

Svojstva i trajnost svježeg ovčjeg sira proizvedenog dodatkom protektivne kulture

Martić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:483051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Ivan Martić

932/PI

**SVOJSTVA I TRAJNOST
SVJEŽEG OVČJEG SIRA
PROIZVEDENOG DODATKOM
PROTEKTIVNE KULTURE**

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

ZAHVALA

U prvom redu se zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Ireni Barukčić na stručnoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade rada. Zahvaljujem se i doc.dr.sc. Katarini Lisak Jakopović te Snježani Šimunić, tehničkoj suradnici na prijateljskom pristupu, srdačnoj i stručnoj pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada.

Zahvala i onima koji su uvijek tu: mami, tati, Ani.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambeno inženjerstvo

SVOJSTVA I TRAJNOST SVJEŽEG OVČJEG SIRA PROIZVEDENOG DODATKOM PROTEKTIVNE KULTURE

Ivan Martić 932/PI

Sažetak: Svježi ovčji sirevi proizvedeni su na tri različita načina: dodatkom mezofilnih sirarskih kultura, sirarskih kultura i tekućeg sirila te dodavanjem sirarske kulture, tekućeg sirila i protektivne kulture. Pakirani su u normalnoj atmosferi i skladišteni u hladnjaku 28 dana. Uzorci sireva izuzimani su i analizirani svaka četiri dana. Tijekom skladištenja bilježi se porast pH vrijednosti te smanjenje titracijske kiselosti sireva, a mikrobiološkom analizom utvrđen je porast broja naraslih kolonija mikroorganizama. Sirevi proizvedeni dodatkom sirarske kulture, tekućeg sirila i protektivne kulture (KSP) imaju najdužu trajnost (21 dan) i kod njih se bilježi najsporiji rast mikroorganizama tijekom skladištenja. Svi sirevi postigli su vrlo dobre ocjene (raspon bodova 17,7 - 20) prilikom senzorske analize, a uzorci proizvedeni dodatkom protektivne kulture zadržavaju odlična senzorska svojstva (20 bodova) čak do 14. dana skladištenja. Na osnovu rezultata provedenih analiza može se zaključiti da dodatak protektivne kulture u proizvodnji svježeg ovčjeg sira produljuje rok trajanja za 12 dana u odnosu na kontrolni uzorak uz očuvanje poželjnih fizikalno - kemijskih i senzorskih svojstava.

Glavne riječi: svježi sir, ovčje mlijeko, trajnost, protektivna kultura

Rad sadrži: 51 stranica, 8 slika, 15 tablica, 59 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc. dr. sc. Irena Barukčić*

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Rajka Božanić*
2. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić*
3. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković*
4. Prof.dr.sc. *Nada Vahčić* (zamjena)

Datum obrane: 21. rujna, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Engineering

CHARACTERISTICS AND SHELF LIFE OF FRESH SHEEP CHEESE PRODUCED BY ADDING PROTECTIVE CULTURE

Ivan Martić 932/PI

Abstract: Fresh sheep cheeses are produced in 3 different ways: by adding mesophilic starter cultures, mesophilic cultures and liquid rennet and by adding starter culture, rennet and protective culture. Fresh cheeses were packed under normal atmosphere and stored in fridge for 28 days. Cheese samples were analyzed every 4 days. During the storage period the pH value of fresh cheeses increased, while titratable acidity decreased. Microbiological analysis showed that the viable cell counts of the examined microorganisms increased progressively. Fresh cheeses produced by adding starter culture, liquid rennet and protective culture (KSP) had the longest shelf life (21 days) and showed the slowest growth of microorganisms during storage. All samples were evaluated by high sensory scores and those produced by adding protective culture retained excellent sensory properties until the 14th day of storage. All analysis confirmed that addition of protective culture in the production of fresh sheep cheese significantly prolonged its shelf life while preserving desirable physico – chemical and sensory characteristics.

Keywords: fresh cheese, sheep milk, shelf life, protective culture

Thesis contains: 51 pages, 8 figures, 15 tables, 59 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor

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

Reviewers:

1. PhD. *Rajka Božanić*, Full professor
2. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
3. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor
4. PhD. *Nada Vahčić*, Full profesor (substitute)

Thesis defended: 21 October 2018

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Mlijeko	2
2.1.1. Ovčje mlijeko.....	2
2.2. Sir	3
2.2.2. Proizvodnja svježih sireva.....	4
2.3. Dodaci u proizvodnji svježeg sira.....	5
2.3.1. Mikrobne kulture.....	5
2.3.2. Sirilo	7
2.4. Mikrobiologija mlijeka i svježeg sira	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijal	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.2. Kemikalije i reagensi za provođenje kemijskih i mikrobioloških analiza	12
3.1.3. Aparatura i pribor za provođenje fizikalno-kemijskih i mikrobioloških analiza	13
3.1.4. Postupak proizvodnje sira.....	15
3.2. Metode rada	16
3.2.1. Fizikalno-kemijske analize mlijeka i sireva.....	16
3.2.2. Određivanje kiselosti pH - metrom	16
3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet - Henkelu	17
3.2.4. Određivanje udjela proteina modificiranom metodom po Kjeldahlu	18
3.2.5. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku metodom po Gerberu	19
3.2.6. Određivanje gustoće mlijeka laktodenzimetrom	19
3.2.7. Određivanje koncentracije mineralnih tvari u mlijeku i svježim sirevima.....	19

3.2.8. Određivanje boje svježih sireva	21
3.2.9. Određivanje teksture sireva	21
3.3. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda	22
3.3.1. Priprema uzoraka	22
3.4. Senzorska analiza svježih sireva	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Prinos sira i volumen izdvojene sirutke	28
4.2. Aktivna i titracijska kiselost svježih ovčjih sireva	29
4.3. Mikrobiološka analiza uzoraka mlijeka i svježeg sira	31
4.4. Senzorska analiza svježih ovčjih sireva	34
4.5. Boja sireva i mlijeka	37
4.6. Tekstura sireva	38
4.7. Udio proteina u svježim ovčjim sirevima	39
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Sir je svježi ili zreli proizvod dobiven grušnjem mlijeka (sirutke, stepke, vrhnja ili njihove kombinacije) uz izdvajanje sirutke (tekućine nastale tijekom obrade gruša). Naziv svježi sir smatra se najprikladnijim za sireve koji se ne podvrgavaju procesu zrenja (Milić, 1984). U Republici Hrvatskoj svježi sir proizvodi se industrijski te tradicionalnim načinom, naročito u području sjeverne Hrvatske i Slavonije. Kod industrijske proizvodnje svježeg sira najčešće se koriste pasterizirano mlijeko te selekcionirane mikrobne kulture koje osiguravaju jednolične karakteristike sireva, dok se u domaćinstvima svježi sir proizvodi od sirovog, termički neobrađenog mlijeka (Kirin, 2009). U ovom istraživanju proizvodio se svježi sir od ovčjeg mlijeka s područja otoka Paga, koji se ne proizvodi tradicionalno i nije bio tematika dosadašnjih istraživanja.

Svježi sir karakterizira visok udio vode, nizak udio mliječne masti te pojačana kiselost (Sabljak i sur., 2013). Jedan od najvećih nedostataka u proizvodnji svježeg sira jest kratka trajnost što nerijetko predstavlja probleme kako proizvođačima, tako i potrošačima. Stoga, produljenje trajnosti svježeg sira predstavlja jedan od najvećih izazova za mljekarsku industriju.

Cilj ovog rada jest ispitivanje fizikalno - kemijskih, mikrobioloških i senzorskih karakteristika svježih ovčjih sireva te produljenje trajnosti svježeg sira, uz očuvanje njegovih nutritivnih i senzorskih značajki, uporabom protektivnih kultura. U moderno vrijeme protektivne kulture često se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda zbog usporavanja rasta bakterija, kvasaca i plijesni čime pogoduju produljenju mikrobiološke ispravnosti (Grattepanche i sur., 2008). Kako bi se pratio utjecaj protektivnih kultura na trajnost sira, mikrobiološka analiza svježih sireva provedena je 1., 5., 9., 14., 21. i 28. dana skladištenja odnosno do zadnjeg dana trajnosti sireva.

Osnovna svrha rada je utvrđivanje mogu li protektivne kulture produljiti trajnost svježih ovčjih sireva, a da se pri tome ne zabilježe značajne promjene na fizikalnim, kemijskim i senzorskim karakteristikama sireva.

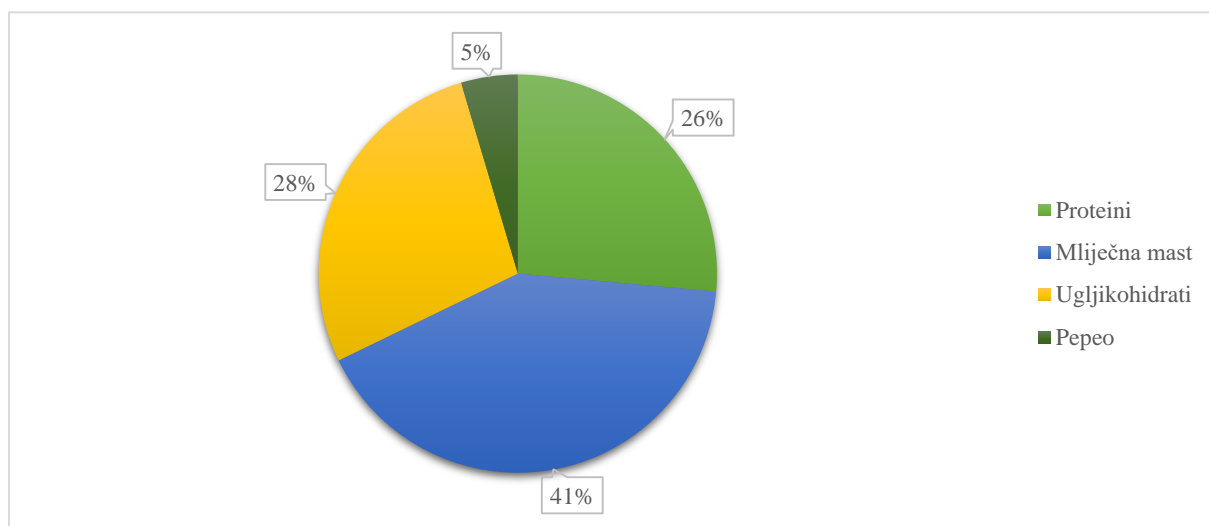
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mlijeko

Mlijeko označava prirodni sekret mliječne žlijezde životinja iz uzgoja, dobiven jednom ili više mužnji, kojemu nije ništa dodano niti oduzeto (Pravilnik, 2017a). Sastav mlijeka vrlo je složen, a glavne sastojke čine: voda, mliječna mast, laktoza, proteini i pepeo čiji je udio promjenjiv ovisno o brojnim čimbenicima. Mlijeko ima karakterističan izgled, okus i miris, a boja mu varira od bijele do žućkaste ovisno o vrsti životinje od koje potječe (Tratnik i Božanić, 2012). Od ukupne globalne proizvodnje mlijeka, više od čak 85% otpada na proizvodnju kravljeg mlijeka, a zatim slijedi višestruko manja proizvodnja bivoljeg, ovčjeg te kozjeg mlijeka.

2.1.1. Ovčje mlijeko

Proizvodnja ovčjeg mlijeka u Republici Hrvatskoj bazira se na tradicionalnim pasminama koje su prilagođene oskudnim primorskim vegetacijama, siromašnom tlu i nedostatku oborina. Ovčje mlijeko karakterizira veći sadržaj proteina i mliječne masti u odnosu na kravlje, stoga se ono prvenstveno koristi za proizvodnju tvrdih sireva, osobito u primorskim dijelovima Hrvatske (Pandek i sur., 2005). Upravo zbog većeg sadržaja suhe tvari, randman ovčjeg mlijeka je skoro 2 puta veći od kravljeg i ono se gotovo u potpunosti koristi za proizvodnju sira (Antunac i Lukač Havranek, 1999).



Slika 1. Prosječni sastav (%) ovčjeg mlijeka (Bylund, 2003)

Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (Pravilnik 2017b), ispravnim uzorcima ovčjeg mlijeka se smatraju oni koji sadrže najmanje 3%, a najviše 12% mliječne masti te najmanje 3,8%, a najviše 8% proteina. Sirovo ovčje mlijeko ne smije sadržavati manje od 9,5% suhe tvari bez masti i gustoća mu ne smije biti niža od $1,034 \text{ gcm}^{-3}$ pri temperaturi od 20°C (Pravilnik, 2017b).

2.2. Sir

Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sireva dozvoljena je upotreba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima i/ili dozvoljenih kiselina za koagulaciju (Pravilnik, 2009). U proizvodnji svih vrsta sireva primjenjuju se postupci sirenja mlijeka te sušenja i oblikovanja sirnog zrna, a vrlo često se koriste i specifični postupci obrade gruša za proizvodnju točno određene vrste sira (Tratnik i Božanić, 2012).

Sirevi se prema sadržaju vode u bezmasnoj suhoj tvari sira dijele na: ekstra tvrde (<51%), tvrde (49 - 56%), polutvrde (54 - 59%), meke (>67%) i svježe (69 - 85%), dok se prema sadržaju masti u suhoj tvari dijele na: ekstramasne, punomasne, masne, polumasne i posne sireve. Česta je i podjela sireva prema načinu zrenja i to na sireve koji ne zriju (svježi sirevi), na one koji zriju pretežno s bakterijama u unutrašnjosti, na one koji zriju pretežno s bakterijama na površini i na one koji zriju s plijesnima pretežno u unutrašnjosti i s plijesnima pretežno na površini (Kalit, 2015).

Kravlje mlijeko najčešće se koristi kao sirovina za proizvodnju sireva u Republici Hrvatskoj, ali se u primorskim dijelovima tradicionalno proizvode i tvrdi sirevi napravljeni od ovčjeg mlijeka kao što su: Paški sir, Krčki sir, Creski sir, Istarski pecorino itd. Prema podacima Kanadskog mljekarskog informacijskog centra (Canadian dairy information centre - CDIC), u Republici Hrvatskoj se 2016. godine konzumiralo samo 13,0 kg sira po stanovniku po čemu smo znatno ispod europskog prosjeka (18,6 kg). Na svjetskoj razini prednjače Danci (28,1 kg/stanovnik/godišnje), dok se sir najmanje konzumira u azijskim zemljama, naročito u Kini (0,1 kg/stanovnik/godišnje) (CDIC, 2018).

2.2.1. Svježi sirevi

Procjenjuje se da proizvodnja svježih sireva čini otprilike 30% ukupne svjetske proizvodnje sireva (Schulz - Collins i Senge, 2004). Svježi sirevi definiraju se kao sirevi koji sadrže 65 - 85% vode i proizvode se mliječno - kiselom fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline, s tim da se u industrijskoj proizvodnji nerijetko dodaju i manje količine sirila (Božanić, 2015). Iako dodavanje sirila omogućuje stvaranje čvršćeg gruša i smanjuje gubitke kazeina tijekom naknadnog izdvajanja sirutke, ono nije neophodno u proizvodnji svježih sireva (Fox i sur., 2017). Svježi sirevi najčešće se proizvode od obranog mlijeka, a mogu se proizvesti i od punomasnog mlijeka pa se tada nazivaju kremastim svježim sirevima. U skupinu svježih sireva spada i zrnati sir koji se proizvodi od obranog mlijeka i karakterizira ga posebna čvrstoća sirnog zrna (Božanić, 2015). Svježi sirevi su karakterističnog srednje kiselog okusa, bijele boje i konzistencije koja se lista. Zajednička karakteristika svih svježih sireva je da ne prolaze fazu zrenja, već su odmah spremni za konzumaciju (Radošević i sur., 2007). Velike su razlike u karakteristikama svježih sireva proizvedenih mliječno-kiselom fermentacijom u usporedbi sa sirevima proizvedenim samo dodatkom sirila:

- sadrže veći udio vode (55 - 84% u odnosu na 32 - 60%), imaju nižu pH vrijednost (4,4 - 5,0 u odnosu na 4,9 - 6,0) te manji udio proteina (10 - 15% u odnosu na 16 - 34%) i kalcija (<0,15% u odnosu na >0,4%)
- mekši su i manje žvackljivi
- konzumiraju se svježi (ne zahtijevaju proces zrenja) i uglavnom imaju kraći rok trajanja (Fox i sur., 2017)

2.2.2. Proizvodnja svježih sireva

U proizvodnji svježih sireva primjenjuje se koagulacija kazeina mliječnom kiselinom djelovanjem kulture mezofilnih bakterija mliječne kiseline ili termofilnih za probiotičke vrste (Tratnik i Božanić, 2012). Postoje značajne razlike u industrijskoj i tradicionalnoj odnosno domaćinskoj proizvodnji svježeg sira. Kod tradicionalne proizvodnje se svježe pomuzeno i procijeđeno mlijeko nalijeva u staklene ili plastične posude te ostavlja 2-3 dana na prohladnom mjestu da se spontano ukiseli. Nakon kiseljenja, s površine zgrušanog mlijeka obere se površinski izdvojeno vrhnje, a mlijeko se prelijeva u posudu i podgrijava tijekom 2-3 sata. Potom se gruš izlijeva u cjediljke, zdjelice s gazom ili u sirne vrećice u kojima se ocjeđuje. Prethodno se gruš može blago rezati na veće komade kako bi se olakšala sinereza (Kirin, 2009;

Radošević i sur., 2007). Također, za poboljšanje sinereze gruša se može i naknadno dogrijavati, ali ne na previsokim temperaturama već na temperaturama tek nešto višim od temperature sirenja (Tratnik i Božanić, 2012). Tako dobiveni sirevi čuvaju se do potrošnje ili prodaje na hladnom mjestu. Često se dobiveni sirevi miješaju s vrhnjem, zasoljavaju i oblikuju u male stošce te suše (Božanić, 2015). U Hrvatskoj se takvi sirevi najčešće proizvode u sjeverozapadnom dijelu i imaju nazive poput prgica ili turoš. Turoš pripada skupini svježih, osušenih, slanih sireva s dodatkom mljevene crvene paprike i najčešće ima konusni oblik. Tradicionalno se proizvodi na području Međimurja od svježeg kravljeg mlijeka bez dodatka mljekarskih kultura (Valkaj i sur., 2013).

U industrijskoj se proizvodnji, osim mikrobnih kultura, u prethodno pasteurizirano te ohlađeno mlijeko dodaju i manje količine sirila. Dodavanje sirila je karakteristično za sireve poput Quarka ili Cottagea, a dodaje se otprilike oko 0,5 - 1 mL tekućeg sirila na 100 L mlijeka, što je 10 puta manja količina od količine potrebne za sirenje mlijeka u proizvodnji zrelih sireva (Fox i sur., 2017). Sirilo se dodaje 1 - 2 sata nakon dodavanja mikrobnih kultura odnosno kad se pH vrijednost spusti do vrijednosti 6,1 - 6,3. Neke od prednosti uporabe sirila su primjerice: veće oslobađanje sirutke, nastanak manje sirne prašine te veća stabilnost sirnih zrna (Tratnik i Božanić, 2012; Lucey i sur., 2001). Fermentacija se provodi u zatvorenom spremniku ili otvorenoj kadi, najčešće pri temperaturi 25 - 28°C i prekida kad se dostigne pH vrijednost 4,5 - 4,7 što je vrlo blizu pH vrijednosti izoelektrične točke kazeina. Pomoću cijevnog ili pločastog izmjenjivača topline provodi se termalizacija gruša nakon sirenja i to pri temperaturi oko 60°C u trajanju 3 minute. Nakon termalizacije, gruša se hladi na 37°C i odvodi u centrifugalni separator gdje se sirutka odvaja od gruša. Zatim se gruša hladi u cijevnom izmjenjivaču topline do temperature 8 - 12°C te pakira najčešće u plastične posudice. Trajnost svježih sireva najčešće iznosi 2 - 3 tjedna što ovisi o proizvodnom procesu, korištenim mikrobnim kulturama, dodacima te načinu i temperaturi čuvanja (Tratnik i Božanić, 2012).

2.3. Dodaci u proizvodnji svježeg sira

2.3.1. Mikrobne kulture

Mikrobne kulture definiraju se kao pažljivo odabrani mikroorganizmi koji se dodaju u mlijeko ili gruša zbog iniciranja i izvođenja poželjne fermentacije i zrenja u proizvodnji različitih tipova sira, ali i fermentiranih mlijeka (Matijević, 2015). Ovisno o korištenoj vrsti mikroorganizama, postoje različite uloge mikrobnih kultura kao što su:

- fermentacija laktoze do mliječne kiseline što omogućuje optimalnu izradu sira i sprječava rast mikroorganizama kvarenja i patogenih mikroorganizama;
- proizvodnja širokog spektra enzima i metabolita koji imaju značaj u formiranju okusa, arome i cjelokupnih senzorskih svojstava tijekom zrenja
- proizvodnja različitih antimikrobnih tvari (uz mliječnu kiselinu nastaju i bakteriocini) koje sprječavaju razmnožavanje i preživljavanje patogenih mikroorganizama
- poboljšanje zdravstvenih svojstava sira (npr. nastanak bioaktivnih peptida)
- djelomična hidroliza i proteoliza (Tratnik i Božanić, 2012; Rogelj, 2015)

Primarna uloga mikrobne kulture je acidifikacija gruša u sirarskom kotlu i postizanje konačne pH vrijednosti, a sekundarna uloga očituje se tijekom zrenja, posebice tijekom proteolize kao važnog čimbenika u razvoju okusa sira (Radeljević i sur., 2013). Za proizvodnju kiseline primarno su odgovorne homofermentativne vrste bakterija (konačni produkt fermentacije je samo mliječna kiselina), dok su heterofermentativne vrste ponajviše odgovorne za tvorbu tvari arome u grušu sira, naročito one vrste koje metaboliziraju i citrate (konačni produkti fermentacije su mliječna kiselina, CO₂ i etanol) (Tratnik i Božanić, 2012; Rogelj, 2015). Bakterije mliječne kiseline koje se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda dijele se u dvije osnovne skupine na:

1. mezofilne bakterije mliječne kiseline (optimalna temperatura rasta 20 - 30°C)
2. termofilne bakterije mliječne kiselina (optimalna temperatura rasta 30 - 45°C) (Wouters, 2002)

U proizvodnji svježih sireva često se koriste i probiotičke kulture (sojevi *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*) zbog terapijskih svojstava tijekom probave sira te utjecaja na brže stvaranje koaguluma i bolju aromu svježih sireva (Tratnik i Božanić, 2012). Također, bakterije mliječne kiseline pokazuju antimikrobni utjecaj na patogene mikroorganizme, stimuliraju imunološki sustav, djeluju antikancerogeno te snižavaju koncentraciju kolesterola u serumu (Radošević i sur., 2007; Guarner i Malagelada, 2003).

U proizvodnji mliječnih proizvoda, pa tako i svježih sireva, koriste se mikrobne kulture u različitim oblicima koje mogu biti; vrlo koncentrirane kulture (DVS) za izravno naciepljivanje u mlijeko, koncentrirane zamrznute, osušene (liofilizirane) ili duboko zamrznute kulture (Matijević, 2015).

2.3.2. Sirilo

Za grušanje mlijeka djelovanjem enzima, u prošlosti su se najviše koristili pripravci kimozina izolirani iz želuca mlade teladi i janjadi. Nakon što se značajno povećala svjetska proizvodnja sireva, kimozijski pripravci zamijenjeni su pripravcima mikrobnih proteinaza kao što su enzimi izolirani iz plijesni *Rhizomucor miehei* i *Cryphonectria parasitica* (Tratnik i Božanić, 2012). Iako su mikrobnne proteinaze vrlo slične kazeinu, odlikuje ih nespecifična i izraženija proteolitička aktivnost u usporedbi s uporabom kimozina (Matijević, 2015). U današnje vrijeme najčešće se koriste rekombinantni kimozijski pripravci dobiveni postupkom genetičkog inženjerstva pomoću proizvodnih mikroorganizama kao što su: *Maxiren*, *Chy-Max* te *Chimogen*. Rekombinantni kimozin ima brojne prednosti: neograničena opskrba, manja osjetljivost na pH - vrijednost mlijeka, velika specifičnost djelovanja na κ - kazein, bolja čvrstoća sirnog gruša te optimalna aroma sira (Matijević, 2015; Tratnik i Božanić, 2012).

Primarna ili specifična aktivnost enzimskih pripravaka je destabilizacija micela kazeina odnosno cijepanje veze između 105. i 106. aminokiseline (fenilalanin i metionin) κ - kazeina. Zbog cijepanja te veze kazein gubi svoje svojstvo zaštite stabilnosti kazeinskog kompleksa s obzirom na djelovanje Ca-iona. Posljedica toga je koagulacija tj. stvaranje trodimenzionalne mreže gela (Repelius, 1998). Međutim, navedeni enzimski pripravci imaju i znatnu nespecifičnu proteolitičku aktivnost koja može uzrokovati gorak okus i manji randman sira. Zbog toga je važno da je nespecifična aktivnost mikrobnog sirila što niža ili da je enzim termolabilan jer se na taj način djelomično ili potpuno uništi tijekom procesa proizvodnje sira (Matijević, 2015; Repelius, 1998).

2.4. Mikrobiologija mlijeka i svježeg sira

Svježe pomuzeno mlijeko, koje sadrži samo mikrofloru iz unutrašnjosti zdravog vimena, može se nazvati i aseptičnim mlijekom. Takvo mlijeko sadržava samo prirodnu mikrofloru kod koje prevladavaju bakterije roda *Micrococcus*, a ponekad sadrži i određen broj korinebakterija te bakterija roda *Streptococcus*. U sirovom mlijeku mogu se pronaći i naknadno dospjeli mikroorganizmi koji kontaminiraju mlijeko i čine njegovu sekundarnu mikrofloru. Uglavnom su to bakterije, a rjeđe kvasci i plijesni koji dopijevaju u mlijeko putem sljedećih izvora: hrane i stelje, fecesa stoke, opreme za mužnju, ljudi, vode ili zraka (Tratnik i Božanić, 2012).

Mikrobiološka kvaliteta sira predstavlja značajan javno - zdravstveni interes, stoga su i kriteriji mikrobiološke ispravnosti sira i mlijeka vrlo visoki (Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o

mikrobiološkim kriterijima za hranu). Udovoljavanje ovim mikrobiološkim kriterijima ovisi o nizu čimbenika: sirovini koja se koristi u proizvodnji sira, dakle o mlijeku i načinima njegova dobivanja, provođenju dobre higijenske prakse, tehnološkom procesu proizvodnje, o uvjetima njegova čuvanja na mjestu proizvodnje, ali i domaćinstvu potrošača (HAH, 2016).

Tablica 1. Pregled obaveznih mikrobioloških kriterija za mlijeko i svježi sir (Vodič, 2011)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini i metaboliti	Plan uzimanja uzoraka		Granične vrijednosti		Ispitna referentna metoda	Faza u kojoj se kriterije primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
Pasterizirano mlijeko i drugi pasterizirani tekući mliječni proizvodi	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	$<1 \text{ cfu mL}^{-1}$	5 cfu mL^{-1}	ISO 21528-1	Kraj proizvodnog procesa	Provjera djelotvornosti termičke obrade i prevencije ponovnog zagađenja, kao i kvalitete sirovina
Nedozreli meki sirevi (svježi sirevi) načinjeni od mlijeka ili sirutke koji su pasterizirani ili još jače termički obrađeni	Koagulaza pozitivni stafilokoki	5	2	10 cfu g^{-1}	100 cfu g^{-1}	HRN EN ISO 6888-1 ili HRN EN ISO 6888-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanja higijene proizvodnje. Ako se otkriju vrijednosti $>10^5 \text{ cfu g}^{-1}$, ta serija sira se mora ispitati na prisutnost stafilokoknih enterotoksina

Tablica 2. Pregled preporučenih mikrobioloških kriterija za pasterizirano mlijeko i svježi sir (Vodič, 2011)

Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriteriji
		n	c	
Pasterizirano mlijeko i mliječni napitci	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25 mL
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 mL
	Koagulaza pozitivni stafilocoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	M=10 cfu mL ⁻¹
	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	m<1cfu mL ⁻¹ M=10cfu mL ⁻¹
	Aerobne mezofilne bakterije	5	1	m=10 ³ cfu ml ⁻¹ M=10 ⁴ cfu ml ⁻¹
Meki (svježi) sirevi od pasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n u 25 g
	<i>Escherichia coli</i>	5	2	m=10 cfu g ⁻¹ M=10 ² cfu g ⁻¹
	Koagulaza pozitivni stafilocoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	m=10 cfu g ⁻¹ M=10 ² cfu g ⁻¹
	Kvasci	5	1	m=10 ² cfu g ⁻¹ M=10 ³ cfu g ⁻¹
	Plijesni	5	1	m=10 cfu g ⁻¹ M=10 ² cfu g ⁻¹

Enterobakterije ili crijevne bakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja, a njihova patogenost povezana je s endotoksinima, egzotoksinima i sposobnošću razmnožavanja u krvi i tkivima (Panday i sur., 2000). Upravo su enterobakterije glavni uzročnik zdravstvene neispravnosti prehrambenih namirnica, stoga je vrlo važno provesti adekvatnu mikrobiološku kontrolu svježeg sira i mlijeka (Markov i sur., 2009).

Staphylococcus aureus smatra se najopasnijim ljudskim patogenom i ima sposobnost stvaranja endotoksina. Ova je bakterija prisutna u mlijeku i mliječnim proizvodima najčešće zbog toga što je u više od 90% slučajeva uzročnik mastitisa muznih životinja (Markov i sur., 2009). Brojna su istraživanja potvrdila prisutnost *S. aureus* u svježem siru, a u istraživanju Samaržije i sur. (2007) čak je 54% svježih sireva obuhvaćenih istraživanjem bilo pozitivno na stafilokoke. Upravo zato, tijekom mikrobiološke analize svježih sireva nužno je ispitati i broj koagulaza pozitivnih stafilokoka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju koristili su se uzorci svježeg ovčjeg mlijeka s otoka Paga koji su se, neposredno nakon mužnje, transportirali od OPG-a Fabijanić u gradu Pagu do Zagreba. Ovčje mlijeko s područja otoka Paga karakterizira drugačiji kemijski sastav te senzorska svojstva u odnosu na mlijeko s drugih geografskih područja. Kemijski sastav korištenog ovčjeg mlijeka naveden je u tablici 7. U ovom istraživanju za proizvodnju svježih ovčjih sireva koristili su se sljedeći dodaci: kultura 1 (Choozit MA 11 LYO 25 DCU, Danisco - DuPont, Francuska), kultura 2 (Choozit BT 01 LYO 50 DCU, Danisco - DuPont, Francuska), protektivna kultura (Holdbac YM-C Plus LYO 100 DCU, Danisco - DuPont, Francuska) te tekuće sirilo (Siris, Medimon, Split).

3.1.2. Kemikalije i reagensi za provođenje kemijskih i mikrobioloških analiza

0,1 M otopina NaCl (Carlo Erba Group, Cornaredo, Italija)

2%-tna alkoholna otopina fenoftaleina (GramMol, Zagreb, Hrvatska)

Puferi za kalibraciju elektrode pH-metra

5%-tna otopina kobaltovog sulfata ($\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Acros Organic, Geel, Belgija)

90-91%-tna sumporna kiselina (H_2SO_4) (GramMol, Zagreb, Hrvatska)

Izoamilni alkohol (Merck- Alkaloid, Skopje, Makedonija)

Sumporna kiselina 90% (T. T. T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Sumporna kiselina 96-98%

40%-tna otopina natrijevog hidroksida (NaOH)

4%-tna otopina borne kiseline (H_3BO_3)

Kjeldahlove tablete bez žive i selena

0,1 M HCl titrival

9%-tna fiziološka otopina (NaCl)

2%-tna otopina natrijeva citrata ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) (GramMol, Zagreb, Hrvatska)

Hranjiva podloga za određivanje enterobakterija - Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Milan, Italija)

Hranjiva podloga za određivanje kvasaca i plijesni - Sabouraud Dextrose Agar CAF 50 (Biolife, Milano, Italija)

Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja bakterija - Tryptic Glucose Yeast Agar (Biolife, Milano, Italija)

Hranjiva podloga za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka – Baird Parker agar (Biolife, Milano, Italija)

3.1.3. Aparatura i pribor za provođenje fizikalno-kemijskih i mikrobioloških analiza

Destilirana voda

pH - metar (Multi 340i, WTW, Wellheim, Germany)

Staklene čaše (100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)

Bireta

Lijevak

Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 250 mL)

Pipete (1 mL, 2 mL, 10 mL, 11 mL 20 mL)

Termometar

Plamenik

Stakleni štapić

Digitalna vaga (EB-1200C, Tehtnica, Telezniki, Slovenija)

Porculanski tarionik s tučkom

Menzure (10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)

Staklene i plastične Petrijeve ploče

Laktodenzimetar

Butirometar za mlijeko

Čep za butirometar

Stalak za butirometre

Centrifuga po Gerberu

Vodena kupelj

Kiveta za Kjeltec sustav (500 mL)

Odmjerna tikvica (250 mL)

Blok za spaljivanje (Tecator – Digestion system 6 1007 Digester)

Kjeltec Destiling Unit 1002 sustav za destilaciju

Žlica

Staklena zrnca

Vortex (MS2 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington, USA)

Električni grijač s magnetskom mješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Telezniki, Slovenija)

Autoklav (INKO, Zagreb, Hrvatska)

Epruvete

Stalak za epruvete

Štapić po Drigalskom

Mikropipete od 100 μ L i 1000 μ L

Magnet

Staklene boce

Termostat Uniblok 3U1 (INKO, Zagreb, Hrvatska)

Spektrofotometar CM-3500d (Konica Minolta, Nizozemska)

Uređaj za određivanje teksture TA.HD Plus (SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer, Surrey, England)

3.1.4. Postupak proizvodnje sira

3.1.4.1. Pasterizacija mlijeka

Sirovo mlijeko se stavlja u veliki lonac i provodi se postupak visoke pasterizacije tako da se mlijeko zagrijava na plameniku do temperature 90°C i zadržava pri toj temperaturi 10 minuta. Nakon što se provede postupak pasterizacije, zagrijani lonac stavlja se u hladnu vodu kako bi se mlijeko što prije ohladilo do temperature od 40 - 45°C koja je pogodna za obiranje mliječne masti.

3.1.4.2. Separacija mliječne masti iz mlijeka

Mliječna mast se iz mlijeka izdvaja u obliku vrhnja. Sva količina prethodno pasteriziranog mlijeka izlije se u bubanj separatora (EP-80, Technica, Dulles, SAD) i raspoređuje u slojeve između stijenki tanjura. Poželjno je da mlijeko bude zagrijano na temperaturu 40 - 45°C (ne više od 60°C) kako bi se smanjila viskoznost mlijeka i povećala efikasnost samog procesa. Globule mliječne masti, koje su najmanje gustoće od svih sastavnica mlijeka, kreću se prema osi rotacije, a obrano mlijeko prema obodu bubnja. Mliječna mast se odvodi kroz odvod za vrhnje i na taj način odvaja od obranog mlijeka. Tijekom provedenih pokusa, u obranom ovčjem mlijeku postotak mliječne masti iznosio je od 1,3% do 4,5%.

3.1.4.3. Priprema inokuluma i fermentacija

Ova faza proizvodnje provodila se na tri različita načina tijekom istraživanja:

1. Prvi način proizvodnje sastojao se od dijeljenja ukupne količine pasteriziranog mlijeka u 2 jednaka dijela, a svaki se dio podsiravao dodavanjem različite mezofilne sirarske kulture - kulture 1 (Choozit MA 11 LYO 25 DCU, Danisco-DuPont, Francuska) i kulture 2 (Choozit BT 01 LYO 50 DCU, Danisco-DuPont, Francuska). Inokulum se pripremio u sterilnim uvjetima tako da se u 50 mL mlijeka dodala točno određena količina kulture (0,0200 g kulture 1 i 0,0168 g kulture 2 za podsiravanje 2 L mlijeka), cjelokupni sadržaj se dobro promiješao i stavio u termostat na temperaturu od 30°C. Tako pripremljeni inokulum u večernjim se satima dodao u pasterizirano i zagrijano mlijeko (30°C), izmjerila se pH - vrijednost inokuliranog mlijeka i započela je fermentacija. Fermentacija se prekinula hlađenjem u ranim jutarnjim satima kad bi pH - vrijednost iznosila 4,6 - 4,7. Uobičajeno trajanje fermentacije kretalo se od 11 do 12 sati.

2. Drugi način proizvodnje provodio se gotovo identično, samo što se za pripremu inokuluma koristila isključivo kultura 1, a prilikom dodavanja inokuluma u mlijeko bi se dodalo i tekuće sirilo (Siris, Medimon, Split) u količini 0,2 mL na 2 L mlijeka. Time se trajanje fermentacije skratilo za 2 - 3 sata, stoga je ukupno trajanje fermentacije iznosilo 8 - 9 sati.

3. U trećem načinu proizvodnje se, uz kulturu 1 i tekuće sirilo u pasteurizirano mlijeko dodavala i protektivna kultura (Holdbac YM-C Plus LYO 100 DCU, Danisco-DuPont, Francuska) u količini 0,013 g na 2 L mlijeka.

3.1.4.4. Dogrijavanje i cijedenje gruša

Dobiveni gruš se razreže na sitne kockice (otprilike 5 cm x 5 cm) da bi se omogućila jača sinereza i stavi u vodenu kupelj zagrijanu na 65°C. Dogrijavanje gruša traje otprilike 2 - 3 sata i prekida se nakon provjere čvrstoće gruša i promatranja bistroće površinski izdvojene sirutke. Slijedi ocjeđivanje svježeg sira od zaostale sirutke preko perforiranih cjedila koje traje 30 - 60 minuta. Sir se nakon toga prekrio aluminijskom folijom i stavio u hladnjak do sutrašnjeg dana kad se izmjerila njegova težina, kao i volumen izdvojene sirutke.

3.2. Metode rada

3.2.1. Fizikalno-kemijske analize mlijeka i sireva

U svježem sirovom mlijeku, kao i na proizvedenim sirevima, provedene su sljedeće fizikalno - kemijske analize: određivanje kiselosti pH - metrom i titracijskom metodom po Soxhlet - Henkelu, određivanje proteina Kjeltel metodom te određivanje udjela mineralnih tvari (pepela), dok se samo za mlijeko još provelo i određivanje gustoće pomoću laktodenzimetra te određivanje udjela mliječne masti metodom po Gerberu.

3.2.2 Određivanje kiselosti pH - metrom

1) Određivanje kiselosti mlijeka pH - metrom

Prije uporabe elektroda je kalibrirana prema uputama proizvođača, nakon čega je isprana destiliranom vodom i osušena staničevinom. Tako pripremljena elektroda uranja se u mlijeko, a vrijednost pH se očitava na zaslonu pH - metra (Technische Werkstätten GmbH pH 3110, WTW, 17 Njemačka). Nakon uporabe elektroda se ponovno ispiru s destiliranom vodom, suši staničevinom i uranja u otopinu KCl-a (Bajt i sur., 1998).

2) Određivanje kiselosti sira pH - metrom

Sir se pomiješa s prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom u omjeru 3:10 i zatim se mjeri pH - vrijednost uranjanjem elektrode pH - metra u homogeniziranu smjesu sira i vode (Sabadoš, 1998).

3.2.3. Određivanje titracijske kiselosti metodom po Soxhlet - Henkelu

1) Određivanje titracijske kiselosti mlijeka metodom po Soxhlet - Henkelu

Metoda po Soxhlet - Henkelu je službena titracijska metoda za određivanje kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda u Republici Hrvatskoj. Mlijeko se titrira s 0,25 M NaOH, a rezultati se izražavaju u stupnjevima po Soxhlet - Henkelu ($^{\circ}SH$) koji odgovaraju broju mililitara 0,25 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenoftalein. No, u važećem Pravilniku navedena je modifikacija te metode u kojoj se koristi smjesa 20 mL mlijeka i 1 mL fenoftaleina koja se titrira do stabilne crvenkaste boje. Kiselost se izračuna po sljedećoj formuli:

$$^{\circ}SH = a * f * 2$$

a - broj mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju 20 mL mlijeka

f - faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M = 1

U dvije Erlenmeyerove tikvice otpipetira se po 20 mL mlijeka. U prvu tikvicu se otpipetira 0,4 mL 5%-tne otopine kobaltova sulfata ($CoSO_4 \cdot 7 H_2O$) te nastala boja predstavlja standardnu boju, odnosno nijansu blijedo ružičaste boje do koje se treba titrirati u drugoj tikvici. U drugu tikvicu otpipetira se 1 mL fenolftaleina te se titrira 0,1 M NaOH do promjene boje u blijedo ružičastu koja se mora zadržati 1 minutu. Prema prethodno navedenoj formuli izračuna se vrijednost kiselosti izračene u stupnjevima po Soxhlet – Henkelu (Božanić i sur., 2010).

2) Određivanje titracijske kiselosti sira

Titracijska kiselost sira predstavlja broj mL 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 g sira uz indikator fenolftalein. Postupak se odvija tako da se u tarioniku odvaže 5 g sira te se otopi s destiliranom vodom temperature 50°C. Pripremljena otopina kvantitativno se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu tako da ukupna količina bude 100 mL, nakon čega se emulziji doda 1 mL fenol ftaleina te titrira sa 0,1 M NaOH do promjene boje u blijedo crvenu koja se zadržava dvije minute (Bajt i sur., 1998).

Titracijska kiselost se izračuna po navedenoj formuli:

$$^{\circ}SH = a * f * 8$$

a - broj mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju 20 mL mlijeka

f - faktor otopine natrijeve lužine (NaOH) 0,1 M = 1

8 – razrjeđenje

3.2.4. Određivanje udjela proteina modificiranom metodom po Kjeldahlu

Odvagne se 5 g homogeniziranog uzorka i prebaci u kivetu od 500 mL tako da grlo kivete ostane čisto. Zatim se u kivetu doda 20 mL koncentrirane sumporne kiseline i katalizator u obliku tableta (Kjeldahl tabletten, Carl Roth GmbH, Njemačka). Kiveta se u digestoru lagano zagrijava u bloku za spaljivanje uz sve jače zagrijavanje. Spaljivanje je gotovo kad u kiveti zaostane bistra plavo - zelena tekućina bez neizgorelih crnih komadića uzorka. Kad se sadržaj u kiveti ohladi, razrijedi se destiliranom vodom i postavlja u sustav za destilaciju. Na postolje u destilacijskoj jedinici postavlja se Erlenmeyerova tikvica u kojoj se nalazi 25 mL borne kiseline te podigne u položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta se stavi na predviđeno mjesto i zatvore se sigurnosna vrata. Dozira se 50 mL 40% NaOH u Kjeldahlovu epruvetu, a sam postupak destilacije traje 4 minute. Dobije se destilat zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka. Nakon što se dobije destilat, provodi se titracija klorovodičnom kiselinom (0,1M HCl) direktno u prihvatnu tikvicu. U završnoj točki boja otopine postane blijedo ružičasta kao što je izgledala borna kiselina u tikvici prije destilacije. Potpuno isti postupak provede se i za slijepu probu u kojoj se nalaze svi reagensi osim uzorka.

Račun:

$$\% N = \frac{(V - V_s) * c(HCl) * 14,007 * 100}{m(\text{uzorak u mg})}$$

$$\% \text{ proteina} = \% N * F$$

gdje je:

V- utrošeni mL 0,1 M otopine HCl za titraciju uzorka

Vs- utrošeni mL 0,1 M otopine HCl slijepu probe

F- faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode) (HRN ISO 1871:1999, AOAC 991.22)

3.2.5. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku metodom po Gerberu

Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom po Gerberu zasniva se na kemijskom otapanju kazeina i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Izoamilni alkohol dodaje se kako bi snizio površinsku napetost mlijeka i olakšao izdvajanje mliječne masti. Mast se odvoji centrifugiranjem i količina se očitava na skali butirometra pri temperaturi od 65°C.

Postupak određivanja udjela mliječne masti u mlijeku odvija se tako da se u butirometar otpipetira trbušastim pipetama 10 mL sumporne kiseline, nakon toga 11 mL mlijeka, te na kraju 1 mL izoamilnog alkohola. Pri tome se treba voditi računa da se pipetiranje vrši uz stijenkicu butirometra kako ne bi došlo do pogreške u mjerenju. Butirometar se začepi tzv. „Gerberovim čepom“ i dobro promućka kako bi se mlijeko u potpunosti otopilo. Dolazi do razvoja topline te promjene boje iz svijetlosmeđe u tamnosmeđu što je ujedno i znak završetka reakcije i mućkanja. Dok je butirometar još uvijek vruć postavlja se u centrifugu (Nova Safety, Funke Gerber, Berlin, Njemačka) koja pri okretanju mora biti ravnomjerno opterećena. Centrifuga mora biti prethodno zagrijana na 65 °C i sam postupak centrifugiranja traje 5 - 10 minuta. Nakon centrifugiranja rezultat se očitava na skali butirometra (Sabadoš, 1998).

3.2.6. Određivanje gustoće mlijeka laktodenzimetrom

Areometar (laktodenzimetar) služi za određivanje gustoće mlijeka po načelu Arhimedova zakona prema kojem svako tijelo uronjeno u tekućinu prirodno gubi od svoje težine onoliko koliko teži tijelom istisnuta tekućina. Laktodenzimetar ima dvije skale od kojih jedna pokazuje temperaturu, a druga gustoću mlijeka. Postupak određivanja gustoće mlijeka odvija se tako da se mlijeko nalije do vrha menzure koja je položena u poklopac Petrijeve ploče. Zatim se laktodenzimetar uroni u menzuru tako da pliva u mlijeku, a nakon 2 minute očitavaju se temperatura i gustoća mlijeka (Bajt i sur., 1998).

3.2.7. Određivanje koncentracije mineralnih tvari u mlijeku i svježim sirevima

U postupcima pripreme uzoraka i standarda korištena je kiselina HNO₃ (65%, v/v) i vodikov peroksid H₂O₂ (30%, v/v) (Kemika d.o.o., Hrvatska). U analizama je korištena ultra-čista voda (18 MΩxcm) dobivena sustavom pročišćavanja NIRO VV UV UF 20 (Nirosta d.o.o. Water Technologies, Osijek, Croatia).

Koncentracije mineralnih tvari prisutnih u ovčjem mlijeku i svježim ovčjim sirevima određene su primjenom tehnike induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP - MS). Postupak započinje tako da se uzorci sireva i mlijeka važu u posudicama (2 g) i doda se 1 mL

H₂O₂ te 6 mL HNO₃. Mokro spaljivanje uzoraka odvija se u mikrovalnoj pećnici Multiwave 3000 (Anton Paar, Ostfildern, Njemačka) provođenjem digestije u 2 koraka: prvi korak snage 800 W 15 minuta uz zadržavanje 15 minuta te drugi korak snage 0 W 15 minuta. Otopljeni uzorci se prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL i do vrha dopune ultra-čistom vodom. Isti postupak koristi se za slijepu probu, ali bez uzorka.

Kvantitativna analiza provedena je pomoću metode kalibracijske krivulje. Granice detekcije elemenata su izračunate kao 3 puta standardna devijacija 10 uzastopnih mjerenja slijepe probe i iznose (mgkg⁻¹): Ca 0.01, Na 0.01, K 0.025, Mg 0.02, Cu 0.01, Fe 0.005, Se 0.001, Zn 0.005 i Mn 0.01.

Koncentracije elemenata mjerene su primjenom instrumenta induktivno spregnute plazme s masenim detektorom model Optima 8000 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD). Uvjeti rada instrumenta ICP - MS prikazani su u tablici 3.

Rezultati koncentracija elemenata obrađeni su statističkim programom Statistica 6.1. (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Koncentracije su izražene kao srednje vrijednosti dobivenih rezultata. (Bilandžić i sur., 2014).

Tablica 3. Instrumentalni uvjeti rada za ICP-MS (Bilandžić i sur., 2014)

Uvjeti	Elementi	
	Ca, K, Na, Mg	Cu, Fe, Zn, Se, Mn
Plazma mod	Radijalni	Aksijalni
Vrijeme čitanja	1-5 s	1-5 s
Replike	3	3
Rf snaga	1000 W	1300 W
Protok argona	8 Lmin ⁻¹	15 Lmin ⁻¹
Raspršivač argona	0,85 Lmin ⁻¹	0,55 Lmin ⁻¹
Sporedni protok	0,2 Lmin ⁻¹	0,2 Lmin ⁻¹
Brzina unosa uzorka	1.5 mLmin ⁻¹	1.5 mLmin ⁻¹
Unutarnji promjer injektora	2,0 mm	2,0 mm
Nebulizer	Stakleni koncentrični (Meinhard)	Stakleni koncentrični (Meinhard)
Vrsta raspršivača	Stakleni ciklonski	Stakleni ciklonski

3.2.8. Određivanje boje svježih sireva

Mjerenje boje provedeno je pomoću uređaja Spectrophotometer CM-3500d (Konica Minolta, Nizozemska). Određivana su tri parametra boje: L (svjetlina), a (zeleno) i b (žuto). Prije svakog mjerenja instrument je standardiziran s bijelom i crnom keramičkom pločicom. Mjerenje je provedeno postavljanjem uzorka sira veličine otprilike 1 x 1 cm. Uzorak se poklopi te se na računalnom programu pokrene očitavanje.

3.2.9. Određivanje teksture sireva

Tekstura svježeg sira određivana je analizom teksturalnog profila (engl. Texture Profile Analysis, TPA) ili metodom dvostrukog zagriža. Ovom metodom se simulira dvostruki zagriž na način da se uzorak stavlja na bazu analizatora i podvrgava dvostrukoj kompresiji pri čemu se sonda zadržava određeno vrijeme između ciklusa. Promjenu sile koja je potrebna za

kompresiju uzorka u podešenom vremenu mjeri računalni program koji rezultat zapisuje u obliku krivulje. Za određivanje teksture korišten je uređaj TA.HD Plus (SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer, Surrey, England) sa sondom promjera 6 mm. Dobiveni podaci su analizirani s Texture Exponent 32 softverom (verzija 3.0.5.0.). Uzorci sireva su rezani na kockice otprilike 5 x 5 cm te postavljeni na mjernu plohu instrumenta. Sva su mjerenja provedena pri sobnoj temperaturi. Uzorci se podvrgavaju dvostrukoj kompresiji prema sljedećim parametrima: kalibracija visine: 40 mm, brzina mjerenja: 1,0 mms⁻¹, brzina prije mjerenja: 1,0 mms⁻¹ te brzina nakon mjerenja: 0,5 mms⁻¹. Računalni program zapisuje krivulju prema promjeni sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu. Iz dobivenih rezultata očitava se tvrdoća, elastičnost i rad potreban za kidanje uzorka.

3.3. Mikrobiološke analize mlijeka i mliječnih proizvoda

U ovom istraživanju provodila se mikrobiološka analiza sirovog i pasteriziranog ovčjeg mlijeka te mikrobiološka analiza svježih ovčjih sireva. U sirovom i pasteriziranom mlijeku određivao se ukupan broj bakterija (UB), broj kvasaca i plijesni (KiP) te broj enterobakterija (EB), dok se kod mikrobiološke analize svježih sireva, uz sve navedeno, utvrđivao i broj koagulaza pozitivnih stafilokoka (KPS). Mikrobiološka analiza sirovog mlijeka provodila se odmah po prijemu mlijeka, dok se analiza pasteriziranog mlijeka provodila na ohlađenom uzorku mlijeka neposredno nakon pasterizacije. Broj mikroorganizama u uzorcima svježih sireva određivao se 1., 5., 9., 14., 21. i 28. dan skladištenja u plastičnim vrećicama u normalnoj atmosferi. Mikrobiološka analiza navedenih uzoraka provodila se primjenom direktne metode naciepljivanja decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge i inkubacijom na prikladnim temperaturama (Božanić i sur., 2010).

3.3.1. Priprema uzoraka

Uzorak mlijeka dobro se promiješa, 20 mL se otpipetira u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima i doda se 180 mL fiziološke otopine te se homogenizira mućkanjem. Tako se dobije osnovno razrjeđenje.

Uzorak sira pripremljen je usitnjavanjem 20 g sira u tarioniku, uz postupno dodavanje 180 mL 2%-tne otopine natrijevog citrata zagrijanog na oko 45°C. Nakon toga sadržaj tarionika se kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim zrcima i prije pipetiranja se dobro homogenizira.

Priprema fiziološke otopine:

9 grama natrijevog klorida (NaCl) otopljeno je u 1000 mL destilirane vode. Nakon toga je po 9 mL fiziološke otopine razdijeljeno u epruvete, začepljeno i autoklavirano pri 121°C/ 20 minuta.

Priprema 2%-tne otopine natrijevog citrata:

20 g trinatrijevog - dihidroksicitrata otopi se u 1000 mL destilirane vode. Destilirana voda se zagrije na 45 - 50°C i nakon toga se doda 20 g soli. Nakon što je sva sol otopljena, pripremljena se otopina autoklavira na 121°C/ 20 minuta.

Priprema hranjivih podloga:

Točno određena količina hranjive podloge (prema uputi proizvođača) odvaže se u destiliranoj vodi. Erlenmeyerova tikvica zagrije se na magnetskom grijaču kako bi se sav sadržaj otopio. Dobivena hranjiva podloga razlije se u predviđene infuzijske boce, začepi i sterilizira u autoklavu pri 121°C/20 minuta.

Priprava decimalnih razrjeđenja:

Iz homogeniziranog uzorka sterilnom pipetom prenese se 1 mL uzorka u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nastalo razrjeđenje dobro se homogenizira na vorteksu, a nakon toga se sterilnom pipetom prenese 1 mL homogeniziranog razrjeđenja i prenese u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Navedeni postupak se ponavlja sve dok se ne dobije željeni broj decimalnih razrjeđenja.

Nacjepljivanje i inkubacija ploča:

Kako bi se odredio broj enterobakterija i koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorku mlijeka ili sira, mikropipetom se uzme 100 µL homogeniziranog decimalnog razrjeđenja i otpipetira na čvrstu hranjivu podlogu. Pomoću štapića po Drigalskom, koji je prethodno umočen u etanol i spaljen na plameniku, uzorak se jednoliko razmaže po cijeloj ploči. Nacijepljene ploče okrenute su naopako i inkubirane 1 - 3 dana u termostatu pri temperaturi od 37°C.

Za određivanje ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni, mikropipetom se uzme 1 mL decimalnog razrjeđenja i otpusti u Petrijevu ploču. Odmah nakon pipetiranja razrjeđenja na Petrijeve ploče, u svaku ploču dolije se 10 - 12 mL hranjivog supstrata (agara) koji je prethodno rastopljen pri temperaturama višim od 100°C te ohlađen i držan u vodenoj kupelji na 45°C. Odmah nakon nalijevanja agara, ploča se jednolično promiješa blagim kružnim pokretima u trajanju desetak sekundi. Nakon toga se pričekava 10 do 15 minuta da se podloga potpuno ne

skrutne, a zatim se ploče okreću dnom prema gore i stavljaju u termostat na temperaturu od 30°C u trajanju 2 - 3 dana.

Očitavanje rezultata:

Nakon vađenja ploča iz termostata, na brojaču kolonija broje se narasle kolonije. Ako su kolonije presitne, broje se pod povećalom pod određenim povećanjem. Uvijek se za brojanje odabiru one ploče na kojima je naraslo između 30 i 300 kolonija. Broj kolonija pomnoži se s faktorom decimalnog razrjeđenja i na taj način odredi se broj mikroorganizama u 1 mL uzorka.

3.4. Senzorska analiza svježih sireva

Senzorska ocjena kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda podrazumijeva ocjenjivanje boje, konzistencije, mirisa i okusa uzoraka. Za senzorsko ispitivanje svježih ovčjih sireva korištena je metoda bodovanja s ponderiranim bodovima pri čemu se svako svojstvo bodovalo ocjenom od 1 do 5, ovisno o kvaliteti svakog pojedinačnog proizvoda. U tablici 4. prikazan je primjer obrasca koji služi za senzorsku analizu svježih sireva.

Tablica 4. Obrazac za senzorsku ocjenu sireva

DATUM:				
OCJENJIVAČ:				
OCJENJIVANO SVOJSTVO	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>			
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4
BOJA				
KONZISTENCIJA				
MIRIS				
OKUS				
UKUPNO				

Za svako svojstvo računa se srednja ocjena koja se zatim množi s faktorom značajnosti prethodno utvrđenim za to svojstvo i tako se dobiju ponderirani bodovi. Zbroj svih bodova pomnoženih s odgovarajućim faktorom uzima se kao konačna ocjena senzorske analize, a maksimalan broj bodova koje neki uzorak može dobiti iznosi 20 (Božanić i sur., 2010).

U senzorskom ocjenjivanju svježih ovčjih sireva sudjelovala su 4 senzorska analitičara, a analiza se provodila tijekom 1. dana proizvodnje sireva te 5., 9., 14., 21. i 28. dan skladištenja odnosno do zadnjeg dana trajnosti.

Tablica 5. Obrazac za senzorsku ocjenu sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (sastavljeno prema Božanić i sur., 2010)

SENZORSKO SVOJSTVO	OPIŠNI PARAMETRI	OČJENA	FAKTOR ZNAČAJNOSTI	MAKS. BODOVI
Okus	Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma, umjereno slan	4 - 5	2,0	10,0
	Preizražen okus mlijeka, preslaba aroma, nedovoljno slan, tragovi kiselosti, gorčine i užeglosti, kredast okus, tragovi stranih okusa	3		
	Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, preslan, potpuno neslan (bljutav), okus po plijesni	1 - 2		
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan po mlijeku, diskretan blag kiselkast miris, bez ikakvih stranih mirisa	4 - 5	1,5	7,5
	Prenaglašen miris, nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris mlijeka, tragovi užeglosti	3		
	Potpuno nekarakterističan za proizvod, stran, užegao, po plijesni, preizražena kiselost	1 - 2		

Tablica 5. (nastavak) Obrazac za senzorsku ocjenu sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (sastavljeno prema Božanić i sur., 2010)

Konzistencija	Sir kompaktan, homogen, tvrdoća karakteristična za proizvod, bez grudica, gladak, nasumična pojava sirnih rupica/pukotina	5	0,8	4
	Neznatno tvrđi ili mekši, neznatno ljepljiv	3 - 4		
	Pretvrd ili premekan sir, pjeskovit ili gnjecav, osjetno se lijepi za usta	1 - 2		
Boja	Karakteristična, bijela sa laganim krem do žućkastim odsjajem, jednolična po cijeloj površini	5	0,4	2
	Zamjetno neujednačene boje, malo žuće nijanse, blago prošaran	3 - 4		
	Zamjetna zona različitih boja površine sira, strana i nekarakteristična boja	1 - 2		
Izgled	Karakterističan, bez formirane kore, gladak, bijele boje, bez sluzi, na prerez umjeren broj pukotina, jednolika boja	5	0,2	1
	Blago formirana naznaka kore na površini, neznatno nejednolika boja, naboranost površine, premalo ili previše sirnih pukotina na prerezu, urušenost, napuhnutost	3 - 4		
	Sluzava/ vlažna/pljesniva površina, pojava zaušenog sloja nalik kori ispod kojeg je krto i rastresito tijelo, ljepljiva površina, pojava crvene ili narančaste boje	1 - 2		

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bilo je ispitivanje utjecaja uporabe različitih sirarskih kultura, tekućeg sirila i protektivne kulture na trajnost svježeg ovčjeg sira te njegove fizikalno - kemijske i senzorske karakteristike.

Tablica 6. Prosječan sastav i svojstva mlijeka (n = 4)

Uzorak mlijeka	pH (sirovo)	pH (pasterizirano)	Gustoća (gcm ⁻³)	°SH (pasterizirano)	% m.m. (neobrano)
Srednja vrijednost	6,59	6,56	1,034	10,7	7,98
Raspon	6,50-6,64	6,48-6,64	1,034-1,034	9,0-12,0	7,5-8,5

Iz tablice 6. vidljivo je da se pH vrijednost sirovog mlijeka kreće od 6,50 do 6,64 što je u skladu s uobičajenim vrijednostima aktivne kiselosti svježe pomuzenog mlijeka. U pravilu, nakon pasterizacije ne dolazi do velikih promjena u kiselosti mlijeka pa je tako u našim uzorcima nakon pasterizacije došlo do djelomičnog, ali ne značajnog smanjenja pH - vrijednosti mlijeka. Do sličnih rezultata došli su Park i sur. (2007) pri čemu se pH - vrijednost ovčjeg mlijeka kretala od 6,51 do 6,85. U istraživanju koje su proveli Antunac i Lukač Havranek (1999) prosječna titracijska kiselost ovčjeg mlijeka iznosila je 8,8°SH što je nešto niža vrijednost u usporedbi s dobivenim rezultatima (10,7°SH). U tablici 6. svakako se ističe udio mliječne masti koji se kreće od 7,5% do 8,5% što je više od 7,2% mliječne masti koliko je uobičajeno za svježe ovčje mlijeko (Bylund, 2003). Prema istraživanju Antunca i sur. (2008), prosječan udio mliječne masti u ovčjem mlijeku s područja otoka Krka iznosio je 8,29% što se podudara s dobivenim vrijednostima. U pravilu je udio mliječne masti u mlijeku bio veći pri večernjoj nego pri jutarnjoj mužnji, kada ovce proizvode i više mlijeka. Prosječan udio mliječne masti (%) u mlijeku dobivenom od paške ovce iznosi 7,81% na što izravno utječu klima i tlo specifični za otok Pag (Pandek i sur., 2005). Na izrazito visok udjel mliječne masti u mlijeku utječe i pasmina ovaca, način i vrsta hranidbe te broj mužnji (Tratnik i Božanić, 2012). Gustoća ovčjeg mlijeka izmjerena laktodenzimetrom iznosi 1,034 gcm⁻³ što je u skladu s Pravilnikom o mlijeku i mliječnim proizvodima (Pravilnik, 2017a). U istraživanju Parka i sur. (2007) gustoća ovčjeg mlijeka bila je nešto viša u odnosu na ovdje prikazane rezultate i kretala se od 1,035 - 1,038 gcm⁻³.

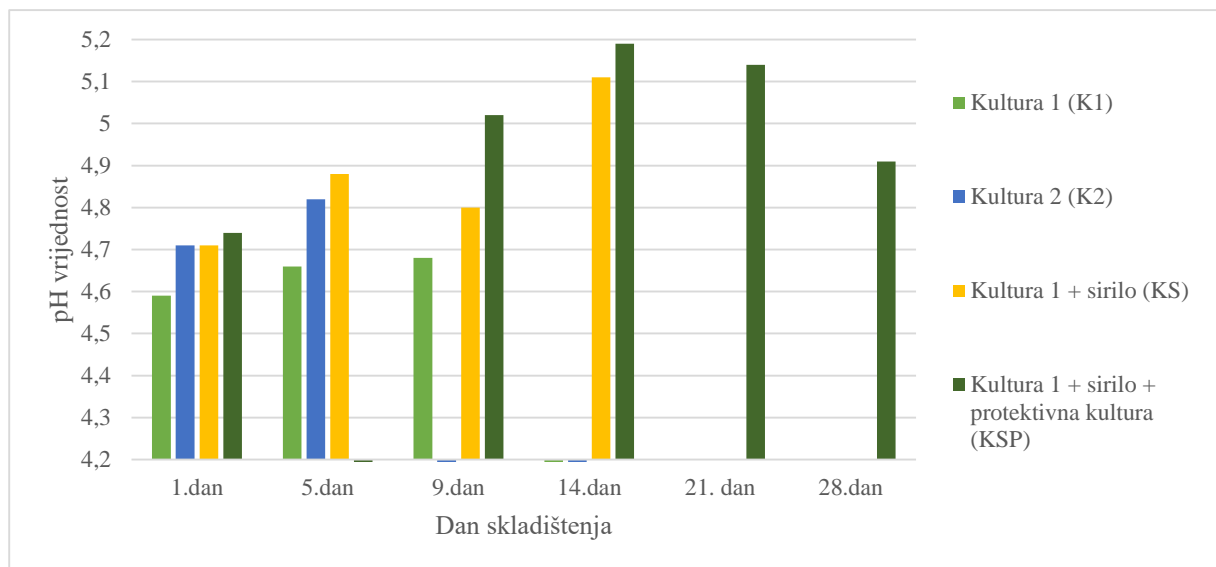
4.1. Prinos sira i volumen izdvojene sirutke

Tablica 7. Prosječan prinos sireva i volumen izdvojene sirutke (n = 3)

Uzorak	Prinos sira (kgL ⁻² mlijeka)	Volumen izdvojene sirutke (LL ⁻² mlijeka)
Kultura 1 (K1)	3,21	4,99
Kultura 2 (K2)	2,99	5,66
Kultura 1 + sirilo (KS)	3,94	5,81
Kultura 1 + sirilo + protektivna kultura (KSP)	3,86	6,02

Stvarni prinos sira računa se nakon završene proizvodnje svježeg sira. Na prinos sira primarno utječe udio suhe tvari odnosno proteina i mliječne masti u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012). Sastav, prinos i u konačnici kakvoća sira primarno ovise o cjelokupnom sastavu mlijeka i učinkovitosti prijelaza njegovih sastojaka u sir (Amenu i Deeth, 2007). Iz tablice 7. vidljivo je da se prinos sira mijenja ovisno o kulturi korištenoj za podsiravanje mlijeka, kao i uporabi tekućeg sirila te protektivne kulture. Najmanji prinos sira iznosi 2,99 kgL⁻² mlijeka i postigao se korištenjem kulture 2, dok se najveći prinos od 3,94 kgL⁻² mlijeka postigao kod podsiravanja mlijeka kulturom 1 i tekućim sirilom. Najveći volumen izdvojene sirutke dobio se proizvodnjom sira tako da se kulturi 1 i tekućem sirilu dodala još i protektivna kultura, dok je najmanje sirutke izdvojeno ocjeđivanjem sira dobivenog kulturom 1. Sant'Ana i sur. (2013) izračunali su prinos svježih sireva napravljenih od kravljeg i kozjeg mlijeka i dobili značajno niže vrijednosti u odnosu na rezultate ovog istraživanja. Prinos svježeg kravljeg sira iznosio je 1,94±0,11 kgL⁻² mlijeka, dok je prinos kozjeg sira bio još manji i iznosio je samo 1,76±0,09 kgL⁻² mlijeka. U usporedbi s tim rezultatima, prinos svježeg ovčjeg sira proizvedenog prilikom izrade ovog diplomskog rada bio je znatno veći.

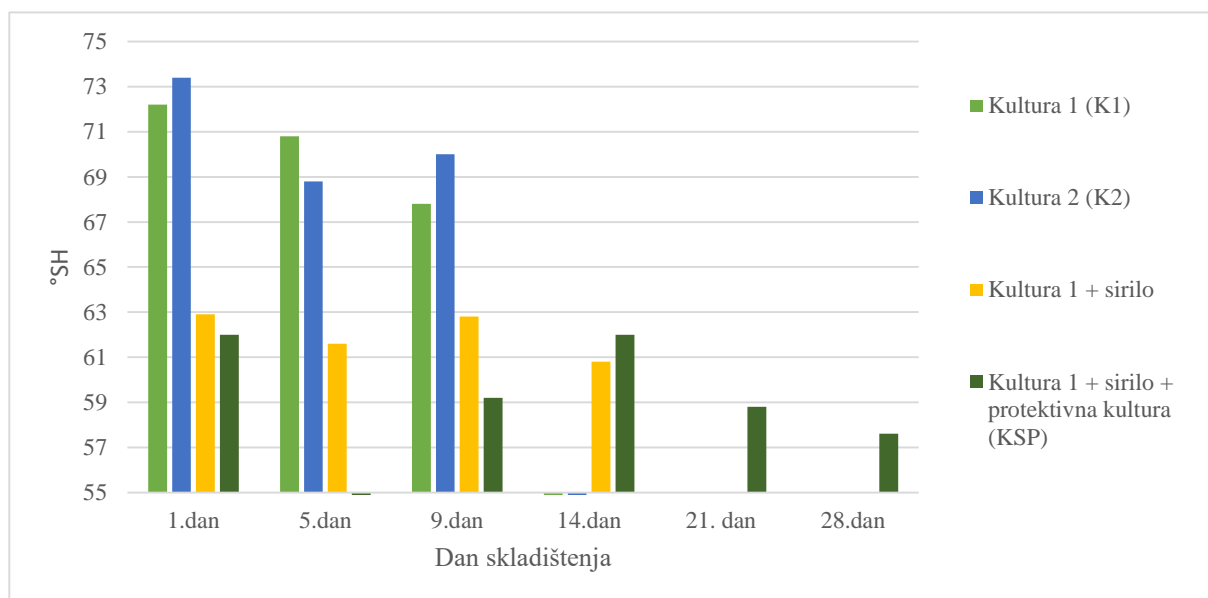
4.2. Aktivna i titracijska kiselost svježih ovčjih sireva



Slika 2. Prosječna pH - vrijednost svježih ovčjih sireva (K1, K2, KS te KSP) tijekom skladištenja

Proces fermentacije uobičajeno se zaustavlja pri pH vrijednosti 4,6 - 4,7, dok se u ovom istraživanju fermentacija prekidala u rasponu pH vrijednosti od 4,43 do 4,73 što je jedan od glavnih razloga razlike u kiselosti sireva tijekom 1. dana skladištenja. Iz grafa prikazanog na slici 2. može se zaključiti da sirevi proizvedeni uporabom kulture 1, sirila i protektivne kulture (KSP) imaju najvišu pH vrijednost u odnosu na ostale sireve te da im se pH vrijednost značajno povisuje do 14. dana skladištenja, a zatim naglo opada do 28. dana skladištenja. Najveću kiselost imali su sirevi proizvedeni samo uporabom kulture 1 (K1) i kod njih je zabilježena najmanja promjena aktivne kiselosti tijekom svih dana skladištenja. Za razliku od dosadašnjih istraživanja gdje se pH vrijednost smanjivala tijekom skladištenja svježih sireva (Mannheim i Soffer, 1996), u ovom istraživanju bilježi se tendencija porasta pH vrijednosti tijekom skladištenja svježih ovčjih sireva do 14. dana, dok se od 14. do 28. dana zabilježio pad pH vrijednosti. Drgalić i sur. (2006) optimizirali su proizvodnju probiotičkog svježeg sira od kozjeg i kravljeg mlijeka. Kiselost svježeg kravljeg sira kretala se od $4,33 \pm 0,12$ tijekom 1. dana skladištenja sve do $4,19 \pm 0,11$ tijekom 14. dana skladištenja. Kod sireva napravljenih od kozjeg mlijeka pH vrijednost nije se smanjivala tijekom skladištenja već se povećala od $4,06 \pm 0,08$ do $4,25 \pm 0,06$ tijekom 14. dana. Buriti i sur. (2005) proveli su istraživanje u kojem su odredili utjecaj skladištenja (21 dan) na aktivnu kiselost svježeg Minas sira. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se pH vrijednost svježeg sira smanjuje tijekom skladištenja i to od pH=6,16 tijekom 1. dana skladištenja sve do pH=5,38 tijekom 21. dana skladištenja. Do sličnih zaključaka došli

su Alalade i Adeneye (2006) kod ispitivanja fizikalno - kemijskih svojstava nigerijskog Wara sira tijekom skladištenja. Tijekom 4 dana skladištenja zabilježili su znatan pad pH vrijednosti svježeg sira i to od početnih $pH=4,85\pm 0,56$ do $pH=4,33\pm 0,70$ tijekom 4. dana skladištenja.



Slika 3. Prosječna titracijska kiselost ($^{\circ}SH$) svježih ovčjih sireva tijekom skladištenja

Iz slike 3. vidljivo je da uzorci sireva koji su imali najniže pH vrijednosti (K1 i K2) imaju najveću titracijsku kiselost. Kod većine sireva bilježi se tendencija smanjenja titracijske kiselosti tijekom skladištenja što se najbolje uočava kod uzoraka dobivenih uporabom samo kulture 1 (K1). Sirevi dobiveni uporabom kulture 1, tekućeg sirila i protektivne kulture (KSP) imaju najnižu kiselost po Soxhlet - Henkelu u usporedbi s ostalim sirevima te dolazi do značajnog pada njihove $^{\circ}SH$ vrijednosti nakon 14. dana skladištenja. Kod sireva dobivenih korištenjem kulture 1 i sirila (KS) ne dolazi do značajne promjene kiselosti po Soxhlet-Henkelu tijekom skladištenja u trajanju 14 dana. Za razliku od rezultata dobivenih u ovom istraživanju, Drgalić i sur. (2006) utvrdili su da se titracijska kiselost svježeg kravljeg sira povećava tijekom skladištenja. Vrijednost titracijske kiselosti kretala se od $65,3\pm 6,28^{\circ}SH$ tijekom 1. dana skladištenja do $69,8\pm 2,83^{\circ}SH$ tijekom 14. dana skladištenja, a slični su rezultati dobiveni i kod analize svježeg sira napravljenog od kozjeg mlijeka. Milić (1984) je u svom istraživanju navela da se kod industrijski proizvedenih sireva bilježi porast titracijske kiselosti tijekom skladištenja što je u suprotnosti sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

4.3. Mikrobiološka analiza uzoraka mlijeka i svježeg sira

Tablica 8. Mikrobiološka analiza sirovog i pasteriziranog mlijeka (n=5)

Vrsta mikroorganizama	Ovčje mlijeko log cfumL ⁻¹	
	Sirovo	Pasterizirano
Enterobakterije	3,11	1,43
Kvasci i plijesni	6,02	1,85
Ukupni broj	5,21	2,10

Tijekom mikrobiološke analize određivao se broj enterobakterija, kvasaca i plijesni te ukupni broj mikroorganizama u sirovom i pasteriziranom mlijeku. Svi sirevi proizvedeni su od termički obrađenog mlijeka stoga je bilo važno adekvatno provesti postupak pasterizacije. Iz navedene tablice vidljivo je da se broj svih mikroorganizama značajno reducirao nakon termičke obrade mlijeka. U ovom istraživanju sve je uspoređivano s kriterijima koji su postavljeni za kravlje mlijeko budući da kriteriji za ovčje mlijeko nisu definirani. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), najveća dozvoljena koncentracija enterobakterija u pasteriziranom kravljem mlijeku iznosi 5 cfumL⁻¹ te 10⁴ cfumL⁻¹ aerobnih mezofilnih bakterija. Samo je u jednoj seriji broj enterobakterija u pasteriziranom mlijeku bio neznatno veći od dozvoljenog. U istraživanju Kozračinske i sur. (2003), od 117 analiziranih uzoraka konzumnog mlijeka čak njih 24 nisu zadovoljila kriterije mikrobiološke ispravnosti prema nacionalnom Pravilniku. Također, u istom istraživanju je ustanovljeno da 42,86 % uzoraka kozjeg mlijeka ne ispunjava kriterije mikrobiološke ispravnosti. Autori navode da su uzorci bili mikrobiološki neispravni, prvenstveno zbog povećanog broja enterobakterija, kvasaca i plijesni, ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, *E. coli* i *S. aureus*.

Kod mikrobiološke analize svježih sireva, uz određivanje ukupnog broja bakterija, broja enterobakterija te kvasaca i plijesni, određivao se i broj koagulaza pozitivnih stafilokoka.

Tablica 9. Rezultati mikrobiološke analize svježeg sira podsirenog kulturom 1 (K1) (n = 2)

Mikroorganizam	K1 (Serija 1) log cfug ⁻¹		
	1. dan	5. dan	9. dan
Ukupni broj	2,60	3,00	3,95
Kvasci i plijesni	2,87	3,07	3,65
Enterobakterije	1,40	1,65	2,39
Koagulaza pozitivni stafilokoki	1,69	1,00	1,40

Tablica 10. Rezultati mikrobiološke analize svježeg sira podsirenog kulturom 2 (K2) (n = 2)

MIKROORGANIZAM	K2 (Serija 1) log cfug ⁻¹		
	1.dan	5.dan	9.dan
Ukupni broj	2,86	4,06	3,56
Kvasci i plijesni	4,00	3,76	3,56
Enterobakterije	2,11	2,49	2,85
Koagulaza pozitivni stafilokoki	1,78	1,18	1,00

Tablica 11. Rezultati mikrobiološke analize svježeg sira podsirenog kulturom 1 i sirilom (KS) (n = 2)

MIKROORGANIZAM	KS (Serija 1) log cfug ⁻¹			
	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan
Ukupni broj	3,71	2,86	2,00	4,00
Kvasci i plijesni	2,91	2,48	2,34	3,23
Enterobakterija	2,62	1,62	0,85	1,00
Koagulaza pozitivni stafilokoki	2,06	2,30	1,00	1,00

Tablica 12. Rezultati mikrobiološke analize svježih sireva podsirenih kulturom 1, sirilom i protektivnom kulturom (KSP) te usporedba s kontrolnim uzorcima (KS) (n = 2)

Mikroorganizam	KSP log cfug ⁻¹					KS log cfug ⁻¹		
	1.dan	9.dan	14.dan	21.dan	28.dan	1.dan	9.dan	14.dan
Ukupni broj	2,65	2,93	2,77	3,78	≥4,00	2,28	2,96	3,76
Kvasci i plijesni	2,38	2,61	2,60	3,05	4,25	2,24	2,74	3,75
Enterobakterije	1,34	1,93	2,00	3,53	3,04	1,74	1,59	2,32
Koagulaza pozitivni stafilokoki	1,00	1,00	1,00	1,81	1,00	1,00	1,00	1,00

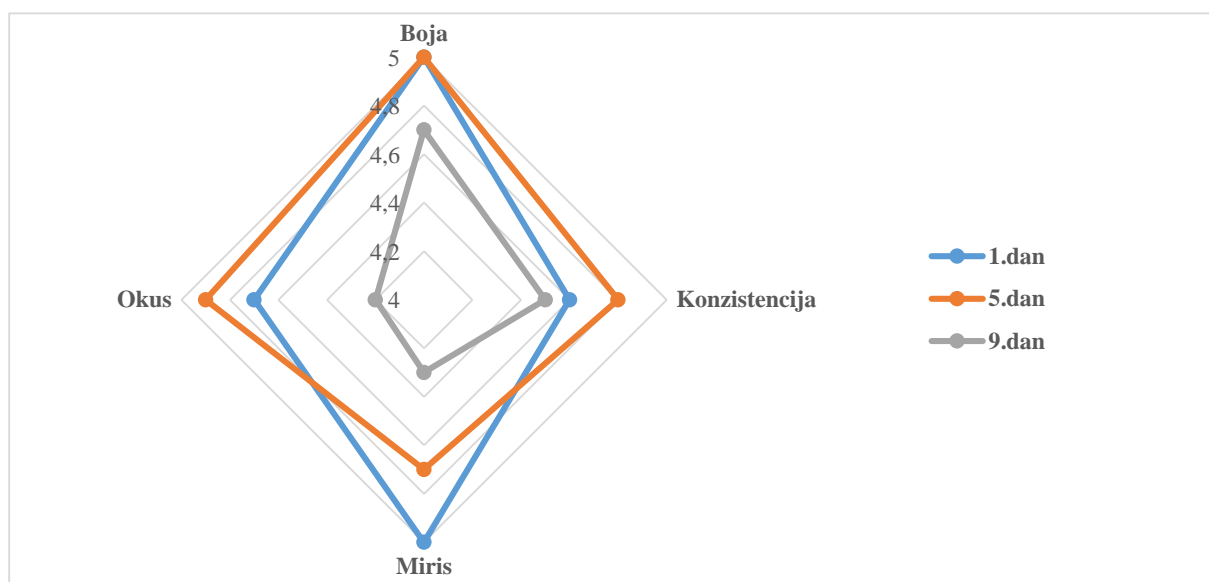
Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), najveća dozvoljena koncentracija kvasaca i plijesni kao i koagulaza pozitivnih stafilokoka u svježem siru je 10² cfug⁻¹. U prvom dijelu istraživanja uspoređivala se trajnost svježih sireva podsirenih kulturom 1 (K1) i kulturom 2 (K2) s obzirom na prethodno navedene kriterije. Iz tablica 9. i 10. vidljivo je da su sirevi podsireni kulturom 1 manje mikrobiološki kontaminirani i imaju dužu trajnost od sireva podsirenih kulturom 2, stoga je za drugi dio istraživanja odabrana kultura 1 kao adekvatnija kultura za proizvodnju svježeg ovčjeg sira. U drugom dijelu istraživanja svježi sirevi proizvedeni su uporabom odabrane kulture uz dodavanje tekućeg sirila (KS) i uspoređivana je trajnost dobivenih sireva. Iz tablice 11. zapaža se da sirevi podsireni kulturom 1 i tekućim sirilom (KS) imaju dužu trajnost od sireva podsirenih isključivo sirarskim kulturama (K1 i K2) pa su se za treći dio istraživanja koristili tekuće sirilo i kultura 1.

U trećem i najvažnijem dijelu istraživanja, cilj je bio odrediti utjecaj uporabe protektivne kulture tijekom proizvodnje sira na njegovu trajnost. Svježi sirevi proizvedeni su u dvije serije (KSP) tako da se za podsiravanje upotrebljavala kultura 1, tekuće sirilo i protektivna kultura. Trajnost proizvedenih sireva uspoređivala se s trajnošću kontrolnih uzoraka (KS) kod kojih se nije koristila protektivna kultura. Mikrobiološka analiza provodila se tijekom 1., 9., 14., 21. i 28. dana skladištenja. Iz tablice 12. lako se zapaža da uporaba protektivne kulture značajno utječe na produljenje trajnosti svježih ovčjih sireva. Trajnost kontrolnih uzoraka iznosila je samo 9 dana, dok je trajnost sireva proizvedenih dodatkom protektivne kultura iznosila 21 dan, što je produljenje trajnosti za 2,3 puta.

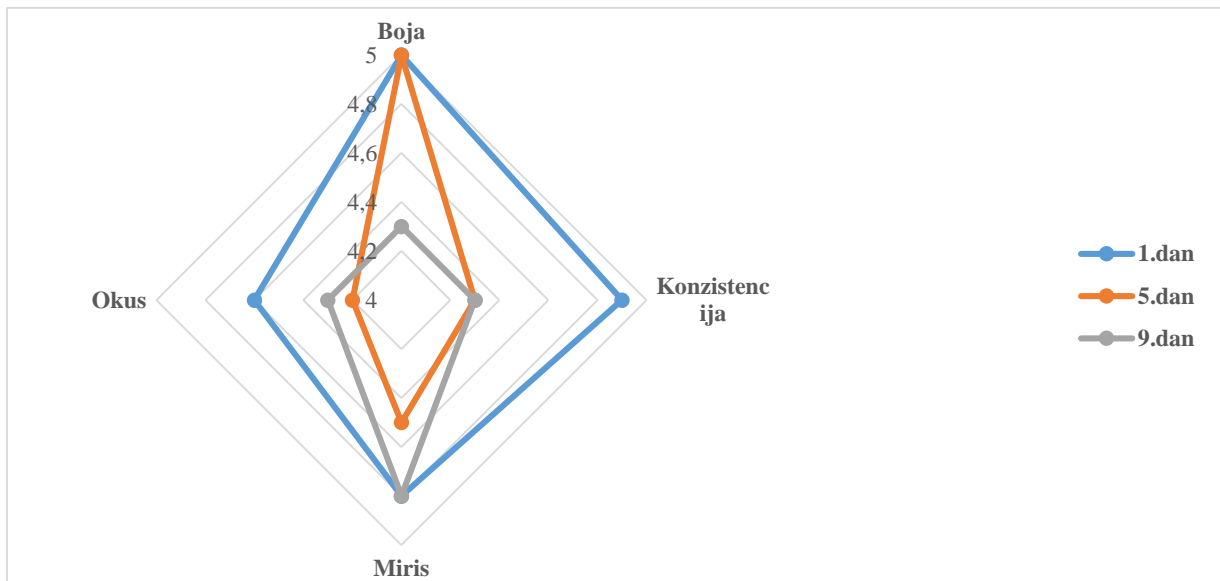
U istraživanju Sabljak i sur. (2013) provedena je mikrobiološka analiza 12 uzoraka svježih kravljih sireva. Od zaprimljenih sireva, čak 3 su bila mikrobiološki neispravna odmah na samom početku, dok je nakon 6. dana mikrobiološku ispravnost zadovoljilo samo 4 uzorka. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da svježiji ovčji sirevi imaju dužu trajnost s obzirom na mikrobiološke kriterije u usporedbi sa kravljim sirevima. Međutim, treba napomenuti da su kravljji sirevi u istraživanju Sabljak i sur. (2013) bili proizvedeni od sirovog mlijeka.

4.4. Senzorska analiza svježih ovčjih sireva

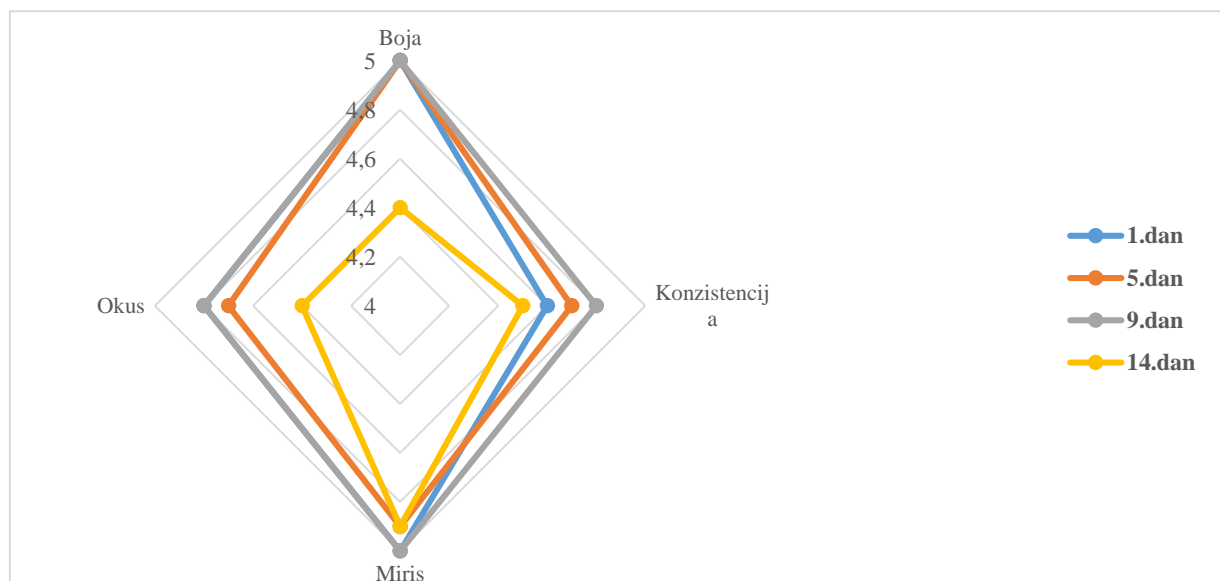
Prilikom senzorske analize uzoraka svježih ovčjih sireva 5 panelista ocjenjivali su miris, okus, boju i konzistenciju ocjenama od 1 do 5. Senzorska analiza svježih sireva provedena je 1., 5., 9., 14., 21. i 28. dan skladištenja odnosno do zadnjeg dana trajnosti. Velika većina uzoraka ocjenjena je vrlo dobrim i izvrsnim ocjenama, čak i u posljednjim danima skladištenja.



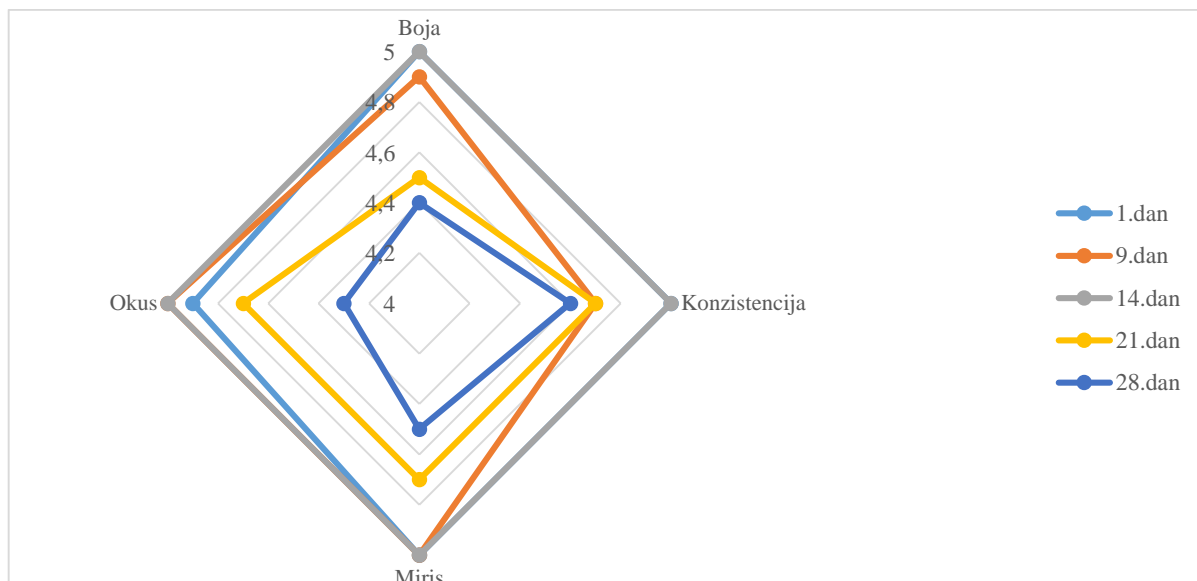
Slika 4. Prosječna ocjena pojedinačnih senzorskih svojstava za sireve dobivene uporabom kulture 1 (K1) tijekom skladištenja (n = 2)



Slika 5. Prosječna ocjena pojedinačnih senzorskih svojstava za sireve dobivene uporabom kulture 2 (K2) tijekom skladištenja (n = 2)



Slika 6. Prosječna ocjena pojedinačnih senzorskih svojstava za sireve dobivene uporabom kulture 1 i sirila (KS) tijekom skladištenja (n = 2)



Slika 7. Prosječna ocjena pojedinačnih senzorskih svojstava za sireve dobivene uporabom kulture 1, sirila i protektivne kulture (KSP) tijekom skladištenja (n = 2)

Iz rezultata prikazanih na slikama 4.-7. može se zaključiti da svi sirevi imaju najbolja senzorska svojstva tijekom 1. i 5. dana skladištenja, dok uzorci sireva oznake KSP zadržavaju odlična senzorska svojstva sve do 14. dana skladištenja. Za sireve dobivene uporabom kulture 1 i sirila (KS) senzorske ocjene značajno opadaju nakon 9. dana skladištenja, dok se kod sireva proizvedenih uporabom kulture 1, sirila i protektivne kulture (KSP) značajno smanjenje senzorske kvalitete očituje nakon 14. te naročito nakon 21. dana skladištenja. Gledajući pojedinačna senzorska svojstva, sirevi dobiveni uporabom kulture 2 (K2) imaju najlošije ocjene za okus, dok se sirevi dobiveni korištenjem kulture 1 i sirila (KS) odlikuju izvrsnim mirisom tijekom svih dana skladištenja. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na pozitivan utjecaj dodatka protektivne kulture na senzorska svojstva svježih ovčjih sireva. Mikrobiološka ispravnost i senzorska svojstva svježih sireva međusobno su povezani, međutim lošije senzorske ocjene ne impliciraju mikrobiološku neispravnost, odnosno mikrobiološki neispravni sirevi mogu postići i relativno dobre senzorske ocjene (Sabljak i sur., 2013). Tratnik i sur. (2002) ispitivali su prihvatljivost probiotičkog svježeg sira proizvedenog korištenjem mješovite probiotičke kulture. Tijekom 14 dana skladištenja boja i izgled sireva gotovo se uopće nisu promijenili, ali su zabilježene promjene u mirisu i okusu sireva. Najbolje ocjene za miris i okus dobili su svježi sirevi skladišteni 10 dana, a nakon 10. dana skladištenja smanjuju se njihove ocjene. Olarte i sur. (2001) ispitivali su senzorska svojstva svježeg kozjeg sira tijekom skladištenja u trajanju 28 dana pri čemu su svako svojstvo ocjenjivali ocjenama 1-7. Boja i izgled svježeg kozjeg sira najbolje su ocijenjeni tijekom 0. i 7. dana skladištenja, dok su nakon

14. dana zabilježene puno lošije ocjene navedenih svojstava. Ocjena za okus tijekom 0. dana ocjenjivanja iznosila je $6,90 \pm 0,32$, a 14. dana samo $1,80 \pm 0,63$ što znači da duže skladištenje izrazito negativno utječe na okus svježih sireva. Miris svježeg kozjeg sira dobio je ocjenu $6,90 \pm 0,32$ tijekom 0. dana skladištenja, dok je tijekom 21. i 28. dana bio okarakteriziran kao potpuno neprihvatljiv s ocjenom $1,00 \pm 0,00$.

4.5. Boja sireva i mlijeka

Tablica 13. Boja svježih sireva tijekom skladištenja izražena srednjim vrijednostima parametara L (svjetlina), a (zeleno) i b (žuto) (n = 2)

Kultura 1			
Dan skladištenja	L vrijednost	a vrijednost	b vrijednost
<u>1.dan</u>	95,15	-1,37	9,88
<u>5.dan</u>	94,39	-1,54	9,58
<u>9.dan</u>	94,90	-1,66	10,02
Kultura 2			
<u>1.dan</u>	95,11	-1,22	10,27
<u>5.dan</u>	93,29	-1,26	10,09
Kultura 1 + sirilo			
<u>1.dan</u>	94,04	-1,58	9,4
<u>9.dan</u>	94,41	-1,74	9,91
Kultura 1 + sirilo + protektivna kultura			
<u>1.dan</u>	95,67	-1,75	9,87
<u>9.dan</u>	93,69	-1,69	8,93
<u>14.dan</u>	93,54	-1,82	10,02
<u>21.dan</u>	93,37	-1,81	10,00

Iz tablice 13. vidljivo je da se L vrijednost (svjetlina) svježih sireva smanjuje tijekom skladištenja za većinu uzoraka. Iznimku predstavljaju sirevi dobiveni uporabom kulture 1 i sirila (KS) kod kojih dolazi do povećanja L vrijednosti tijekom skladištenja od 9 dana. Evert – Arriagada i sur. (2014) zabilježili su povećanje L vrijednosti kod svježih sireva tijekom 7 dana skladištenja, dok je kod svježih sireva tretiranih visokim tlakom (500 MPa) zabilježeno produljenje trajnosti uz smanjenje L vrijednosti tijekom skladištenja. U istraživanju Sant'ane i sur. (2013) može se uočiti smanjenje L vrijednosti tijekom skladištenja svježih sireva napravljenih od kravljeg i kozjeg mlijeka. Općenito, izmjerene su značajno niže L vrijednosti (svjetlina) svježih kravljih sireva (od $93,54 \pm 0,80$ do $92,28 \pm 0,45$) u usporedbi s L vrijednostima

svježih kozjih sireva (od $95,36 \pm 0,75$ do $93,35 \pm 0,439$). Može se zaključiti da se svjetlina svježih ovčjih sireva, proizvedenih u ovom istraživanju, podudara sa svjetlinom svježih sireva napravljenih od kozjeg mlijeka.

Prosječna a vrijednost (zeleno) svježih ovčjih sireva kretala se od -1,22 do -1,82 uz tendenciju stalnog smanjivanja navedenog parametra tijekom skladištenja. Do sličnih rezultata došli su Sant'ana i sur. (2013) kod ispitivanja boje svježih kozjih sireva. U njihovom se istraživanju a vrijednost kretala od -3,09 do -3,87 što je u skladu s rezultatima provedenog istraživanja.

B vrijednost sireva proizvedenih u ovom istraživanju kretala se od 8,93 do 10,27 pri čemu su najviše vrijednosti zabilježene kod sireva proizvedenih samo dodatkom kulture 2 (K2). Uspoređujući b vrijednosti izmjerene kod svježih sireva tijekom 1. i zadnjeg dana trajnosti, može se zaključiti da se kod većine uzoraka navedeni parametar povećavao tijekom skladištenja. Kod svježih kravljih sireva b vrijednost se smanjivala tijekom 7 dana skladištenja od $10,53 \pm 0,99$ do $10,47 \pm 0,44$ (Evert-Arriagada i sur., 2014), dok se u drugom istraživanju, provedenom 2013. godine, ta vrijednost povećavala od $16,34 \pm 1,63$ do $16,52 \pm 0,69$ (Sant'ana i sur., 2013).

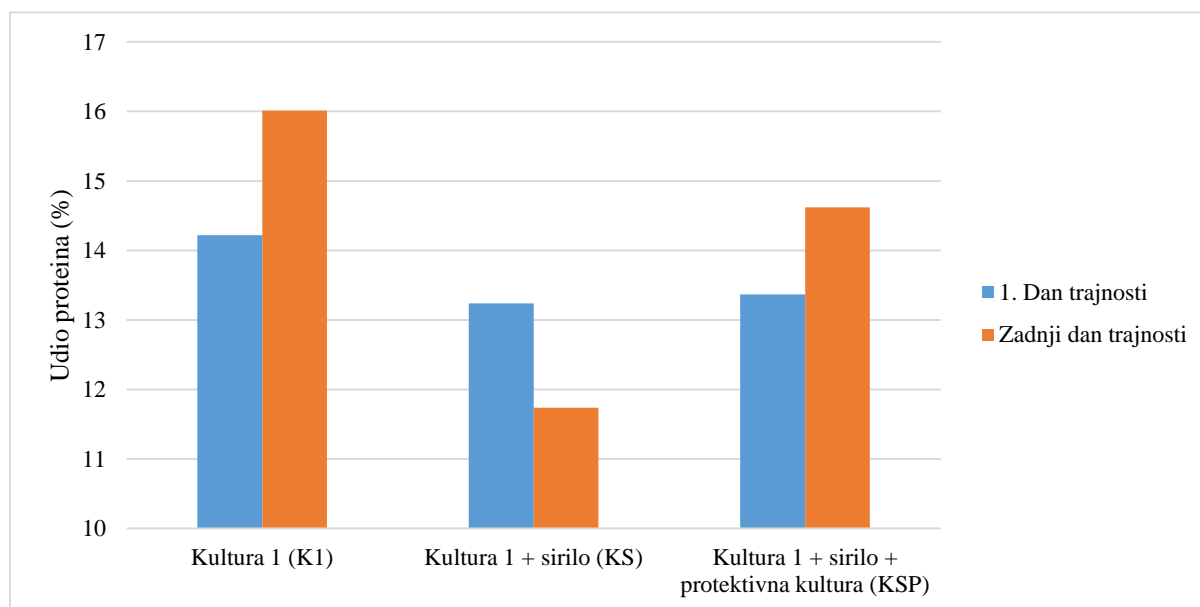
4.6. Tekstura sireva

Tablica 14. Rezultati teksturalne analize svježih sireva (n = 2)

Uzorak	Maksimalna sila F max (N)	Vrijeme potrebno za pucanje uzorka t (s)	Duljina prodora (mm)	Utrošeni rad (Nm)
K1 1. dan	2,280	29,260	14,629	0,023
K1 Zadnji dan	2,151	9,545	4,772	0,006
K2 1. dan	3,366	15,640	7,819	0,020
K2 Zadnji dan	2,310	9,875	4,937	0,008
KS 1. dan	2,848	3,569	7,140	0,006
KS Zadnji dan	1,494	2,507	5,015	0,002
KSP 1. dan	0,905	5,319	10,640	0,002
KSP Zadnji dan	1,357	2,942	5,885	0,003

Iz rezultata prikazanih u tablici 14. vidljivo je da tijekom skladištenja dolazi do promjena u teksturi svježeg sira. Kod svih uzoraka se značajno smanjuje vrijeme potrebno za pucanje uzorka tijekom zadnjeg dana skladištenja uspoređujući s 1. danom. Za sireve proizvedene samo dodatkom čistih mezofilnih kultura (K1 i K2) potrebno je najdulje vrijeme za pucanje uzorka, dok je kod sireva proizvedenih dodatkom kulture 1 i sirila (KS) potrebno najkraće vrijeme za probijanje površine sira. Duže skladištenje utječe i na skraćivanje duljine prodora što se najviše odražava na sireve proizvedene dodatkom kulture 1 (K1). Utrošeni rad, kao i maksimalna sila za probijanje površine sireva, u pravilu opadaju tijekom dužeg skladištenja sireva što se može objasniti omekšavanjem sireva poglavito zbog razgradnje proteina. Hayaloglou i sur. (2005) navode da tijekom sazrijevanja sira dolazi do povećanja udjela proteolitičkih produkata kao što su aminokiseline, što može utjecati na pogoršanje teksture sira. Iznimku predstavljaju sirevi proizvedeni dodatkom kulture 1, sirila i protektivne kulture (KSP) kod kojih dolazi do blagog porasta navedenih parametara tijekom skladištenja.

4.7. Udio proteina u svježim ovčjim sirevima



Slika 8. Prosječan udio proteina (%) u uzorcima svježih sireva tijekom prvog i zadnjeg dana trajnosti (n = 2)

Iz rezultata prikazanih na slici 8. može se uočiti da se udio proteina u uzorcima svježih sireva kreće od 11,74% do 16,01%. S obzirom da se udio proteina u svježim sirevima određivao preračunavanjem udjela dušičnih tvari, može se zaključiti da se udio proteina u svježim sirevima smanjuje tijekom skladištenja radi proteolitičke aktivnosti mikroflore za vrijeme skladištenja te djelomične hidrolize proteina. To potkrepljuju rezultati analize mineralnih tvari (tablica 16.) gdje se vidi da udio mineralnih tvari, naročito kalcija, raste tijekom skladištenja što upućuje na njegovo otpuštanje iz proteinske mreže gruša. Nadalje, kod svih uzoraka zabilježen je porast udjela dušičnih tvari tijekom skladištenja, osim kod uzorka KS (kultura 1 + sirilo) koji je od samog početka imao najnižu koncentraciju proteina, no ne može se isključiti ni mogućnost pogreške u izvođenju analize.

Lante i sur. (2006) određivali su fizikalno-kemijska svojstva dvaju tradicionalnih, svježih kravljih sireva s područja Italije, Crescenze i Squacqueronea. Prosječan udio proteina u siru Crescenzi iznosio je $17,28 \pm 0,71\%$, a u Squacqueroneu $14,34 \pm 0,47\%$. Udio proteina u svježim ovčjim sirevima proizvedenim u našem istraživanju podudara se s udjelom proteina u talijanskom siru Squacqueroneu, dok je Crescenza nešto bogatija proteinima. Prosječan udio proteina u svježem siru Minas napravljenom od kozjeg mlijeka iznosi $15,78 \pm 0,82\%$ (Sant'Ana i sur., 2013), dok je sir Cottage nešto siromašniji proteinima i prosječno ih sadrži 12,5% (Fox i sur., 2017). U istraživanju Tratnik i sur. (2002) udio proteina u svježim kravljim sirevima kretao se od 17,74 - 19,55 %. Od svih svježih sireva, prema vrlo visokom udjelu proteina ističe se Queso Blanco, tradicionalni španjolski i meksički sir, čiji je prosječni udio proteina 22,9% (Fox i sur., 2017).

4.7. Udio mineralnih tvari u ovčjem mlijeku i svježim sirevima

Tablica 15. Prosječna koncentracija mineralnih tvari u ovčjem mlijeku (mgL^{-1}) i svježim sirevima (mgg^{-1}) tijekom prvog i zadnjeg dana trajnosti

Uzorak	Koncentracija mineralnih tvari									
	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Al	Ba	Pb
Ovčje mlijeko (mgL^{-1})	169,620	65,400	560,460	644,600	0,240	0,160	1,880	0,140	0,060	0,001
K1 1.dan (mgg^{-1})	149,027	67,943	495,944	749,766	0,0011	0,6045	3,925	0,414	0,076	0,002
K1 zadnji dan (mgg^{-1})	187,855	85,311	646,737	932,885	0,001	0,382	4,513	0,385	0,081	0,001
KS 1. dan (mgg^{-1})	149,474	70,860	519,611	766,021	0,041	0,367	4,681	0,298	0,074	0,001
KS zadnji dan (mgg^{-1})	161,045	74,729	575,572	797,542	0,157	0,502	4,083	0,521	0,078	0,001
KSP 1.dan (mgg^{-1})	156,989	71,766	511,516	786,652	0,187	0,423	4,850	0,344	0,078	0,002
KSP zadnji dan (mgg^{-1})	161,143	74,959	525,168	818,819	0,035	0,418	4,887	0,403	0,079	0,002

U mlijeku je identificirano oko 40 različitih mineralnih tvari od čega je brojčano puno više mikroelemenata od makroelemenata, međutim oni su najčešće prisutni samo u tragovima. Makroelementi se u mlijeku nalaze uglavnom u obliku topljivih disociranih ili nedisociranih anorganskih i organskih soli (Tratnik i Božanić, 2012; Claeys, 2014). Ovčje mlijeko sadrži otprilike 35% više pepela u usporedbi s kravljim mlijekom. Mineralne tvari u ovčjem mlijeku većinom su anorganskog, a manjim dijelom organskog porijekla. Sadržaj kalcija i magnezija u ovčjem mlijeku znatno je viši u odnosu na kozje i kravlje mlijeko, dok je sadržaj natrija i citrata u pravilu nešto niži (Antunac i Lukač Havranek, 1997; Alichanidis i Polychroniadou, 1995). Prema koncentraciji mineralnih tvari prikazanoj u tablici 15. vidljivo je da ovčje mlijeko sadrži najviše kalcija ($644,600 \text{ mgL}^{-1}$), zatim kalija ($560,460 \text{ mgL}^{-1}$), natrija ($169,620 \text{ mgL}^{-1}$) te magnezija ($65,400 \text{ mgL}^{-1}$). Do vrlo sličnih rezultata došao je Al-Wabel (2008) tijekom analize mineralnog sastava ovčjeg mlijeka s područja Saudijske Arabije. Najzastupljeniji minerali u ovčjem mlijeku bili su redom kalcij ($822,500 \pm 113,36 \text{ mgkg}^{-1}$), kalij ($127,410 \pm 1,10 \text{ mgkg}^{-1}$) i natrij ($95,400 \pm 5,47 \text{ mgkg}^{-1}$). Dobivene rezultate potvrđuje i istraživanje Raynal-Ljutovca i sur. (2008) kod kojih je u ovčjem mlijeku kvantificirano najviše kalcija, kalija te fosfora. Ovčje je mlijeko, kao i sve druge vrste mlijeka, vrlo slab izvor željeza i sadrži samo $0,160 \text{ mgL}^{-1}$ ovog minerala. Claeys i sur. (2014) utvrdili su da ovčje mlijeko sadrži najviše kalcija ($159 - 242 \text{ mgmL}^{-2}$), fosfora ($124 - 175 \text{ mgmL}^{-2}$) i kalija ($104 - 205 \text{ mgmL}^{-2}$), dok su u tragovima identificirani željezo ($0,08 - 0,1 \text{ mgmL}^{-2}$) te bakar ($0,03 - 0,05 \text{ mgmL}^{-2}$). Prema istraživanju Zamberlina i sur. (2012), koncentracija željeza u ovčjem mlijeku iznosila je $62 - 100 \text{ } \mu\text{gg}^{-2}$. Od svih mikroelemenata u ovčjem mlijeku, u najmanjim koncentracijama identificirani su aluminij ($0,140 \text{ mgL}^{-1}$) i olovo ($0,001 \text{ mgL}^{-1}$) za koje se može reći da su identificirani u tragovima. Ovi se mikroelementi ne smatraju prirodnim sastojcima mlijeka, već u njega dopijevaju od ostataka pesticida ili metalne opreme, kanti i uređaja (Al) (Tratnik i Božanić, 2012). Ayar i sur. (2009) utvrdili su da kravlje mlijeko sadrži $0,103 \pm 0,14 \text{ mgkg}^{-1}$ olova te $7,427 \pm 1,362 \text{ mgkg}^{-1}$ aluminijska.

Sir predstavlja najbogatiji izvor mineralnih tvari, osobito kalcija i fosfora. Sirevi proizvedeni dodatkom sirila (zreli sirevi) sadrže puno više kalcija i fosfora u usporedbi sa svježim sirevima proizvedenih dodatkom mikrobnih kultura jer kiselina otapa Ca i P iz kazeina te oni odlaze u sirutku (Božanić, 2015). Rezultati prikazani u tablici 15. pokazuju da se koncentracija gotovo svih mineralnih tvari u svježim sirevima u pravilu povećava tijekom skladištenja. U svim uzorcima sireva, mineral koji se nalazi u najvećoj koncentraciji je kalcij. Najveća koncentracija kalcija zabilježena je prilikom zadnjeg dana trajnosti kod svježeg sira proizvedenog samo

dodatkom kulture 1 (K1) i iznosi $932,885 \text{ mgg}^{-1}$. Prema istraživanju iz 1995. godine, prosječna koncentracija kalcija u svježem Cottage siru iznosi 73 mgg^{-2} (Holland i sur., 1995), dok Tratnik i Božanić (2012) navode da je koncentracija kalcija u svježem posnom siru 90 mgg^{-2} . Preporučeni dnevni unos kalcija za odrasle osobe iznosi 1000-1300 mg i mliječni proizvodi predstavljaju glavni izvor ovog minerala u prehrani (Zamberlin i sur., 2012). Sljedeći najzastupljeniji mineral u svježim ovčjim sirevima je kalij čija se koncentracija kreće u rasponu $495,944 - 646,737 \text{ mgg}^{-1}$. Kalij se u svježim sirevima uglavnom nalazi u topljivom obliku (93%), a manji dio nalazi se i u koloidnoj formi (7%) (Abollino i sur., 1998). Prosječna koncentracija kalija u talijanskom svježem siru Crescenzi iznosi $1069 \pm 52 \text{ mgkg}^{-1}$, dok se u Squacqueroneu nalazi $1163 \pm 62 \text{ mgkg}^{-1}$ navedenog minerala (Lante i sur., 2006). Treći najzastupljeniji mineral u svježim ovčjim sirevima jest natrij i njegova najveća koncentracija ($187,855 \text{ mgg}^{-1}$) zabilježena je kod sira proizvedenog samo dodatkom kulture 1 (K1) tijekom zadnjeg dana trajnosti. U španjolskom svježem siru naziva Burgos koncentracija natrija iznosi 259 mgg^{-2} (Marcos i sur., 1983). Mikroelementi poput barija, olova, mangana i aluminija prisutni su samo u tragovima u analiziranim uzorcima svježih sireva.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata fizikalno-kemijskih, mikrobioloških te senzorskih analiza ovčjeg mlijeka i svježih ovčjih sireva, izvode se sljedeći zaključci:

1. Prinos svježih ovčjih sireva značajno se povećao kad se u proizvodnji, uz primjenu mezofilnih mikrobnih kultura, upotrebljavalo i tekuće sirilo.
2. Titracijska kiselost svježih ovčjih sireva se snižava, dok se aktivna kiselost odnosno pH - vrijednost istih sireva u pravilu povećava tijekom skladištenja.
3. Mikrobiološkom analizom utvrđeno je da protektivne kulture značajno utječu na produljenje trajnosti svježeg sira budući su najdulju trajnost (21 dan) imali svježi sirevi proizvedeni uporabom kulture 1, tekućeg sirila i protektivne kulture (KPS).
4. Uporabom protektivnih kultura u proizvodnji svježeg sira ne dolazi do degradacije senzorskih svojstava. Tako su najbolje ocijenjeni svježi ovčji sirevi tijekom 14. dana skladištenja kod kojih se uz kulturu 1 i tekuće sirilo upotrebljavala i protektivna kultura.
5. Tijekom skladištenja od 1. do zadnjeg dana trajnosti bilježi se smanjenje udjela proteina kod uzoraka napravljenih dodatkom kulture 1 i sirila (KS).
6. Od mineralnih tvari prisutnih u svježim ovčjim sirevima u najvećoj su koncentraciji kvantificirani redom: Ca, K, Na i Mg što je u skladu s većinom dosadašnjih istraživanja. Koncentracija gotovo svih mineralnih tvari prisutnih u svježim ovčjim sirevima povećava se tijekom skladištenja od 1. do zadnjeg dana trajnosti.

6. LITERATURA

Abollino, O., Aceto, M., Bruzzoniti, M. C., Mentasti, E., Sarzanini, C. (1998) Speciation of copper and manganese in milk by solidphase extraction/inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **375**, 299 – 306.

Al – Wabel, N.A. (2008) Mineral contents of milk of cattle, camels, goats and sheep in the central region of Saudi Arabia. *Asian J Biochem* **3 (6)**, 373 – 375.

Alalade, O.A., Adeneye, J.A. (2006) The effect of storage period on the chemical composition and coliform microflora of wara cheese. *Int. J. Dairy Sci.* **1 (2)**, 126 – 130.

Alichanidis, E., Polychroniadou, A. (1995) Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. U: Production and utilization of ewe and goat milk (IDF), Kreta, 21 - 43.

Amenu, B., Deeth, H.C. (2007) The impact of milk composition on Cheddar cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Technol.* **62**, 171 - 184.

Antunac, N., Lukač Havranek, J. (1999) Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo* **49 (4)**, 241 - 254.

Antunac, N., Mikulec, N., Bendelja, D., Prpić, Z., Barać, Z. (2008) Karakterizacija i istraživanje kvalitete mlijeka u proizvodnji krčkog sira. *Mljekarstvo* **58 (3)**, 203 – 222.

AOAC International (2005) Official methods of analysis. Gaithersburg, 17.

Ayar, A., Sert, D., Akin, N. (2009) The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia – Turkey. *Environ. Monit. Assess.* **152**, 1 – 12.

Bajt, N., Golc-Teger, S., Pirkmajer, E. (1998) Mleko in mlečni izdelki, Zavod Republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana

Bilandžić, N., Sedak, M., Đokić, M., Solomun Kolanović, B., Varenina, I., Božić, Đ., Končurat, A. (2014) Differences of the essential mineral element levels in the milk of Croatian Coldblood horse and Littoral – Dinaric donkey. *Mljekarstvo* **64** (1), 12 – 18.

Božanić, R. (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević, B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 54.

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

Buriti, F.C.A., da Rocha, J.S., Saad, S.M.I. (2005) Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int. Dairy J.* **15**, 1279 – 1288.

Bylund, G. (2003) Dairy processing handbook, 2.izd., Tetra Pak, Lund, Švedska

CDIC (2018) Canadian Dairy Information Centre – Homepage. <http://www.dairyinfo.gc.ca>
Pristupljeno 18. lipnja 2018.

Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014) Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control.* **42**, 188 – 201.

Drgalić, I., Tratnik, Lj., Božanić, R., Koruga, S. (2006) Optimiranje proizvodnje probiotičkog svježeg sira od kozjeg i kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **56** (2), 107 – 118.

Evert – Arriagada, K., Hernandez – Herrero, M.M., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2014) Commercial application of high – pressure processing for increasing starter – free fresh cheese shelf – life. *Food Sci. Technol. Int.* **55**, 498 – 505.

Fox, P.F., McSweeney P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (2017) Fundamentals of cheese science, 2. izd., Springer, New York

Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., Lacroix, C. (2008) Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Sci. Technol.* **88**, 421 - 444. doi: 10.1051/dst:2008013

Guarner, F., Malagelada, J. R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet.* **361**, 512 – 519. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0

Hayaloglou, A.A., Guven, M., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2005) Influence of starters on chemical, biochemical and sensory changes in Turkish white – brined cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* **88**, 3460 – 3474.

Holland, B., Welch, A.A., Unwin, I.D., Buss, D.H., Paul, A.A., Southgate, D.A.T. (1995) The composition of foods. 5. izd., royal society of chemistry and ministry of agriculture, fisheries and food, London

Hrvatska agencija za hranu (2016) Znanstveno mišljenje o mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrdim sirevima na tržištima RH i njihovim kemijskim parametrima (Zahtjev HAH-Z-2016-1), Zagreb

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

Kirin, S. (2009) Bjelovarski domaći svježi meki sir. *Mljekarstvo* **59**, 148 - 154.

Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Hadžiosmanović, M., Majnarić, D., Kukuruzović, B. (2003) Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **53** (1), 17-22.

Lante, A., Lomolino, G., Cagnin, M., Spettoli, P. (2006) Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP – OES. *Food Control* **17**, 229 – 233.

Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P.A. (2001) Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid. *Int. Dairy J.* **11**, 559 - 565.

Mannheim, C. H., Soffer, T. (1996) Shelf-life extension of cottage cheese by modified atmosphere packaging. *Lebensm - Wiss. Technol.* **29 (8)**, 767 – 771.

Marcos, A., Millan, R., Esteban, M.A., Alcalá, M., Fernandez – Salguero, J. (1983) Chemical composition and water activity of spanish cheeses. *J. Dairy Sci.* **66 (12)**, 2488 – 2493.

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo* **59 (3)**, 225 – 231.

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

Milić, M. (1984) Ispitivanje promjene kiselosti kod svježih sireva u varaždinskoj regiji. *Mljekarstvo* **34**, 182 - 185.

Olarte, C., Gonzalez – Fandos, E., Sanz, S. (2001) A proposed methodology to determine the sensory quality of a fresh goats cheese (Cameron cheese): application to cheeses packaged under modified atmospheres. *Food Qual. Prefer.* **12**, 163 – 170.

Panday, A., Joshi, V.K., Nigam, P., Soccol, C.R. (2000) *Enterobacteriaceae*, coliforms and *E. coli*. U: *Encyclopedia of food microbiology* (Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D.), Academic Press, 604 - 610.

Pandek, K., Mioč, B., Barać, Z., Pavić, V., Antunac, N., Prpić, Z. (2005) Mliječnost nekih pasmina ovaca u Hrvatskoj. *Mljekarstvo* **55** (1), 5 - 14.

Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007) Physico - chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.* **68**, 88 – 113.

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

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

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

Radeljević, B., Mikulec, N., Antunac, N., Prpić, Z., Maletić, M., Havranek, J. (2013) Utjecaj mikrobne kulture na koncentraciju ukupnih slobodnih aminokiselina tijekom zranja Krčkog sira. *Mljekarstvo* **63** (1), 15 – 21.

Radošević, V., Tonković, K., Gregurek, Lj., Kos, B., Šušković, J. (2007) Proizvodnja svježeg probiotičkog sira s dodatkom transglutaminaze. *Mljekarstvo* **57** (1), 15 - 29.

Raynal – Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008) Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Res.* **79**, 57 – 72.

Repelius, C. (1998) Sredstva za koagulaciju proizvedena fermentacijom i njihovo korištenje u proizvodnji sira. *Mljekarstvo* **48** (4), 253- 263.

Rogelj, I. (2015) Mikrobne kulture u proizvodnji sira. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević, B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 113 – 123.

Sabadoš, D. (1998) Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Sabljak, V., Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., Pejaković, A., Božanić, R. (2013) Određivanje trajnosti tradicionalnog svježeg sira. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. **8**, 115 - 122.

Samaržija, D., Damjanović, S., Pogačić, T. (2007) *Staphylococcus aureus* u siru. *Mljekarstvo* **57** (1), 31 – 48.

Sant'Ana, A.M.S., Bezerril, F.F., Madruga, A.S.M., Batista, A.S.M., Magnani, M., Souza, E.L., Queiroga, R.C.R.E. (2013) Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *J. Dairy Sci.* **96**, 7442 – 7453. doi: 10.3168/jds.2013-6915

Schulz-Collins, D., Senge, B. (2004) Acid- and acid/rennet-curd cheeses. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3. izd., (Fox, P.F., McSweeney P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P.), Elsevier, Oxford, 301 – 328.

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

Tratnik, Lj., Božanić, R., Drgalić, I. (2002) Svojstva i prihvatljivost svježeg sira proizvedenog korištenjem mješovite probiotičke kulture. *Mljekarstvo* **52** (3), 239 – 285.

Valkaj, K., Cerjak, M., Kalit, S., Rako, A., Wendorff, W.L. (2013) Do consumers from Međimurje region recognize their autochthonous Turoš cheese?. *Mljekarstvo* **63**, 211 – 219.

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb

Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* **12**, 91 – 109.

Zamberlin, Š., Antunac, N., Havranek, J., Samaržija, D. (2012) Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo* **62** (2), 111 – 125

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ivan Martić

Ime i prezime studenta