

# BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA

---

**Rendulić, Ema**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:049077>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**

**STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA  
PRERADA MLIJEKA**

**EMA RENDULIĆ**

**BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 26. rujan 2024.**

**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Prerada mlijeka

Ema Rendulić

**Biokemijski procesi tijekom zrenja sira**

Završni rad

Mentor: dr. sc. Ines Cindrić, prof. struč.stud.

Broj indeksa studenta: 0248079187

Karlovac, 26. rujan 2024.

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Ema Rendulić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom „**Biokemijski procesi tijekom zrenja sira**“ rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 26. rujan 2024.

Ema Rendulić

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA SIRA

*Emma Rendulić*

Rad je izrađen na Veleučilištu u Karlovcu

Mentor: dr.sc. Ines Cindrić, prof. struč.stud.

### Sažetak

Proizvodnja sira jedna je od najstarijih metoda konzerviranja mlijeka, lako pokvarljive sirovine, kojom se omogućava njegova dugotrajnija upotreba. Ključni i završni korak u proizvodnji sira je zrenje ili maturacija, proces tijekom kojeg dolazi do složenih biokemijskih reakcija koje definiraju konačne karakteristike sira. Zrenje uključuje dinamičke interakcije između enzima, mikroorganizama, proteina, masti i drugih sastojaka mlijeka, što rezultira promjenama u izgledu, aromi, okusu i teksturi sira. Zrenje sira podijeljeno je na dvije glavne faze: primarno i sekundarno zrenje. Primarno zrenje obuhvaća razgradnju laktoze, proteina i masti te je odgovorno za formiranje željene teksture sira. Sekundarno zrenje, s druge strane, uključuje složenije procese koji doprinose razvoju specifične arome i okusa, karakterističnih za određenu vrstu sira. Razumijevanje ovih biokemijskih procesa ključno je za kontrolu i optimizaciju kvalitete sira, čime se omogućuje proizvodnja proizvoda visoke senzorske i nutritivne vrijednosti.

Broj stranica: 30

Broj slika: 3

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 30

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: lipoliza, mlijeko, proteoliza, sir, zrenje

Datum obrane: 26.rujan 2024.

### Stručno povjerenstvo za obranu:

- dr. sc. *Marijana Blažić*, prof. struč. stud.
- Elizabeta Zandona*, mag. ing. bioproc., pred
- dr. sc. *Ines Cindrić*, prof. struč. stud.
- dr. sc. *Bojan Matijević*, prof. struč. stud (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J.J., Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional undergraduate study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### **BIOCHEMICAL PROCESSES DURING CHEESE RIPENING**

*Ema Rendulić*

**Final paper performed at** Karlovac University of Applied Sciences  
**Supervisor:** dr.sc. *Ines Cindrić*, college prof.

#### **Abstract**

Cheese production is one of the oldest methods of preserving milk, a highly perishable raw material, allowing for its extended use. The critical and final step in cheese production is ripening or maturation, a process during which complex biochemical reactions occur, defining the final characteristics of the cheese. Ripening involves dynamic interactions between enzymes, microorganisms, proteins, fats, and other milk components, resulting in changes in the appearance, aroma, flavor, and texture of the cheese. Cheese ripening is divided into two main stages: primary and secondary ripening. Primary ripening involves the breakdown of lactose, proteins, and fats and is responsible for developing the desired cheese texture. Secondary ripening, on the other hand, includes more complex processes that contribute to the development of specific aromas and flavors characteristic of a particular cheese type. Understanding these biochemical processes is essential for controlling and optimizing cheese quality, enabling the production of products with high sensory and nutritional value.

**Number of pages: 30**

**Number of figures: 3**

**Number of tables: 4**

**Number of references: 30**

**Original in:** Croatian

**Key words:** lipolysis, milk, proteolysis, cheese, ripening

**Date of the final paper defense: 26. september 2024.**

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Marijana Blažić*, college prof.
2. *Elizabeta Zandona*, lecturer
3. Ph.D. *Ines Cindrić*, college prof.
4. Ph.D. *Bojan Matijević*, college prof. (substitute)

**Final paper deposited in:** Library of Karlovac University of Applied Sciences, Trg J.J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Croatia.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Proizvodnja sira.....	3
2.2. Zrenje sira.....	9
2.2.1. Faktori koji utječu na zrenje sira.....	10
2.2.2. Vrste zrenja.....	12
2.2.2.1. Primarno zrenje sira.....	13
2.2.2.2. Sekundarno zrenje sira.....	14
2.2.3. Ključni biokemijski procesi tijekom zrenja sira.....	16
2.3. Mliječno kiselo vrenje.....	17
2.4. Metabolizam citrata.....	18
2.5. Lipoliza.....	19
2.6. Proteoliza.....	20
2.6.1. Kazein.....	22
2.6.2. Kemijske reakcije tijekom proteolize.....	23
2.7. Dekarboksilacija i transaminacija aminokiselina.....	25
<b>3. ZAKLJUČCI</b> .....	27
<b>4. LITERATURA</b> .....	28

## 1. UVOD

Prehrambena tehnologija, također poznata kao grana znanosti o hrani, bavi se primjenom inženjerskih, kemijskih, matematičkih i drugih znanstvenih principa u proučavanju i unapređivanju procesa prerade sirovina biljnog i/ili životinjskog podrijetla u gotove prehrambene proizvode. Proces prerade uključuje mehaničke operacije, fizikalne procese, kemijske reakcije, enzimske i mikrobiološke procese, konzerviranje te, na kraju pakiranje i transport gotovog proizvoda. Prehrambenom tehnologijom osim što se nastoji proizvesti visokokvalitetni prehrambeni proizvod od iznimne je važnosti usavršiti proizvodni proces kako bi se osigurala ponovljivost i dosljednost gotovog proizvoda, produljila trajnost sirovine, poboljšala njegova hranjiva i zdravstvena vrijednost te unaprijedila senzorska svojstva. Kao primjer primjene prehrambene tehnologije jest prerada mlijeka u gotove proizvode.

Mlijeko je sirovina koja se spontano kiseli i grušava, a kako bi mu se produljio rok trajanja podvrgava se različitim postupcima konzerviranja. Jedna od metoda konzerviranja je fermentacija mlijeka, kojom se proizvode fermentirani mliječni proizvodi poput kiselog mlijeka, kefira, jogurta, voćno-aromatiziranih jogurta te mnogih probiotičkih fermentiranih proizvoda. Međutim, jedna od najstarijih metoda konzerviranja ove lako pokvarljive namirnice je proizvodnja sira. Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon zgrušavanja mlijeka, vrhnja ili kombinacijom navedenih sirovina (NN 20/2009). Osnovni ciljevi tehnologije proizvodnje sira uključuju utvrđivanje parametara koji osiguravaju željena svojstva sira te izradu protokola proizvodnje i zrenja, čime se postiže ujednačena kvaliteta proizvoda. Kako bi se osigurao gotov proizvod ujednačene kvalitete, od iznimne je važnosti imati kvalitetnu sirovinu, ispravan način obrade te učinkovit sustav kontrole gotovog proizvoda. Sir se uglavnom proizvodi od kravljeg mlijeka, ali i mlijeka drugih sisavaca, najčešće ovaca, koza i bivola. Osim prema vrsti mlijeka, sirevi se mogu klasificirati prema vrsti proteina, načinu grušanja, udjelu masti u suhoj tvari, konzistenciji, udjelu vode, stupnju zrelosti, specifičnom postupku proizvodnje te kao autohtoni sirevi. Sir je izvor hranjivih tvari u oblicima koje organizam lako može iskoristiti. Nutritivna vrijednost sira, kao visoko vrijedne prehrambene namirnice, obuhvaća značajne količine esencijalnih hranjivih nutrijenata, poput proteina, bioaktivnih peptida, masti, masnih kiselina, vitamina i minerala. Kemijski sastav sira



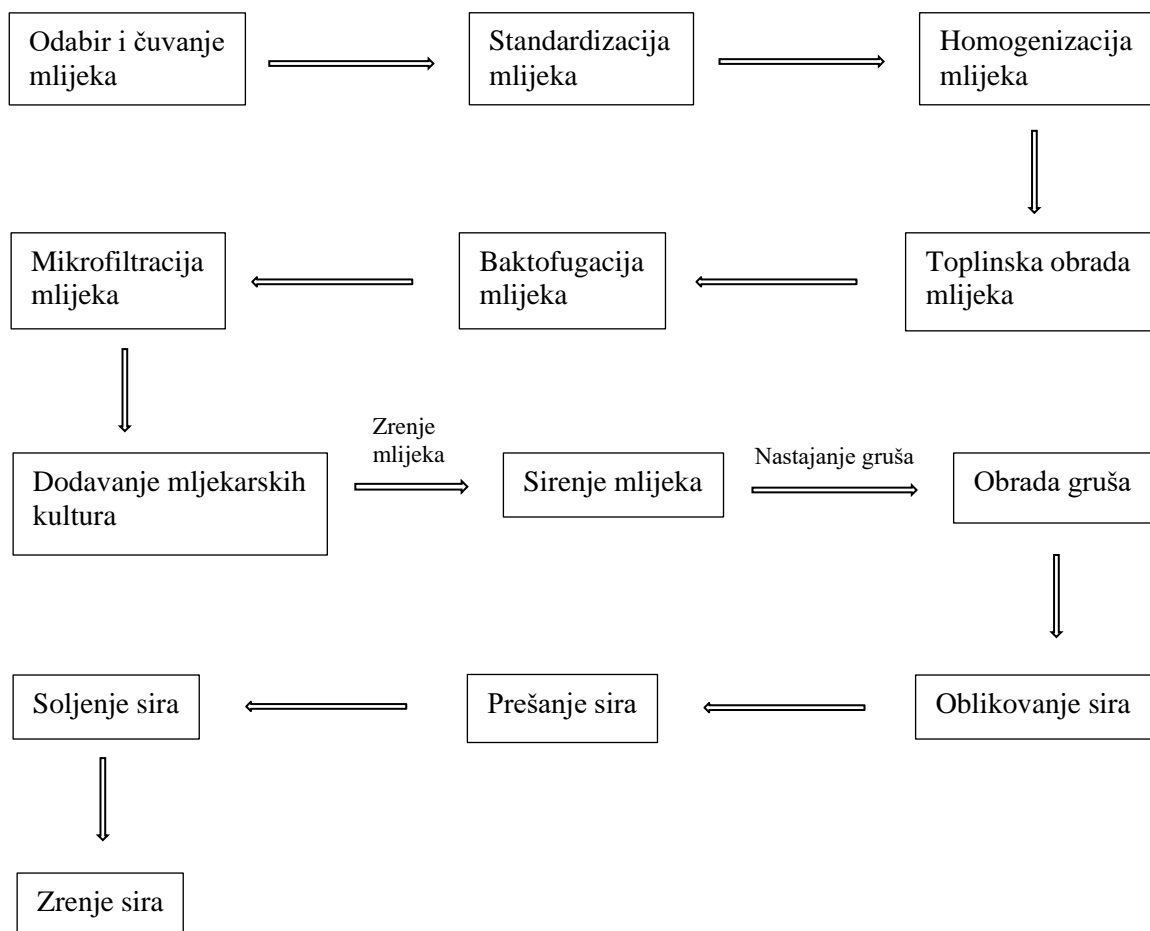
varira ovisno o vrsti sira, odnosno ovisno o vrsti mlijeka od kojeg je sir proizveden te radi li se o svježem, polutvrdom ili tvrdom siru.

Cilj ovog završnog rada je na primjeru sira, istražiti biokemijske reakcije koje se odvijaju tijekom njegovog zrenja, te analizirati kako ti procesi utječu na teksturu, okus, miris i nutritivni sastav gotovog proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA SIRA

Cilj tehnološkog procesa proizvodnje prehrambenih proizvoda je očuvanje izvornih nutritivnih svojstava sirovine te postizanje željenih fizikalnih, kemijskih, bioloških i organoleptičkih karakteristika konačnog proizvoda. Shematski prikaz tehnološkog procesa proizvodnje sira prikazan je na slici br. 1. Važno je istaknuti da se, radi postizanja optimalne kvalitete gotovog proizvoda – sira, svaki korak u procesu proizvodnje mora provesti u odgovarajućim uvjetima, prilagođenim vrsti sira koja se želi proizvesti.



**Slika br.1:** Shematski prikaz tehnološkog procesa proizvodnje sira (Matijević, 2015).

Tehnološki proces proizvodnje sira započinje odabirom i pravilnim načinom čuvanja sirovine. Mlijeko za proizvodnju sira mora biti higijenski i mikrobiološki ispravno, a izrazito je važno da ono ima sposobnost sirenja te da se očuvaju prirodna svojstva proteina zbog bolje kakvoće sira i većeg doprinosa u proizvodnom procesu (Matijević, 2015). Prilikom odabira mlijeka za proizvodnju sira, gledaju se fizikalno-kemijska svojstva mlijeka koja nam daju uvid u njegovu kakvoću, odnosno kvalitetu. Neka od svojstava koja se gledaju prilikom odabira mlijeka su: ocjena senzorskih svojstava, procjena higijenske kakvoće, dodatak vode, prisutnost antibiotika, gustoća, kiselost te udjel masti i ostalih sastojaka suhe tvari (Havranek i sur. 2014). Prije same prerade, mlijeko je potrebno ohladiti na 4°C te ga na toj temperaturi čuvati do 24 sata kako bi završila baktericidna faza i kako bi mlijeko bilo ispravno, odnosno prihvatljivo za početak obrade i njegovo sirenje (Matijević, 2015). Osim što je mlijeko, kao sirovinu, prije njezine prerade potrebno ohladiti u uređaju zvanom laktofriz, izrazito je važno održati hladni lanac koji se odnosi na put od farme do mljekare. Ako se hladni lanac mlijeka ne održava, u tom će slučaju doći do porasta temperature, što će se rezultira razvojem mikroorganizama, povećanjem njihovog ukupnog broja te prisutnošću enzima i metabolita koje mikroorganizmi proizvode. Također, mlijeko je važno skladištiti što kraće zbog mogućeg rasta mikroorganizama koji preživljavaju i rastu na niskim temperaturama. Osim hlađenja, sirovo mlijeko potrebno je izmjeriti i odrediti njegov točan volumen kako bi se osigurala standardizacija i preciznost u svim daljnjim fazama proizvodnje te kako bi se osigurao kvalitetan gotov proizvod. Također, mlijeko treba profiltrirati, podvrgnuti kontroli kakvoće i kvalitete te ukloniti otopljeni i suspendirani zrak koji može uzrokovati netočne volumetrijske rezultate, nastanak zagorina te izdvajanje mliječne masti i sirutke na površini pakovine.

Nakon odabira mlijeka za proizvodnju sira slijedi standardizacija mlijeka. Riječ je o postupku kojim se u mlijeku, namijenjenom za sir, regulira udio masti (Kalit, 2002). Standardizacija mlijeka se provodi kako bi se odnos između kazeina, glavnog proteina mlijeka, i masti u mlijeku za sirenje doveo u optimalan odnos koji je nužan kako bi iskoristivost masti u siru bila što je moguće veća. Standardizacija se postiže na dva načina. Prvi način je miješanje mlijeka sa obranim mlijekom gdje dolazi do smanjenja udjela mliječne masti, a drugi način je miješanjem mlijeka sa vrhnjem što rezultira povećanju udjela mliječne masti (Tratnik i sur. 2012). Uz udio mliječne masti, također se može standardizirati udio kazeina u mlijeku, a postupak standardizacije se provodi u

uređaju zvanom separator.

Kao treći korak u proizvodnji sira slijedi proces homogenizacije mlijeka, odnosno postupak razbijanja kuglica/kapljica mliječne masti na manje veličine podvrgavanjem sirovine vrlo visokim tlakovima (10/25 MPa ili 100/250 bara) i naglim prelaženjem tako tretiranog mlijeka na normalan tlak (Havranek i sur., 2014). Budući da homogenizacijom nastaje fini gruš, sastavljen od mreže proteina koja zadržava više vode, homogenizacija se najviše primjenjuje u proizvodnji sireva sa plavom plijesni, kod mekih sireva te u proizvodnji vrhnje.

Nakon homogenizacije, mlijeko se podvrgava postupku toplinske obrade radi postizanja što bolje mikrobiološke kvalitete. Osim zbog uništenja patogenih mikroorganizama, toplinska obrada mlijeka, odnosno postupak pasterizacije sirovine se provodi zbog redukcije broja ostalih mikroorganizama, redukcije i uništenja enzima u mlijeku zbog produljenja trajnosti gotovog proizvoda, povećanja njegove viskoznosti i teksture te nadasve, kao što je već rečeno, osiguranja njegove mikrobiološke kvalitete. U tablici br.1 dan je pregled temperatura koje se najčešće koriste prilikom toplinske obrade u proizvodnji sira.

**Tablica br.1:** Procesi toplinske obrade koji se u proizvodnji sira najčešće upotrebljavaju (Matijević, 2015).

Proces	Temperatura (°C)	Trajanje (s)
Termalizacija	63 - 65	15
Niska dugotrajna pasterizacija	63 - 65	1800
Srednja kratkotrajna pasterizacija	72 - 75	15 - 20

Kao dodatna metoda za uklanjanje bakterija, posebno onih otpornih na toplinu, poput sporogenih bakterija (npr. iz roda *Clostridium*) upotrebljava se uređaj baktofuga. Riječ je o uređaju koji koristi centrifugalnu silu za mehaničko uklanjanje bakterija iz mlijeka, stoga ne može u potpunosti zamijeniti toplinsku obradu jer ne uništava sve bakterije,

viruse i enzime prisutne u mlijeku. U praksi, baktofuga se često koristi u kombinaciji s toplinskom obradom kako bi se postigao maksimalni učinak uklanjanja bakterija i produžila trajnost mlijeka ili mliječnih proizvoda. Postupak baktofugacije (Slika br.1) se vrši pri temperaturi od 55°C do 60°C te uklanja 80%-90% prisutnih bakterija u mlijeku (Havranek i sur., 2014).

Mikrofiltracija je membranski proces koji se osniva na razdvajanju sastojaka u smjesi na osnovi različite veličine čestica uz primjenu tlaka. Njome se uklanja i do 99,6% bakterija, no sam proces nije selektivan, odnosno nepoznato je da li su zaostale bakterije patogene ili ne. Primjena mikrofiltracije u sirarstvu korisna je jer pomaže u uklanjanju preostalih čestica i mikroorganizama koje toplinska obrada i bakteriofag nisu u potpunosti eliminirali. Time se poboljšavaju organoleptička svojstva mlijeka (okusa, mirisa) i postiže se konzistentnija kvaliteta proizvoda. Osim toga mikrofiltracija također smanjuje trajanje zrenja sira, poboljšava kontrolu zrenja sira, povećava trajnost mlijeka, omogućava kontroliranu fermentaciju te dulju trajnost fermentiranih mliječnih proizvoda (Tratnik i sur., 2012).

Sedmi korak u procesu proizvodnje sira prikazan na slici br.1 naziva se zrenje mlijeka, a započinje dodavanjem mljekarske kulture u preobrađeno mlijeko. Mljekarske kulture, također poznate pod nazivom mikrobne kulture ili inokulumi predstavljaju specijalizirane prirodne bakterije mliječne kiseline koje se izoliraju iz najkvalitetnijih sireva ili drugih mliječnih proizvoda. U proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, ove kulture se obavezno dodaju u koncentriranom obliku, posebno kada je mlijeko prethodno pasterizirano (Havranek i sur., 2014). Pasterizacija, iako ključna za eliminaciju patogenih mikroorganizama, također uništava korisne bakterije mliječne kiseline i neke prirodne enzime, poput lipaza. Mljekarske kulture imaju ključnu ulogu u fermentaciji mlijeka jer razgrađuju mliječni šećer (laktozu) i proizvode mliječnu kiselinu, što doprinosi zakiseljavanju mlijeka i formiranju karakterističnog okusa i arome sireva. Osim što proizvode tvari koje su od esencijalne važnosti za oblikovanje okusa, njihovi enzimi također sudjeluju u razgradnji proteina, masti, laktoze i citrata tijekom zrenja sira. Aktivnost mljekarskih kultura potiče kočenje rasta i aktivnosti nepoželjnih mikroorganizama, čime se osigurava kvaliteta proizvoda. Također, ove kulture igraju ključnu ulogu u poticanju aktivnosti sirila, što omogućava formiranje kvalitetnog gruš (Havranek i sur., 2014). Dodavanjem mljekarske kulture, započinje prvi ključni korak u

kojem se složeni kemijsko-biokemijski procesi usmjeravaju prema željenim karakteristikama proizvoda, poput konzistencije, okusa, mirisa i arome sira. Ovi procesi omogućavaju kontrolu nad kvalitetom proizvoda i minimiziraju utjecaj vanjskih okolišnih čimbenika. Zrenje mlijeka podrazumijeva djelovanje bakterija mliječne kiseline u samom mlijeku koje može trajati od 5 minuta do 2 sata. Trajanje ovog procesa ovisi o vrsti sira koji se proizvodi, kao i o pripremljenom obliku mljekarske kulture. Zrenje mlijeka manifestira se kroz zakiseljavanje i smanjenje pH vrijednosti, što je rezultatni učinak aktivnosti bakterija mliječne kiseline koje konvertiraju mliječni šećer (laktozu) u mliječnu kiselinu. Ovaj proces je od presudne važnosti za razvoj željenih organoleptičkih svojstava sira, uključujući njegov okus, miris i teksturu (Kalit, 2014). Nakon dodatka mljekarskih kultura, odnosno zrenja mlijeka, slijedi njegovo sirenje (korak 8 prikazan na slici br.1). Sirenje mlijeka je proces koagulacije u kojem se mlijeko pretvara u krute tvari (sir) i tekućinu (sirutka). Ovaj proces započinje dodavanjem točno određenog postotka mikrobne kulture (inokuluma) pri optimalnoj temperaturi uz intenzivno miješanje mlijeka (Matijević, 2015). Sirenje se odvija u tradicionalnim otvorenim kadama ili bazenima, najčešće pri temperaturi od 30°C uz dodatak sirila i  $\text{CaCl}_2$ , a odvija se zajedničkim djelovanjem topline, kiseline i raznih enzima. Sirilo je naziv koji podrazumijeva enzimatski preparat koji se koristi u procesu proizvodnje sira za zgrušavanje mlijeka. Njegova glavna funkcija je razbijanje proteina kazeina, što dovodi do koagulacije, odnosno zgrušavanja mlijeka, omogućujući odvajanje čvrste faze (sirnog gruša) od tekuće faze (sirutke). Sirenje mlijeka je ključan postupak u proizvodnji sira budući da omogućava oblikovanje i sazrijevanje sirnog gruša u konačni proizvod. Najčešći tip sirila koji se koristi u proizvodnji sira je sirilo životinjskog podrijetla čiji je glavni enzim kimozin koji se dobiva iz želudaca mladih preživača (poput teladi, janjaca ili kozlića), a zbog svoje vrlo visoke specifičnosti za razgradnju kazeina, predstavlja idealnim za proizvodnju raznih vrsta sira (Selim i sur., 2021). Uz sirilo životinjskog podrijetla, također se upotrebljavaju sirilo biljnog podrijetla, mikrobnog ili genetički modificirano, odnosno rekombinantno sirilo. Tijekom koagulacije proteina dolazi do destabilizacije globula proteina, zbližavanja razdvojenih globula proteina te povezivanje promijenjenih globula proteina. Dakle, nakon sirenja slijedi oblikovanje trodimenzionalne mreže gel proteina koja obuhvaća preostalu tekuću fazu i čini polučvrsti sustav zvan koagulum ili gruš sira (Slika br.1). Nastali sirni gruš može biti kiseo ili sladak, što je ovisno o tome koju vrstu proteina mlijeka se koagulira za određeni tip sira. Ukoliko se provodi koagulacija kazeina, glavnog proteina mlijeka, uz djelovanje

kiseline tada nastaje kiseli gruš koji je prvenstveno namijenjen za proizvodnju svježeg mekog sira. Ukoliko se odvija koagulacija kazeina uz djelovanje proteolitičkih enzima, tada nastaje slatki gruš koji je namijenjen za proizvodnju ostalih vrsta sira (Matijević, 2015). Koagulacijom proteina sirutke koja se odvija uz djelovanje topline, nastaje slatki gruš koji je svoju primjenu našao u proizvodnji sirutkinog sira.

Kao što je već spomenuto, gruš je prilično stabilna polučvrsta faza nastala kemijsko-fizikalnim promjenama iz tekućeg mlijeka koja u sebi zadržava cjelokupnu količinu vodene faze mlijeka prilikom stajanja (Kalit, 2002). Kada se gruš počne rezati, lomiti, miješati ili podvrgavati nekom obliku vanjskog pritiska, tada počinje izlučivati svoju vodenu fazu koja se naziva sirutka. Sinereza je proces, odnosno postupak preslagivanja mreže kazeina u grušu koja za posljedicu ima kontrakciju mreže i izlaženje vodene faze, sirutke, iz sirnog gruša (Matijević, 2015). Djelovanjem sirila, mliječne kiseline i temperature, dolazi do skraćivanja polipeptidnih lanaca te do dehidracije kazeina, pri čemu se kao što je već rečeno, izdvaja sirutka (Havranek i sur., 2014). Odvajanje sirutke od gruša se može vršiti samoprešanjem uz pomoć krpa ili cjedila ili se može vršiti upotrebom centrifugalnog separatora što također ovisi o vrsti sira koja se proizvodi. Dovoljno osušeno zrno odvaja se od ostatka preostale sirutke preko kalupa koji mogu biti različitog oblika, veličine te proizvedeni od različitog materijala. Sirno zrno se smatra dovoljno suhim kada pod pritiskom u šaci oblikuje grudu koja se ne raspada, a koja se može ponovno „rastaviti“ na sastavna zrna (McSweeney, 2017). Prešanje gruša traje nekoliko sati pri temperaturi od 15°C, a okretanjem sira tijekom prešanja omogućava se učinkovito odvajanje sirutke, ravnomjerna raspodjela vode, stapanje sirnih zrna, postiže se odgovarajuća tekstura sira, stvara se konačan oblik sira te se osigurava nastajanje kore sira (Havranek i sur., 2014), a kao najbitniji utjecaj prešanja je omogućena jednostavnija njega sira tijekom glavnog procesa proizvodnje, odnosno tijekom njegovog zrenja. U pravilu što je sir tvrdi, vrijeme prešanja je duže i pritisak na sirni gruš je veći. Sljedeći korak u procesu proizvodnje sira slijedi soljenje (Slika br.1). Soljenje sira je postupak kojim se zaustavlja daljnji tijek fermentacije (Matijević, 2015). Sol djeluje selektivno i na mikroorganizme čime usmjerava zrenje sira. Ujedno daje okus i važan je čimbenik u produljenju trajnosti mnogih sireva. Soljenjem se također gubi mali postotak zaostale sirutke u siru, utječe na oblikovanje kore i kakvoću sira (Tratnik i sur., 2012). Najčešći načini soljenja sira su utrljavanje soli po površini sira, uranjanje sira u salamuru te soljenje sira u kalupu tijekom punjenja sirnim tijestom. Nakon soljenja sira slijedi

postupak zrenja sira. Zrenje sira ili maturacija sira je biokemijski i mikrobiološki proces tijekom kojeg svježi sir prolazi kroz niz promjena koje rezultiraju razvojem specifičnih svojstava, uključujući okus, teksturu, aromu, boju i konzistenciju. Postupak zrenja je ključan za konačnu kvalitetu sira budući da omogućuje razvoj složenih karakteristika koje definiraju različite vrste sira.

## 2.2. ZRENJE SIRA

Zrenje sira uključuje različite mikrobiološke i biokemijske promjene u grušu što rezultira karakterističnim okusom i teksturom svake vrste sira. Ono se smatra najvažnijim, ujedno i zadnjim postupkom u proizvodnji sira (Kalit, 2002). Glavni cilj zrenja je pretvaranje sirne mase, koja se u početku značajno ne razlikuje ovisno o vrsti sira, u sireve karakterističnog okusa, arome, teksture i izgleda (Havranek i sur., 2014). Sam postupak zrenja sira je spor i skup, a povezan je s aktivnostima mnogih mikrobnih proteolitičkih i lipolitičkih enzima koji mijenjaju morfologiju i fizičku teksturu sira te tako razvijaju okus gotovog proizvoda (Selim, 2021). Zrenje se odvija djelovanjem prisutnih enzima u siru gdje nastaju biokemijske, kemijske i fizikalno-kemijske promjene, uglavnom laktoze, proteina i masti (Tunick, 2014). Gotovo svi sastojci sira se mijenjaju u smislu pojednostavljenja njihove složene strukture na jednostavnije spojeve, zbog čega sir postaje zreo sa specifičnim okusom, mirisom, bojom, konzistencijom i strukturom. Također je bitno spomenuti kako zrenjem dolazi do korisnih promjena, odnosno smanjuje se 20-30% laktoze (sir se lakše probavlja), nastaje mliječna kiselina (potiče peristaltiku crijeva te sekreciju korisnih enzima), udvostručuje se resorpcija Ca, P i ostalih nutritivnih tvari, sprječava se rast nepoželjne mikroflore te se produžuje trajnost gotovog proizvoda (Kalit, 2002). Uz biokemijske promjene odvijaju se i mikrobiološke promjene koje uključuju rast ne-starterske mikrobne populacije i lizu (odumiranje) bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, pri čemu se oslobađaju unutarstanični enzimi (Hickey i sur., 2007; Kenny i sur., 2006; Mikulec i sur., 2010; Williams i sur., 2002). Tijekom zrenja sira dolazi do nekoliko ključnih procesa kao što su fermentacija šećera, lipoliza, proteoliza, enzimske i mikrobiološke aktivnosti te promjene u strukturi i teksturi sira. U procesu fermentacije šećera, mikroorganizmi, prvenstveno bakterije mliječne kiseline, fermentiraju laktozu (mliječni šećer) u mliječnu kiselinu koja snižava pH sira i utječe na njegovu teksturu i okus. Sljedeći proces koji se odvija tijekom



zrenja sira je lipoliza. Proces lipolize se može definirati kao razgradnja masti na slobodne masne kiseline, glicerol i druge spojeve (McSweeney i sur., 2004). Ovaj proces doprinosi razvoju okusa, osobito kod sireva s visokim udjelom masti ili onih koji sadrže plijesni. Uz fermentaciju šećera i lipolizu se odvija proces proteolize. Proces proteolize predstavlja razgradnju mliječnih proteina (isključivo kazeina, glavnog proteina mlijeka) u manje peptide i aminokiseline pomoću enzima koji su prisutni u siru ili dodani putem starter kulture (McSweeney i sur., 2004). Starter kultura predstavlja mikrobnii pripravak koji sadrži veliki broj stanica najmanje jednog mikroorganizma koji se dodaje sirovini u cilju proizvodnje fermentirane hrane ubrzanim i kontroliranim fermentacijskim procesom (Williams i sur., 2002). Proces proteolize utječe na teksturu sira (od krutog do kremastog) te doprinosi stvaranju okusa i arome. Upravo ovaj proces diferencira različite vrste sireva i čini ih jedinstvenim. Ona predstavlja složen i višefazan proces razgradnje proteina na jednostavnije molekule. Enzimske i mikrobiološke aktivnosti su još jedan od procesa u nizu koji se odvijaju tijekom zrenja sira (Selim i sur., 2021). One se smatraju dodatnim reakcijama uzrokovanim bakterijama, kvascima ili plijesnima koje se nalaze u siru ili na njegovoj površini. U procesu zrenja sira također se odvijaju promjene u strukturi i teksturi, a kako zrenje napreduje, sir postaje mekši, kremastiji, tvrdi ili mrvičastiji, što ovisi o vrsti sira koja se proizvodi te o uvjetima zrenja.

### 2.2.1. FAKTORI KOJI UTJEČU NA ZRENJE SIRA

Da bi se biokemijske promjene tijekom zrenja sira mogle kretati u željenom pravcu, postoji nekoliko ključnih faktora na koje se može utjecati. Kvaliteta nekog prehrambenog proizvoda proizlazi prvenstveno iz proizvodnog procesa. Sirovina, odnosno mlijeko od kojeg želimo proizvesti sir, može biti kravlje, kozje, ovčje ili bivolje, a ovisno o vrsti mlijeka koja je odabrana, javlja se utjecaj na sastav proteina i masti, što također utječe na okus, teksturu i aromu sira. Uz odabir vrste mlijeka, veliki utjecaj na zrenje sira imaju određene vrste mikroorganizama s kojima se nastoji usmjeriti proces proizvodnje (Kalit, 2002). Različite vrste bakterija, kvasaca i plijesni igraju ključnu ulogu u razvoju određenih karakteristika sira. Starter kulture bakterija poput *Lactococcus lactis* ili *Streptococcus thermophilus* se koriste za kontrolu fermentacije laktoze, dok neki dodatni mikroorganizmi mogu dodati specifične okuse i teksture, kao na primjer *Penicillium roqueforti* za plave sireve. Dakle, u proizvodnom procesu se postiže

odgovarajući sastav sira gdje se kontrolira njegov sadržaj vode, soli te pH vrijednost koji moraju biti unutar određenih granica za pojedinu vrstu sira (Matijević, 2015). Osim sastava sira, na pravilan tijek biokemijskih promjena tijekom zrenja sira utječu i mikroklimatski uvjeti u prostoriji za zrenje sira. Inkubacija ili vrenje ili zrenje sira odvija se u komorama ili spremniku za vrenje koji se naziva zriona. U zrionama, za pravilno zrenje sira, je potrebno osigurati odgovarajuću temperaturu i relativnu vlažnost zraka, a u njima se reguliraju brzina fermentacije i enzimske aktivnosti. Više temperature obično ubrzavaju zrenje, dok niža temperatura usporava proces, a idealan postotak relativne vlažnosti u zrionama iznosi 70%-80% (Kalit, 2002). Tijekom zrenja sira, osim sastava sira i mikroklimatskih uvjeta, također je bitno njegovati sir. Njega sira uključuje njegovo okretanje, brisanje suhom ili vlažnom krpom te četkanje, ribanje i struganje. Njegovom sira se sprječava razvoj plijesni ili prekomjernog maza te se osigurava nastanak željenih karakteristika (McSweeney, 2017). Za zaštitu sira se koristi premaz kojim je potrebno premazati sir što prije nakon postupka soljenja ili prešanja, odnosno sir se premazuje čim mu je kora dovoljno suha. Vrijeme trajanja zrenja sira je također ključan faktor u želji za osiguranjem pravilnog tijeka biokemijskih procesa. Trajanje zrenja ovisi o vrsti sira, njegovom sastavu (količina vode, masti, soli, pH vrijednost, ponajviše vrsta kulture koja se primijenila- mezofilna, termofilna, probiotička) te načinu zrenja (klasično zrenje ili zrenje sira u foliji) (Tunick, 2014). Zrenje može trajati od nekoliko tjedana (za svježije ili mekše sireve) do nekoliko godina (za tvrde, odnosno zrele sireve). Što je proces zrenja dulji, ono obično rezultira nastajanje intenzivnijeg okusa i arome sira.

**Tablica br.2:** Karakteristike najpoznatijih vrsta sira koje zriju (Havranek i sur., 2014).

Vrsta sira		Karakteristike za vrijeme zrenja
O P Ć E N I T O	Mekši sirevi	- Zrenje se odvija pri nižim temperaturama, kraće vrijeme
	Tvrđi sirevi	- Zrenje se odvija pri višim temperaturama, znatno dulje vrijeme
Polutvrđi i tvrđi sirevi		- Primarno zrenje se odvija pri 10°C - Sekundarno zrenje se odvija pri 15°C, a traje najmanje 2-5 tjedana do godinu dana pa čak i dulje
		- Primarno zrenje se odvija pri 8-12°C u trajanju od 3-4 tjedna

Sirevi tipa Ementaler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sekundarno zrenje se odvija pri 22-25°C u trajanju od 6-7 tjedana</li> <li>- Završno zrenje, odnosno čuvanje gotovog proizvoda traje vremenski što duže pri nižim temperaturama (8-12°C)</li> </ul>
Sirevi u salamuri	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zrenje se odvija pri 12-16°C, najmanje 2-3 tjedna uz 10-15% soli</li> <li>- Zrenje zatim pada na niže temperature (oko 5°C)</li> <li>- Završno zrenje, odnosno čuvanje u salamuri se odvija pri 2°C u trajanju do godine dana sa više od 16% soli</li> </ul>
Sirevi sa plemenitom plijesni – zrenje uz rast bijele plijesni na površini sira (Camembert, Brie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zrenje se odvija pri 10-14°C, a trajanje zrenja za Camembert sir traje dulje u odnosu na Brie</li> </ul>
Sirevi sa plemenitom plijesni – zrenje uz rast plave plijesni unutar sira (Gorgonzola, Roquefort, Stilton)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potrebno je osigurati pristup zraka unutar sira (bušenje iglama) ili inokulirati u sir kulturu injekcijom; stvaraju se otvori za izlaz CO<sub>2</sub>, a ulaz O<sub>2</sub></li> <li>- Zrenje se odvija pri 10-13°C u trajanju 2-3 tjedna za Gorgonzolu i Roquefort, a 5-6 tjedana za Stilton</li> </ul>

### 2.2.2. VRSTE ZRENJA

Kao što je već rečeno, biokemijske reakcije tijekom zrenja sira su ključne za razvoj njegovih specifičnih karakteristika, uključujući okus, aromu, teksturu, miris i boju. Budući da su kazein i mliječna mast dvije dominantne komponente suhe tvari sira, biokemijske reakcije se odvijaju upravo na njima (Tudor i sur., 2010). Uz biokemijske promjene, tijekom zrenja se javljaju mikrobiološke i fizikalno-kemijske promjene u sirnoj masi. Proces zrenja sira se može podijeliti u dvije glavne faze, a to su primarno (rano) zrenje i sekundarno (kasno) zrenje (Orlien, 2022). Tijekom zrenja sira odvijaju se složene interakcije između enzima, mikroorganizama, proteina, masti i drugih sastojaka

mlijeka. Odnosno, biokemijski procesi u siru se odvijaju djelovanjem enzima sirila, endogenih enzima mlijeka, enzima bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture te enzima nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Havranek i sur., 2014).

### 2.2.2.1. PRIMARNO ZRENJE SIRA

Primarno zrenje je početna, rana faza u kojoj se odvijaju osnovne fermentacije i enzimske aktivnosti koje formiraju temeljne karakteristike sira. Primarno zrenje je prva faza u procesu zrenja sira koja se događa odmah nakon formiranja sirnog grušča i njegovog oblikovanja u sir. Ova faza je ključna za razvoj osnovnih karakteristika sira, no ponajviše je odgovorna za formiranje željene teksture sira te za proizvodnju okusa (Muartaza, 2022). Primarno zrenje je temelj za daljnje faze zrenja, budući da ono određuje početnu kvalitetu sira te osigurava da su svi uvjeti pravilno postavljeni za razvoj složenijih aroma, tekstura i okusa tijekom sekundarnog zrenja. Bitno je istaknuti kako bez pravilno provedenog primarnog zrenja, sir može imati nepoželjnu teksturu, okus ili se mogu razviti mikrobiološke nesavršenosti. Dakle, primarno zrenje je ključni prvi korak u procesu proizvodnje sira, gdje se uspostavljaju osnovne karakteristike te se osigurava da sir ima dobru osnovu za daljnje zrenje i starenje. Trajanje primarnog zrenja može varirati ovisno o vrsti sira, ali ono obično traje od nekoliko dana do nekoliko tjedana. Ova faza je posebno važna za mekše sireve koji su često spremni za konzumaciju već nakon kratkog perioda primarnog zrenja. Tokom primarnog zrenja odvijaju se različiti biokemijski procesi koji uključuju djelovanje enzima sirila, bakterija mliječne kiseline i drugih mikroorganizama (Williams i sur., 2002).

**Tablica br.3:** Karakteristike biokemijskih procesa tijekom primarnog zrenja (McSweeney, 2004).

<b>Biokemijski procesi tokom primarnog zrenja</b>	<b>Karakteristike procesa</b>
	- Bakterije mliječne kiseline, koje su dodane tijekom proizvodnje sira, razgrađuju preostalu laktozu u siru na mliječnu kiselinu

Razgradnja laktoze	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovaj proces snižava pH vrijednost sira što pomaže u koagulaciji proteina, sprječava rast nepoželjnih mikroorganizama te pridonosi karakterističnom okusu i teksturi sira</li> </ul>
Djelovanje sirila	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzim kimozin (glavni enzim sirila) nastavlja razgrađivati kazein, glavni protein mlijeka, tijekom prvih nekoliko dana ili tjedana zrenja</li> <li>- Ovaj proces je važan za omekšavanje sirnog tijesta i početni razvoj teksture sira</li> </ul>
Gubitak vlage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sirevi gube dio vlage (sirutke) kroz isparavanje ili zrenje u kontroliranim uvjetima (kontrolirana temperatura i relativna vlažnost) što pomaže u stvaranju tvrde kore ili zaštitnog sloja na površini sira što je ključno za daljnje faze zrenja</li> </ul>
Početno stvaranje arome i okusa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bakterije mliječne kiseline proizvode aromatične spojeve kao što su diacetil, acetaldehid i drugi, koji daju sirevima karakteristične blage kisele ili slatke note</li> <li>- Postavljanje temelja za daljnji razvoj složenijih aroma u kasnijim fazama zrenja</li> </ul>
Kontrola mikroflore	<ul style="list-style-type: none"> <li>- U ovoj fazi se kontrolira razvoj mikroflore na površini sira</li> <li>- Različiti sirevi imaju specifične kulture bakterija koje se primjenjuju na njihovoj površini čime se omogućava razvoj karakterističnih okusa, mirisa i teksture (na primjer sir poput Camemberta ili Brie-a razvijaju specifičnu koru od bijele plijesni)</li> </ul>

#### 2.2.2.2. SEKUNDARNO ZRENJE SIRA

Sekundarno zrenje, glavno ili kasno zrenje je druga faza u procesu zrenja koja slijedi odmah nakon primarnog zrenja. Ova kasnija faza je ključna za razvoj složenijih karakteristika poput specifičnog okusa, arome i teksture (McSweeney i sur., 2014). U ovoj fazi mogu sudjelovati specifični mikroorganizmi, kao što su plijesni ili bakterije koje doprinose stvaranju željenih karakteristika (kao na primjer stvaranje rupa kod sira

Ementaler). Dakle, sekundarno zrenje je presudno za konačnu kvalitetu sira, odnosno tokom ove faze sir razvija svoj jedinstveni profil okusa i teksture koji ga razlikuje od ostalih vrsta sira. Bez sekundarnog zrenja sir bi imao vrlo blag okus bez svoje karakteristične arome i konzistencije. Trajanje sekundarnog zrenja dakako značajno varira ovisno o vrsti sira. Tako na primjer mekši sirevi (poput Brie ili Camembert-a) mogu imati sekundarno zrenje koje traje samo nekoliko tjedana, dok tvrđi sirevi (poput Parmezan-a, Cheddar-a ili Ementaler-a) mogu zreti mjesecima pa čak i godinama. Također je važno spomenuti kako sekundarno zrenje uključuje složenije biokemijske procese, kao što su razgradnja proteina (poznata i kao proteoliza), razgradnja masti (poznata i kao lipoliza) i daljnji razvoj mikroflore (McSweeney, 2007).

**Tablica br.4:** Karakteristike biokemijskih procesa tijekom sekundarnog zrenja (McSweeney, 2004).

<b>Biokemijski procesi tokom sekundarnog zrenja</b>	<b>Karakteristike procesa</b>
Proteoliza	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzimi iz mliječne mikroflore, kao i enzimi iz sirila, nastavljaju razgradnju proteina (osobito kazeina) u manje molekule poput peptida i aminokiselina</li> <li>- Ovi spojevi značajno doprinose razvoju okusa i teksture sira, dajući mu bogatiji i složeniji profil okusa (primjerice, enzimi razgrađuju kazein u spojeve koji mogu stvoriti pikantne, orašaste, kremaste ili voćne note)</li> </ul>
Lipoliza	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Razgradnja masti u sirevima oslobađa masne kiseline i druge spojeve koji su ključni za aromu</li> <li>- Ovaj proces ima veliki utjecaj na kremastu teksturu sira</li> <li>- U nekim sirevima, poput onih s plavom plijesni (Roquefort ili Gorgonzola), lipoliza je vrlo intenzivna stvarajući specifičan pikantan okus</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mikroorganizmi prisutni u siru, poput bakterija, kvasaca i plijesni nastavljaju rast i mijenjaju se tokom sekundarnog zrenja</li> <li>- Takvi mikroorganizmi proizvode enzime i</li> </ul>

Razvoj mikroflore	metaboličke produkte koji dodatno doprinose razvoju okusa i arome (primjerice, bakterije iz roda <i>Lactobacillus</i> ili <i>Propionibacterium</i> proizvode specifične spojeve poput ugljičnog dioksida koji stvara rupe u sirevima kao što je Ementaler)
Utjecaj uvjeta skladištenja	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontrola uvjeta zrenja, poput temperature, relativne vlažnosti i ventilacije, je ključna za razvoj željenih karakteristika sira (primjerice, visoka vlažnost može potaknuti razvoj plijesni na kori, dok niža vlažnost može spriječiti prekomjerni rast mikroorganizama)</li> </ul>
Formiranje kore sira	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sekundarno zrenje često uključuje razvoj ili sazrijevanje kore sira koja može biti prekrivena plemenitim plijesnima (kao kod Brie ili Camembert sira), bakterijama (kao kod Munster ili Limburgera) ili se može formirati prirodno</li> <li>- Kora sira također doprinosi okusu i teksturi unutrašnjosti sira, ali također ima zaštitnu ulogu od vanjskih utjecaja</li> </ul>

### 2.2.3. KLJUČNI BIOKEMIJSKI PROCESI TIJEKOM ZRENJA

Kao što je već spomenuto, biokemijske reakcije su ključne za razvoj specifičnih karakteristika u siru tokom njegovog zrenja. Za karakterističan razvoj okusa, arome i teksture, tijekom zrenja sira, zaslužni su procesi mliječno kiselog vrenja, metabolizam citrata, lipoliza, proteoliza, dekarboksilacija i transaminacija aminokiselina, te maturacija strukture i teksture (McSweeney, 2004). Također je važno spomenuti kako razne oksidacijske i redukcijske reakcije, katalizirane mikroorganizmima i enzimima, utječu na aromu i teksturu sira. Tako na primjer oksidacija masnih kiselina može dovesti do stvaranja ketona koji pružaju, odnosno dodaju intenzivnije arome. Ovaj tip reakcija je posebno izražen u sirevima s plavom plijesni, poput Roqueforta. Za vrijeme kasnog zrenja sira, odnosno za vrijeme sekundarnog zrenja, rast i aktivnost dodatnih mikroorganizama doprinose razvoju specifičnih aroma, tekstura i rupa u siru za određenu vrstu sira. Tako na primjer *Propionibacterium* spp. proizvode ugljični dioksid koji stvara rupe u švicarskim sirevima, zajedno s propionskom kiselinom koja daje orašasti okus,

dok *Penicillium roqueforti* i *Penicillium camemberti* doprinose stvaranju karakterističnih plavih i bijelih plijesni koje dodaju specifične pikantne i kremaste arome. Dakle, razni mikroorganizmi tijekom zrenja sira proizvode različite spojeve kao što su alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri i sumporni spojevi (Williams i sur., 2002). Ovi spojevi nastaju metabolizmom aminokiselina, masnih kiselina i drugih prekursora te uvelike doprinose kompleksnosti i specifičnosti okusa sira.

### 2.3. MLIJEČNO KISELO VRENJE

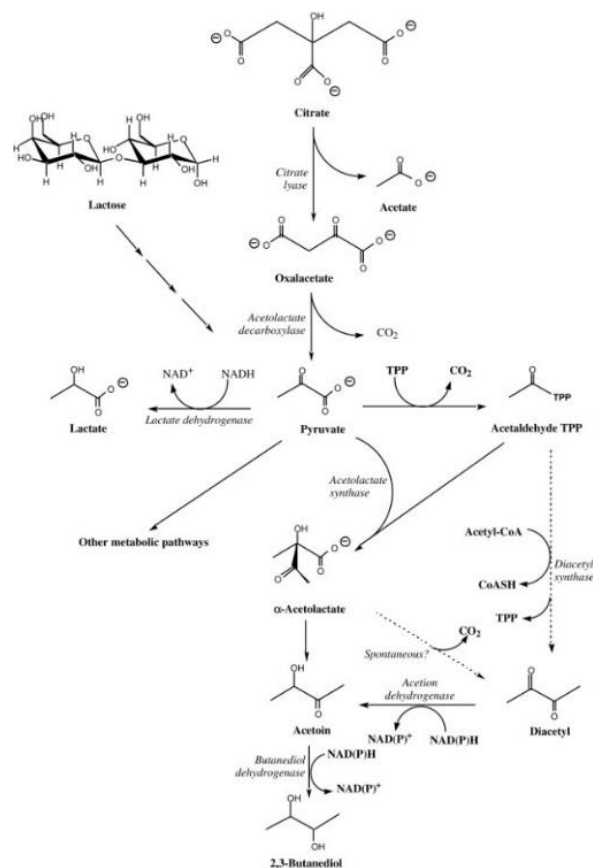
Mliječno kiselo vrenje (glikoliza) je biokemijski proces u proizvodnji sira, pri kojem mliječni šećer (laktoza) fermentira u mliječnu kiselinu. Osim mliječne kiseline, bakterije mogu proizvoditi i druge spojeve poput diacetila, koji doprinosi maslačnoj aromi. Ovaj proces obično završava nekoliko dana nakon početka proizvodnje sira jer laktozu iscrpljuju BMK i drugi mikroorganizmi prisutni u siru. Bakterije mliječne kiseline, uključuju vrste iz roda *Lactobacillus*, djeluju kao agensi fermentaciji hrane te potencijalno imaju zdravstvene koristi (Nuñez, 2011). Proces laktatne fermentacije ključan je za snižavanje pH vrijednosti sira što utječe na teksturu, očuvanje i zaštitu sira od patogenih mikroorganizama. Potpuna fermentacija laktoze u siru je važna kako bi se izbjegao razvoj nepoželjne sekundarne mikroflore. Bakterije mliječne kiseline unose laktozu u stanicu u fosforiliranom obliku pomoću ATP-ovisnog laktoza permeaznog sustava ili fosfoenolpiruvata-ovisnog-fosfotransferaznog sustava. Razgradnja laktoze provodi se glikolitičkim (Embden-Mayerhof-Parnasovim putem) ili fosfoketolaznim putem, ovisno o tome govori li se o homofermentativnim ili heterofermentativnim vrstama bakterija mliječne kiseline (Samaržija, 2015). U stanici se laktoza-6P djelovanjem  $\beta$ -galaktozidaze hidrolizira na glukozu i galaktozu-6P. Glukoza se zatim glikolitičkim putem pretvara u piruvat koji se djelovanjem laktat-dehidrogenaze pretvara u laktat. Galaktoza se razgrađuje Leloirovim ili Tagatoznim putem (Samaržija, 2015). Konverzija laktoze u mliječnu kiselinu se provodi djelovanjem dodanih kultura bakterija mliječne kiseline ili djelovanjem NSBMK-a (Williams i sur., 2002). U proizvodnji sira, sirutka se odvaja od gruša koji sadrži oko 1-2 % laktoze, dok se 98 % laktoze gubi sa sirutkom. Preostala laktoza u grušu konvertira se u L-izomer mliječne kiseline djelovanjem enzima starterskih i ne-starterskih mikrobiota (Fow i McSweeney, 1998; Tudor, 2010). Količina mliječne kiseline i pH vrijednost sira, koja obično varira od 4,6



do 5,2, rezultat su fermentacije laktata, a pH vrijednost se može mijenjati tijekom zrenja (Havranek i sur., 2014).

## 2.4. METABOLIZAM CITRATA

Mlijeko sadrži približno 1750 mg citrata po litri, od čega je većina u topljivoj fazi te se stoga gubi prilikom uklanjanja vodene faze, odnosno sirutke iz sirnog tijesta (Fox, 1989). Citrat je važan prekursor za spojeve okusa u određenim vrstama sira dobiven korištenjem mezofilnih starter kultura (McSweeney, 2004). Neke bakterije mliječne kiseline, poput *Leuconostoc* spp., fermentiraju citrat u mlijeku stvarajući diacetil i druge aromatične spojeve. Diacetil daje karakterističan maslačast okus i važan je u mnogim sirevima (poput Gouda-e ili Cheddar-a).



**Slika br.2:** Metabolizam citrata

## 2.5. LIPOLIZA

Lipoliza je proces hidrolitičkog cijepanja esterskih veza u trigliceridima, što rezultira stvaranjem masnih kiselina i glicerola (Collins i sur., 2003). Lipoliza, uzrokovana djelovanjem lipolitičkih enzima na mliječnu mast, rezultira stvaranjem slobodnih masnih kiselina koje značajno utječu na miris i okus sira. U mlijeku su lipolitički enzimi prisutni u manjim količinama. Kod većine mliječnih proizvoda predstavlja nepoželjan proces, dok u proizvodnji sira, konkretno tijekom zrenja svih vrsta sira predstavlja poželjan proces (Tratnik i sur., 2012). Lipolitički enzimi koji su prisutni u mlijeku, bakterijama starter kultura ili specifičnim plijesnima (*Penicillium roqueforti* ili *Penicillium camemberti*) igraju ključnu ulogu u ovom procesu. Također je važno spomenuti kako slobodne masne kiseline i njihovi produkti razgradnje doprinose aromi sira, osobito u sirevima s visokim udjelom masti ili onima koji sadrže plijesni. Kratkolančane i srednjelančane masne kiseline, poput maslačne, kapronske i kaprilne kiseline, izravno utječu na stvaranje arome sira dok su dugolančane masne kiseline prekursori za biosintezu sekundarnih metabolita poput metil-ketona, sekundarnih alkohola,  $\gamma$ - ili  $\delta$ -laktona te kiselina i alkohola (Tudor i sur., 2010). Tako možemo spomenuti kako kratkolančane masne kiseline (poput buterne kiseline) daju oštar i pikantan okus, dok dugolančane masne kiseline daju blage kremaste note. Lipoliza se odvija brže u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka nego u sirevima od pasteriziranog mlijeka (Nuñez, 2011). U sirevima od sirovog mlijeka, izvorni lipolitički enzimi ostaju aktivni, stoga je proces brži. Dok u sirevima od pasteriziranog mlijeka, lipolitički enzimi u mlijeku više nisu aktivni te je potrebna liza, odumiranje BMK stanica za otpuštanje unutarstaničnih esteraza u medij. Postupkom lipolize nastaju sirevi s raznolikijim i intenzivnijim okusom poput Ementaler-a, Camembert-a, Fontina, Sbrinz-a, Cheddar-a, Ricotte, Brie-a, Fete, itd. (Nuñez, 2022). Mliječna mast je kompleks lipida koji uključuje triacilglicerole, diacilglicerole, monoacilglicerole, fosfolipide, slobodne masne kiseline, kolesterol, cererozide te vitamine A, D, E i K, kao i minerale i druge spojeve (Tratnik i Božanić, 2012). Mliječna mast je podložna lipolitičkim i oksidativnim promjenama. Lipolitičke promjene uključuju cijepanje esterskih veza u triacilglicerol molekule pri čemu nastaju alkohol glicerol i slobodne masne kiseline (Collins i sur., 2003; Tudor, 2010) koje su podložne oksidaciji, odnosno vezanju kisika iz zraka na dvostruke kovalentne veze nezasićenih masnih kiselina (Antunac i sur., 2013). Međutim, zbog niskog oksidacijsko-redukcijskog potencijala u siru, mliječna je mast više sklonija lipolitičkim nego

oksidativnim promjenama (Collins i sur., 2003). U odnosu na kravlje i kozje, u ovčjim se sirevima zbog većeg udjela mliječne masti odvijaju intenzivnije lipolitičke promjene tijekom zrenja (Larreyoz i sur., 2002). Kao što je već spomenuto, lipidi u hrani mogu biti podvrgnuti hidrolitičkoj ili oksidativnoj razgradnji. Oksidativne promjene su vrlo ograničene zbog niskog oksidacijskog potencijala. Međutim, trigliceridi u svim vrstama sira podliježu hidrolizi djelovanjem autohtonih endogenih i/ili egzogenih lipolitičkih enzima što dovodi do oslobađanja masnih kiselina u sir tijekom zrenja (McSweeney, 2004). Niske razine lipolize doprinose sazrijevanju sira, dok pretjerane razine lipolize su nepoželjne i rezultiraju užeglošću.

## 2.6. PROTEOLIZA

Proteoliza je ključan proces tijekom zrenja sira koji se odnosi na razgradnju proteina (kazeina) i peptida u manje molekule peptida i slobodnih aminokiselina, a događa se hidrolizom peptidne veze pomoću enzima koji se nazivaju proteolitički enzimi, proteaze ili peptidaze (McSweeney, 2017). Te manje molekule igraju ključnu ulogu u razvoju karakterističnih okusa i tekstura sireva. Proteoliza dodatno doprinosi omekšavanju teksture sira tijekom zrenja, što je rezultat hidrolize kazeina. Proteolitički enzimi potječu iz mlijeka, sirila, mljekarske kulture (*Bakterije mliječne kiseline*- BMK), naknadnog ili sekundarnog stratera te ne-starterske mikrobne populacije (*Ne-starter bakterije mliječne kiseline* - NSBMK) (Fox, McSweeney, 1998). Reakcija proteolize obuhvaća tri faze: proteoliza u mlijeku, proteoliza za vrijeme enzimske koagulacije mlijeka i proteoliza za vrijeme zrenja sireva (Fox, 1989). Proteoliza se javlja u svim vrstama sireva te je preduvjet za razvoj karakterističnog okusa koji se može regulirati pravilnom upotrebom enzima (Roohi, 2019). Ona je ujedno najvažniji i najsloženiji biokemijski proces koji se odvija u siru tijekom zrenja (Havranek i sur., 2014). Optimalna proteoliza je značajna za formiranje teksture sirnog tijesta i okusa sira. Veliki udio vode, viša temperatura i određena pH vrijednost su parametri koji olakšavaju proces proteolize. Proteolitički enzimi razgrađuju kazein i polipeptide do peptida, koji se djelovanjem istih enzima razgrađuju na aminokiseline, iz kojih enzimima dekarboksilazama nastaju amini i ugljikov dioksid, a deaminazama nastaju ketonske kiseline i amonijak (Havranek i sur., 2014). Proteoliza se može podijeliti na primarnu, koja se odvija djelovanjem kimozina i plazmina, te sekundarnu koja uključuje djelovanje endogenih i egzogenih enzima iz ne-

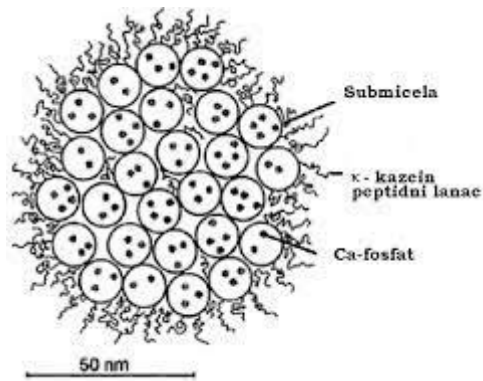
starterske populacije i bakterija mliječne kiseline dodanih kao starter kulture. Primarna proteoliza podrazumijeva hidrolizu kazeina do određenih razgradnih produkata (Benfeldt i sur., 1997) i najviše ovisi o količini i aktivnosti rezidualnog sirila, a u manjoj mjeri o aktivnosti plazmina (Rako, 2016). Započinje već tijekom proizvodnje sira u trenutku dodatka koagulanta (kimozin) za zgrušavanje mlijeka. Sekundarna proteoliza uključuje razgradnju proteina i velikih peptida u aminokiseline i manje peptidne fragmente (Gagnaire i sur., 2001). Produkti sekundarne proteolize su niskomolekularni peptidi koji se konvertiraju do aminokiselina, a iz kojih biokemijskim procesima dekarboksilacije, deaminacije, transaminacije i desumporizacije nastaju aromatske komponente. Ovaj proces generira širok spektar peptida i slobodnih aminokiselina koji doprinose složenom profilu okusa i teksture sira. Konačna aroma sira oblikovana je brojnim čimbenicima, uključujući udio vode, zrelost sirnog tijesta, udio soli i metodologiju soljenja, pH-vrijednost gruš, temperaturu zrenja te aktivnost primarne i sekundarne mikroflore. Proteoliza ima široku ulogu u zrenju sira. Ona omogućuje razvoj okusa i arome, za promjenu teksture i stvaranje specifičnih karakteristika. Za razvoj okusa i arome zadužene su slobodne aminokiseline i peptidi, kao i njihovi metabolički produkti, koji imaju različite organoleptičke karakteristike koje se percipiraju kao različiti okusi (slatko, gorko, umami, pikantno) i mirisi (voćni, orašasti, cvjetni) (Fox, 1989). Na promjenu teksture sira ima utjecaj proteolitička razgradnja proteina. Dakle, kako se proteini razgrađuju u manje fragmente, sir postaje mekši, kremastiji te se lakše topi. Tako na primjer, u mekim sirevima kao što je Camembert, proteoliza uzrokuje stvaranje tekuće unutrašnjosti ispod kore. Proteoliza je također ključna za razvoj specifičnih karakteristika sira, kao što su plijesni u sirevima poput Roquefort-a, gdje se razgradnja proteina odvija pod utjecajem enzima koje proizvode plijesni *Penicillium roqueforti*. Proces proteolize varira o vrsti sira, o načinu proizvodnje te o načinu zrenja gotovog proizvoda.

Viša temperatura zrenja, duži vremenski period zrenja, više rezidualnog sirila, veći aktivitet vode te manji udio soli uzorci su intenzivnije proteolize u siru (Tudor i sur., 2010). Ubrzanje proteolize predstavlja ključni faktor u procesu sazrijevanja sira budući da utječe ne samo na stvaranje mnoštva spojeva okusa i njihovih prekursora, već i na reologiju i vanjski izgled sira omekšavanjem njegove teksture (Nuñez, 2011). Brzina proteolize je varijabilna, ovisno o toplinskoj obradi mlijeka, proteolitičkoj aktivnosti mliječnog koagulansa, proteolitičkoj aktivnosti početnih kultura BMK-a i proteolitičkoj

aktivnosti pomoćnih gljivičnih ili bakterijskih kultura. Ubrzanje proteolize tijekom zrenja sira može se postići povećanjem aktivnosti proteolitičkih enzima u grušu i siru bilo kojom od sljedećih metoda: inokulacija mlijeka atenuiranim stanicama BMK starter kultura (za povećanje biomase bez povećanja aktivnosti stvaranja kiselina); inokulacija mlijeka s odabranim bakterijskim pomoćnim kulturama visoke proteolitičke/peptidolitičke aktivnosti (za povećanje enzimске aktivnosti); pojačana liza BMK stanica i otpuštanje proteolitičkih enzima pomoću bakteriocina ili visokotlačne obrade sira; dodatak bestaničnih proteolitičkih enzima životinjskog, biljnog ili mikrobnog podrijetla u mlijeko ili skutu; dodavanje inkapsuliranih proteolitičkih enzima životinjskog, biljnog ili mikrobnog podrijetla u mlijeko. Ove se metode mogu kombinirati kako bi se dobili proizvodi posebnih senzorskih svojstava, odnosno karakteristika te kako bi se spriječili nedostaci povezani s jakom neuravnoteženom proteolizom kao što je gorčina (Nuñez, 2022).

#### 2.6.1. KAZEIN

Kazein je glavna bjelančevina u mlijeku i čini oko 80% proteina u kravljem mlijeku. Riječ je o složenom proteinu koji se na molekularnoj razini sastoji od nekoliko podjedinica koje tvore micelarnu strukturu (Havranek i sur., 2014; Tratnik i sur., 2012). Kazeinske micidele su sferne čestice promjera od oko 100-200 nanometara. Mikroskopski, kazein se pojavljuje kao male, amorfne čestice koje su dispergirane u mliječnoj vodi. Kazein se sastoji od frakcija, uključujući  $\alpha$ 1-kazein,  $\alpha$ 2-kazein,  $\beta$ -kazein i  $\kappa$ -kazein. Zbog različitog aminokiselinskog sastava, ove frakcije su sklone interakcijama koje uključuju hidrofobne, elektrostatske, vodikove i disulfidne veze (Tratnik i sur., 2012). Prema radu Tratnika i Božanića (2012), kazeinska micela, zahvaljujući većem udjelu prolina (neesencijalna aminokiselina) i svojoj otvorenoj strukturi, sklona je proteolitičkim promjenama.



**Slika br.3:** Strukturni prikaz molekule kazeina

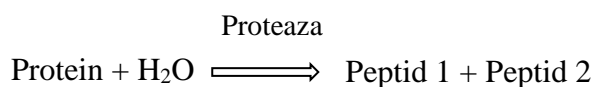
### 2.6.2. KEMIJSKE REAKCIJE TIJEKOM PROTEOLIZE

Hidroliza peptidne veze i transformacija slobodnih aminokiselina spadaju u glavne reakcije proteolize. Peptidne veze između aminokiselina u proteinskom lancu se cijepaju. Enzim katalizira dodavanje molekule vode što rezultira razdvajanjem peptidnih veza. Nakon hidrolize, oslobođene aminokiseline mogu biti podvrgnute različitim kemijskim reakcijama (kao na primjer dekarboksilacija i deaminacija) koje doprinose stvaranju okusa i arome sira (Fox, 1989).

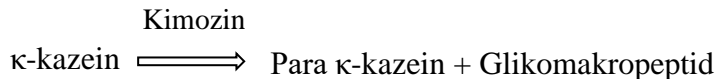
#### 1. Hidroliza peptidne veze

Ova početna hidrolitička reakcija uzrokuje zgrušavanje mlijeka i formiranje sirnog gruš. Veza između dvije aminokiseline (na primjer alanina i valina) se cijepa, oslobađajući kraće peptide.

Opća reakcija hidrolize peptidne veze pomoću proteaza:

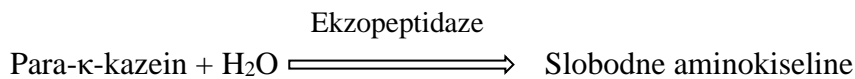


Primjer kemijske reakcije razgradnje  $\kappa$ -kazeina (glavnog proteina u mlijeku) djelovanjem enzima kimozina:



## 2. Daljnja razgradnja peptida (proteoliza)

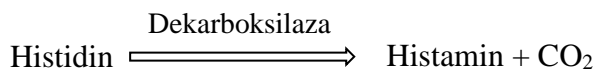
Nakon inicijalne razgradnje kazeina, nastali manji peptidi se podvrgavaju daljnjoj hidrolizi uz pomoć enzima iz bakterija mliječne kiseline. U ovoj reakciji razni enzimi razgrađuju para- $\kappa$ -kazein na manje peptide i slobodne aminokiseline kao što su glutaminska kiselina, lizin, fenilalanin i drugi.



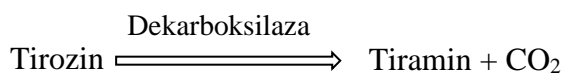
## 3. Transformacija slobodnih aminokiselina

Slobodne aminokiseline mogu se pretvoriti u druge spojeve koji doprinose specifičnom okusu i aromi sira. Na primjer, dekarboksilacija aminokiseline može rezultirati stvaranjem biogenih amina. Biogeni amini (poput histamina i tiramina) doprinose specifičnim aromama sira (Havranek i sur., 2014).

Dekarboksilacija histidina:

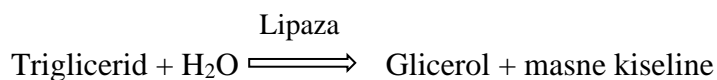


Dekarboksilacija tirozina:



#### 4. Hidroliza esterskih veza (lipoliza)

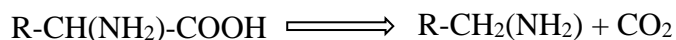
Tijekom proteolize često se odvijaju i druge reakcije poput lipolize, gdje se masti u siru hidroliziraju na masne kiseline i glicerol. Ovaj proces hidrolize, odnosno proces lipolize također doprinosi karakterističnoj aromi sira (Tratnik i sur., 2012).



#### 2.7. DEKARBOKSILACIJA I TRANSAMINACIJA AMINOKISELINA

Aminokiseline oslobođene tijekom proteolize mogu se podvrgnuti dekarboksilaciji i transaminaciji (Mikulec, 2010). Dekarboksilacija je biokemijski proces u kojem se iz aminokiselina uklanja karboksilna skupina, rezultirajući stvaranjem biogenih amina kao što su tiramin i histamin. Ovi biogeni amini mogu značajno utjecati na okus sira, ali njihova prekomjerna akumulacija može biti nepoželjna zbog potencijalnih zdravstvenih rizika. Transaminacija je proces u kojem se aminokiseline prenose na alfa-keto kiseline, što rezultira stvaranjem novih alfa-keto kiselina. Ove alfa-keto kiseline mogu se dalje pretvarati u aldehide, alkohole i kiseline, doprinoseći specifičnim okusima i aromama sira (Muartaza, 2022).

Opća reakcija dekarboksilacije:



Gdje:

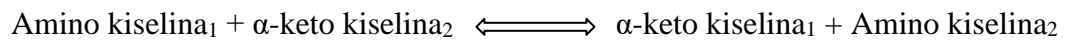
R-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH predstavlja aminokiselinu.

R-CH<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>) predstavlja biogeni amin, poput tiramina (iz tirozina) ili histamina (iz histidina).

CO<sub>2</sub> je karboksilna kiselina koja se oslobađa



Opća reakcija transaminacije:



U ovoj reakciji:

Amino kiselina je molekula koja daje svoju amino skupinu.

$\alpha$ -keto kiselina je molekula koja prihvata amino skupinu.

Rezultat reakcije su nova  $\alpha$ -keto kiselina i nova amino kiselina.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju izrade Završnog rada, mogu donijeti sljedeće zaključke:

1. Odabir kvalitetnog sirovog mlijeka u velikoj mjeri utječe ne samo na kvalitetu gotovog proizvoda, već i na stvaranje arome sira, a odabirom vrste sira i procesa proizvodnje započinje stvaranje arome.
2. Zrenje sira je ključan proces s vrlo složenim nizom međusobno povezanih događaja koji rezultiraju razvoju konačne karakteristike sira, uključujući njegov okus, aromu, teksturu i izgled.
3. Kombinacija fermentacije, lipolize, proteolize i drugih metaboličkih aktivnosti mikroorganizama definira konačan profil svake vrste sira. Stoga različite vrste sireva prolaze kroz različite puteve zrenja kako bi postigli svoje specifične i nadasve željene karakteristike.
4. Kontroliranjem uvjeta zrenja, vrste mikroorganizama i drugih faktora moguće je stvoriti raznolike sireve s jedinstvenim svojstvima.

#### 4. LITERATURA

1. Antunac, N., Havranek J. (2013): Mlijeko-kemija, fizika i mikrobiologija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
2. Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K.H., & Petersen, T.E. (1997): Heat treatment of cheese milk- effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 7, 723-731.
2. Collins, Y.F., McSweeney, Paul LH, Wilkinson, M.G. (2003): Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese; a review of current knowledge, *International Dairy Journal* 13, 841-866.
3. Fox, P.F. (1989): Proteolysis during cheese manufacture and ripening, *Journal Dairy Science* 72, 1379-1400.
4. Fox, P.F, McSweeney, Paul LH (1998): *Dairy chemistry and biochemistry*, Thomson Science, London, Velika Britanija.
5. Gagnaire, V., Thierry, A., & Leonil, J. (2001): Propionibacteria and facultatively heterofermentative Lactobacilli weakly contribute to secondary proteolysis of Emmental cheese. *Lait*, 81, 339-353.
6. Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014): *Sirarstvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
7. Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Sheehan, E.M. (2007): Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 74, 9-17.
8. Kalit, S. (2002): *Zrenje sireva, Četvrto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj, Varaždinske toplice.*

9. Kalit, S. (2013): Kazein i njegova uloga u nastajanju gruša i izdvajanju sirutke, *Petnaesto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj*, Šibenik.
10. Kalit, S. (2014): Mljekarske kulture i dodaci u proizvodnji sira, *Šesnaesto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj*, Poreč, 23. i 24. listopad 2014.
11. Kenny, O., FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K. (2006): Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening, *International Dairy Journal*, 16, 794-804.
12. Larreyoz, P., Mendia, C., Torre, P., Barcina, Y., Ordonez, I. (2002): Sensory profile of flavor and other characteristics in Roncal cheese made from raw ewes milk, *J. Sensory Stud.* 17, 415-427.
13. Matijević, B. (2015): *Sirarstvo u teoriji i praksi*.
14. McSweeney, Paul LH (2004): *Biochemistry of cheese ripening*, Department of Food and Nutritional Sciences, University College, Cork, Ireland.
15. McSweeney, Paul LH (2007): *Improving the taste of cheese*.
16. McSweeney Paul LH (2017): *Cheese, fourth edition*.
17. Mikulec, N., Habuš, I., Antunac, N., Vitale, Lj., Havranek, J. (2010): Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira, *Mljekarstvo* 60, 219-227.
18. Muartaza, M.A. (2022); *Encyclopedia of Dairy sciences, third edition*.
19. Narodne novine (20/2009): *Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva*, Zagreb; Narodne novine d.d. 46/07, 155/08.
20. Nuñez, M. (2011): *Encyclopedia of Dairy sciences, second edition*.

21. Nuñez, M. (2022): Encyclopedia of Dairy sciences, *third edition*.
22. Orlien V. (2022): Encyclopedia of Dairy sciences, *third edition*.
23. Rako, A. (2016): Utjecaj sastava ovčjeg mlijeka na proteolitičke i teksturne promjene bračkog sira tijekom zrenja, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
24. Roohi, Gupta, A. (2019): Enzymes in food biotechnology.
25. Samaržija, D. (2015): Fermentirana mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
26. Selim Kermasha, Michael N.A. Eskin (2021): Enzymes.
27. Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
28. Tudor Kalit, M., Kalit, S., Havranek, J. (2010): An overview of researches on cheeses ripening in animal skin, *Mljekarstvo* 60 (3), 149-155.
29. Tunick, M.H. (2014): *The Science of Cheese*, Oxford University Press.
30. Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Bamks, J.M. (2002): Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 12, 841-852.