

Utjecaj vrste salamure na teksturne i proteolitičke promjene sira u tipu mozzarella

Vukman, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:204:441458>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ VRSTE SALAMURE NA TEKSTURNE I
PROTEOLITIČKE PROMJENE SIRA U TIPU MOZZARELLE**

DIPLOMSKI RAD

Antonija Vukman

Zagreb, srpanj, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

**UTJECAJ VRSTE SALAMURE NA TEKSTURNE I
PROTEOLITIČKE PROMJENE SIRA U TIPU MOZZARELLE**

DIPLOMSKI RAD

Antonija Vukman

Mentor:

Izv.prof.dr.sc. Milna Tudor Kalit

Zagreb, srpanj, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Antonija Vukman**, JMBAG 02840151098, rođen/a 30.08.2000. u Splitu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ VRSTE SALAMURE NA TEKSTURNE I PROTEOLITIČKE PROMJENE SIRA U TIPU
MOZZARELLE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor 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/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Antonija Vukman**, JMBAG 02840151098, naslova

UTJECAJ VRSTE SALAMURE NA TEKSTURNE I PROTEOLITIČKE PROMJENE SIRA U TIPU

MOZZARELLE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Izv.prof.dr.sc. Milna Tudor Kalit mentor

2. Izv.prof.dr.sc. Iva Dolenčić Špehar član

3. Prof.dr.sc. Samir Kalit član

Zahvala

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Milni Tudor Kalit na predloženoj temi, vremenu, trudu, stručnoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem članovima stručnog povjerenstva, prof. dr. sc. Samiru Kalitu i izv.prof.dr.sc. Ivi Dolenčić Špehar koji su korisnim savjetima tokom mog školovanja neizmjereno doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Iskrene zahvale obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju, osobito ekipama: "Maratonci", "Štilovka", "Zvijezda Danica" i "Plišivica".

Osobito zahvaljujem svome ocu, svojoj majci i bratu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali sve ove godine i bez kojih moje studiranje ne bi bilo moguće. Hvala Vam od srca. Ovaj rad je posvećen Vama!

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Mozzarella	3
2.2. Tehnologija proizvodnje mozzarelle	4
2.3. Reorganizacija gruša	6
2.4. Biokemijske promjene	7
2.4.1. Proteoliza	8
2.5. Tekstura	10
2.6. Upotreba začina u sirarstvu	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Tehnologija proizvodnje sira u tipu mozzarelle	12
3.2. Analiza kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira u tipu mozzarelle.....	16
3.3. Analiza proteolitičkih promjena sira u tipu mozzarelle	17
3.4. Analiza teksture	18
3.5. Statistička analiza	19
4. Rezultati i rasprava	20
4.1. Proteolitičke promjene	20
4.2. Teksturne promjene mozzarelle	22
4.3. Utjecaj vrste salamure na fizikalno-kemijski sastav, proteolitičke i teksturne karakteristike sira.....	23
5. Zaključak.....	25
6. Popis literature	26

7. Popis slika, grafova i tablica	29
Popis slika	29
Životopis	30

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Antonija Vukman**, naslova

UTJECAJ VRSTE SALAMURE NA TEKSTURNE I PROTEOLITIČKE PROMJENE SIRA U TIPU MOZZARELLE

Mozzarella je meki sir koji pripada skupini pasta filata sireva te je upravo tekstura jedna od najvažnijih čimbenika njezine kvalitete i prepoznatljivosti. Kako bi se spriječilo stvaranje kore te gubitak vode iz sira, mozzarella se pohranjuje u salamuri. Sastav salamure od izuzetne je važnosti s obzirom da se unutar roka trajnosti kvaliteta mozzarelle mijenja kao posljedica proteolize i izmjene tvari sa salamurom. Stoga, cilj ovoga rada je istražiti utjecaj različitih vrsta salamure na proteolitičke i teksturne promjene sira u tipu mozzarella.

Proizvedene su tri šarže sira u tipu mozzarella te je sir pohranjen u tri vrste salamure: 1) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L), 2) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L) i kalcij-klorida (5 g/L), 3) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L), kalcij-klorid (5 g/L) i vodenog ekstrakta bosiljka (20 g suhog bosiljka/L). Uzorkovanje sira provedeno je 0., 5., 10. i 15. dana. Proteolitičke promjene u siru praćene su određivanjem udjela frakcija dušika topljivih u vodi (WSN %TN) i topljivih u 12%-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA-SN %TN), a teksturne promjene silom proboda. Fizikalno-kemijskim analizama u siru određen je sadržaj suhe tvari, proteina i pH. Sadržaj WSN %TN i TCA-SN %TN ($P < 0,05$) kao i sila proboda ($P < 0,01$) bili su značajno veći u kontrolnom siru, u usporedbi s tretmanima koji su pohranjeni u salamurama koje sadrže kalcij-klorid.

Ključne riječi: mozzarella, proteoliza, tekstura, salamura, kalcij-klorid

Summary

Of the master's thesis – student **Antonija Vukman**, entitled

INFLUENCE OF DIFFERENT BRINE TYPES ON PROTEOLYTIC AND TEXTURAL CHANGES IN MOZZARELLA-TYPE CHEESE

Mozzarella is a soft cheese that belongs to the group of pasta filata cheeses, and its texture is one of the most important factors in its quality and recognition. In order to prevent the formation of a hard surface and the loss of water from the cheese, mozzarella is stored in brine. The composition of the brine is extremely important, considering that the quality of mozzarella changes within the shelf life as a result of proteolysis and exchange of substances with the brine. Therefore, the aim of this thesis is to investigate the influence of different types of brine on the proteolytic and textural changes of mozzarella type cheese.

Three batches of mozzarella type cheese were produced and the cheese was stored in three types of brine: 1) aqueous solution of citric acid (0.5 g/L), 2) aqueous solution of citric acid (0.5g/L) and calcium chloride (5g/L) and 3) aqueous solution of citric acid (0.5 g/L), calcium chloride (5 g/L) and water extract of basil (20 g of dry basil/L). During the 15-day storage period, cheese sampling was carried out on days 0, 5, 10 and 15. Proteolytic changes and textural properties in cheese were monitored by determining the percentage of nitrogen fractions soluble in water (WSN %TN) and soluble in 12% trichloroacetic acid (TCA-SN %TN), and changes by rupture strength, respectively. The content of dry matter, protein and pH was determined in the cheese. WSN %TN and TCA-SN %TN content ($P < 0.05$) as well as rupture strength ($P < 0.01$) were significantly higher in control cheese, compared to treatments stored in brines containing calcium chloride.

Keywords: mozzarella, proteolysis, texture, brine, calcium chloride

1. Uvod

Prehrambena industrija u današnje vrijeme jedna je od vodećih industrija u svijetu. Proizvodnja sira, najrasprostranjenijeg fermentiranog mliječnog proizvoda, smatra se umjetnošću. Sir je još u prošlosti bio jedna od osnovnih namirnica, kao što je i danas. Smatra se da je prvi sir proizveden na području između Eufrata i Tigrisa te se iz tog područja proširio na ostatak svijeta pa tako i na područje Mediterana (Havranek i sur., 2014). Područje sjevernog Mediterana karakteristično je po sirevima skupine parenog tijesta odnosno pasta-filata što u prijevodu s talijanskog jezika znači „ispredena pasta“. Na području Italije najpoznatiji predstavnik te skupine je sir mozzarella koja se tradicionalno proizvodi od bivoljeg mlijeka (De Candia i sur., 2007). Proizvodnja tih vrsta sireva obuhvaća zakiseljavanje mlijeka, rastezanje kuhanog sirnog tijesta te njegovo oblikovanje. Svi sirevi proizvedeni na taj način, uključujući i mozzarellu, imaju glatku teksturu i blagu aromu. Na presjeku tih sireva izostaju sirne oči, a sama tekstura tijesta je listasta (Barukčić, 2015).

Proteoliza je kao najvažniji biokemijski proces tijekom zrenja sira prvenstveno odgovorna za promjenu teksture samog sira. Do promjena teksture sira dolazi zbog razgradnje proteinske mreže kazeina. Proteoliza je u siru odgovorna za smanjenje sadržaja slobodne vode, mekšu teksturu, te povećanje pH-vrijednosti. Sve to se događa zbog razgradnje micle kazeina na male peptide i slobodne aminokiseline koji su odgovorni za razvoj arome (Havranek i sur., 2014).

Tekstura je jedna od najbitnijih i najsloženijih senzorskih svojstava bilo koje prehrambene namirnice pa tako i kod sira. Tekstura je odgovorna za prepoznatljivost i karakteristike određene vrste sira. Na teksturu sira najveći utjecaj imaju sastav mlijeka, fizikalno-kemijske karakteristike sira, način prerade mlijeka, te zrenje sira (Rako, 2016). Mozzarella je meki sir koji pripada skupini pasta filata sireva te je upravo tekstura jedan je najvažnijih čimbenika njezine kvalitete i prepoznatljivosti. Kako bi se spriječilo stvaranje kore te gubitak vode iz sira, mozzarella se pohranjuje u salamuri. Sastav salamure od izuzetne je važnosti s obzirom da se unutar roka trajnosti kvaliteta mozzarelle mijenja kao posljedica proteolize i izmjene tvari sa salamurom (Ardö i sur., 2017). Difuzija soli odgovorna je prijenos tvari između salamure i sira, a ovisi o sastavu salamure. Kao dodatak salamuri najčešće se koristi CaCl_2 , koji svodi oštećenje površine mozzarelle na minimum te uspostavlja ravnotežu između topivog i koloidnog oblika kalcija (Luo i sur., 2013).

Zbog njihovog bakteriostatskog djelovanja, korištenje esencijalnih ulja i ekstrakata začina sve je učestalija alternativa upotrebi kemijskih konzervanasa u prehrambenoj industriji (Romeo i sur., 2008). Primjerice, dodatkom bosiljka (*Ocimum basilicum*) osim što se obogaćuje mliječni proizvod novim okusom i aromom, ostvaruju se brojni benefiti na ljudsko zdravlje te na sigurnost i trajnost proizvoda zbog njegovog antifungalnog, antimutagenog, antioksidativnog i antimikrobnog djelovanja (Carocho i sur., 2016, Josipović i sur., 2016).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti utjecaj različitih vrsta salamure na proteolitičke i teksturne promjene sira u tipu mozzarelle.

2. Pregled literature

2.1. Mozzarella

Postojanje mozzarelle vezano je za 7. stoljeće dok je prostor središnje i južne Italije bio nastanjen vodenim bivolima. Stanovništvo je bivole u to doba iskorištavalo za obradu zemlje plugom, zbog njihove snage. S vremenom se bivole mlijeko počelo koristiti za proizvodnju sireva. Jedan od najpoznatijih sireva u svijetu koji se proizvodi od bivoljeg mlijeka je Mozzarella di Bufala (Jana i Mandal, 2011). Mozzarella se ubraja u skupinu sireva pasta-filata što u prijevodu znači „ispredena pasta“ ili „razvučeni gruš“. Sirevi te skupine karakteristični su za područje Mediterana te mogu biti proizvedeni osim od bivoljeg i od ovčjeg, kozjeg ili kravljeg mlijeka (De Candia i sur., 2007). S obzirom da je proizvodnja bivoljeg mlijeka sve manja, u današnje vrijeme za proizvodnju mozzarelle najviše se koristi kravlje mlijeko (Goncalves i Cardarelli, 2021). Kod mozzarelle proizvedene od kravljeg mlijeka manje do izražaja dolazi njen okus, a tekstura joj je gumena (Barukčić, 2015).

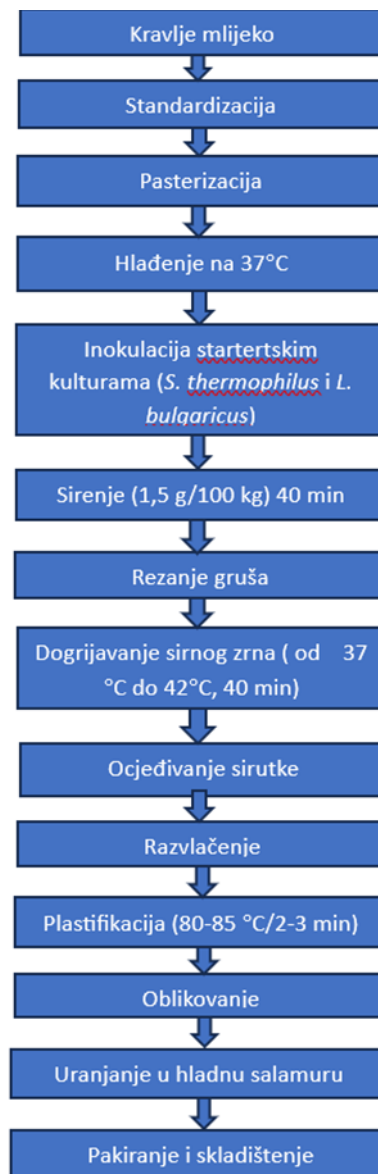
Mozzarella je sir koji ne zrije, a po sadržaju suhe tvari pripada skupini mekih sireva (Ricciardi i sur., 2015). Poznata je po izrazito bijeloj boji, blago kiselkastom okusu te mekanoj teksturi. Također posjeduje svojstva dobre rastezljivosti i topljivosti što je čini idealnim dodatkom za pizzu (Jana i Mandal, 2011). Ovisno o sadržaju vlage razlikuju se mozzarella visoke vlažnosti i niske vlažnosti. Namjenski, mozzarella visoke vlažnosti (sadržaj vlage od 55 do 65%) konzumira se kao svježi stolni sir, dok mozzarella niske vlažnosti služi kao prilog za pizze ili neka druga jela gdje se sir zagrijava ili peče. Zbog izrazito visoke vlažnosti te kratkog vremenskog perioda roka trajanja (od 7 do 15 dana) sir je potrebno čuvati u salamuri (Alinovi i sur., 2020; Parafati i sur., 2023). Salamura se najčešće sastoji od vode, organske kiseline ili NaCl, uz mogućnost dodatka Ca (u obliku CaCl_2). Kalcij ima značajnu ulogu u sastavu salamure. Jedna od uloga kalcija je uspostavljanje ravnoteže između topivog i koloidnog oblika kalcija što dovodi do sprječavanja kazeina da veže vodu. Pozitivno utječe na samu teksturu sira (odgodom difuzije vode između sira i salamure) te na proteolitičke promjene. Izostanak kalcija iz salamure dovodi do nastanka mekane, sluzave i nekompaktne površine mozzarelle (Luo i sur., 2013). Kvarenje mozzarelle najčešće je uzrokovano prekomjernim rastom mikroorganizama i prijenosa tvari (migracija soli i vode) (Faccia i sur., 2019). Zappia i sur. (2020) navode da dodatak koncentriranog soka bergamota i kalcij-laktata u sastav salamure pozitivno utječe na produljenje roka trajnosti. Sir pohranjen u navedenoj salamuri ima trajnost 20 dana te je zabilježeno bakteriostatsko djelovanje na *Pseudomonas* vrste. Usporedno sirevi pohranjeni samo u koncentrirani sok bergamota ili samo u vodu nakon 13. dana imaju jako lošu mikrobiološku kvalitetu.

Za postizanje pasta-filata konzistencije važan korak je zakiseljavanje mlijeka prije sirenja, koje se može provesti na više načina. Jedna od mogućnosti je direktno zakiseljavanje dodavanjem organske kiseline u mlijeko, primjerice limunske ili octene kiseline. Drugi način je dodavanje kultura bakterija mliječne kiseline u mlijeko. Kultura za proizvodnju mozzarelle

najčešće se sastoji od kombinacije mezofilnih i termofilnih bakterija ili samo od termofilnih bakterija (Ricciardi i sur., 2015).

2.2. Tehnologija proizvodnje mozzarelle

Tehnologija proizvodnje mozzarelle se razlikuje ovisno o tome da li se o tradicionalnoj ili industrijskoj proizvodnji. Slika 2.2.1. prikazuje industrijsku tehnologiju proizvodnje mozzarelle.



Slika 2.2.1. Dijagram tijeka proizvodnje mozzarelle (Izvor: Jana i Mandal, 2011)

Prvi, ujedno i najvažniji korak pri proizvodnji bilo koje vrste sira je odabir mlijeka. Kemijski sastav i mikrobiološka ispravnost mlijeka osnovni su preduvjeti za dobivanje kvalitetnog proizvoda (Havranek i sur., 2014). Dosadašnja istraživanja za proizvodnju

mozzarelle pokazala su da je za proizvodnju najbolja kombinacija bivoljeg i kravljeg mlijeka ako promatramo utjecaj na okus, miris i teksturu (Bonassi i sur., 1982). Izrazito bijela boja mozzarelle potječe od bivoljeg mlijeka koji ima znatno manji udio karotenoida od kravljeg mlijeka. Bivolje mlijeko s 4% mliječne masti smatra se najidealnijim za preradu te daje najveći prinos (Jana i Mandal, 2011).

Kod kemijskog sastava mlijeka za proizvodnju sira glavnu ulogu ima omjer kazeina i mliječne masti (Havranek i sur., 2014). Stoga je prije samog početka proizvodnje potrebno provesti proces standardizacije mlijeka, najčešće od 3,0 do 6,0% mliječne masti (Jana i Mandal, 2011). Prema Ali i Abdel-Razig (2011.) se kravlje mlijeko za proizvodnju mozzarelle standardizirano na 5,0% mliječne masti pokazalo boljim nego na 3,0 ili 7,0% masti.

Za proizvodnju mozzarelle koristi se sirovo mlijeko (tradicionalna proizvodnja) ili se podvrgava procesu pasterizacije (industrijska proizvodnja) (Jana i Mandal, 2011). Srednja pasterizacija koja se provodi na temperaturi od 72 do 75 °C tijekom 15 – 20 s, uglavnom se provodi u sirarstvu. Svrha same pasterizacije je uništavanje svih patogenih i većine vegetativnih mikroorganizama (Havranek i sur., 2014).

Usitnjavanjem globula mliječne masti, odnosno homogenizacijom, postižu se određeni benefiti u proizvodnji mozzarelle. Poznato je da nakon homogenizacije dolazi do manjeg stvaranja slobodne masti pa mozzarella ima veću viskoznost (Rowney i sur., 2003).

Faza zakiseljavanja mlijeka može se provesti dodatkom bakterija mliječne kiseline (BMK) ili dodatkom organske kiseline. Limunska i octena kiselina su dvije najčešće organske kiseline u proizvodnji mozzarelle. Imaju ulogu u razvoju arome te omogućuju istežanje pri većoj pH vrijednosti (niža količina kalcija povezana s proteinima). Kada je riječ o zakiseljavanju bakterijama mliječne kiseline koristi se kombinacija termofilnih bakterija *Streptococcus thermophilus* i mezofilnih *Lactobacillus bulgaricus*. BMK svojim djelovanjem zaustavljaju enzimsko posmeđivanje. Ovisno o vrsti mogu se kombinirati i druge BMK kao što su *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* i/ili *L. helveticus* za mozzarellu s manjim udjelom vlage, a *S. lactis*, *S. durans* ili *S. faecalis* za mozzarellu s većim udjelom vlage (Jana i Mandal, 2011).

Rastezanje guša slijedi nakon soljenja sirnog zrna (1 do 1,5%), što rezultira boljim topljenjem, okusom i teksturom. Rastezanje sirnog gruša ovisi o više parametara kao što su:

- kemijski sastav mlijeka: svi sastojci mlijeka (laktoza, proteini, masti, vitamini i mineralne tvari) imaju utjecaj na krajnji proizvod, ali najvažnijim se smatra omjer kazeina i mliječne masti koji doprinose teksturi sira,
- termička obrada mlijeka: premda se tradicionalno mozzarella proizvodi od sirovog mlijeka, proces pasterizacije (72 °C/15 s) uvodi se zbog sve veće industrijske proizvodnje i boljeg okusa (Goncalves i Cardarelli, 2021),
- kiselost: rastezanje koje se provodi pri pH=5,3 za rezultat ima produženje trajnosti proizvoda te bolju teksturu u usporedbi s rastezanje pri nižim pH vrijednostima (Yun i sur., 1993),
- kalcij: najveći dio kalcija u mlijeku nalazi se u obliku koloidnog kalcijevog fosfata koji je odgovoran za povezivanje submicela u kazeinske micelle. Dokazano je da

manja koncentracija kalcija ima pozitivan utjecaj na hidratiziranost proteinske mreže, bolju emulziju masti te topljivost (Joshi i sur., 2004),

- vrsta rastezanja: rastezanje je moguće provesti ručno, industrijskom opremom (šaržna ili kontinuirana oprema s pužnicama) te kontinuiranim ubrizgavanjem vodene pare (veći gubitak masti i manji sadržaj vlage). Najučinkovitijim uvjetima za rastezanje mozzarelle smatraju se uvjeti pri kojima je pH gruša od 5,0 do 5,8 te temperaturi vode od 50 do 85 °C (Goncalves i Cardarelli, 2021; Renda i sur., 1997).

Nakon procesa rastezanja potrebno je provesti hlađenje. Hlađenje se provodi uranjanjem gotovih oblika mozzarelle u hladnu slanu vodu (Goncalves i Cardarelli, 2021). Najčešći sastojci salamure za mozzarellu su voda, sol i kalcij u obliku CaCl_2 . Voda i sol ključni su sastojci za kontrolu vlage te imaju utjecaj na teksturu, okus i fizičke karakteristike sira. CaCl_2 ima bitnu ulogu u salamuri. Naime, količina kalcija na površini sira znatno je manja nego unutar samog sira što dovodi do oštećenja površine sira. Dodavanje kalcija uspostavlja se ravnoteža između koloidnog i topljivog oblika kalcija. Samim tim oštećenje površine mozzarelle svedeno je na minimum (Luo i sur., 2013). Ohlađena mozzarella može se pohraniti osim u salamuri i zamrzavanjem (Goncalves i Cardarelli, 2021). Utvrđeno je da pohrana mozzarelle na -18°C , tijekom razdoblja od 1 do 4 mjeseca ima negativan učinak na senzorska svojstva (gorak okus) te izraženiju proteolizu nakon odmrzavanja (Alinovi i sur., 2020).

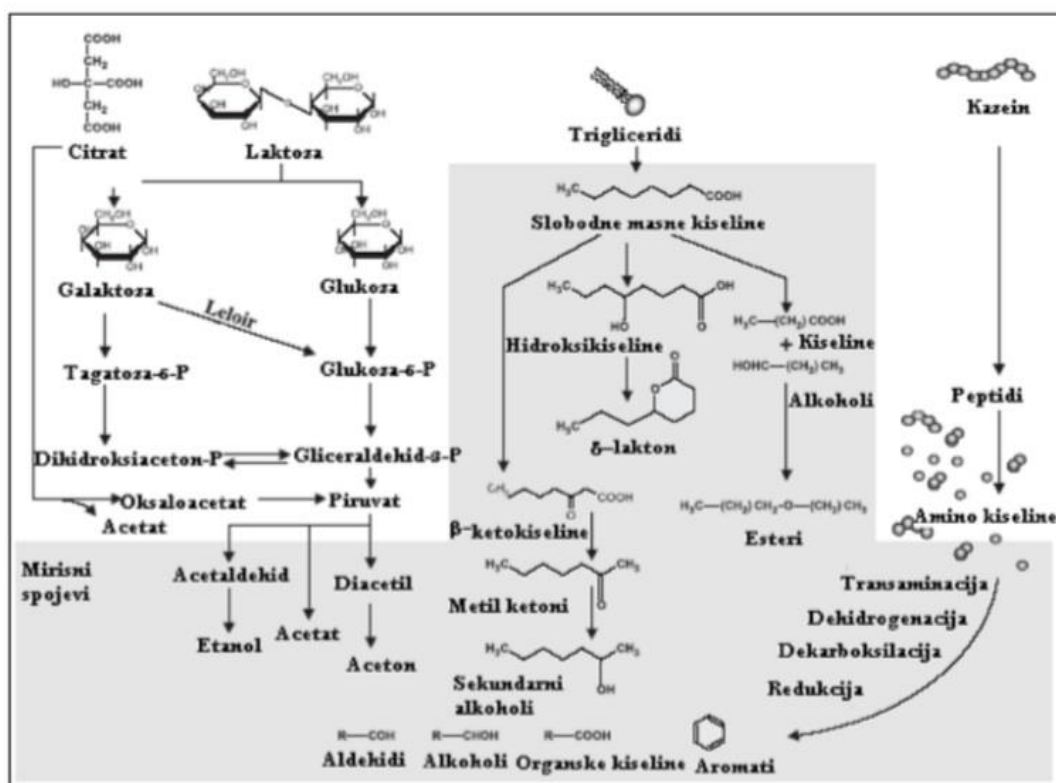
2.3. Reorganizacija gruša

Rastezanjem, pohranom i sazrijevanjem dolazi do reorganizacije strukture gruša. Rastezanjem sirnog gruša, odnosno termomehaničkim djelovanjem, dolazi do formiranja vlakana karakterističnih za mozzarellu. Nastaju kazeinska vlakna s dispergiranim masnim globulama i slobodnom vodom unutar proteinskog matriksa. Optimalna temperatura gruša za razvlačenje je od 55 do 65 °C pri čemu jačaju hidrofobne interakcije unutar matriksa koje dovode do djelomičnog otpuštanja vode u slobodnu vodu (Goncalves i Cardarelli, 2021). Uvjeti razvlačenja također imaju utjecaj na reorganizaciju strukture, ponajprije globula mliječne masti. Utvrđeno je da temperatura pri termomehaničkoj obradi utječe na raspored globula mliječne masti. Ukoliko se gruša rasteže tijekom kratkog vremenskog perioda i pri nižim temperaturama, globule mliječne masti su manje. Nadalje, veće globule uočene su ukoliko su uvjeti rastezanja gruša grublji (Banville i sur., 2016).

U fazi pohrane sira slobodna voda koja je nastala razvlačenjem gruša apsorbira se na proteinsku mrežu te dolazi do promjena u sastavu masnih kiselina i slobodne vode. Tijekom zrenja dolazi do proteolize i otpuštanja kalcija što rezultira povećanjem hidratacije, a time i povećanjem volumena parakazeina (Goncalves i Cardarelli, 2021).

2.4. Biokemijske promjene

Tijekom zrenja sira dolazi do mikrobioloških i brojnih biokemijskih promjena koje su odgovorne za razvoj arome i teksture sira. Biokemijskim promjenama dolazi do razgradnje složenih spojeva na jednostavne. Ovisno o vrsti sira to sazrijevanje može trajati od dva tjedna kao kod mozzarelle ili dvije godine kao kod parmezana (McSweeney, 2004). Glavnu ulogu u zrenju sira ima početna, dodana i starter kultura te enzimi. Izvor enzima može biti samo mlijeko, koagulant, starterske i nestarterske bakterije mliječne kiseline te egzogeni enzimi. (Fox i sur., 2000). Brojni su čimbenici o kojima ovisi zrenje, najčešće su to uvjeti u zrioni (vlaga, temperatura), pH, količina soli te količina i vrsta dodane mikrobne kulture. Kod zrenja sira razlikuje se primarno i sekundarno zrenje. Primarno zrenje karakteristično je za polutvrde i tvrde sireve, dok je kod mekih i sireva s većim udjelom vlage i kiseline izraženo sekundarno zrenje. Tijekom primarnog zrenja sira odvijaju se procesi lipolize, proteolize i glikolize (Slika 2.4.1), dok tijekom sekundarnog zrenja dolazi do katabolizma aminokiselina i slobodnih masnih kiselina. Za teksturu je odgovorno primarno, dok je za specifičnu aromu sira odgovorno sekundarno zrenje. Mliječna kiselina koja nastaje kao produkt glikolize kod svježih sireva odgovorna je za aromu (Barukčić, 2015).



Slika 2.4.1. Opći biokemijski putevi tijekom zrenja sira

(Izvor: Marilley i Casey, 2004)

Laktoza (mliječni šećer) sastoji se od glukoze i galaktoze koje su povezane β-(1-4) glikozidnom vezom (Fox i sur., 2015). Fermentacija mliječnog šećera, odnosno proces

fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu, smatra se osnovnim procesom u proizvodnji svježih i mekih sireva zbog doprinosa mliječne kiseline aromi. Postoji više načina metabolizma laktoze: uz pomoću bakterija mliječne kiseline, glikolitičkim putem ili fosfo-ketolaznim putem. Samo mali dio laktoze zaostaje u sirnom tijestu (od 1 do 2 %) dok ostatak prelazi u sirutku. Procesom glikolize sva laktoza koja je zaostala u sirnom tijestu prelazi u mliječnu kiselinu (L-izomer). Katabolizam laktoze ovisi i o pH vrijednosti grušā. Pri alkalnim uvjetima dolazi do prelaska aldoze u ketozu. Kod sireva kiselog grušā laktati pridonose stvaranju arome, najvećim dijelom u prvoj fazi zrenja, posebice kod mladih sireva. Pri višim temperaturama dolazi do mutarotacije i izomerizacije laktoze te stvaranja hlapljivih spojeva kao što su kiseline, furfural, hidroksimetilfurfural, CO₂ i CO. Ukoliko dođe do zaostajanja laktoze ili monosaharida postoji mogućnost pojave Maillardovih reakcija. Maillardove reakcije nastaju kao posljedica tretiranja laktoze na povišenim temperaturama što je slučaj pri proizvodnji mozzarelle kada se vrši zagrijavanje grušā (Havranek i sur., 2014, Fox i sur., 2015).

Razgradnja lipida (mliječne masti) pomoću enzimatskih katalizatora (lipaza) na slobodne masne kiseline i alkohol glicerol nazivamo lipolizom. Lipoliza je u manjoj mjeri prisutna u mlijeku gdje je i nepoželjna (užeglost). Lipolitičke promjene poželjne su tijekom zrenja sira (Barukčić, 2015). Udio mliječne masti utječe na konzistenciju sira, što je više masti konzistencija je mekanija (Havranek i sur., 2014). Ukoliko su globule mliječne masti manje sir sadrži više vlage i elastičniji je u odnosu na sir proizveden s mlijekom koje ima veće globule mliječne masti (Zhang i sur., 2024). Prisustvo slobodnih masnih kiselina može imati i pozitivan i negativan utjecaj na gotovi proizvod. Visoka koncentracija slobodnih masnih kiselina dovodi do užeglosti sira, dok pri nižim koncentracijama dolazi do razvoja arome. Katabolizmom slobodnih masnih kiselina nastaju laktoni, sekundarni alkoholi i kiseline kao spojevi arome. Esteri i tioesteri (spojevi arome) također nastaju djelovanjem slobodnih masnih kiselina. Koncentracija slobodnih masnih kiselina u mozzarelli je 363 mg/kg u usporedbi s parmezanom koji ima 4993 mg/kg (Havranek i sur., 2014).

2.4.1. Proteoliza

Od svih navedenih biokemijskih promjena koje se događaju tijekom zrenja sira proteoliza je najvažniji i najsloženiji proces. Proces se razlikuje ovisno o vrsti sira. Plavi sirevi imaju izraženije proteolitičke promjene, dok su promjene kod mozzarelle vrlo ograničene. Proteolizom dolazi do razgradnje kazeinske mreže. Kazeinska mreža razgrađuje se do malih peptida i slobodnih aminokiselina. Nadalje, dolazi do promjene sirne teksture (lomljivosti, elastičnosti, tvrdoće, topljivosti, kohezivnosti, adhezivnosti, rastezljivosti, svojstva emulgiranja), povećanja pH-vrijednosti sira, smanjuje se sadržaj slobodne vode te dolazi do razvoja arome (Havranek i sur., 2014, Fox i sur., 2015). Do omekšavanja teksture sira dolazi zbog smanjenja aktivnosti vode i hidratacije kazeinske micela. Enzimi, peptidaze i proteaze mogu biti iz različitih izvora kao što su mlijeko, sirilo, starter bakterije mliječne kiseline, nestarterske bakterije mliječne kiseline ili neke druge kulture (McSweeney, 2004, Fox i sur., 2015). Istraživanja pokazuju da laktokoki imaju najvažniju ulogu u razgradnji kazeina. Evolucijski su razvili metabolički koncept razgradnje proteina mlijeka. Laktokoki za rast i razvoj

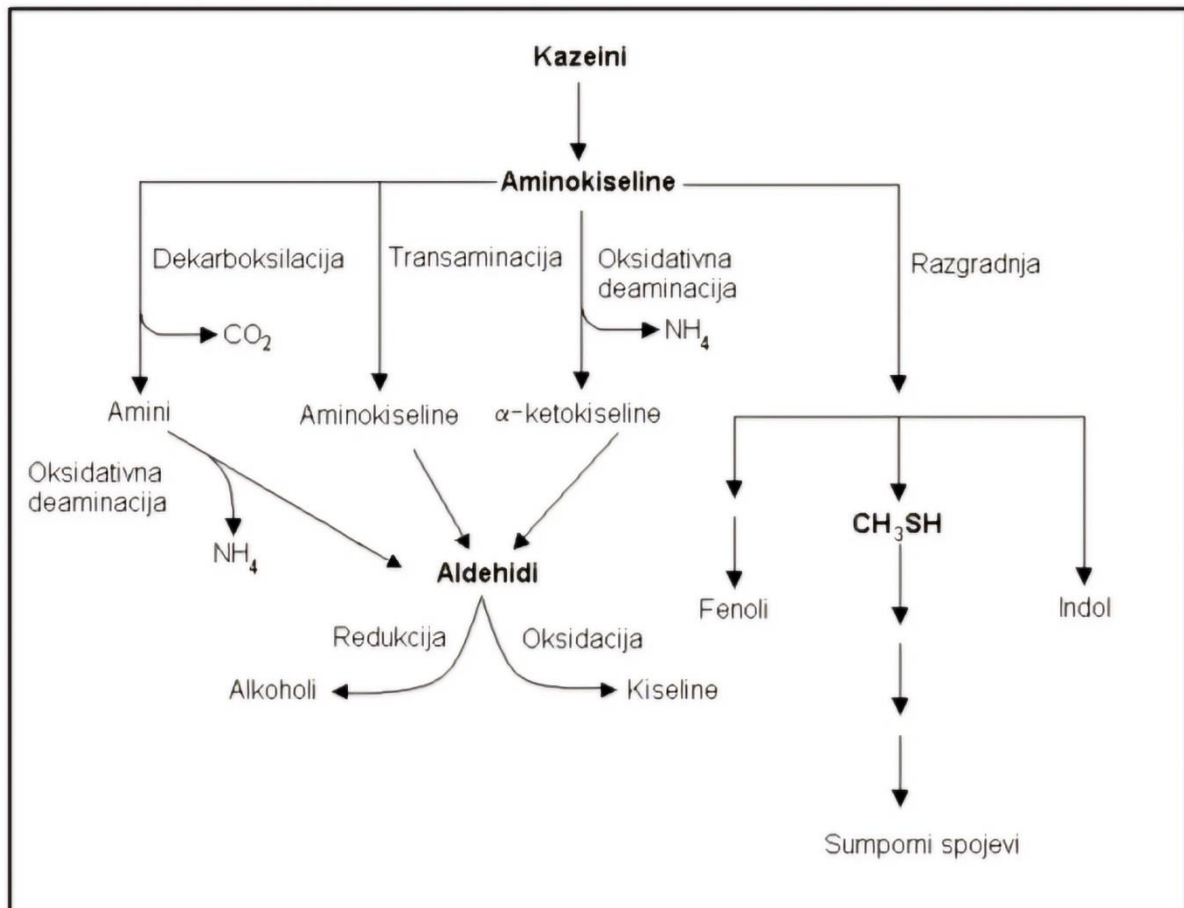
u mlijeku koriste aktivnost stanično vezane peptidaze. Peptidaze omogućuju razgradnju kazeina do oligopeptida. Također, aminokiseline unutar stanice različitim reakcijama postaju prekursori za tvorbu aromatskih spojeva (Samaržija, 2015).

Razgradnja kazeina opisana je primarnim i sekundarnim metaboličkim putem. Primarnim metaboličkim putem nastaju peptidi i slobodne aminokiseline, dok nastale slobodne aminokiseline u sekundarnom metaboličkom putu služe kao supstrat za nastajanje aromatskih spojeva. Primarna proteoliza odvija se pod djelovanjem kimoza i plazmina, a sekundarna djelovanjem intracelularnih i ekstracelularnih te nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Havranek i sur., 2014).

Kimozin, glavni proteolitički enzim, može zaostati u sirnom grušu nakon ocjeđivanja sirutke u količini od 3 do 10 % , ovisno o pH vrijednosti gruša. Aktivnost kimoza ovisi o temperaturi termičke obrade, vrsti enzima i pH vrijednosti tijekom otjecanja sirutke (McSweeney, 2004). Kimozin ponajprije razgrađuje α_{s1} -kazeina na dva fragmenta na poziciji između 23 i 24 ostatka pri čemu nastaju fragmenti f1-23, α_{s1} -I (f 24-199) i α_{s1} -II (f 24-169). Fragment f1-23 koji je topiv u vodi je supstrat za razgradnju do aminokiselina i polipeptida (Havranek i sur., 2014). Cijepanjem β -kazeina na sedam mjesta (cijepanje se većinom događa u neposrednoj blizini C-terminalnog, hidrofobnog dijela) nastaju kratki hidrofobni peptidi koji su gorkog okusa (McSweeney, 2004). Pri proizvodnji mozzarelle većina kimoza gubi se tijekom dogrijavanja na više temperature, zbog njegove termolabilnosti. Plazmin kao alkalna proteinaza potječe iz krvnog seruma te je najaktivnija pri pH 8,45 i temperaturi od 37 °C. Pri aktivnosti plazmina dolazi do cijepanja proteinske molekule s lizinskim ostatcima, dok rjeđe cijepa argininske ostatke aminokiselina u lancu (Havranek i sur., 2014). Na djelovanje plazmina najosjetljiviji je β -kazein. Plazmin cijepa β -kazein na dijelovima Lys 28-Lys 29, Lys105-His106 i Lys107-Glu108. Cijepanjem nastaju γ^1 (β -CN f29-209), γ^2 (β -CN f106-209) i γ^3 (β -CN f108-209) kazeini te proteoza-peptoni i to PP8 brzi (β -CN f1-29), PP8 spori (β -CN f29-105/7) i PP5 (β -CN f1-105/7) (Fox i McSweeney, 1998).

Slobodne aminokiseline nastale proteolizom služe kao prekursori za kataboličke reakcije tijekom kojih nastaju brojni spojevi odgovorni za okus (McSweeney, 2004). Tijekom katabolizma aminokiselina dolazi do dekarboksilacije, oksidativne deaminacije, transaminacije i desumporizacije (Slika 2.4.1.1). Procesom dekarboksilacije dolazi do konverzije aminokiseline te nastaje primarni amin i ugljikov dioksid. Dekarboksilacijom tirozina i histidina nastaju tiramin i histamin koji se smatraju najvažnijim aminima u siru. Nadalje, nastali amini mogu reakcijom oksidativne deaminacije prijeći u aldehide ili α -ketokiseline, pri čemu nastaje i NH_4 (Havranek i sur., 2014). Transaminacijom dolazi do prijenosa amino skupine s α -aminokiselina na α -ketokiselinu djelovanjem katalizatora aminotransferaze. Dva su koraka transaminacije. U prvom koraku dolazi do prijenosa amino skupine s aminokiselina na piridoksamino-5-fosfat. Nadalje, u drugom koraku amino skupina s piridoksamino-5-fosfata prelazi u α -ketokiselinu te nastaje aminokiselina i regenerirani piridoksamino-5-fosfat (Fox i sur., 2004). Nastali amini, aminokiseline i α -ketokiseline prelaze u aldehide. Također, aldehidi ovisno o vrsti reakcije, redukcija ili oksidacija, prelaze u alkohole ili kiseline. Sumporni spojevi koje pronalazimo u siru potječu iz metionina. U siru možemo pronaći metantioi, sumporovodik, dimetilsulfid,

dimetildisulfid, dimetiltrisulfid i karbonil sulfid kao nisko molekularne sumporne spojeve. Zaključno, razgradnja aminokiselina odgovorna je za razvoj arome sira stvaranjem alkohola, fenola, indola, aldehida, amonijaka i sumpornih spojeva (Havranek i sur., 2014). Sam proces proteolize u nekim vrstama sireva kao što je cheddar jako je dobro istražen, dok je manje poznat proces proteolize kod sireva kao što je mozzarella (Costabel i sur., 2007).



Slika 2.4.1.1. Opći putovi katabolizma slobodnih aminokiselina

(Izvor: McSweeney i Sousa, 2000)

2.5. Tekstura

Tekstura je najvažnije svojstvo za potrošače jer pomoću teksture identificiraju određenu vrstu sira (Lawrence i sur., 1987). Teksturu možemo definirati kao skupinu fizikalnih svojstava koja proizlaze iz strukturnih elemenata (Samaržija, 2015). Tekstura kao složeno senzorsko svojstvo smatra se na najvažnijim čimbenikom kvalitete i prepoznatljivosti svakog sira. Nadalje na teksturu sira utječe sam sastav mlijeka koje se koristi za sirenje, tehnološki postupci kojima je izloženo mlijeko i na samom kraju uvjeti u zrioni (Rako, 2016). Glavni čimbenici koji određuju kvalitetu mozzarelle su istezanje, svojstvo topljenja i tekstura. Najveći

utjecaj na kvalitetu mozzarelle ima vrsta mlijeka, način proizvodnje, odabir starter kulture i enzima sirila, postupak istezanja te soljenje (Akarca i sur., 2023).

Na svojstvo teksture utjecaj imaju struktura i sastav same micele (Cai i sur., 2023). Značajne promjene u teksturi sira događaju se tijekom prvog i drugog tjedna sazrijevanja (Lawrence i sur., 1987). Frakcije kazeina (α_{s1} -kazeina i β -kazeina) hidroliziraju pri čemu dolazi do promjena u sastavu proteinske mreže, samim tim i do promjene u teksturi sira. Dokazano je da su specifična svojstva teksture (kohezivnost, tvrdoća, otpornost i lomljivost) u visokoj korelaciji s hidrolizom α_{s1} -kazeina i β -kazeina ukoliko se radi o hidrolizi kojom dominira plazmin (Cai i sur., 2023).

Tekstura sira također je određena omjerom netaknutog kazeina i vlage te pH vrijednošću. Nadalje, temperatura ima ulogu u razvoju teksture. Sir koji zrije na većim temperaturama ima veći intenzitet hidrolize kazeina te dolazi do promjena u teksturi. Dokazano je da pri pH vrijednosti većoj od 5,6 dolazi do veće razgradnje β -kazeina za razliku od α_s -kazeina. Smatra se da je za to odgovorna povećana aktivnost plazmina (Lawrence i sur., 1987).

2.6. Upotreba začina u sirarstvu

Zbog sve veće svijesti potrošača, u sastav prehrambenih proizvoda, dodaju se različiti prirodni sastojci koji osim pozitivnog djelovanja na okus proizvoda imaju i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Carocho i sur., 2016). Dodatak začina ovisi o regiji u kojoj se sir proizvodi. Na području Hrvatske najčešće se dodaje ružmarin, list lovora, kopar, papar, peršin bijel luk, feferoni, crvena paprika i bosiljak. Kao začin moguće je koristiti bilo koji dio biljke u svježem obliku, osušenom, usitnjenom, u obliku praha ili ekstrakcijom aromatičnih sastojaka (Josipović i sur., 2016). Također se mogu koristiti kao alternativna sredstva za konzerviranje hrane zbog bakteriostatske aktivnosti (Zappia i sur., 2020).

Bosiljak pripada porodici usnjača lat. *Lamiaceae*. Smatra se da potječe iz Indije gdje se odavno koristi kao začin. Ukoliko se bosiljak dodaje hrani najčešće se radi o listu ili stabljici (Carović – Stanko, 2013.). Bosiljak (*Ocimum basilicum*) je zelena biljka koja ima sjajne i mirisne listove, raste u obliku grma visine do 90 cm. Dodatak bosiljka kao začina ili sastojka prehrani karakterističan je za talijansku kuhinju. Bosiljak posjeduje i mnogo ljekovitih svojstava kao što su ublažavanje zatvora, dijareje, upala i bolova, uklanjanje bradavica i izravno liječenje gastritisa. Također je utvrđeno da ima antifungalno, antimutageno, antioksidativno i antimikrobno svojstvo. Carocho i sur. (2016) navode da dodatak ekstrakta bosiljka i suhog bosiljka u sireve ima antioksidativno djelovanje te time povećava funkcionalna svojstva sira. Antimikrobno djelovanje bosiljka ogleda se u većem gubitku vlage, te manjim promjenama u sadržaju proteina i masti tijekom 6 mjeseci pohrane u usporedbi sa kontrolnim sirom. Autori objašnjavaju da dodatak bosiljka u sir prevenira peroksidaciju lipida te smanjuju aktivnost proteolitičkih bakterija specifičnih za ovu vrstu sira. Rezultati pokazuju da ekstrakt bosiljka kao dodatak siru ima bolje konzervirajuće djelovanje te učinak na funkcionalna svojstva u usporedbi sa sušenim lišćem bosiljka.

3. Materijali i metode

Sir u tipu mozzarelle proizveden je od punomasnog mlijeka u tri ponavljanja/šarže u pilot pogonu Zavoda za mljekarstvo. Proizvedeni sirevi iste šarže podijeljeni su u tri grupe s obzirom na vrstu salamure: 1) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L) 2) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L) i kalcij-klorida (5 g/L) 3) vodena otopina limunske kiseline (0,5 g/L), kalcij klorida (5 g/L) i vodenog ekstrakta bosiljka (20 g suhog bosiljka/L). Tijekom vremena pohrane u trajanju od 15 dana uzorkovanje sira provedeno je 0., 5., 10. i 15. dana.

3.1. Tehnologija proizvodnje sira u tipu mozzarella

Za proizvodnju sira korišteno je 80 L kravljeg mlijeka jutarnje i večernje mužnje. Do trenutka prerade mlijeko je pohranjeno u laktofrizu na 4 °C. U hladno mlijeko dodana je limunska kiselina (120 g). Limunska kiselina prije dodavanja u mlijeko otopljena je u maloj količini tople vode. Mlijeko je zagrijano u sirarskom kotlu do temperature od 32 °C. Na toj temperaturi dodano je mikrobnog sirila (3,2 g; Microclerici, Caglifacio Clerici spa, Italija) uz neprestano miješanje od 1 minute (slika 3.1.1).



Slika 3.1.1. Dodavanje mikrobnog sirila u mlijeko

Pri završetku sirenja koje je provedeno na temperaturi od 32 do 35 °C tijekom 10 minuta nastaje gruš (slika 3.1.2.). Nastali gruš rezan je sirarskom harfom na veličinu manjeg oraha (slika 3.1.3.). Sirno zrno je potom prebačeno iz sirarskog kotla na sirarski stol kako bi se sirutka ocijedila (slika 3.1.4.).



Slika 3.1.2. Završetak sirenja



Slika 3.1.3. Rezanje gruša sirarskom harfom



Slika 3.1.4. Ocjeđivanje sirutke iz sirnog gruša

Nakon cijeđenja, sirno tijesto je potom prebačeno u plastičnu posudu u kojoj je obavljeno soljenje tijesta (slika 3.1.5.) sitnom morskom soli (640 g). Zatim je dodana vruća voda (80 °C). U vrućoj vodi provedeno je razvlačenje sirnog tijesta (slika 3.1.6.) kao i oblikovanje kuglica mozzarelle (slika 3.1.7.), koje su potom prebačene u posudu s hladnom vodom i ledom.



Slika 3.1.5. Soljenje sirnog tijesta



Slika 3.1.6. Razvlačenje sirnog tijesta



Slika 3.1.7. Oblikovanje mozzarelle

Proizvedeni sirevi iste šarže podijeljeni su u tri grupe s obzirom na vrstu salamure. Pripremljene su tri vrste salamure (slika 3.1.8.): 1) vodena otopina limunske kiseline (0,5g/L) 2) vodena otopina limunske kiseline (0,5g/L) i kalcij klorida (5g/L) 3) vodena otopina limunske kiseline (0,5g/L), kalcij klorida (0,5g/L) i vodeni ekstrakt bosiljka (20 g suhog bosiljka/L), u kojima je sir pohranjen u periodu od 15 dana na temperaturama hladnjaka (slika 3.1.9.).



Slika 3.1.8. Pripremljene salamure



Slika 3.1.9. Uzorci mozzarelle pohranjeni u tri vrste salamure

3.2. Analiza kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira u tipu mozzarella

Analize kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira u tipu mozzarelle tijekom pohrane (0., 5., 10. i 15. dan) provedene su u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

Provedene su sljedeće analize:

- udio suhe tvari u siru metodom sušenja na $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase (HRN EN ISO 5534:2008),

- udio proteina metodom blok digestije-Kjeldahlovo načelo (HRN EN ISO 8968-1:2014),
- pH-vrijednost potenciometrijskom metodom pomoću pH-metra 340 (Mettler Toledo, Švicarska).

3.3. Analiza proteolitičkih promjena sira u tipu mozzarelle

U procjeni sekundarnih proteolitičkih promjena tijekom pohrane sira (0., 5., 10. i 15. dan) metodom blok digestije (slika 3.3.1.). - Udio u vodi topljivih frakcija dušika (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN) i udio dušične frakcije topljive u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (TN) određen je metodom po Kjeldhalu (HRN EN ISO 8968-1:2014) u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

Procjena sekundarnih proteolitičkih promjena mjerila se kao:

- udio dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN): pokazuju količinu polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina i njihovih soli, a koje nastaju kao posljedica kimozijske aktivnosti i u manjoj mjeri plazminske aktivnosti
- udio dušičnih tvari topljivih u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (TN): pokazuju količinu neproteinskog dušika i slobodnih aminokiselina, a koje nastaju kao posljedica proteolitičke aktivnosti mikrobnih kultura i nestarterske mikrobne populacije te u manjoj mjeri kimozijske aktivnosti.

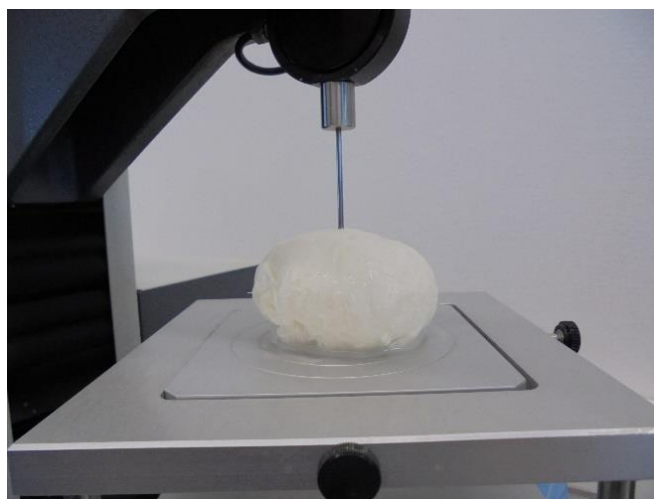


Slika 3.3.1. Metoda blok digestije

3.4. Analiza teksture

Mjerenje teksture sira tijekom pohrane (0., 5., 10. i 15. dan) provedeno je pomoću teksturnog analizatora (TA Plus Lloyd Instruments) opremljenog mjernom stanicom od 500 N pomoću cilindrične sonde \varnothing 2 mm (slika 3.4.1.). Prije mjerenja uzorci sira su izvađeni iz salamure i ostavljeni 20 minuta da se ocijede. Nakon toga su omotani prijanjajućom plastičnom folijom da ne bi došlo do daljnjeg gubitka vlage, te su čuvani na sobnoj temperaturi prostorije (22 - 25 °C) kako bi temperatura uzorka i radnih alata na teksturnom analizatoru bila identična.

Uzorak sira je postavljen na radnu površinu, a sonda je spuštена do površine samog uzorka. Nakon pokretanja teksturnog analizatora i postizanja vrijednosti pred testne sile okidača, započeto je mjerenje, a uzorak je bio podvrgnut testu proboda prema sljedećim softverskim postavkama: vrijednost predtestne sile okidača – 0,001 N, dubina prodiranja sonde u sir – 10 mm, brzina kretanja sonde tijekom prodiranja sonde u sir i njenog povrata u početni položaj – 20 mm/min. Pomoću softvera Nexygen izračunata je sila prodora. Sila proboda je definirana kao najveća postignuta vrijednost sile tijekom prodiranja sonde u sir i izražena je u njutnima (N).



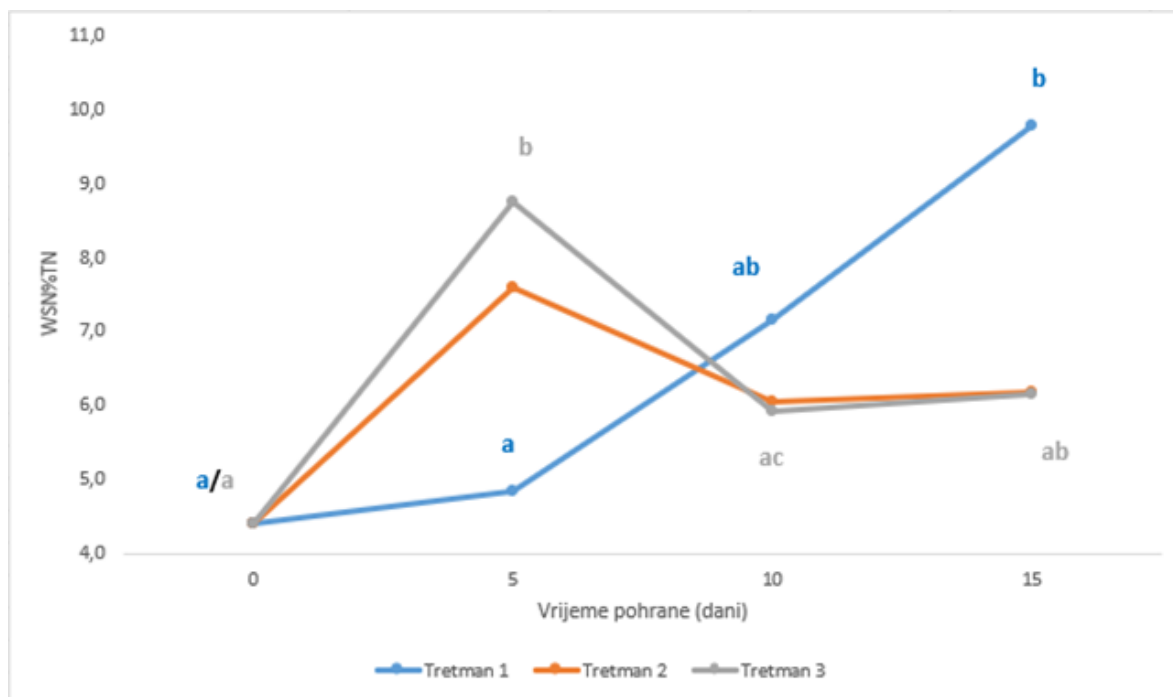
Slika 3.4.1. Određivanje teksture sira

3.5. Statistička analiza

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem statističkog programa SPSS (IBM, i.21). Utjecaj različitih vrsta salamure na proteolitičke i teksturne značajke sira u tipu mozzarelle nakon 15 dana pohrane analiziran je pomoću jednofaktorske analize varijance (ANOVA) pri čemu je vrsta salamure bila fiksni faktor, a proteolitički i teksturni parametri zavisne varijable. Eksperimentalni podaci dobiveni tijekom pohrane sira u pojedinoj vrsti salamure analizirani su također primjenom jednofaktorske analize varijance (ANOVA). Naknadno testiranje provedeno je pomoću testa najmanje značajnih razlika (LSD test) na razini od 5% značajnosti ($P < 0,05$).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Proteolitičke promjene

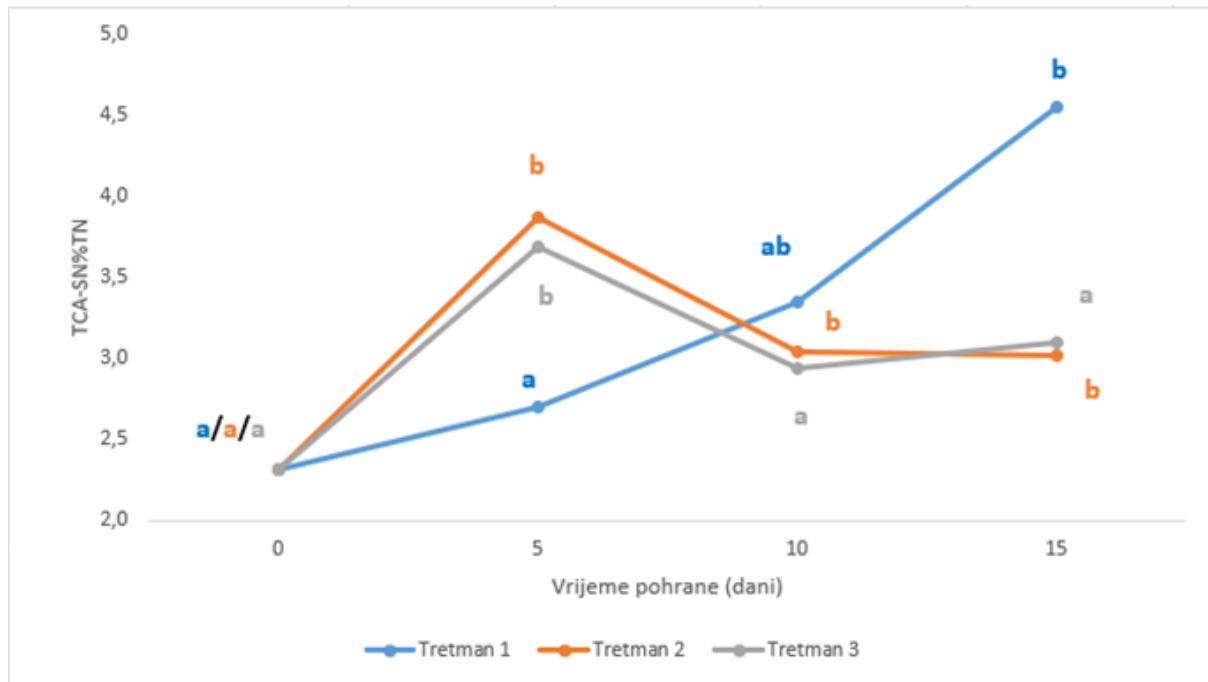


Tretman 1 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom (kontrolni sir); Tretman 2 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom i CaCl_2 ; Tretman 3 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom, CaCl_2 i ekstraktom bosiljka; a - c vrijednosti na liniji pojedinog tretmana označene različitim slovima značajno se razlikuju ($P < 0,05$).

Graf 4.1.1. Promjene WSN %TN vrijednosti tijekom pohrane mozzarelle u različitim vrstama salamure

Jedan od pokazatelja proteolize u siru je sadržaj topivog dušika u vodi (WSN %TN) (Golzarjalal i sur., 2024). Iz Grafikona 4.1.1. vidljivo je da se sadržaj WSN %TN značajno ($P < 0,01$) povećava tijekom svih 15 dana pohrane kontrolnog sira, dok tijekom pohrane sira iz grupe 2 i 3 dolazi do porasta sadržaja WSN %TN samo do 5. dana pohrane, nakon čega se sadržaj smanjuje. Kod skupine sireva koji se proizvode na visokim temperaturama kao što je mozzarella, razgradnja kazeina najvećim dijelom pripisuje se plazminu (Feeney i sur., 2002). Zbog njegove termostabilnosti, aktivnost plazmina (glavne proteinaze mlijeka) izražena je kod takvih sireva s obzirom da kod ostalih enzima zbog visokih temperatura dolazi do denaturacije. Posljedično tomu plazmin ima glavnu ulogu u primarnoj proteolizi takvih vrsta sireva (Fox i sur., 2015). Plazmin hidrolizira β -kazein na tri mjesta (McSweeney, 2004). Alinovi i sur. (2020) uočavaju značajno smanjenje sadržaja β -kazeina tijekom pohrane smrznute mozzarelle, dok nije bilo promjena u sadržaju frakcija $\alpha S1$, $\alpha S2$ i para- κ -kazeina. Kalcij dodan u salamuru odgovoran je za uspostavljanje ravnoteže između sadržaja kalcija iz vodene faze sira i koloidnog oblika kalcija što utječe i na sadržaj vode u siru (Luo i sur., 2013). Veći sadržaj vode u kontrolnom siru (Tablica 4.3.1.) utječe i na intenzivniji stupanj proteolize, odnosno veći sadržaj WSN %TN što je u skladu sa istraživanjem Luo i sur. (2013). Autori navode da je sadržaj

vode u mozzarellam sirevima koji su pohranjeni u salamuri sa 0.10% i 0,25% kalcij-klorida značajno manji u odnosu na mozzarellu pohranjenu u salamuri bez dodatka kalcija. Također, Joshi i sur. (2003) navode da pri proizvodnji mozzarelle s različitim udjelima dodanog kalcija dolazi do promjene intenziteta proteolize te da sir s manjom količinom dodanog kalcija kao posljedicu ima povećan udio ukupnih topivih proteina.



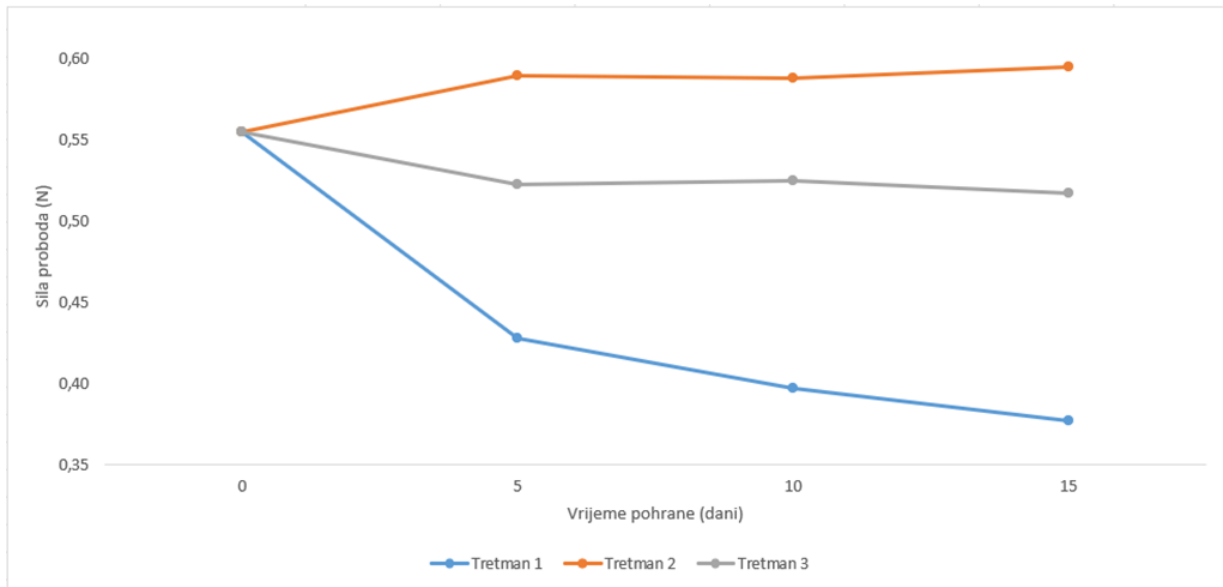
Tretman 1 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom (kontrolni sir); Tretman 2 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom i CaCl_2 ; Tretman 3 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom, CaCl_2 i ekstraktom bosiljka; a, b vrijednosti na liniji pojedinog tretmana označene različitim slovima značajno se razlikuju ($P < 0,05$).

Grafikon 4.1.2. Promjene TCA vrijednosti tijekom pohrane mozzarelle u različitim vrstama salamure

Grafikon 4.1.2. prikazuje sadržaj dušičnih tvari topivih u 12% trikloroctenoj kiselini (TCA-SN %TN) tijekom 15 dana pohrane sira. Vidljivo je da kontrolni uzorak tijekom cijelog perioda pohrane bilježi značajan ($P < 0,05$) porast sadržaja TCA-SN %TN. Značajni porast ($P < 0,05$) sadržaja TCA-SN %TN kod tretmana 2 i 3 vidljiv je između 0 i 5 dana, nakon čega se intenzitet proteolize smanjuje, što se može pripisati dodatku kalcij-klorida u salamuru kako je prethodno opisano. Sekundarna proteoliza odvija se pod djelovanjem proteinaza i peptidaza bakterija mliječne kiseline. Ukoliko se radi o toplinski obrađenom mlijeku nastaju tioldisulfidni kompleksi između plazmina i β -laktoglobulinu (β -lg). Nadalje, tioldisulfidni kompleksi dovode do smanjenja aktivnosti plazmina tijekom zrenja. Denaturirani serum proteini imaju sposobnost vezanja Ca^{2+} i rezistentni su na hidrolizu (Jovanović i sur., 2007; Benfeldt i sur., 1997). Slično su utvrdili Feeney i sur. (2002.). Dokazano je da kod mozzarelle s niskim udjelom vlage osim promijene pH vrijednosti i načina acidifikacije utjecaj na proteolizu ima i količina

kalcija. Metodom Urea-PAGE dobiveni su rezultati koji također prikazuju da smanjenjem omjera kalcija i kazeina dolazi do značajnog povećanja sekundarne proteolize.

4.2. Teksturane promjene mozzarelle



Tretman 1 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom (kontrolni sir); Tretman 2 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom i CaCl_2 ; Tretman 3 Pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom, CaCl_2 i ekstraktom bosiljka

Grafikon 4.2.1. Sila proboda tijekom pohrane mozzarelle u različitim vrstama salamure

Na grafikonu 4.2.1. vidljivo je da se sila proboda u kontrolnom uzorku smanjuje tijekom 15 dana pohrane, dok je kod sireva iz tretmana 2 i 3 sila proboda konstantna tijekom cijelog perioda pohrane. Smanjenje sile proboda kod kontrolnog uzorka rezultat je odsustva kalcij-klorida u salamuri, što je u skladu s rezultatima istraživanja Luo i sur. (2013). Autori navode da je površina sira soljenog u salamuri bez kalcija sluzava i mekana za razliku od sira soljenog u salamuri s dodanim kalcijem kod kojeg je površina sira tvrđa i suha. Zbog natrijevih iona dolazi do topljenja kalcija vezanog za kazein, te kalcij difundira iz sira u salamuru uslijed koncentracijskog gradijenta. Kazein u tom slučaju veže vodu i bubri što za posljedicu ima nastajanje mekane, sluzave i nepovezane površine sira. Dodavanjem CaCl_2 u salamuru navedena pogreška površine sira svodi se na minimum (Luo i sur., 2013; Faccia i sur., 2019). Slične rezultate su dobili Zappia i sur. (2020) koji su kao dodatak salamuri koristili koncentrirani sok bergamota sa i bez dodatka kalcij-laktata. Utvrdili su da najveću čvrstoću ima sir koji je bio pohranjen u salamuri koja je u svom sastavu imala koncentrirani sok bergamota i kalcij-laktata. Guinee i sur. (2002) također su došli do zaključka da smanjeni sadržaj kalcija u salamuri pri proizvodnji mozzarelle dovodi do hidratacije te bubrenja para-kazeinata što rezultira smanjenom čvrstoćom sira.

4.3. Utjecaj vrste salamure na fizikalno-kemijski sastav, proteolitičke i teksturne karakteristike sira

Tablica 4.3.1. Utjecaj vrste salamure na fizikalno-kemijski sastav, proteolitičke i teksturne karakteristike sira u tipu mozzarelle 15.dana pohrane

Parametar	Tretman			Razina značajnosti
	1	2	3	
	Limunska kiselina	Limunska kiselina + CaCl ₂	Limunska kiselina + CaCl ₂ + bosiljak	
Sila proboda (N)	0,38 ^a ± 0,02	0,60 ^b ± 0,05	0,52 ^b ± 0,05	**
WSN % TN	9,778 ^a ± 0,711	6,186 ^b ± 0,585	6,152 ^b ± 0,610	*
TCA % TN	4,549 ^a ± 0,401	3,013 ^b ± 0,543	3,092 ^b ± 0,305	*
Suha tvar(%)	38,48 ± 0,82	40,28 ± 0,87	40,68 ± 0,56	NZ
Proteini (%)	19,64 ± 0,30	20,11 ± 0,84	19,60 ± 1,29	NZ
pH	5,78 ± 0,14	5,94 ± 0,06	6,00 ± 0,01	NZ

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška; ^{a, b} vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju, ** P<0,01, *P<0,05, NZ= nije značajno

Iz tablice 4.3.1. vidljivo je da postoje značajne razlike u sili proboda (P<0,01) te sadržaju WSN %TN i TCA-SN %TN (P<0,05) između tretmana u 15. danu pohrane sira. Također je vidljivo da vrsta salamure statistički značajno ne utječe na sadržaj suhe tvari, proteina i pH sira. Značajno manja vrijednost sile proboda (P<0,01) uočena je za kontrolni sir u odnosu na sireve iz tretmana 2 i 3. Pohrana sira u salamuri koja sadrži samo limunsku kiselinu rezultira nastankom mekane površine sira zbog izlaženja kalcija iz sira u salamuru. Difuzija vode odgovorna je za prijenos tvari između sira i salamure u kojoj se sir nalazi (Luo i sur., 2013). Difuzijom dolazi do ispiranja kalcija s površine sira što rezultira nastajanjem sluzave površine sira (slika 4.3.1.). Kod tretmana 2 i 3 koji u sastavu salamure sadrže kalcij-klorid sila proboda je veća zbog manjeg prodora vode unutar sira. Dodatak kalcija u salamuru sprječava gubitak kalcija u salamuru i difuziju vode te nastanak sluzave površine (Luo i sur., 2013) što je vidljivo i na slici 4.3.2. Također je vidljivo da dodatak ekstrakta bosiljka nema značajan utjecaj na silu proboda s obzirom da nema statistički značajne razlike između tretmana 2 i 3.

Sadržaj WSN %TN i TCA-SN %TN značajno (P<0,05) je veći u kontrolnom siru u usporedbi sa sirevima iz tretmana 2 i 3 što je posljedica prisutnosti kalcij-klorida u salamuri za pohranu sireva iz grupe 2 i 3 odnosno većeg sadržaja vode u siru što intenzivira proces proteolize. Slično su dokazali Zappia i sur. (2020) u svom istraživanju. Značajno veći sadržaj WSN %TN nakon 13 dana pohrane zabilježena je za mozzarellu u salamuri sa dodatkom samo soka bergamota u odnosu na mozzarellu u salamuri s sokom bergamota i kalcij-laktata.

Dodatak ekstrakta bosiljka nema značajan utjecaj na teksturne karakteristike sira niti na razinu proteolize s obzirom da nema statistički značajne razlike između tretmana 2 i 3, iako je sadržaj WSN %TN niži u siru tretmana 3. Carocho i sur. (2016) navode da dodatak ekstrakta bosiljka i sušenog lišća bosiljka u proizvodnji Serra de Estrela sira smanjuje djelovanje proteolitičkih bakterija.



Slika 4.3.1. Izgled površine sira nakon 15 dana pohrane u salamuri tretmana 1



Slika 4.3.2. Izgled mozzarelle nakon 15 dana pohrane u salamuri (s lijeva na desno Tretman 1 - pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom), Tretman 2 - pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom i CaCl_2 , Tretman 3 - pohrana sira u salamuri s limunskom kiselinom, CaCl_2 i ekstraktom bosiljka)

5. Zaključak

Pohrana mozzarelle u salamuri koja u svom sastavu sadrži kalcij-klorid utječe na čvršću teksturu odnosno površinu sira. Dodatak kalcij-klorida u salamuru onemogućuje prodor vode iz salamure u unutrašnjost sira što sprečava stvaranje meke i sluzave površine sira. Vrsta salamure također ima utjecaj na proteolitičke promjene. Mozzarella u salamuri koja u sastavu nije imala kalcij-klorid ima intenzivnije proteolitičke promjene u usporedbi s mozzarellom pohranjenom u salamuri s kalcij-kloridom. Dodatak ekstrakta bosiljka nema utjecaj na razinu proteolize i teksturu sira.

6. Popis literature

1. Akarca G., Atik A., Atik İ., Denizkara A. J. (2023). A comparison study on functional and textural properties of mozzarella cheeses made from bovine and buffalo milks using different starter cultures. *International Dairy Journal*. 141: 105622.
2. Ali A. M., Abdel-Razig K. A. (2011). Cholesterol content of Mozzarella cheese during storage as affected by level of milk fat. *Pakistan Journal of Nutrition*. 65-70.
3. Alinovi M., Wiking L., Corredig M., Mucchetti G. (2020). Effect of frozen and refrigerated storage on proteolysis and physicochemical properties of high-moisture citric mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*. 103(9): 7775-7790.
4. Ardö Y., McSweeney P. L., Magboul A. A., Upadhyay V. K., Fox P. F. (2017). *Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis*. U: Cheese, 4. izd. (ur. McSweeney P. A. L.; Fox P. F.; Cotter P. D.; Everett D. W.), Academic Press. str. 445-482.
5. Banville V., Chabot D., Power N., Pouliot Y., Britten M. (2016). Impact of thermo-mechanical treatments on composition, solids loss, microstructure, and rheological properties of pasta filata-type cheese. *International Dairy Journal*. 61: 155-165.
6. Barukčić I. (2015). *Proizvodnja sira u zemljama Europske unije U: Sirarstvo u teoriji i praksi* (ur. Matijević B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, 71-84.
7. Benfeldt C., Sørensen J., Ellegård K. H., Petersen T. E. (1997). Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 7(11): 723-731.
8. Bonassi I. A., Carvalho J. D. C., Villares J. B. (1982). Use of buffaloes' milk for Mozzarella cheese. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 32: 903-912.
9. Cai H., Scholten E., Sala G., Bijl E. (2023). Linking casein hydrolysis by chymosin and plasmin to the rheological and textural properties of model cheese. *LWT-Food Science and Technology*. 186: 115158.
10. Carović-Stanko, K. (2013). *Bosiljak - hrana i lijek*. Masmedia. Zagreb.
11. Carocho M., Barros L., Barreira J. C., Calhelha R. C., Soković M., Fernandez-Ruiz V., Buelga C. S., Morales P., Ferreira I. C. (2016). Basil as functional and preserving ingredient in "Serra da Estrela" cheese. *Food Chemistry*. 207: 51-59.
12. Costabel L., Pauletti M. S., Hynes E. (2007). Proteolysis in Mozzarella cheeses manufactured by different industrial processes. *Journal of Dairy Science*. 90(5): 2103-2112.
13. De Candia S., De Angelis M., Dunlea E., Minervini F., McSweeney P. L. H., Faccia M., Gobbetti M. (2007). Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 119(3): 182-191.
14. Faccia M., Gambacorta G., Natrella G., Caponio F. (2019). Shelf life extension of Italian mozzarella by use of calcium lactate buffered brine. *Food Control*. 100: 287-291.
15. Feeney E. P., Guinee T. P., Fox P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*. 85(7): 1646-1654.

16. Fox P. F., McSweeney P. L., Paul L. H. (1998). Dairy chemistry and biochemistry. Thomson Science, London, Velika Britanija.
17. Fox P. F., McSweeney P. L., Cogan T. M., Guinee T. P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1, General aspects. Elsevier, Academic Press.
18. Fox P. F., Uniacke- Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A., (2015). Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edition. Springer. New York, SAD.
19. Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. (2000). Biochemistry of cheese ripening. U: Fundamentals of Cheese Science (ur. Colilla J.), Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland, SAD, str. 236-278.
20. Golzarjalal M., Ong L., Neoh C. R., Harvie D. J., Gras S. L. (2024). Machine learning for the prediction of proteolysis in Mozzarella and Cheddar cheese. Food and Bioproducts Processing. 144: 132-144.
21. Gonçalves M.C., Cardarelli H.R. (2021). Mozzarella Cheese Stretching: A Minireview. Food Technology and Biotechnology. 59(1), 82-91
22. Guinee T. P., Feeney E. P., Auty M. A. E., Fox P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science. 85(7), 1655-1669.
23. Havranek J., Kalit S., Antunac N., Samaržija D. (2014). Sirarstvo. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
24. HRN EN ISO 5534 (2008). Sir i topljeni sir - Određivanje sadržaja suhe tvari (Referentna metoda). Hrvatski zavod za norme: Zagreb, Hrvatska.
25. HRN EN ISO 8968-1 (2014). Određivanje udjela proteina metodom blok digestije- Kjeldahlovo načelo. Hrvatski zavod za norme: Zagreb, Hrvatska.
26. Jana A. H., Mandal P. K. (2011). Manufacturing and Quality of Mozzarella Cheese: A Review. International Journal of Dairy Science. 6: 199-226
27. Joshi N. S., Muthukumarappan K., Dave R. I. (2003). Understanding the role of calcium in functionality of part skim Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science. 86(6): 1918-1926.
28. Joshi N. S., Muthukumarappan K., Dave R. I. (2004). Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science. 87(7): 1975-1985.
29. Josipović R., Markov K., Frece J., Stanzer D., Cvitković A., Mrvčić J. (2016). Upotreba začina u proizvodnji tradicionalnih sireva, Mljekarstvo. 66 (1): 12-25.
30. Jovanović S., Mačej O., Barać M., Vučić T. (2007). Promjene dušičnih tvari tijekom zrenja polutvrdog sira proizvedenog na temelju koagregata proteina mlijeka. Mljekarstvo. 57(3): 169-193.
31. Lawrence R. C., Creamer L. K., Gilles J. (1987). Texture development during cheese ripening. Journal of Dairy Science. 70(8): 1748-1760.
32. Luo J., Pan T., Guo H. Y., Ren F. Z. (2013). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. Journal of Dairy Science. 96(2): 824-831.

33. McSweeney P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3): 127-144.
34. Parafati L., Siracusa L., Pesce F., Restuccia C., Fallico B., Palmeri R. (2023). Mango (*Mangifera indica* L.) young leaf extract as brine additive to improve the functional properties of mozzarella cheese. *Food Chemistry*. 425: 136474.
35. Rako A. (2016). Utjecaj sastava ovčjeg mlijeka na proteolitičke i teksturne promjene bračkog sira tijekom zrenja. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
36. Renda A., Barbano D. M., Yun J. J., Kindstedt P. S., Mulvaney S. J. (1997). Influence of screw speeds of the mixer at low temperature on characteristics of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*. 80(9): 1901-1907.
37. Ricciardi A., Guidone A., Zotta T., Matera A., Claps S., Parente E. (2015). Evolution of microbial counts and chemical and physico-chemical parameters in high-moisture Mozzarella cheese during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*. 63(2): 821-827.
38. Romeo F.V., De Luca S., Piscopo A., Poiana M. (2008). Antimicrobial effect of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 20: 373–379.
39. Rowney M. K., Hickey M. W., Roupas P., Everett D. W. (2003). The effect of homogenization and milk fat fractions on the functionality of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*. 86(3): 712-718.
40. Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
41. Yun J. J., Barbano D. M., Kindstedt P. S. (1993). Mozzarella cheese: impact of milling pH on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science*. 76(12): 3629-3638.
42. Zappia A., Branca M. L., Piscopo A., Poiana M. (2020). Shelf life extension of mozzarella cheese packed in preserving liquid with calcium lactate and bergamot juice concentrate. *Journal of Dairy Research*. 87(4): 474-479.
43. Zhang M., Liu Z., Kang F., Wu K., Ni H., Han Y., Yang Y., Fu T., Yang G., Gao T., Han L. (2024). Is milk fat globule size correlated with milk fat content in Ruminants?. *Food Chemistry*. 439: 138101.

7. Popis slika, grafova i tablica

Popis slika

Slika 2.2.1. Dijagram tijeka proizvodnje mozzarelle (Izvor: Jana i Mandal, 2011)

Slika 2.4.1. Opći biokemijski putevi tijekom zrenja sira (Izvor: Marilley i Casey, 2004)

Slika 2.4.1.1. Opći putevi katabolizma slobodnih masnih kiselina (Izvor: McSweeney i Sousa, 2000)

Slika 3.1.1. Dodavanje mikrobnog sirila u mlijeko

Slika 3.1.2. Završetak sirenja

Slika 3.1.3. Rezanje gruša sirarskom harfom

Slika 3.1.4. Ocjeđivanje sirutke iz sirnog gruša

Slika 3.1.5. Soljenje sirnog tijesta)

Slika 3.1.6. Razvlačenje sirnog tijesta

Slika 3.1.7. Oblikovanje mozzarelle

Slika 3.1.8. Pripremljene salamure

Slika 3.1.9. Uzorci mozzarelle pohranjene u tri vrste salamure

Slika 3.3.1. Metoda blok digestije

Slika 3.4.1. Teksturni analizator

Slika 4.3.1. Izgled površine sira nakon 15 dana pohrane u salamuri tretmana 1 (voda i limunska kiselina)

Slika 4.3.2. Izgled sireva nakon 15 dana pohrane u slamuri

Popis grafova i tablica

Grafovi

Graf 4.1.1. Promjene WSN vrijednosti tijekom pohrane

Graf 4.1.2. Promjene TCA vrijednosti tijekom pohrane

Graf 4.2.1. Sila proboda tijekom pohrane

Tablice

Tablica 4.3.1. Utjecaj vrste salamure na fizikalno-kemijski sastav, proteolitičke i teksturne karakteristike sira u tipu mozzarelle 15. dana pohrane

Životopis

Antonija Vukman rođena je 30.08.2000. godine u Splitu. Pohađala je osnovnu školu Dinka Šimunovića u Hrvacama, 2015. godine upisuje Opću gimnaziju Dinka Šimunovića u Sinju koju završava 2019. godine. 2019. godine upisuje stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija na Veleučilištu "Marko Marulić" u Kninu. Studij završava 2022. godine obranom završnog rada na temu Probiotici i prebiotici kao dodatak prehrani. Iste godine upisuje diplomski studij na Agronomskom fakultetu, smjer Proizvodnja i prerada mlijeka. Vrlo dobro se služi engleskim jezikom te Microsoft Office paketom.