

Karakterizacija sastava i svojstava polutvrdog sira obogaćenog cvjetnom peludi

Vukelić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:467938>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Maja Vukelić

7227/PT

**KARAKTERIZACIJA SASTAVA I SVOJSTAVA POLUTVRDOG
SIRA OBOGAĆENOG CVJETNOM PELUDI**

ZAVRŠNI RAD

Kolegij: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda

Mentor: doc.dr.sc. Irena Barukčić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KARAKTERIZACIJA SASTAVA I SVOJSTAVA POLUTVRDOG SIRA OBOGAĆENOG CVJETNOM PELUDI

Maja Vukelić, 0058208621

Sažetak: U ovom radu određivana su fizikalna svojstva i kemijski sastav polutvrdoг sira obogaćenog s cvjetnom peludi. Istraživanje je provedeno na tri uzorka sira nakon trideset dana zrenja. Pri tom su sirevima određivani kiselosti, udio mliječne masti, proteina i suhe tvari, indeks boje, mineralni profil i parametri teksture, koncentracija polifenola, antioksidacijski kapacitet te je provedena senzorska analiza. Prosječne vrijednosti udjela proteina (26,09%), masti (29,27%), ukupne suhe tvari (66,31%) i kiselosti (pH=5,39) u skladu su s vrijednostima za kategoriju polutvrđih sireva. Utvrđeno je kako su koncentracije nekih mineralnih tvari (natrij, kalcij i kalij) i ukupnih polifenola bile znatno veće u odnosu na polutvrde sireve bez dodataka. Na osnovi svih dobivenih rezultata može se zaključiti kako dodatak cvjetne peludi povoljno utječe na nutritivna svojstva sira, dok istovremeno karakteristična senzorska svojstva i parametri teksture ostaju nepromijenjeni.

Ključne riječi: *antioksidacijski kapacitet, cvjetna pelud, kemijski sastav, polutvrđi sir, polifenoli*

Rad sadrži: 31 stranica, 1 sliku, 11 tablica i 25 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Irena Barukčić

Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Irena Barukčić

Datum obrane: 17. lipnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

CHARACTERIZATION OF COMPOSITION AND PROPERTIES OF SEMI-HARD CHEESE ENRICHED WITH FLOWER POLLEN

Maja Vukelić, 0058208621

Abstract: Physical properties and chemical composition were determined in this paper. Measurements have been conducted on three cheese samples after thirty days of ripening. Analyses that were made are cheese acidity, milk fat content, protein content, dry matter, color index, mineral profile, cheese texture, concentration of polyphenols and antioxidant capacity and sensory analysis. Average values of protein (26,09%) milk fat content (29,27%), cheese acidity (pH=5,39) and dry matter (66,31%) are in line with values for semi-hard cheese category. Concentration of some minerals (sodium, calcium and potassium) and total polyphenols are much higher compared to semi-hard cheeses without supplements. Analyzing the results it can be concluded that the addition of pollen affects the nutritional properties of cheese while sensory and texture properties stay unchanged.

Keywords: *antioxidant capacity, bee pollen, chemical composition, semi-hard cheese, polyphenols,*

Thesis contains: 31 pages, 1 figure, 11 tables, 25 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, 10000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Irena Barukčić

Technical support and assistance: doc.dr.sc. Irena Barukčić

Thesis defended: June 17th, 2021.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Proizvodnja sira	2
2.1.1. Odabir mlijeka.....	2
2.1.2. Standardizacija (tipizacija) mlijeka	3
2.1.3. Toplinska obrada mlijeka.....	3
2.1.4. Sirenje mlijeka	3
2.1.5. Obrada gruša.....	3
2.1.6. Oblikovanje i prešanje sira	3
2.1.7. Soljenje sira.....	4
2.1.8. Zrenje	4
2.2. Cvjetna pelud	4
3. Materijali i metode.....	7
3.1. Materijali	7
3.2. Metode rada.....	7
3.2.1. Određivanje kiselosti sira	7
3.2.2. Određivanje udjela mliječne masti u siru metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu. 8	
3.2.3. Određivanje udjela proteina u siru modificiranom metodom po Kjeldahlu (Kjeltec metoda) 9	
3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u siru.....	10
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola u polutvrdom siru s Folin.Ciocalteu reagensom.....	11
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uzorku sira FRAP metodom.....	13
3.2.7. Određivanje indeksa boje.....	15
3.2.8. Određivanje teksture sira	15
3.2.9. Određivanje mineralnog sastava sira metodom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom.....	16
3.2.10. Senzorska analiza sira metodom ponderiranih bodova	17
4. Rezultati i rasprava	21
4.1. Rezultati analiza kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira	21
4.2. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja	22
4.3. Mineralni profil polutvrđog sira s pčelinjom peludi	24
4.4. Senzorska analiza polutvrđog sira.....	26
4.5. Rezultati mjerenja teksture sira.....	27

5. Zaključak	28
6. Literatura.....	29

1. Uvod

Prema općoj definiciji sirevi su svježiji proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke ili kombinacijom navedenih sirovina (Tratnik i Božanić, 2012). Proizvodnja sira jedan je od najstarijih postupaka kojeg su ljudi počeli primjenjivati za konzerviranje lako pokvarljive hrane poput mlijeka, koje se spontano kiseli i gruša.

Arheološka istraživanja provedena u kolijevci civilizacije, između rijeka Eufrat i Tigris te nalazi koji potječu od 7000. do 6000. godina prije Krista upućuju na postojanje sira od ovčjeg i kozjeg mlijeka. Mnogi kasniji nalazi u grobnicama, ilustracije o mljekarskoj djelatnosti, glineno posuđe, prastari zapisi i testamenti pronađeni u brojnim civilizacijama svijeta, dokazuju poznavanje sireva od raznih vrsta mlijeka. Brojni zapisi poslije Krista već iznose neke detalje o procesu proizvodnje sira i sposobnosti grušanja mlijeka ne samo prirodnim zakiseljavanjem već i sekretom dobivenim iz želudaca mladih jarića, janjadi, i teladi kao i mliječno bijelom izlučevinom smokvina ploda. Osim toga, navodi se da je tada potrebno kraće vrijeme da se sirutka odvoji od gruša nego kod prirodno zakiseljenog mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012.).

Sirarstvo se smatra umjetnošću stvaranja okusa, utemeljenoj na kreativnosti i iskustvu sirara, iako je svaka faza proizvodnje sira usavršena suvremenim spoznajama iz područja tehnologije prerade mlijeka u sir. Sirarska tehnologija je danas jedna od najnaprednijih tehnologija prehrambene industrije u svijetu. Kako su suvremeni potrošači sve više orijentirani prema minimalno procesiranoj i što prirodnijoj hrani, tako se na tržištu sve češće mogu naći sirevi obogaćeni različitim funkcionalnim dodacima biljnog porijekla među koje se ubraja i cvjetna pelud. Poznato je kako cvjetna pelud nutritivno visokovrijedna zbog visokih koncentracija mineralnih tvari, vitamina i bioaktivnih komponenti te njezin dodatak značajno doprinosi povećanju prehrambene i zdravstvene vrijednosti sira. Međutim, kako je riječ o novim kategorijama funkcionalnih proizvoda, od velikog je značaja ispitati njihov sastav i svojstva. Stoga je cilj ovog završnog rada bio odrediti fizikalno-kemijski sastav i svojstva, antioksidacijski kapacitet i senzorska svojstva polutvrđog sira obogaćenog cvjetnom peludi te dobivene vrijednosti usporediti s postojećim sirevima iste kategorije kako bi se utvrdio utjecaj dodatka cvjetne peludi na prehrambenu vrijednost sira.

2. Teorijski dio

2.1. Proizvodnja sira

Proizvodnja sira obuhvaća sirenje ili grušanje mlijeka, sušenje gruša i oblikovanje sirnog zrna što se primjenjuje u proizvodnji svih vrsta sireva, te specifične postupke koji se provode pri daljnjoj obradi gruša tijekom proizvodnje određene vrste sira. Dva bitna cilja tehnologije proizvodnje sira jesu ustanoviti parametre koji siru daju poželjne karakteristike (okus, miris, aroma, tekstura, topljivost te sposobnost razvlačenja) te napraviti protokol proizvodnje i zrenja sira čime se osigurava ujednačena kvaliteta proizvoda.

Tehnologija proizvodnje sireva općenito obuhvaća slijedeće korake:

- Odabir mlijeka
- Standardizacija mlijeka
- Homogenizacija mlijeka (samo kod mekih sireva)
- Toplinska obrada mlijeka
- Sirenje mlijeka
- Obrada gruša
- Oblikovanje sira
- Prešanje sira
- Soljenje sira
- Zrenje (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.1. Odabir mlijeka

Mlijeko za sir mora imati dobru sposobnost sirenja. U proizvodnji sira najbitnija je količina proteina u mlijeku (mlijeko s većim postotkom proteina daje siru bolju kvalitetu, a isto tako je i prinos veći). Poželjno je zadržati prirodna svojstva kazeina i osigurati dovoljnu količinu topljivog kalcija koji je kasnije potreban za sirenje mlijeka. Isto tako mlijeko mora biti higijenski proizvedeno i što prije prerađeno u sir. Ako se iz nekog razloga treba duže čuvati, onda ga je potrebno termalizirati pri 63-69°C/10-60 sekundi te nakon toga čuvati na temperaturi 2-3°C (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.2. Standardizacija (tipizacija) mlijeka

Standardizacija mlijeka provodi se kako bi se dobio optimalan odnos kazeina (proteina mlijeka) i masti u mlijeku za sirenje koji je nužan kako bi iskorištenje masti u siru bilo što je moguće veće (razne vrste sireva imaju različit udio mliječne masti u suhoj tvari sira). Tipizacija se provodi obiranjem mliječne masti iz punomasnog mlijeka ili dodatkom obranog mlijeka u prahu (Havranek i sur., 2014).

2.1.3. Toplinska obrada mlijeka

Cilj toplinske obrade je biološka standardizacija kvalitete mlijeka za sirenje. Pasterizacija se, u proizvodnji sira, može provoditi pri niskim temperaturama (63-65°C/30 minuta), ali se u industriji provodi srednja pasterizacija u izmjenjivačima topline na 72-73°C/15-20 sekundi. Na toj temperaturi se neće uništiti sve spore bakterija tako da je preporučljivo mlijeko prethodno obraditi baktofugacijom ili mikrofiltracijom (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.4. Sirenje mlijeka

Sirilo je smjesa enzima koja vrši specifičnu proteolizu na kazeinu pri čemu mlijeko prelazi iz tekućeg u kruto agregatno stanje (dolazi do formiranja grušā uz izdvajanje sirutke). Sirenje mlijeka za proizvodnju sira provodi se pri temperaturi oko 30°C. Važno je da se nakon miješanja sirila i mlijeka oblikuje gruš dovoljne čvrstoće te je vrlo bitno odrediti vrijeme pogodno za rezanje grušā (Havranek i sur., 2014).

2.1.5. Obrada grušā

Dobiveni gruš reže se na kockice. Ovisno o vrsti sira koji se radi, veličina kockica se razlikuje. Kako bi se omogućila još bolja sinereza (izdvajanje sirutke), gruš se dogrijava. Nakon završene sinereze, gruš se prebacuje u posebno oblikovana cjedila (Tratnik i Božanić, 2012).

2.1.6. Oblikovanje i prešanje sira

Sir se dalje dodatno preša kako bi se zaostala sirutka skroz izdvojila te kako bi se dobio konačan oblik sira i željena tekstura. Završno prešanje se provodi i kako bi se osigurao nastanak svojstvene kore (kod klasičnog zrenja sireva bez folije) (Tratnik i Božanić, 2012). Kod prešanja je bitno da je sirno zrno temperature više od 20°C jer u slučaju da je niže, neće doći do potpuno sljepljivanja sirnih zrna. Tijekom prešanja se sir okreće kako bi se vlaga u siru ravnomjerno rasporedila i kako bi on dobio odgovarajući oblik (Havranek i sur., 2014).

2.1.7. Soljenje sira

Cilj soljenja sira je konzerviranje i sušenje sira te stvaranje željenog okusa. Postoji nekoliko načina soljenja sireva. Najčešći načini soljenja su utrljavanje soli po površini sira, soljenje sira u kalupu kod punjenja sirnim tijestom te uranjanje sira u salamuru. Salamura je ustvari zasićena otopina soli (oko 23% soli), odgovarajućeg pH (4,5 – 5,1) i sadržaja kalcija (0,2 – 0,3 %) (Kalit i sur., 2015.). Sol za upotrebu u sirarstvu provodi se prema standardima. Ukoliko mikrobiološki ne odgovara, ne smije se koristiti. Sol inhibira rast nekih bakterija, a stimulira rast nekih drugih (Havranek i sur., 2014).

2.1.8. Zrenje

Zrenje sira odvija se u prostorijama sa povoljnom klimom određene temperature, relativne vlažnosti i protoka zraka. Uz to je potrebna i odgovarajuća oprema kako bi se osiguralo odvijanje fizikalno-kemijskih i biokemijskih procesa u siru (Tratnik i Božanić, 2012). Glavni cilj zrenja je pretvaranje sirne mase u sireve karakteristične arome, teksture i izgleda. Tijekom zrenja nastaju aromatski spojevi karakteristični za svaki pojedini sir. Za vrijeme trajanja zrenja, sir je potrebno njegovati i to u vidu okretanja, brisanja suhom ili vlažnom krpom te četkanja struganja i ribanja sira. Takvom njegom sprječava se razvoj plijesni ili prekomjernog maza (Kalit i sur., 2015).

Navedene faze proizvodnje sira zajedničke su svim sirevima. Ovisno o vrsti sira, neke faze se mogu razlikovati (vrijeme zrenja, način obrade gruša, soljenje sira). Danas se sve više proizvode sirevi s raznim dodacima u svrhu poboljšanja kako nutritivne vrijednosti tako i senzorskih svojstava. Najčešći dodatak su začini kao npr. ružmarin, češnjak, paprika, kopar, ali isto tako i cvjetna pelud koja ima ljekovita svojstva.

2.2. Cvjetna pelud

Pelud su muške spolne stanice koje su presudne za razmnožavanje biljnih vrsta. Nosilac je genski svojstava biljke i zato sadrži sve neophodne hranjive tvari za stvaranje i razvoj novog života. Pelud je pčelinjoj zajednici glavni izvor bjelančevina, minerala i vitamina. Zbog prirodnih sastojaka, osim za pčele, biološki je vrlo vrijedan i za zdravlje ljudi. Takvo bogatstvo hranjivih tvari nije pronađeno ni u jednom drugom biljnom obliku. Njegova ljekovita svojstva utječu na poboljšanje i održavanje ljudskog zdravlja pa se u te svrhe i koristi. Bioaktivne komponente pčelinje peludi uključuju flavonoide, fenolne kiseline i njihove derivate (Roldán i sur., 2011).

Uspoređujući ga s mnogim standardnim prehrambenim namirnicama, pelud je bogat proteinima, sadrži malo masti i obiluje mineralima i vitaminima (Tablica 1). Sve do danas poznate aminokiseline pronađene su u peludi, a to su u najvećem postotku prolin, asparaginska kiselina, fenilalanin i glutaminska kiselina (Roldán i sur., 2011). Oko 70% peludi čine bioaktivne komponente (Borycka i sur., 2015) od kojih potječu antioksidativna, antimikrobna, antialergena i protuupalna svojstva.

Tablica 1. Kemijski sastav peluda (Čanak, 2013.)

Glavni sastojci	Minimum – maksimum g/100g osušenog cvjetnog praha
Bjelančevine	10-40
Masti	1-10
Ugljikohidrati	55-80
Šećeri (fruktoza i glukoza)	2,1
Dijetalna vlakna i pektin	0,3-20
Pepeo	2-6
Ostalo	2-5

Pelud sadrži u visokim koncentracijama brojne kemijske elemente kao što su željezo, bakar, cink, kobalt, selen, mangan, silicij, natrij, kalij, aluminijski, fosfor, barij, srebro, krom, itd. Hranjiva vrijednost peluda je značajna zbog sadržaja esencijalnih kiselina koje nije moguće sintetizirati u organizmu, već se unose hranom (Levaković, 2014). U tablici 2. prikazane su mineralne tvari zastupljene u najvećoj koncentraciji.

Tablica 2. Mineralni sastav peludi (Čanak, 2013.)

Mineralna tvar	Sadržaj (mg g⁻¹)
Kalij	4-20
Magnezij	0,2-3
Kalcij	0,2-3
Fosfor	0,8-6
Željezo	0,11-0,17
Cink	0,03-0,25
Mangan	0,002-0,11

Kemijski sastav cvijeta, vrsta pčela, geografski položaj i vrijeme skladištenja peludi utječu na kemijski sastav što posljedično dovodi do manjih promjena kako u kemijskom sastavu tako i u bioaktivnim svojstvima (Yerlikaya, 2014).

U današnje vrijeme sve se više proizvode sirevi sa raznim dodacima koji su najčešće neki začini. Dodavanje začina u sireve potrebno je ograničiti na 2% (Krapljan, 2020) jer bi u protivnom začini ili neki drugi dodatak preuzeo okus sira te negativno utjecao na senzorske karakteristike. Svaki dodatak doprinosi ili aromi ili antimikrobnom i antioksidacijskom djelovanju.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Za potrebe provođenja eksperimentalnog dijela ovog završnog rada korišteni su uzorci polutvrdog sira s dodatkom pčelinje peludi, trgovačkog naziva "Gacki sir s pčelinjim peludom" proizvođača Sirana Runolist. Uzorke je ustupio proizvođač direktno, izuzimanjem uzoraka (n=3) po završetku proizvodnje i procesa zrenja u trajanju od 30 dana. Uzorci su čuvani na hladnom ($\leq 8^{\circ}\text{C}$) do provođenja analiza.

3.2. Metode rada

3.2.1. Određivanje kiselosti sira

a) Određivanje pH-vrijednosti sira

pH vrijednost sira određivana je pomoću pH-metra (pH3110, WTW, Weilheim, Germany) na način da se uzorak sira usitnio u tarioniku i pomiješao sa prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom u omjeru 3:10. Uranjanjem elektrode pH-metra u homogeniziranu smjesu se zatim očitala pH-vrijednost (Božanić i sur., 2010).

b) Određivanje titracijske kiselosti sira

Postupak:

U dvije Erlenmeyerove tikvice odvaži se po 5 g sira koji se usitni i otopi u tarioniku uz dodatak manje količine destilirane vode zagrijane na 50°C . Dobivena smjesa se zatim kvantitativno prenese u Erlenmeyerove tikvice tako da ukupna količina vode ne prelazi 100 mL. U prvu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 1 mL otopine kobaltovog sulfata te ta otopina služi kao standardna boja do koje se moraju titrirati analizirani uzorci. U drugu Erlenmeyerovu tikvicu se zatim doda 1 mL 2%-tnog fenolftaleina i titrira se s 0,1 M NaOH do pojave blijedocrvene boje identične onoj u prvoj tikvici. Boja mora biti stabilna dvije minute (Božanić i sur., 2010).

Izračun kiselosti sira radi se prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 8 \times f \quad [1]$$

gdje je a = mL 0,1 M NaOH utrošene za neutralizaciju,

f = faktor otopine NaOH,

8 = razrijeđenje

3.2.2. Određivanje udjela mliječne masti u siru metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu

Metoda se zasniva na kemijskom otapanju kazeina (protein mlijeka) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Dodaje se izoamilni alkohol radi lakšeg odvajanja masti jer on snižuje površinsku napetost. Mast se odvoji centrifugiranjem i količina masti se očitava na skali butirometra pri temperaturi od 65°C.

Postupak:

2 do 2,5 g sira odvažuje se i kvantitativno prenese u staklenu čašu u koju se zatim otpipetira 10 mL sumporne kiseline (Gerberova, gustoće 1,520 g/cm³) te se sadržaj zagrijava u vodenoj kupelji. Tijekom zagrijavanja, sadržaj je potrebno stalno miješati. Kad se sir otopi, sadržaj se prelije u butirometar za mlijeko, a čaša se ispere sa 9 mL sumporne kiseline. Nakon toga se u butirometar otpipetira 1 mL izoamilnog alkohola, začepi se čepom te se promućka. Potom se uzorci centrifugiraju 5 minuta pri 1200-1300 okretaja/min u centrifugi po Gerberu. Butirometar se nakon centrifugiranja drži 5 minuta u vodenoj kupelji pri 65°C ili ostavi u centrifuge ukoliko ista ima mogućnost održavanja navedene temperature, nakon čega se očitava postotak masti (Božanić i sur., 2010).

Izračun udjela mliječne masti u siru:

$$\% \text{ masti u siru} = m \times 11,33 / A \quad [2]$$

gdje je m = očitana postotak masti na butirometru,

A = odvaga sira u gramima

3.2.3. Određivanje udjela proteina u siru modificiranom metodom po Kjeldahlu (Kjeltec metoda)

Metoda određivanja proteina po Kjeldahlu odvija se kroz tri koraka. Ti koraci su redom spaljivanje (mineralizacija), destilacija i titracija. Prilikom zagrijavanja uzorka uz dodatak sumporne kiseline i katalizatora dolazi do razaranja organskih tvari u uzorku. Posljedica je oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata. Dodatak natrijeva hidroksida rezultira oslobađanjem amonijaka iz amonijeva sulfata koji se onda predestilira u bornu kiselinu uslijed čega nastaje amonijev borat. Nastali amonijev borat titrira se klorovodičnom kiselinom nakon čega nastaje amonijev klorid i borna kiselina (Marković i sur., 2017).

Postupak:

Spaljivanje

Spaljivanje je provođeno na bloku za spaljivanje (1007 Digestion System DS6, Tecator, Danska) smještenom u digestoru (DIGIM 12, GIMlab, Hrvatska) sukladno slijedećoj proceduri.

Na laboratorijskoj vagi se odvagne 1 – 2 g sira te se prebaci u kivetu od 500 mL. Nakon toga dodajemo 15 mL 96%-tne sumporne kiseline i 2 Kjeldahl-ove tablete kao katalizator. Tako pripremljen uzorak ostavi se neko vrijeme kako bi se odvila reakcija te se zatim lagano u digestoru zagrijava u bloku za spaljivanje uz postupno pojačavanje jačine zagrijavanja. Spaljivanje je završeno kad u kiveti zaostane bistra plavo-zelena tekućina bez krutih crnih komadića uzorka. Kada se sadržaj ohladi, u kivetu se dodaje 80 mL destilirane vode te se kiveta postavlja u Kjeltec i Destiling Unit sustav za destilaciju (2100 Distillation Unit, FOSS).

Destilacija

Na postolje u destilacijskoj jedinici stavi se Erlenmeyerova tikvica zaremene 300 mL u koju je prethodno otpipetirano 25 mL 4%-tne borne kiseline te se podigne u gornji položaj tako da je destilacijska cjevčica uronjena u otopinu. Kjeldahlova kiveta se postavi na predviđeno mjesto i zatvore se sigurnosna vrata. Dozira se 70 mL 40% NaOH u Kjeldahlovu epruvetu. Destilacija traje 4 minute. Destilat je zelene boje što ukazuje na prisutnost amonijaka.

Titracija

Titracija se provodi direktno u prihvatnoj tikvici s 0,1 M HCl. Titracija je gotova kada boja otopine postane ružičasta (kakva je bila borna kiselina prije destilacije).

Isti postupak provede se i za tzv. "slijepu probu" koja sadrži sve osim uzorka.

Izračun:

$$\%N = \frac{(V-Vs)*c(HCl)*14,007*100}{m(uzorak)[mg]} \quad [3]$$

$$\%proteina = \%N * F \quad [4]$$

gdje je:

V – utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju uzorka

Vs – utrošeni mL 0,1 M HCl za titraciju slijepe probe

F – faktor za preračunavanje % dušika u proteine (6,38 za mlijeko i mliječne proizvode)

3.2.4. Određivanje ukupne suhe tvari u siru

Metoda se zasniva na isparavanju vode iz uzorka sušenjem u sušioniku pri temperaturi 105°C do konstantne mase.

Postupak:

U prethodno posušenu i ohlađenu aluminijsku posudicu napunjenu izarenim kvarcnim pijeskom odvagane se 2-3 g uzorka. Posudica se zatim stavi u sušionik na 105 °C na 1-2 h s time da ju se ne smije skroz poklopiti. Potom se posudica izvadi iz sušionika u eksikator, ohladi i odvaži na analitičkoj vagi. Sušenje se ponavlja toliko puta dok zadnja odvaga ne bude veća od prethodne (Božanić i sur., 2010).

Izračun:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [5]$$

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola u polutvrdom siru s Folin-Ciocalteu reagensom

Određivanje ukupnih fenola se provodi u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (modificirano prema Shortle i sur., 2014).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC)
- Staklene kivete
- Vortex mješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Plastična lađica za vaganje
- Pipete od 1 mL, 2 mL i 5 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 mL, 1000 mL i 5000 mL)
- Menzura
- Stalak za epruvete
- Termostat
- Staklene epruvete
- Falcon epruvete

Reagensi:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema uzorka

Za određivanje ukupnih fenola uzorak se priprema na način da se 20 g uzorka (sira) homogenizira sa 20 mL destilirane vode. Tako homogeniziran uzorak se zatim centrifugira (Rotina 380R, Hettich Zentrifugen GmbH, Njemačka) 10 minuta. Ekstrakt se odvoji i kao takav skladišti na 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

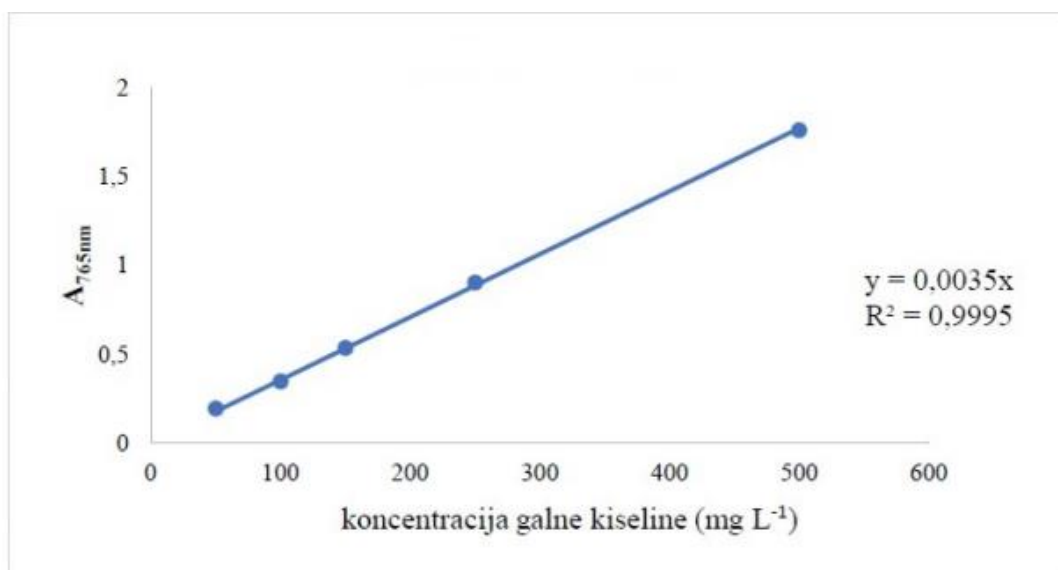
Postupak:

U staklenu epruvetu se otpipetira 0,1 mL ekstrakta uzorka, 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon par minuta 1 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata. Sadržaj se homogenizira i potom inkubira 25 min na 50 °C. Nakon toga se mjeri apsorbancija na

spektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba se pripremi na isti način s tim da se umjesto uzorka stavi destilirana voda u istoj količini.

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca se odvaži 0,5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline se rade razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice se otpipetira 0,1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 0,2 mL F.C. reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon nekoliko minuta se doda 1 mL 20 %-tnog natrijeva karbonata. Sve se skupa pomiješa (pomoću Vortexa), a potom se uzorci termostatiraju 25 min pri temperaturi 50°C. Za slijepu probu se uzima 0,1 mL destilirane vode. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija se nacrtava baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola se izračuna prema dobivenoj jednadžbi pravca (slika 1).



Slika 1. Baždarni pravac za galnu kiselinu (GAE)

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uzorku sira FRAP metodom

FRAP metodu razvili su Benzie (1996.) i Benzie i Strain (1996.). Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojen produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju (pH=3,6) kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal Fe^{3+}/Fe^{2+} iznosi 0,77 V i svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

FRAP vrijednosti se najčešće izražavaju preko askorbinske kiseline, $FeSO_4$ ili trolox ekvivalenata (Benzie i Strain, 1996.).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC)
- Staklene kivete
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Mikropipete Eppendorf (100 mL, 1000 mL i 5000 mL)
- Staklene epruvete
- Staklena čaša (50 mL)
- Odmjerna tikvica (5 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Plastična lađica za vaganje
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)

Kemikalije i reagensi:

- Klorovodična kiselina, 40 mM
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 5mM – odvagane se 0,0156 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 5 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom (HCl)
- Željezo (III) klorid heksahidrat ($FeCl_3 \times 6H_2O$), 20mM
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6
- FRAP reagens – priprema se u staklenoj čaši volumena 50 mL tako da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III) klorida heptahidrata

Priprema uzorka

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uzorku, uzorak se priprema na način da se 20 g uzorka (sira) homogenizira sa 20 mL destilirane vode. Tako homogeniziran uzorak se zatim centrifugira (Rotina 380R, Hettich Zentrifugen GmbH, Njemačka) 10 minuta. Ekstrakt se odvoji i kao takav skladišti na 4 °C do upotrebe (modificirano prema Apostolidis i sur., 2007).

Postupak:

U staklene epruvete se otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL uzorka i 2080 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa na vortexu te se 5 minuta termostatira na temperature 37°C. Potom se mjeri apsorbanacija pri valnoj duljini od 593 nm. Priprema se i slijepa proba koja sadrži sve osim uzorka (umjesto njega se dodaje destilirana voda u istoj količini).

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 500 ml 1 mM otopine željezo (II) sulfat septahidrata. Od te otopine se pripremi pet razrjeđenja u koncentracijama od 0,25, 100, 250, 500 i 750 µM i to na način da se u odmjerne tikvice (10 mL) otpipetira 0,25, 1,0, 2,5, 5,0 i 7,5 mL alikvota otopine željezo (II) sulfat septahidrata te se tikvica nadopuni destiliranom vodom do oznake.

U odmjerne tikvice (10 mL) se redom otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL otopine prethodno pripremljenog standarda i 2080 µL FRAP reagensa, sve se dobro promiješa te se 5 minuta termostatira na 37°C. Nakon termostatiranja mjeri se apsorbanacija pri valnoj duljini od 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim standarda umjesto kojeg se dodaje destilirana voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbanacije nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel s vrijednostima koncentracije željezo (II) sulfat septahidrata na apscisi i vrijednostima apsorbanacije na ordinati.

Na temelju rezultata koje smo dobili, jednadžba pravca je:

$$Y = 0,00053372 \times X \quad [6]$$

gdje je y – apsorbanacija pri 593 nm, a x – ekvivalent Fe^{2+} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

3.2.7. Određivanje indeksa boje

Danas se u svrhu instrumentalnog određivanja boje za prehrambene proizvode najčešće koristi CIELAB metoda koja je ustanovljena od strane Commission Internationale de L'Eclairage (Lancaster i sur., 1997). Metoda se zasniva na mjerenju tri dimenzije u prostoru boje. Takvo mjerenje izražava se L^* , a^* i b^* vrijednostima. L^* označava svjetlinu, tj. skalu sive boje, gdje je 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijela boja. Parametar a^* ima raspon od -100 (čisto zelena boja) do +100 (čisto crvena boja). Parametar b^* isto ima raspon -100 do +100, ali ovdje -100 označava čisto plavu boju, a +100 čisto žutu boju. Ukupnu promjenu boje (ΔE) moguće je dobiti pomoću parametara L^* , a^* i b^* , a računa se prema formuli:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2} \quad [7]$$

3.2.8. Određivanje teksture sira

Tekstura polutvrdog sira određivana je analizom teksturalnog profila (engl. Texture Profile Analysis, TPA) ili metodom dvostrukog zagrizava. Ovom metodom se simulira dvostruki zagriz tako 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.

3.2.9. Određivanje mineralnog sastava sira metodom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom

U postupcima pripreme uzoraka i standarda korištena je dušična kiselina (HNO_3) (65%, v/v) i vodikov peroksid (H_2O_2) (30%, v/v) (Kemika d.o.o., Hrvatska). U analizama je korištena ultra-čista voda (18 M Ω cm) dobivena sustavom pročišćavanja NIRO VV UV UF 20 (Nirosta d.o.o. Water Technologies, Osijek, Croatia). Koncentracije mineralnih tvari prisutnih u polutvrdom siru s pčelinjom peludi određene su primjenom tehnike induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP - MS).

Postupak započinje tako da se uzorci sireva važu u posudicama (2 g) i doda se 1 mL H_2O_2 te 6 mL HNO_3 . Mokro spaljivanje uzoraka odvija se u mikrovalnoj pećnici Multiwave 3000 (Anton Paar, Ostfildren, 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 prethodno dobivenom ultra-čistom vodom. Isti postupak koristi se za slijepu probu, ali bez uzorka.

Metodom kalibracijske krivulje provedena je kvantitativna analiza. 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.

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 L min ⁻¹	15 L min ⁻¹
Raspršivač argona	0,85 L min ⁻¹	0,55 L min ⁻¹
Sporadni protok	0,2 L min ⁻¹	0,2 L min ⁻¹
Brzina unosa uzorka	1,5 mL min ⁻¹	1,5 mL min ⁻¹
Unutarnji promjer injektora	2,0 mm	2,0 mm

Nebulizer	Stakleni koncentrični (Meinhard)	Stakleni koncentrični (Meinhard)
Vrsta raspršivača	Stakleni ciklonski	Stakleni ciklonski

3.2.10. Senzorska analiza sira metodom ponderiranih bodova

Senzorska analiza znanstvena je disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica, a koja se određuju uz pomoć osjetila mirisa, okusa, njuha dodira i sluha. Senzorska svojstva namirnice uključuju tri osnovne karakteristike. To su izgled (boja, veličina, oblik), okus i miris te tekstura (viskoznost, hrskavost) (Tratnik i Božanić, 2012).

Prednosti senzorske ocjene kvalitete proizvoda su brzina i mogućnost ranog otkrivanja mane proizvoda, točnost u procjeni kvalitete proizvoda, jednostavnost, niski troškovi i mnogostruka primjena. Nedostatci se odnose uglavnom na probleme pri interpretaciji rezultata i odabiru što objektivnijih metoda (Tratnik i Božanić, 2012).

Pri senzorskoj analizi mlijeka i mliječnih proizvoda koristi se metoda ocjenjivanja tj. bodovanja s ponderiranim bodovima. U tom se slučaju svako navedeno svojstvo ocjenjuje ocjenom od 1 do 5, a nedostatak takve procjene korigira se faktorom značajnosti (F_v). Množenjem faktora značajnosti i ocjena dobiju se ponderirani bodovi (Božanić i sur., 2010).

Termini koji određuju kvalitetu sireva su:

- Vanjski izgled – prejednoličan, previsok, deformiran, konkavan, napuhnut, konveksan, zemljan, prljav, nakrivljen
- Unutarnji izgled – bez rupa, premalo rupa, previše rupa, premale, prevelike, napuhnete, netipične, urušene, iskrivljene, nejednake sirne oči, napukline, pljesniv s vanjske strane, nejednoliko pljesniv, strana plijesan, puno rupa ispod površine
- Kora/površina – debela, tanka, gruba, bezbojna, popucana, suha, vlažna, masna, naborana, previše pljesniva, premalo pljesniva, pljesniva ispod kore, zamrljana ispod kore, rupičasta, nagrižena

- Boja – bez boje, nejednake boje, prošaran, mramoran, išaran pjegama, šarolika, blijed ispod površine, crven ispod površine
- Konzistencija/tijelo i tekstura – tvrd, čvrst, grub, grudast, zgrušan, mrvičast, zrnast, brašnast, pjeskovit, krhak, jak, ljepiv, dug, elastičan, gladak, mekan s vanjske strane, tanak, moker, spužvast
- Okus – strani okus, nekarakterističan, po trulom, po amonijaku, jednoličan, pljesniv, fermentiran, pjenušav, po maslačnoj kiselini, nečist, pokvaren, izgoren, užežen, mastan, sapunast, hranjiv, sladak, voćni, oštar, sladak, kiseo, gorak, hrapav, slan, metalik, kuhan (Tratnik i Božanić, 2012).

Senzorska analiza polutvrđog sira s pčelinjom peludi provedena je od strane 4 senzorska analitičara i jedne studenice koji su ocjenjivali boju, miris, teksturu i okus pomoću obrasca za ocjenjivanje. Parametri koji su navedeni ocjenjeni su od 1 do 5, a zatim je srednja ocjena pojedinog parametra pomnožena s faktorom značajnosti da bi dobili ponderirane bodove. Faktori značajnosti za pojedino svojstvo prikazani su u tablici 4., a obrazac za senzorsko ocjenjivanje u tablici 5 (Božanić i sur., 2010).

Tablica 4. Obrazac za senzorsku ocjenu sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (Filajdić i sur., 1988.)

Senzorsko svojstvo	F_v	Opisni parametri	Ocjena	Maks. Br. bodova
Okus	2,0	Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma, umjereno slan	4-5	10,0
		Preizražen okus po mlijeku, preslaba aroma, nedovoljno slan, tragovi kiselosti, gorčine i užeglosti, okus po kori sira, tragovi stranih okusa	3	
		Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, preslan, potpuno neslan (bljutav), preintezivna aroma, okus po plijesni	1-2	
Miris	1,5	Ugodan, niti presnažan, niti preslab, karakteristično po mlijeku, diskretni miris, bez ikakvih stranih mirisa	4-5	7,5
		Prenaglašen miris, nedovoljno izražen okus, slabije se osjeti miris mlijeka, tragovi užeglosti	3	
		Potpuno nekarakterističan za proizvod, prejaka aroma koja sakriva miris mlijeka, užegao, miris po plijesni	1-2	
Tekstura i naknadni okus u ustima	0,3	Sir kompaktno, homogeno, tvrdoća karakteristična za proizvod (nije pretvrda ni premekana), presjek gladak i pravilan, bez neravnina, jednolika boja po čitavom presjeku, cijela masa jednolična i bez grudica, ne lijepi se za usta	5	1,5
		Zamjetne male neravnine i udubljenja, malo pretvrdo ili premekano, na presjeku zamjetne male nehomogenosti	3-4	
		Sir pretvrdo ili premekano, presjek nepravilan, nejednolike granulacije i boje, pjeskovit ili gnjecav, osjetno se lijepi za usta	1-2	
	0,2	Homogena, glatka, sjajna, jednolična boja po čitavoj površini	5	1,0

Izgled kore (površine)	Neravna površina, malo hrapava, zamjetna nejednolikost boje na površini kore	3-4	
	Kora ispucala, potpuno neravna, hrapava, zamjetne zone različitih boja kore (površine sira), strana i nekarakteristična boja kore ili površine sira	1-2	
MAKSIMALAN BROJ PONDERIRANIH BODOVA			20

Tablica 5. Obrazac za senzorsko ocjenjivanje polutvrđog sira

DATUM			
OCJENJIVAČ			
OCJENJIVANO SVOJSTVO	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svako svojstvo u kolonu odgovarajućeg uzorka.</i> <i>Svojstva ocjenjivati redosljedom koji je naveden</i>		
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
IZGLED KORE/POVRŠINE			
MIRIS			
OKUS			
TEKSTURA I NAKNADAN OKUS U USTIMA			

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati analiza kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira

Za tri uzorka sira provedeno je mjerenje kiselosti, udio mliječne masti, udio suhe tvari i udio proteina. Rezultati tih mjerenja prikazani su u Tablici 6. u obliku prosječne vrijednosti. Također je mjereno antioksidacijski kapacitet, ukupni fenoli i indeks boje te je analizirana tekstura i mineralni sastav.

Tablica 6. Rezultati mjerenja za polutvrđi sir sa dodatkom pčelinje peludi (n=3)

Određivani parametar	pH	°SH	Udio mliječne masti (%)	Udio proteina (%)	Udio suhe tvari (%)
Prosječna vrijednost	5,39	23,92	29,27	26,09	66,31

Bojanić-Rašović i sur. (2013) određivali su udio masti i udio proteina u crnogorskom prirodno sušenom polutvrdom siru. Vrijednost udjela mliječne masti je bio 29,23% što je približno ista vrijednost kao i kod polutvrđog sira iz ovog rada.

Udio proteina kod Bojanić-Rašović i sur. (2013.) iznosio je 21,85%, dok je prosječan udio proteina u siru s dodatkom cvjetne peludi 26,09%.

Tablica 7. Vrijednost L*a*b* za ispitivane uzorke (n=3)

	L*	a*	b*
Uzorak 1	77,45	-1,94	16,48
Uzorak 2	83,32	-2,35	16,54
Uzorak 3	83,95	-1,73	18,32

L* predstavlja svjetlinu u rasponu 0-100 pri čemu je vrijednost 0 potpuno crna boja, a vrijednost 100 potpuno bijela boja. U diplomskom radu Hrvatinić (2018) određivan je indeks boje

za svježiji sir. Vrijednosti za L^* su se kretale u rasponu 90,75-95,52 što je vrlo blizu potpuno bijeloj boji koja ustvari i karakterizira svježiji sir. U ovom radu prosječna vrijednosti za L^* iznosila je 81,57 što je u skladu s očekivanjima s obzirom na to da su analizirani uzorci sira obogaćeni dodatkom peludi koja obiluje karotenoidnim sastojcima, a i sam sir sadrži veći udio mliječne masti u suhoj tvari u uspoređi sa svježim sirevima.

Parametar a^* ima raspon vrijednosti -100 – 100. Negativne vrijednosti parametra a^* označavaju približavanje zelenoj boji, a pozitivne vrijednosti označavaju približavanje crvenoj boji. Prosječna vrijednost parametra a^* u ovom radu je -2,01 što znači da se uzorci ne približavaju crvenoj boji već zelenoj.

Parametar b^* ima isti raspon kao i parametar a^* samo što -100 označava čisto plavu boju, a +100 čisto žutu boju. Prosječna vrijednost parametra b^* u ispitivanim uzorcima je 17,11 što znači da ih karakterizira žuta boja. U diplomskom radu Hrvatin (2018) vrijednost parametra b^* kretala se 9,06-12,35 ovisno o uzorku. Vidljivo je da svježiji sir karakterizira manje žuta boja u odnosu na polutvrđi sir.

U istraživanju koje su proveli Oliviera i sur. (2012) na brazilskom polutvrdom kozjem siru također je određivan indeks boje. Vrijednost za parametar L^* iznosila je 91,36 što je približno prosječnoj vrijednosti parametra L^* (81,57) za analizirane uzorke sira. Vidljivo je da je polutvrđi kozji sir bliži potpuno bijeloj boji u odnosu na sir sa dodatkom pčelinje peludi.

Kod Oliviera i sur. (2012) vrijednost parametra a^* je -2,88 što označava približavanje zelenoj boji. U ovom radu prosječna vrijednost parametra a^* iznosi -2,01 što također znači da se uzorci ne približavaju crvenoj već zelenoj boji.

Prosječna vrijednost parametra b^* u ovom radu je bila 17,11 dok je u radu Oliviera i sur. (2012) iznosila 11,16. Vrijednosti parametra b^* u oba slučaja označavaju približavanje žutoj boji.

4.2. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja

Analiziranim uzorcima sira određeni su koncentracija fenola kolorimetrijskom reakcijom fenola sa Folin-Ciocalteu reagensom i antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Određivanje ukupnih fenola u uzorcima sireva provedeno je spektrofotometrijskom metodom. Nastali intenzitet obojenja se mjeri pri 765 nm.

Metoda za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. U tablici 8. nalaze se rezultati spektrofotometrijski mjerenja.

Tablica 8. Rezultati spektrofotometrijskih mjerenja (n=3)

	Ukupni fenoli (mgGAE g⁻¹)	Antioksidacijski kapacitet (mmolFe²⁺ g⁻¹)
Uzorak 1	2,914	17,19
Uzorak 2	2,976	15,51
Uzorak 3	2,932	15,39

U istraživanju koje su proveli Josipović i sur. (2016) mjerila se količina ukupnih fenola u sirevima s dodatkom raznih začina, kako sušenih, tako i svježih (ružmarin, češnjak, paprika, kopar, peršin). Najveća koncentracija je izmjerena u siru s dodatkom sušenog kopra (37,8 mg 100 g⁻¹), a najmanja zabilježena koncentracija je bila u siru s dodatkom paprike (20,3 mg 100 g⁻¹). Koncentracija ukupnih fenola u polutvrdom siru sa dodatkom peludi koja je mjerena u ovom radu je skoro sedam puta veća od koncentracije u siru s dodatkom sušenog kopra i iznosi 294,1 mg 100 g⁻¹.

Josipović i sur. (2016) također su određivali i antioksidacijski kapacitet u sirevima sa dodatkom začinskog bilja. Uz mnoge druge određivan je antioksidacijski kapacitet sira sa dodatkom ekstrakta ružmarina. Dobivena vrijednost je iznosila 15,2 mmol 100g⁻¹ sira, dok je u ovom radu za sir sa dodatkom pčelinje peludi dobivena vrijednost oko 16,03 mmol g⁻¹ sira.

U istraživanju koje su proveli Serra i sur. (2020) mjerena je koncentracija polifenola u siru od bivoljeg mlijeka uz dodatak kiwija te je zabilježena koncentracija iznosila 1,49 mgGAE g⁻¹ dok je prosječna koncentracija ukupnih fenola u uzorcima sira iz ovog rada 2,94 mgGAE g⁻¹.

4.3. Mineralni profil polutvrdog sira s pčelinjom peludi

Za tri uzorka sira određivan je mineralni sastav metodom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom. Cvjetna pelud bogata je mineralima (naročito makroelementima) te znatno doprinosi povećanju koncentracije istih u analiziranom polutvrdom siru.

Tablica 9. Udio mineralnih tvari u uzorcima polutvrdog sira sa pčelinjom peludi (n=3)

	Koncentracija mineralnih tvari (mg kg⁻¹)									
	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Al	Ba	Cu
Uzorak 1	11902,51	432,65	1517,12	8478,15	0,51	1,07	28,14	0,62	0,48	0,29
Uzorak 2	11473,17	426,77	1467,27	7629,66	0,48	1,39	26,59	0,57	0,47	0,27
Uzorak 3	10503,98	467,37	1419,31	8949,67	0,57	1,91	33,47	0,73	0,71	0,29

U tablici 9. prikazani su rezultati određivanja mineralnog profila za analizirane uzorke. Šnirc i sur. (2020) određivali su mineralni profil tradicionalnog slovačkog polutvrdog sira Oštiepoka gdje je, što se tiče makroelementa, u najvećoj koncentraciji bio natrij i to 8083 mg kg⁻¹ sira. U ovom radu je za natrij dobivena prosječna vrijednost od 11293,22 mg kg⁻¹.

Kod Šnirc i sur. (2020) drugi najzastupljeniji makroelement je bio kalcij te je prosječna vrijednost koncentracije kalcija bila 6850 mg kg⁻¹. U polutvrdom siru sa dodatkom pčelinje peludi, kalcij je također drugi po zastupljenosti s prosječnom vrijednošću koncentracije od 8352,49 mg kg⁻¹ te je također kao i natrij (11293,22 mg kg⁻¹) u većoj koncentraciji u odnosu na polutvrđi sir Oštiepok gdje je koncentracija natrija iznosila 8083 mg kg⁻¹.

Šnirc i sur. (2020) su za prosječne koncentracije mikroelemenata dobili nešto veće vrijednosti u odnosu na polutvrđi sir iz ovog rada. Koncentracija cinka je 23,2 mg kg⁻¹, željeza 14,1 mg kg⁻¹, a bakra 10,0 mg kg⁻¹. U ovom radu su dobivene prosječne vrijednosti za cink 29,41 mg kg⁻¹ što je vrlo blizu koncentraciji cinka kod polutvrdog sira Oštiepoka. Prosječna vrijednost koncentracije željeza je 1,46 mg kg⁻¹, a bakra 0,29 mg kg⁻¹.

U istraživanju koje su proveli Aday i Karagul Yuceer (2014) uz indeks boje određivan je i mineralni profil polutvrdog ovčjeg sira Mihalic. Od makroelemenata čije su koncentracije izmjerene (kalij, kalcij i magnezij) najzastupljeniji je kalcij i to u prosječnoj vrijednosti koncentracije od 2718 mg kg⁻¹. U ovom radu je za koncentraciju kalcija dobivena vrijednost 8352,49 mg kg⁻¹.

Kod Aday i Karagul Yuceer (2014) drugi najzastupljeniji određivani makroelement je magnezij čija je prosječna koncentracija bila 198 mg kg⁻¹. U polutvrdom siru iz ovog rada prosječna koncentracija magnezija iznosi 442,3 mg kg⁻¹ što je čak dva puta više nego kod sira Mihalica.

Što se tiče mikroelemenata kod Aday i Karagul Yuceer (2014) su kao i kod Šnirc i sur. (2020) prosječne koncentracije mikroelemenata nešto veće nego ko polutvrdog sira sa dodatkom pčelinje peludi. Prosječna vrijednost koncentracije bakra u ovom radu je 0,29 mg kg⁻¹, a željeza 1,46 mg kg⁻¹ dok su vrijednosti koncentracija ova dva mikroelementa kod Aday i Karagul Yuceer (2014) za željezo 1,8 mg 100g⁻¹ sira, a za bakar 2,7 mg 100g⁻¹.

4.4. Senzorska analiza polutvrđog sira

Senzorsku analizu proveli su četiri senzorska analitičara i jedna studentica. Rezultati su dobiveni metodom ponderiranih bodova i prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati senzorske analize (n=3)

Senzorsko svojstvo	F_v	Ocjena	Broj bodova
Izgled kore/površine	0,2	4,87	0,97
Miris	1,5	4,93	7,39
Okus	2,0	4,85	9,70
Tekstura i naknadan okus u ustima	0,3	4,87	1,46
Ukupno			19,52

Iz tablice 10. je vidljivo da je najvećom ocjenom ocijenjen miris, zatim izgled kore/površine i tekstura te nakraju okus. Razlike u ocjenama svojstava su minimalne i razlikuju se u par decimala, ali iz ukupnog broja bodova je vidljivo da je polutvrđi sir iz ovog rada ocijenjen vrlo visokom ocjenom.

4.5. Rezultati mjerenja teksture sira

Tekstura polutvrđog sira određivana je analizom teksturalnog profila (engl. Texture Profile Analysis, TPA) ili metodom dvostrukog zagriža. Iz dobivenih rezultata očitana je tvrdoća, ljepljivost, elastičnost, kohezivnost, gumiranost i žvakljivost te rad potreban za kidanje uzorka. Vrijednosti mjerenja prikazane su u tablici 11.

Tablica 11. Rezultati mjerenja teksture polutvrđog sira (n=3)

	Tvrdoća (N)	Elastičnost (mm)	Kohezivnost	Gumiranost (N)
Uzorak 1	56,97	-1,26	0,25	21,45
Uzorak 2	57,68	-4,64	0,29	17,10
Uzorak 3	58,58	-4,71	0,24	14,25

U istraživanju koje su proveli Schenkel i sur. (2013) određivana je tekstura polutvrđog sira tipa Gauda. Izmjerena vrijednost za tvrdoću nakon četiri tjedna zrenja bila je oko 48 N, a za elastičnost 7,5 mm. Prosječna vrijednost za tvrdoću polutvrđog sira iz ovog rada je bila nešto veća u odnosu na sir tipa Gauda i iznosila je 57,74 N, ali je zato elastičnost bila nešto manja i u prosjeku je iznosila 3,5 mm.

Kod Schenkel i sur. (2013) kohezivnost je iznosila 0,62, a gumiranost oko 30 N dok je u ovom radu prosječna vrijednost kohezivnosti iznosila 0,26, a gumiranosti 17,59 N.

5. Zaključak

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Prosječne vrijednosti udjela proteina ($26,09 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), masti ($29,27 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) i ukupne suhe tvari ($66,31 \%$) u ispitivanom uzorku sira u skladu su s vrijednostima za kategoriju polutvrdih sireva navedenim u znanstvenoj i stručnoj literaturi.
2. Prosječne vrijednosti kiselosti također su se kretale unutar standardnih definiranih raspona za polutvrde sireve te je aktivna kiselost izražena kao pH vrijednost iznosila $5,39$, a titracijska kiselost po Soxhlet Henkelu $23,92 \text{ }^\circ\text{SH}$
3. Određivanjem mineralnog profila metodom induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom utvrđeno je kako su u analiziranim uzorcima najzastupljenije mineralne tvari natrij ($11293,22 \text{ mg kg}^{-1}$), kalcij ($8352,49 \text{ mg kg}^{-1}$) i kalij ($1467,9 \text{ mg kg}^{-1}$).
4. Udio polifenola u uzorcima sira određivan je s reagensom po Folin-Ciocalteu i prosječno je iznosio $2,94 \text{ mgGAE g}^{-1}$, a antioksidacijski kapacitet je određivan FRAP metodom te je u prosjeku bio $16,03 \text{ mmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$
5. Ukupni postignuti bodovi pri senzorskoj analizi ispitivanih uzoraka sira iznosili su $19,52$ od ukupno 20 , pri čemu su najveći broj bodova dobila svojstva mirisa i izgleda površine, a nešto nižim brojem bodova ocijenjena svojstva okusa i teksture
6. Vrijednosti parametara teksture sira u skladu su s vrijednostima za kategoriju polutvrdih sireva navedenim u znanstvenoj i stručnoj literaturi. Vrijednost za tvrdoću u prosjeku je bila $57,74 \text{ N}$, za elastičnost $3,5 \text{ mm}$, za kohezivnost $0,26$, a za gumiranost $17,59 \text{ N}$.
7. Usporedbom svi određivanih parametara s vrijednostima navedenim u dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi razvidno je da dodatak peludnih zrna doprinosi povećanju koncentracije nekih mikro- i makroelemenata (kalcij, natrij i kalij), ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u siru.

6. Literatura

Aday, S., Karagul Yuceer, Y. (2014). Physicochemical and sensory properties of Mihalic cheese. *International Journal of Food Properties*, 17(10), 2207-2227.

Aličić, D., Flanjak, I., Ačkar, Đ., Jašić, M., Babić, J., Šubarić, D.: Physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollen collected in Tuzla Canton (B&H). *Journal of Central European Agriculture*, 2020, 21(1), 42-50

Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Shetty, K. (2007) Inhibitory potential of herb, fruit, and fungalenriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8, 46-54.

Bojanić-Rašović M., N. Nikolić, A. Martinović, V. Katić, R. Rašović, M. Walzer, i K. Domig. (2013). Korelacija između odnosa proteina i masti u mleku i hemijskih parametara i randmana polutvrđog sira. *Biotechnology in Animal Husbandry* 29 (1), 145-159.

Borycka, K., Grabek-Lejko, D., Kasprzyk, I., (2015) Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products, *Journal of Apicultural Research*, 54:5, 491-502

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

Čanak S. (2013): *Zdravlje iz košnice; med i drugi pčelinji proizvodi*, str. 62- 70.

Havraneck, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D.: *Sirarstvo*, 66 – 141., Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 2014.

Hrvatini, L. (2018) Utjecaj dodatka ekstrakta majčine dušice i protektivne kulture na svojstva i trajnost svježeg sira od sirovog mlijeka. *Diplomski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Klarić, I., Domaćinović, M., Samac, D., Steiner, Z., Ronta, M., Đidara, M. (2013) Pčelinja pelud kao mogući dodatak hrani životinja. *Krmiva* 55, 103 – 110.

Levaković, M. (2014) Pelud – ljekovita svojstva i primjena. *Diplomski rad*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek

Lukač-Havraneck, J. (1995.): Autohtoni sirevi Hrvatske. *Mljekarstvo* 45 (1), 19 – 37.

Margetić, J. (2012) Određivanje boje u voćnim vinima. Završni rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb

Martić, I. (2018) Svojstva i trajnost svježeg ovčjeg sira proizvedenog dodatkom protektivne kulture. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Oliveira, M. E. G. D., Garcia, E. F., Queiroga, R. D. C. R. D. E., & Souza, E. L. D. (2012). Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, 69(6), 370-379.

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

Rogelj, I., Božanić, R., Perko, B., Kalit, S., Matijević, B., Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., Magdić, V., Stručić, D.: Sirarstvo u teoriji i praksi, 29 - 45., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2015.

Roldán, A., Muiswinkel, G.C.J., Lasanta, C., Palacios, V., Caro, I. (2011): Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry* 126, 574-582.

Schenkel, P., Samudrala, R., Hinrichs, J. (2013): The effect of adding whey protein particles as inert filler on thermophysical properties of fat-reduced semihard cheesetype Gouda. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 220-230.

Serra, A., Conte, G., Corrales-Retana, L., Casarosa, L., Ciucci, F., & Mele, M. (2020). Nutraceutical and Technological Properties of Buffalo and Sheep Cheese Produced by the Addition of Kiwi Juice as a Coagulant. *Foods*, 9(5), 637.

Šnirc, M., Árvay, J., Král, M., Jančo, I., Zajac, P., Harangozo, L., Benešova, L., Content of Mineral Elements in the Traditional Oštiepok Cheese. *Biol Trace Elem Res* **196**, 639–645 (2020).

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

Yerlikaya, O. (2014) Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Journal for dairy production and processing improvement*. *Mljekarstvo* 64, 268 – 279.

Živko, T. (2012) Određivanje antioksidativnog učinka ukupnih fenola i tanina u plodu rogača. Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb

<https://www.savjetodavna.hr/2020/07/15/koristenje-zacina-u-proizvodnji-domacih-sireva/?print=print> (pristupljeno 19. svibnja 2021.)

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Maja Vukelić

ime i prezime studenta