

Praćenje zrenja sira Rici primjenom senzorskih i fizikalno-kemijskih analiza

Petrinec, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:889393>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**PRAĆENJE ZRENJA SIRA *RICI* PRIMJENOM
SENZORSKIH I FIZIKALNO - KEMIJSKIH
ANALIZA**

DIPLOMSKI RAD

Karla Petrinc

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

**PRAĆENJE ZRENJA SIRA *RICI* PRIMJENOM
SENZORSKIH I FIZIKALNO- KEMIJSKIH
ANALIZA**

DIPLOMSKI RAD

Karla Petrinec

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Karla Petrinc**, JMBAG 0248060253, rođena 04.10.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**PRAĆENJE ZRENJA SIRA *RICI* PRIMJENOM SENZORSKIH
I FIZIKALNO - KEMIJSKIH ANALIZA**

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 **Karla Petrincec**, JMBAG 0248060253, naslova

**PRAĆENJE ZRENJA SIRA *RICI* PRIMJENOM SENZORSKIH
I FIZIKALNO - KEMIJSKIH ANALIZA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | |
|--------------------------------------|--------|-------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec | mentor | _____ |
| 2. Prof. dr. sc. Neven Antunac | član | _____ |
| 3. Prof. dr. sc. Samir Kalit | član | _____ |

Zahvala

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Nataši Mikulec na iskazanoj volji za mentorstvom kao i strpljenjem, znanjem, spremnošću i radošću. Također, zahvaljujem timu odličnih profesora i djelatnika u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo koji su bili uvijek spremni pomoći te strpljivo objašnjavali tijekom analiza i način odrađivanja.

Hvala Agronomskom fakultetu na mogućnosti školovanja i stečenom znanju. Zahvaljujem i sirani *Vesna Loborika* na mogućnosti odrađivanja prakse, također i proizvodnji sira *Rici* bez kojeg ne bi bilo ni ovog rada.

Na kraju, ali ne i manje bitno zahvaljujem se suprugu Petru na strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom mog studiranja.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Osnovni postupci u proizvodnji sira	3
2.1. Tehnologija proizvodnje sira <i>Rici</i>	3
2.2. Zrenje sira	5
2.2.1. Glikoliza	6
2.2.2. Lipoliza	7
2.2.3. Proteoliza.....	8
2.2.4. Stvaranje arome u siru	10
2.3. Metode praćenja zrenja sira	11
2.4. Senzorska svojstva sira.....	11
3. Materijali i metode	15
3.1. Uzorkovanje sira <i>Rici</i>	15
3.2. Određivanje udjela suhe tvari u siru	16
3.3. Određivanje udjela mliječne masti u siru	16
3.4. Određivanje udjela proteina u siru	17
3.5. Određivanje udjela slobodnih amino skupina korištenjem Cd-ninhidrina	17
3.5.1. Priprema vodenog ekstrakta sira <i>Rici</i>	17
3.5.2. Priprema reagensa i analiza slobodnih aminoskupina korištenjem spektrofotometrijske metode	18
3.6. Određivanje soli u siru.....	19
3.7. Određivanje pH-vrijednosti sira.....	19
4. Rezultati i rasprava	20
4.1. Fizikalno-kemijski sastav sira <i>Rici</i> tijekom zrenja	20

4.2. Određivanje ukupnog dušika u vodenom ekstraktu sira	24
4.3. Određivanje slobodnih amino skupina	26
4.4. Senzorska analiza	29
4.5. Utjecaj zrenja na senzorsku kvalitetu sira i pojedinih fizikalno-kemijskih parametara	33
5. Zaključak	38
6. Literatura	39
7. Popis tablica, slika i grafikona	43
7.1. Popis tablica	43
7.2. Popis slika	43
7.3. Popis grafikona	43
Životopis	45

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Karla Petrincec**, naslova

PRAĆENJE ZRENJA SIRA *RICI* PRIMJENOM SENZORSKIH I FIZIKALNO - KEMIJSKIH ANALIZA

Tijekom zrenja sira odvija se niz biokemijskih i fizikalno-kemijskih promjena pod određenim uvjetima te nastaju spojevi okusa i arome sira. Biokemijskim reakcijama kao što su proteoliza i lipoliza tijekom zrenja nastaju slobodne aminokiseline i masne kiseline koje su odgovorne za stvaranje arome sira te imaju utjecaj na senzorska svojstva sira. Cilj rada je odrediti senzorske i fizikalno-kemijske značajke te koeficijent regresije između određivanih značajki. Također, praćenjem pojedinih parametara u različitim fazama zrenja odrediti će se optimalno trajanje zrenja sira *Rici*. Fizikalno-kemijski parametri određeni su odgovarajućim i propisanim standardnim metodama. Provedena je i senzorska analiza sira. Analiza je utvrđeno 44,34% vode u bezmasnoj suhoj tvari zrelog sira i 45,81% masti u suhoj tvari. Nadalje, na kraju zrenja, sir *Rici* sadrži 1,02% soli te pH-vrijednost iznosi 5,54. Na temelju provedenih analiza, utvrđeno je da sir *Rici* pripada skupini ekstra tvrdog sira. Optimalno trajanje zrenja sira *Rici* je 10 mjeseci.

Ključne riječi: sir *Rici*, zrenje, senzorska analiza, fizikalno-kemijski parametri, regresijska krivulja

Summary

Of the master's thesis – student **Karla Petrinc**, entitled

MONITORING THE RIPENING OF *RICI* CHEESE USING SENSORY AND PHYSICO-CHEMICAL ANALYSES

During the ripening of cheese, a number of biochemical and physico-chemical changes take place under certain conditions, and compounds of cheese taste and aroma are formed. Biochemical reactions such as proteolysis and lipolysis during ripening produce free amino acids and fatty acids that are responsible for creating the aroma of the cheese and have an impact on the sensory properties of the cheese. The aim of this paper is to determine the sensory and physico-chemical characteristics and the degree of regression between the determined characteristics. Also, by monitoring individual parameters in different stages of ripening, the optimal duration of ripening of *Rici* cheese will be determined. Physico-chemical parameters were determined by appropriate and prescribed standard methods. Sensory analysis of the cheese was also performed. Analyzes revealed 44,34% of water in the fat-free dry matter of mature cheese and 45,81% of fat in the dry matter. Furthermore, at the end of ripening, *Rici* cheese contains 1,02% salt and the pH-value is 5,54. Based on the conducted analyzes, it was determined the *Rici* cheese belongs to the group of extra hard cheese. The optimal ripening time for *Rici* cheese is 10 months.

Keywords: cheese *Rici*, ripening, sensory analysis, physico-chemical parameters, regression curve

1. Uvod

Sirarstvo je dio prehrambene industrije čija je proizvodnja različitih vrsta sireva i tehnologija u konstantnom porastu. S porastom industrijske proizvodnje povećava se proizvodnja različitih vrsta sireva, različitih tehnologija proizvodnje i raznih receptura. Osnovni ciljevi tehnologije proizvodnje sira jesu ustanoviti parametre koji siru daju zadana i poželjna svojstva te izraditi protokol proizvodnje i zrenja sira, čime se osigurava ujednačena kvaliteta proizvoda (Havranek i sur., 2014). Proizvodnja sira se temelji na složenim fizikalno-kemijskim i biokemijskim promjenama pri čemu je naglasak na koncentriranju sastojaka mlijeka, prvenstveno mliječne masti i proteina. Promjene započinju koagulacijom mlijeka te slijede procesi koji održavaju novonastalu kazeinsku micelu. Tehnologija sireva općenito obuhvaća slijedeće faze: priprema mlijeka za sirenje, dodavanje boja, aditiva i mljekarskih kultura, dodavanje sirila, sirenje mlijeka obradom gruša i sirnog zrna, prešanje i oblikovanje, soljenje, zrenje, njega sira, postupak skladištenja i pripreme sira za tržište te pakiranje. Pojedine faze mogu se razlikovati ovisno o vrsti sira koji se proizvodi.

U Istri, u mjestu Loborika nalazi se obiteljska sirana koja ima dugu povijest. Prema podacima iz sirane, predak današnje obitelji Grubešić, početkom 1900. godine imao je stado ovaca i koza, a mlijeko je prerađivao u sir. Obiteljska sirana prenosi tehnologiju proizvodnje s generacije na generaciju te u tijeku renovacije sirane (2017. godine) pronalaze recept za jedan „zaboravljeni“ sir. Obzirom na povijest recepture sira, vlasnici su odlučili prilagoditi proizvodnju suvremenoj tehnologiji koju koriste u sirani te nastaje sir *Rici*. U sklopu izrade diplomskog rada, a u svrhu određivanja optimalnog trajanja zrenja, praćeno je zrenje sira *Rici*.

Zrenje je važan dio tehnološkog procesa proizvodnje polutvrđih i tvrdih sireva. Tijekom zrenja odvijaju se biokemijske promjene glikoliza, lipoliza i proteoliza, čiji su produkti odgovorni za stvaranje arome i odgovarajuće teksture sira. Uz određivanje fizikalno-kemijskog sastava sira u različitim fazama zrenja, praćene su promjene senzorskih svojstava sukladno *Pravilniku o ocjenjivanju kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda* (2004). Senzorskom analizom određene su karakteristike sira u različitim fazama zrenja odnosno promjene izgleda, boje, konzistencije, mirisa i okusa finalnog proizvoda. Nakon utvrđivanja senzorskih svojstava izrađena je regresijska krivulja pojedinih parametara u odnosu na senzorske ocjene pojedinih uzoraka u različitim fazama zrenja. Proizvodnja sira je započela u rujnu 2019. g. te je praćeno zrenje sireva tijekom 12 mjeseci. Svaka tri mjeseca provedeno je uzorkovanje sira, te su uzorci

dostavljeni na daljnje analize u Referentni laboratorij za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

1.1. Cilj rada

Odrediti fizikalno-kemijske parametre i senzorske osobine tijekom različitog razdoblja zrenja te opisati sir *Rici* i usporediti ga sa sirevima u tom tipu. Također, odrediti međusobnu povezanost pojedinih parametara kroz bodovanje senzorskih svojstava i odrediti međusobnu razinu značajnosti. Pri tome predložiti optimalno trajanje zrenja sira *Rici* obzirom na određivane značajke.

2. Osnovni postupci u proizvodnji sira

Prema važećem Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (2009.) skupini ekstra tvrdih sireva pripadaju sirevi koji sadrže manje od 51 % vode u nemasnoj tvari sira te su sirevi većinom većeg oblika i mase. Dugotrajnim zrenjem ekstra tvrdih sireva nastaju sirevi kompaktnije strukture i izraženije arome. Obilježja ekstra tvrdih sireva su: sirenje spontano obranog mlijeka s ciljem standardizacije mliječne masti, primjena termofilnih kultura (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.,...), relativno kratko vrijeme sirenja (otprilike 20 min.), male dimenzije sirnog zrna - veličina zrna pšenice/graška, dogrijavanje sirutke i sirnog zrna (45-55 °C), 'sušenje' sirnog zrna, taloženje sirnog zrna, vađenje istog, kalupljenje, prešanje i hlađenje sira, soljenje u salamuri te zrenje sira u minimalnom trajanju od 6 mjeseci (Kirin, 2016.). U suvremenoj tehnologiji proizvodnje sira gotovo svaki pojedini sir proizveden od kravljeg mlijeka proizvodi se i od ovčjeg i kozjeg mlijeka te se razlikuju brojne vrste ekstra tvrdih sireva s obzirom na ishodišno mlijeko (kravlje, ovčje, kozje) i mjesto izrade što dovodi do sireva različitih senzorskih svojstava. Većina ekstra tvrdih sireva zaštićena je oznakom izvornosti, ali postoji mnogo različitih ekstra tvrdih sireva (Gobbetti i Cagno, 2017.). Najpoznatiji predstavnici ekstra tvrdih sireva su npr. talijanski sirevi u tipu sira Grana (*Parmigiano Reggiano*, *Grana Padano*), talijanski ovčji sir *Pecorino Romano*, švicarski sir *Sbrinz*, a u Hrvatskoj sir *Ribanac*, *Paški sir* odnosno *Krčki sir*.

2.1. Tehnologija proizvodnje sira *Rici*

Proizvodnja sira *Rici* temelji se na tradicionalnoj proizvodnji i recepturi iz 1919. godine. Sir *Rici* pripada skupini ekstra tvrdih sireva, a proizvodi se isključivo od kravljeg mlijeka. Sir je pravilnog i cilindričnog oblika, visine 13 cm, a promjera 26 cm. Kora sira je žute do svjetlo smeđe boje dok boja sirnog tijesta u unutrašnjosti sira varira od svjetlo žute do zlatno žute boje (slika 1). Na prerezu sira nema sirnih očica, kod zrelih sireva (>6 mjeseci) može biti vidljiva „stjenovita“ struktura zbog kristalića mliječne kiseline, koji potječu od aminokiseline tirozina. Okus zrelog sira treba biti blagi do neznatno kiselkast, karakterističan za tu skupinu sireva, proizvedenih od kravljeg mlijeka. Sir zrije minimalno 10 mjeseci. Za proizvodnju 1 kilograma sira *Rici* potrebno je 14 L kravljeg mlijeka.



Slika 1. Sir Rici

(Izvor: <https://www.vesna.hr/>)

Za proizvodnju sira *Rici* koristi se mlijeko iz rashladnog uređaja, pomuženo prethodnoga dana. Mlijeko se sabire od lokalnih uzgajivača, koji drže muzne krave na ekstenzivni način. Toplinska obrada sirovog mlijeka provodi se u duplikatoru, pri temperaturi 68 °C / 20 min. Toplinski obrađeno mlijeko se zatim hladi do temperature 47 °C, a to je ujedno i temperatura inokulacije s mljekarskom kulturom. Za proizvodnju sira Rici koriste se zamrznute, termofilne kulture: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus*, proizvođača DANISCO, Danska. Nakon inokulacije mljekarske kulture potrebno je mlijeko 20 min dobro promiješati. Hlađenje se prekida pri postizanju temperature mlijeka 41 °C, a zbog konvekcije (mlijeko – kultura) - temperatura mlijeka se snizuje do 37 °C. Pri toj temperaturi dodaje se sirilo u prahu, koje se prethodno mora pripremiti na način da se 25 g sirila u prahu otopi u 1 L vode. Uz sirilo može se dodati i dodatak za sprečavanje nadimanja sira (Delvo Zyme G 21301, Delft, Nizozemska), koje se priprema otapanjem 5 g u 2 dcl vode. Nastavlja se s miješanjem kroz naredne 2 minute, kako bi se sirilo ravnomjerno raspodijelilo u čitavoj masi mlijeka. Mlijeko se potom ostavlja u mirovanju narednih 25 do 35 min. Kraj podsirivanja provjerava se uranjanjem kažiprsta u mlijeko, pri čemu gruša oštro i ravnomjerno puca, a izdvojena sirutka je zelenkaste boje. Slijedi proces obrade sirnog gruša sa sirnom harfom, sve do veličine zrna graška. Obrada sirnog gruša traje ~ 10 min te se usitnjeni gruša ostavlja u mirovanju, kako bi se sirno zrno nakupilo na dnu

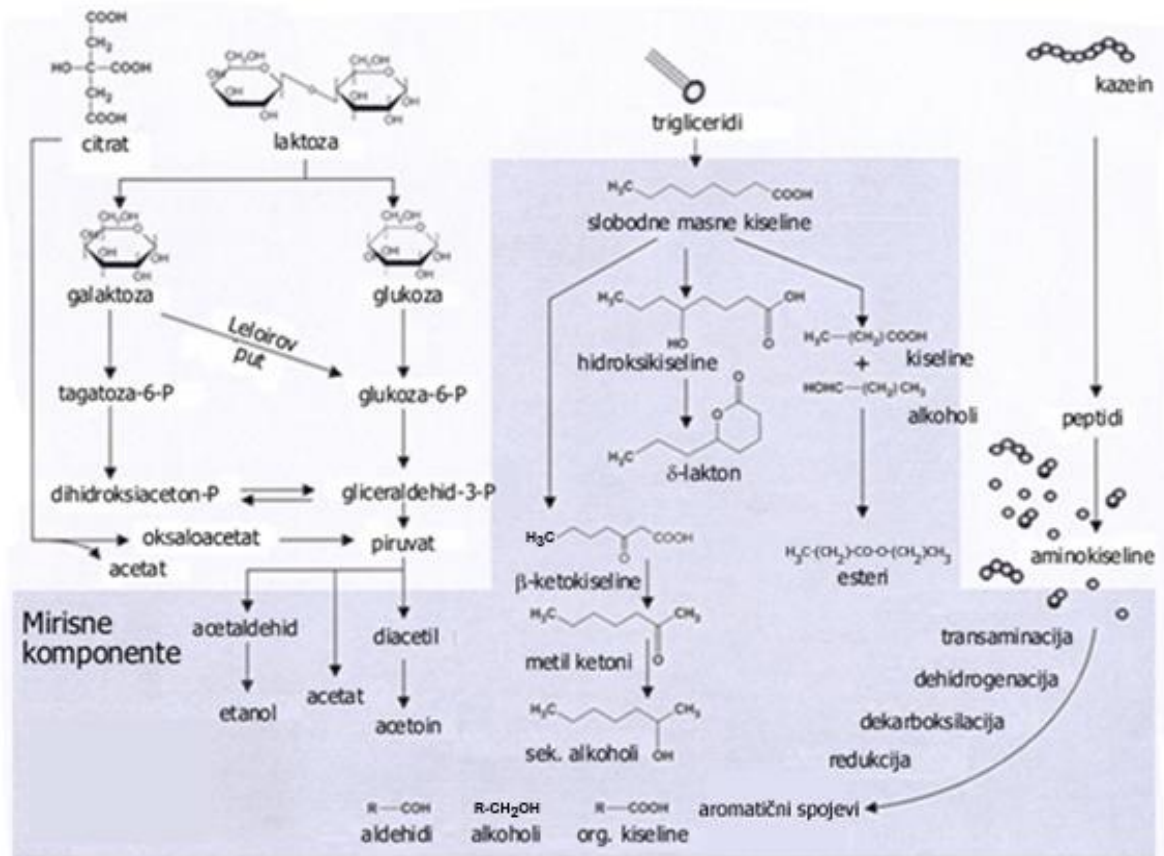
duplikatora, što traje otprilike 10 min. Slijedeća faza je dogrijavanje (sušenje) sirnog zrna pri temperaturi od 45 °C tijekom 20 min, uz okretanje sirne harfe. Sirno zrno i sirutka se zajedno ispuštaju na distribucijski stol, na kojem se nalaze perforirani kalupi, koji se pune sirnim zrnom.

Na distribucijskom stolu odvija se samoprešanje, prekriva se poklopcem i podiže temperatura na 45 °C, što je prethodna temperatura dogrijavanja. Tijekom 180 min sirevi se okreću svakih 30 min. Sirevi se odlažu u komori na suhe police 12 – 14 h pri temperaturi 15 °C. Tijekom iduća 72 h odlažu se u salamuru temperature 15 °C, pH-vrijednosti 5 i slanosti 17 °Bè (Baumea) te slijedi postupak zrenja. Sirevi zriju u komori za zrenje, u kojoj se sirevi svakodnevno okreću tijekom 3 mjeseca svakodnevno okreću, a iduća dva mjeseca svaki drugi dan. Nakon 5 mjeseci dozrijevanja sir gubi dovoljno vlage, te se okretanje sira smanjuje na jednom tjedno. Prva 4 mjeseca sir zrije pri 12 °C uz relativnu vlažnost zraka 85 %, dok se u nastavku zrenja temperatura snižava na 11 °C uz relativnu vlažnost zraka 75 %.

2.2. Zrenje sira

Nakon soljenja slijedi faza zrenja ekstra tvrdog sira u zrioni. Zrenje je proces koji se odvija u zrioni u kojoj je potrebno zadovoljiti mikroklimatske uvjete (temperaturu i relativnu vlažnost zraka). Pri tome je potrebno provjeravati temperaturu zraka u zrioni, relativnu vlažnost zraka i njegov protok, korištenjem odgovarajuće opreme. Trajanje zrenja ovisi o tipu ekstra tvrdog sira koji se proizvodi, a iznosi od minimalno 6 mjeseci do 2 godine, a neki zriju i duže (Linford, 2008.; Harbutt, 2008.). Osim tipa sira koji se proizvodi, na trajanje zrenja ovisi njegov sastav, svojstva sirnog tijesta prije zrenja (udio vode, masti, soli, pH-vrijednost, prisutna mikroflora) te veličina sira (Tratnik, 2012.). Glavni cilj zrenja je pretvaranje sirne mase u sir karakterističnog okusa, arome, teksture i izgleda. Dakle, zrenje je proces u kojem se odvijaju biokemijske reakcije tijekom kojih se složeni organski spojevi (mliječna mast, proteini i laktoza) razgrađuju u jednostavnije spojeve o kojima ovisi stvaranje zrelog sira karakterističnog okusa, arome, konzistencije i strukture (Kalit i sur., 2002.; Havranek i sur., 2014.). Mikulec i sur. (2010.) opisuju kako se biokemijske reakcije mogu podijeliti na primarne i sekundarne promjene. Prema tome proteoliza, lipoliza i glikoliza su primarne promjene koje su odgovorne za formiranje željene teksture, dok se sekundarnim promjenama formira aroma sira, razgradnjom aminokiselina i slobodnih masnih kiselina (slika 2). Djelovanjem enzima sirila, indogenih enzima mlijeka, endogenih enzima bakterija mliječne kiseline, enzima dodane mljekarske kulture i enzima nestarterske mikroflore (eng. *non starter lactic acid bacteria* –

NSLAB), odvijaju se biokemijski procesi proteolize, glikolize i lipolize. Navedeni biokemijski procesi uzrokuju fizikalno-kemijske promjene u siru (Lukač Havranek i sur., 2000; Prieto i sur., 2002.; Marilley i Casey, 2004.; McSweeney, 2004.; Mikulec i sur., 2010.; Tudor Kalit, 2012.; Havranek i sur., 2014.).



Slika 2. Biokemijske promjene tijekom zrenja sira (Izvor: Mikulec, 2010.)

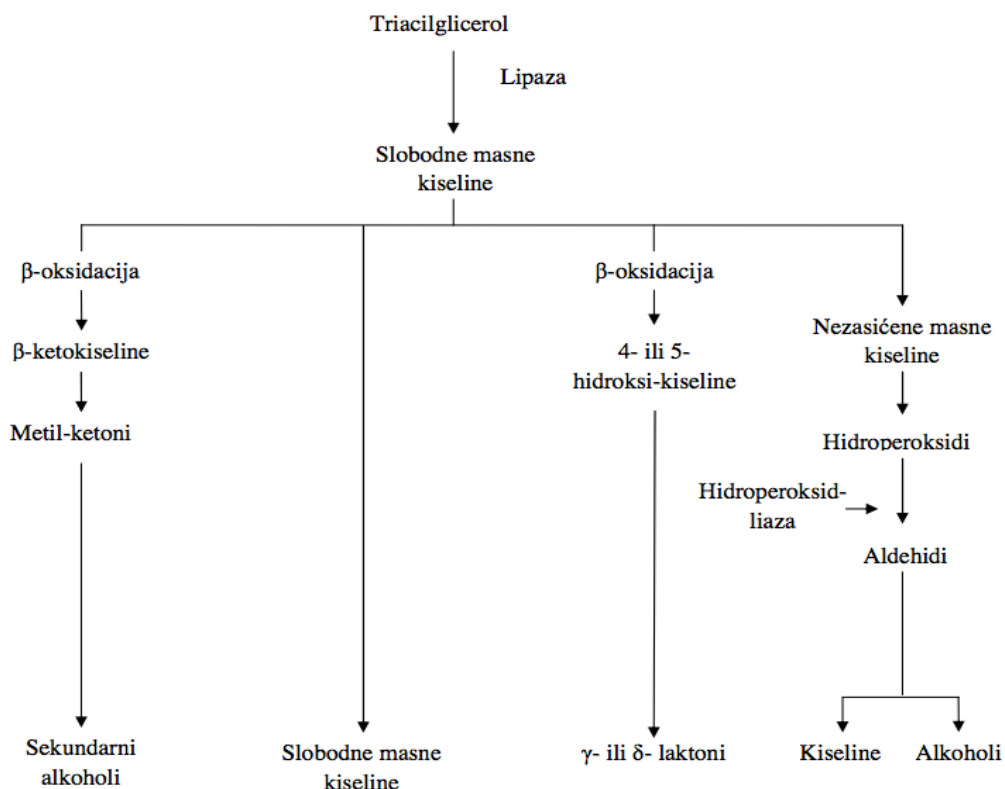
2.2.1. Glikoliza

Glikoliza je biokemijski proces u proizvodnji sira, pri čemu mliječni šećer (laktoza) fermentira u mliječnu kiselinu. Pretvorba laktoze u mliječnu kiselinu odvija se glikolitičkim (Embden-Mayerhof-Parnasovim putem) ili fosfoketolaznim putem ovisno o korištenim vrstama bakterija mliječne kiseline; homofermentativne ili heterofermentativne (Samaržija, 2015.). Laktoza je disaharid koji bakterije mliječne kiseline ne mogu razgraditi kao takvog, ali mogu fermentirati glukozu i galaktozu koje nastanu u procesu razgradnje laktoze s enzimom β-galaktozidazom. Uz fermentaciju laktoze, odvija se i fermentacija citrata pri čemu nastaju mliječna kiselina i popratni produkti kao što su acetaldehid, etanol, ugljikov dioksid, diacetil, i dr. Produkti metabolizma citrata jesu nositelji okusa i mirisa budućeg sira (Havranek i sur.,

2014.; Kirin, 2016.). Aromi sira pridonose laktati nastali tijekom glikolitičkog procesa i aromatski spoj acetat. Acetat može nastati iz laktoze djelovanjem bakterija mliječne kiseline, ali i kao rezultat metabolizma citrata i laktata. Tijekom glikolize nastala mliječna kiselina snižava pH-vrijednost sira te time određuje kiselost sira. Također, nastala mliječna kiselina ima i konzervirajuću ulogu. Nadalje, usmjerava daljnji proces zrenja sprječavajući nekontroliranu razgradnju kazeina. Ako je pH-vrijednost preniska dolazi do pogreške sira zbog nedovoljne razgradnje kazeina, također i kod pH-vrijednosti više od očekivane dolazi do pogreške sira tijekom zrenja (Kirin, 2016.; Gobbetti i Cagno, 2017.).

2.2.2. Lipoliza

Lipoliza je biokemijski proces razgradnje mliječne masti djelovanjem enzima lipaze na slobodne masne kiseline koje utječu na miris i okus sira. Lipoliza je u većini sireva vrlo ograničena zbog pasterizacije koja inaktivira prisutne lipaze te je mliječna mast relativno stabilan sastojak sira. Enzim lipazu moguće je dodati iz drugih izvora kao što su mljekarska kultura, pripravak sirila, nestarterske bakterije mliječne kiseline i egzogene lipaze. Intenzivna lipoliza tijekom zrenja je nepoželjna kod većine vrsta sireva s unutarnjim bakterijskim zrenjem. Oslobođene masne kiseline mogu oksidirati i uzrokovati užegao okus sira što je nepoželjno senzorsko svojstvo. Hill (2000.) navodi kako drugi izvori dodatka lipaze imaju veliki utjecaj na proizvodnju talijanskih sireva kao što je npr. Parmezan.



Slika 3. Biokemijski put mliječne masti (Izvor: McSweeney i Sousa, 2000.)

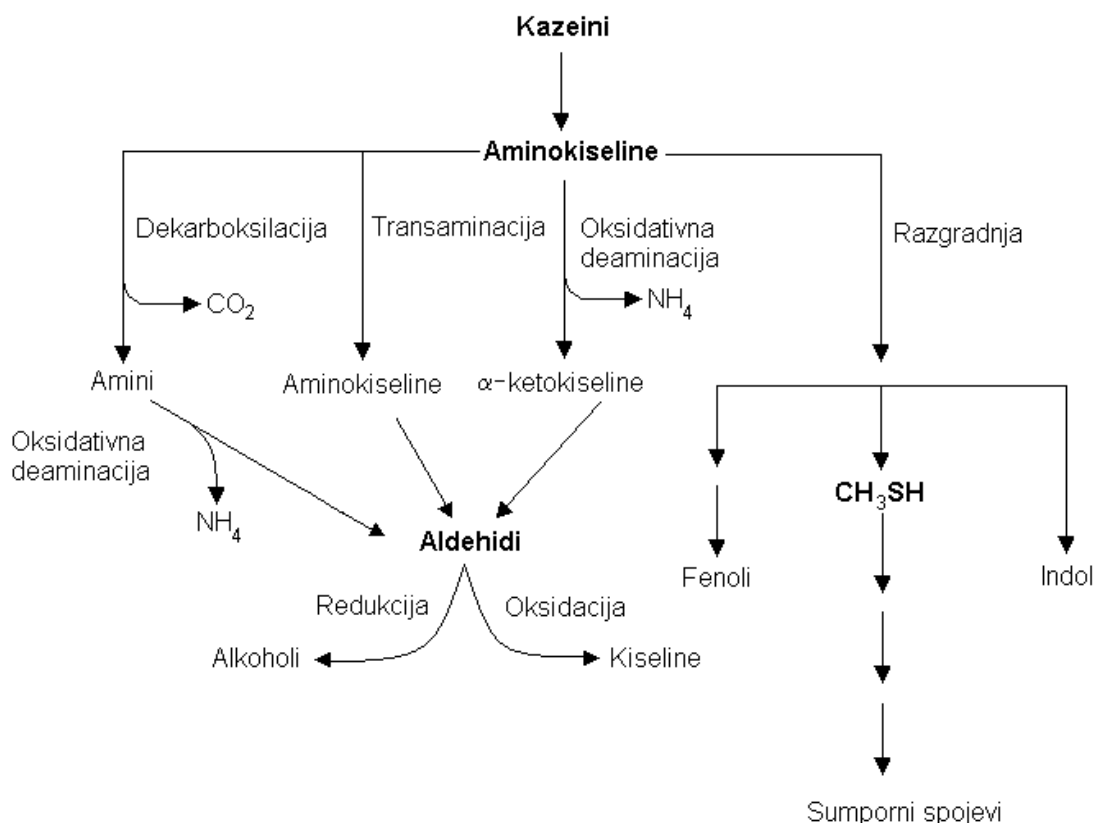
Biokemijski put razgradnje mliječne masti do spojeva koji utječu na aromu sira prikazan je na slici 3. Izravan utjecaj na kreiranje arome sira imaju masne kiseline kratkog (maslačna C_{4:0}, kapronska C_{6:0} i kaprilna C_{8:0} kiselina) i srednje dugog lanca (kaprinska C_{10:0} i laurinska C_{12:0}). Stoga sirevi od kozjeg ili ovčjeg mlijeka imaju izraženiju aromu u odnosu na sireve proizvedene od kravljeg mlijeka. Suprotno tome, masne kiseline dugog lanca su prekursori za biosintezu sekundarnih metabolita poput sekundarnih alkohola, metil-ketona, γ - ili δ -laktona te kiselina (Tudor Kalit, 2012.).

2.2.3. Proteoliza

Proteoliza je najvažniji proces tijekom zrenja sira. Enzimi proteaze razgrađuju kazein i polipeptide do peptida, koji se djelovanjem peptidaza razgrađuju na aminokiseline, iz kojih enzimima dekarboksilazama nastaju amini i ugljikov dioksid, a deaminazama nastaju ketonske kiseline i amonijak (Kalit, 2005.; Mikulec, 2010.; Havranek i sur., 2014.; Kirin, 2016.). Posljedica proteolize tijekom zrenja je povećana pH-vrijednost sira. Aromi sira pridonosi stvaranje malih peptida i slobodnih aminokiselina. Katabolizam aminokiselina dovodi do

nastajanja spojeva odgovornih za aromu sira, stoga način i trajanje proteolize ovisi o proizvodnji sira odgovarajuće arome ili sira s pogreškom. Nadalje, polipeptidi i peptidi su poznati po gorkom okusu, a aminokiseline imaju okuse u rasponu od neutralnog preko slatkog, gorkog, kiselog do sumporastog.

Proteoliza može biti primarna i sekundarna. Primarnom proteolizom djelovanjem kimočina i plazmina kazein se razgrađuje na oligopeptide dok sekundarna proteoliza predstavlja razgradnju proteina i oligopeptida do malih peptida i aminokiselina. Osim proteolitičkih enzima mlijeka (endogeni enzimi) koriste se sirila, mljekarske kulture te nestarterske mikrobnе populacije (McSweeney i Fox, 1999.; Mikulec i sur., 2010.). Praćenje proteolize sira postalo je iznimno važno zbog utjecaja proteolize na teksturu i aromu sira. U radovima pojedinih autora prikazan je utjecaj proteolize na modifikacije tehnološkog procesa proizvodnje sira, pa tako pratiti tijekom zrenja obzirom na proteolizu (Folkertsma i Fox, 1992., McSweeney i Fox, 1997.; McSweeney i Fox, 1999.; De Angelis Curtis i sur., 2000.; Prieto i sur, 2002.; McSweeney, 2004.; Kalit i sur, 2005.; Guinee i O'Callaghan, 2010.; Mikulec i sur., 2010.; Kilcawley Kieran, 2017. i dr.).



Slika 4. Opći putevi katabolizma aminokiselina

(Izvor: McSweeney i Sousa, 2000.).

Kao pokazatelj zrelosti sira moguće je pratiti i koncentraciju slobodnih aminokiselina (SAK), koje predstavljaju konačni razgradni produkt proteolize. Oslobođene aminokiseline iz kazeina moguće je pratiti tijekom zrenja te njihovu transformaciju u kataboličke spojeve (slika 4). Tijekom različitih faza zrenja oslobađaju se različite aminokiseline te će količina slobodnih aminokiselina ovisiti o dužini zrenja. Havranek i sur. (2014.) navode da je za stvaranje karakteristične arome sira važan sastav kratkih peptida, SAK i relativan odnos pojedinih aminokiselina. Katabolizam aminokiselina odvija se u tri osnovne faze koje su odgovorne za stvaranje pojedinih aminokiselina. Pojedine aminokiseline imaju pozitivan ili negativan utjecaj na okus i aromu sira stoga je moguće proizvesti sir određenog okusa, praćenjem stvaranja pojedinih slobodnih aminokiselina koje su odgovorne za pojedinu aromu. S obzirom na navedeno neki peptidi mogu biti gorkog okusa, okusa po juhi, orasima ili slatkastog okusa (McSweeney i Sousa, 2000.).

2.2.4. Nastajanje arome u siru

Na konačnu aromu sira utječu brojni čimbenici: udio vode, zrelost sirnog tijesta, udio soli i način soljenja, pH-vrijednost gruša, temperatura zrenja i djelovanje primarne i sekundarne mikroflore. Konačna aroma sira ponajprije ovisi o vrsti sira koja se proizvodi te načinu i vremenskom trajanju zrenja. Odabir kvalitetnog sirovog mlijeka u velikoj mjeri utječe na stvaranje arome sira, a odabirom vrste sira i procesom proizvodnje započinje stvaranje arome. Biokemijskim procesima odgovornim za razgradnju sastojaka mlijeka, gruša i sira (glikoliza, lipoliza, proteoliza, i dr.) nastaju spojevi arome i okusa. Korištenjem endogenih enzima mlijeka, mljekarskih kultura, sirila ili nestarterskih mikrobnih populacija u proizvodnji sira nastaju spojevi odgovorni za kreiranje arome sira, kao što su masne kiseline, ketoni, alkoholi, laktoni, esteri, aldehidi, sumporni spojevi i amini (Le Que´re, 2004).

Početkom 20. stoljeća provedena su istraživanja arome sira, navode Havranek i sur., (2014.). Nadalje, napredak u istraživanju arome sira može se zahvaliti razvoju plinske kromatografije (GC) i masene spektrometrije (MS). Aroma sira je opisana stvaranjem aromatskih spojeva tijekom proizvodnje i zrenja sira. Njihovu koncentraciju moguće je odrediti u različitoj fazi zrenja sira plinskim kromatografskim tehnikama s masenim detektorom (GC-MS) (McSweeney, 2000.). Praćenjem biokemijskih procesa u stvaranju arome sira, ponajviše proteolize, moguće je utjecati na eventualne pogreške sira kao što je gorak okus. Pravovremenim određivanjem spojeva odgovornih za stvaranje gorkog okusa sira moguće je prekinuti tijekom zrenja te tako utjecati na aromu proizvedenog sira. Također, može se pratiti tijekom

zrenja do stvaranja spojeva odgovornih za željenu aromu (McSweeney i Sousa, 2000.; Muir, 2010.).

2.3. Metode praćenja zrenja sira

Prije stavljanja sireva u prodaju potrebno je odrediti osnovne parametre kemijskog sastava i fizikalnih osobina. Osnovne analize uključuju određivanje mliječne masti najčešće butirometrijskom metodom (HRN EN ISO 3433:2009), proteina metodom Kjeldahl (HRN EN ISO 8968-2), suhe tvari metodom sušenja (ISO 5534:2008), pH vrijednosti (prema uputi proizvođača) pH metrom Seven Multi (Mettler Toledo, Švicarska).

Uz praćenje ukupnog proteina moguće je odrediti udio slobodnih amino skupina korištenjem Cd-ninhidrina (Folkertsma i sur., 1992.) te odrediti tijek proteolize. Uz osnovni sastav sira potrebno je pratiti udio soli metodom po Volhardu korištenjem srebrovog nitrata kao reagensa za određivanje klorida. Udio pojedinih sastojaka te fizikalnih parametara potrebno je pratiti tijekom zrenja kako bi se proizveo sir odgovarajuće kvalitete te pravovremeno utjecalo na moguće pogreške. Odstupanjem nekih od parametara moguće je detektirati eventualne pogreške u procesu proizvodnje te ih pokušati ukloniti.

2.4. Senzorska svojstva sira

Senzorska svojstva sira ovise o brojnim čimbenicima kao što su vrsta mlijeka, mljekarske kulture, proces proizvodnje, zrenje te njega sira. Antunac i Mikulec (2018.) navode kako se kvaliteta sira određuje senzorskim analizama hrane za koje se koriste ljudska osjetila, dok je „analitički instrument“ posebno odabrana i uvježbana skupina ocjenitelja (panel). Senzorska svojstva sira temelje se na uporabi osjetila vida, mirisa, okusa i dodira. Korištenjem osnovnih osjetila opisuje se izgled, boja, konzistencija, miris i okus sira. Senzorski tim se educira o poželjnim okusima i aromama koji nastaju u siru najviše tijekom zrenja, kao i uzrocima pogrešaka sira. Na taj način može nastati sir ugodnih aroma, kao i sir koji uslijed pogrešaka i nepravilnog zrenja stvara nepoželjne mirise i okuse. Potrebno je provoditi senzorsko ocjenjivanje sira kako bi se moglo odrediti postoji li pogreška, zbog čega je došlo do nje i kako reagirati.

Senzorsko ocjenjivanje sireva provodi se prema odgovarajućim pravilnicima. Europska udruga za kontrolu kvalitete hrane predlaže jedinstvenu metodu u kojoj se primjenjuje skala od

ukupno 20 ponderiranih bodova, a u Republici Hrvatskoj primjenjuje se Pravilnik za ocjenjivanje mlijeka i mliječnih proizvoda (2004.), koji je izradio Zavod za mljekarstvo Agronomskog fakulteta. Članovi povjerenstva koriste terminologiju i standarde propisane u FIL-IDF (1997.). U tablici 1 prikazana su senzorska svojstva te raspodjela bodova za svako pojedino svojstvo ekstra tvrdog sira sukladno Pravilniku (2004).

Tablica 1. Broj bodova za ocjenu senzorskih svojstava ekstra tvrdog sira

Svojstvo	Najviši broj bodova
Vanjski izgled	1
Boja	2
Konzistencija	4
Miris	3
Okus	10
Ukupno:	20

(Izvor: Pravilnik za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, 2004.)

Određivanje senzorskih svojstava je važno i u procjeni mogućeg patvorenja sira s obzirom na okus. Sir *Parmigiano Reggiano* ima oznaku izvornosti (eng. *Protected Denomination of Origin – PDO*), te potječe iz okolice grada Parme. Konzumira se u cijelom svijetu stoga proizvođači Italije i šire pokušavaju proizvesti takav sir i prodavati pod istim nazivom. Qian i Burbank (2007.), navode da je tehnologija sireva koji se proizvode po uzoru na *Parmigiano Reggiano* sir slična, ali razlika je u spojevima arome koji se senzorskim određivanjem mogu odrediti. Shodno tome određivanje senzorskih svojstava ima veliku ulogu u određivanju vrste sira. Kako bi se moglo obaviti ocjenjivanje potrebno je oformiti stručni tim/panel, educirati ih, odrediti termine te izraditi bodovnu listu za pojedine vrste sira. Kušanje se odvija u prostoriji s pregradama kako ocjenjivači ne bi mogli utjecati na donošenje konačne ocjene između pojedinih ocjenjivača. Sir se donosi na ocjenjivanje u izvornoj veličini, u cjelovitoj veličini te se najprije ocjenjuje vanjski izgled. Zatim se sir reže (meki, polutvrđi, tvrdi, ekstra tvrdi sir) i to po sredini kako bi bio vidljiv prerez te se uočavaju moguće pogreške na prerezu sira, ocjenjuje se miris, okus - blag, kiselkast, i dr.. Ako se sir ocjenjuje u različitim fazama zrenja, uvijek se ocjenjuje u svim fazama zrenja (npr. na početku, u sredini i na kraju zrenja). Također, ako se ocjenjuju različite vrste sira, potrebno je uzorke prezentirati ocjenjivačima u rastućem nizu intenziteta okusa (Antunac i Mikulec, 2018.). Paneliste je

potrebno dodatno educirati i provjeravati njihove sposobnosti razlikovanja senzorskih svojstava kako bi bili međusobno ujednačeni (Kilcawley, 2017.).

Ne tako često, osim poželjnih aroma i okusa kao i ostalih senzorskih svojstava, moguće su pogreške sira koje se manifestiraju prema jednom od senzorskih parametara (tablica 2), a najčešće je to uočavanjem vanjskog i unutarnjeg izgleda sira te mirisa i okusa. U tablici 2 prikazani su termini pogrešaka sira za pojedina svojstva (Havranek i sur., 2014.; Antunac i Mikulec, 2018.).

Tablica 2. Prikaz odgovarajućih termina za pojedina senzorska svojstva

Svojstvo	Termini	Mogući uzroci
Vanjski izgled	deformiran, napuhnut, nečist, nakrivljen;	nepravilno prešanje, neredovito okretanje sira, nečisto mlijeko
Izgled Unutarnji izgled	napukline, mnogo sitnih rupica na prerezu, bez očiju, premale oči;	zaostala sirutka, usporena fermentacija, mikroorganizmi (<i>E. coli</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , kvasci)
Kora	debela, gruba, bez boje, vlažna, nečista, pljesniva	prebrzo sušenje, visoka temperatura zrenja i niska relativna vlažnost zraka, grinje <i>Tyroglyphus siro</i>
Boja	blijeda, crvene mrlje, mramoriran/prošaran, obojane mrlje, neujednačena boja	nepravilno soljenje, nejednolična raspodjela vlage, utjecaj kvasaca, sporogene bakterije, visoka pH-vrijednost, loša kvaliteta mlijeka, nepotpuno izdvajanje sirutke
Miris	po prezrelom siru, nekarakterističan miris, miris po amonijaku	previsoka temperatura zrenja, predugo trajanje zrenja, propust u tehnološkom procesu, utjecaj okolišnih čimbenika
Okus	kiseli, gorak, užegao, okus po kvascima, nedovoljno slan/preslan, po kemikalijama	nakiselo mlijeko, hidrofobni peptidi, nedovoljno prešanje sira, proteinaze ili njihova odsutnost, spora acidifikacija, lipolitički mikroorganizmi, dezinfekcijska sredstva
Konzistencija	suha, mrvičasta, masna, gumasta, žilava, čvrsta, nepovezana, spužvasta,	neodgovarajući sastav, spori razvoj kiselosti, visoka kiselost mlijeka za sirenje, izloženost previsokoj temperaturi tijekom zrenja, visok sadržaj vlage, pretjerana proteoliza

(Izvor: Havranek i sur., 2014.; Antunac i Mikulec, 2018.)

Senzorska svojstva sira ovise o tehnološkom procesu proizvodnje sira te kemijskim i biokemijskim procesima tijekom zrenja. Također, moguće je na njih utjecati provođenjem senzorske analize uz senzorski tim ili instrumentalno. Suvremenom tehnologijom moguće je instrumentalno određivanje senzorskih svojstva, korištenjem plinske kromatografije (masena spektrometrija, olfaktometrija), te određivanjem sastava slobodnih masnih kiselina i aminokiselina koje su odgovorne za stvaranje arome (Tunick, 2014.).

3. Materijali i metode

Sir *Rici* proizvodi se u sirani *Vesna Loborika* (Loborika-Istra), gdje su uzorci sira prikupljeni radi određivanja fizikalno–kemijskih analiza. Priprema uzoraka sira obuhvatila je odstranjivanje kore sira, usitnjavanje sira u ribalici za sir. Za određivanje senzorskih svojstava, dostavljen je isječak mase 300 g od svakog pojedinog sira, različitih faza zrenja.

Fizikalno–kemijske analize obuhvaćale su određivanje:

- udjela suhe tvari, referentnom metodom sušenja sira u sušioniku na 102 °C, (HRN EN ISO 5534:2008.),
- udjela mliječne masti u siru, butirometrijskom metodom po Van Guliku, (HRN ISO 3433:2009.),
- udjela proteina i u vodi topljivih frakcija dušika (WSN), na instrumentu Kjeltec 2003, metodom blok digestije (HRN EN ISO 8968-1:2014.),
- količine slobodnih aminokiselina spektrofotometrijskom metodom (g Leu/100 g suhe tvari), uz korištenje Cd-ninhidrina,
- količine soli, metodom po Volhard-u (AOAC 935.43),
- pH vrijednosti potenciometrijskom metodom, s pH-metrom Mettler Toledo.

Analiza senzorskih svojstava sira *Rici* obavljena je prema Pravilniku za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004.). Za svaki uzorak sira korišteno je sustavno bodovanje za ukupno pet (5) svojstava, s maksimalnim brojem bodova: vanjski izgled (2 boda), tekstura (2 boda), prerez (2 boda), boja (2 boda), miris (2 boda) i okus (10 bodova), što ukupno iznosi 20 bodova. Pojedinačne ocjene pojedinih ocjenjivača su usuglašene u zajedničku ocjenu, koja odgovara srednjoj vrijednosti ocjena svih ocjenjivača.

3.1. Uzorkovanje sira *Rici*

Tijekom 2019. godine u sirani *Vesna Loborika* proizveden je sir *Rici* prosječne mase 7,5 kg. Proizvedeno je 20 koluta sira, od kojih je u različitim vremenskim fazama zrenja (0., 90., 230., 280., 320., 350. i 450. dan) izdvojen po jedan sir. Od svakog sira uzorkovano je 300 grama sira. Analize su provedene u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda

za mljekarstvo na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za svaki sir određeni su fizikalno–kemijski parametri i senzorska kvaliteta sira u različitim fazama zrenja.

3.2. Određivanje udjela suhe tvari u siru

Određivanje udjela suhe tvari u siru provedeno je referentnom metodom sušenja, prema normi HRN EN ISO 5534:2008. U aluminijske lončice potrebno je staviti 20 g prethodno odvagano pijeska, te zajedno sa staklenim štapićem sušiti u sušioniku najmanje 30 min pri temperaturi 102 °C. Po završenom sušenju, poklopljeni lončići prebacuju se u eksikator kako bi se ohladili i izvagali.

Pijesak je protresanjem smješten na jednoj strani lončića, dok se na drugoj dodaje ~ 3 g naribanog sira, izvaže na analitičkoj vagi, zabilježi masa te se uzorak staklenim štapićem mora promiješati. Otklopljeni lončići stavljaju se potom na sušenje u sušionik, u trajanju od najviše 3 sata pri temperaturi 102 °C ± 2 °C. Nakon završenog sušenja, lončice treba poklopiti i ostaviti u eksikatoru kako bi se ohladili. Slijedi vaganje na analitičkoj vagi, na 0,1 mg točnosti. Sušenje se ponavlja sve dok promjena mase poklopljene posudice ne bude manja ili jednaka 2,0 mg ili dok se ne poveća u dva uzastopna vaganja.

3.3. Određivanje udjela mliječne masti u siru

Određivanje udjela mliječne masti u siru butirometrijskom metodom po Van Guliku, provodi se prema normi HRN ISO 3433:2009, a uključuje odvagu 1,5 g sira uz dodatak sumporne kiseline ($\rho = 1,52 \text{ g/cm}^3$). Pripremljeni uzorak treba biti uronjen u vodenu kupelj, ~ 1 sat, kako bi se struktura sira razorila. Nakon što je dobiven homogen uzorak, potrebno je dodati 1 mL izoamilnog alkohola ($\rho=0,812 \text{ g/cm}^3$) kako bi se odvojila mliječna mast, a butirometri se moraju nadopuniti sa sumpornom kiselinom do oznake na staklenom dijelu butirometra. Uzorci se potom centrifugiraju u centrifugi pri 1130 okretaja/minuti, te stavljaju u vodenu kupelj zagrijanu na 65 °C u trajanju od 7 minuta. Količina mliječne masti se izravno očitava sa skale butirometra.

3.4. Određivanje udjela proteina u siru

Određivanjem udjela proteina u siru metodom po Kjeldahlu određuje se ukupni protein, na način da se u tube odvagane 1–2 g uzorka sira, uz dodatak dvije tablete katalizatora ($K_2SO_4 + CuSO_4 \times 5 H_2O$) i 12–14 mL koncentrirane sumporne kiseline. Držać za tube s reagensima stavlja se u peć za digestiju, prethodno zagrijanu pri $420\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Scrubber jedinica postavlja se na brzinu 2, 10 minuta prije stavljanja tuba. Nakon spaljivanja, tube s uzorcima ostavljaju se u mirovanju kroz 10 minuta. Slijedi proces destilacije i titracije korištenjem analizatora Kjeltec 2300 Tekator. Instrument se provjerava slijepom probom i pilot uzorkom. Uzorak se destilira na Kjeltec analizatoru, a u spaljeni uzorak se dodaje otopina natrijevog hidroksida (35 %) te se destilat uvodi u otopinu borne kiseline. Borna kiselina je pripremljena na način da je prethodno otopljena u 2-3 L ključale vode, uz dodatak indikatora (brom krezol zeleni i metil crveni), te oko 10 mL 0,1 M NaOH. Nastali produkt (destilat + borna kiselina) se titrira s 0,1 M otopinom klorovodične kiseline. Instrument prikazuje udio dušika te uz pomoć faktora preračunava u količinu proteina u siru. Proces destilacije i titracije odvija se automatski, dok je potrebno prethodno pripremiti reagense.

3.5. Određivanje udjela slobodnih amino skupina korištenjem Cd-ninhidrina

3.5.1. Priprema vodenog ekstrakta sira *Rici*

Vodeni ekstrakti sira pripremljeni su metodom opisanom u radu Mayera i sur. (1998.). U 10 g naribanog sira treba dodati 90 g prethodno zagrijane (50 °C) redestilirane vode, a zatim se smjesa homogenizira u homogenizatoru pri 4 mPa, ~ 2 min. Nakon homogenizacije, uzorci se centrifugiraju 30 minuta pri 4 °C i 3500 okretaja. Uzorci su filtrirani kroz naborani filter papir te je 20 mL korišteno u svrhu određivanja udjela u vodi topljivih frakcija metodom blok digestije. Preostali filtrat se mora još jednom profiltrirati u Erlenmeyerovu tikvicu kako bi se dobili vodeni ekstrakti sira.

3.5.2. Priprema reagensa i analiza slobodnih aminoskupina korištenjem spektrofotometrijske metode

Otopina Cd-ninhidrina se sastojala od 0,8 g ninhidrina otopljenog u smjesi od 80 mL 99,5 % etanola i 10 mL octene kiseline, kojoj je dodan 1 g CdCl_2 (s) prethodno otopljen u 1 mL redestilirane vode. Reagens je ostavljen na tamnom i hladnom mjestu do početka analize. Na spektrofotometru pri valnoj duljini 507 nm mjeri se apsorpcija svijetla smjese (uzorak + reagens).

Smjesa je pripravljena od prethodno razrijeđenog vodenog ekstrakta uzorka volumena 1 mL i 2 mL Cd-ninhidrin reagensa. Razrijeđeni vodeni ekstrakt pripremljen je tako što se iz drugog filtrata u epruvetu mikropipetom otpipetira 50 μg filtrata i nadopuni do 1 mL redestiliranom vodom (950 μg H_2O). Nakon što su pripremljeni svi potrebni razrijeđeni vodeni ekstrakti, dodaje se 2 mL reagensa i odmah zagrijava u vodenoj kupelji pri 84 °C u trajanju od 5 minuta (čim se doda reagens potrebno je odmah staviti u vodenu kupelj zbog brze reakcije). Nakon provedenih 5 minuta u vodenoj kupelji, uzorci se ohlade do sobne temperature te se prebacuju u kivete, koje se stavljaju u spektrofotometar. Nakon očitavanja rezultata, izrađuje se baždarni dijagram kako bi se odredio ekvivalent leucina u uzorcima.

Prije određivanja ekvivalenta leucina u uzorcima, potrebno je pripremiti razrjeđenja leucina (0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,3; 0,5 i 1 mM Leu), iz prethodno pripravljene 2 mM početne otopine leucina sa svrhom prikazivanja baždarnog dijagrama. Potrebno je odvagati 0,026 g leucina u odmjernu tikvicu od 100 mL i redestiliranom vodom nadopuni se do oznake te je tako pripravljena početna 2 mM otopina leucina. Nakon pripravljene početne otopine slijede razrjeđenja volumena 1 mL čiji je omjer opisan u tablici 3. U pripravljena razrjeđenja dodaje se 2 mL reagensa Cd-ninhidrina, zatim se prebacuje u vodenu kupelj te se očitavaju rezultati na spektrofotometru i radi baždarni dijagram.

Tablica 3. Prikaz potrebnih volumena reagensa kako bi se dobila odgovarajuća koncentracija leucina (mM)

Koncentracija leucina / mM	Voda / μL	2 mM leucin (aq) / μL
0,01	990	10
0,02	980	20
0,04	960	40
0,08	920	80
0,1	900	100
0,3	700	300
0,5	500	500
1	-	1000

3.6. Određivanje soli u siru

Metoda po Volhardu (AOAC 935.43) za određivanje količine klorida u siru uključivala je odvagu 2 g prethodno usitnjenog uzorka. U uzorak sira dodano je 2,5 mL HNO_3 (4 mol/L) i 50 mL zagrijane redestilirane vode (50 °C). Uzorci su pripremljeni u paraleli. Prije početka rada elektroda je isprana s otopinom srebrovog nitrata (0,1 M), koja služi kao reagens za određivanje klorida. Pomoću uređaja Compact titrator G20 (Mettler Toledo TITI) očitana je količina klorida u siru tako što se elektroda instrumenta uronila u uzorak, a na zaslonu instrumenta se očitava vrijednost. Nakon svakog uzorka potrebno je elektrodu isprati s redestiliranom vodom i osušiti.

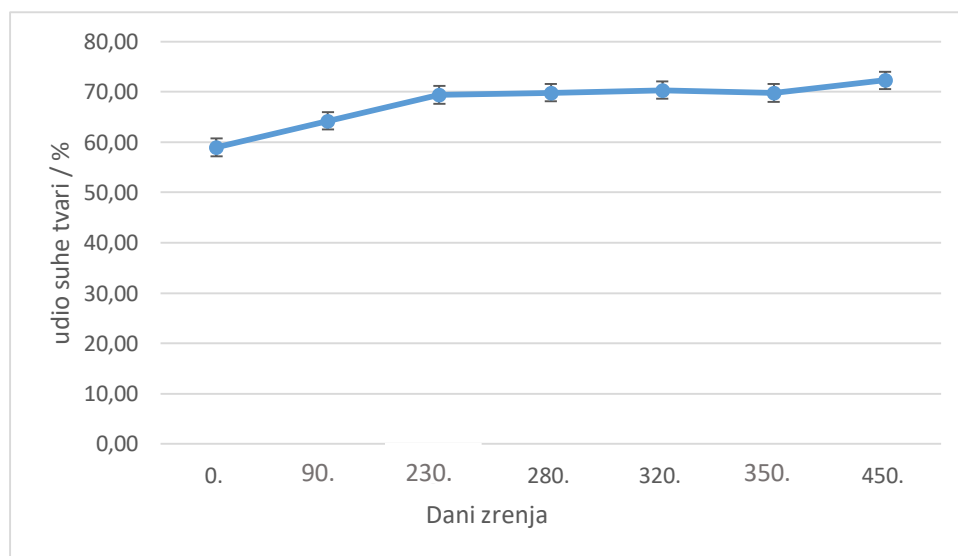
3.7. Određivanje pH-vrijednosti sira

pH-vrijednost sira određuje se s pH-metrom Mettler Toledo. Za svaki uzorak sira bilo je potrebno odstraniti koru i usitniti sir u ribalici za sir, na veličinu 15 mm \times 15 mm \times 15 mm. Instrument je prethodno umjeren korištenjem standarda: pH 4,01 i pH 7,00. Nakon završenog umjeravanja, staklena ubodna elektroda se uroni u uzorak te se očitava pH-vrijednost.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Fizikalno-kemijski sastav sira *Rici* tijekom zrenja

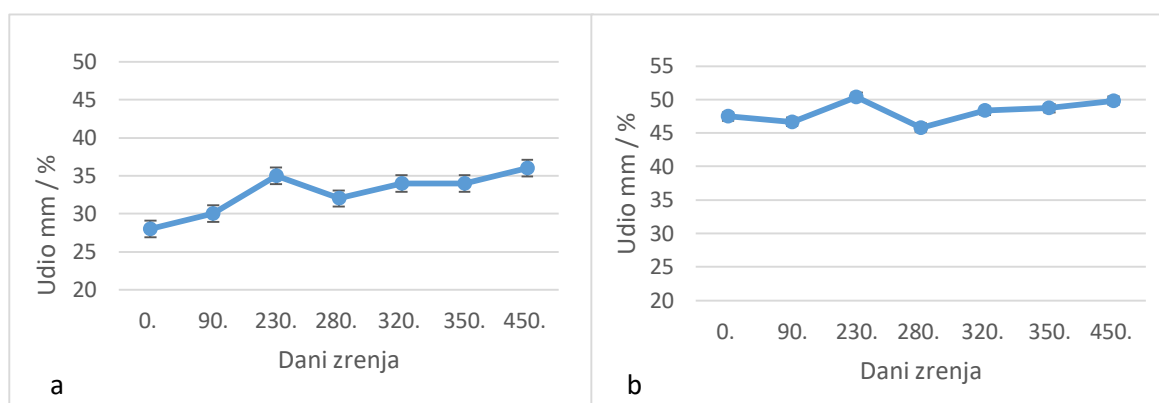
Na osnovu udjela vode u bezmasnoj suhoj tvari zrelog sira (44,34 %) i udjela masti u suhoj tvari (45,81 %), sir *Rici* pripada skupini ekstra tvrdog, punomasnog sira prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sira (2009.). Sir je okruglog oblika (slika 4), mase 7,5 kg te s obzirom na veličinu može ga se usporediti s drugim ekstra tvrdim sirevima kao što su *Parmigiano Reggiano*, *Parmesan* i *Grana Padano* (Gobbetti i Cagno, 2017). U usporedbi s drugim vrstama sira (npr. Vesnin kravljji sir) koji se proizvode od kravljeg mlijeka u sirani Vesna Lobarika, utvrđeno je da svi sirevi sadrže u prosjeku ~ 47 % masti, što je posljedica ujednačenog sastava skupnog mlijeka koje se otkupljuje od istih gospodarstava. Promjene udjela suhe tvari sira tijekom zrenja prikazane su na grafikonu 1.



Grafikon 1. Promjene udjela suhe tvari u siru tijekom zrenja

Na grafikonu 1 vidljiv je linearan porast udjela suhe tvari tijekom zrenja sira s iznosom od 58,95 % (0. dan zrenja) do 72,28 % (450. dan zrenja). Također, udio suhe tvari u siru tijekom zrenja sira *Rici* može se usporediti sa sličnim rezultatima za Paški i Krčki sir, iako su razlike neznatne. Prema Mikulec (2010.) mladi Krčki sir sadrži 54,29 % (≤ 60 %), a zreli 71,44 % (≥ 65 %) dok Antunac i Mikulec (2012.) navode da Paški sir sadrži od 63 – 75 % suhe tvari. Do povećanja udjela suhe tvari u siru dolazi zbog gubitka sirutke u prvoj fazi zrenja te vlage tijekom zrenja (grafikon 1).

Na temelju statističke obrade svih rezultata pomoću Microsoft Office Excell paketa (2016.) određen je značajan utjecaj ($P < 0,01 / 0,05$) pojedinog svojstva (suha tvar, mliječna mast i protein) za vrijeme trajanja zrenja u 100 g sira. Razina značajnosti izračunata je za ukupne analize svakog pojedinog parametra u odnosu na trajanje zrenja te nije bilo moguće odrediti utjecaj između pojedinih faza zrenja zbog količine uzorka ($n = 7$) za analize gdje je za različita faza zrenja izdvojen samo jedan sir. Kako bi se odredio utjecaj između pojedinih faza zrenja trebalo bi izdvojiti minimalno tri uzorka sira za svaku fazu zrenja. Nadalje, povećanjem suhe tvari u siru posljedično raste udio mliječne masti ($P < 0,01$) i proteina u 100 g sira ($P < 0,05$) iako udio proteina izražen na 100 g suhe tvari prikazuje smanjivanje smanjenje udjela (grafikon 2a) dok povećanje udjela mliječne masti u 100 g suhe tvari varira (grafikon 2b).



Grafikon 2a. Promjene udjela mliječne masti u siru tijekom zrenja

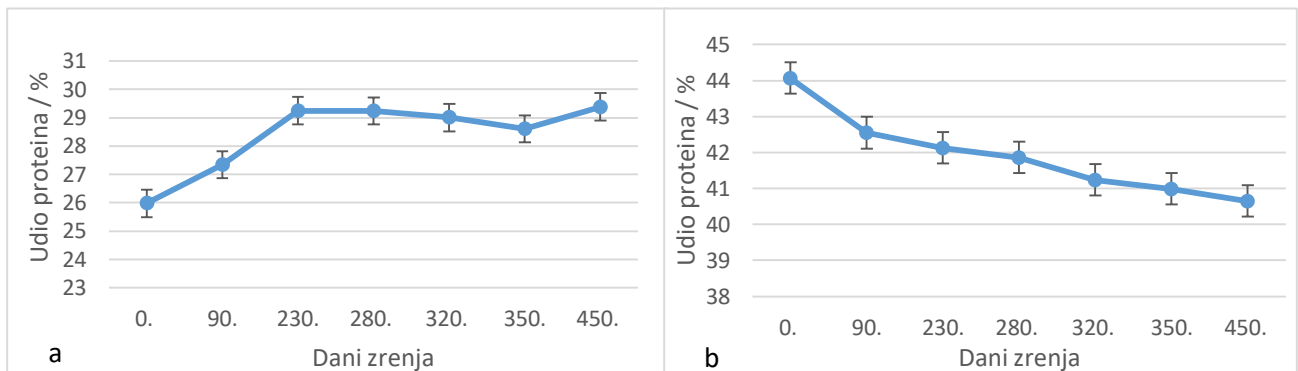
Grafikon 2b. Promjene udjela mliječne masti u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Grafikon 2a prikazuje udio mliječne masti u siru na početku zrenja (28 %) i na kraju zrenja (36 %), dok je u grafikonu 2b prikazan 47,50 % mliječne masti 0. dana zrenja te 49,81 % na kraju zrenja (450. dan). Kao i kod suhe tvari udio mliječne masti u siru *Rici* tijekom različitih faza zrenja može se usporediti s Paškim sirom koji sadrži ≥ 45 % mliječne masti u suhoj tvari (Barać i sur, 2008.; Antunac i Mikulec, 2012.; Oštarić i sur, 2015.) te Krčkim sirom koji sadrži od 29 do 41 % masti odnosno ~ 51 % masti u suhoj tvari sira (Mikulec, 2010.).

Nadalje, tijekom zrenja nema značajan utjecaj na količinu masti ($P > 0,05$) odnosno njihova promjena je prividna. Početni udio mliječne masti u mlijeku rezultirat će istim udjelom mliječne masti na kraju zrenja s obzirom da mliječna mast ne nastaje već se razgrađuje na masne kiseline, ali ukupna mast ostaje u početnoj količini. Mliječna mast ne podliježe većim količinskim promjenama te je relativno stabilan sastojak sira zbog inaktivacije prisutnih lipaza prethodnom

pasterizacijom mlijeka za sirenje. Dodatno se mogu provesti analize (plinska kromatografija) kako bi se odredila količina i veličina novonastalih masnih kiselina tijekom zrenja.

Jedan od glavnih procesa zrenja je proteoliza čiju razgradnju proteina kataliziraju enzimi proteaze koji potječu od sirovog mlijeka i mljekarskih kultura. Promjene količine proteina u 100 g sira i 100 g suhe tvari sira tijekom različitih faza zrenja, prikazane su na grafikonu 3a i 3b.



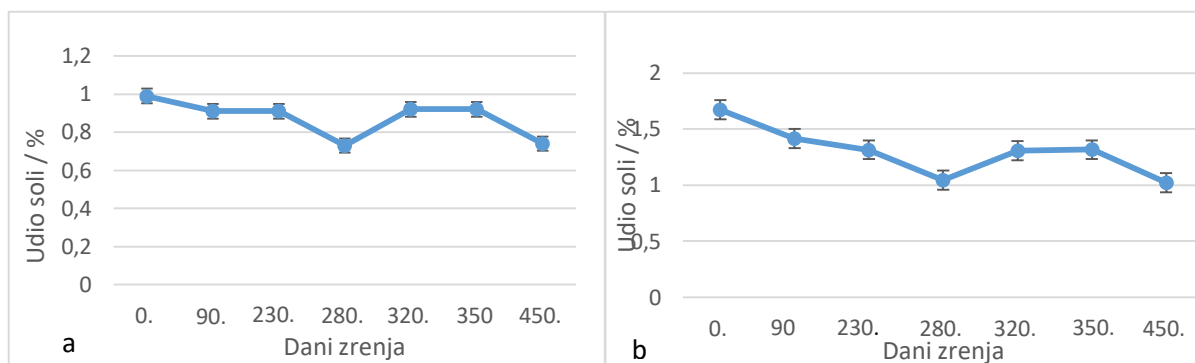
Grafikon 3a. Promjene udjela proteina u siru tijekom zrenja

Grafikon 3b. Promjene udjela proteina u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Grafikon 3a prikazuje porast udjela proteina u 100 g sira (25,98 % - 29,38 %) što je prethodno opisano i povećanjem količine suhe tvari u siru te određena je razina značajnosti ukupne količine proteina u odnosu na ukupno razdoblje zrenja ($P < 0,05$). Nadalje, grafikon 3b prikazuje pad količine proteina u 100 g suhe tvari sa 44,07% (0. dan) na 40,65% (450. dan). Dužim zrenjem smanjuje se udio proteina u suhoj tvari, a dolazi zbog izlučivanja djela topljivih sirutkinih proteina i peptida nastalih uslijed djelovanja peptidaza startera dodanih u mlijeko (Mikulec, 2010.; Summer i sur., 2017.). Kao starter kultura za proizvodnju sira *Rici* korišten je *Lactobacillus helveticus* koji zasigurno utječe na tijek proteolitičkih promjena tijekom zrenja. Kroz cijeli period zrenja vidljivo je smanjivanje udjela proteina u suhoj tvari, a očiti prikaz istog je u vremenu 0. dana zrenja do 90. dana (grafikon 3b). Proteolizom nastaju pojedini spojevi kao što su polipeptidi, peptidi, aminokiseline te ostali spojevi koji u sebi sadrže dušik, a formiraju okus sira (Kirin, 2016.).

U suvremenom sirarstvu sir se najčešće soli u salamuri zbog svoje mogućnosti upravljanja, racionalnosti te učinkovitosti. Svrha soljenja sira je konzerviranje i sušenje sira što uključuje i zaustavljanje aktivnosti dodanih kultura te formiranje okusa (Havranek i sur., 2014.). Za soljenje se koristi sol natrijev klorid (NaCl) otopljena u vodi kao otapalu

odgovarajućih omjera. Omjeri se određuju prema vrsti sira i željenim senzorskim svojstvima istog. Prikaz promjene udjela soli u siru i u 100 g suhe tvari tijekom zrenja prikazane su grafikonom 4a i 4b.



Grafikon 4a. Promjene udjela soli u siru tijekom zrenja

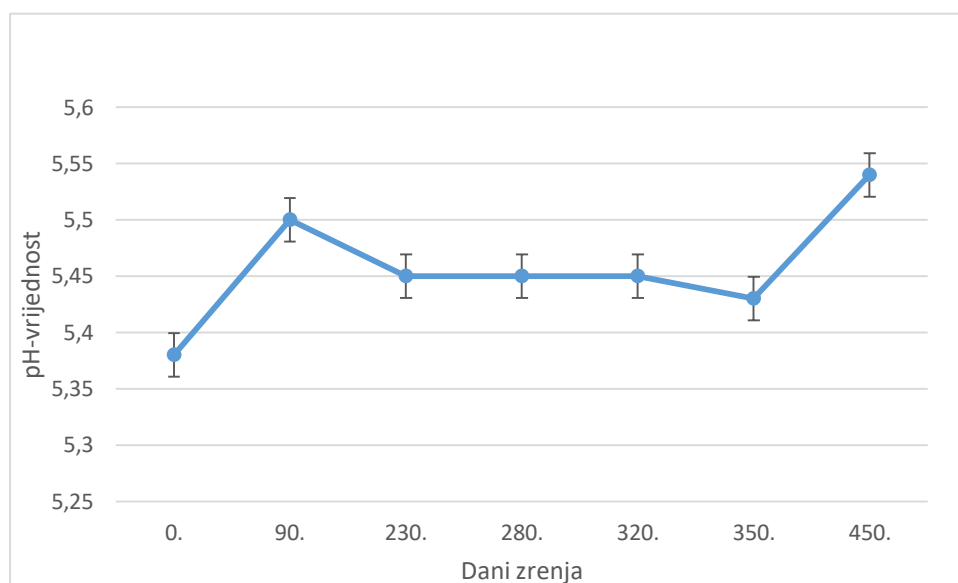
Grafikon 4b. Promjene udjela soli u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Sir *Rici* soli se u salamuri, temperature 15 °C, pH-vrijednosti 5,0 i slanosti 17 °Be, a udio soli u 100 g sira i udio soli u suhoj tvari sira tijekom zrenja prikazan je u grafikonu 4a i 4b. Na kraju zrenja utvrđeno je smanjenje koncentracije soli u siru što je posljedica gubitka vlage u siru a time i dijela otopljene soli. Usporedbe radi, ekstra tvrdi sir *Parmigiano Reggiano* sadrži na kraju zrenja (10 mjeseci) prema navodima Gobbetti i Cagno (2017.) sličnu količinu soli kao i sir *Rici*, što je rezultat sličnosti u tehnološkom postupku proizvodnje. Povećanje količine soli u siru tijekom zrenja može biti posljedica brisanja sira s otopinom soli u cilju sprječavanja razvoja plijesni na površini. Pri kraju zrenja količina soli se smanjuje do količine koja je bila utvrđena u mladom siru što je posljedica isparavanja vode u kojoj se nalazi sol. Također, i u ekstra tvrdom siru *Västerbottensost*, koji je držan u salamuri tri dana, Hartmann i sur. (2018.) navode sličnu količinu soli kao i u siru *Rici*.

Povećanje količine soli u siru tijekom zrenja može se objasniti kao posljedica brisanja sireva s krpom umočenom u otopinu soli kako bi se uklonila moguća nastala plijesan. Također, prema kraju zrenja udio soli se smanjuje malo ispod početne količine soli u mladom siru kao posljedica isparavanja preostale vode u kojoj se nalazi sol. Osim kod *Parmigiano Reggiano* sira, količina soli u siru *Rici* slična je i u švedskom siru *Västerbottensost* koji se također soli u salamuri tijekom tri dana (Hartmann i sur., 2018.).

Utjecaj zrenja praćen je i određivanjem pH-vrijednosti sira. Kod ovog parametra bilo je moguće izračunati i značajnost u svim fazama zrenja s obzirom na činjenicu da su sve analize

odrađivane u triplikatu. Na grafikonu 5 prikazane su promjene pH-vrijednosti sira u različitim fazama zrenja.



Grafikon 5. Promjene pH-vrijednosti sira tijekom zrenja

Prosječna pH-vrijednost sira *Rici* tijekom zrenja od 24 mjeseca iznosi 5,4, što je slična vrijednost za argentinski sir *Reggianito* (Wolf i sur., 2010). Slične pH-vrijednosti navode i Gobbetti i Cagno (2017.) za ekstra tvrde sireve kao što su *Parmigiano Reggiano*, *Asiago*, *Montasio* i dr. Određena je značajna razlika ($P < 0,01$) pH-vrijednosti te je model opisan približno 99 % odnosno koeficijent determinacije (R^2) iznosi 98,99 % čime ukazuje na dobro opisan model. Također, utvrđene su međusobne značajne razlike za pH-vrijednosti između određenih dana zrenja (0., 90., 350., 450.) dok kod 230., 280. i 320. nisu utvrđene međusobne značajne razlike iako su različite u odnosu na ostale dane zrenja. Povećanje pH-vrijednosti na kraju zrenja može biti posljedica stvaranja slobodnih amino skupina.

4.2. Određivanje ukupnog dušika u vodenom ekstraktu sira

Voda je najčešće otapalo koje se koristi za ekstrakciju peptida/aminokiselina iz sira. Vodeni ekstrakti sira pripremljeni su prema opisanoj metodi (poglavlje 3.5.), a u tablici 4 prikazan je utjecaj trajanja zrenja na količinu dušika (N) u siru i količinu N u vodenom ekstraktu sira. Vodeni ekstrakti sira sadrže veliki broj većih i manjih lanaca peptida/aminokiselina i njihovih razgradnih produkata, organske kiseline i njihovih soli te hlapljive lipofilne sastojke

koji su djelomično topljivi u vodi (Mikulec, 2010.). Uz prisustvo prirodnih proteaza dio kazeina i većih peptida se razgrađuje na manje produkte topljive u vodi zbog čega dolazi do povećanja organskog dušika u vodenom ekstraktu sira tijekom zrenja. Dodatno, tijekom dužeg zrenja otpušta se i vezana voda u kojoj su topljivi manji peptidi i ostali spojevi koji sadrže dušik, također vidljiv je porast organskog dušika (De Angelis Curtis i sur., 2000.). Smanjivanje količine većih peptida i kazeina obrnuto proporcionalan je nastanku manjih peptida te slobodnih aminokiselina.

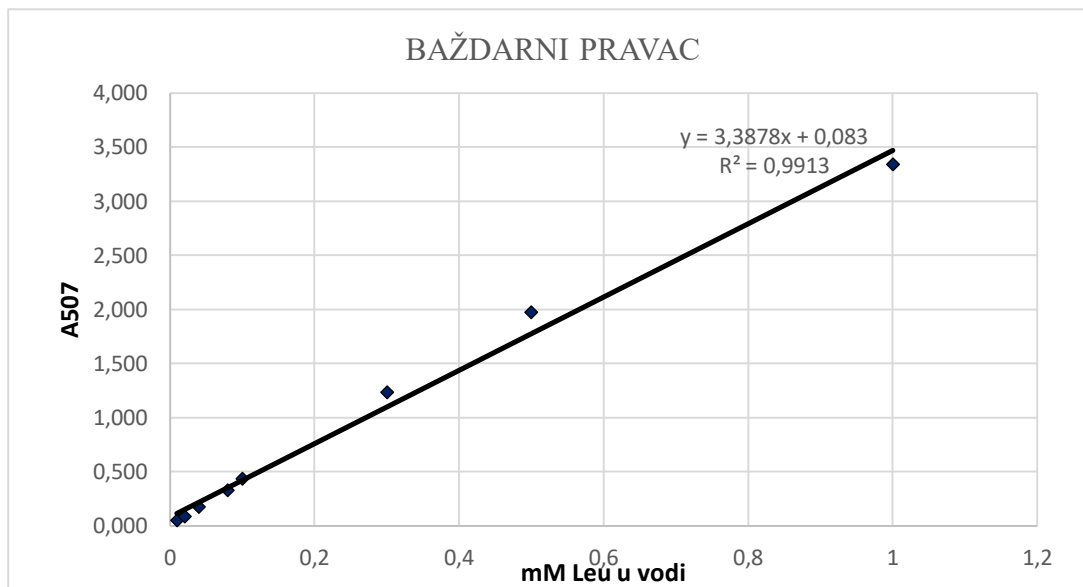
Tablica 4. Utjecaj zrenja na sadržaj tvari koje sadrže dušik u 100 g sira

Uzorak	Dan zrenja	Datum proizvodnje	Ukupni dušik (g)	Ukupni N (g) u vodenom ekstraktu	Vodom ekstrahirani N (%)
1	0.	14.09.2019.	4,07	0,32	7,86
2	90.	13.12.2019.	4,29	0,85	19,81
3	230.	25.03.2020.	4,58	0,85	18,56
4	280.	25.04.2020.	4,58	0,84	18,34
5	320.	04.06.2020.	4,55	1,12	24,62
6	350.	22.07.2020.	4,48	0,80	17,86
7	450.	31.01.2021.	4,61	0,92	19,96

Tijekom zrenja povećavala se količina ukupnog dušika kao posljedica razgradnje većih peptida i kazeina. Vidljivo je kako na početku zrenja (0. dan) u vodenom ekstraktu 100 g sira ima 4,07 g organskog dušika što je 7,86 % ukupnog dušika u 100 g sira, a na kraju zrenja povećava se do 4,61 g odnosno 19,96 %. Kao posljedica sporije razgradnje proteina na slobodne aminokiseline i manje peptide u odnosu na druge vrste ekstra tvrdih sireva, može biti zbog niže pH-vrijednosti te također i količina soli koja djeluje inhibitorски, ali paralelno otpušta i vezanu vodu te što je vidljivo na grafikonu 4b i u tablici 4, 320. dana zrenja (uzorak 5). Količina vodom ekstrahiranog dušika u odnosu na ukupni dušik na kraju zrenja kod sira *Rici* je zanemarivo niža u odnosu *Canestrato Pugliese* sir proizvedenog od ovčjeg mlijeka čiji se interval kreće od 13 – 30 %, ali jednako tako niža u odnosu na Krčki sir također proizveden od ovčjeg mlijeka (Mikulec, 2010.). U odnosu na sir *Parmigiano Reggiano*, sir *Rici* sadrži niži udio vodom ekstrahiranog dušika (Gobbetti i Cagno, 2017.).

4.3. Određivanje slobodnih amino skupina

Uz određivanje ukupnog dušika metodom po Kjeldahlu (tablica 4) korištena je i metoda određivanja ukupnih slobodnih amino skupina, koje se oslobađaju zrenjem kao rezultat hidrolize peptidnog veza proteina/peptida (Mayer i sur., 1998.). Prema Mikulec (2010.) njihovim određivanjem može se promatrati napredak proteolize tijekom zrenja. Slobodne amino skupine analizirane su pomoću aminokiseline leucina koja je referentna aminokiselina za određivanje količine ukupnih amino skupina te je izrađen baždarni pravac (poglavlje 3.5.). Na grafikonu 6 prikazan je baždarni pravac ovisnosti koncentracije leucina i apsorpcije svjetla valne duljine 507 nm te su prikazani jednadžba pravca i koeficijent determinacije ($\approx 100\%$).



Grafikon 6. Ovisnost koncentracije leucina i apsorpcije svjetla valne duljine 507 nm

*y-os: apsorpcija svjetla pri valnoj duljini 507nm

x-os: koncentracija leucina u vodi izražena u mM

Sadržaj slobodnih amino skupina izražen je kao NH_2 – dušik u 100 g sira kao i udio NH_2 – dušika u odnosu na ukupni N u 100 g sira (tablica 5).

Tablica 5. Koncentracije slobodnih aminokiselina (izraženih kao g Leu u 100 g suhe tvari sira i mg Leu u 100 g sira) u različitim fazama zrenja

Uzorak	Dani zrenja	Datum proizvodnje	Količina NH ₂ -dušika (mg) u vodenom ekstraktu sira ($\bar{x} \pm S.D.*$)	g NH ₂ -dušika / 100 g suhe tvari ($\bar{x} \pm S.D.*$)	Količina NH ₂ -dušika u vodenom ekstraktu sira u odnosu na ukupni N (%) u siru
1	0.	14.09.2019.	1,74±5,22	0,01 ^a ±0,01	0,04
2	90.	13.12.2019.	955,84±48,74	1,49 ^b ±0,08	22,28
3	230.	25.03.2020.	1198,91±62,84	1,73 ^b ±0,09	26,18
4	280.	25.04.2020.	1488,54±124,51	2,14 ^c ±0,18	32,50
5	320.	04.06.2020.	1422,33±196,46	2,18 ^c ±0,28	31,26
6	350.	22.07.2020.	1789,31±324,92	2,45 ^d ±0,47	39,94
7	450.	31.01.2021.	1820,00±112,65	2,54 ^d ±0,16	39,48

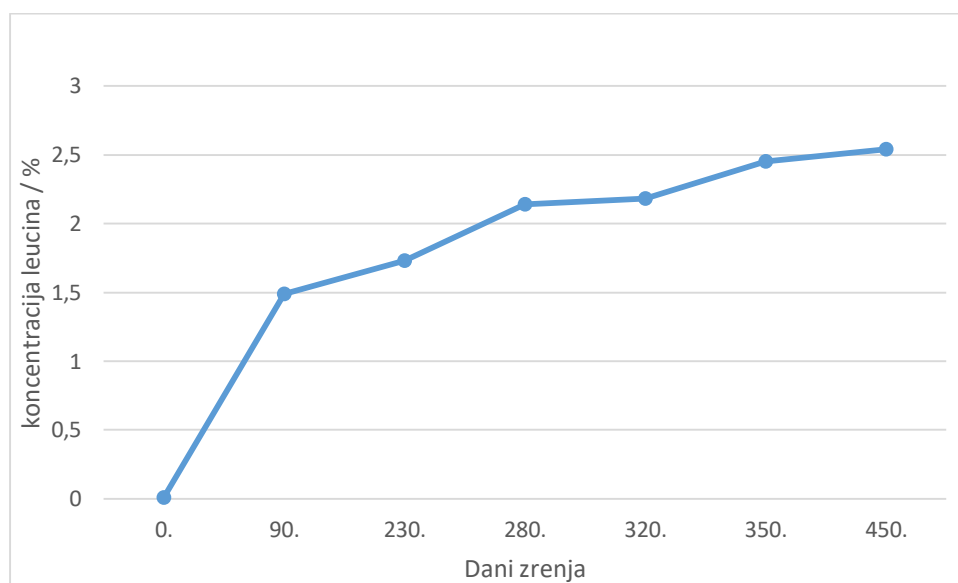
* $\bar{x} \pm S.D.$ – srednja vrijednost od 4 određivanja sa standardnom devijacijom

^{a, b, c, d} srednje vrijednosti u istoj koloni tablice s različitim oznakama značajno se razlikuju: ** $P < 0,01$

Dušične tvari topljive u vodi nastaju djelovanjem sirila, starter kulture te manjim dijelom peptidaza mlijeka (Kalit i sur., 2005.). Također na utjecaj nastanka količine slobodnih amino skupina ima korištena starter kultura, a koristi se kod gotovo svih vrsta ekstra tvrdih sireva tako i u proizvodnji sira *Rici* te je na grafikonu 8 vidljiv utjecaj bakterije *Lactobacillus helveticus* i nastanak manjih peptida odnosno slobodnih amino skupina tijekom dužeg zrenja što i u svom radu navode Summer i sur., (2017.). Prema podacima dobivenim 0. dana ekstrahira ukupno 7,86 % (tablica 4) prisutnog organskog dušika u siru, taj postotak za dušik u NH₂ skupinama iznosi 0,04 %, a na kraju zrenja iznosi 19,96 % odnosno 39,48 %, što ukazuje na povećanje količine slobodnih amino skupina u odnosu na polipeptide. Usporedbom udjela dušika u vodenom ekstraktu sira *Rici* s Krčkim sirom vidljiva je znatna razlika. Tako u 90. danu za Krčki sir (Mikulec, 2010.) udio iznosi 139 mg (OPG A) odnosno 156 mg (OPG B) dok analizom sira *Rici* utvrđeno je 955,84 mg uz standardnu devijaciju 48,74. Ovoliko odstupanje može se objasniti i većim udjelom proteina u siru *Rici* u odnosu na Krčki sir (poglavlje 4.1.) te korišteno mlijeko (kravlje/ovčje). Dodatno, tijekom zrenja sira *Rici* može nastati veći udio slobodnog dušika zbog intenzivnije proteolize u odnosu na Krčki sir iako je to potrebno dodatno istražiti odgovarajućim analizama.

Statističkom obradom rezultata u SAS programu (1999.) (Tukey provjerom) određena je razina značajnosti između pojedinog vremena zrenja i količine slobodnih amino skupina te

je modelom opisano 93,76 % što ukazuje na prihvatljiv model te statistički značajan utjecaj ($P < 0,01$). Također, zbog dovoljne količine uzoraka (n) određen je međusobni utjecaj pojedinih mjerenja u odnosu na tijek zrenja. Tablicom 5 prikazano je kako su pojedini dani zrenja statistički značajno različiti ($P < 0,01$). Shodno tomu, trajanje zrenja u razdoblju od 230., 320. i 450. dana nemaju međusobno značajan utjecaj, ali je vidljiv značajan utjecaj u odnosu na ostala razdoblja zrenja (0., 90., 280. i 350.) ($P < 0,01$). Na grafikonu 8 prikazan je porast ukupnih slobodnih amino skupina izraženih kao udio leucina u 100 g suhe tvari sira.



Grafikon 7. Porast ukupnih amino skupina izraženih kao koncentracija leucina u 100 g suhe tvari

Od 0. do 90. dana vidljiv je eksponencijalni porast koncentracije slobodnih aminokiselina te ukazuje na nastanak manjih peptida odnosno hidrolize peptidnih lanaca. Tijekom ostatka zrenja vidljiv je blagi porast količine slobodnih amino skupina koje također ukazuju na stvaranje manjih peptida kao i napredak tijeka proteolize tijekom dužeg zrenja te nastanka spojeva koji tvore aromu u siru. Pavia i sur. (2000.) navode kako se ova metoda može koristiti za određivanje stupnja zrelosti sira *Manchego*, te zamijeniti metodu po Kjeldahlu. Tijekom zrenja od 0. do 90. dana (grafikon 7), vidljiv je porast koncentracije slobodnih amino skupina u prosjeku od 50 % od ukupnog porasta tijekom zrenja te pri kraju zrenja porast koncentracije slobodnih amino skupina je također vidljiv, ali u znatno manjoj mjeri nego na početku. Njihova koncentracija prati napredak proteolize tijekom zrenja.

4.4. Senzorska analiza

Tablica 6 prikazuje ocjene za pojedine karakteristike sira koje se ocjenjuju prema *Pravilniku za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004)*. Sireve tijekom zrenja ocijenilo je stručno povjerenstvo od 5 članova te je na temelju ocjena za različita svojstva (izgled, boja, struktura tijesta, prerez, miris i okus) usvojena konačna ocjena za sir u različitoj fazi zrenja. U tablici 6 sirevi su rangirani prema stupnju zrelosti.

Tablica 6. Ocjena senzorske kvalitete ekstra tvrdog sira Rici

Datum proizvodnje	Uzorak	Izgled	Boja	Struktura	Prerez	Miris	Okus	Ukupan broj bodova
				tijesta				
Postignuti broj bodova								
14.09.2019.	1	2	1	1,75	3	2	9,75	19,50
13.12.2019.	2	2	1	2	3	2	9,75	19,75
25.03.2020.	3	2	0,75	1,5	2,75	2	8,75	17,75
25.04.2020.	4	2	1	2	3	2	9,5	19,50
04.06.2020.	5	2	1	1,75	3	2	9,5	19,25
22.07.2020.	6	2	0,75	1,75	2,75	2	9,5	18,75
31.01.2021.	7	2	1	1,75	2,75	2	9,5	19,00

Svih 7 uzoraka sira ocijenjeni su s maksimalnim brojem bodova za vanjski izgled i miris. U dva uzorka sira primijećena je neujednačena boja koja je posljedica neravnomjerne raspodjele vlage tijekom zrenja sira. Sirevi s oznakama 2 i 4 ocijenjeni su s maksimalnim brojem bodova za strukturu tijesta dok su ostali uzorci sira ocijenjeni s nešto nižim brojem bodova (od 1,5 do 1,75). Prerez je za 4 uzorka sira ocijenjen s maksimalnim brojem bodova (3), dok su tri uzorka ocijenjena s neznatno nižim brojem bodova (2,75) zbog nepravilnosti u formiranju i raspodjeli sirnih očiju. Treba istaknuti da sirevi nisu dostavljeni na analizu u svom izvornom obliku već kao isječak od svakog pojedinog sira, što se odrazilo i na pojedine ocjenjivane parametre sira.



Slika 5. Prerez sira Rici nakon 8 mjeseci zrenja

Sir s oznakom 1 ocijenjen je s ukupno 19,25 bodova od maksimalno 20 mogućih, budući su utvrđene manje pogreške strukture sirnoga tijesta i okusa. Sir je imao premekano sirno tijesto što je posljedica izostanka zrenja sira (0. dan zrenja te je bilo za očekivati mekaniju strukturu tijesta). Također, uzorak nije bio dovoljno slan s obzirom da je netom prije bio u salamuri.

Sir s oznakom 2 ocijenjen je s ukupno 19,75 bodova zbog utvrđenih pogrešaka okusa (blago gorak, nedovoljno slan). Tijekom zrenja dolazi do proteolitičkih procesa i mogućeg stvaranja nepoželjnih aromatskih tvari. Na grafikonu 7 vidljivo je značajno povećanje koncentracije slobodnih aminokiselina (gotovo 50 % od ukupnog porasta) te je moguće nastajanje nepoželjnih aroma. Dodatnim analizama bi se moglo utvrditi koje slobodne aminokiseline nastaju, a dovode do pogreške okusa.

Sir s oznakom 3 ocijenjen je s najnižim ukupnim brojem bodova (17,75 od maksimalno 20 mogućih), čime svakako ukazuje na potrebu dužeg zrenja sira. Pogreške se odnose na strukturu sirnoga tijesta koja je bila previše mekana i elastična te na prerez sira na kojem su utvrđene rupice nepravilne raspodjele i veličine. Dodatno, utvrđene su pogreške okusa (blago gorak, kiseli, neharmoničan okus), nakon 8 mjeseci zrenja što može biti rezultat proteolize odnosno nastanka tvari arome (grafikon 7). Provedenim analizama je vidljivo kako se izmjereni rezultati ne razlikuju značajno od rezultat utvrđenih za sir s oznakom 2, ali senzorska svojstva sira s oznakom 3 bila su ocijenjena s manjim ukupnim brojem bodova (slika 5), što može biti posljedica ne osiguravanja optimalnih mikroklimatskih uvjeta tijekom zrenja sira.



Slika 6. Prerez sira Rici nakon 9,5 mjeseci zrenja

Nakon 9,5 mjeseci zrenja senzorska kvaliteta sira ocijenjena je s ukupno 19,5 bodova od maksimalno 20 mogućih. Zannoni (2010.) navodi kako sir *Parmigiano Reggiano* posjeduje slične karakteristike nakon 10 mjeseci zrenja. Sir je imao harmoničan okus s dobro izraženom aromom, dobrom strukturom sirnog tijesta i kristalićima koji nastaju od tirozina i mliječne kiseline. Boja sira je jednolična te je kora sira tanka (slika 6). D’Incecco i sur. (2020.) u svom istraživanju navode da boja sira mora biti jednolična jer je ona važna karakteristika određenog proizvoda. Također, Zannoni (2010.) ukazuje na nijanse boje sira *Parmigiano Reggiano* tijekom godina te se boja sira može usporediti s uzorkom sira *Rici*. Prethodnim analizama utvrđeno je kako uzorak 4 sadrži optimalne udjele masti i proteina odnosno soli koji pridonose aromi sira.



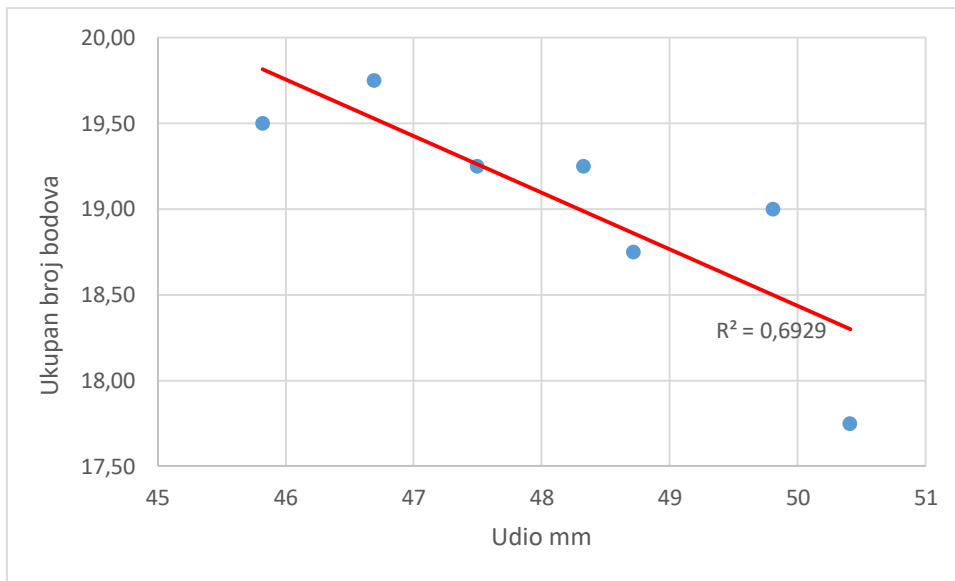
Slika 7. Prerez sira Rici nakon 10 mjeseci zrenja

Sir s oznakom 5 (slika 7) ocijenjen je s ukupno 19,25 bodova. Dužim zrenjem boja postaje sve izraženija u odnosu na ostale sireve, te je izražen slani okus sira (grafikon 4a i b). Obzirom na dužinu zrenja okus je nedovoljno izražen iako se mjestimice osjeti okus po karameli što može biti posljedica proteolize odnosno stvaranja aroma tvari kako navodi Tagliazucchi i sur. (2020.). Nastajanje tirozina je izostalo. Dodatnim analizama mogle bi se odrediti aminokiseline koje su odgovorne za nastajanje karameliziranog okusa. Također, dolazi do problema diskoloracije sira kao posljedica neravnomjerne količine soli odnosno vode. Na grafikonu 4 vidljivo je naglo povećanje koncentracije soli u siru, što je najvjerojatnije posljedica prekomjernog brisanja sira sa slanom otopinom u cilju sprječavanja razvoja plijesni. Sir s oznakom 6 ostvario je ukupno 18,75 bodova. Utvrđene su pogreške boje (blijeda, nedovoljno izražena) i okusa (prazan okus, nedovoljno izražen,..). Sir s oznakom 7 ocijenjen je s ukupno 19 bodova od maksimalno 20 mogućih. Sir nije imao izraženu aromu u dovoljnoj mjeri, budući se radi o siru koji je bio na zrenju 15 mjeseci. Također je zapažena i blaga gorčina okusa sira.

Uzevši u obzir sve promatrane parametre, sir s oznakom 4 je odabran kao sir s optimalnim karakteristikama i optimalnom zrelošću. Izgledom i okusom ukazuje na optimalno zrenje sira *Rici* te je duže zrenje nepotrebno, jer može dovesti i do formiranja nepoželjnih aroma u siru, što se može utvrditi dodatnim analizama. Također, proizvođač navodi kako je minimalno zrenje sira 10 mjeseci. U poglavlju Tehnologija proizvodnje, opisana su senzorska svojstva sira *Rici*, te je vidljivo kako i sir s oznakom 7 odgovara očekivanim karakteristikama zrelog sira. Unatoč tome, za što objektivnije i pouzdanije ocjenjivanje pojedinih senzorskih svojstava sira, nužno je imati na raspolaganju veći broj uzoraka sira za analizu.

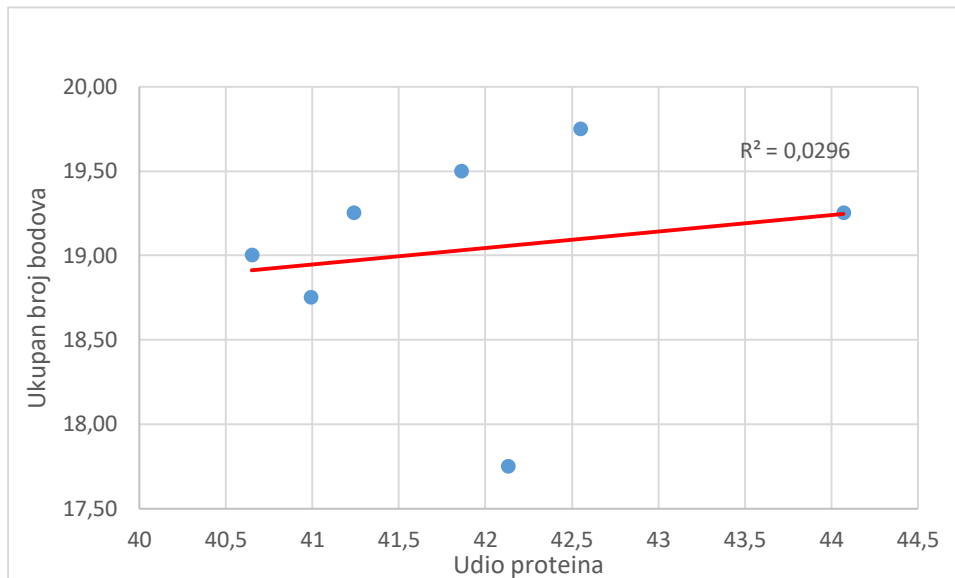
4.5. Utjecaj zrenja na senzorsku kvalitetu sira i pojedinih fizikalno-kemijskih parametara

Nakon prikaza fizikalno-kemijskih parametara i senzorskih svojstva sireva, potrebno je odrediti regresijske krivulje pojedinih parametara u različitoj fazi zrenja. Regresijska krivulja određena je u Excell Office paketu (2016.) i prikazana je na grafikonu 8.



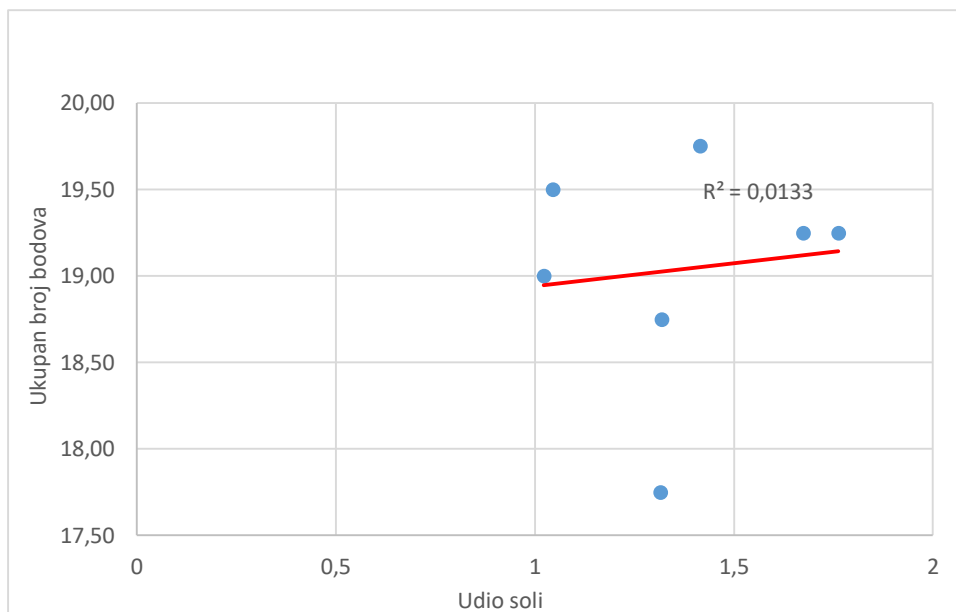
Grafikon 8. Ovisnost udjela masti i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 8 prikazuje ovisnost udjela masti i senzorske kvalitete sira izražene ukupnim brojem bodova za koju je utvrđen značajan utjecaj ($P < 0,05$). Tijekom zrenja može doći do nastajanja nepoželjnog okusa sira uslijed promjena mliječne masti (užeglost), ukoliko nisu osigurani optimalni mikroklimatski uvjeti u zrionici. Utjecaj masti na okus sira detaljnije je opisan u poglavlju 4.4. Modelom je objašnjeno 70 % varijabilnosti te ukazuje na prihvatljiv model iako većim brojem uzoraka se može utjecati na poboljšanje rezultata i točnije usporedbe.



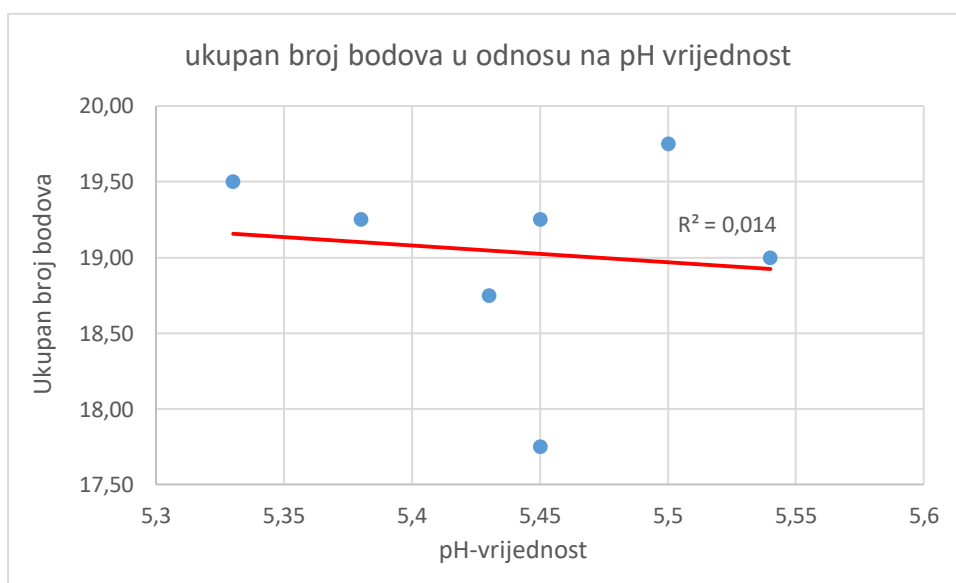
Grafikon 9. Ovisnost udjela proteina i senzorske kvalitete bodova sira Rici

Modelom je opisano svega 0,03 % varijabilnosti te regresija nije bila značajna ($P > 0,05$). Na grafikonu 9 prikazana je ovisnost udjela proteina i senzorske kvalitete sira izražene ukupnim brojem bodova, za koju nije utvrđen značajan utjecaj ($P > 0,05$). S obzirom da iz proteina nastaju kratki peptidi i slobodne aminokiseline koje su odgovorne za aromatske spojeve u siru, očekivan je značajan utjecaj proteina na ukupan broj bodova, međutim model ukazuje na suprotno. Također, u grafikonu 9 vidljivo je mnogo ekstremnih rezultata zbog kojih dolazi do velikih odstupanja pravca odnosno modela. Na točniju procjenu modela moglo bi se utjecat izbacivanjem ekstremnih podataka, ali se dobiva premali broj uzorka te bi to moglo imati za posljedicu loše određenu regresiju. Kao rješenje problema odnosno određivanje točnijeg pravca potrebno je imati veći broj uzoraka.



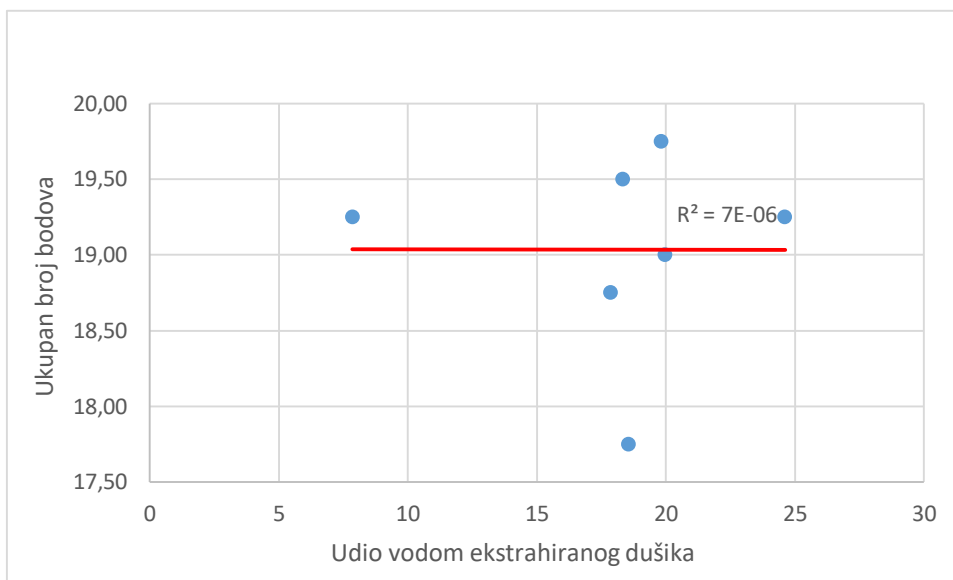
Grafikon 10. Ovisnost udjela soli i senzorske kvalitete sira Ricci

Iako je utjecaj soli jasno izražen na senzorne osobine sira kao i njen varijabilan udio tijekom zrenja koji je određen analizom, određivanjem regresije i koeficijenta determinacije opisano je 0,01% modela što ukazuje na 'loš' model. Pri tome se misli kako su neka opažanja 'loša' to jest opažanja koja su neuobičajeno ekstremna kao što je uzorak 3 (ukupan broj bodova 17,75). Također, ekstremni podatci mogu dovesti do krive procjene regresijske krivulje te time utjecati na točnost rezultata. Potrebno je imati na raspolaganju veći broj uzoraka kako bi model imao smisla te bi se mogao odrediti što prihvatljiviji model.



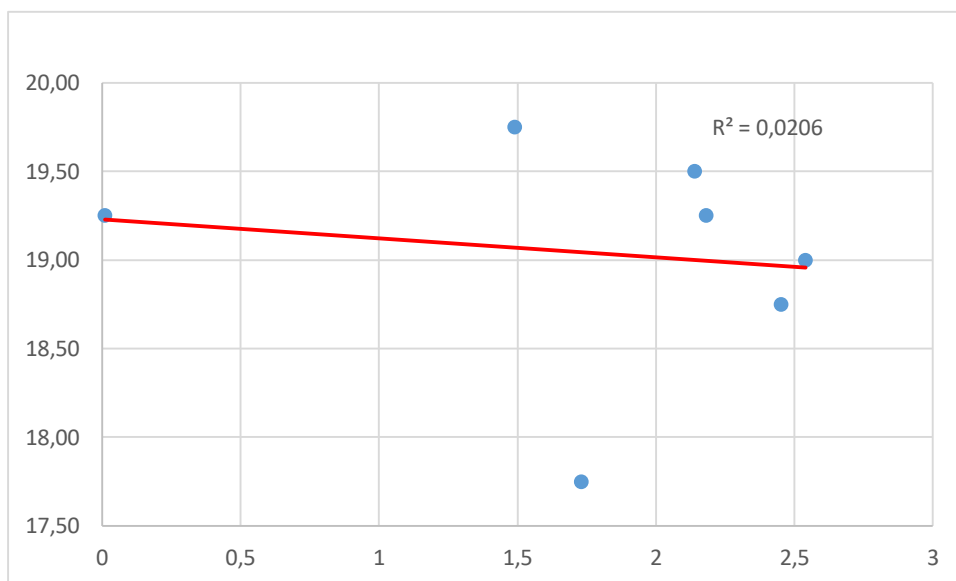
Grafikon 11. Ovisnost pH-vrijednosti i senzorske kvalitete

Grafikonom je prikazan 'loš' model (R^2) te negativna regresija. Naziv 'loš' model proizlazi iz koeficijenta determinacije gdje je modelom opisano 0,01% od ukupne varijabilnosti. Vidljiv je ekstremni podatak (uzorak 3) koji bi trebao biti izuzet iz analize kako bi model bio što precizniji i točniji te također potreban veći broj uzoraka.



Grafikon 12. Ovisnost vodom ekstrahiranog dušika i senzorske kvalitete sira Rici

U grafikonu 12 modelom regresija nije jasno utvrđena te je uz korištenje ovih podataka nemoguće odrediti ovisnost vodom ekstrahiranog dušika i ukupnog broja bodova.



Grafikon 13. Ovisnost NH₂-dušika i senzorske kvalitete sira Rici

Nastajanjem slobodnih amino skupina tijekom zrenja pokazatelj je i stvaranja tvari arome od kojih se očekuje kako imaju utjecaj na okus sira tijekom zrenja kao i na kraju zrenja. Međutim, prikazanim grafikonom 13 vidljiva je negativna regresija te da nema značajnijeg utjecaja na ukupan broj bodova. Nadalje, ekstremni podatci utječu na točnost modela i procjenu tog istog modela iako je u prethodnom poglavlju jasno vidljiv utjecaj na aromu sira tijekom zrenja.

5. Zaključak

1. Sir *Rici* pripada skupini ekstra tvrdog i punomasnog sira.
2. Količina ukupnog topljivog organskog N u vodenom ekstraktu sira od 0. do 120. dana povećala se za 2,9 dok se količina slobodnih amino skupina (NH_2) povećala za faktor 987 te se može zaključiti da je proteoliza sira *Rici* puno intenzivnija u odnosu na ostale sireve te skupine. Međutim, za ispravnije rezultate trebala bi se provesti detaljna analiza proteolize odgovarajućim metodama i utvrditi brzinu nastanka slobodnih amino skupina.
3. Temeljem količine slobodnih amino skupina (NH_2) i topljivog N iz slobodnih NH_2 skupina može se zaključiti kako nastaje više malih peptida i aminokiselina tijekom zrenja te se količina postupno povećava što ukazuje na intenzivnu proteolizu u siru *Rici*.
4. Tijekom zrenja od 10 mjeseci utvrđena su najbolja senzorska svojstva sira *Rici*.
5. Određivanjem regresijskog pravca utvrđeno je kako niti jedan kemijsko-fizikalni parametar nema značajan utjecaj na senzorska svojstva.
6. Na konačnu ocjenu senzorske kvalitete utječe nedovoljna količina uzorka te moguća subjektivnost u ocjenjivanju istih. Za što bolju interpretaciju rezultata potrebno je prikupiti veći broj uzoraka te uzeti u obzir više parametara.

6. Literatura

1. Antunac, N., Mikulec, N. (2018). Senzorsko ocjenjivanje sireva i sirutke. U: Senzorska svojstva mlijeka i mliječnih proizvoda. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb, 104-141.
2. AOAC (2000). Chloride (Total) in Cheese Volhard Method.
3. Barać, Z., Mioč, B., Lukač Havranek, J., Samaržija, D.(2008.): Paška ovca, hrvatska izvorna pasmina. Novalja.
4. D’Incecco, P., Limbo, S., Hogenboom, J., Rosi, V., Gobbi, S., Pellegrino, L. (2020). Impact of extending hard-cheese ripening: A multiparameter characterization of Parmigiano Reggiano cheese ripened up to 50 months. *Foods*. 9 (3), 2-18. <https://doi.org/10.3390/foods9030268>
5. De Angelis Curtis, S., Curini, R., Delfini, M., Brosio, E., D’Ascenzo, F., Bocca, B. (2000). Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: A NMR study. *Food Chemistry*. 71 (4), 495-502. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00192-8)
6. FIL-IDF (1997). Sensory evaluation of dairy products by scoring. Reference method. 99C. International Dairy Federation. Brussels, Belgija.
7. Folkertsma, B., Fox, P. F. (1992). Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*. 59, 217-224.
8. Gobbetti, M., Cagno, R. Di (2017). Extra-Hard Varieties. U: Cheese Fourth Edition. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00032-6>
9. Guinee, T. P., O’Callaghan, D. J. (2010). Control and Prediction of Quality Characteristics in the Manufacture and Ripening of Cheese. U: Technology of cheesemaking (Law Barry, A.), second edition, 260-330.
10. Harbutt, J. (2008). World cheese book. DK Publishing, SAD.
11. Hartmann, K., Licitra, G., Meier, E. E. (2018). Allgäu Mountain Cheese – Germany. 204-246.
12. Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014). Zrenje sira. U: Sirarstvo. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 107-138.
13. Hill, A. (2000). Technology of Cheesemaking. U: *Food Research International*. 33 (9), 807-808. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(00\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(00)00083-1)
14. HRN EN ISO (2008). Sir i topljeni sir -- Određivanje sadržaja suhe tvari (Referentna metoda). Hrvatski zavod za norme. Zagreb.

15. HRN EN ISO (2014). Mlijeko - Određivanje sadržaja dušika - 1. dio: Kjeldahlovo načelo i izračunavanje sirovih proteina. Hrvatski zavod za norme. Zagreb.
16. HRN ISO (2009). Sir - Određivanje udjela masti - Van Gulikova metoda. Hrvatski zavod za norme. Zagreb.
17. Kalit, S., Havranek-Lukač, J., Čubrić Čurik, V. (2002). Plazmin: indogena proteinaza mlijeka. *Mljekarstvo*. 52, 191-206.
18. Kalit, S., Lukac Havranek, J., Kaps, M., Perko, B., Cubric Curik, V. (2005). Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *International Dairy Journal*. 15 (6–9), 619-624. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.09.010>
19. Kilcawley Kieran, N. (2017). Cheese Flavour, Fundamentals of Cheese Science, (Fox, F., Guinee Timothy, P., Cogan Timothy, M., McSweeney, P.L.H.), Second Edition. Springer, 443-450.
20. Kirin, S. (2016). Podjela i svojstva sira. U: Sirarski priručnik. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 18-26.
21. Le Que´re, J. L. (2004). Cheese Flavor. U: Cheese Chemistry, Physics Microbiology, Two-Volume Set, Volume 1-2, Third Edition by Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, Timothy P. Guinee. Academic Press. 2011., United Kingdom, 675-683.
22. Linford, J. (2008). Hard cheeses. U: Great British cheeses, Dorling Kindersley Limited Velika Britanija, 98-187.
23. Lukač-Havranek, J., Hadžiosmanović, M., Samaržija, D., Antunac, N. (2000). Prehrambena svojstva mediteranskih sireva. *Mljekarstvo*. 50 (2), 141-150.
24. Marilley, L., Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 139-159.
25. Mayer, H., Rockenbauer, C., Mlcak, H. (1998). Evaluation of proteolysis in Parmesan cheese using electrophoresis and HPLC. *Lait*. 78, 425-438.
26. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*. 77, 41-76.
27. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (1999). Methods of Chemical Analysis. U: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P.F. Fox (Ed.), Vol. 1: General Aspects, An Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 341-388.
28. McSweeney, P. H. L., Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80, 293-324.

29. McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57, 127-144.
30. Mikulec, N., Habuš, I., Antunac, N., Vitale, Lj., Havranek, J. (2010). Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira. *Mljekarstvo*. 60, 219-227.
31. Mikulec, N. (2010). Promjene sadržaja topljivih peptida i aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb.
32. Muir, D. D. (2010). The grading and sensory profiling of cheese. U: *Technology of cheesemaking* (Law Barry, A.), second edition, 440-470.
33. Oštarić, F., Antunac, N., Prpić, Z., & Mikulec, N. (2015). Utjecaj sirila na kvalitetu paškog sira. *Mljekarstvo*, 65(2), 101–110.
<https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0204>
34. Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. (2000). Proteolysis in Manchego - type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal of Dairy Science*. 83, 1441-1447.
35. Pravilnik za ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda (2004). Interni pravilnik Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
36. Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (2007). Narodne novine broj 133. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva. Zagreb.
37. Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009). Narodne novine broj 20. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Zagreb.
38. Prieto, B., Franco, I., Gonzalez Prieto, J., Bernardow, A., Carballo, J. (2002). Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of raw cow's milk cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15, 725-735.
39. Qian, M. C., Burbank, H. M. (2007). Hard Italian cheeses: Parmigiano-Reggiano and Grana-Padano. U: *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing Limited., 421-441. <https://doi.org/10.1533/9781845693053.4.421>
40. Science, T. (2014). The science of cheese. U: *Choice Reviews Online* (Vol. 51, Issue 11). <https://doi.org/10.5860/choice.51-6139>
41. Summer, A., Formaggioni, P., Franceschi, P., Frangia, F. Di, Righi, F., Malacarne, M. (2017). Cheese as functional food: The example of parmigiano reggiano and grana padano. *Food Technology and Biotechnology*. 55(3), 277-289.
<https://doi.org/10.17113/ft b.55.03.17.5233>
42. Tagliazucchi, D., Solieri, L., Baldaccini, A., Martini, S., Bianchi, A., & Pizzamiglio, V.

- (2020). Peptide profiling and biological activities of 12- month ripened parmigiano reggiano cheese. *Biology*, 9(7), 1-17. <https://doi.org/10.3390/biology9070170>
43. Samaržija, D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
44. Tratnik, Lj. (2012). Sirarstvo. U: Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga. 205-311. Zagreb.
45. Tudor Kalit, M. (2012). Određivanje sastava i udjela slobodnih masnih kiselina sira iz mišine te njegova fizikalno-kemijska i senzorska svojstva. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno biotehnoški fakultet. Zagreb.
46. Tunick, M. H. (2014). Analysis and flavor comparisons. U: The science of cheese. Oxford University Press, Sjedinjene Američke Države, 174-198.
47. Wolf, I. V., Perotti, M. C., Bernal, S. M., Zalazar, C. A. (2010). Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*. 43 (4), 1204-1211.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.02.018>
48. Zannoni, M. (2010). Evolution of the sensory characteristics of Parmigiano-Reggiano cheese to the present day. *Food Quality and Preference*. 21 (8), 901-905.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.01.004>

7. Popis tablica, slika i grafikona

7.1. Popis tablica

Tablica 1. Broj bodova za ocjenu senzorskih svojstava ekstra tvrdog sira

Tablica 2. Prikaz odgovarajućih termina za pojedina senzorska svojstva

Tablica 3. Prikaz potrebnih volumena reagensa kako bi se dobila odgovarajuća koncentracija leucina (mM)

Tablica 4. Utjecaj zrenja na sadržaj tvari koje sadrže dušik u 100 g sira

Tablica 5. Koncentracije slobodnih aminokiselina (izraženih kao g Leu u 100 g suhe tvari sira i mg Leu u 100 g sira) u različitim fazama zrenja

Tablica 6. Ocjena senzorske kvalitete ekstra tvrdog sira Rici

7.2. Popis slika

Slika 1. Sir Rici

Slika 2. Biokemijske promjene tijekom zrenja sira

Slika 3. Biokemijski put mliječne masti

Slika 4. Opći putevi katabolizma aminokiselina

Slika 5. Prerez sira Rici nakon 8 mjeseci zrenja

Slika 6. Prerez sira Rici nakon 9,5 mjeseci zrenja

Slika 7. Prerez sira Rici nakon 10 mjeseci zrenja

7.3. Popis grafikona

Grafikon 1. Promjene udjela suhe tvari u siru tijekom zrenja

Grafikon 2a. Promjene udjela mliječne masti u siru tijekom zrenja

Grafikon 2b. Promjene udjela mliječne masti u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Grafikon 3a. Promjene udjela proteina u siru tijekom zrenja

Grafikon 3b. Promjene udjela proteina u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Grafikon 4a. Promjene udjela soli u siru tijekom zrenja

Grafikon 4b. Promjene udjela soli u 100 g suhe tvari tijekom zrenja

Grafikon 5. Promjene pH-vrijednosti sira tijekom zrenja

Grafikon 6. Ovisnost koncentracije leucina i apsorpcije svjetla valne duljine 507 nm

Grafikon 7. Porast ukupnih amino skupina izraženih kao koncentracija leucina u 100 g suhe tvari

Grafikon 8. Ovisnost udjela masti i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 9. Ovisnost udjela proteina i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 10. Ovisnost udjela soli i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 11. Ovisnost pH-vrijednosti i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 12. Ovisnost vodom ekstrahiranog dušika i senzorske kvalitete sira Rici

Grafikon 13. Ovisnost NH₂-dušika i senzorske kvalitete sira Rici

Životopis

Karla Petrincec rođena je u Zagrebu, 04. listopada 1997. godine. Završila je Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga (2012.–2016.), smjer kemijski tehničar a potom upisala Veleučilište u Karlovcu (2016.–2020.) i stekla diplomu stručna prvostupnica inženjerka prehrambene tehnologije (bacc. ing. techn. aliment). Fakultetsko obrazovanje nastavlja na diplomskom studiju *Proizvodnja i prerada mlijeka* na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Studentsku praksu u trajanju od mjesec dana odrađivala je u pivarskom pogonu *Grif* i u sirani *Vesna Lobarika*, u mjestu Lobarika (Istra). Aktivno govori engleski jezik te osnovno sporazumijevanje na njemačkom jeziku. Iskustva rada u prehrambenoj industriji (rad u kemijskom i mikrobiološkom laboratoriju, operater na stroju) kao i u mnogim drugim poslovima (ugostiteljstvo, prodavač u trgovačkim centrima i marketima te pozivnom centru) gdje je stekla verbalnu komunikaciju s ljudima, timskog rada ili samostalnog rada. Od hobija ističe badminton i folklor kao i volontiranje. Volontiranje sa starijima kao asistent ili osnovnoškolske i srednjoškolske instrukcije ponajviše prirodoslovnih predmeta, ali i svih drugih. Radoznala, sigurna i odgovorna, želi učiti i usavršavati stečeno znanje.