

# Određivanje udjela ukupnih mineralnih tvari i proteina u uzorcima sireva

---

Vranković, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:344340>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Lucija Vranković**

7433/PT

**ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH MINERALNIH TVARI  
I PROTEINA U UZORCIMA SIREVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitika prehrambenih proizvoda

**Mentor:** Prof.dr.sc. Ksenija Marković

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda**  
**Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**Određivanje udjela ukupnih mineralnih tvari i proteina u uzorcima sireva**

***Lucija Vranković, 0058211244***

**Sažetak:** Tijekom ovog istraživanja, metodom suhog spaljivanja te metodom po Kjeldahl-u, određen je udio ukupnih mineralnih tvari i proteina u osamnaest (n=18) uzoraka različitih sireva proizvedenih na hrvatskim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Udio ukupnih mineralnih tvari u analiziranim uzorcima sireva (n=18) kretao se u rasponu od 2,07% do 5,52% (prosječno 3,54%), dok se udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima sireva (n=18) kretao u rasponu od 13,29% do 33,75% (prosječno 25,33%). Dobiveni podaci mogu predstavljati doprinos utvrđivanju parametara kvalitete analiziranih proizvoda.

**Ključne riječi:** metoda po Kjeldahl-u, udio mineralnih tvari, udio proteina

**Rad sadrži:** 27 stranica, 3 slike, 3 tablice, 28 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Ksenija Marković

**Pomoć pri izradi:** Valentina Hohnjec, tehnički suradnik

**Datum obrane:** 10. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Quality Control**  
**Laboratory for Food Quality Control**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Determination of total mineral and protein content in cheese samples**

***Lucija Vranković, 0058211244***

**Abstract:** During this research, by dry burning method and by Kjeldahl method, was determined the content of total minerals and proteins in eighteen (n=18) samples of different cheeses produced on Croatian family farms. The content of total minerals in the analysed cheese samples (n=18) ranged from 2,07% to 5,52% (average 3,54%), while the content of total proteins in the analysed cheese samples (n=18) ranged from 13,29% to 33,75% (average 25,33%). The obtained data can be a contribution to determining the quality parameters of the analysed products.

**Keywords:** Kjeldahl method, mineral content, protein content

**Thesis contains:** 27 pages, 3 figures, 3 tables, 28 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Ksenija Marković, Full professor

**Technical support and assistance:** Valentina Hohnjec, Technical Associate

**Defence date:** July 10<sup>th</sup> 2020

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO.....  | 2  |
| 2.1 Mineralne tvari u mlijeku.....                                 | 2  |
| 2.2 Analitičke metode za određivanje mineralnih tvari u hrani..... | 4  |
| 2.3 Najznačajniji proteini mlijeka.....                            | 5  |
| 2.4 Analitičke metode određivanja proteina u hrani.....            | 9  |
| 2.5 Osnove proizvodnje sireva.....                                 | 11 |
| 2.6 Označavanje prehrambenih proizvoda.....                        | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....  | 14 |
| 3.1 Materijali.....  | 14 |
| 3.1.1 Uzorci.....  | 14 |
| 3.1.2 Laboratorijsko posuđe i uređaji.....                         | 15 |
| 3.1.3 Reagensi.....  | 15 |
| 3.2 Metode rada.....   | 16 |
| 3.2.1 Princip određivanja ukupnih mineralnih tvari.....            | 16 |
| 3.2.2 Princip određivanja ukupnih proteina.....                    | 16 |
| 3.2.3 Postupak određivanja ukupnih mineralnih tvari.....           | 17 |
| 3.2.4 Postupak određivanja ukupnih proteina.....                   | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....                                       | 20 |
| 5. ZAKLJUČAK.....  | 23 |
| 6. LITERATURA.....   | 24 |

## 1. UVOD

Hrana je složeni sustav sastavljen od brojnih hranjivih komponenata koje utječu na funkcioniranje ljudskog organizma. Ove komponente dijele se u dvije glavne skupine, a to su makronutrijenti i mikronutrijenti. Makronutrijente čine proteini, masti, ugljikohidrati i prehrambena vlakna, a mikronutrijente čine mineralne tvari i vitamini. Za normalno funkcioniranje ljudskog organizma potrebno je unositi dovoljne količine makronutrijenata koji su izvor energije i mikronutrijenata koji sudjeluju u važnim metaboličkim procesima (Vranešić Bender i Krstev, 2008).

Mlijeko i mliječni proizvodi dobar su izvor mineralnih tvari. Mlijeko se smatra jednim od najvažnijih izvora kalcija. Gotovo cjelokupna količina kalcija u ljudskom organizmu nalazi se u sastavu zubi i kostiju, što kalcij čini jednim od najvažnijih građevnih elemenata, a mlijeko i mliječne proizvode jednima od najvažnijih funkcionalnih proizvoda (Gordon, 2014).

Osim kao dobar izvor mineralnih tvari mlijeko se ističe i kao dobar izvor proteina. Proteini mlijeka dijele se u dvije glavne skupine, a to su kazein i proteini sirutke. Nutritivnu vrijednost proteina mlijeka uvjetuju omjer i udio esencijalnih aminokiselina koje se uspješno apsorbiraju u organizam. Povećani udio lizina i tioaminokiselina razlog je zbog kojeg proteini sirutke pokazuju veću nutritivnu vrijednost u odnosu na kazein i smatraju se jednim od glavnih izvora esencijalnih aminokiselina (Tratnik i Božanić, 2012).

Sir je jedan od glavnih proizvoda mljekarske industrije kojeg kao i mlijeko odlikuje bogat sastav proteina i mineralnih tvari. Danas u svijetu postoji veliki broj različitih vrsta sireva koji se učestalo javljaju u prehrani ljudi s područja Europe, Sjeverne Amerike, Australije i Novog Zelanda. Sir se osim zbog povoljnog sastava, konzumira i zbog svojih senzorskih karakteristika (Fox i Guinee, 2013).

Na temelju Zakona o hrani (Zakon, 46/07; Zakon, 155/08) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja Republike Hrvatske donijelo je Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (Pravilnik, 2009) u kojem su definirani zahtjevi kvalitete koje ti proizvodi moraju zadovoljiti prije stavljanja na tržište (Pravilnik, 2009).

Cilj ovog istraživanja bio je laboratorijskim analizama odrediti udio ukupnih mineralnih tvari i proteina u osamnaest ( $n = 18$ ) uzoraka različitih sireva proizvedenih na hrvatskim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, te time doprinijeti utvrđivanju parametara kvalitete analiziranih proizvoda.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Mineralne tvari u mlijeku**

Prehrambeni proizvodi složenog su kemijskog sastava kojeg čini niz makronutrijenata i mikronutrijenata. Svi nutrijenti koji su sadržani u prehrambenim proizvodima imaju različite učinke na ljudski organizam. Ugljikohidrati, prehrambena vlakna, masti i proteini ubrajaju se u skupinu makronutrijenata dok mineralne tvari ulaze zajedno s vitaminima u skupinu mikronutrijenata. Mikronutrijenti su iznimno važni metabolički faktori i u metabolizmu imaju razne uloge pa su tako neki ključni za aktivnost pojedinih enzima, aktivno sudjeluju u biokemijskim reakcijama, imaju određene kontrolne funkcije, posjeduju antioksidacijska svojstva ili sudjeluju u formiranju strukture određenih spojeva. Mineralne tvari pronalazimo uglavnom u ionskom stanju, a ovisno o koncentraciji u kojoj ih pronalazimo dijelimo ih na makromineralne i minerale u tragovima tj. mikromineralne. Osim u ionskom stanju mineralne tvari pronalazimo kao sastavne dijelove određenih spojeva. Makrominerali važni su za brojne funkcije ljudskog organizma, pa su tako npr. magnezij, fosfor i kalcij važni građivni elementi, kalij, natrij i klor odgovorni su za održavanje ravnotežnog stanja u organizmu, a fosfor i magnezij sudjeluju u metabolizmu brojnih spojeva. Minerali u tragovima se u prehrambenim proizvodima nalaze u malom udjelu koji prvenstveno ovisi o okolišnim čimbenicima. Unosom elemenata iz ove skupine u količinama većim od propisanih moguć je njihov toksični učinak (Vranešić Bender i Krstev, 2008).

Mlijeko je bogat izvor različitih mineralnih tvari koje doprinose njegovoj nutritivnoj vrijednosti. Mineralne tvari prisutne u mlijeku se s obzirom na udio u kojem su zastupljene dijele na makromineralne i na mikromineralne. Mlijeko sadrži veći broj različitih mikrominerala nego makrominerala. Mikrominerali u mlijeku imaju značajne uloge, a u mlijeko dolaze prvenstveno iz hrane. Neki od mikrominerala koji se javljaju u mlijeku su cink, brom, željezo, jod i mnogi drugi. Od prethodno spomenutih mikrominerala mlijeko je dobar izvor joda i cinka. Makrominerali u mlijeku se mogu naći u ionskom obliku ili kao sastavni dio enzima, vitamina, proteina i drugih organskih molekula. Fosfor i kalcij najvažnije su mineralne tvari prisutne u mlijeku. Mliječni proizvodi su u prehrani ljudi cijenjeni upravo zbog toga što se njihovom konzumacijom zadovoljavaju dnevne potrebe za unosom ovih dvaju mineralnih tvari. Fosfor se u mliječnim proizvodima nalazi najčešće u sastavu fosfolipida, u sastavu kazeinskih micela ili u obliku soli. Kalcij se u mlijeku prvenstveno nalazi u sastavu kazeinskih

micela, a kako bi iskorištenje kalcija u organizmu bilo što bolje značajan je povoljan udio vitamina D i fosfora. Osim na prehranbenu vrijednost mineralne tvari imaju utjecaj i na neka fizikalna svojstva mlijeka, pa tako utječu na gustoću i viskoznost, osmotski tlak, pH vrijednost, vrelište i talište, električnu provodljivost i slično. Isto tako kalcij i fosfor osim zbog svoje nutritivne vrijednosti značajni su i u procesu sirenja prilikom koagulacije proteina i formiranja gruš (Tratnik i Božanić, 2012).

Tablica 1. Prosječni sastav glavnih soli u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012)

| Soli                           | Udjel u mlijeku<br>mg/100mL | Udjel u topljivom<br>stanju % |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Kalcija (Ca)                   | 123                         | 39                            |
| Fosfora (P)                    | 95                          | 38                            |
| Magnezija (Mg)                 | 12                          | 73                            |
| Natrija (Na)                   | 58                          | <100                          |
| Kalija (K)                     | 141                         | <100                          |
| Klora (Cl)                     | 119                         | 100                           |
| Sumpora (sulfata)              | 30                          | 100                           |
| Limunske kiseline<br>(citrata) | 160                         | 90                            |

Kalcij je jedan od osnovnih građevnih elemenata ljudskog kostura te je više od 99 % ukupne količine kalcija u organizmu sastavni dio kostiju i zubi. Zbog toga je kod ljudi koji su oboljeli od osteoporoze glavna terapija za liječenje upravo povećanje unosa kalcija, ali i vitamina D koji je važan za metabolizam unesenog kalcija. Osim blagotvornog djelovanja na kosti, kalciju se pripisuje i blagotvorno djelovanje na funkcije srca i mozga (Laktašić-Žarjević, 2014).

Ljudi tijekom života mijenjaju svoje prehranbene navike pa je tako zamijećeno da se kod adolescenata može javiti nedostatak kalcija u organizmu zbog smanjenog unosa mliječnih proizvoda, dok kod djece to nije slučaj. Ta pojava javlja se iz socioloških razloga zbog toga što adolescenti pod utjecajem okoline započinju konzumaciju brojnih drugih proizvoda kao npr. gaziranih pića (Colić Barić i sur., 2000).



Bo-Ra i suradnici su od 2010. do 2012. godine provodili istraživanje o povezanosti unosa kalcija i pojave metaboličkog sindroma kod pretilih muškaraca. Iz rezultata tog istraživanja vidljivo je da je unos mliječnih proizvoda iznimno značajan jer se metabolički sindrom češće javljao kod pretilih muškaraca koji su uzimali visoke količine kalcija iz raznih dodataka prehrani bez konzumacije mliječnih proizvoda, nego kod onih koji su kalcij unosili konzumacijom mliječnih proizvoda (Bo-Ra i sur., 2016).

Iz istraživanja koje je proveo Tserendolgor (2014) još jednom je potvrđen značaj konzumacije mliječnih proizvoda. Proučavan je unos kalcija, a isto tako i udio kalcija u organizmu djece s područja Mongolije. Rezultati su pokazali kako je i unos kalcija i udio kalcija u organizmu djece ispod normalne razine, zbog čega je iznimno značajno povećati konzumaciju mliječnih proizvoda (Tserendolgor, 2014).

Unos kalcija u organizam izrazito je značajan kod osoba oboljelih od celijakije. Osobe oboljele od ove bolesti imaju oštećene crijevne resice pa je oslabljena mogućnost apsorpcije kalcija u organizam, zbog čega su te osobe iznimno podložne nedostatku kalcija u organizmu. Nedostatak kalcija u organizmu dovodi da brojnih zdravstvenih problema od kojih su neki već prethodno navedeni kao što su smanjenje koštane mase, rahitis i mnoge druge (Panjkota Krbavčić i Sučić, 2007).

## **2.2. Analitičke metode za određivanje mineralnih tvari u hrani**

Mineralne tvari dio su važnih metaboličkih aktivnosti te zbog toga imaju značajnu ulogu u ljudskom organizmu. Upravo zbog njihovog značaja potrebno je pratiti udio mineralnih tvari u prehrambenim proizvodima putem kojih se mineralne tvari primarno unose u organizam. Praćenje udjela mineralnih tvari u prehrambenim proizvodima pokazatelj je njihove nutritivne vrijednosti, ali i zdravstvene ispravnosti jer se osim poželjnih mineralnih spojeva u hrani određuju i mogući kontaminanti. Analitičke metode koje se koriste u analizi brojnih komponenata prehrambenih proizvoda, pa tako i ukupnih mineralnih tvari propisane su od strane nekoliko svjetskih organizacija, a neke od njih su: AOAC International, ISO (eng. *The International Organization for Standardization*), CEN (eng. *European Committee for Standardization*) i brojne druge. Zbog složenog sastava prehrambenih proizvoda, prije same analize potrebno je provesti homogenizaciju uzorka te izuzimanje odgovarajuće količine pripremljenog uzorka (Poitevin, 2016).

Jedna od najčešćih metoda za određivanje ukupnih mineralnih tvari je spaljivanje uzorka u mufolnoj peći pri temperaturama između 450 i 1000 °C. Ova metoda temelji se na uklanjanju organske tvari iz uzorka, a preostali dio nakon spaljivanja predstavlja ukupne mineralne tvari. Odvagani uzorci prije same mineralizacije u mufolnoj peći karboniziraju se na plameniku. Glavni nedostaci ove metode su dugotrajnost postupka jer se spaljivanje provodi i do 18 sati ovisno o uzorku, zatim mogući gubitci nekih hlapljivih komponenata, a može doći i do interakcija mineralnih tvari iz uzorka s komponentama od kojih je izrađena posudica u kojoj se provodi spaljivanje. Osim ovog suhog postupka spaljivanja, moguća je i primjena tzv. mokrog postupka spaljivanja u kojem se organske tvari prisutne u uzorku razaraju primjenom mineralnih kiselina. Dugotrajnost postupka spaljivanja u mufolnoj peći moguće je izbjeći primjenom mikrovalnog razaranja i tako provesti spaljivanje do pepela u svega nekoliko minuta. Nakon provedenog spaljivanja uzorka, moguće je pripremom otopine pepela i njenom analizom odrediti udio pojedinih mineralnih tvari koje se nalaze u tom uzorku. Za analizu otopine pepela najčešće se koriste spektrofotometrijske metode od kojih je najčešća tehnika atomske apsorpcijske spektrofotometrije (AAS, eng. *Atomic absorption spectrometry*). Primjenom AAS tehnike, koja se temelji na Kirchhoffovom zakonu, moguće je detektirati prisutnost metala u niskim koncentracijama. Ovako detaljna analiza omogućuje i provjeru zdravstvene ispravnosti namirnica jer se kontaminanti mogu detektirati čak i ako se u namirnici nalaze u vrlo niskim koncentracijama. Od AAS tehnika, najčešće se primjenjuju plamena atomska apsorpcijska spektrofotometrija (FAAS, eng. *Flame atomic absorption spectrometry*) i elektrotoplinska atomska apsorpcijska spektrofotometrija (ETAAS, eng. *Electrothermal atomic absorption spectrometry*). Razlika između FAAS i ETAAS je u načinu atomizacije, kod FAAS se ona postiže u plamenu, a kod ETAAS se atomizacija postiže grafitnom kivetom koja je zagrijana pomoću električne energije (Marković i sur., 2017).

### **2.3. Najznačajniji proteini mlijeka**

Proteini su polimerne molekule građene od 20 različitih aminokiselina koje su međusobno povezane. Struktura svih aminokiselina sastoji se od glavnog dijela koji je jednak za sve aminokiseline, te pobočnog ogranka. Glavni dio aminokiselina čini središnji ugljikov atom ( $\alpha$ - ugljikov atom) na koji su vezani amino skupina, karboksilna

skupina i jedan vodikov atom. Na središnji ugljikov atom vezan je i pobočni ogranak koji je specifičan za svaku aminokiselinu. Upravo su različiti pobočni ogranci aminokiselina odgovorni za njihovu značajnu kemijsku raznolikost. Značaj konzumacije hrane bogate proteinima vidljiv je u činjenici da ljudski organizam može sintetizirati 11 od 20 aminokiselina, dok je preostalih 9 esencijalnih aminokiselina potrebno unijeti hranom. Aminokiseline se sintetiziraju iz međuprodukata metaboličkih puteva, a glavni izvor dušika za sintezu aminokiselina je amonijak. Višak sintetiziranih aminokiselina ne može se skladištiti u stanici već se one razgrađuju tako da se aminoskupina odcjepljuje iz molekule i putem urea ciklusa izlučuje u obliku uree iz organizma dok se ugljikovodični dio molekule aminokiselina metabolizira putem raznih metaboličkih puteva ovisno o potrebama stanice. Proteini imaju trodimenzionalnu strukturu unutar koje nalazimo četiri strukturne razine, a to su: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura. Aminokiseline su u polipeptidnom lancu povezane peptidnom vezom koja nastaje povezivanjem  $\alpha$ -karboksilne i  $\alpha$ -amino skupine dviju različitih aminokiselina. Redoslijed kojim se aminokiseline povezuju čini primarnu strukturu proteina. Formiranjem vodikovih veza između atoma peptidne veze u osnovici polipeptidnog lanca nastaje odnos koji čini sekundarnu strukturu proteina. Oblici sekundarne strukture su  $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -ploča i  $\beta$ -okret. Formiranjem vodikovih i ionskih veza te van der Waalsovih i hidrofobnih interakcija između pobočnih ogranaka aminokiselina u polipeptidnom lancu nastaje odnos koji čini tercijarnu strukturu proteina. Većinom proteini imaju kuglastu ili globularnu strukturu u kojoj se hidrofobni aminokiselinski ogranci orijentiraju prema unutrašnjosti molekule, dok se hidrofilni ogranci nalaze na površini molekule i orijentiraju prema vodenoj okolini. Kvaterna struktura je odnos koji nastaje međusobnom interakcijom više polipeptidnih lanaca, a dimeri koji se sastoje od dva polipeptidna lanca najjednostavniji su primjer kvaterner strukture. Zbog svoje raznolike građe proteini su neophodni u metabolizmu živih stanica jer obavljaju funkcije koje su vitalne za život svake stanice. Enzimi su katalitičke molekule koje ubrzavaju odvijanje reakcija te se bez djelovanja enzima brojne reakcije metabolizma uopće ne bi mogle odvijati. Gotovo svi enzimi koji se nalaze u prirodi su upravo proteini. Enzimi ubrzavaju reakcije tako da vežu supstrat u aktivno mjesto i smanjuju energiju aktivacije tako da povećaju stabilnost energetski najzahtjevnijeg stanja u reakciji. Aktivno mjesto je mali dio enzima trodimenzionalne strukture kojeg formiraju pobočni ogranci aminokiselina, a poseban raspored pobočnih ogranaka u aktivnom mjestu odgovoran je za specifičnost vezanja molekula supstrata. Osim katalitičke uloge, proteini imaju i strukturnu ulogu. Proteini koji imaju strukturnu ulogu

su vlaknasti proteini i oni su odgovorni za čvrstoću stanica i tkiva koje izgrađuju. Posebnost vlaknastih proteina je u njihovoj strukturi koja se sastoji od posebnih uzvojnica koje se međusobno isprepleću stvarajući čvrste i stabilne strukture. U ovu skupinu proteina ubrajaju se  $\alpha$ -keratin kao najzastupljeniji građevni element kose te kolagen koji izgrađuje kožu, vezivna tkiva i sl. (Berg i sur., 2013).

Mlijeko sadrži velik broj različitih proteina od kojih su neki zastupljeni u puno većem udjelu od ostalih. Dvije glavne skupine proteina u mlijeku su kazein i proteini sirutke koji se u mlijeku nalaze u omjeru 80:20. Kazein se nalazi u najvećoj koncentraciji u mlijeku u odnosu na ostale proteine, a to je ujedno i najkompleksniji protein u mlijeku koji lako koagulira te se tako može izdvojiti iz mlijeka. Koagulacija se provodi zakiseljavanjem ili dodatkom enzima. Za razliku od kazeina, proteini sirutke ne koaguliraju djelovanjem kiseline ili enzima već koaguliraju pod utjecajem povišene temperature. Kazein se zbog svog raznolikog sastava označava kao kalcijev fosfoglikoprotein jer u svom sastavu sadrži fosfate, ugljikohidrate i kalcijeve ione, a u mlijeku se nalazi u obliku kazeinskih micela. Kazeinske micelle građene su od frakcija, a to su:  $\alpha_{S1}$ -kazein,  $\alpha_{S2}$ -kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein. Sve kazeinske frakcije međusobno su različite i formiraju se u mliječnim žlijezdama.  $\alpha_S$ - frakcije u svom sastavu sadrže fosfoserinske grupe koje tu frakciju čine hidrofилnom, ali izuzetno osjetljivom na kalcij s kojim fosfoserinske skupine stupaju u reakcije.  $\beta$ -kazein je frakcija zaslužna za skupljanje kazeina u agregate, ujedno je to i najhidrofobnija kazeinska frakcija.  $\kappa$ -kazein je jedina frakcija koja u svom sastavu sadrži ugljikohidrate zbog čega je izrazito hidrofилna. Zbog svoje hidrofилnosti  $\kappa$ -kazein se u micelama nalazi na površini, dok su  $\alpha_S$ - frakcije i  $\beta$ -kazein orijentirani prema unutrašnjosti micelle. Kazeinske frakcije se prvo povezuju u submicelle koje se onda preko Ca-fosfata povezuju u micelle. Povećanje koncentracije  $Ca^{2+}$  iona u mlijeku dovodi do grušanja kazeina pa se kalcijevi ioni uz enzime koriste u proizvodnji sira, dok se za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i svježeg sira koagulacija kazeina provodi zakiseljavanjem pri pH vrijednosti izoelektrične točke kazeina koja iznosi 4,6. Uz kazein u mlijeku se u značajnijim koncentracijama nalaze i proteini sirutke. Proteini sirutke su za razliku od kazeina stabilniji u vodenoj okolini, ali osjetljiviji na promjenu temperature te njihova koagulacija započinje već pri temperaturi od oko 60 °C.  $\beta$ -laktoglobulini i  $\alpha$ -laktalbumini čine najveći dio proteina sirutke.  $\beta$ -laktoglobulini čine oko 50% ukupnih proteina sirutke, a  $\alpha$ -laktalbumini čine oko 22% ukupnih proteina sirutke. U manjim koncentracijama proteine sirutke čine još i proteoze-peptoni te proteini koji u mlijeko

dospijevaju iz krvi, a to su imunoglobulini i albumin krvnog seruma. Proteini sirutke imaju značajno veću nutritivnu vrijednost u odnosu na kazein, ali i u odnosu na druge namirnice bogate proteinima kao što su jaja ili meso. Njihova nutritivna vrijednost očituje se i u visokom udjelu tioaminokiselina i lizina. Proteini sirutke dodaju se u mnoge prehrambene proizvode kako bi povećali njihovu nutritivnu vrijednost. Jedna od najčešćih primjena proteina sirutke je u hrani za dojenčad. Osim same količine esencijalnih aminokiselina u proteinima, također je važan i njihov omjer pa se tako nutritivna vrijednost proteina sirutke povećava s povećanjem omjera cistein/metionin (Tratnik i Božanić, 2012).

Osim zbog bogatog nutritivnog sastava, proteini sirutke se u prehrambenoj industriji koriste i zbog dobrih funkcionalnih svojstava. Koriste se kao sredstva za želiranje (u umacima, juhama, preljevima za salatu i sl.), kao sredstva za vezanje vode (u kruhu, kobasicama, kolačima i sl.) kao emulgatori (u dječjoj hrani, salamama i sl.) i za stvaranje pjene (u desertima, tučenim preljevima i sl.) (Herceg i Režek, 2006).

Tablica 2. Koncentracija glavnih proteina u mlijeku (Tratnik i Božanić,2012)

| PROTEINI<br>(glavne frakcije)    | Udjel u mlijeku<br>gkg <sup>-1</sup> | Udjel od ukupne mase<br>% |
|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| KAZEIN (ukupno)                  | 26,0                                 | 79,5                      |
| α <sub>S1</sub> -kazein          | 10,0                                 | 30,6                      |
| α <sub>S2</sub> -kazein          | 2,6                                  | 8,0                       |
| β-kazein                         | 10,1                                 | 30,8                      |
| κ-kazein                         | 3,3                                  | 10,1                      |
| PROTEINI SIRUTKE (ukupno)        | 6,3                                  | 19,3                      |
| β-laktoglobulin                  | 3,2                                  | 9,8                       |
| α-laktalbumin                    | 1,2                                  | 3,7                       |
| Albumin krvnog seruma            | 0,4                                  | 1,2                       |
| Imunoglobulini                   | 0,7                                  | 2,1                       |
| Proteoze-peptoni (i mnogi drugi) | 0,8                                  | 2,4                       |
| PROTEINI MEMBRANE MASTI          | 0,4                                  | 1,2                       |
| UKUPNI PROTEINI                  | 32,7                                 | 100,0                     |

## 2.4. Analitičke metode određivanja proteina u hrani

Proteini su iznimno značajni za brojne funkcije metabolizma, a udio proteina u prehrambenim proizvodima pokazatelj je njihove nutritivne vrijednosti. Razvijene su brojne analitičke metode koje omogućuju određivanje udjela proteina u hrani, a većina tih metoda temelji se na određivanju udjela dušika. Metode po Dumasu, Meulen-Heslingu, Will-Varentroppu i Kjeldahlu pripadaju grupi metoda kojima se udio proteina određuje indirektno preko dušika. Osim ovih metoda u analizi proteina koriste se i reakcije koje se temelje na taloženju ili promjeni boje, a to su: biuret i ksantoproteinska reakcija, biuret reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom, elektroforeza, Sörensenova formolna titracija, primjena azo bojila te infracrvena spektrofotometrija (Marković i sur., 2017).

Kjeldahlova metoda bazira se na razaranju organskih tvari koncentriranom sumpornom kiselinom prilikom čega dolazi do prevođenja dušika, koji potječe iz organskih spojeva, u amonijev sulfat. Amonijak se u sljedećem koraku oslobađa iz amonijeve soli dodatkom jake lužine i u lužnatim uvjetima predestilira u bornu kiselinu. Borni anioni koji zaostanu u suvišku titriraju se klorovodičnom kiselinom poznate koncentracije. Pomoću volumena klorovodične kiseline koji je upotrebljen za titraciju izračunava se udio dušika koji ujedno predstavlja udio proteina u uzorku. Kako bi se izračunao udio proteina, potrebno je dobiveni udio dušika pomnožiti s faktorom pretvorbe koji ovisi o analiziranom uzorku, a onaj najčešće korišten iznosi 6,25 (Jiang i sur., 2014).

Metoda po Dumasu manje je korištena metoda u odnosu na Kjeldahlovu metodu. Međutim, razvoj tehnologije omogućio je ovoj metodi bolju preciznost i jednostavniju provedbu postupka analize koja traje oko 5 min po uzorku zbog čega znanstvenicima postaje sve zanimljivija. Princip ove metode temelji se na pretvaranju svih dušičnih spojeva u analiziranom uzorku u dušikove okside koji se nakon toga prevode u plinoviti dušik. Ovaj proces odvija se pri temperaturama u rasponu od 800 do 1000 °C, a nastali plinoviti dušik detektira se pomoću detektora toplinske vodljivosti (Jung i sur., 2003).

Metoda po Meulen – Heslingu temelji se na određivanju udjela amonijaka koji se dobije uslijed zagrijavanja uzorka u struji vodika uz katalizator nikal. Oslobođeni amonijak nastaje iz dušika koji se nalazi u uzorku. Metoda po Will – Varentroppu također se temelji na određivanju amonijaka koji se ovom metodom dobije uslijed spaljivanja uzorka vapnom i lužinom (Marković i sur., 2017).

Biuret reakcija jednostavna je reakcija pomoću koje se udio proteina određuje na temelju promjene boje reakcijske smjese. Princip biuret reakcije zasniva se na reakciji peptidne veze s bakrovim ionima u lužnatim uvjetima pri čemu dolazi do razvoja ljubičastog obojenja reakcijske smjese. Intenzitet ljubičastog obojenja određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 540 nm i proporcionalan je udjelu proteina. Biuret reakcija s Folin – Ciocalteu reagensom naziva se još i metodom po Lowry-u. Ova metoda temelji se na razvoju plavo obojenog kompleksa koji nastaje kao posljedica reakcije proteina s Folin – Ciocalteu reagensom, a intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je udjelu proteina u uzorku (Jiang i sur., 2014).

Ksantoproteinska reakcija još je jedna reakcija kod koje je intenzitet obojenja reakcijske smjese proporcionalan udjelu proteina u uzorku. Žuto obojenje koje nastaje primjenom ove metode posljedica je reakcije proteina s koncentriranom dušičnom kiselinom. Primjena azo bojila metoda je kod koje se udio proteina određuje na temelju reakcije anionske boje s proteinima uslijed čega dolazi do formiranja netopljivog kompleksa. Netopljivi kompleks odvaja se iz reakcijske smjese centrifugiranjem, a udio proteina određuje se iz udjela nevezane boje. Što je udio nevezane boje veći, udio proteina u uzorku je manji. Primjenom Sørensenove formolne titracije udio proteina određuje se na temelju volumena lužine koji je korišten za titraciju spojeva koji nastaju reakcijom proteina i formaldehida (Marković i sur., 2017).

Udio proteina u uzorku moguće je odrediti mjerenjem apsorbancije u UV djelu spektra jer proteini pokazuju maksimum apsorpcije pri 280 nm (Jiang i sur., 2014). Određivanje proteina moguće je provesti mjerenjem apsorbancije u infracrvenom djelu spektra, pa se tako *mid infrared* (MIR) koristi za određivanje proteina u mlijeku dok se *near infrared* (NIR) može koristiti za više vrsta prehrambenih proizvoda. Elektroforeza se ne koristi za određivanje udjela proteina u uzorcima već se koristi za detekciju denaturacije proteina i za njihovu identifikaciju (Marković i sur., 2017).

Prilikom određivanja udjela proteina važno je odabrati metodu koja odgovara svojstvima proteina prisutnih u uzorku (Jiang i sur., 2014).

## 2.5. Osnove proizvodnje sireva

Proces proizvodnje svih vrsta sireva sastoji se od nekoliko glavnih faza, a to su: kontrola i čuvanje, standardizacija, homogenizacija, toplinska obrada i sirenje mlijeka, obrada gruša, oblikovanje, prešanje, soljenje i zrenje sira. Ove faze razlikuju se ovisno o vrsti sira koji se proizvodi. Kako bi se proizveo što kvalitetniji sir potrebno je koristiti zdravstveno ispravno mlijeko koje sadrži dovoljnu količinu topljivog kalcija i u kojem nije došlo do promjena na kazeinu. Tijekom čuvanja mlijeka potrebno je izbjeći predugo čuvanje kako ne bi došlo do promjena koje bi negativno utjecale na proces sirenja i kvalitetu sira. Standardizacija mlijeka odnosi se na podešavanje udjela mliječne masti u suhoj tvari mlijeka. Udio mliječne masti iznimno je važan u proizvodnji sira, a ovisi o vrsti sira koji se proizvodi. Standardizacijom mlijeka podešava se omjer kazeina i mliječne masti, a u proizvodnji sira moguće je provesti i standardizaciju proteina. Nakon standardizacije mlijeka slijedi faza homogenizacije mlijeka koja se u sirarstvu provodi samo kod proizvodnje mekih sireva. Razlog tomu je što homogenizirano mlijeko daje meki gruš koji veže više vode te se iz takvog gruša teško izdvaja sirutka. Ova pojava nepoželjna je u proizvodnji tvrdih sireva jer je tu cilj izdvajanje što veće količine sirutke iz gruša. Kako bi se osigurala mikrobiološka ispravnost mlijeka i proizvedenog sira, provodi se termička obrada mlijeka iako ona u pravilu nije poželjna jer dovodi do promjena na proteinima koje dovode do stvaranja mekog gruša. Termičku obradu mlijeka moguće je preskočiti ako je mlijeko dobiveno u strogim higijenskim uvjetima, dok se u ostalim slučajevima provodi pasterizacija mlijeka uglavnom pri temperaturi od 72 do 73 °C kroz 15 do 20 sekundi. Kako bi se u potpunosti uklonile moguće spore sporogenih bakterija, moguće je provesti baktofugaciju ili mikrofiltraciju mlijeka prije pasterizacije. Sirenje mlijeka provodi se u otvorenim kadama kod diskontinuirane proizvodnje ili u zatvorenim spremnicima kod kontinuirane proizvodnje, a provodi se pri temperaturi od 30 °C. Sirilo koje je odgovorno za stvaranje gruša dodaje se u mlijeko nakon dodatka svih drugih potrebnih dodataka koji ovise o vrsti sira koji se proizvodi. Dodaci koji se uz sirilo dodaju u mlijeko su mezofilna bakterijska kultura, CaCl<sub>2</sub>, boje, kalijev ili natrijev nitrat i dr. Nakon formiranja gruša, slijedi faza njegove obrade kojoj je cilj odvajanje gruša od sirutke. Sam proces obrade gruša ovisi o vrsti sira koja se proizvodi, kod nekih sireva gruš se reže na kockice određene veličine dok se u proizvodnji npr. svježeg sira gruš cijedi (tradicionalna metoda) ili se gruš zagrijava na izmjenjivaču topline nakon čega se sirutka izdvaja na centrifugalnom separatoru. Dobiveni gruš zatim se prebacuje u



kalupe za oblikovanje nakon čega slijedi prešanje. Gruš se može podvrgnuti pretprešanju, a zatim konačnom prešanju kako bi se istisnulo što više zaostale sirutke. Prešanje je potrebno provoditi postupno, povećavajući tlak kako ne bi došlo do stvaranja džepova sa sirutkom. Nakon prešanja, slijedi faza soljenja sireva, a za soljenje se koristi kuhinjska sol. Sol u siru produžuje njegovu trajnost jer smanjuje udjel vode što za posljedicu ima smanjenu mikrobiološku aktivnost, a ima utjecaj i na senzorske karakteristike sira. Za soljenje sireva najčešće se koristi salamura, a za vrijeme procesa salamurenja potrebno je voditi računa o mikrobiološkoj ispravnosti salamure. Kako bi se soljenje sira provelo što bolje, dobro je koristiti salamuru s manjom koncentracijom soli kako bi se sol jednakomjerno rasporedila u siru. Posljednja faza proizvodnje sireva je zrenje tijekom kojeg, uslijed brojnih biokemijskih procesa, dolazi do razvoja senzorskih svojstava karakterističnih za pojedinu vrstu sira. Zrenje sireva se odvija u zronicama, a to su posebne prostorije u kojima su podešeni potrebni uvjeti za postizanje poželjnih karakteristika sira. Tijekom zrenja potrebno je čitavo vrijeme njegovati sireve kako bi se dobio što kvalitetniji sir (Tratnik i Božanić, 2012).

## **2.6.Označavanje prehrambenih proizvoda**

Potrošači danas sve veću pažnju posvećuju pravilnoj prehrani i nutritivnoj vrijednosti prehrambenih proizvoda koji se stavljaju na tržište. Zbog toga se sve veća pozornost pridaje označavanju proizvoda kako bi se potrošačima osigurale točne informacije o sastavu, kvaliteti i sigurnosti proizvoda (Bandara i sur., 2016).

Proizvođači su obavezni proizvesti kvalitetan i zdravstveno ispravan proizvod, ali i pružiti potrošaču točne informacije o proizvodu. Prilikom deklariranja potrebno je odrediti prosječne hranjive vrijednosti proizvoda, ali i dozvoljena odstupanja od njih. Vrijednosti hranjivih tvari na deklaraciji mogu se dobiti temeljem analize hrane od strane proizvođača, izračuna iz poznatih ili stvarnih prosječnih vrijednosti upotrijebljenih sastojaka ili izračuna iz opće utvrđenih i prihvaćenih podataka (Knežević i Rimac Brnčić, 2014; Uredba (EU) br. 1169/2011).

Stvaranje baze podataka koja sadrži informacije o hranjivim vrijednostima sastavnih komponenti namirnica moglo bi olakšati označavanje proizvoda i poslužiti kao alternativa provođenju analiza sastava proizvoda. Međutim, stvaranje takve baze je kompleksno te za neke namirnice nije moguće odrediti hranjivu vrijednost bez direktne analize sastava (Cunningham i Sobolewski, 2011).

Jedna od značajnih uloga označavanja proizvoda borba je i protiv epidemije pretilosti koja je najizraženija u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Pretilost, uz karcinom, srčanožilne i respiratorne bolesti, pogađa veliki dio svjetske populacije. Navođenjem nutritivne vrijednosti prehrambenih proizvoda na pakiranju, nastoji se pomoći potrošačima u izboru nutritivno vrijednih proizvoda (Vasiljević i sur., 2015).

Istraživanje koje su proveli Bandara i suradnici (2016) pokazalo je kako većina kupaca čita deklaracije kako bi provjerili podrijetlo namirnica, također da li je namirnica podrijetlom iz organskog uzgoja te sadrži li alergene, a kao najznačajnije informacije na pakiranju navode naziv proizvoda i rok trajanja. Nedostatak vremena, povjerenje prema brendu, nedostatak razumijevanja informacija o hrani ili previše informacija na deklaracijama, pokazali su se razlozima zbog kojih neki kupci ne čitaju deklaracije (Bandara i sur., 2016).

Jedan od problema korištenja nutritivnih deklaracija je nerazumijevanje navedenih pojmova. Istraživanja su pokazala kako prethodno znanje iz područja nutricionizma doprinosi boljem razumijevanju deklaracija i poboljšava njihovu primjenu. Smatra se kako je potrebno educirati potrošače o pravilnoj prehrani te ih upoznati sa značenjem pojmova navedenih u okviru informacija o hrani, a kako bi se u potpunosti mogao iskoristiti potencijal njihove primjene (Soederberg Miller i Cassidy, 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJALI

##### 3.1.1 Uzorci

Određivanje ukupnih mineralnih tvari i proteina provedeno je na 18 uzoraka sira koji su proizvedeni različitim načinima proizvodnje na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima iz različitih regija. Slika 1. prikazuje analizirane uzorke sireva koji su za potrebe analize označeni brojevima od 1 do 18. Uzorci su usitnjeni i homogenizirani, te čuvani u smrznutom stanju do provedbe laboratorijskih analiza.



Slika 1. Analizirani uzorci sireva (vlastita fotografija)

S obzirom na navode proizvođača na njihovim proizvodima uzorci 1 – 6 su kuhani sirevi, uzorci 7 i 8 su sirevi pod nazivom prgica ili kvargl, uzorci 9 i 10 su preveli sirevi, uzorak 11 je meki sir, uzorci 12 - 14 su polutvrđi sirevi, uzorci 15 i 16 su tvrdi sirevi, uzorak 17 je ekstratvrđi sir i uzorak 18 je suhi sir.

### 3.1.2 Laboratorijsko posuđe i uređaji

- Prilikom analitičkog određivanja ukupnih mineralnih tvari korišteni su:
  - porculanska zdjelica
  - eksikator
  - plamenik
  - analitička vaga tip 2615, Tehnica, Železniki
  - mufolna peć tip Heraeus KR-170, W.C. Heraeus GmbH, Hanau
  - sušnica tip ST- 01/02, Instrumentaria, Zagreb.
- Prilikom analitičkog određivanja proteina korišteni su:
  - analitička vaga
  - kivete za Kjeltrec sustav (500 mL)
  - blok za spaljivanje
  - Erlemeyerova tikvica (250 mL)
  - pipeta (25 mL)
  - bireta (50 mL)
  - destilacijska jedinica Kjeltrec sustava.

### 3.1.3 Reagensi

- Prilikom analitičkog određivanja ukupnih proteina korišteni su :
  - 96%-tna sumporna kiselina
  - Kjeldahl-ove tablete ( $K_2SO_4 + CuSO_4$ )
  - 30%-tni vodikov peroksid,  $H_2O_2$
  - 40%-tni natrijev hidroksid (NaOH)
  - 4%-tna borna kiselina ( $H_3BO_3$ )
  - klorovodična kiselina (HCl,  $c=0,1\text{ mol/L}$ )

## **3.2 METODE RADA**

### **3.2.1 Princip određivanja ukupnih mineralnih tvari**

Princip određivanja ukupnih mineralnih tvari temelji se na suhom spaljivanju uzorka u mufolnoj peći koji je prethodno karboniziran na plameniku. Spaljivanje se provodi do postizanja pepela konstantne mase ili do postizanja jednoliko svijetlo sivog obojenja pepela. Spaljivanjem se iz uzorka uklanja organska tvar dok anorganska tvar zaostaje u obliku pepela koji predstavlja ukupne mineralne tvari u uzorku (Vahčić i sur., 2008).

### **3.2.2 Princip određivanja ukupnih proteina**

Kjeldahlov postupak određivanja ukupnih proteina ubraja se u grupu postupaka kojima se udio proteina određuje indirektno preko udjela dušika. Ovim postupkom određuje se udio ukupnog dušika koji se nalazi u sastavu -NH grupa prisutnih u analiziranom uzorku. Kako bi se dobio udio ukupnih proteina u uzorku potrebno je dobiveni udio dušika preračunati množenjem s faktorom pretvorbe F koji je definiran za određene skupine namirnica. Uzorak se u ovoj metodi podvrgava zagrijavanju sa sumpornom kiselinom uz katalizator  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{K}_2\text{SO}_4$  koji ima ulogu povišenja vrelišta sumpornoj kiselinu. Ovim postupkom dolazi do oslobađanja proteinskog i neproteinskog dušika, ali ne i dušika koji se nalazi u sastavu nitrita i nitrata. Oslobođeni dušik nalazi se u obliku amonijevih soli. Amonijak se potom oslobađa dodatkom natrijevog hidroksida, nakon čega se predestilira u bornu kiselinu. Udio ukupnog dušika određuje se titracijom klorovodičnom kiselinom nastalog amonijevog borata (Vahčić i sur., 2008).

### 3.2.3 Postupak određivanja ukupnih mineralnih tvari

Na analitičkoj vagi odvagano je 5 g (s točnošću  $\pm 0,0001$ ) homogeniziranog uzorka sira u porculansku zdjelicu. Porculanska zdjelica je prije vaganja uzorka izžarena u mufolnoj peći, ohlađena na sobnu temperaturu u eksikatoru i izvagana. Uzorak je nakon vaganja u porculansku zdjelicu karboniziran na plameniku, a potom je prebačen u mufolnu peć. Uzorak je spaljivan u mufolnoj peći pri temperaturi oko 550 °C do postizanja jednolično svijetlo sivog pepela. Nakon spaljivanja, porculanska zdjelica s pepelom ohlađena je u eksikatoru te izvagana.

Udio ukupnih mineralnih tvari izračunat je prema :

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je :  $m_1$ - masa prazne porculanske zdjelice

$m_2$ - masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g)

$m_3$ - masa porculanske zdjelice i pepela (g)

### 3.2.4 Postupak određivanja ukupnih proteina

Na analitičkoj vagi odvažano je 1g (s točnošću  $\pm 0,0001$ ) homogeniziranog uzorka sira u lađicu od aluminijske folije. Uzorak je pomoću pincete prebačen s lađice u kivetu (od 500 mL) za Kjeltrec sustav, pažljivo kako bi grlo kivete ostalo čisto. Folija je nakon prebacivanja uzorka ponovno izvagana kako bi se dobila točna masa uzorka u kiveti. Potom je u kivetu s uzorkom dodano 10 mL 96%-tne sumporne kiseline, 2 Kjeldahlove tablete ( $K_2SO_4 + CuSO_4$ ) i 5 mL 30%-tnog vodikovog peroksida. Nakon dodatka vodikovog peroksida došlo je do burne egzotermne reakcije što se očitovalo pjenjenjem i dimljenjem reakcijske smjese. Kada se reakcija smirila, kiveta je postavljena u blok za spaljivanje (slika 2) u digestoru i polagano zagrijavana. Spaljivanje je provedeno sve do pojave bistre plavo-zelene tekućine u kojoj nisu bili vidljivi crni neizgoreni komadići. Nakon hlađenja smjese u kiveti, slijedio je postupak destilacije koji je proveden u destilacijskoj jedinici Kjeltrec sustava (slika 3). Prije provedbe destilacije, u Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 25 mL 4%-tne borne kiseline koja je potom postavljena na postolje destilacijske jedinice tako da je destilacijska cjevčica bila uronjena u kiselinu. Dodana borna kiselina je blijedoružičaste boje. Kiveta je također postavljena na, za nju predviđeno mjesto, u destilacijskoj jedinici Kjeltrec sustava te je automatski dozirano 50 mL 40%-tnog NaOH. Destilacija je provedena 5 min tijekom kojih je amonijak predestiliran u bornu kiselinu uz nastanak amonijevog borata, pri čemu se prisutnost amonijevih iona očitovala u promjeni boje iz blijedoružičaste u zelenu. Nastali amonijev borat titriranje klorovodičnom kiselinom uz nastanak amonijevog klorida i borne kiseline, te promjenu boje iz zelene natrag u blijedoružičastu.

Udio ukupnog dušika izračunat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ ukupnog } N = \frac{(T-B) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 100}{m} \quad [2]$$

Udio ukupnih proteina izračunat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ proteina} = \%N \cdot F \quad [3]$$

gdje je : T- volumen HCl utrošen za titraciju uzorka (mL)

B- volumen HCl utrošen za titraciju slijepa probe (mL)

N- molaritet kiseline

m- masa uzorka (mg)

F- faktor za preračunavanje % dušika u proteine; za mlijeko i mliječne proizvode iznosi 6,38



Slika 2. Blok za spaljivanje (vlastita fotografija)



Slika 3. Kjeltac sustav (vlastita fotografija)



#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem, metodom suhog spaljivanja određen je udio ukupnih mineralnih tvari, a metodom po Kjeldahl-u udio ukupnih proteina u osamnaest (1.-18.) uzoraka različitih sireva proizvedenih na hrvatskim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Dobiveni analitički rezultati prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Udio ukupnih mineralnih tvari i proteina u uzorcima sireva (n=18)

| UZORAK  | UDIO UKUPNIH MINERALNIH TVARI (%) | UDIO DUŠIKA (%) | UDIO PROTEINA (%) |
|---------|-----------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1.      | 3,91                              | 3,47            | 22,13             |
| 2.      | 2,92                              | 3,66            | 23,37             |
| 3.      | 3,26                              | 3,90            | 24,89             |
| 4.      | 3,41                              | 4,68            | 29,87             |
| 5.      | 2,34                              | 3,90            | 24,89             |
| 6.      | 2,59                              | 3,89            | 24,82             |
| 7.      | 2,87                              | 4,00            | 22,50             |
| 8.      | 4,14                              | 3,92            | 24,98             |
| 9.      | 3,00                              | 3,83            | 24,46             |
| 10.     | 2,07                              | 3,94            | 25,15             |
| 11.     | 2,31                              | 3,26            | 20,82             |
| 12.     | 2,31                              | 4,01            | 25,58             |
| 13.     | 4,76                              | 4,57            | 29,14             |
| 14.     | 4,66                              | 5,01            | 31,96             |
| 15.     | 4,55                              | 2,08            | 13,29             |
| 16.     | 5,52                              | 3,35            | 21,37             |
| 17.     | 4,56                              | 5,29            | 33,75             |
| 18.     | 4,52                              | 5,16            | 32,92             |
| Raspon  | 2,07-5,52                         | 2,08-5,29       | 13,29-33,75       |
| Prosjek | 3,54                              | 4,00            | 25,33             |

Udio ukupnih mineralnih tvari u uzorcima sireva određen je metodom suhog spaljivanja uzoraka u mufolnoj peći. Dobiveni udio pepela predstavlja udio ukupnih mineralnih tvari. Iz dobivenih analitičkih podataka prikazanih u Tablici 3. vidljivo je da se u analiziranim uzorcima udio pepela, odnosno udio ukupnih mineralnih tvari kreće u rasponu od 2,07% do 5,52%, prosječno 3,54%.

Udio ukupnih proteina, prikazan u Tablici 3., određen je metodom po Kjeldahl-u kojom se udio ukupnih proteina određuje indirektno preko udjela dušika. Dobiveni udio dušika u analiziranim uzorcima sireva kreće se u rasponu od 2,08% do 5,29%, prosječno 4,00%. Kako bi se iz udjela dušika dobio udio ukupnih proteina potrebno je udio dušika pomnožiti s faktorom pretvorbe koji za mlijeko i mliječne proizvode iznosi 6,38. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima sireva kreće se u rasponu od 13,29% do 33,75%, odnosno u prosjeku iznosi 25,33%.

Iz Tablice 3. vidljivo je da se udio ukupnih mineralnih tvari razlikuje između analiziranih uzoraka (n=18) što je u skladu s objašnjenjem koje je dao Gordon (2014). Prema Gordonu (2014), udio mineralnih tvari u siru ovisi prvenstveno o sastavu mlijeka, koje u prosjeku sadrži oko 0,9% mineralnih tvari, te o samom procesu proizvodnje sira. Ovisno o parametrima procesa proizvodnje sira, neke mineralne tvari iz mlijeka u većoj mjeri prelaze u sirutku, dok neke u većoj mjeri zaostaju u grušu (Gordon, 2014).

Fox i Guinee (2013) u svom radu navode kako udio proteina u sirevima varira u rasponu od 4 do 40%, a razlike u udjelu proteina ovise o vrsti sira (Fox i Guinee, 2013). Rezultati analiza uzoraka sireva (n=18) dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s vrijednostima koje navode Fox i Guinee (2013).

Bachmann i suradnici (2011) su u svom radu opisali švicarske vrste sireva od kojih je ementaler jedan od najpoznatijih. Navode kako sir ementaler, starosti godinu dana, sadrži  $28,42 \pm 0,64\%$  ukupnih proteina (Bachmann i sur., 2011). Vrijednosti udjela ukupnih proteina koje su ovim istraživanjem dobivene za uzorke 4 i 13 usporedive su s vrijednostima koje Bachmann i suradnici (2011) navode za sir ementaler.

Havranek (1995) u svom radu predstavlja autohtone hrvatske sireve među kojima je i paški sir koji se ubraja u skupinu tvrdih sireva. Iz navedenog kemijskog sastava, vidljivo je kako paški sir sadrži 28,82% ukupnih proteina i 4,35% ukupnih mineralnih tvari. Vidljivo je i kako se kemijski sastav paškog sira mijenja ovisno o proizvođaču (Havranek, 1995). Vrijednosti udjela ukupnih mineralnih tvari dobivene analizom uzoraka 8, 13, 14, 15, 17 i 18 te vrijednosti ukupnih proteina dobivene

analizom uzoraka 4 i 13 mogu se usporediti s vrijednostima koje Havranek (1995) navodi u svom radu za paški sir.

Gobbetti (2004) u svom radu opisuje vrste ekstratvrdih sireva među kojima se nalazi i talijanski ekstratvrđi sir Parmigiano Reggiano. Gobbetti (2004) navodi kako Parmigiano Reggiano sadrži 33% ukupnih proteina i 4,6% ukupnih mineralnih tvari (Gobbetti, 2004). Vrijednosti udjela ukupnih mineralnih tvari i proteina, koje su u ovom istraživanju dobivene analizom uzoraka 17 i 18, u skladu su s navedenim vrijednostima za Parmigiano Reggiano (Gobbetti, 2004).

Margolies i Barbano (2018) proveli su istraživanje u kojem je kemijski sastav Cheddar sira određen *mid-infrared* spektroskopijom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako bi ova metoda određivanja udjela proteina, ali i udjela ostalih sastojaka proizvoda, zbog jednostavnosti korištenja, mogla imati veliku primjenu u mljekarskoj industriji (Margolies i Barbano, 2018).

Camina i suradnici (2012) proveli su istraživanje kojim su pokazali kako je moguće na temelju profila izotopa i mineralnih tvari potvrditi autentičnost tvrdih ribanih sireva. Ova saznanja omogućuju detekciju patvorenja poznatih svjetskih sireva kao što je na primjer Parmigiano Reggiano, a time i zaštitu potrošača s obzirom na to da onemogućuje neispravno deklariranje proizvoda (Camina i sur., 2012).

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih mineralnih tvari u analiziranim uzorcima sireva (n=18) kretao se u rasponu od 2,07% do 5,52%, prosječno 3,54%.
2. Udio ukupnih proteina u analiziranim uzorcima sireva (n=18) kretao se u rasponu od 13,29% do 33,75%, te je iznosio prosječno 25,33%.
3. Podaci dobiveni temeljem laboratorijskih analiza uzoraka sireva, mogu predstavljati doprinos utvrđivanju parametara kvalitete analiziranih proizvoda sa obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava.

## 6. LITERATURA

Bachmann H.P., Bütikofer U., Fröhlich-Wyder M.T., Isolini D., Jakob E. (2011) Swiss-Type Cheeses, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2. izd., str. 712-720.

Bandara B.E.S., De Silva D.A.M., Maduwanthi B.C.H., Warunasinghe W.A.A.I. (2016 ) Impact of food labeling information on consumer purchasing decision: with special reference to faculty of Agricultural Sciences. *Procedia Food Science* **6**: 309-313.

Berg J. M., Tymoczko J.L., Stryer L.,(2013) Biokemija, 6. izd. (1. izd. na hrvatskom) , Školska knjiga, Zagreb, str. 25-50, 205, 649, 685, 705.

Bo-Ra S.,Yeon-Kyeong C., Ha-Na K.,Sang-Wook S. (2016) High dietary calcium intake and a lack of diary consumption are associated with metabolic syndrome in obese males: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2010 to 2012. *Nutrition Research* **36(6)**: 518 - 525.

Camina F., Wehrens R., Bertoldi D., Bontempo L., Ziller L., Perini M., Nicolini G., Nocetti M., Larcher L. (2012) H, C, N, and S stable isotopes and mineral profiles to objectively guarantee the authenticity of grated hard cheeses. *Analitica Chimica Acta* **711**: 54-59.

Colić Barić I.,Kendel G., Španjur L., Šatalić Z. (2000) Unos mlijeka i mliječnih proizvoda u djece i adolescenata s obzirom na dob i spol. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **50(2)** : 99 - 112.

Cunningham J., Sobolewski R. (2011), Food composition databases for nutrition labeling: Experience from Australia. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**: 682-685.

Fox P.F., Guinee T. P. (2013) Cheese Science and Technology. U: Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, 1.izd., Park Y.W., Haenlein G.F.W., ur., John Wiley & Sons, Ltd. str. 357-389.

Gobbetti M. (2004) Extra-Hard Varieties. U: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3. izd., vol.2, Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P., ur., Elsevier Ltd. str. 51 – 70.

Gordon I. (2014) Minerals and Vitamins in Milk and Dairy Products. U: Milk and Dairy Products as Functional Foods, 1. izd., Kanekanian A., ur., John Wiley & Sons, Ltd. str. 289 – 313.

Havranek J.L. (1995) Autohtoni sirevi Hrvatske. *Mljekarstvo* **45(1)**: 19-37.

Herceg Z., Režek A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56(4)**: 379 – 396.

Jiang B., Tsao R., Li Y., Miao M. (2014) Food Safety: Food Analysis Technologies/Techniques. U: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 2. izd., Vol. 3., Van Alfen N.K., ur., Elsevier Inc. str. 273-288.

Jung S., Rickert D.A., Deak N.A., Aldin E.D., Recknor J., Johnson L.A., Murphy P.A. (2003) Comparison of Kjeldahl and Dumas Methods for Determining Protein Contents of Soybean Products. *Journal of American Oil Chemists' Society* **80 (12)**.

Knežević N., Rimac Brnčić S. (2014) Označavanje hranjive vrijednosti na deklaraciji prehrambenih proizvoda. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **9**: 17-25.

Laktašić-Žarjević N. (2014 ) Uloga vitamina D i kalcija u liječenju osteoporoze. *Reumatizam* **61 (2)**: 80 – 88.

Margolies B.J., Barbano D.M. (2018) Determination of fat, protein, moisture, and salt content of Cheddar cheese using mid-infrared transmittance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* **101(2)**: 924 - 933.

Marković K., Vahčić N., Hruškar M. (2017) Analitika prehrambenih proizvoda, Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 27-37, 38 – 50.

Panjkota Krbavčić I., Sučić M. (2007) Procjena unosa mlijeka, mliječnih proizvoda i kalcija u prehrani oboljelih od celijakije. *Mljekarstvo* **57 (3)** : 219 – 228.

Poitevin E. (2016) Official Methods for the Determination of Minerals and Trace elements in Infant Formula and Milk Products: A Review. *Journal of AOAC International* **99(1)** : 1 – 11.

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009) *Narodne novine* **20** (NN 20/2009).

Soederberg Miller L.M., Cassady D.L. (2015) The effects of nutrition knowledge on food label use. A review of the literature. *Appetite* **92**: 207-216.

Tratnik Lj., Božanić R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, 1. izd., Hrvatska mlijeckarska udruga, Zagreb, str. 38, 39, 41, 42, 45, 49, 55, 56, 64 - 66, 254 - 292.

Tserendolgor U. (2014) Calcium intake and serum calcium status in Mongolian children. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **144 (A)**:167-171.

Uredba (EU) br.1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1169> Pristupljeno: 07. srpnja 2020.

Vahčić N., Hruškar M., Marković K. (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane, Praktikum. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Vasiljević M., Pechey R., Marteau T.M. (2015) Making food labels social: The impact of colour of nutritional labels and injunctive norms on perceptions and choice of snack foods. *Appetite* **91**: 56 - 63.

Vranešić Bender D., Krstev S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus* **17 (1)** : 19 – 26.



## Izjava o izvornosti

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

Lucija Vranković

ime i prezime studenta