionalnih sireva koje karakterizira snažna povezanost s prostorom na kojem su nastali, te utjecaj kulture i povijesti ljudi tog prostora. Razlog današnje proizvodnje takvih sireva upravo je prenošenje znanja i vještina s generacije na generaciju. Provođenjem istraživanja i standardizacijom proizvodnje moguće je očuvati kulturnu baštinu i potvrditi autentičnost sireva koji zriju u životinjskoj koži. Samim time postižu se preduvjeti za zaštitu sireva oznakama izvornosti. U Republici Hrvatskoj poznato je oko trideset različitih vrsta autohtonih sireva od kojih posebno mjesto zauzimaju sirevi od ovčjeg mlijeka. Ovčje mlijeko ima gotovo dva puta veći randman od kravljeg mlijeka zbog visokog sadržaja suhe tvari. Iz tog razloga češće se koristi za proizvodnju sireva nego za izravnu potrošnju. U proizvodnji autohtonog hrvatskog sira iz mišine koristi se ovčje mlijeko. Frece i sur. (2016) navode da dvije trećine uzoraka ovčjeg mlijeka, gruš i sira iz mišine ne zadovoljava kriterije sigurnosti hrane što ukazuje na nehigijensku mužnju i nedovoljno educirane proizvođače sira.

Proces zrenja sastoji se od biokemijskih i mikrobioloških promjena čija interakcija rezultira specifičnim senzorskim svojstvima sira. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje bakterija mliječne kiseline, rast nestarterske mikrobne populacije i rast sekundarne mikroflore. Tijekom biokemijskih transformacija složeni organski spojevi sira razgrađuju se na jednostavnije spojeve djelovanjem različitih enzima u siru. Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije i sudjeluju u primarnim biokemijskim procesima (proteoliza, lipoliza i glikoliza) koji se odvijaju u siru tijekom zrenja. Proteoliza, lipoliza i glikoliza uvjetuju promjenu teksture sira i odgovorne su za specifičnu aromu sira. Okus sira čine frakcije topljive u vodi, dok je aroma sira koncentrirana u hlapljivoj frakciji. Teorija balansnih spojeva potvrđuje konstataciju da većina sireva sadrži iste ili slične komponente, ali u različitim koncentracijama i odnosima što svakoj vrsti sira daje specifičnost (Mikulec, 2010.).

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži imaju izražen i pikantan okus, miris i aromu te specifičnu granuliranu ili mazivu i glatku teksturu. Te osobine sira zamjetno su različite u odnosu na sireve koji zriju u prirodnoj kori što se pripisuje intenzivnim biokemijskim procesima proteolize i lipolize koji se odvijaju tijekom specifičnih uvjeta zrenja u životinjskoj koži što uključuje nešto manju permeabilnost od prirodne kore sira, ali veću u usporedbi s plastičnim

bačvama koje se također koriste kao medij za zrenje takvih vrsta sireva (Tudor Kalit, 2014.). Životinjsku kožu potrebno je obraditi posebnom tehnikom i paziti da se koža ne ošteti kako bih se cijeli proces zrenja sira odvijao u anaerobnim uvjetima. Tudor Kalit i sur. (2016.) navode lipolizu kao glavni biokemijski proces kod zrenja sireva u životinjskoj koži. Odgovorna je za stvaranje okusa i arome sira i vodi većoj akumulaciji slobodnih masnih kiselina i spojeva arome. Anaerobno zrenje i prirodno prisutna populacija bakterija mliječne kiseline i nestarterske mikroflore, te sekundarna mikroflora koju predstavljaju kvasci i plijesni, zaslužni su za stvaranje specifičnih karakteristika sireva koji zriju u životinjskoj koži.

Cilj ovog rada je prikazati specifičnosti proteolitičkih i lipolitičkih promjena tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži te njihov utjecaj na senzorne karakteristike sira: okus, miris i teksturu.

2. Zrenje sira

Zrenje sira može se definirati se kao proces sazrijevanja sirne mase u zreli sir tijekom čega se odvija kontrolirani rast mikroorganizama (Havranek i sur. 2014.). Svježe proizvedena sirna masa nema izražene karakteristike okusa, mirisa i arome, te nema značajnih razlika između sirnih masa pojedinih vrsta sireva. Za vrijeme zrenja sira odvija se niz biokemijskih i fizikalno-kemijskih promjena u sirnoj masi, pri čemu se složeni organski spojevi sira (proteini, masti i laktoza) razgrađuju na jednostavnije spojeve djelovanjem različitih enzima u siru. Rezultat toga su aromatski spojevi nastali tijekom procesa zrenja, karakteristični za pojedine vrste sireva te izravno odgovorni za njihove specifične značajke (Matutinović i sur. 2007., Tratnik i Božanić 2012.)

Struktura sastojaka sira mijenja se tijekom procesa zrenja. Kako navode Havranek i sur. (2014.) na tijek zrenja i senzorna svojstva sireva osobito utječu kemijski parametri kao što su sadržaj masti u siru, sadržaj masti u suhoj tvari sira, sadržaj vode u bezmasnoj suhoj tvari sira i sadržaj soli u vodenoj fazi sira. Za pravilan tijek biokemijskih promjena tijekom zrenja sira utječu i mikroklimatski uvjeti u zrionici. Od velike je važnosti da temperatura pri kojoj sir zrije ne oscilira izvan određenih raspona, a to je moguće postići izgradnjom zrionice na pogodnoj lokaciji, hlađenjem ili zagrijavanjem i prozračivanjem prostora zrionice. Povećanjem temperature zrenja sira ubrzavaju se mikrobiološke, enzimske i kemijske reakcije u siru, te se time može utjecati na brzinu zrenja sira. Relativnu vlažnost zraka potrebno je održavati u određenim granicama (85-95%) jer se tako regulira sadržaj vode u siru (Havranek i sur. 2014., Kalit 2015.). Osim optimalnih klimatskih uvjeta koje je potrebno osigurati tijekom zrenja, svakodnevna kontrola i njega sira od velike su važnosti. Njega sira uključuje okretanje, četkanje, brisanje, struganje i premazivanje sireva (Tratnik i Božanić 2012.).

2.1. Djelovanje enzima tijekom zrenja sira

Zrenje sira je složeni proces koji se odvija uz djelovanje enzima. Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije, dok oni pri svom djelovanju ostaju nepromijenjeni (Kalit 2017.). Aktivnost enzima tijekom zrenja ovisi o uvjetima u siru kao što su sadržaj vode, kiselost i koncentracija soli u siru (Havranek i sur. 2014.). Glavni biokemijski procesi proteoliza, lipoliza i glikoliza odvijaju se u siru tijekom zrenja s djelovanjem enzima sirila, prirodno prisutnih enzima mlijeka, enzima bakterija mliječne kiseline (starter kulture/čiste kulture), te enzima bakterija nestarterske mikroflore i dodane kulture (Mikulec i sur. 2010.).

Enzimi koji se mogu dodati u mlijeko za sirenje su kimozin, pepsin i drugi enzimi mikrobiološkog, biljnog ili životinjskog podrijetla (Havranek i sur. 2014.). U siru zaostaje oko 6-9% sirila. Potrebno je paziti na količinu dodanog sirila kako bi se izbjegle moguće pogreške okusa sira poput gorkog okusa sira nastalog tijekom prvih tjedana zrenja djelovanjem sirišnih enzima (Kalit 2017.). Na proces zrenja utječu i prirodno prisutni indogeni enzimi mlijeka kao što su plazmin i lipoproteinska lipaza koji su vezani za kazeinsku micelu (Tratnik i Božanić

2012.). Danas je poznato više od 60 različitih prirodnih enzima. Njihov učinak na zrenje sira dodatno je izražen u sirevima kod kojih mlijeko nije toplinski obrađeno. U adekvatnim uvjetima zrenja enzimi imaju pozitivan utjecaj na senzorna svojstva sira (Kalit 2017.). Bakterije mliječne kiseline (BMK) izlučuju enzime u okolinu nakon lize stanica. Egzogeni enzimi bakterija mliječne kiseline imaju primarnu ulogu tijekom zrenja svih sireva (Tratnik i Božanić 2012.). Postoje čiste kulture koje imaju veći enzimatski potencijal, odnosno veći učinak na zrenje i one sa slabijim ili nikakvim učinkom. Potrebno je voditi računa o vrsti čiste kulture koja se koristi u proizvodnji sira jer će o njoj ovisiti svojstva sira (Kalit 2017.). U proizvodnji nekih vrsta sireva koriste se mljekarske kulture, plijesni, kvasci ili bakterije koje tvore maz na površini sira. Ako se koriste, njihovi enzimi također sudjeluju u procesu zrenja sira. U proizvodnji autohtonih sireva koji se proizvode od sirovog mlijeka enzimi bakterija nestarterske mikroflore imaju presudnu ulogu u stvaranju specifične arome sira. Broj bakterija nestarterske mikroflore povećava se tijekom zrenja sira, za razliku od BMK čiji se broj tijekom zrenja smanjuje (Mikulec i sur. 2010.). Na kraju zrenja gotovo svi sastojci sira transformiraju se iz složenog oblika u jednostavnije spojeve te je zreli sir karakterističnog okusa, mirisa, boje i konzistencije (Havranek i sur. 2014.).

2.2. Primarno zrenje

Primarno zrenje specifično je za polutvrde i tvrde sireve. Procesi zrenja u tim sirevima teku sporo i zbivaju se u cijeloj sirnoj masi. Kod zrenja tvrdih sireva promjene u siru započinju pod utjecajem egzogenih i endogenih enzima bakterija mliječne kiseline dok kod polutvrdih sireva glavnu ulogu imaju mikrobni enzimi i enzimi sirila (Tratnik i Božanić 2012.). Tijekom primarnog zrenja najveće promjene dešavaju se na proteinima tijekom proteolize uz djelovanje proteolitičkih enzima. Razgradnja masti (lipoliza) započinje kada i proteoliza, ali u značajno manjoj mjeri te je ona u polutvrdim i tvrdim sirevima ograničena i u većoj mjeri nepoželjna zbog mogućih pogrešaka okusa kao što su užegao okus i pokvarena, neuravnotežena aroma sira. Suprotno tome, kod zrelih tvrdih sireva kao što su čedar, parmezan i pecorino pojačana lipoliza pridonosi stvaranju oštrijeg okusa sira. Iznimka je i sir iz mišine čiji je pikantan okus posljedica intenzivne lipolize zbog korištenja sirovog mlijeka te zrenja u mišini. Mliječna kiselina sudjeluje u pripremi kazeina na daljnje fizikalno-kemijske promjene čime se olakšava daljnja proteoliza, a sirno tijesto postaje elastično i gipko (Tratnik i Božanić 2012., Havranek i sur. 2014.).

2.3. Sekundarno zrenje

Sekundarno zrenje specifično je za meke sireve, odnosno sireve s većim udjelom vode i većom kiselošću (Tratnik i Božanić 2012.). U proizvodnji mekih sireva biokemijski procesi svojstveni za sekundarno zrenje, odvijaju se pod utjecajem rasta i aktivnosti aerobne mikroflore (*Brevibacterium linens*, kulture plemenitih plijesni, kvasci, bakterije ili plijesni koje potječu od sekundarno stvorene mikroflore sira) (Fox i sur. 2004.). Iako je njihovo djelovanje sekundarno, enzimi aerobne sekundarne kulture upravljaju procesom zrenja te je njihovo djelovanje esencijalno za takvu vrstu sireva. Sam proces zrenja odvija se od površine sira prema unutrašnjosti. Upravo je to razlog zašto nezreli meki sir ima unutrašnjost kredaste teksture i neizraženog okusa i mirisa. Tijekom proteolize nastaju aminokiseline, amonijak, metil amini, histidin, ketoni, diacetil, indol i sumporovodik. Kao rezultat razgradnje masti nastaju slobodne masne kiseline kao što su kapronska, kaprinska, kaprilna, laurinska, miristinska, palmitinska i stearinska (Tratnik i Božanić 2012., Perko 2015.).

3. Biokemijski procesi tijekom zrenja sira

Proces zrenja sira sastoji se od biokemijskih i mikrobioloških promjena čijom zajedničkom interakcijom nastaju senzorska svojstva sira. Mikrobiološke promjene uključuju odumiranje (lizu) bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, rast nestarterske mikrobne populacije (eng. Non-Starter Lactic Acid Bacteria – NSLAB), te rast sekundarne mikroflore. Biokemijske promijene tijekom zrenja sira dijele se na primarne i sekundarne. Primarne promjene u sirevima odgovorne su za osnovne promjene teksture, dok sekundarne promjene formiraju konačni miris i okus sira (Mikulec i sur. 2010.). Primarni biokemijski procesi tijekom zrenja sira su proteoliza, lipoliza i glikoliza koje uključuju razgradnju masti, proteina i laktoze, a u nekih sireva i citrata. Navedeni procesi uvjetuju promjenu teksture sira i odgovorne su za osnovnu aromu pojedinog sira. Propionsko vrenje uvjetuje okus, teksturu i sirne oči svojstvene za ementaler i grojer, a odvija se u siru tijekom zrenja u zrionici. Sekundarne promjene uključuju transformacije nastalih produkata razgradnje, odnosno metabolizam amino i masnih kiselina (Tratnik i Božanić 2012.).

3.1. Proteoliza

Proteoliza, razgradnja kazeina pod utjecajem proteolitičkih enzima – proteaza, najsloženiji je i vjerojatno najvažniji biokemijski proces koji se odvija tijekom zrenja sireva s unutrašnjim bakterijskim zrenjem (Havranek i sur. 2014.). Rezultat proteolize je promjena strukture sira pri čemu ona postaje mekša, sadržaj vode u siru se smanjuje dok se pH-vrijednost sira povećava. Proteoliza direktno utječe na okus kroz proizvodnju kratkih peptida i aminokiselina, olakšava oslobađanje aromatskih spojeva iz unutrašnjosti sira (Sousa i sur. 2001.) te osigurava slobodne aminokiseline koje su supstrati za sekundarne kataboličke promjene odgovorne za stvaranje tvari arome (Mikulec i sur. 2010.). Sir sadrži širok spektar proteinaza i peptidaza koje potječu od sirila, mlijeka, bakterija mliječne kiseline iz mljekarskih kultura (LAB), nestarterskih bakterija mliječne kiseline (NSLAB) i drugih kultura (Havranek i sur. 2014.).

Proces proteolize odvija se u dva stupnja. Primarna proteoliza odvija se uz djelovanje kimoзина i plazmina. U siru zaostaje 3-10 % kimoзина, ovisno o pH sira. Kimozin cijepa α_s kazein na poziciji 23 i 24 ostatka, pri čemu nastaju proteoza pepton (f1-23) i α_{s1} -I (f 24-199). Iz fragmenta f24-199 u određenim uvjetima mogu nastati α_{s1} -II (f 24-169) i f 170-199. Plazmin je endogena proteinaza mlijeka (Havranek i sur. 2014.). Kalit i sur. (2002.) navode da broj somatskih stanica (BSS) u mlijeku ima najveći utjecaj na plazminsku aktivnost. Također navode kako svako povećanje BSS za 250.000 stanica /mL uvjetuje porast koncentracije plazmina za 0,03 mg/L. Djelovanje plazmina značajnije je kod sireva kod kojih se sirno zrno zagrijava na temperaturu iznad 40 °C i kod sireva proizvedenim od toplinski obrađenog mlijeka (Havranek i sur. 2014.). Plazmin je termostabilan i zaostaje u grušu, a inhibitori plazmina i plazmin aktivatora gube se sirutkom. Njegova primarna proteolitička aktivnost

pripisuje se intenzivnoj razgradnji β -kazeina i ograničenoj razgradnji α_{S1} -kazeina i α_{S2} -kazeina (Kalit i sur. 2002.).

U sekundarnoj proteolizi sudjeluju intracelularni i ekstracelularni enzimi bakterija mliječne kiseline i nestarterske mikroflore bakterija mliječne kiseline. Proteini i proteoze razgrađuju se na peptide i aminokiseline. Proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline je vrlo slaba, ali se nadovezuje na primarne proteolitičke promjene (Fox i McSweeney 1996.). Prema Havranek i sur. (2014.) proteolitički sustav BMK postaje značajan kada broj BMK-a dosegne 10^9 - 10^{10} cfu/mL. Bakterije mliječne kiseline imaju membransku proteinazu (PrpP) i intracelularne oligoendopeptidaze, aminopeptidaze, imunopeptidaze, dipeptidaze i tripeptidaze (Sousa i sur. 2001.). PrpP pridonosi nastajanju malih peptida hidrolizom velikih peptida nastalih djelovanjem plazmina i kimoza. Intracelularni enzimi postaju aktivni tek nakon lize stanica BMK i odgovorni su za nastajanje slobodnih aminokiselina. Proteinaze i peptidaze BMK nisu specifične. One cijepaju N i C terminalne aminokiseline na polipeptidnim lancima i oslobađaju se aminokiseline (Havranek i sur. 2014.). Broj bakterija nestarterske mikroflore povećava se tijekom zrenja sira. Prema Mikulec i sur. (2010.) NSLAB imaju značajnu ulogu u zrenju sireva proizvedenih od sirovog mlijeka. Njihova aktivnost nadopunjuje proteolitičku aktivnost mljekarske kulture, pri čemu nastaju slobodne aminokiseline i peptidi sličnih molekulskih masa (Sousa i sur. 2001.).

3.1.1. Katabolizam aminokiselina

Havranek i sur. (2014.) navode kako mnogi aromatski spojevi nastali tijekom katabolizma aminokiselina pridonose nastajanju specifične arome sira. U siru je identificirano više od 200 različitih hlapljivih komponenti, a razgradnjom aminokiselina nastaju alkoholi, aldehidi, esteri, kiseline i sumporni spojevi. Aktivnost bakterija startera i NSLAB-a određuje karakterističan sadržaj aminokiselina u siru (Mikulec i sur. 2010.). Sastav kratkih peptida, slobodnih aminokiselina i relativan odnos pojedinih aminokiselina važni su za stvaranje specifične arome sira. Nastali nisko-molekularni peptidi odgovorni su za okus koji može biti slankast, po juhi te po orasima. Širok raspon nastalih spojeva okusa i arome nastaje kroz tri osnovne faze katabolizma aminokiselina. Prva faza uključuje dekarboksilaciju, deaminaciju, transaminaciju i desumporizaciju. Tijekom navedenih procesa nastaju amini, aminokiseline i α -ketoni. U drugoj fazi dolazi do konverzije nastalih spojeva u aldehide. Treća faza uključuje redukciju aldehida u alkohole ili njihovu oksidaciju u kiseline. Tijekom katabolizma aminokiselina dolazi i do stvaranja sumpornih spojeva kao što su: metantioi, sumporovodik, dimetilsulfid, dimetildisulfid itd. (Havranek i sur. 2014.).

3.2. Lipoliza

Lipoliza je biokemijski proces razgradnje mliječne masti na masne kiseline i alkohol glicerol (Perko i sur. 2015.). Lipoliza se odvija pod utjecajem enzima lipaza. U mlijeku se nalaze prirodno prisutne lipoproteinske lipaze, a ostale lipaze koje se mogu naći u siru potječu iz sirila, mljekarske kulture, nestarterske mikroflore i sekundarne mikroflore (Sert i sur. 2014.). Lipoproteinska lipaza najvažnija je indogena lipaza, porijeklom iz krvi. Potpuno se inaktivira na 78 °C/10 s. Značajnija je za sireve proizvedene od sirovog mlijeka zbog svoje termolabilnosti. Lipoproteinska lipaza nije specifična i odcjepljuje masne kiseline s prve i treće pozicije monoacilglicerola, diacilglicerola, triacilglicerola i s prve pozicije fosfolipida (Havranek i sur. 2014.). Kod većine polutvrdih i tvrdih sireva s unutarnjim zrenjem intenzivna lipoliza zapravo je nepoželjna. Visok udio slobodnih masnih kiselina uzrokuje užegao okus sira, posebice kratkolančanih masnih kiselina kao što je maslačna (Tratnik i Božanić 2012.). Produkti katabolizma slobodnih masnih kiselina koje se odvija u sirevima tijekom zrenja su sekundarni alkoholi, laktoni i kiseline koji zajedno sa slobodnim masnim kiselinama čine spojeve arome. Slobodne masne kiseline mogu reagirati s alkoholima ili slobodnim sulfhidrilnim skupinama pri čemu nastaju esteri koji siru daju jaku aromu i tioesteri (Yilmaz i sur. 2005., Havranek i sur. 2014.). Prema Yilmaz i sur. (2005.) niske koncentracije slobodnih masnih kiselina imaju poželjan utjecaj na stvaranje arome sira, posebice ako su pravilno izbalansirane s produktima ostalih biokemijskih reakcija tijekom zrenja sira. Lipolitičke promjene izraženije su kod sireva proizvedenih od sirovog mlijeka kao što su sir iz mišine i neke vrste talijanskih sireva (pecorino romano i provolone). Zbog prisutnosti primarne mikroflore mlijeka i lipoproteinske lipaze te korištenja sirila koje sadrži predželučanu esterazu navedene vrste sireva imaju pojačanu lipolitičku aktivnost i pikantniji okus (Havranek i sur. 2014.). Kod sireva s plemenitim plijesnima odvija se pojačana lipoliza masti zbog prisustva kiselih i alkalnih lipaza koje proizvode *P. roqueforti* i *P. camemberti* (Tratnik i Božanić 2012.). Lipoliza nema primarni značaj kod zrenja sireva s plemenitom plijesni na površini, dok aroma sireva s plavom plijesni u unutrašnjosti sira ovisi o β -oksidaciji masnih kiselina pri kojoj nastaju metil-ketoni. Preizražena lipoliza uzrokuje nepoželjnu i neuravnoteženu aromu sira (Havranek i sur. 2014.).

3.3. Glikoliza

Osnovni proces u proizvodnji sira je fermentacija laktoze u mliječnu kiselinu. Razgradnju laktoze glikolitičkim ili fosfoketolaznim putem vrše bakterije mliječne kiseline. Krajnji produkt glikolitičkog puta razgradnje laktoze je mliječna kiselina, a produkti fosfoketolaznog puta razgradnje su laktat, acetat, etanol i CO. U proizvodnji sira gotovo sva laktoza iz mlijeka (98%) prelazi u sirutku dok se u svježoj sirnoj masi zadrži 1-2 % laktoze (Fox i sur. 1990., Samaržija 2015., Havranek i sur. 2014.). Zaostala laktoza na početku zrenja metabolizira u L(+)laktat, ovisno o temperaturi i razini soli u grušu. Brzim prodorom soli u grušu i niski pH usporavaju glikolizu, a kod previsoke koncentracije soli dolazi do inhibicije bakterija mliječne

kiseline. Bakterije nestarterske mikroflore (NSLAB) do kraja metaboliziraju laktozu na DL-mliječnu kiselinu (McSweeney 2004.).

Kojim putem će se glikoliza odviti i koji će spojevi nastati ovisi i o vrsti sira. U siru cheddar i nizozemskim vrstama sira dolazi do racemizacije L(+)laktata u D(-)laktat (Havranek i sur. 2014.). Prema Foxu i Lawu (1991.) za izomeriziranu racemičnu mješavinu D/L laktata u cheddar siru odgovorni su pediokoki koji racemiziraju laktat brže od laktobacila. McSweeney (2004.) navodi da se racemizacija laktata odvija znatno brže u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka nego u onima proizvedenim od pasteriziranog mlijeka. Racemizacija nema značajan utjecaj na okus sira, međutim, previsoka koncentracija D(-) laktata u siru može uzrokovati nepoželjne kristale na površini sira (Havranek i sur. 2014., Fox i sur. 1990.). Oksidacija laktata u acetat ovisi o dostupnosti kisika koju određuju veličina sira i materijal za pakiranje, odnosno njegova propusnost za plinove. Acetat može nastati i iz citrata i aminokiselina NSLAB-a. U cheddar siru nalazi se u visokim koncentracijama i smatra se da doprinosi okusu sira (Fox i Law 1991.). U švicarskim vrstama sireva, uz djelovanje bakterija propionske kiseline, mliječna kiselina prelazi u propionsku i octenu kiselinu, CO₂ i H₂ O (Havranek i sur. 2014.). Nastale kiseline pridonose aromi sira, a CO₂ odgovoran je za stvaranje sirnih očiju, karakterističnih za ove varijante sireva (Fox i Law 1991.). Sirne oči su pravilni okrugli otvori, karakterističnog promjera za pojedinu vrstu sira (Havranek i sur. 2014.). Stvaranje sirnih očiju ovisi o brzini i količini stvaranja CO₂, o broju i veličini pogodnih mjesta u sirnom tijestu, o tlaku i temperaturi i teksturi sirnoga tijesta (McSweeney 2004.). Na površini sireva s plemenitim plijesnima i sirevima s mazom dolazi do katabolizma mliječne kiseline u CO₂ i H₂ O djelovanjem kvasaca i plijesni, čime se povećava pH-vrijednost. Mliječna kiselina difundira iz unutrašnjeg dijela sira prema površini, čime tijekom zrenja nastaje pH-gradijent u smjeru od površine prema središtu s obrnutom koncentracijom mliječne kiseline (Havranek i sur. 2014.). U zrelom siru na površini sira proteolizom dolazi do stvaranja NH₄ (Fox i sur. 1990.). Amonijak nastao na površini sira prelazi u unutrašnjost, povećavajući pH sira. Porastom pH-vrijednosti sira omekšava se tekstura sireva i olakšava se rast *Brevibacterium linens* na površini sireva s mazom (Havranek i sur. 2014.). Metabolizam laktata i povećanje pH-vrijednosti na površini sireva s plemenitim plijesnima i mazom, indirektno utječe na proteolizu pojačavanjem aktivnosti plazmina (McSweeney 2004.).

3.3.1. Metabolizam citrata

Mlijeko sadrži približno 1750 mg citrata /L (McSweeney 2004.). Zbog njegove topljivosti u vodi tijekom proizvodnje sira 94% citrata gubi se sirutkom. Usprkos njegovoj niskoj koncentraciji u sirnom grušu (Havranek i sur. 2014.) metabolizam citrata od iznimne je važnosti za stvaranje arome i okusa sira, posebice u nizozemskim vrstama sira, cottage siru, quark siru i fermentiranim proizvodima (Fox i sur. 1990.). Diacetil je važan aromatski spoj navedenih vrsta sireva i može prijeći u acetoin, 2,3-butilen glikol i 2-butanon jednako važne aromatske spojeve za pojedine vrste sireva (Havranek i sur. 2014.). Bakterije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. bakterije su mliječne kiseline koje imaju sposobnost metabolizirati citrat. Navedene bakterije mliječne kiseline imaju specifično vezane

stanične citrat-permeaze pomoću kojih imaju sposobnost prevođenja citrata iz mlijeka u vlastitu stanicu. Citrat se unutar stanice konvertira u acetat i oksaloacetat. Navedenu reakciju katalizira citrat liaza, stanični enzimatski kompleks odgovoran za konverziju citrata u C-4 spojeve kao što su diacetil, acetoin, 2,3-butilen glikol i acetat (Samaržija 2015.). Citrat pozitivne mezofilne bakterije ne koriste citrat kao izvor energije. Metaboliziraju ga zajedno s laktozom i ostalim šećerima (Fox i sur. 1990.) te nastaju spojevi važni za stvaranje arome i okusa sira. Nastali spojevi međusobno se razlikuju ovisno o tome koje bakterije sudjeluju u metabolizmu citrata (Havranek i sur. 2014.). Citrat mogu metabolizirati i neki sojevi NSLAB-a do spojeva acetoina, acetata i diacetila (McSweeney 2004.).

4. Tradicionalni sirevi

Tradicionalni sirevi nastali su samoniklo na nekom području kao rezultat interakcije između čovjeka i okoliša (Matutinović i sur. 2007.), a karakterizira ih snažna povezanost s prostorom na kojem su nastali te utjecaj kulture i povijesti ljudi tog prostora (Medjoudj i sur. 2016.). U pravilu se tradicionalni sirevi proizvode iz toplinski neobrađenog mlijeka, sa ili bez primjene mljekarske kulture. Proizvode se uz mnogo ručnog rada, primjenom prirodnih sirila i začina. Sirevi proizvedeni na tradicionalan način specifičnog su unikatnog okusa, mirisa, arome i teksture dok je u industrijskim uvjetima nemoguće proizvesti identičan proizvod. Tradicionalni sirevi u odnosu na industrijske su raznolikijeg, intenzivnijeg i uzbudljivijeg okusa i arome (Kalit 2015.). Sirevi od sirovog mlijeka kraće zriju, imaju izraženiji okus i drugačiju teksturu koji su rezultat složenih biokemijskih reakcija tijekom zrenja sira. Biokemijski procesi proteoliza i lipoliza smatraju se najznačajnijim parametrima u identifikaciji podrijetla tradicionalnih sireva proizvedenih od sirovog mlijeka (Božanić 2015.). Inovativni načini proizvodnje i pripreme hrane znatno se razlikuju od tradicionalne proizvodnje. Posebnu zainteresiranost prema autohtonim sirevima pokazuju potrošači koji brinu o prirodi, podrijetlu i nutritivnoj vrijednosti hrane. Prema Lešić i sur. (2016.) autohtoni sirevi imaju visoku nutritivnu vrijednost zbog bogatstva prirodnih sastojaka kao što su proteini, kalcij, fosfor, vitamin A i D.

Republika Hrvatska je bogata riznica tradicionalnih sireva, no približno njih trideset još uvijek nije u potpunosti okarakterizirano (Matutinović i sur. 2007., Tudor Kalit i sur. 2014.). Prema Samaržiji i sur. (2006.) za ostvarivanje oznake izvornosti potrebno je provesti niz istraživanja i standardizirati proizvodnju kako bi se potvrdila autentičnost sira, dok Ercan i sur. (2011.) navode kako je potvrđivanje autentičnosti tradicionalnih sireva važno i zbog zaštite raznolikosti i kontrole kvalitete sireva u budućim istraživanjima. Oznaku izvornosti mogu ostvariti sirevi čija je kvaliteta uvjetovana tradicijom proizvodnje kroz određeno povijesno razdoblje u točno određenoj zemljopisnoj regiji i/ili kraju (Samaržija i sur. 2006.) i čija se proizvodnja, prerada i priprema u cijelosti odvija u tom zemljopisnom području (Havranek i Đugum 2014.). Oznaka izvornosti (Slika 4.1.) poželjna je na hrvatskom i europskom tržištu (Tudor Kalit i sur. 2014.), te se u usporedbi s oznakom zemljopisnog podrijetla ili tradicionalnog ugleda, smatra najvrjednijom (Samaržija i sur. 2006.). Iako se u Republici Hrvatskoj proizvodi veliki broj tradicionalnih sireva, paški sir i bjelovarski kvargl jedini su sirevi koji nose oznaku izvornosti/zemljopisnog podrijetla. U postupku odobravanja oznake trenutno su krčki sir, istarski sir i lički škripavac.



Slika 4.1. Oznaka izvornosti

Izvor: <https://ec.europa.eu>

4.1. Sirarstvo u Hrvatskoj

Republika Hrvatska je zemlja bogata kulturnom baštinom, a neki od naših tradicionalnih proizvoda poznati su na globalnoj razini. U Republici Hrvatskoj poznato je oko trideset različitih vrsta autohtonih sireva čije je podrijetlo usko vezano za prehrambene navike stanovništva, potražnju na tržištu, klimatske i zemljopisne karakteristike te količinu prenesenog znanja s generacije na generaciju (Tudor Kalit i sur. 2014.). Prema Matutinović i sur. (2007.) posebno mjesto među hrvatskim tradicionalnim sirevima zauzimaju sirevi od ovčjeg mlijeka, proizvedeni na jadranskom i dinarskom području. Za stanovništvo na jadranskim otocima i dalmatinskom zaleđu, ovca je predstavljala blago kroz stotine godina. Ime Dalmacija dolazi od korijena ilirske riječi delm što je u prijevodu ovca. Iz navedenog se da zaključiti da je Dalmacija bila zemlja ovčarstva.

4.2. Kvaliteta mlijeka za sirenje

U proizvodnji sira može se koristiti bilo koja vrsta mlijeka. Na svjetskoj razini proizvodnja kravljeg mlijeka je najzastupljenija i upravo se zato ono najčešće koristi u proizvodnji sireva (Tratnik i Božanić 2012.). U Hrvatskoj je u proizvodnji tradicionalnih sireva vrlo učestala upotreba ovčjeg mlijeka. Proizvodnja kvalitetnog ovčjeg sira ovisi o kvaliteti mlijeka za sirenje, odnosno o njegovim fizikalno-kemijskim i higijenskim osobinama posebice ako se sirevi proizvode iz toplinski neobrađenog mlijeka kao što je to slučaj primjerice kod sireva koji zriju u životinjskoj koži (Kaić i sur. 2008.). Ukupnu kvalitetu mlijeka za sirenje određuju njegov kemijski sastav, fizikalna svojstva, higijenska kvaliteta, senzorna svojstva i

neprisutnost inhibitornih tvari u mlijeku kao što su antibiotici, ostaci detergenata i sredstva za dezinfekciju (Matutinović i sur. 2007.). Fizikalna svojstva mlijeka koja izravno utječu na kvalitetu sira su kiselost i točka ledišta mlijeka (Havranek i sur 2014.).

Najvažniji kemijski parametri mlijeka za sirenje su udio proteina (kazeina) i mliječne masti, te njihovi omjeri i udio suhe tvari. Navedeni sastojci izravno određuju količinu i kvalitetu sira, stoga je osim njihovog udjela važna i njihova cjelovitost u mlijeku za sirenje (Havranek i sur. 2014.). Kazein je najvažniji protein mlijeka za proizvodnju sira. Brzina zgrušavanja i čvrstoća grušta izravno ovisi o njegovoj količini u mlijeku (Havranek i sur. 2014.). Ovčje mlijeko ima bolju sposobnost sirenja mlijeka od kravljeg, zbog veće količine kazeina i visokog sadržaja suhe tvari te stoga ima gotovo dva puta veći randman od kravljeg mlijeka. Iz tog razloga ovčje mlijeko rjeđe se koristi u izravnoj potrošnji, ali je zato odlična sirovina za proizvodnju sireva (Antunac i Havranek 1999.). Mliječna mast najvarijabilniji je sastojak mlijeka, ali je uz kazein jedna od važnijih komponenti tijekom proizvodnje sira. Oko 90% mliječne masti prelazi u sir i određuje njegov randman. Mliječna mast daje ugodan okus i aromu, a utječe i na teksturu i konzistenciju mliječnim proizvodima (Tratnik i Božanić 2012., Havranek i sur. 2014.).

Higijensku kvalitetu mlijeka za sirenje određuje ukupan broj mikroorganizama i broj somatskih stanica. Ukupan broj mikroorganizama izražava se brojem anaerobnih mezofilnih bakterija u mL mlijeka, koji se razvija na temperaturi 30°C. Izražava se brojem poraslih kolonija, cfu – colony forming unit, u 1 mL mlijeka. Ovčje mlijeko uglavnom je lošije mikrobiološke kvalitete nego kravlje i kozje mlijeko stoga je potrebno obratiti pažnju na higijenu mužnje. Somatske stanice prirodni su sastojak mlijeka i nemaju utjecaj na fizikalne osobine, promjenu sastojaka mlijeka i bakteriološku kakvoću. Somatske stanice u mlijeku sastoje se od leukocita i epitelnih stanica alveola i kanalića mliječne žlijezde. Određivanje broja somatskih stanica provodi se radi kontrole zdravstvenog stanja vimena, sprečavanja pojave mastitisa i poboljšanja kvalitete mlijeka. Na temelju broja somatskih stanica može se procijeniti zdravstveno stanje mliječne žlijezde. Povećan broj somatskih stanica u mlijeku najčešće je posljedica upale vimena. Kao rezultat dolazi do promjena u sekreciji mlijeka, kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama, te bakteriološkim i tehnološkim osobinama mlijeka. U mlijeku zdravih krava broj somatskih stanica je oko 250.000/ mL. Ovce i koze imaju prirodno veći broj somatskih stanica u mlijeku. Sirevi proizvedeni od mlijeka s povećanim brojem somatskih stanica imaju izraženije pogreške teksture kao što su brašnasta i mrvičasta tekstura i užegao okus (Antunac i sur. 1997., Havranek i sur. 2014.). Na području Šibenika u razdoblju od travnja do srpnja 2008. godine, provedeno je istraživanje higijenske kvalitete ovčjeg mlijeka za proizvodnju sira iz mišine. Od ukupno 16 analiziranih uzoraka, samo njih 5 zadovolja Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/07). Kako bi se poboljšala higijenska kvaliteta pomuzenog ovčjeg mlijeka, potrebno je poduzeti niz mjera i educirati proizvođače, u cilju proizvodnje sira s boljim proizvodnim svojstvima i ujednačenom kakvoćom (Kaić i sur. 2008.). Navedene modifikacije i provođenje istraživanja preduvjet su za zaštitu izvornosti sira (Tudor Kalit i sur. 2014.).

5. Sirevi koji zriju u životinjskoj koži

U svijetu postoji nekoliko vrsta sireva čije zrenje se odvija u životinjskoj koži. S određenim razlikama u tehnologiji proizvodnje i vrsti mlijeka sirevi koji zriju u životinjskoj koži proizvode se na području Hrvatske (sir iz mišine), Bosne i Hercegovine, Crne Gore (sir iz mijeha), Turske (tulum), Alžira (bouhezza) i Libanona (darfiyeh). Glavna specifičnost ovih sireva upravo je zrenje u janjećoj ili jarećoj koži koja ima različite regionalne i lokalne nazive: mišina (Hrvatska), mijeh (Bosna i Hercegovina), tulum (Turska) (Tudor Kalit i sur. 2010.) Sirevi koji zriju u životinjskoj koži imaju specifičnu teksturu, izražen i pikantan okus, miris i aromu. Navedne osobine sira zamjetno se razlikuju od osobina sireva koji zriju u prirodnoj kori što se pripisuje intenzivnim biokemijskim procesima proteolize i lipolize koji se odvijaju u anaerobnim uvjetima zrenja u životinjskoj koži (Tudor Kalit i sur. 2012.).

5.1. Priprema kože u kojoj sir zrije

Pravilna priprema janjeće kože važan je postupak u proizvodnji sira iz mišine, s obzirom da je riječ o anaerobnom zrenju, mišina osigurava pravilno zrenje sira tijekom kojeg se formiraju i njegova senzorska svojstva. Janje čija će se koža koristiti za izradu mišine mora biti staro minimalno 6 mjeseci (www.hah.hr). U Turskoj se za janjeću ili jareću kožu (slika 5.1.1.) u kojoj zrije sir koristi naziv tulum, po kojem je tulum sir dobio ime (Cakmakci i sur. 2008.). Tulum sir u pravilu zrije u jarećoj koži bez dlake, međutim u nekim regijama u Turskoj koristi se i neobrađena koža (Kamber 2008.). Sama priprema kože u kojoj sir zrije zahtjeva posebnu tehniku u kojoj je potrebno paziti da se koža ne ošteti (slika 5.1.2.). Nepravilna tehnika pripreme može uzrokovati pucanje janjeće kože, a kao posljedica toga ulazak zraka u mišinu i kvarenje sira (Tudor Kalit 2013.). Kod izrade mišine mogu se koristiti obje strane kože koje će biti u izravnom kontaktu sa sirom. Sir može biti u kontaktu s vanjskim dijelom kože na kojem se nalazila vuna ili s unutarnjim dijelom kože - dio kože uz meso (Tudor Kalit i sur. 2010.). Medjoudj i sur. (2017). navode da se u proizvodnji bouhezza sira koristi jareća koža koja je vanjskim dijelom u kontaktu sa sirom. Nakon što je koža skinuta s janječeg trupa, svi otvori na mišini vežu se špagom. Oko zadnjeg otvora naprave se rupice razmaka 2 cm u koje se uvuče drveni štapić koji spriječava klizanje špage tijekom puhanja mišine. Mišina se puni zrakom kako bi poprimila oblik pogodan za otklanjanje vune i skidanje loja (www.hah.hr). Nakon navedenih postupaka slijedi pranje mišine i sušenje na zraku (slika 5.1.3.). Tijekom sušenja može se prakticirati i dimljenje. Prema Tudor Kalit i sur. (2010.) prije upotrebe osušena koža mora se oprati u toploj vodi ili sirutki kako bi omeknula, dok Sert i sur. (2014.) navode da se koža može namočiti dan prije u slanoj vodi (5%). U svrhu preveniranja mogućeg kvarenje sira provodi se i dezinfekcija svih otvora na koži. Za dezinfekciju se koristi ocat ili tradicionalno alkoholno piće rakija (Tudor Kalit i sur. 2010.). Prema Medjoudju i sur. (2017) jareća koža u kojoj zrije bouhezza sir konzervira se solju i smrekom zbog njenih antiseptičkih i antifungalnih svojstava. Osim toga smreka se koristiti i kako bi se otklonio neugodni miris kože



Slika 5.1.1. a) životinjska koža s dlakom prije prodaje sira, b) životinjska koža bez dlake za vrijeme prodaje

Izvor: Cakmakci i sur. (2008)



Slika 5.1.2. Obrada mišine

Izvor: Petrović I.



Slika 5.1.3. Napuhnuta mišina nakon sušenja

Izvor: Petrović I.

5.2. Sir iz mišine

Sir iz mišine pripada skupini tradicionalnih hrvatskih sireva i nosi svoju dugu tradiciju proizvodnje koja se prenosila s koljena na koljeno. Područje proizvodnje ovčjeg mlijeka za proizvodnju sira iz mišine usko je vezano za područje Dalmacije, točnije unutar administrativnih granica tri županije: Zadarske, Šibensko-kninske, Splitsko-dalmatinske. Specifičnost područja očituje se u suhoj i vrućoj sub-mediteranskoj i mediteranskoj klimi i brdovitoj konfiguraciji terena sa specifičnim botaničkim sastavom brojnih mediteranskih vrsta. Na spomenutom području najbrojnija pasmina ovaca je dalmatinska pramenka i njeni križanci, a upravo se mlijeko te pasmine koristi u proizvodnji sira iz mišine. Dalmatinska pramenka je otporna i prilagodljiva na nepogodne vremenske uzgoje te pokazuje kombinirana proizvodna svojstva. Mlijeko dobiveno mužnjom dalmatinske pramenke bogatog je kemijskog sastava i odlično je za proizvodnju mlijeka u sir iz mišine (Tudor Kalit 2013.).

Kako navode Tudor Kalit i Kalit (2013.) prvi pisani dokument o siru iz mišine, njegovom području proizvodnje koji obuhvaća područja Dinare i Velebita, te opisu tradicionalnih tehnoloških procesa proizvodnje, nalazimo u knjizi *Sirarstvo u Dalmaciji*, autora Ljudevita Tejkala iz 1913. godine. Početak proizvodnje sira iz mišine datira još iz doba Ilira i Tračana, naroda čija su stada ovaca napasivala pašnjake Dinare (Tudor Kalit i sur. 2010.). Ti su narodi koristili mišinu za spremanje i transport sira s planine u dolinu (Tudor Kalit i sur. 2014.).

5.2.1. Karakteristike sira

Sir iz mišine je specifični hrvatski autohtoni sir dobiven koagulacijom sirovog ili pasteriziranog ovčjeg mlijeka. U proizvodnji sira tradicionalno se koristi janjeća koža, lokalnog naziva mišina ili mješina, u kojoj sir zrije. Mišina ima oblik „vreće“ načinjene od kože cijelog janjeta. Sir iz mišine tradicionalno se proizvodio isključivo iz punomasnog sirovog ovčjeg mlijeka bez upotrebe mljekarske kulture (Tudor Kalit i Kalit 2013). Međutim, danas se proizvodi sirenjem punomasnog ili obranog ovčjeg, kozjeg i kravljeg mlijeka ili njihovih mješavina (www.hah.hr).

Proizvodnja je u najvećoj mjeri vezana za mala obiteljsko-poljoprivredna gospodarstva s vlastitim uzgojem životinja za proizvodnju mlijeka za sirenje. Osim tradicionalne proizvodnje, Sir iz mišine može se proizvesti i u industrijskim uvjetima iz pasteriziranog mlijeka uz korištenje mezofilne mljekarske kulture. Nakon formiranja sirne grude, slijedi cijedenje, rezanje na komade i soljenje krupnom morskom soli. Zadnji korak je stavljanje grumena sirnoga tijesta u janječju kožu u kojoj će se odvijati zrenje sira (slika 5.2.1.1.). Konzumna zrelost sira iz mišine iznosi između 30 i 60 dana (Tudor Kalit 2013.). S obzirom na ocjene senzorskih karakteristika od strane potrošača optimalno trajanje zrenja sira iz mišine je 45 dana. Sir iz mišine nakon zrenja od 45 dana ocijenjen je ocjenom 16,69 (od ukupno mogućih 20 bodova), dok je sir nakon zrenja od 60 dana imao značajno nižu ocjenu – 16,09 (Tudor Kalit i sur. 2014.). Prema tehnologiji proizvodnje sir iz mišine pripada skupini polutvrdih sireva, no uzimajući u obzir prosječni udio vode u bezmasnoj tvari sira (53,34%),

zreli sir iz mišine pripada skupini tvrdih sireva. Mlijeko korišteno u proizvodnji sira iz mišine bogatog je kemijskog sastava s velikim udjelom suhe tvari i masti, pa stoga sir iz mišine pripada skupini masnih sireva s prosječnim udjelom masti u suhoj tvari sira 55,52% na kraju zrenja (Kaić i sur. 2008.). Sir je nakon završenog procesa zrenja čvrste konzistencije, bijele do žućkaste boje (Slika 5.2.1.2.). Boja sira najviše ovisi o vrsti mlijeka i dužini zrenja u mišini.



Slika 5.2.1.1. Punjenje sira u mišinu

Izvor: Tudor Kalit M.



Slika 5.2.1.2. Zreli sir iz mišine za konzumaciju

Izvor: Tudor Kalit M.

5.2.2. Proizvodnja sira iz mišine

Tradicionalan način pripreme sira iz mišine zadržao se do danas na obiteljskim gospodarstvima u Dalmaciji. Janjeća koža u proizvodnji sira iz mišine ima ulogu medija za zrenje sira, te se posebna pozornost posvećuje njenoj pripremi (Tudor Kalit 2013.). Tehnologija proizvodnje sira iz mišine još uvijek nije standardizirana. Stoga možemo naći razlike u određenim fazama proizvodnje ovisno na kojem se gospodarstvu sir proizvodi (Kalit 2016.).

Mlijeko je moguće siriti iz pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka. Ako se u proizvodnji koristi pasterizirano mlijeko uglavnom se primjenjuju dvije vrste pasterizacije (Tudor Kalit 2013.). Prva je niska pasterizacija koja se odvija na 63-65 °C oko 30 minuta. Druga vrsta pasterizacije vrši se na 72 °C oko 15 minuta (Tamime 2009.). Ako se sirenje vrši iz nepasteriziranog mlijeka ono mora biti izvrsne mikrobiološke kvalitete. Mlijeko se prije sirenja filtrira kako bi se otklonile eventualne nečistoće (Tudor Kalit 2013.). Filtriranjem mlijeka uklanjaju se samo vidljive nečistoće koje su slučajno ušle u mlijeko. Na taj se način uklanjanja i dio mikroorganizma (Perko 2015.). Temperatura sirenja, neovisno o tome da li se koristi pasterizirano ili nepasterizirano mlijeko, varira između 32 °C i 37 °C. Sirilo u prahu potrebno je razmutiti u 200 mL destilirane vode sobne temperature na svakih 100 L mlijeka kako bi se potaknula njegova aktivacija. Količina dodanog sirila najčešće ovisi o uputama proizvođača, a mora biti dovoljna da mlijeko zgruša u vremenu od 30 minuta do najviše jednog sata. Nakon približno pola sata potrebno je provjeriti čvrstoću gruš. Sirna lopatica uranja se u grušu i podiže prema gore. Ukoliko je grušenje gotovo, gruša će puknuti oštro, a izdvojena sirutka imat će prozirno-zelenkastu boju. Ako dođe do neravnomjernog pucanja gruš i pojave bjelkaste sirutke potrebno je pričekati još 5-10 minuta do završetka grušenja (Tudor Kalit 2013.).

Nakon završene koagulacije gruša se reže kutljačem u nepravilne oblike ili nožem u pravilne kocke približne veličine 3x3 cm. Zatim se sirno zrno zagrijava kako bi se otpustila zaostala sirutka, a tijekom procesa koristi se temperatura između 34 °C i 40 °C. Veličina sirnog zrna nakon sušenja ima oblik lješnjaka ili oraha. Slijedi ručno oblikovanje sirne grude u sirutki, njeno zamatanje i cijedenje u sirnoj marami postupkom samoprešanja. Cijeli postupak traje približno 5 sati. Nakon prešanja sir se soli krupnom morskom soli i slaže se u mišinu u slojevima na način da što manje prostora ostane između grumen sira. Posebno je važno tijekom punjenja u mišinu sir dobro sabiti i istisnuti sav zrak iz mišine te tako prevenirati moguće kvarenje sira. Ako nije napravljena dovoljna količina sira za cijelu mišinu, postupno se puni sljedeći dan (Tudor Kalit i sur. 2010., Tudor Kalit 2013.).

Zrenje sira odvija se na temperaturama između 16 i 18 °C, dok je relativna vlažnost zraka 65-80% (Tudor Kalit i sur. 2014.). Mišinu je potrebno negovati i svaki dan brisati vlažnom krpom radi skidanja plijesni. Također je potrebno okretati mišinu prvih nekoliko dana nakon punjenja, a kasnije svaka 2 dana (Tudor Kalit i sur. 2010.).

5.3. Sir iz mijeha

Sir iz mijeha tradicionalni je sir koji se proizvodi na području Hercegovine. Porijeklo nastanka poklapa se s nastankom hrvatskog sira iz mišine.

5.3.1. Karakteristike sira

Postoje dvije varijante hercegovačkog sira iz mijeha. Jedna od varijanti proizvodi se od obranog mlijeka nakon proizvodnje kajmaka (Kalit 2016.). Kajmak je hercegovački proizvod koji 2 mjeseca zrije u drvenoj posudi „kaci“, a zatim se stavlja u životinjsku kožu (Slika 5.3.1.1.) na anaerobno zrenje (Samardžić 2009.). Nakon proizvodnje kajmaka, mlijeko ima visok udio proteina i mali postotak mliječne masti, što doprinosi nutritivnoj vrijednosti sira (Tudor Kalit i sur. 2010.). Druga varijanta proizvodnje sira iz mijeha je primjena punomasnog ili djelomično obranog mlijeka (Kalit 2016.).



Slika 5.3.1.1. Hercegovački Sir iz mijeha

Izvor: <http://www.wikipedia.com>

5.3.2. Proizvodnja sira iz mijeha

Tehnologija proizvodnje sira iz mijeha slična je proizvodnji hrvatskog sira iz mišine. Jedna od razlika je privremeno skladištenje posoljenog sira u drvenoj posudi pod pritiskom. Razlog zbog kojeg se sir nakon cijedenja ne stavlja u mijeh je nedovoljna količina sira za popunjavanje cijelog mijeha (Kalit 2016.). Potrebno je čekati da se proizvede dovoljna količina sira za popunjavanje mijeha, a za to vrijeme odvija se aerobna faza u kojoj bakterije mliječne kiseline intenzivno razgrađuju laktozu u mliječnu kiselinu. Druga razlika između hrvatskog i hercegovačkog sira iz mišine/mijeha je tekstura sira. Sir iz mijeha se prije punjenja u janjeću kožu ručno mrvi na manje komade nepravilnog oblika. Ponovno se soli ako je potrebno i stavlja u janjeću kožu na zrenje. Tekstura sira iz mijeha više je mrvičasta u usporedbi s hrvatskim sirom iz mišine (Tudor Kalit i sur 2010.).

5.4. Tulum sir

5.4.1. Karakteristike sira

Prema Tudor Kalit i sur. (2010.) u Turskoj postoji veliki broj sireva koji zriju u životinjskoj koži. Tulum sir najpoznatija je vrsta sira u turskoj koji zrije u životinjskoj koži. Postoji nekoliko varijanti tulum sira kao što su erzincan (savak) tulum, divle tulum i cimi tulum sir. Erzincan (savak) tulum sir najpoznatija je varijanta tulum sira. Danas se njegova proizvodnja odvija u svakoj regiji u Turskoj. Ime ovog sira potječe od plemena Savak, nomadskog naroda koji je u prošlosti obitavao na području istočne Turske, točnije u provinciji Erzincan u regiji Anatoliji (Slika 5.4.1.1.) (Ceylan i sur. 2007.). Tulum sir tradicionalno se proizvodio i prodavao na seoskim lokalnim tržnicama u Turskoj (Sert i sur. 2014.). Ceylan i sur. (2007.) navode da se proizvodnja do danas zadržala u manjim mljekarama i obiteljskim gospodarstvima korištenjem tradicionalnih metoda, dok se prema Sertu i sur. (2014.) modernim metodama proizvodnje koristi vrlo mali broj proizvođača. Riječ je o popularnoj vrsti sira u Turskoj, no tehnologija proizvodnje još uvijek nije standardizirana.



Slika 5.4.1.1. Turska regija Anatolija – područje proizvodnje tulum sira

Izvor: <http://www.lahistoriaconmapas.com>

Zrenje sira odvija se u janjećoj/jarećoj koži po kojoj je i dobio ime. Prema Kamber (2008.) glavne razlike između pojedinih varijanti tulum sira temelje se na tehnologiji proizvodnje, uvjetima u zionici, kvaliteti i sastavu mlijeka, a razlikuju se ovisno o regiji u kojoj se sir proizvodi.

Prema Tudor Kalit i sur. (2010.) tradicionalna tehnologija proizvodnje tulum sira slična je proizvodnji hrvatskog i hercegovačkog sira koji zrije u životinjskoj koži. U proizvodnji se koristi ovčje ili kravlje mlijeko, ali može se koristiti kozje i bivolje mlijeko i njihova mješavina. Prema Sert i sur. (2014.) mlijeko za proizvodnju tulum sira može biti djelomično obrano, ali u tradicionalnoj proizvodnji koristi se potpuno obrano ovčje mlijeko koje ostaje nakon proizvodnje maslaca. Kamber (2008.) navodi da je žuta boja tulum sira izraženija ukoliko se koristi punomasno mlijeko. Neki proizvođači tijekom proizvodnje dodaju jogurt kako bi okus sira bio bolji i izraženiji. Boja tulum sira varira od bijele do izražene žute boje, ovisno o vrsti mlijeka koja se koristi za proizvodnju sira (Slika 5.4.1.2.) (Kamber 2008.). Sadržava visok udio proteina, mliječne masti (ako se proizvodi iz punomasnog mlijeka), te visok udio suhe tvari (Ceylan i sur. 2007). Pripada skupini polutvrdih sireva. Tekstura mu je granulirana i sklona mrvljenju (Kamber 2008.). Karakterističnog je kiselkastog okusa, a tijekom konzumacije može se osjetiti originalni okus maslaca (Sert i sur. 2014.). Yilmaz i sur. (2005.) navode da prisustvo plijesni tijekom zrenja tulum sira utječe na stvaranje specifičnog okusa po plijesnima, dok Kamber (2008.) tvrdi da okus tulum sira također varira ovisno o regiji proizvodnje.



Slika 5.4.1.2. Tulum sir

Izvor: <http://www.scielo.br>

5.4.2. Proizvodnja tulum sira

Tulum sir tradicionalno se proizvodi od obranog ovčjeg mlijeka dobivenog nakon proizvodnje maslaca (Yilmaz i sur. 2005.) te traje od 10 do 12 dana (Ceylan i sur. 2007.).

Tijekom pasterizacije dolazi do inaktivacije određenih enzima u mlijeku koji imaju važnu ulogu u zrenju sira. Danas se tulum sir proizvodi i od pasteriziranog mlijeka zbog higijenskih razloga (Sert i sur. 2014.). Pasterizacija se provodi na 65 °C u trajanju od 30 minuta. Zatim se mlijeko hladi na 30 °C i koristi se starter kultura (Ceylan i sur. 2007.). Tradicionalna proizvodnja uključuje cijedenje mlijeka kroz nekoliko slojeva sirne marame kako bi se odstranile eventualne nečistoće iz mlijeka (Kamber 2008.), zagrijavanje sirovog ovčjeg mlijeka na 30 °C i dodavanje mikrobnog sirila (Ceylan i sur. 2007.).

Nakon približno 90 minuta koagulirano mlijeko se nožem reže na kockice veličine 1 cm³, te se prebacuje u lanenu maramu gdje se cijedi 15 h bez pritiska. Zatim se gruša ponovno reže i cijedi 2 dana, ali ovaj puta pod pritiskom od 1 kg za 1 kg gruša. Nakon zadnjeg cijedenja, gruša se reže treći put i soli 2% NaCl. Zatim se postupak sušenja u lanenoj marami provodi treći put i traje 5 dana, te slijedi zadnje rezanje (Ceylan i sur. 2007.). Kamber (2008.) navodi da se u pojedinim regijama sirno zrno zagrijava na temperaturu 50-60 °C oko 10-15 minuta kako bi se ubrzalo otjecanje sirutke iz sirnoga gruša. Naposljetku se sir ostavlja da odleži 20 h prije nego ga se stavi u jareću kožu (Ceylan i sur. 2007.).

Anaerobno zrenje sira traje 3-6 mjeseci. Sir zrije na temperaturi od 6-10 °C i pri relativnoj vlažnosti zraka 65-85%. Prema Yilmazu i sur. (2005.) zrenje tulum sira moralo bi trajati minimalno 4 mjeseca kako bi se postigao njegov karakterističan okus. Tijekom zrenja tulum sira životinjska koža ima veliku ulogu u stvaranju karakterističnog okusa i arome sira. U modificiranoj proizvodnji tulum sira mogu se koristiti plastični spremnici umjesto kozje kože kako bi se spriječila eventualna kontaminacija (Colak i sur. 2007.).

5.5. Darfiyeh sir

5.5.1. Karakteristike sira

U Libanonu se uzgoj koza tradicionalno prenosi na nove generacije. Zbog novih tehnologija uzgoja životinja i proizvodnje mliječnih proizvoda postoji opasnost od nestajanja kozarstva. Kozje mlijeko izuzetno je cijenjena namirnica na području Libanona zbog visoke hranjive vrijednosti i brojnih kozjih proizvoda (darfiyeh, aricheh, serdale, labneh, kishk) koji se od njega proizvode. Potražnja za navedenim proizvodima sve više raste, stoga je važno očuvanje njihove autentičnosti (Serhan i Mattar 2017.). Darfiyeh je polutvrđi kozji sir čije se zrenje odvija u jarećoj koži. Stoljećima se proizvodi na području sjevernih libanonskih planina. Tradicionalno se proizvodi od svježeg sirovog kozjeg mlijeka (Serhan i sur. 2009.).

5.5.2. Proizvodnja darfiyeh sira

Prema Serhan i sur. (2010.) u proizvodnji sira darfiyeh koristi se kozje mlijeko jutarnje i večernje mužnje. Mlijeko se zatim filtrira na sobnoj temperaturi kako bi se otklonile eventualne nečistoće. U proizvodnji darfiyeh sira ne koristi se starter kultura niti otopina CaCl_2 za lakšu koagulaciju. Zatim slijedi zagrijavanje mlijeka na temperaturu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ i korištenje mikrobnog sirila *Mucor miehei* 1:150,000 (Serhan i Mattar 2017.).

Vrijeme potrebno za koagulaciju je između 60-90 minuta. Nakon koagulacije gruš se reže kako bi se olakšalo izdvajanje sirutke koja će se kasnije koristiti za proizvodnju albuminskog sira arichi, sira u tipu riccota. Albuminski sir arichi i kazeinski sir darfiyeh zriju zajedno u jarećoj koži. Sirni gruš se ne soli te se oblikuje u sirne kuglice težine 400-500g (slika 5.5.2.1.). U proizvodnji albuminskog sira sirutku je potrebno zagrijati na $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ i dodati 500 ml svježeg sirovog kozjeg mlijeka. Nakon što proteini sirutke koaguliraju, kupi ih se s površine i oblikuje arichi sir. Soljenje sira arichi s 1 kg NaCl -a od iznimne je važnosti s obzirom da se darfiyeh sir tijekom proizvodnje ne soli, već tijekom zrenja sol s arichi sira difundira u darfiyeh sir. Od ukupne količine mlijeka za sireenje (100kg) dobije se 10 kilograma sira (Serhan i sur. 2010.).

Darfiyeh sir i arichi sir zajedno se stavljaju u jareću kožu kroz vratni otvor na anaerobno zrenje. U kožu se slažu 2-3 sirne kuglice darfiyeh sira, a nakon toga slijedi arichi sir (slika 5.5.2.1.). Jareća koža hermetički se zatvara i pohranjuje u prirodne podrumne. Sir zrije na temperaturi od $10\text{--}12\text{ }^{\circ}\text{C}$, relativne vlažnosti zraka 85-95% oko 1-3 mjeseca. Jareća koža svaki se tjedan soli s 5 kg soli (Serhan i sur. 2010.).



Slika 5.5.2.1. Stavljanje darfiyeh sira i arichi sira na anaerobno zrenje u jareću kožu

Izvor: <http://www.slowfoodbeirutb.blogspot.com>

5.6. Bouhezza sir

5.6.1. Karakteristike sira

Bouhezza je lokalni alžirski tradicionalni sir. Njegova proizvodnja veže se za sjevero-istočni dio države, točnije regiju. Chaouia Medjoudj i sur. (2017.) tvrde da se bouhezza sir tradicionalno proizvodi od sirovog kravljeg ili kozjeg mlijeka i njihove mješavine, dok Aissaoui i sur. (2011.) navode da se u proizvodnji osim kozjeg i kravljeg mlijeka može koristiti i ovčje mlijeko. Prema navodima Aissaoui i sur. (2011.) proces proizvodnje sireva sastoji se od koagulacije mlijeka, sušenja sirnog zrna, soljenja i za većinu sireva zrenja sira. Kod bouhezza sira proizvodnja je nešto drugačija. Bouhezza sir proizvodi se bez uporabe sirila. Samoregulacija proizvodnje temelji se na solima i kiselinama proizvedenima od strane mikroorganizama prirodno prisutnima u mlijeku. Prirodna mikroflora mlijeka štiti sir od mogućih patogenih mikroorganizama i uzročnika kvarenja (Medjoudj i sur. 2017.). Zrenje sira odvija se u janjećoj ili jarećoj koži tradicionalnog naziva „Chekoua“ (Medjoudj i sur. 2017.). Sir se nakon završenog procesa zrenja začinja crvenom ljutom paprikom (Aissaoui i sur. 2011.). Bouhezza kozji sir pikantnog je okusa, bijele boje i pastozne konzistencije s crvenim točkicama od ljute paprike. Tekstura je maziva, glatka, čvrsta i ljepljiva. Miris sira je poprilično jak i podsjeća na octenu kiselinu (Medjoudj i sur. 2017.).

5.6.2. Proizvodnja bouhezza sira

U proizvodnji bouhezza sira koristi se lben. Sirovo mlijeko (3 L) prolazi kroz proces spontane fermentacije i koagulacije tijekom 24-36 sati na sobnoj temperaturi 25-30 °C (Medjoudj i sur. 2017.). Zatim se nastali gruš imena „Rayeb“ miješa oko 30-45 minuta s 0,25 L tople vode temperature 20-25 °C. Navedeni proces potiče nakupljanje zrna maslaca, čime se olakšava obiranje (Medjoudj i sur. 2017.). Nakon djelomičnog obiranja nastali proizvod zvan „Lben“ stavlja se u chekouau u količini 2-3 L (Aissaoui i sur. 2011.). Punjenjem chekouae lben-om umanjuje se intenzivan miris jareće kože i koža se priprema za punjenje mliječnim sadržajem (lben i sirovo mlijeko) (Medjoudj i sur. 2017.). Punjenje u jarećoj koži ostaje preko noći, a nakon toga se uklanja (Aissaoui i sur. 2011.). Glavni dio proizvodnje bouhezza sira započinje soljenjem lben-a s 20-25g/L soli. Chekoua se prvog dana puni s 3 litre posoljenog lben-a, a zatim se svaka 3-4 dana ponovno puni s 2-2.5 L lbena. Tijekom proizvodnje bouhezza sira dolazi do spontane sinereze, odnosno izvajanja sirutke kroz pore na jarećoj koži (Medjoudj i sur. 2017.). Vanjski dio chekouae potrebno je svakodnevno čistiti. Dva tjedna prije kraja proizvodnje chekoua se puni sirovim mlijekom u količini od 2 L u 4 intervala. Dodavanjem sirovog kozjeg mlijeka i njegovog miješanja sa sirnim grušem (lben), pridonosi se završnoj masnoći sira, regulira se kiselost i koncentracija soli u siru (Medjoudj i sur. 2017.).

6. Fizikalno-kemijske karakteristike sireva koji zriju u životinjskoj koži

Tablica 6.1. prikazuje fizikalno-kemijske karakteristike sireva koji zriju u životinjskoj koži. U Republici Hrvatskoj 1969. godine zabilježena je prva analiza kemijskog sastava sira koji zrije u životinjskoj koži. Sir iz mišine u prošlosti je bio klasificiran kao meki punomasni sir. Novijim istraživanjima utvrdilo se da sir koji zrije u životinjskoj koži pripada skupini tvrdih sireva (Tudor Kalit i sur. 2010.) s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari od 53,30 %, iako je tehnologija njegove proizvodnje specifična za polutvrde sireve (Tudor Kalit i sur. 2014.). Slične rezultate potvrdilo je istraživanje provedeno na darfiyeh libanonskom siru. U prvih 40 dana dolazi do značajno većeg gubitka vlage iz sira nego u posljednjih 20 dana sira (Serhan i sur. 2010.). Gubitak vlage uzrokovan je stvaranjem mliječne kiseline tijekom zrenja, sinerezom i smanjenom hidratacijom kazeina kada pH-vrijednost dođe do izoelektične točke (Tudor Kalit i sur. 2014.). Na kraju zrenja (60 dana) darfiyeh sira udio vode u bezmasnoj tvari sira iznosi oko 54% (Serhan i sur. 2010.) što je gotovo identično rezultatu (53,30%) dobivenom analizom sira iz mišine na kraju zrenja od 60 dana (Tudor Kalit i sur. 2014.). Istraživanjem koje su proveli Yilmaz i sur. (2005.) utvrdilo se da tulum sir pripada kategoriji polutvrdih sireva s 65,27 % vode u bezmasnoj tvari sira nakon 90 dana zrenja. Razlog većeg postotka vode u tulum siru u usporedbi sa sirom iz mišine (53,30 %) i darfiyeh sirom (54 %) je niža temperatura zrenja (6-10 °C) tulum sira što rezultira smanjenim gubitkom vlage iz sira kroz pore životinjske kože. Suprotno navedenom, najviši postotak suhe tvari (78,98 %) ima hercegovački sir iz mijeha koji zbog permeabilnosti životinjske kože u kojoj zrije gubi najviši udio vode (Dozet i sur. 1996.).

Prema Rako i sur. (2019.) gubitkom vlage iz sira tijekom zrenja povećao se udio suhe tvari, masti i proteina u siru iz mišine. Slične rezultate zabilježili su Tudor Kalit i sur. (2014.) i Lešić i sur. (2015.). Rezultatima prijašnjeg istraživanja provedenog od strane Tudor Kalit i sur. (2012.) potvrđena je veća permeabilnost prirodne kore sira od permeabilnosti životinjske kože u kojoj zrije sir. Sir koji zrije u prirodnoj kori zbog većeg gubitka vlage ima viši sadržaj suhe tvari tijekom svih faza zrenja sira. Prema navodima Hayaloglua i sur. (2007.) plastične bačve pokazuju loša svojstva permeabilnosti u usporedbi sa životinjskom kožom. Sirevi koji zriju u plastičnim bačvama imaju manji udio suhe tvari na kraju zrenja te imaju nižu ukupnu senzornu ocjenu od tulum sira koji zrije u životinjskoj koži (Ceylan i sur. 2007.). Tijekom zrenja bouhezza alžirskog sira udio suhe tvari na kraju zrenja doseže vrijednost od 30,60 %. Udio proteina i masti povećava se proporcionalno s udjelom suhe tvari u siru tijekom zrenja sira, pa je tako udio masti u suhoj tvari sira 35,62%, a udio proteina 15,65 % 64. dana zrenja bouhezza sira (Medjoudj i sur. 2017.). Slične rezultate dobili su i Tudor Kalit i sur. (2014.) gdje udio masti u suhoj tvari iznosi 34,53%, a udio proteina u suhoj tvari 23,93% 60. dana zrenja sira iz mišine. Nešto manji sadržaj masti u suhoj tvari Yilmaz i sur. (2005.) zabilježili su u tulum siru (zrelost sira 90 dana) 29,50%, dok su Serhan i sur. (2010.) kod libanonskog darfiyeh sira (zrelost sira 60 dana) zabilježili veći sadržaj masti u suhoj tvari 42,24-43,47 %. Ove razlike rezultat su različitog sastava mlijeka za sirenje ovisno o vrsti mlijeka i pasmini životinje, te tehnologiji proizvodnje navedenih vrsta sireva (Tudor Kalit i sur. 2014.).

Tudor Kalit i sur. (2012.) usporedili su fizikalno-kemijske parametre sira iz mišine i sira koji zrije u kori. Rezultati su pokazali brži porast i višu pH-vrijednost tijekom cijelog perioda zrenja sira iz mišine zbog pojačane proteolize. Porast pH-vrijednosti povezan je sa smanjenim stvaranjem mliječne kiseline iz rezidualne laktoze. Gomilanje produkata proteolize (aminokiseline i amonijak), razgradnja zaostale laktoze do mliječne kiseline i njena potrošnja za rast i razvoj kvasaca i plijesni utječu na povećanje pH-vrijednosti (Tudor Kalit i sur. 2014.). pH-vrijednost sira iz mišine 60. dana zrenja iznosi 5,15, dok su Yilmaz i sur. (2005.) zabilježili pH-vrijednost tulum sira (90 dana zrenja) od 5,03, a Serhan i sur. (2010.) 4,99-5,06 pH u darfiyeh siru (60 dana zrenja) na kraju zrenja.

Svrha soljenja sireva je formiranje okusa, konzerviranje i sušenje sira. Postupkom soljenja zaustavlja se daljnje zakiseljavanje sira, odnosno aktivnost mikroorganizama mljekarske kulture. Koncentracija soli u siru na kraju zrenja ovisi o tehnici soljenja sireva i vrsti sira koji se proizvodi (Havranek i sur. 2014.). Koncentracija soli jedno je od važnih svojstava o kojima ovisi brzina razgradnje rezidualne laktoze i brzina zrenja svih vrsta sireva, a posebice onih koji zriju u životinjskoj koži (Tudor Kalit i sur. 2014.). Prosječni udio soli u zrelom siru iz mišine je 2,46 % (Tudor Kalit i sur. 2014.) dok je u darfiyeh siru 3,01-9,56 %, u hercegovačkom siru iz mjeha 3,59 % (Grbavac 2002.), dok je u tulum siru 4,97 % (Yilmaz i sur. 2005.). Velike razlike u udjelu soli u darfiyeh siru mogu biti uzrokovane metodom soljenja. Darfiyeh sir stavlja se na zrenje u životinjsku kožu zajedno s albuminskim sirom pri čemu se soli samo albuminski sir, a darfiyeh sir se ne soli. Važno je da sol s albuminskog sira difundira na darfiyeh sir. Kako se svaki albuminski sir zasebno soli posipanjem NaCl-a po površini, moguće je da sirevi ne dobiju jednaku količinu soli, stoga i sama difuzija soli s albuminskog sira na darfiyeh sir neće biti ista (Serhan i ur. 2010.).

Tablica 6.1. Prosječni fizikalno-kemijski sastav sireva koji zriju u životinjskoj koži

<i>Autori</i>	<i>Milin, 1969.</i>	<i>Dozet i sur. 1996.</i>	<i>Yilmaz i sur. 2005.</i>	<i>Ceylan i sur. 2007.</i>	<i>Serhan i sur. 2010.</i>	<i>Tudor Kalit i sur. 2014.</i>	<i>Medjoudj i sur. 2017.</i>	<i>Rako i sur. 2018.</i>
<i>Naziv sira</i>	Sir iz mišine	Sir iz mijeha	Tulum	Tulum	Darfiyeh	Sir iz mišine	Bouhezza	Sir iz mišine
<i>Zrelost sira (dani)</i>	Različita	Različita	60	90	60	60	64	30
<i>Suha tvar (%)</i>	62,96	78,98	53,04	65,06	-	64,97	30,60	58,20
<i>Proteini (%)</i>	24,8	31,17	-	26,10	36,72	23,93	15,65	22,18
<i>Mast (%)</i>	32,92	39,40	29,05	32,00	-	34,53	35,62	31,28
<i>Mast u suhoj tvari (%)</i>	52,5	49,54	55,63	-	43,46	52,96	-	-
<i>Voda u bezmasnoj suhoj tvari (%)</i>	-	-	-	-	54,15	53,30	-	60,77
<i>NaCl (%)</i>	4,29	-	4,16	4,97		2,46		1,91
<i>pH</i>	-	-	5,03	-	4,99	5,15	3,99	5,20
<i>Mliječna kiselina (%)</i>	-	0,80	-	7,11	-	1,56		-
<i>Pepeo</i>	-	4,44	-	6,60	-	-	1,24	-

7. Biokemijske promijene tijekom zrenja sira u koži

7.1. Proteoliza

Primarna proteoliza uključuje početnu razgradnju para-kazeinske mreže uz djelovanje kimočina. Ova reakcija posebno je izražena u sirevima koji zriju na nižim temperaturama. U razgradnji para-kazeina na kazeinske frakcije sudjeluje i plazmin u nešto manjoj mjeri. Nastale frakcije srednje i male molekularne mase doprinose aromi i teksturi sira (Havranek i sur. 2014.).

Rako i sur. (2019.) proveli su istraživanje utjecaja proteolize na teksturu sira iz mišine. Rezultati istraživanja prikazuju značajnu razgradnju α_{S1} -kazeina popraćenu nakupljanjem α_{S1} -I-kazeina tijekom zrenja sira. Iako degradacija β -kazeina nije bila značajna, koncentracija γ -kazeina značajno raste tijekom zrenja sira iz mišine, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Celik i Tarakci (2017.). U istraživanju na bouhezza alžirskom siru detektirani su β -CN f29-209 (γ 1-CN), β -CN f106-209 (γ 2-CN), β -CN f108-209 (γ 3-CN) peptidi. Nastali peptidi rezultat su djelovanja endogenih enzima mlijeka i plazmina na β -kazeinu i imaju manju elektroforetsku aktivnost od peptida nastalih razgradnjom α -kazeina. U proizvodnji bouhezza sira ne dodaje se sirilo, te se pretpostavlja da su detektirani peptidi nastali enzimatskom aktivnosti katepsina D na α_S -kazeinu (Medjoudj i sur. 2017.). Vrdoljak i sur. (2018.) navode da indeks alfa u siru iz mišine iznosi 58%, a indeks beta 39% na kraju zrenja sira iz mišine (45. dana). Rako i sur. (2019.) navode značajno intenzivniju hidrolizu α_{S1} -kazeina od β -kazeina tijekom zrenja sira iz mišine. Rezultati istraživanja potvrdili su da se veći dio dodanog sirila izlučuje sirutkom te je 60,66% α_{S1} -kazeina i 90,49% β -kazeina ostalo nerazgrađeno. Celik i Tarakci (2017.) u istraživanju tulum sira dobili su slične rezultate za β -kazein (90,14 %), dok je vrijednost za α_{S1} -kazein (84,96 %) nešto veća u usporedbi za sirom iz mišine. Sengül i sur. (2014.) tvrde da korištenje mikrobnog sirila pozitivno utječe na intenzitet proteolize u tulum siru, odnosno dolazi do intenzivnije razgradnje α_{S1} -kazeina i β -kazeina. Nakon 90 dana zrenja sireva u čijoj proizvodnji su korištena mikroba sirila (proteaze *Aspergillus niger* i *Rhizomucor miehei*) udio α_{S1} -kazeina (50,59 %, 50,32 %) i β -kazeina (55,38 %, 38,20 %) je manji u odnosu na sir u čijoj proizvodnji je korišteno prirodno sirilo (67,54 %, 63,93%).

Za što bolje razumijevanje proteolize koja se odvija u siru tijekom zrenja, potrebno je istražiti dušične tvari koje nastaju tijekom navedenog biokemijskog procesa. Formiranje dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) tijekom zrenja sira predstavlja opseg i brzinu proteolize. Koliko će dušičnih tvari nastati ovisi o prethodnom procesu hidrolize kazeina tijekom djelovanja kimočina i proteinaza mlijeka prisutnih na početku zrenja (Lavasani i sur. 2012.). Procjena sekundarnih proteolitičkih promjena mjeri se udjelom dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN) i udjelom dušičnih tvari topljivih u trikloroetanoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (TN). Dobivene vrijednosti WSN%TN prikazuju količinu polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina te njihovih soli, koje nastaju kao posljedica kimočinske aktivnosti i u manjoj mjeri plazminske aktivnosti. Vrijednosti TCA-SN%TN pokazuju količinu neproteinskog dušika i slobodnih aminokiselina, koje nastaju kao posljedica proteolitičke aktivnosti mikrobnih kultura i nestarsterske mikrobne populacije te u

manjoj mjeri kimozijske aktivnosti (Havranek i sur. 2014.). Kazeinske micelle i molekule kimozijske negativno su nabijene i međusobno se odbijaju. Dodavanjem soli u mlijeko pri sirenju povećava se ionska jakost u mlijeku. Navedeni postupak dovodi do smanjenja zeta-potencijala i smanjenja negativnog naboja na površini kazeinske micelle. Time se omogućava interakcija micelle i molekula kazeina, a kao rezultat kimozijske se zadržava u sirnom grušu. Sirilo je odgovorno za proizvodnju WSN% TN i za proizvodnju TCA-SN% TN u manjem opsegu (Bansal i sur. 2010.). Bakterijski enzimi imaju značajan doprinos stvaranju peptida malih molekularnih masa, aminokiselina, amonijaka i drugih spojeva topljivih u 12% TCA (Desmazeaud i sur., 1977., Addeo i sur.1992).

Prema navodima autora Rako i sur. (2019.) rezultati sekundarne proteolize pokazuju značajno povećanje udjela dušičnih tvari topljivih u vodi u odnosu na ukupni dušik i povećanje udjela dušičnih tvari topljivih u 12% trikloroctenoj kiselini u odnosu na ukupni dušik. Slične rezultate TCA-SN% TN i WSN%TN u istraživanju zabilježila je i Tudor Kalit (2014.) s nešto manjim vrijednostima TCA-SN% TN i WSN%TN u svakoj fazi zrenja sira. Prema Tudor Kalit (2014.) WSN%TN značajno raste tijekom zrenja sira iz mišine i doseže vrijednost od 18,34% nakon 30 dana zrenja, dok su Rako i sur. (2019.) zabilježili 29,25% vrijednosti WSN%TN tijekom istog perioda zrenja. Şengül i sur. (2014.) navode da udio WSN%TN povećava tijekom cijelog perioda zrenja tulum sira, ali porast vrijednosti nije povezan s vrstom sirila. Vrijednost WSN%TN u uzorku sira u kojem se koristilo prirodno sirilo iznosi 6,01% 30.-og dana zrenja. Tijekom perioda zrenja vrijednost raste i doseže WSN%TN 17,80% 90.-og dana zrenja tulum sira.

Veće vrijednosti u novijem istraživanju mogu biti razlog i većeg zadržavanja rezidualnog sirila u sirnom grušu. Rezidualno sirilo pridonosi povećanju WSN%TN više nego plazmin. Rezidualno sirilo ima sposobnost stvaranja peptida velike molekularne mase, ali pokazuje ograničenu sposobnost oslobađanja slobodnih aminokiselina tijekom zrenja sira (Rako i sur. 2019.). Druga istraživanja provedena na sirevima koji zriju i životinjskoj koži potvrđuju pozitivnu korelaciju povećanja WSN%TN i trajanja zrenja. U istraživanju provedenom na uzorcima darfijskih libanonskog sira dokazan je utjecaj udjela soli i vlage na proteolitičku aktivnost u siru. Serhan i sur. (2010.) navode da vrijednost WSN%TN uzorka B (uzorak sa smanjenom koncentracijom soli) darfijskih sira iznosi 13,16 % nakon 20 dana zrenja. Uzorak A i uzorak C imaju manji udio WSN%TN (8,95 %,8,80 %). Razlog tome bila je smanjena koncentracija NaCl-a i veći postotak vlage u prvom uzorku. Sadržaj soli i tehnika soljenja mogu utjecati na opseg proteolize, odnosno veća količina soli može odgoditi proteolizu na početku zrenja sira. Nakon 40. dana zrenja darfijskih sireva intenzivna proteoliza odvijala se u sva tri uzorka sira. Na kraju zrenja darfijskih sireva uzorak B ima najviši sadržaj WSN%TN (21,96 %), dok uzorak A i C imaju nešto niži sadržaj WSN%TN-a (17,70 % i 20,14 %). Intenzivnija proteolitička aktivnost u uzorku B može se objasniti značajno manjim udjelom soli u tom uzorku.

Medjoudj i sur. (2017.) navode da brzina proteolize izražena udjelom dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN% SN na pH 4,4) u ukupnom dušiku iznosi 13,04% na kraju zrenja (64. dan) bouhezza alžirskog sira proizvedenog od sirovog kozjeg mlijeka tradicionalnim postupkom proizvodnje. Rezultati dobiveni analizom bouhezza sira značajno su niži u usporedbi sa

spomenutim rezultatima Rako i sur. (2019.) i Tudor Kalit i sur. (2014.) i ukazuje na slabiji intenzitet proteolize. U istraživanju provedenom na siru iz mišine udio WSN/TN na početku zrenja (15.-og dana) iznosi 9 %, 30.-og dana WSN/TN iznosi 13 %, a na kraju zrenja (45.-og dana) vrijednost WSN/TN ponovno pada i iznosi 12 % (Vrdoljak i sur., 2018.).

Vodotopljive peptide nastale djelovanjem kimoza i u manjoj mjeri plazmina dalje razgrađuju intracelularni i ekstracelularni enzimi starter bakterija i bakterija nestarterske mikroflore. Nastali spojevi imaju manju molekulsku masu i neproteinske su dušične tvari topljive u 12%-TCA (Tudor Kalit i sur. 2014.). Vrijednost TCA-SN%TN indikator je manjih dušičnih tvari i očekivano je da se tijekom procesa zrenja ta vrijednost povećava. Često je vrijednost TCA-SN%TN kompatibilna vrijednosti WSN-a (Celik i Tarakci 2017.). Sukladno navedenom, Serhan i sur. (2010.) zabilježili su povećanje vrijednosti TCA-SN%TN tijekom cijelog perioda zrenja u svim uzorcima darfiyeh sira. Povećanje TCA-SN%TN vrijednosti bilo je u pozitivnoj korelaciji s povećanjem vrijednosti WSN%TN. Vrijednost TCA-SN%TN uzorka sira (B) iznosi 11,30% 20.-og dana zrenja, dok 60.-og dana zrenja ona iznosi 18,28 %. Pozitivnu korelaciju između vrijednosti WSN%TN i TCA-SN%TN zabilježili su Tudor Kalit i sur. (2014.). Vrijednosti WSN%TN (13,96%) i TCA-SN%TN (6,37%) u siru iz mišine 15.-og dana zrenja povećale su se sukladno s dužinom trajanja zrenja te na kraju zrenja (60 dana) iznose 23,69 % i 12,24 %. Şengül i sur. (2014.) navode da je povećanje vrijednosti TCA-SN%TN u sirevima usko povezano s vrstom sirila i vremenom zrenja. Sir koji se sirio s *Aspergillus niger* proteazama 30.-og i 60.-og dana zrenja pokazuje najmanju vrijednost TCA-SN/TN (2 % i 5 %), dok sirevi čije sirenje se provelo proteazama *R. Mieheli* i telećim sirilom imaju nešto veće vrijednosti u tom periodu zrenja (TCA-SN/TN 3 % i 9 %, TCA-SN/TN 3 % i 6 %). Na kraju zrenja od 90 dana najvišu vrijednost TCA-SN/TN ima sir u kojem se koristilo mikrobnom sirilom *podrijetlom iz Aspergillus niger* (14%), dok preostala sirevi proizvedeni mikrobnim sirilom *Rhizomucor miehei* i prirodnim sirilom imaju nešto niže vrijednosti (12 %, 9 %). Uz navedeno, na povećanje TCA-SN%TN vrijednosti može utjecati i aktivnost nestarterske mikrobne kulture kao i kvasaca i plijesni. Prema Tudor Kalit i sur. (2012.) vrijednost TCA-SN%TN veća je kod sireva čije se zrenje odvija u životinjskoj koži u usporedbi sa sirom koji zrije u prirodnoj kori. Rako i sur. (2019.) zabilježili su vrijednosti TCA-SN% TN na početku zrenja koji iznosi 9,49 %, što je 3,5 puta veće od rezultata kojeg navodi Tudor Kalit (2014.). Razlog tome vjerojatno je veća vlaga u siru tijekom zrenja i različite autohtone vrste mikroorganizama različite proteolitičke aktivnosti.

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži prolaze kroz izraženije proteolitičke promjene od sireva koji zriju u kori, te posljedično tome sadrže viši udio WSN%TN. Izraženije proteolitičke promjene rezultat su anaerobnih uvjeta zrenja, temperature zrenja i prirodne mikrobne kulture životinjske kože (kvasci i plijesni). Razlika u sadržaju WSN%TN između sireva koji zriju u koži (19,98 %) i sireva koji zriju u kori (13,86 %) značajna je tek nakon 45. dana zrenja sireva, što ukazuje na to da se proteolitičke reakcije u mišini intenziviraju tek nakon navedenog perioda zrenja (Tudor Kalit i sur. 2012.).

Sir čije se zrenje odvija u koži postiže određenu vrijednost TCA-SN%TN 75.-og dana zrenja (12,5-13 %), dok je feta siru potrebno 240 dana zrenja za postizanje iste vrijednosti (Katsiari i sur., 2000.). Tijekom cijelog perioda zrenja sireva vrijednosti TCA-SN%TN su više u

sirevima koji zriju u koži od sireva koji zriju u kori. Tjedni porast vrijednosti TCA-SN%TN u sirevima koji zriju u koži iznosi 0,78%, dok sirevi koji zriju u prirodnoj kori imaju nešto niži tjedni porast vrijednosti TCA-SN%TN (0,52%). Vrijednost TCA-SN (%TN) na kraju zrenja sira iz mišine veća je u odnosu na rezultate istraživanja proteolize drugih vrsta sireva (Katsiari i sur., 2000.; Mallatou i sur., 2003.; Kalit i sur., 2005.). Slično opažamo i kod dušičnih tvari topljivih u vodi. Feta sir postiže sličnu vrijednost WSN%TN kao i sir iz mišine (23,69%; Tudor Kalit i sur. 2014.), međutim tek nakon 240 dana zrelosti (22,10%) (Katsiari i sur., 2000). Teleme sir zrelosti 360 dana ima sličan udio WSN%TN kao i sir iz mišine zrelosti svega 30 dana (Mallatou i sur., 2003).

Usporedba vrijednosti dušičnih tvari s rezultatima provedenima na drugim vrstama sireva (oni koji ne zriju u životinjskoj koži) jasno ukazuje na intenzivnu proteolizu koja se odvija u životinjskoj koži kao mediju za zrenje sira, odnosno sirevi koji zriju u životinjskoj koži pripadaju skupini sireva s intenzivnim i brzim proteolitičkim procesima što rezultira njegovim specifičnim okusom i teksturom (Tablica 7.1.1.). Različite vrijednosti dušičnih tvari između sireva koji zriju u životinjskoj koži posljedica su različitih vrsta mlijeka korištenih za proizvodnju sireva, različite tehnologije proizvodnje te različit stupanj zrelosti pojedinih sireva.

Tablica 7.1.1. Sekundarne proteolitičke promjene na kraju zrenja sireva koji zriju u životinjskoj koži

<i>Autori</i>	<i>Serhan i sur. 2010.</i>	<i>Şengül i sur. 2014.</i>	<i>Tudor Kalit i sur. 2012.</i>	<i>Tudor Kalit i sur. 2014</i>	<i>Celik i Tarakci, 2017.</i>	<i>Medjoudj i sur. 2017.</i>	<i>Rako i sur. 2018.</i>
<i>Naziv sira</i>	Darfiyeh	Tulum	Sir iz mišine	Sir iz mišine	Tulum	Bouhezza	Sir iz mišine
<i>Trajanje zrenja</i>	60	90	75	60	120	64	30
<i>WSN%TN</i>	21,96	17,00	22,77	23,69	36,01	13,04	29,25
<i>TCA- SN%TN</i>	18,24	9,70	12,36	12,24	19,07	-	17,93

WSN%TN= udio dušičnih tvari topivih u vodi u odnosu na ukupan dušik, TCA%TN= udio dušičnih tvari topivih u 12%-tnoj triklorooctenoj kiselini u odnosu na ukupan dušik

7.2. Lipoliza

Stupanj lipolitičkih promjena koje se dešavaju u siru tijekom zrenja može se utvrditi određivanjem količine ukupnih slobodnih masnih kiselina. Osim što služe kao indikator lipolitičkih promjena, slobodne masne kiseline imaju značajnu ulogu u stvaranju arome i okusa sira. Slobodne masne kiseline mogu direktno utjecati na svojstva sira ili mogu biti prekursori za stvaranje hlapljivih spojeva kao što su ketoni, laktoni, alkoholi, esteri i aldehidi (Lešić i sur. 2016.). Tudor Kalit i sur. (2016.) navode lipolizu kao glavni biokemijski proces tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži. Odgovorna je za stvaranje okusa i arome sira i vodi većoj akumulaciji slobodnih masnih kiselina i spojeva arome (Slika 7.2.1.) (Vrdoljak i sur. 2018.).

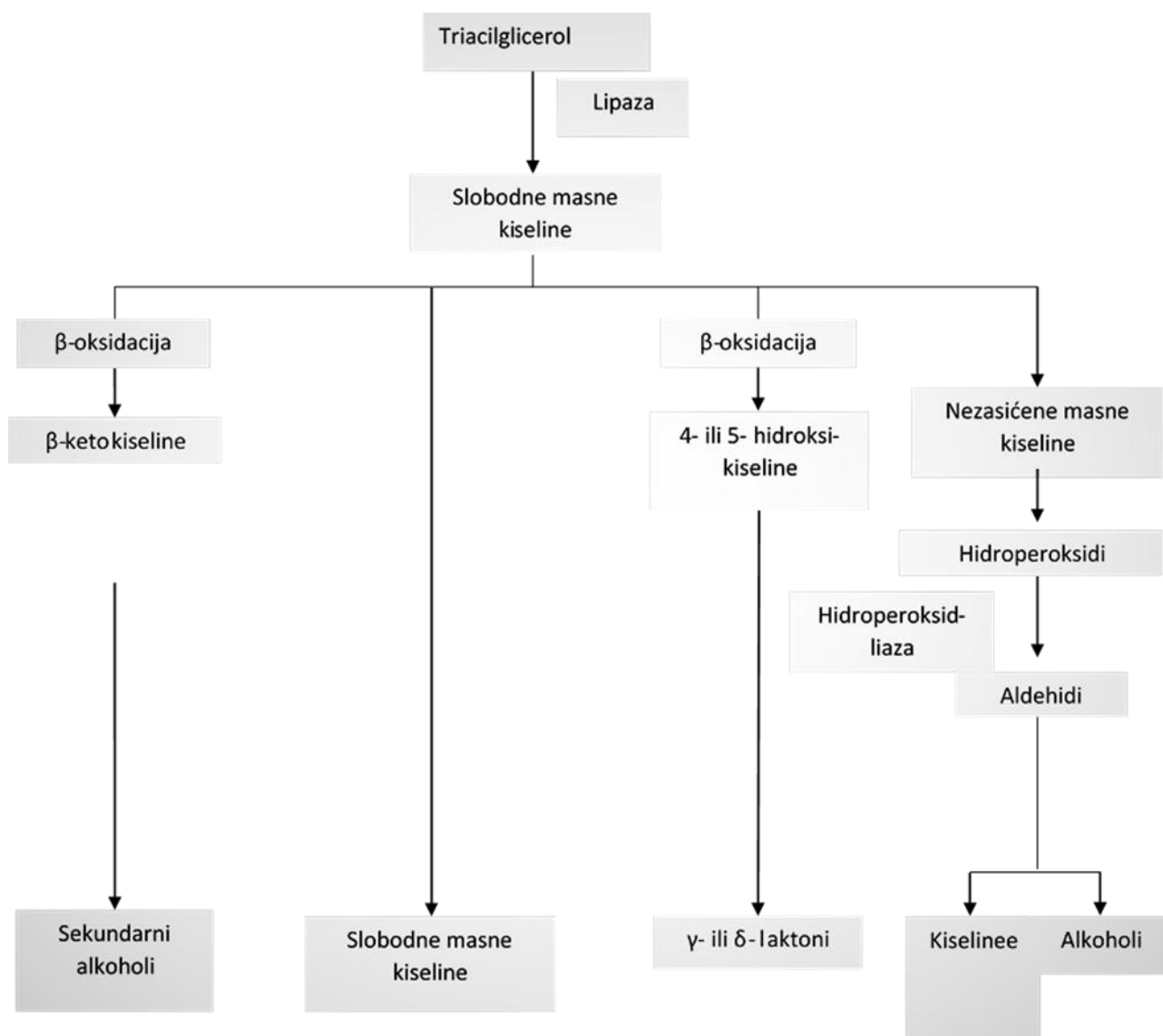
Prema Tudor Kalit i sur. (2014.) koncentracija ukupnih slobodnih masnih kiselina na kraju zrenja iznosi 195,41 mg/100g sira što je značajno povećanje u odnosu na početak zrenja (39,08mg/100g sira). Intenzivna lipoliza tijekom zrenja sira iz mišine povezana je s anaerobnim uvjetima zrenja, temperaturom i vremenskim trajanjem zrenja sira. Na kraju zrenja najzastupljenije slobodne masne kiseline dugog lanca su palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1) i stearinska (C18:0) (Tudor Kalit i sur. 2014.). Slobodne masne kiseline glavni su indikator lipolitičke aktivnosti u siru. Na stvaranje arome i okusa sira mogu utjecati direktno ili stvaranjem aromatskih komponenti (alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, laktoni) (Collins i sur. 2003.). Prema Yilmaz i sur. (2005.) na nešto niži sadržaj slobodnih masnih kiselina na kraju zrenja (164,06 mg/100g sira) u tulum siru u odnosu na sir iz mišine utječu drugačiji uvjeti zrenja, točnije niža temperatura zrenja (6-10 °C) i drugačija vrsta mlijeka (kravlje mlijeko) za sirenje. Dokazan je značajan utjecaj dodavanja mikrobne lipaze u mlijeko prije sirenja. Uzorak sira u čije je mlijeko za sirenje dodana najveća količina mikrobne lipaze imao je najviši stupanj slobodnih masnih kiselina na kraju zrenja sireva (90 dana). Dominantne masne kiseline tulum sira bile su dugolančane masne kiseline palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1) i miristinska (C14:0) masna kiselina. Na kraju zrenja dugolančane masne kiseline iznose 52-53 g 100g⁻¹ od ukupne količine slobodnih masnih kiselina u svim sirevima, dok srednje lančane masne kiseline (21-22 g 100g⁻¹) i kratkolančane masne kiseline (24-25 g 100g⁻¹) imaju nešto niže vrijednosti.

Sir iz mišine sadrži 1,48% kaprilne masne kiseline 60.-og dana zrenja (Tudor Kalit i sur. 2014.), a koncentracija kaprilne kiseline u tulum siru proizvedenom od sirovog mlijeka zabilježena je u postotku 3,28 na 180 dan skladištenja (Sert i sur. 2014.). Koncentracije masnih kiselina C 14:0, C 14:1, C 17:0, C 18:0, C 18:2n-6 i C 23:0 (P<0,05), kao i C 16:0, C 18:3n-3, C 23:0 (P<0,01) u 45 dana zrelog sira su u pozitivnoj korelaciji sa svojstvom mirisa sira, kao i koncentracije C 8:0, C 17:0, C 18:0 C 18:1n-9t, C 18:1n-9c (P<0,05), C 14:0, C 16:0, C 16:1, C 18:3n-3, C 21:0, C 23:0 (P<0,01), C 12:0, i C 22:0 (P<0,001) masnih kiselina koje su u pozitivnoj korelaciji s okusom sira. Nakon 60.-og dana zrenja nižoj senzornoj ocjeni pridonose masne kiseline dugog lanca koje služe kao prekursori u sintezi masnih kiselina kratkog lanca i alkohola i akumulacija C 4:0, C 6:0 i C 8:0 masnih kiselina kao posljedica uvjeta i trajanja zrenja (Tudor Kalit i sur. 2016.). Sert i sur. (2014.) proveli su istraživanje na tulum siru proizvedenom od sirovog kozjeg mlijeka te od pasteriziranog mlijeka. Rezultati su

pokazali da kratkolančane, srednjelančane i dugolančane masne kiseline u tulum sirevima detektirane u rasponu od 15,08-22,51 %, 39,13-42,62 % i 30,92-38,56 %. Njihova koncentracija veća je u grupi sireva proizvedenim od sirovog mlijeka (Sert i sur. 2014.). Za snažni pikantni okus tulum sira odgovoran je visok stupanj lipolize tijekom zrenja sira. Pikantni okus i izražena aroma pojačavaju se s porastom koncentracije masnih kiselina i povećanje stupnja kiselosti koji iznosi 4,4-8 mg KOH/g masti tijekom zrenja sira od 90 dana (Koçak i sur. 1995., Güler i Uraz 2003., Yilmaz i sur. 2005.). Prema Serhan i sur. (2010.) zabilježeni su slični rezultati krajnjeg stupnja kiselosti darfiyeh sira koji na kraju zrenja od 60 dana iznos 5,61-5,59 mg KOH/g masti. Dodavanje mikrobne lipaze tijekom proizvodnje tulum sira utječe na krajnji stupanj kiselosti i koncentraciju masnih kiselina u siru. Tulum sir proizveden s dodatkom mikrobne lipaze bilježi viši stupanj kiselosti od tulum sira proizvedenog od sirovog mlijeka na tradicionalan način. Korištenjem mikrobne lipaze tijekom proizvodnje tulum sira postiže se porast udjela masnih kiselina kratkoga lanca kao što su octena, maslačna, kaprinska, kaprilna i kapronska, a masne kiseline kratkoga lanca imaju važnu ulogu u stvaranju okusa i arome sira (Yilmaz i sur. 2005.). Za zaključiti je da je kod sireva intenzivne lipolize potrebno pažljivo koristiti mikrobne lipaze, jer pretjerana lipoliza ima negativan učinak na senzorska svojstva sira, odnosno na potrošačku ocjenu (Tudor Kalit 2014).

Mikrobna flora tulum sira značajno utječe na proces lipolize i formirane slobodnih masnih kiselina u siru. Razlog tome je korištenje sirovog mlijeka u proizvodnji tulum sira (Şengül i sur. 2014.). Şengül i sur. (2014.) proveli su istraživanje tulum sira korištenjem tri različite vrste sirila. Analizom lipolitičkih promjena u tulum siru zabilježene su veće vrijednosti slobodnih masnih kiselina (SMK). Dugolančane masne kiseline kao što su palmitinska (C16), oleinska (C18:1) i miristinska (C14) pokazuju nešto više vrijednosti od kratkolančanih masnih kiselina (maslačna, kapronska, kaprilna, kaprinska masna kiselina) od kojih kaprinska masna kiselina pokazuje najviše vrijednosti (2,8 %) na kraju zrenja sireva (90 dana). Tijekom proizvodnje tulum sireva korištene su *A. niger* proteinaze, *R. miehei* proteinaze i prirodno sirilo. Koncentracija slobodnih zasićenih masnih kiselina tijekom cijelog perioda zrenja se povećava. Vrsta sirila ne utječe značajno na koncentraciju slobodnih kratkolančanih masnih kiselina i zasićenih masnih kiselina. Suprotno navedenom, uzorak sira u kojem je korišteno prirodno sirilo ima najvišu koncentraciju slobodnih nezasićenih masnih kiselina (palmitinska 1,80%, oleinska 19,12%, linolna 3,11% i linolenska 0,40%) u usporedbi s preostala dva uzorka. U istraživanju provedenom 2019. godine Tekin i Guler analiziraju utjecaj životinjske kože na zrenje tulum sira u usporedbi s plastičnim bačvama. Sirevi su proizvedeni od sirovog ovčjeg mlijeka. Značajna razlika u koncentraciji uočava se kod maslačne i oleinske kiseline tijekom cijelog perioda zrenja. Nakon 90.-og dana zrenja pojavljuju se neke nezasićene slobodne masne kiseline (*cis*-9-dekanska, *cis*-7-tetradekanska, *cis*-7-heksadekanska, linolenska i arahidna masna kiselina) koje vjerojatno nastaju aktivnošću enzima desaturaze izlučenog od strane bakterija i kvasaca koji su dospjeli u mlijeko iz proizvodnog okruženja. Koncentracija *trans*-9-oktadekanske kiseline tri je puta veća u sirevima koji zriju u životinjskoj koži (1200 mg kg⁻¹) u usporedbi sa sirevima koji zriju u plastičnim bačvama (400 mg kg⁻¹). Tekin i Guler (2019.) navode da bi razlog veće koncentracije *trans*-9-oktadekanske kiseline mogao biti viši sadržaj C18:2 i C18:3 koje uz pomoć mikrobiote u siru

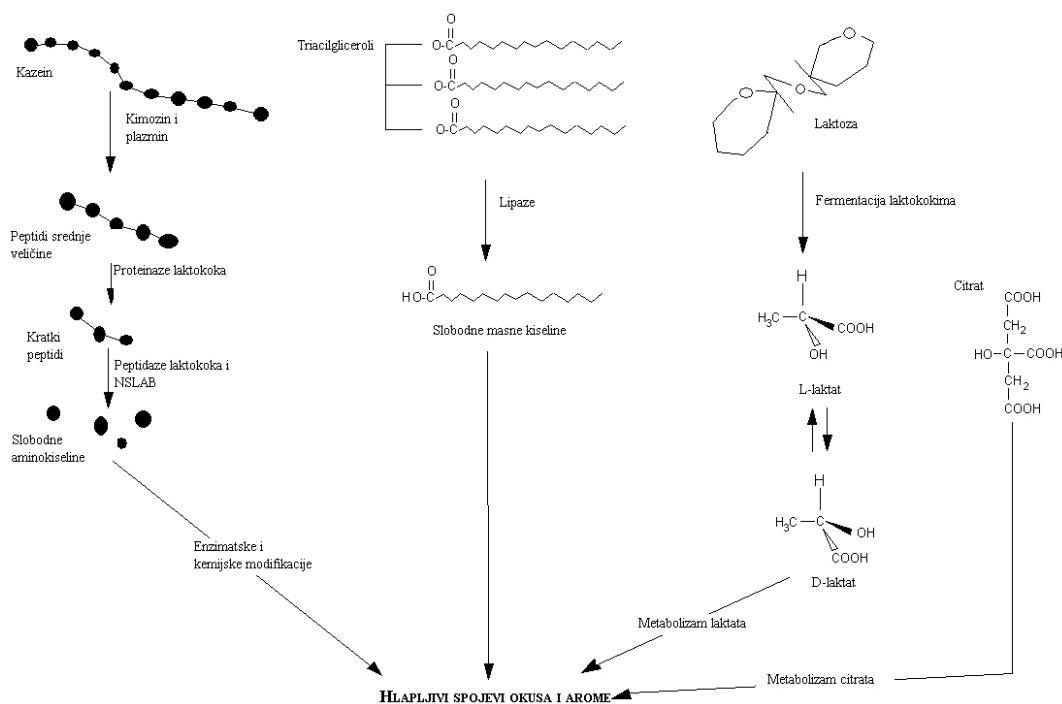
sintetiziraju navedenu masnu kiselinu. Sirevi koji zriju u koži imaju višu koncentraciju slobodnih nezasićenih masnih kiselina dugog lanca od sireva koji zriju u plastičnim bačvama. Koncentracija nezasićenih masnih kiselina u sirevima općenito ovisi o vrsti i kvaliteti mlijeka za sirenje. Sirevi koji zriju u koži pokazuju višu koncentraciju slobodnih kratkolančanih, srednjelančanih i dugolančanih masnih kiselina tijekom cijelog perioda zrenja. Na kraju zrenja (270. dan) sirevi koji zriju u plastičnim bačvama i sirevi u životinjskoj koži imaju slične koncentracije slobodnih srednjelančanih (21 %) i dugolančanih (74 %) masnih kiselina te imaju intenzivnu proteolizu. 180.-og dana zrenja udio ukupnih SMK za sir koji zrije u koži iznosi 6305 mg kg^{-1} , a nešto manja vrijednost 4821 mg kg^{-1} za sir čije se zrenje odvija u plastičnim bačvama.



Slika 7.2.1. Putovi katabolizma slobodnih masnih kiselina u siru (McSweeney i Sousa, 2000.)

8. Aromatski spojevi u sirevima koji zriju u životinjskoj koži

Kompleksni hlapljivi sastojci i nehlapljivi kemijski spojevi koji se oslobađaju u siru tijekom zrenja potječu od mliječne kiseline, proteina i ugljikohidrata (Vrdoljak i sur. 2018.). Razgradnja laktoze i metabolizam citrata utječu na nakupljanje acetaldehida, acetata, etanola, diacetila i acetoina u siru (McSweeney i Sousa 2000.). Razgradnjom citrata nastaju diacetil i acetoin, spojevi koji siru daju aromu maslaca. Razgradnjom proteina tijekom zrenja sireva stvaraju se aminokiseline i topljivi peptidi koji znatno utječu na teksturu i senzorska svojstva sira. Razgradnjom aminokiselina nastaju specifični spojevi koji formiraju arome različitih vrsta sireva. Hidrolizom masti nastaju slobodne masne kiseline koje služe kao prekursori za formiranje ketona, primarnih i sekundarnih alkohola, laktona, aldehida i estera, spojeva također odgovornih za aromu sira (Mikulec i sur. 2010.; Vrdoljak i sur. 2018.). Slika 8.1. prikazuje biokemijske procese tijekom zrenja sira kojima nastaju aromatski spojevi.



Slika 8.1. Biokemijski procesi tijekom zrenja sira: a) proteoliza, b) lipoliza, c) metabolizam laktoze, laktata i citrata

Izvor: McSweeney i Sousa (2000.)

Istraživanja arome sira potječu od početka 20. stoljeća. Veliki pomak postignut je razvojem plinske kromatografije (GC) i masene spektrometrije (MS). Izolirano je nekoliko stotina različitih spojeva okusa i arome sira (Havranek i sur. 2014.). Okus sira koncentriran je u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline, amini), a aroma sira koncentrirana je u hlapljivoj frakciji (organske kiseline, aldehidi, amini, esteri). Dokazano je

da aromu sira predstavlja kombinacija različitih spojeva nastalih tijekom zrenja. Većina sireva sadrži iste ili slične komponente, ali u različitim koncentracijama i odnosima što daje specifičnost svakoj pojedinoj vrsti sira, objašnjavaju Mikulec i sur. (2010.). Navedeno otkriće objavljeno je u Teoriji balansnih spojeva (Component Balance Theory). Predloženo je pedesetih godina prošlog stoljeća, a vrijedi i danas (Havranek i sur. 2014.). Na okus i aromu sireva utječe i udio vode u siru, pH-vrijednost sira, udio soli i metoda soljenja sira, temperatura zrenja te vrsta mlijeka i aktivnost primarne i sekundarne mikroflore sira. Korištenjem sirovog mlijeka u proizvodnji tradicionalnih sireva postiže se brže stvaranje arome i okusa sira zbog prirodno prisutnih endogenih enzima i primarne mikroflore mlijeka. Toplinskom obradom mlijeka dolazi do njihove inaktivacije (Vrdoljak i sur. 2018.)

Serhan i sur. (2010.) analizirali su darfiyeh sir tijekom zrenja u jarećoj koži (20, 40 i 60 dana). U siru je identificirano ukupno 16 hlapljivih sastojaka, od kojih su 2 aldehida, 8 alkohola i 6 ketona. Prema navodima Hayaloglu i sur. (2007.) identificirano je 100 hlapljivih sastojaka u tulum siru. Zrenje tulum sireva odvijalo se u jarećoj koži (T_1 i T_2) i u plastičnim bačvama (P_1 i P_2). Obje vrste sireva imaju slične aromatske profile, s tim da se koncentracija pojedinih sastojaka razlikuje ovisno o materijalu u kojem sir zrije (plastične bačve, koža). Permeabilnost kože omogućava kontrolirano propuštanje zraka i vode. Sirevi su se proizvodili u dvije različite mljekare, što je također utjecalo na krajnje rezultate. Identificirano je 12 kiselina u uzrocima sireva od kojih značajne razlike u koncentraciji pokazuju 2-metil propanonska, 2-metil butanonska i 3-metil butanonska kiselina. Od ukupno 16 estera (9 etilnih, 4 propilnih i 3 bitilnih estera) u najvišoj koncentraciji identificirani su etilni esteri koji predstavljaju jedne od najvažnijih aromatskih komponenti tulum sira. Najviša koncentracija etil butanoata (21,55), etil heksonata (10,57), etil laktata (21,04) i propil acetata (13,76) zabilježena je u T_1 uzorku sira sa zrenjem u životinjskoj koži (tulum). Od ukupno 13 metil ketona uzorci P_1 (127,91) i T_2 (128,99) imaju višu koncentraciju metil ketona zbog većeg sadržaja kvasaca i plijesni tijekom cijelog perioda zrenja. Od 7 identificiranih aldehida (acetaldehid, 2-propanal, 2-metil propanal, 2-metil butanal, 3-metil butanal, 2-furankarboksialdehid, benzaldehid) acetaldehid, 2-propanal, 2-metilpropanal i 3-metil propanal zabilježeni su u najvišim koncentracijama u P_1 uzorku sira, dok je benzaldehid koji je važan aldehid u svim vrstama sireva zabilježen u svakom uzorku sira ali bez značajnih razlika u koncentraciji. Od ukupno 22 detektiranih alkohola u tulum siru, u najvišim koncentracijama prisutni su etanol, 3-metil 1-butanol i 2-butanol. Dimetil disulfid i dimetil sulfon detektirani su u najvećoj koncentraciji od svih 7 sumpornih spojeva čija je koncentracija veća u sirevima koji zriju u koži u odnosu na sireve koji zriju u plastičnim bačvama. Od ukupno 6 terpena (limonen, karan, α -pinen, β -pinen, β -patulen, p -cimen) detektiranih u uzorcima sireva, zaključeno je da nema značajne razlike u njihovim koncentracijama s obzirom na medij u kojem sirevi zriju (plastične bačve, tulum). Analizom je utvrđeno 19 različitih aromatskih spojeva (ugljkovodici, fenolni spojevi, benzen, toluen, stiren) u tulum sirevima. Utvrđeno je da nema značajne razlike u koncentracijama fenolnih spojeva i ugljikovodičnih spojeva u sirevima. Jedino heksan ima značajno veću koncentraciju u sirevima koji zriju u životinjskoj koži. Potvrđeno je da materijal u kojem se odvija zrenje tulum sira (plastične bačve i tulum) nema značajnu ulogu u proteolizi koja se odvija u sirevima, dok glavni utjecaj na proces ima sirilo. Razlike u aromatskim spojevima uzoraka

sira mogu biti povezane sa strukturom životinjske kože. Slične rezultate zabilježili su Gursoy i sur. (2018.). U uzorcima tulum sireva (C1, C2, C3, C4) detektirano je 11 kiselina, 16 estera, 12 metilketona, 7 aldehida, 22 alkohola, 7 sumpornih spojeva, 6 terpena i 19 različitih spojeva tijekom zrenja sira. Uzorci C1, C2 i C3 proizvedeni su od mješavine kozjeg mlijeka (80%) i ovčjeg mlijeka (20%), a uzorci C4 i C5 od 100% kozjeg mlijeka. U darfiyeh siru detektirani su aldehidi oktanal i 3-metilbutanal, te alkoholi 1-pentiletanol, oktanol, 3-metilbutanol, 1-propanol koji su ujedno prisutni u najvećoj koncentraciji i djeluju na aromu sira alkoholnim i slatkim notama (Serhan i sur. 2010.). U bouhezza siru na kraju zrenja identificirano je 5 aldehida, a kao glavni aldehyd izdvojen je 3-metil-1-butanal koji bouhezza siru daje uljast okus i aromu po maslacu. 50. dana zrenja bouhezza sira zabilježeno je 13 alkohola od kojih su etanol, 1-oktanol i fenilni alkoholi prisutni u višoj koncentraciji nego na kraju zrenja (72 dana). Na kraju zrenja zabilježeno je samo 5 alkohola. Etanol ima ograničenu ulogu u stvaranju arome sira, ali je prekursor za sintezu nekoliko estera (Medjoudj i sur. 2017.). Osim etanola, i tulum sir i sir iz mišine sadrže 2 metil-propanol, 2 metil-butanol, 2-butanol, 2-pentanol, 1-heksanol i 3 metil-butanol koji je rezultat metabolizma leucina (Vrdoljak i sur. 2018.). Od ketona najvišu koncentraciju u darfiyeh siru imaju 2-heptanon, 2-nonanon i 2-undekanon i njihove vrijednosti povećavaju se tijekom cijelog perioda zrenja. 2,3-butandiol, nastao bakterijskom aktivnošću iz 2-butanona i 2-butanola, i zajedno s 2-heptanomom i 2-nonanomom siru daje aromu maslaca. 2-underkanon pridonosi aromi sira notama citrusa, ruže i irisa (Serhan i sur. 2010.). Najzastupljeniji ketoni u tulum siru koji zrije u jarećoj koži su 2 butanon i diacetil (Hayalogl i sur. 2007.). Medjoudj i sur. (2017.) zabilježili su višu koncentraciju ketona 72. dan zrenja bouhezza kozjeg sira, nego 50. dana zrenja. Navode ketone 2-heptaton (gljive), 2-nonanon (kiselo) i 3-hidroksi-2-butanon (mastan) kao glavna aromatična svojstva kozjih sireva (Poveda i sur. 2008.). Glavne aromatske komponente u tulum siru su kratkolančane masne kiseline, 2-butanon, diacetil i primarni alkoholi, a najzastupljenije identificirane kiseline u Tulum siru su octena i maslačna kiselina (Hayalogl i sur. 2007.). Medjoudj i sur. (2017.) navode da je kapronska kiselina najzastupljenija kiselina u bouhezza siru proizvedenom od kozjeg mlijeka tijekom zrenja od 72 dana. Nakon kapronske kiseline slijede kaprilna, valerijanska, dekanska, maslačna i octena kiselina. Kapronska kiselina detektirana je u mnogim sirevima, uključujući i sireve koji zriju u životinjskoj koži. Kapronska kiselina predstavlja glavnu frakciju slobodnih masnih kiselina i odgovorna je za ljutkasti okus sira (Vrdoljak i sur. 2018.).

Dvije enzimske reakcije, esterifikacijom i alkoholizacijom, formiraju se esteri, spojevi odgovorni za voćni okus sira. Esterifikacija je stvaranje estera iz alkohola i karboksilnih kiselina. Alkoholizacijom esteri mogu nastati iz alkohola i acilglicerola, acil-CoA i primarno iz alkohola. Od 16 estera identificiranih u tulum siru najznačajniji za stvaranje arome sira su etil, propil i butil esteri. Visoku koncentraciju u siru imaju etil-butanoat, etil-laktat, propil-acetat i 3-metilbutil-acetat. Navedeni spojevi predstavljaju glavne hlapljive komponente tulum sira (Hayalogl i sur. 2007.), dok etilni esteri imaju značajnu ulogu u aromi bouhezza kozjeg sira. Etil acetat, butanoat, heksanoat, oktanoat, dekanoat i 2-fenil acetat detektirani su nakon 72 dana zrenja bouhezza sira. Navedeni esteri predstavljaju važne aromatske komponente i u turskim sirevima proizvedenim od kozjeg mlijeka (Medjoudj i sur. 2017.).

Sirevi koji zriju u životinjskoj koži ističu se jedinstvenom aromom i okusom sira. Za njihove karakteristike odgovorni su izraženi biokemijski procesi koji se odvijaju u siru tijekom njegovog zrenja u koži. Koža predstavlja specifičan medij u kojem za vrijeme zrenja sira nastaju hlapljivi aromatski spojevi kao rezultat razgradnje složenih kemijskih sastojaka. Na osnovi prikazanih rezultata istraživanja vidljivo je da su najzastupljenije hlapljive komponente koje daju aromu ovim vrstama sireva esteri, alkoholi, kiseline, aldehidi, ketoni i terpeni. Detektiran je manji broj aldehida u sirevima koji zriju u koži zbog njihovog prelaska u alkohole ili odgovarajuće kiseline, ali njihov utjecaj na aromu sira se ne umanjuje. Esteri i terpeni detektirani su u većim koncentracijama, posebice limonen koji daje citrusnu aromu siru. Od aromatskih spojeva najviše su zastupljeni alkoholi. Etanol je pokazao ograničenu ulogu u stvaranju arome sira, ali sudjeluje u sintezi nekih estera. Uz etanol, 3-metil-butanol spoj je koji se pojavljuje u siru iz mišine i u tulum siru.

9. Mikrobiološke karakteristike sireva koji zriju u koži

Mikrobiološke analize sireva koji zriju u životinjskoj koži provode se zbog zaštite izvornosti sira i unapređenja njegove kvalitete. Većina tradicionalnih sireva proizvodi se od sirovog mlijeka koje sadrži indogene mikroorganizme i prirodne startere, no isto tako mogu sadržavati i patogene mikroorganizme. Zbog zaštite potrošača, ali i karakterizacije ovih specifičnih tradicionalnih proizvoda, mikrobiološke analize temelj su za daljnja istraživanja (Frece i sur. 2016.).

Cilj provedenog istraživanja bio je izolirati mikrobnu populaciju u sirovom ovčjem mlijeku i siru iz mišine. Sir je analiziran 1., 15., 30., 45. i 75. dana zrenja. U istraživanju prirodne mikrobne populacije bakterija mliječne kiseline sira iz mišine korištene su standardne mikrobiološke metode. Potvrđena je prisutnost sva ti glavna roda bakterija mliječne kiseline: *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*. Ukupno je izolirano 105 laktokoka, 90 enterokoka i 90 laktobacila. Najveću vrijednost u uzorcima ima populacija laktokoka, što je specifično za većinu tradicionalnih sireva. Kao druga mikrobna populacija pokazuju se enterokoki čije stvorene hlapljive komponente utječu na zrenje, okus i aromu sira. Enterokoki imaju sposobnost producirati bakteriocine i zbog toga pripadaju skupini zaštitnih mikroorganizama. Laktobacili su tipične autohtone bakterije mliječne kiseline koje imaju značajan utjecaj na senzorska svojstva sira (Kaić i sur. 2016.). U darfiyeh siru izolirane su bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus* vrste. Uz njih izolirani su i mikrokoki čiji se rast u siru povezuje s anaerobnim uvjetima zrenja darfiyeh sira te autori navode kako mikrokoki imaju značajnu ulogu u zrenju ove vrste sira (Serhan i sur. 2009.).

Prema istraživanju Frece i sur. (2016.) mikrobiološke analize pokazale su da dvije trećine uzoraka ovčjeg mlijeka, gruša i sira iz mišine ne zadovoljava kriterije sigurnosti hrane. Detektiran je veliki broj *S. aureus* i *Enterobacteriaceae*, a *Salmonella* i *L. monocytogenes* nisu izolirane u uzorcima. Razlog tome je loša higijena prije, tijekom i nakon mužnje i proizvodnja sira u ljetnom razdoblju (Frece i sur. 2016.). U tulum siru na kraju zrenja (9 mj.) izolirane bakterije mliječne kiseline pripadaju *Enterococcus* i *Lactobacillus* rodovima. Vrste *Lactobacillus* (43,75%) dominantna su populacija na početku zrenja sireva. Dok su neke vrste bakterija (*E. avium*, *L. suebicus*, *L. vaccinostercus*, *S. sangius*, *L. lactis* subsp. *lactis* i *P. acidilactici*) nestale nakon tri mjeseca zrenja sira, *Enterococcus* i *Lactobacillus* vrste zadržane su u jednakim koncentracijama (50%). Nakon zrenja od 3 mjeseca broj laktokoka se naglo smanjuje. U zreлом tulum siru izolirano je 15,8% vrste laktokoka. *Enterococcus* i *Lactobacillus* vrste u prva 3 mjeseca zrenja nisu izolirane u velikom broju. Nakon 120 dana zrenja njihov broj se povećava (8 izoliranih vrsta, 50% pop.) i kasnije postaju dominantna mikrobna populacija sira (Cakmakci i sur. 2008.). *Enterococcus* vrste dobro podnose niski pH i visoke koncentracije soli u siru. Zabilježen je veći broj *Enterococcus* vrsta u tulum siru tijekom zrenja (Oksuztepe i sur. 2005.). U tulum siru Colak i sur. (2007.) detektirali su prisutnost *L. monocytogenes* u 12 uzoraka i *Salmonella* u 6 uzoraka. Kao razlog pronalaska patogenih mikroorganizama navodi se loša higijena tijekom proizvodnog procesa i neadekvatni uvjeti zrenja sira. Hayaloglu i sur. (2007.) proveli su istraživanje tulum sira tijekom 150 dana zrenja u svrhu mikrobiološke karakterizacije sira, sa zrenjem u životinjskoj

koži i plastičnim bačvama. Mezofilne bakterije pokazuju visok stupanj rasta (7,62 log cfu/g) u sirevima 30.-og zrenja, a 120.-og dana zrenja broj im naglo pada (5,00 log cfu/g). Značajan porast zabilježen je 150.-og dana zrenja (6,48 log cfu/g). Koliformne bakterije izolirane su iz uzoraka sira. Njihov broj 30.-og dana zrenja tulum sira iznosi 5,00 log cfu/g. Rezultati pokazuju konstantno smanjenje broja koliformnih bakterija sukladno s vremenom trajanja zrenja tulum sira. Na kraju zrenja od 150 dana broj koliformnih bakterija je 0 log cfu/g. Rastom bakterija nestarterske mikroflore i plijesni u siru inhibira se povećanje broja koliformnih bakterija. Manje vlage i viši stupanj soli u tulum siru mogu biti razlog nižem stupnju koliformnih bakterija i višem stupnju ukupnih mezofilnih bakterija. Korištenje sirovog mlijeka u proizvodnji tulum sira, tradicionalan način proizvodnje i sirilo proizvedeno na gospodarstvu predstavljaju potencijalnu opasnost od kontaminacije koliformnim bakterijama. Broj kvasaca i plijesni 30.-og dana zrenja tulum sira iznosi od 5,20 do 6,04 log cfu/g. Najviše vrijednosti kvasci i plijesni postižu na kraju zrenja od 150 dana i iznose od 6,82 do 7,57 log cfu/g. Alperden (1978.) je izolirao 167 vrsta plijesni iz 85 uzoraka tulum sira prikupljenih u turskoj regiji Marmara. Zabilježena je prisutnost 54% *Penicillium* plijesni, 14% *Aspergillus*, 15% *Mucor* i 16% drugih vrsta plijesni (Erdogan i sur. 2003.). Medjoudj i sur. (2017.) u istraživanju na bouhezza siru izolirali su kvasce i plijesni u koncentraciji od 3 i 4 log cfu/g tijekom 4. tjedna zrenja sira. Na kraju 4. tjedna zrenja navedena mikrobna flora doseže vrijednost od 6,45 log cfu/g, a tijekom sljedeća tri tjedna zrenja broj se smanjuje, sve do 8. tjedna zrenja kada doseže vrijednost od 6,53 log cfu/g sira. Korištenjem životinjske kože kao medija za zrenje sira, sir je tijekom cijelog perioda zrenja u kontaktu sa zrakom. Zbog permeabilnosti životinjske kože rast kvasaca i plijesni izraženiji je u sirevima koji zriju u životinjskoj koži od onih koji zriju u plastičnim bačvama (Hayaloglu i sur. 2007.).

10. Zaključak

- Sirevi čije se zrenje odvija u životinjskoj koži pripadaju skupini tradicionalnih sireva. Dokazivanjem njihove autentičnosti i standardizacijom tehnologije proizvodnje omogućuje se zaštita kulturne baštine i stvaraju se preduvjeti za dodjeljivanje oznake izvornosti sira koja je na svjetskom tržištu izuzetno cijenjena.
- Dosadašnja istraživanja provedena u Hrvatskoj, Turskoj, Libanonu i Alžiru potvrđuju da ova vrsta sireva pripada skupini tvrdih ili polutvrdih sireva ovisno o tehnologiji proizvodnje i vrsti mlijeka koje se koristi za sirenje.
- Oštar i pikantan okus, miris, aroma i specifična tekstura rezultat su intenzivnih biokemijskih procesa tijekom zrenja sireva u životinjskoj koži.
- Životinjska koža osim zaštitne uloge predstavlja i medij za anaerobno zrenje. Permeabilnost kože omogućava dovoljan gubitak vlage iz sira i rast sekundarne mikroflore koja sudjeluje u stvaranju aromatskih spojeva u siru.
- Mikrobiološke analize potvrdile su prisutnost glavnih rodova BMK koje mogu poslužiti u budućim istraživanjima i eventualnoj pripremi mješovitih mljekarskih kultura u cilju standardizacije proizvodnje.
- Formiranje dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) i trikloroctenoj kiselini (12%TCA) tijekom zrenja sira pokazuju opseg i brzinu proteolize koja se u sirevima koji zriju u koži pokazala intenzivnom.
- Kod većine polutvrdih i tvrdih sireva intenzivna lipoliza je nepoželjna jer previsok sadržaj slobodnih masnih kiselina uzrokuje užegao okus. No kod zrenja sireva u životinjskoj koži pokazala se kao ključni biokemijski proces koji razlikuje ovu skupinu sireva od ostalih vrsta sireva.
- Ipak, preintenzivna lipoliza na kraju zrenja sireva koji zriju u životinjskoj koži dovodi do nižih senzorskih ocjena sira od strane potrošača.

11. Literatura

1. Addeo F., Chianese L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio U., Ferranti P., Malorni A. (1992). Characterization of the 12 % trichloroacetic acid insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research* 59:401-411.
2. Aissaoui Zitoun O., Benatallah L, Hannachi Ghennam E, Nasreddine Zidoune M. (2011). Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened bouhezza cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 9(2): 96-100.
3. Antunac N., Havranek J. (1999). Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo*. 49(4): 241-254.
4. Antunac N., Havranek J., Samaržija D. (1997). Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. *Mljekarstvo*. 47(3): 183-193.
5. Bansal N., Piraino P., McSweeney P. L. H. (2010). Determination of proteolysis in cheese. U: *Handbook of Dairy Food Analysis*. (L.M.L. Nollet, F. Toldrá, Ur.). CRC Press, Taylor & Francis Group. 405-426.
6. Božanić R. (2015). Povećanje tržišne vrijednosti sira. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi*. (B Matijević, Ur.). Veleučilište u Karlovcu, 189-197.
7. Cakmakci S., Dagdemir E., Hayaloglu A. A., Gurses M., Gundogdu E. (2008). Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 293-299.
8. Celik O. F., Tarakci Z. (2017). The effects of starter cultures on chemical, biochemical and sensory properties of low-fat Tulum cheeses during ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 70: 1-9.
9. Colak H., Hampikyan H., Bingol E.B., Ulusoy B. (2007). Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 18: 576-579.
10. Desmazeaud M.J., Gripon J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft* 32: 731-734.
11. Ercan D., Korel F., Karagül Yüceer Y. and Kınık Ö. (2011). Physicochemical, textural, volatile and sensory profiles of traditional Sepet cheese. *Journal of Dairy Science* 94 4300–4312.
12. Erdogan A., Gurses M., Sert S. (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. 85: 83-85, <http://www.sciencedirect.com> (pristupljeno 14.3.2019.).
13. Fox P. F., Law J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*. 5(3): 239-262.
14. Fox P. F., Lucey J. A., Cogan T. M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29(4): 237-253.
15. Fox P. F., McSweeney P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*. 12(4): 476-509.

16. Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology – Third edition, General aspects, Elsevier Academic Press. (391-393).
17. Frece J., Vrdoljak M., Filipčić M., Jelić M., Čanak I., Jakopović Ž., Pleadin J., Gobin I., Landeka Dragičević T., Markov K. (2016). Microbiological Quality and Viability of Natural Microbiota in Croatian Cheese Maturated in Lambskin Sacks. *Food Technol. Biotechnol.* 54(2): 129-134.
18. Güler Z., Uraz T. (2003). Proteolytic and lipolytic composition of Tulum cheese. *Milchwissenschaft* 58 (9/10): 502-505.
19. Gursoy O., Küçükçetin A., Gökçe Ö., Ergin F., Kocatürk K. (2018). Physicochemistry, microbiology, fatty acids composition and volatile profile of traditional Söğle tulum (goat's skin bag) cheese. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(4):3661-3674, http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000703661 (pristupljeno 15.5.2019.).
20. Havranek J., Kalit S., Antunac N., Samaržija D. (2014). *Sirastvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
21. Hayaloglu A. A., Cakmakci S., Brechany E.Y., Deegan K. C., McSweeney P. L. H. (2007). Microbiology, biochemistry and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science*. 90:1102-1121.
22. Kaić D., Kalit S., Tudor M., Vrdoljak M. (2008). Higijenska kakvoća ovčjeg mlijeka za proizvodnju autohtonog sira iz mišine u zaleđu Šibenika. 38. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Lovran, str. 57-58.
23. Kaić D., Skelin A., Mrkonjić Fuka M., Kalit S., Tudor Kalit M., Redžepović S. (2016). Prirodna mikrobna populacija u Siru iz mišine. *International Symposium on Agriculture*. Opatija, Croatia. 697–700.
24. Kalit S. (2015). Opće sirarstvo. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi*. (B. Matijević, Ur.). Veleučilište u Karlovcu, 29-45.
25. Kalit S. (2015). Tradicionalni sirevi Hrvatske i Slovenije. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi*. (B. Matijević, Ur.). Veleučilište u Karlovcu, 59-70.
26. Kalit S. (2016). Proizvodnja ovčjih i kozjih sireva od sirovog mlijeka. Projektat —Tehnička pomoć u koordinaciji Programa kontrole i iskorjenjivanja bolesti životinja u Bosni i Hercegovini - Faza III", Bosna i Hercegovina.
27. Kalit S. (2017). Zrenje sireva, hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza (www.ovce-koze.hr).
28. Kalit S., Lukač Havranek J., Čubrić Čurik V. (2002). Plazmin: endogena proteinaza mlijeka. *Mljekarstvo*. 52(3): 191-206.
29. Kalit S., Lukač Havranek J., Kapš, M., Perko, B., Čubrić Čurik, V. (2005) Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *Int Dairy J* 15, 619-624.
30. Kamber U. (2008). 46The Traditional Cheeses of Turkey: Cheeses Common to All Regions. *Food Reviews International*. 24: 1–38.
31. Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E., Roussis, I.G. (2000) Lipolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* 10, 369-373.

32. Koçak C., Gursel A., Avsar Y.K., Semiz A. (1995). Effect of lipase enzyme (Palatase M 200L) on the ripening of skin (Tulum) cheese, Egypt. *Journal of Dairy Science* 23: 43-52.
33. Lavasani A. R. Z., Ehsani M. R., Mirdamadi S., Mousavi M. A. E. Z. (2012). Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 65: 64-70.
34. Lešić T., Pleadin J., Krešić G., Vahčić N., Markov K., Vrdoljak M., Frece J. (2016). Chemical and fatty acid composition of cow and sheep milk cheeses in a lamb skin sack. *Journal of Food Composition and Analysis* 46: 70-77.
35. Mallatou, H., Pappa, E., Massouras, T. (2003). Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal* 13: 211-219.
36. Matutinović S., Rako A., Havranek J. (2007). Značaj tradicionalnih sireva s posebnim osvrtom na Lećevečki sir. *Mljekarstvo* 57(1):49-65.
37. McSweeney P. H. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology.* 57(2/3): 127-144.
38. McSweeney P. L. H., Sousa M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Department of Food Science and Technology, University College, Cork, Ireland. 80:293-324.
39. Medjoudj H., Aouar L., Nasreddine Zidoune M., Hayaloglu A. A. (2017). Proteolysis, microbiology, volatiles and sensory evaluation of Algerian traditional cheese Bouhezza made using goat's raw milk. *International Journal of Food Properties.* 20(3): 3246-3265
40. Mikulec N., Habuš I., Antunac N., Vitale Lj., Havranek J. (2010). Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira. *Mljekarstvo.* 60(4): 219-227.
41. Oksuztepe G., Patir B., Calicioglu M. (2005). Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of Savak Tulum cheese. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29:873–879.
42. Perko B. (2015). Najnovija dostignuća u proizvodnji sira. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi.* (B. Matijević, Ur.). Veleučilište u Karlovcu, 133-148.
43. Poveda J. M., Sanchez-Palomo E., Perez-Coello M. S., Cabezas L. (2008). Volatile Composition, Olfactometry Profile and Sensory Evaluation of Semi-Hard Spanish Goat Cheeses. *Dairy Sci. Technol.* 88: 355–367.
44. Rako A., Tudor Kalit M., Rako Z., Petrović D., Kalit S. (2019). Effect of composition and proteolysis on textural characteristics of Croatian cheese ripen in a lamb skin sack (Sir iz mišine). *Mljekarstvo* 69(1): 21-29.
45. Samardžić S. M. (2009). Sir iz mijeha iz Hercegovine: stari recept – nova receptura. *Prehrambena industrija.* 1-2.
46. Samaržija D., Antunac N., Havranek J. and Pecina M. (2006). Protected designation of cheese origin. *Mljekarstvo* 56: 35–44.
47. Şengül M., Erkaya T., Dervişoğlu M., Aydemir O., Gül O. (2014). Compositional, biochemical and textural changes during ripening of Tulum cheese made with different coagulants. *International Journal of Dairy Technology* 67: 373-383.

48. Serhan M. i Mattar J. (2017). The Goat Dairy Sector in Lebanon. 381-396. <https://www.intechopen.com/books/goat-science/the-goat-dairy-sector-in-lebanon> (pristupljeno: 23.05.2019).
49. Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A-M., Hosri C., Fanni J. (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiology*. 26: 645-652.
50. Sert D., Akin N., Aktumsek A. (2014). Lipolysis in Tulum cheese produced from raw and pasteurized goats' milk during ripening. *Small Ruminant Research*. 121: 351-360.
51. Sousa M. J., Ardo Y., McSweeney P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11: 327-345.
52. Tamime A. Y. (2009). *Milk processing and Quality Management*. Wiley-blackwell. United Kingdom.
53. Tekin A., Guler Z. (2019). Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: Effect of ripening materials. *Food Chemistry* 286:160-169.
54. Tratnik Lj., Božanić R. (2012). *Mlijeko i mliječni proizvodi*. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
55. Tudor Kalit M., Buntić I., Morone G., Delaš I., Kalit S. (2016). The content of free fatty acids in relation to electronic nose sensors responses and sensory evaluation of cheese in a lamb skin sack (Sir iz mišine) throughout ripening. *Mljekarstvo*. 66(1): 26-33.
56. Tudor Kalit M., Kalit S. (2013). Sir iz mišine/mješine, mišni/mješni sir. Udruga malih sirara Šibensko kninske županije „MIŠINAC“.
57. Tudor Kalit M., Kalit S., Delaš I., Kelava N., Karolyi D., Kaić D., Vrdoljak M., Havranek J. (2014). Changes in the composition and sensory properties of Croatian cheese in a lamb skin sack (Sir iz misine) during ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 67: 255-264.
58. Tudor Kalit M., Kalit S., Havranek J. (2010). An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo* 60(3): 149-155.
59. Tudor Kalit M., Kalit S., Kelava N., Havranek J. (2012). Physicochemical differences between Croatian cheese matured in a lamb skin sack (Sir iz misine) and cheese matured in a rind throughout ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 65(4): 555-560.
60. Tudor M., Kalit S., Havranek J., Kaić D., Vrdoljak M., Horvat I. (2008). Fizikalno-kemijska karakterizacija autohtonoga ovčjeg sira iz mišine. 38. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Lovran, str. 56-67.
61. Vrdoljak M., Mikulec N., Markov K., Kalit S., Frece J. (2018). Aromatic compounds of cheese ripening in animal skin: An overview. *Journal of Central European Agriculture*. 19(2): 318-334.
62. Vrdoljak M., Tudor Kalit M., Kalit S., Ljubičić I., Radeljević B., Frece J. (2018). Influence of the probiotic cultures on proteolysis patterns of Croatian cheese in lamb sack. NUTRICON Congress, June 13 – 15, Ohrid, Macedonia.
63. Yilmaz G., Ayar A., Akin N. (2005). The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering* 69: 269-274.

12. Životopis autora

Tihana Lojbl rođena je 25. svibnja 1995. godine u Zagrebu. Svoje srednjoškolsko obrazovanje završila je u Gornjogradskoj gimnaziji u Zagrebu. Godine 2014. upisuje preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odrađivala je u laboratoriju Zavoda za opće stočarstvo zbog velikom interesa za genetiku. Dvije godine radila je za terenski promocijski servis MPG kojim je stekla veliko radno iskustvo u komunikaciji s ljudima. Preddiplomski studij završava 2017. godine obranom završnog rada pod nazivom „Kemijske opasnosti kao izvor alergija i netolerancija“ pod vodstvom doc. dr. sc. Milne Tudor Kalit. Svoje fakultetsko obrazovanje nastavlja upisom na diplomski studij „Proizvodnja i prerada mlijeka“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odrađivala je na petoj godini studija u mini mljekari „Mliječno s potpisom“ u Križevcima. Služi se njemačkim i engleskim jezikom, a za engleski jezik položila je A stupanj državne mature 2014. godine. Uz studij aktivno se bavi sportom uz veliko zanimanje za važnost prehrane i balansiranje obroka kod sportaša u svrhu postizanja boljih rezultata.