

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET



mr Spasenija D. Milanović

DOKTORSKA DISERTACIJA

PRIMENA ULTRAFILTRACIJE,  
GENETSKI MODIFIKOVANOG HIMOZINA I PROTEOLITIČKIH ENZIMA  
U TEHNOLOŠKOM PROCESU PROIZVODNJE KAČKAVALJA

Novi Sad, 1993.

*Posvećeno mojim roditeljima*

## ZAHVALNICA

Mentoru Prof. dr Marijani Carić na nesebičnoj pomoći, podršci i korisnim savetima u svim fazama izrade disertacije.

Prof. dr Miodragu Tekiću i Prof. dr Dragojlu Obradoviću na sugestijama tokom pisanja rada.

Kolektivu mlekare „Mlekoprodukt“, Zrenjanin koji mi je pružio neophodnu pomoć i obezbedio potrebne uslove za izvođenje industrijskih eksperimenata, a posebno mr Iliji Kureljušiću na predusretljivosti i pomoći.

Kolektivu mlekare „Somboled“, Sombor koji mi je omogućio izvođenje eksperimentalnih oglada.

Donatorima komecijalnih preparata enzima korišćenih tokom rada: Gist Brocades, Delft, Holland; Novo Industry A/S, Copenhagen, Denmark; Chr. Hansen's Laboratorium A/S Copenhagen, Denmark i Imperial Biotechnology Ltd., Great Britain.

Saradnicima na predmetu Tehnologija mleka: Doc. dr Dragoljubu Gavariću na sugestijama i pomoći, mr Ljiljani Kulić na savetima a Zorki Kosovac, hem. tehn. na pomoći u eksperimentalnom radu.

Dr Miloslavu Kalabu, Food Research Centre, Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa, Canada na uloženom trudu u izučavanju mikrostrukture.

Mr Božani Đulinac i mr Veri Lazić na pruženoj pomoći u delu eksperimentalnog rada.

Mr Goranu Šnajderovu, dipl. ing. Vjeri Vukša i Bošku Velimiroviću, hem. tehn. na tehničkoj obradi disertacije.

Suprugu i ćerkama na neograničenoj podršci, razumevanju i rečima ohrabrenja tokom izrade i pisanja ovog rada.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUCNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

**RBR**

Identifikacioni broj:

**IBR**

Tip dokumentacije:

**TD** Monografska publikacija

Tip zapisa:

**TZ** Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

**VR** Doktorska disertacija

Autor:

**AU** Mr Spasenija D. Milanović

Mentor/ko-mentor:

**MN** Dr Marijana Carić, red. prof.,  
Tehnološki fakultet, Novi Sad

Naslov rada:

**NR** PRIMENA ULTRAFILTRACIJE, GENETSKI MODIFIKOVANOG  
HIMOZINA I PROTEOLITIČKIH ENZIMA U TEHNOLOŠKOM  
PROCESU PROIZVODNJE KAČKAVALJA

Jezik publikacije:

**JP** srpski (latinica)

Jezik izvoda:

**JI** s/en

Zemlja publikovanja:

**ZP** Jugoslavija

Uže geografsko područje:

**UGP** Vojvodina

Godina:

**GO** 1993.

Izdavač:

**IZ**            autorski reprint

Mesto i adresa:

**MA**            21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1

Fizički opis rada:

(Broj poglavlja/strana/lit. citata/tabela/slika/grafikona/priloga)

**FO**     6     177     222     17     101

Naučna oblast:

**OB**            Prehrambena tehnologija

Naučna disciplina:

**DI**            Tehnologija mleka

Predmetna odrednica/Ključne reči:

**PO/KR**       Kačkavalj, ultrafiltracija, genetski modifikovani himozin, M. miehei proteaza, ubrzanje zrenja

**UDK**

631.354.84:542.18.045:612.321

Čuva se:

**CU**            U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu  
21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1

Važna napomena:

**VN**            Nema

Izvod:

**IZ**            Imajući u vidu naučni i praktičan značaj i nedostatak podataka o aplikaciji ultrafiltracije (UF), alternativnih koagulišućih enzima, posebno genetskog himozina, kao i enzima za akceleraciju zrenja u tehnologiji tvrdih sireva, za predmetna istraživanja je odabran Kačkavalj, popularni sir mediteranskog porekla.

U okviru istraživanja je u industrijskim uslovima izvršena proizvodnja Kačkavalja iz retentata dobijenog nakon ultrafiltracije mleka po LCR (Low Concentrated Retentate) postupku (UF Kačkavalj). Ispitan je uticaj koagulanasa mikrobiološkog porekla (M. miehei proteaza, Rennilase) i genetski modifikovanog himozina (Maxiren) na kvalitet finalnog sira i upoređen sa klasičnim analogima (kontrolni Kačkavalj). Istražena je mogućnost skraćenja perioda zrenja obe varijante Kačkavalja (klasični i UF) dodatkom „koktela“ enzima za ubrzanje zrenja proteolitičkog (Accelase) i lipolitičkog (Paletase) dejstva.

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem fizičko-hemijskog sastava, mikrostrukture i senzornog kvaliteta varijanti konvencionalnog Kačkavalja i UF analoga tokom jednogodišnjeg zrenja, utvrđeno je da se dejstvo rekombinovanog himozina (Maxiren-a) i standardnog himozina signifikantno ne razlikuje, potvrđujući dosadašnja saznanja da je genetski modifikovani himozin potpuno kompetentan proteolitički agens za koagulaciju mleka u procesu proizvodnje sira. Kod konvencionalnog i UF Kačkavalja proizvedenog primenom mikrobiološke M. miehei proteaze (Rennilase) ustanovljena je najniža koncentracija mlečne masti u suvoj materiji tokom celokupnog ispitivanog perioda, što se sa ekonomskog aspekta negativno odražava na kvalitet sira. Sve varijante UF Kačkavalja se tokom zrenja razlikuju od klasičnih analoga po hemijskom sastavu (sadržaj mlečne masti, ukupnog N, NPN, RN itd.), profilu proteolitičke degradacije  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -kazeina, modelu distribucije identifikovanih isparljivih komponenata arome, reološkim i senzornim karakteristikama i mikrostrukтури usled

usporenog intenziteta promena proteinske i lipidne faze UF sireva tokom zrenja. Efekat ubrzanja zrenja Kačkavalja tretiranog „koktelom“ enzima lipolitičkog i proteolitičkog dejstva je izraženiji kod konvencionalnog nego UF uzorka.

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća:

**DP**

Datum odbrane: *12. 11. 1993.*

**DO**

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

**KO**

Predsednik: *dr Marijana Larić*

Član: *dr Miodrag Tekić*

Član: *dr Dragoljub Obradović*

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:

**ANO**

Identification number:

**INO**

Document type:

**DT** Monographic publication

Type of record:

**TR** Textual material, printed

Contents code:

**CC** Ph.D. thesis

Author:

**AU** Mr Spasenija D. Milanović

Menthor/co-menthor:

**MN** Dr Marijana Carić, prof.  
Faculty of Technology, Novi Sad

Title:

**TI** APPLICATION OF ULTRAFILTRATION, GENETICALLY  
MODIFIED CHYMOSIN AND PROTEOLYTIC ENZYMES IN  
KASHKAVAL CHEESE MANUFACTURE

Language of text:

**LT** serbian (Roman)

Language of abstract::

**LA** serbian (Roman)/English

Country of publication:

**CP** Yugoslavia

Locality of publication:

**LP** Voivodina

Publication year:

**PY** 1993.

Publisher:

**PU** author reprint

Publ. place:

**PP** 21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1

Physical description:

**PD** 6 vol, 177 p, 222 ref, 17 tabl, 101 fig,

Scientific field:

**SF** Food technology

Scientific discipline:

**SD** Dairy technology

Subject/Key words:

**S/KW** Kashkaval cheese, ultrafiltration, genetically modified chymosin, M. miehei protease, accelerated cheese ripening

**UC** 631.354.84:542.18.045:612.321

Holding data:

**HD** Library of Faculty of Technology, Novi Sad  
21000 Novi Sad, YU, Bulevar Cara Lazara 1

Note:

**N** Ph. D. thesis = Doktorska teza

Abstract:

**AB** The scientific and practical significance and the lack of literature data on the application of ultrafiltration (UF), as well as the alternative coagulating enzymes, particularly genetic chymosin, and enzymes for accelerated ripening in hard cheese technology were essential reasons for choosing this field for research. The object of presented investigations was Kashkaval, the popular mediterranean hard variety cheese.

In the scope of these investigations, Kashkaval was industrially produced using retentate obtained by UF of milk according to LCR (Low Concentrated Retentate) procedure (UF Kashkaval). Effects of clotting enzymes of microbiological origine (M. miehei protease, Rennilase) and of genetically modified chymosin (Maxiren) on the quality of final cheese product was also investigated and compared to conventional analogues (control Kashkaval). The possibility for reduced ripening period of both Kashkaval types (traditional and UF) was investigated by the addition of „coctail“ of enzymes which accelerate the cheese ripening, involving the proteolytic (Accelase) and lypolytic (Palatase) activity.

According to the results obtained by the investigations of physico-chemical composition, microstructure and sensory quality of conventional Kashkaval and UF analogues in the course of one-year ripening period, it was possible to derive the conclusion that the effects of recombined chymosin (Maxiren) and the standard one are insignificantly different, confirming thus the former knowledge that the genetically modified chymosin is an adequate proteolytic agent for milk coagulation in cheese production. The lowest level of milk fat in dry matter over the whole investigated period was established both for conventional and UF Kashkaval samples produced by the application of M. miehei protease (Rennilase), whereas from the economic standpoint this indicated negative effects on cheese quality. All UF Kashkaval varieties differ during the period of ripening from conventional analogues concerning chemical composition (content of milk fat, total N, NPN, RN etc.), profile of proteolytic degradation of  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein, distribution of identified volatile aroma



components, rheological and sensory characteristics as well as the microstructure due to the slower intensity of changes in protein and lipid phases of UF cheese samples during ripening. The „cocktail“ of proteolytic and lipolytic enzymes showed more pronounced effects on the Kashkaval ripening in the case of conventionally produced cheese sample.

Accepted by the Scientific Board on:  
**ASB**

Defended on:  
**DE**

Thesis defend board:  
(Degree/name/surname/title/faculty)  
**DB**

President: \_\_\_\_\_

Member: \_\_\_\_\_

Member: \_\_\_\_\_

# SADRŽAJ

	strana
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	<b>3</b>
<b>2.1. KONVERZIJA MLEKA U SIR</b>	<b>3</b>
2.1.1. Kazeln - sastav i struktura micle	4
2.1.2. Enzimi za koagulaciju mleka	9
2.1.2.1. Animalne proteaze	13
2.1.2.2. Mikrobiološke proteaze	14
2.1.2.3. Genetski modifikovan enzim	16
2.1.3. Mehanizam koagulacije kazeln	22
2.1.3.1. Primarna faza koagulacije	23
2.1.3.2. Sekundarna faza koagulacije	24
2.1.3.3. Post-koagulišući fenomeni	25
<b>2.2. BIOHEMIJSKI ASPEKT ZRENJA</b>	<b>27</b>
2.2.1. Izvori enzima u siru	29
2.2.2. Degradacija proteina i konverzija amlnokiseln	31
2.2.3. Degradacija mlečne masti i konverzija masnih kiseln	34
2.2.4. Fermentacija laktoze	35
<b>2.3. MOGUĆNOST UBRZANJA ZRENJA SIRA</b>	<b>38</b>
2.3.1. Dodatak egzogenih enzima	39
2.3.1.1. Mogući načini dodavanja enzima	39
2.3.1.2. Proteaze	44
2.3.1.3. Lipaze	46
2.3.2. Kontrola temperature zrenja	47
2.3.3. Dodatak modifikovanih startera	48
<b>2.4. PRIMENA ULTRAFILTRACIJE U TEHNOLOGIJI SIRA</b>	<b>49</b>
2.4.1. Uticaj ultrafiltracije na sastav i osobine retentata	50
2.4.2. Postupci za proizvodnju sira iz UF retentata	61

<b>3. MATERIJAL I METODE RADA</b>	<b>67</b>
<b>3.1. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE KAČKAVALJA</b>	<b>67</b>
3.1.1. Konvencionalni Kačkavalj	68
3.1.2. UF Kačkavalj	70
<b>3.2. ANALIZA SUPSTRATA ZA PROIZVODNJU SIRA</b>	<b>72</b>
<b>3.3. ANALIZA SURUTKE TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA</b>	<b>73</b>
<b>3.4. ANALIZA SIRNOG GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA</b>	<b>73</b>
<b>3.5. ANALIZA KAČKAVALJA</b>	<b>74</b>
<b>3.6. MIKROSTRUKTURA GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA</b>	<b>75</b>
<b>3.7. SENZORNA ANALIZA SIRA</b>	<b>75</b>
<b>3.8. GUBITAK TEŽINE SIRA</b>	<b>76</b>
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>77</b>
<b>4.1. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV MLEKA, RETENTATA I PERMEATA</b>	<b>77</b>
<b>4.2. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV SURUTKE TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA</b>	<b>79</b>
<b>4.3. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV SIRNOG GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA</b>	<b>84</b>
<b>4.4. PROMENE SADRŽAJA POJEDINIH KOMPONENATA ISPITIVANIH KONVENCIONALNIH I UF SIREVA TOKOM ZRENJA</b>	<b>89</b>
4.4.1. Voda	89
4.4.2. Mlečna mast	91
4.4.3. Pepeo	94
4.4.4. NaCl	95
4.4.5. Promene sadržaja proteinskih frakcija	98
4.4.5.1. Ukupni azot	98
4.4.5.2. Nепroteinski azot	101
4.4.5.3. Pravi proteini	106
4.4.5.4. Rastvorljivi azot	108
4.4.5.5. Rastvorljivi pravi proteini	111
4.4.5.6. Stepен zrelosti	113

4.4.6. Titraciona kiselost	116
4.4.7. pH vrednost	118
4.5. PAG ELEKTROFOREZA	120
4.6. ISPARLJIVE KOMPONENTE AROME	130
4.7. REOLOŠKE KARAKTERISTIKE	141
4.8. GUBITAK TEŽINE	146
4.9. MIKROSTRUKTURA GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA	148
4.10. SENZORNA ANALIZA	156
5. ZAKLJUČCI	163
6. LITERATURA	167

## 1. UVOD

Primena ultrafiltracije (UF) u industrijskim razmerama počela je 70-ih godina, najpre u tehnologiji prerade mleka, a zatim i u ostalim oblastima prehrambene industrije. U industriji prerade mleka ultrafiltracija se najčešće koristi u tehnologiji sira, preradi surutke u cilju dobijanja koncentrata proteina surutke (KPS), zatim u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda, infant formula i dr. Koncept proizvodnje sira iz UF retentata utemeljen je patentom grupe francuskih naučnika Maubois, Macquot i Vassal tzv. MMV postupkom još 1969. godine.<sup>1</sup> Zahvaljujući signifikantnom progresu u dizajnu sistema za UF i razvoju postupaka za proizvodnju sira iz retentata dobijenog nakon ultrafiltracije mleka, danas se oko 3% ukupne produkcije sira u svetu ili 400.000 t godišnje proizvede primenom ultrafiltracije.<sup>2</sup> Razvijene su nove tehnologije proizvodnje većine svežih i mekih sireva (UF Quarg, UF Ricotta, UF Feta, UF Cast Feta, UF Camembert i dr.). Međutim, kod većine polutvrdih i tvrdih sireva je, zbog veće suve materije sira, nemoguće izbeći klasičan tehnološki postupak proizvodnje sa izdvajanjem surutke, i pored uvođenja ultrafiltracije. Stoga proces proizvodnje tvrdih sireva primenom UF nije definitivno rešen, mada su razvijeni postupci za proizvodnju određenog broja sireva kao npr. Cheddar-a tzv. metodom APV Siro Curd,<sup>3</sup> St. Paulin, Danbo, Havarti i Low Moisture Mozzarella.<sup>4</sup>

Korišćenje himozina za koagulaciju mleka u proizvodnji sira datira još iz antičkog doba, od prapočetaka pravljenja sira.<sup>5</sup> Ograničena mogućnost proizvodnje himozina, skup postupak, nedovoljna čistoća (obično je u smeši sa pepsinom), kao i godišnji obim proizvodnje sira u svetu ( $10^7$  tona uz prosečan godišnji porast od 3-4% u poslednjih dvadeset godina<sup>6</sup>), razlozi su koji su naveli svetske proizvođače komercijalnih enzimskih preparata da pronađu 1960-ih godina alternativne izvore (bakterije i plesni) proteolitičkih enzima za supstituciju himozina u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Danas se kao koagulansi uspešno koriste komercijalni preparati proteolitičkih enzima izolovani iz plesni *M. miehei*, *M. pusillus* Lindt i *Endothia parasitica*. S kraja 80-ih godina na svetsko tržište je lansirana najnovija varijanta supstitucije dobijena primenom genetskog inženjerstva i biotehnologije, genetski modifikovani himozin, kloniranjem gena u kvascu *Kluyveromyces lactis*<sup>7</sup> ili gljivi *Aspergillus niger* var. *awamori*.<sup>8</sup> Iako je identič-



nih funkcionalnih svojstava standardnom himozinu i predstavlja potpuno čist himozin (100% pure chymosin), njegovo dejstvo u tehnologiji različitih tipova sireva se danas intenzivno proučava.

Kako je zrenje sira vremenski najduža operacija u tehnologiji tvrdih sireva (1-2 godine) skraćanjem perioda zrenja korišćenjem odabranih egzogenih enzima proteolitičkog i/ili lipolitičkog dejstva, bez negativnih reperkusija na kvalitet finalnog produkta, znatno se popravljaju ekonomičnost celog procesa i produktivnost proizvodnje. Prednosti ubrzanja zrenja dodatkom egzogenih enzima su: niska cena, specifično delovanje i mogućnost formulacije enzima u smeši (tzv. „koktel“ enzima) ili pojedinačno u cilju postizanja željenih efekata.

Imajući u vidu naučan i praktičan značaj primene ultrafiltracije, alternativnih koagulišućih enzima za supstituciju himozina i „koktela“ egzogenih enzima za akceleraciju procesa zrenja u tehnologiji tvrdih sireva, za objekat istraživanja u ovoj disertaciji odabran je Kačkavalj, popularni sir mediteranskog porekla. Pored specifičnosti tehnologije kojom se razlikuje od ostalih tvrdih sireva iz grupe Pasta filata (Cheddar, Provone, Mozzarella), izuzetan ekonomski i tehnološki značaj koji ima za naše sirarstvo i ostale zemlje u kojima se proizvodi, čini Kačkavalj posebno interesantnim za planirana istraživanja. Relevantni parametri klasičnog tehnološkog procesa proizvodnje Kačkavalja su detaljno ispitani i determinisani kod nas i u svetu, a proces je osavremenjen uvođenjem mašine za kontinualnu obradu čedarizovane grude. Međutim, o mogućnosti aplikacije metode ultrafiltracije, najnovijih varijanti koagulanasa, kao i enzima za ubrzanje zrenja u tehnologiji Kačkavalja u literaturi ima izuzetno malo ili uopšte nema podataka kada su u pitanju istraživanja vezana sa primenu genetskog himozina.

Stoga je cilj ove doktorske disertacije:

- razvoj tehnološkog postupka proizvodnje Kačkavalja iz retentata dobijenog nakon ultrafiltracije mleka po LCR (Low Concentrated Retentate) postupku;
- ispitivanje uticaja koagulanasa mikrobiološkog (M. miehei proteaza, Rennilase) i genetskog (rekombinovani himozin, Maxiren) porekla na kvalitet finalnog produkta;
- ispitivanje mogućnosti skraćanja perioda zrenja Kačkavalja dodatkom „koktela“ enzima proteolitičkog (Accelase) i lipolitičkog (Palatase) dejstva za ubrzanje zrenja;
- komparativna ispitivanja fizičko-hemijskog sastava, mikrostrukture i senzornog kvaliteta varijanti UF Kačkavalja i analognih konvencionalnih sireva (kontrola) proizvedenih u industrijskim uslovima tokom jednogodišnjeg zrenja.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. KONVERZIJA MLEKA U SIR

Konverzija mleka u sir generalno obuhvata četiri faze:

1. koagulaciju mleka: fizičko-hemijske promene kazeinske micelle delovanjem proteolitičkih enzima koji vode formiranju proteinske mreže, zvane koagulum ili gel,
2. separiranje surutke: mehanička obrada koaguluma, formiranje i presovanje (kod polutvrdih i tvrdih sireva) pri čemu nastaje gruša,
3. soljenje: inkorporiranje soli na površini ili u testu, ili imerzijom u slanom rastvoru i
4. zrenje: biohemijske promene konstituenata gruša delovanjem enzima pretežno mikrobiološkog porekla.<sup>9</sup>

U zavisnosti od parametara ova 4 procesa, danas se proizvodi najmanje 500 varijeteta<sup>6</sup> ili oko 10.000 sireva širom sveta, sa godišnjom produkcijom više od  $10^7$  tona<sup>10</sup>

Tekstura, ukus i aroma sira su u neposrednoj vezi sa sastavom (sadržaj vode, proteina, masti i minerala) i pH vrednosti gruša kao i uslovima zrenja. Karakteristike gruša su primarno u funkciji osobina koaguluma, prirode i intenziteta mehaničkog tretmana tokom obrade, stepena separiranja surutke i finalne pH vrednosti. Reološke osobine gela variraju u zavisnosti od uslova koagulacije (količine i porekla enzima za koagulaciju, pH, temperature, stepena acidifikacije) i originalnih karakteristika mleka. Prema tome, dominantnu ulogu u determinaciji kvaliteta finalnog sira ima prvi stepen konverzije mleka u sir.<sup>9</sup> Naučna saznanja iz ove oblasti još uvek ne omogućavaju kompletna objašnjenja fenomena formiranja koaguluma, i uticaja karakteristika mleka i parametara procesa na koagulaciju i reološke osobine gela, pa su, stoga, i dalje predmet savremenih naučnih istraživanja mnogih autora u svetu.



### 2.1.1. Kazeln - sastav I struktura micidele

Prema dosadašnjem saznanjima kazein se u mleku nalazi u obliku kazeinske micidele.<sup>11</sup> Primarnu strukturu kazeinske micidele predstavljaju 4 genetska produkta  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - i  $\chi$ - kazein i nekoliko minornih proteina koji su derivati nastali post transkriptom proteolizom primarnog kazeina i endogenom alkalnom proteinazom mleka, plazminom.<sup>12, 13, 14</sup> Poznate su po 4 genetske varijante  $\alpha_{s1}$ - i  $\alpha_{s2}$ -kazeina, 8 genetskih varijanti  $\beta$ - kazeina i 2 genetske varijante  $\chi$ - kazeina<sup>13</sup>. Sastav kazeinske micidele kravljeg mleka na sobnoj temperaturi dat je u tabeli 1.  $\alpha_{s1}$ -kazein u tabeli 1 je predstavljen kao zbir  $\alpha_{s1}$ -kazeina i  $\alpha_{s0}$ -kazeina, dok  $\alpha_{s2}$ -kazein uključuje  $\alpha_{s2}$ -,  $\alpha_{s3}$ -,  $\alpha_{s4}$ - i  $\alpha_{s6}$ -kazein. Minorne komponente  $\gamma$ -, R-, S- i TS-kazein su produkti proteolitičke degradacije  $\beta$ -kazein.<sup>16</sup> Odnos pojedinih komponenti  $\alpha_{s1} : \alpha_{s2} : (\beta + \gamma) : \chi$  je 4 : 1 : 4 : 1,3<sup>17</sup> i konstantan je tokom laktacionog perioda, dok udeo neorganskih konstituenata znatno varira u zavisnosti od rase, bolesti i dr.

Tabela 1. Sastav kazeinske micidele kravljeg mleka na sobnoj temperaturi<sup>15</sup>

Table 1. Composition of casein micelles in cow's milk at room temperature<sup>15</sup>

Komponenta	Sadržaj (g/100 g micidele)
$\alpha_{s1}$ -kazein	35.6
$\alpha_{s2}$ -kazein	9.9
$\beta$ -kazein	33.6
$\chi$ -kazein	11.9
$\gamma$ -, R-, S- i TS-kazein	2.3
Ukupni kazein	93.3
Kalcijum	2.87
Magnezijum	0.11
Natrijum	0.11
Kalijum	0.26
Neorganski fosfat (PO4)	2.89
Citrati	0.40
Ukupan neorganski materijal	6.6



Jedinstvene osobine kazeinske micelle su rezultat posttranslatorskih modifikacija. Stoga su sve kazeinske frakcije fosforilisane do određenog stepena. Svaki  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - i  $\chi$ -kazeinski molekul sadrži karakteristični broj fosfoserilnih ostataka naprimer  $\alpha_{s1}$ -B,  $\beta$ -A i  $\chi$ -A ili B sadrži 8, 5 i 2, respektivno.<sup>13</sup> To je od presudnog značaja kod formiranja kazeinske micelle i kasnije tokom njenih promena usled dejstva proteolitičkih enzima. Naime,  $\alpha_s$ - i  $\beta$ - frakcije su osetljive na prisustvo kalcijumovih jona usled prisustva većeg broja ostataka serina, dok je  $\chi$ -kazein neosetljiv na jone kalcijuma zbog prisustva samo jedne fosfoserinske grupe.

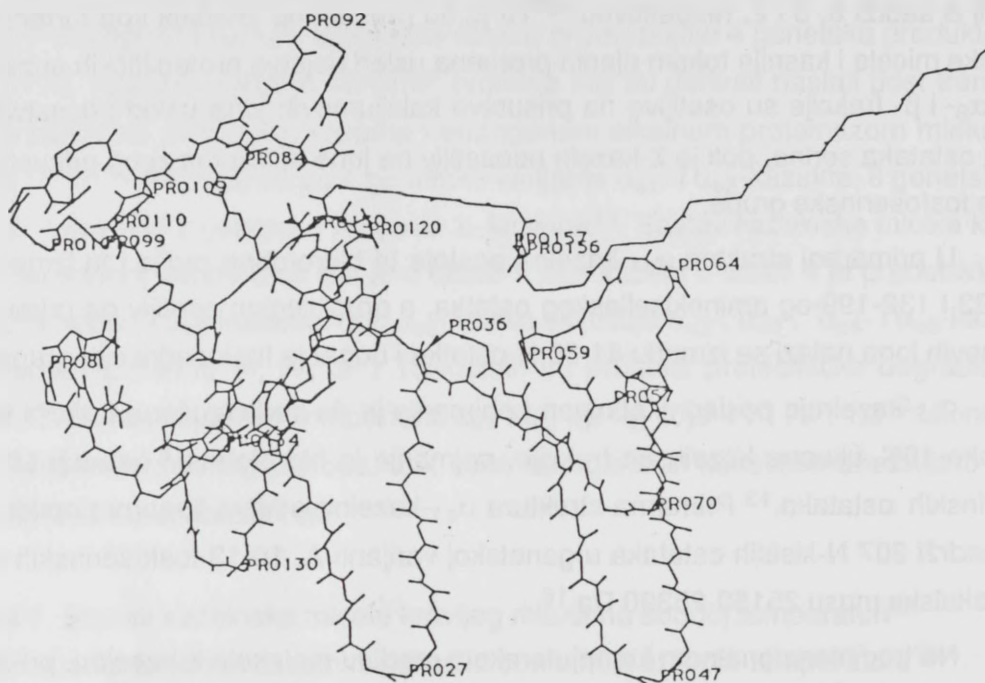
U primarnoj strukturi  $\alpha_{s1}$ -kazeina postoje tri hidrofobne regije i to između 1-44, 90-133 i 132-199-og aminokiselinskog ostatka, a drugi region osetljiv na prisustvo kalcijumovih jona nalazi se između 41-80 N-ostatka i bogat je fosfoserinskim grupama.<sup>13</sup>

$\alpha_{s2}$ -kazein je poslednji otkriven i najmanje je do sada izučena frakcija kazeina, čini oko 10% ukupne kazeinske frakcije, najmanje je hidrofobna<sup>16</sup> i sadrži 10-13 fosfoserinskih ostataka.<sup>13</sup> Primarna struktura  $\alpha_{s1}$ -kazeina otkriva linearni peptidni lanac koji sadrži 207 N-kiselih ostataka u genetskoj varijanti A, 10-13 fosfoserinskih ostataka i molekulska masu 25150-25390 Da.<sup>16</sup>

Na trodimenzionalnom kompjuterskom modelu molekula  $\chi$ -kazeina, prikazanom na slici 11<sup>1</sup>, protein je prezentiran u vidu tzv. „konja i jačaha“ („horse and rider“) gde krajnji N-ostaci od 110-120 predstavljaju „konja“ dok terminalni karboksilni segmenti označavaju „jahača“<sup>4</sup>.  $\chi$ -kazein se razlikuje od  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -kazeina u stepenu rastvorljivosti u prisustvu jona kalcijuma. Upravo zbog toga je  $\chi$ -kazein ključ za stabilnost kazeinske micelle, jer su  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -kazein nerastvorljivi u kalcijumu. Novijim istraživanjima<sup>11</sup> je utvrđeno da su ranije spekulacije o tome da je  $\chi$ -kazein linearni amfifil samo delimično tačne. Krajnji N-5 ostatak molekula ima relativno visoko naelektrisanje (0,34), mada je neto naelektrisanje nula i ovaj deo molekula je takode relativno hidrofoban. N-ostaci od 35-68 pokazuju isključivu hidrofobnost i većinom su bez naelektrisanja.  $\chi$ -kazein sadrži 2 Cys ostatka od kojih je Cys-11 lociran između 2 segmenta u konformaciji  $\alpha$  heliksa, dok je Cys-88 na suprotnoj strani u  $\beta$ -strukturi.<sup>11</sup>

Zbog različitog aminokiselinskog sastava sve komponente kazeinske micelle su veoma reaktivne i podležu međusobnim interakcijama na bazi vodoničnih, hidrofobnih, elektrostatičkih i disulfidnih veza. Na osnovu toga razvijene su brojne teorije o strukturi kazeinske micelle. Najprihvatljivija je teorija po kojoj se kazein u mleku nalazi u obliku sfernih koloidnih partikula prečnika 20-600 nm,<sup>15</sup> (najčešći prečnik je 90-200 nm<sup>18</sup>) sastavljenih od velikog broja tzv. subjedinica. Model kazeinske micelle prikazan na slici 2<sup>19</sup> je potvrđen svim elektron mikroskopskim metodama kao i metodama neutronske difrakcije i difrakcije X-zracima.<sup>19</sup> Neslaganje među istraživačima je oko veličine submi-

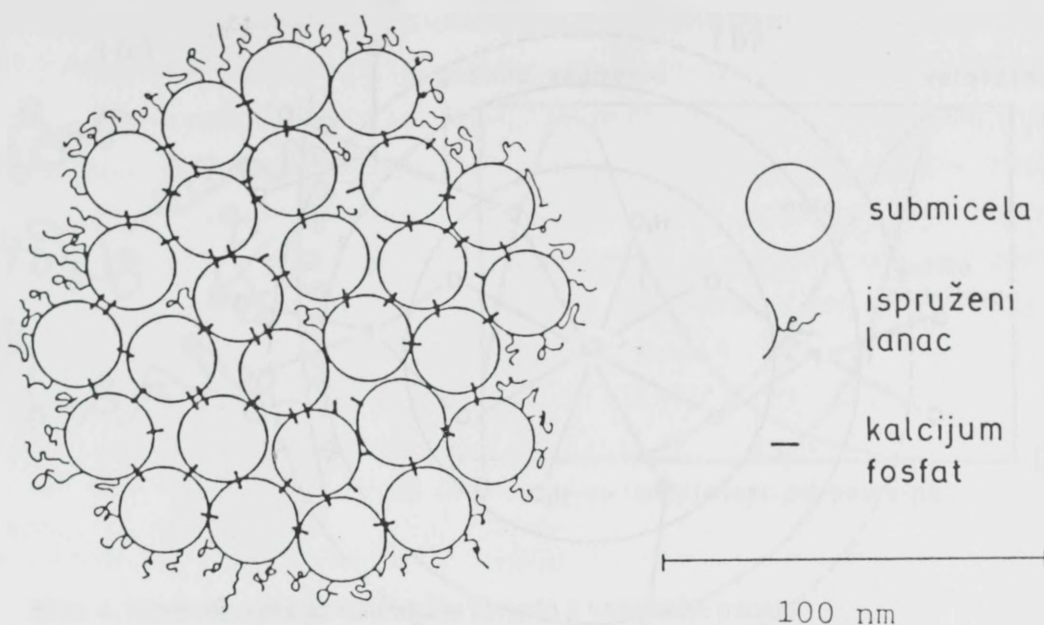
cela koje su najverovatnijeg prečnika 10-15 nm. Submicela sadrže 15-25 kazeinskih molekula, međusobno povezanih hidrofobnim i elektrostatičkim vezama. Postoje 2 tipa



Slika 1. Lanac  $\alpha$ -kazeina sa označenim pozicijama prolina - Pro<sup>19</sup>

Fig. 1. Chain trace of  $\alpha$ -casein: prolines indicated<sup>19</sup>

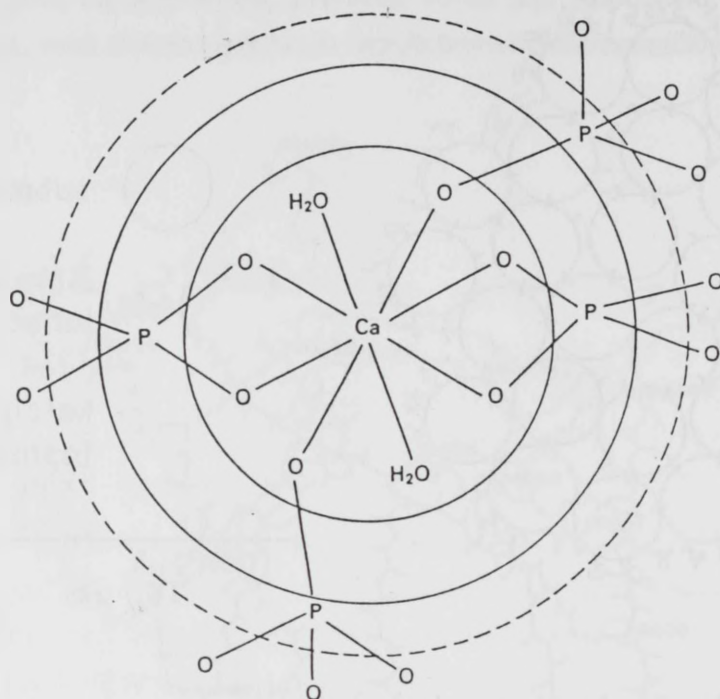
submicela, sa i bez  $\alpha$ -kazeina, što nije iznenađujuće ako se zna da  $\alpha$ -kazein egzistira u mleku kao oligomer koji se prosečno sastoji od 6 molekula.  $\alpha$ -kazein je predominantan na površini micela što je dokazano elektronskom mikroskopijom. Hidrofilni C-terminalni deo molekula  $\alpha$ -kazeina, prema najnovijim saznanjima<sup>19</sup> prostire se sa površine micela u okolni rastvarač u obliku pokretnih filamenata tzv. „kose“ (hairs) što je dokazano u istraživanjima pomoću proton nuklearne magnetne rezonance (NMR) u D<sub>2</sub>O. Ovaj C-terminalni segment počinje između 86-96 N ostatka, debljine je oko 7 nm i odgovoran je za stabilnost micela. Delovanjem proteolitičkih enzima dolazi do njegovog uklanjanja što izaziva flokulaciju micela i od značaja je u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Frakcije  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -kazeina se nalaze u unutrašnjosti svake micela, što znači da je hidrofobno jezgro („core“) pokriveno hidrofilnim omotačem („coat“) u kojem su smešteni polarni delovi  $\alpha$ -kazeina koncentrisani u jednoj površini. Submicela su povezane koloidnim kalcijum fosfatom (CCP) koji gradi mostove između pojedinih fosfoserinskih ostataka.



Slika 2. Šematski prikaz kazeinske micidele  
 Fig. 2. Schematic diagram of a casein micelle

Mada je mnogo konverzi o tačnom hemijskom sastavu koloidnog kalcijum fosfata i prirodi veze CCP i kazeina, infracrvenom spektroskopijom dobijena je najverovatnija struktura koloidnog kalcijum fosfata u obliku četke (slika 3<sup>20</sup>). Mada model na prvi pogled izgleda iznenađujuće jer je odnos  $Ca : P = 1$ , dok je u miceli veći ( $Ca : P = 1,5 - 2$ )<sup>15</sup>, ova činjenica se objašnjava time da su fosfoestarske grupe kazeina deo koloidnog kalcijum fosfata, što je u saglasnosti sa Oswald-ovim zakonima sukcesivnih reakcija<sup>11</sup>. Stehiometrijski odnos  $Ca : P$  jako zavisi od pH i koncentracije kalcijuma, kao i od prisustva pojedinih katjona i anjona.<sup>15</sup>

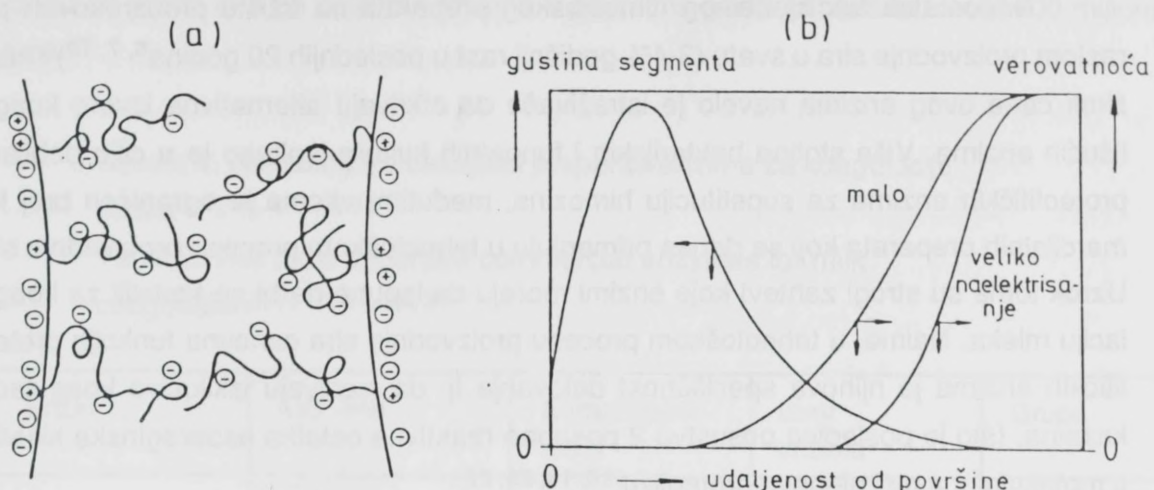
Interakcija između 2 kazeinske micidele prikazana je simplifikirano na slici 4.<sup>19</sup>



Slika 3. Šematski prikaz strukture koloidnog kalcijum fosfata<sup>20</sup>

Fig. 3. Schematic diagram of the colloidal calcium phosphate (CCP) structure<sup>20</sup>

Cepanje veze između CCP i kazeina zagrevanjem mleka na višim temperaturama dešava se bez oslobađanja fosfoestarskih grupa.<sup>21</sup> Uklanjanjem CCP dolazi do dezintegracije kazeinskih micela u subjedinice iste veličine kao submicelle. Sve to ukazuje da se nativna struktura micela zadržava usled prisustva koloidnog kalcijum fosfata, hidrofилnih, hidrofobnih i elektrostatičkih sila.<sup>22</sup>



Slika 4. Hipotetički prikaz interakcije između 2 kazeinske micelle

a) konfiguracija filamenata i naelektrisanja (uprošćeno)

b) prosečna gustina segmenta filamenata jedne micelle kao funkcija rastojanja od centra micelle i relativne verovatnoće pronalaženja takvog segmenta druge micelle na istom mestu pri malom i velikom naelektrisanju micelle

Fig. 4. Hypothetical picture of interactions between two casein micelles.

a) illustrating the configuration of hairs and charges (oversimplified)

b) the average segment density of the hairs of one micelle as a function of the distance from the core of that micelle is illustrated, as well as the relative probability of finding a segment of hair of the other micelle at the same place, for a high and low negative charge of the micelles

### 2.1.2. Enzimi za koagulaciju mleka

Koagulacija mleka proteolitičkim enzimima je jedna od najstarijih operacija u prehrambenoj tehnologiji<sup>23</sup> i datira još od 5000 godine p.n.e.<sup>5</sup>, a prvi sirevi su verovatno proizvedeni u Mesopotamiji (sadašnji Irak).<sup>24</sup> Himozin je prvi enzim koji je upotrebljen za koagulaciju mleka. Izolovan je iz želuca teladi, a naziv, koji je predložio Deschamps, potiče od grčke reči „chyme“, što znači želudačna tečnost.<sup>25</sup> Danski farmaceut Christian Hansen je 1874. godine prvi u svetu uspešno proizveo i otpočeo sa prodajom čistog i stabilnog himozinskog preparata<sup>26</sup> koji se od tada kao standardni koagulans koristi za transformaciju mleka u sir.

Nedostatak tradicionalnog himozinskog preparata na tržištu prouzrokovan porastom proizvodnje sira u svetu (3-4% godišnji rast u poslednjih 20 godina<sup>6, 7, 10</sup>) i nagli skok cene ovog enzima navelo je istraživače da otkrivaju alternativne izvore koagulišućih enzima. Više stotina bakterijskih i fungalnih kultura ispitano je u cilju dobijanja proteolitičkih enzima za supstituciju himozina, međutim, veoma je ograničen broj komercijalnih preparata koji se danas primenjuju u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Uzrok tome su strogi zahtevi koje enzimi moraju da ispune da bi se koristili za koagulaciju mleka. Naime, u tehnološkom procesu proizvodnje sira osnovna funkcija proteolitičkih enzima je njihova specifičnost delovanja tj. da izazivaju isključivo koagulaciju kazeina, (što je posledica prisustva 2 posebno reaktivna ostatka asparaginske kiseline u molekulu<sup>5</sup>), a ne i njegovu proteolizu.<sup>10, 14, 23, 27</sup>

Supstituenti himozinskog preparata, koji se danas komercijalno koriste, generalno se mogu svrstati u 3 kategorije:<sup>5, 10, 14, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 32</sup>

- drugi enzimi animalnog porekla: goveđi, svinjski, pileći i jagnjeći pepsin,
- mikrobiološke proteaze izolovane iz mikroorganizama *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* i *Endothia parasitica*, i
- genetski modifikovan enzim iz mikroorganizama *Kluyveromyces lactis* i *Aspergillus niger* var. *awamori*.

U tabeli 2 prikazani su izvori najvažnijih koagulanasa i njihovi komercijalni nazivi.

Osnovne prednosti aplikacije supstituišućih enzima u odnosu na tradicionalni himozin su:<sup>7, 24, 28</sup>

- neograničen kvantitet proizvodnje,
- visok stepen čistoće,
- uniforman kvalitet,
- dobra održivost tokom skladištenja,
- maksimalan randman sira,
- stabilno snabdevanje,
- pristupačna cena,
- nepostojanje religioznih prepreka za korišćenje enzima (Kosher i Halal sertifikati) u zemljama gde je zabranjena upotreba animalnog koagulansa.

Od ukupne svetske proizvodnje komercijalnih koagulišućih enzima (prema podacima iz 1989. godine), 50-60% zauzimaju mikrobiološki, a 40-50% animalni<sup>34</sup>, pri

čemu se proda oko 25 miliona l enzima a prosečna godišnja zarada iznosi 100 miliona funti.<sup>29</sup>

Tabela 2. Najvažniji komercijalni preparati enzima za koagulaciju mleka<sup>5, 7, 10, 24, 30, 31</sup>

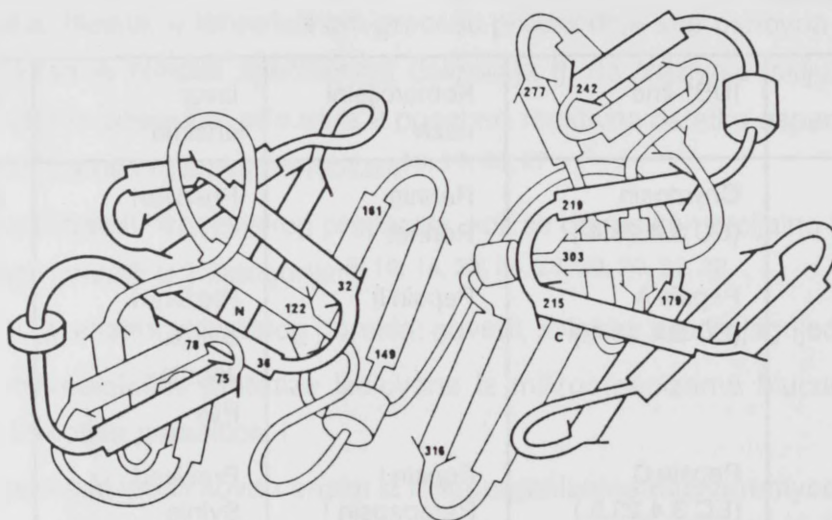
Table 2. The most important commercial enzymes for milk coagulation<sup>5, 7, 10, 24, 30, 31</sup>

Enzim	IUB*-ime	Komercijalni naziv	Izvor enzima	Grupa
Himozin	Chymosin (EC 3.4.23.4.)	Rennin Rennet	Preživari	Animalni
Pepsin	Pepsin A (EC 3.4.23.1.)	Pepsin II	Preživari Svinja Jagnje Pile	
Gastricin	Pepsin C (EC 3.4.23.3.)	Pepsin I Parapepsin I Pepsin B	Preživari Svinja	
M. miehei	(EC 3.4.23.6.)	Rennilase Hannilase Fromase Marzyme Miki	Mucor miehei	Mikrobiološki
M. pusillus proteaza (MPP)	(EC 3.4.23.6.)	Emporase Meito Novadel Noury	Mucor pusillus var. Lindt	
E. parasitica proteaza (EPP)	(EC 3.4.23.6.)	Sure curd Suparen	Endothia parasitica	
Rekombinovani himozin		Maxiren  Chymogen Chy-Max	Klyuveromyces lactis Aspergillus niger var. awamori	Genetski modifikovani

\*IUB - Internacionalna klasifikacija enzima (ime i broj)

Animalni i mikrobiološki enzimi za koagulaciju mleka pripadaju grupi aspartatskih proteaza<sup>25</sup> (ranije poznatih pod nazivom kisele proteaze). To su endopeptidaze<sup>27</sup> koje u internacionalnim klasifikacijama nose broj E.C.3.4.23.<sup>25</sup>

Opšti model molekula aspartatskih proteaza, dobijen metodom kristalografije X-zracima, prikazan je na slici 5.<sup>25</sup>



Slika 5. Šemarski prikaz molekula aspartatskih proteaza<sup>25</sup>

Molekul je otvoren duž pukotina i prikazuje 2 domena strukture.  $\beta$  struktura je označena strelicama, a kratko izduženi  $\alpha$ -heliksi pravougaonicima. N- i C-krajevi su označeni sa N i C, respektivno; u odnosu na aktivno mesto pukotine locirani su „pozadi“ modela molekula

Fig. 5. Schematic drawing of an aspartic protease molecule.<sup>25</sup>

The model is opened along the cleft, in order to illustrate the two-domain structure. The arrows indicate  $\beta$  structures, and the cylinders short stretches of  $\alpha$ -helices. N-terminus and C-terminus are marked by N and C, respectively, relative to the active site cleft, these are located at the „back“ of the molecule

Najbolje je do sada izučen sastav himozinskog preparata obzirom na njegovu upotrebu u tehnološkom procesu proizvodnje sira, dok o strukturi mikrobioloških proteaza postoji znatno manje podataka. Izučavanje osobina genetski modifikovanog himozina najnovijeg razvijenog koagulansa i njegovog uticaja na kvalitet različitih sireva su u toku.



### 2.1.2.1. Animalne proteaze

Himozinski preparat (E.C. 3.4.23.4.) izolovan iz želuca teladi sadrži 88-94% himozina i 6-12% pepsina, dok je kod odraslih životinja taj odnos obrnut, 90-94% pepsina a samo 6-14% himozina.<sup>10</sup>

Stomačne proteaze se izlučuju kao zimogen koji se prevodi u aktivan enzim limitiranim proteolizom u toku koje se uklanja oko 45 aminokiselinskih rezidua iz N-terminalnog peptidnog lanca.<sup>25</sup> Određivanjem primarne strukture ustanovljena je molekulska masa kravljeg himozina i svinjskog pepsina 35400 i 34600, respektivno.

Himozin se pojavljuje u obliku najmanje 2 izoenzima. Himozin A poseduje jedan ostatak asparaginske kiseline u poziciji 244, dok himozin B, u tercijalnoj strukturi prikazanoj na slici 5, na tom mestu ima glicin. Veća koagulišuća aktivnost himozina A (oko 20%) nego himozina B na  $\chi$ -kazein upravo se objašnjava interakcijom Asp-244 iz himozina A i His-102 u strukturi  $\chi$ -kazeina. Treća frakcija himozina dobijena DEAE-celuloza hromatografijom, prepoznatljiva kao himozin C, nije još dovoljno izučena. Prema dosadašnjim saznanjima himozin C predstavlja smešu nekoliko komponenata uključujući i degradacione produkte himozina A, poseduje 50% proteolitičke aktivnosti himozina A i samo 25% koagulišuće moći.

Homologija u sekvenci peptida kiselih proteaza je izrazita. Svinjski pepsin A i kravljeg himozin B imaju 189 ostataka aminokiselina u istoj poziciji. Kod nekih sisara pepsin se pojavljuje u fosforilisanom i nefosforilisanom formi.<sup>25</sup> U svinjskom i kravljem pepsinu dominira fosforilisana forma.

Kravljeg pepsin se najčešće koristi za supstituciju himozinskog preparata. Svinjski pepsin se obično meša sa drugim preparatima, ali većinom sa kravljim himozinom, osetljiv je na promenu pH, pa mu je stoga, upotreba ograničena. Upotreba kokošnjeg pepsina je veoma limitirana zbog izrazite proteolitičke aktivnosti koja uzrokuje gorak ukus i slabo testo sira.<sup>31</sup>

U Grčkoj i Italiji su i danas u širokoj primeni preparati sirila izolovani iz želuca jagnjeta i jareta.<sup>10</sup>

### 2.1.2.2. Mikrobiološke proteaze

Glavni izvori komercijalnih mikrobioloških koagulansa (karboksil proteaze, E.C. 3.4.23.6) su plesni *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* var. *Lindt* i *Endothia parasitica*. Preparati mikrobioloških proteaza se na tržištu nalaze pod različitim komercijalnim nazivima (tabela 2) i pokazuju različite osobine. *M. miehei* proteaza se od 1972. godine koristi u proizvodnji sira.<sup>31</sup> Mnoge varijante ovog mikrobiološkog sirila koji se danas proizvode su različite termičke senzitivnosti. Udeo nespecifične proteolize može se svesti na minimum, što je neobično važno. Većina novijih varijanti je veoma slična po svojim karakteristikama himozinu.<sup>30</sup> Na osnovu dosadašnjih saznanja struktura mikrobioloških proteaza je slična animalnim enzimima. Među mikrobiološkim enzimima proteinski deo glikolizirane *M. miehei* proteaze ima najveću molekulsku masu 38000 a najmanju *M. pusillus* proteaze - 30000, dok molekulska masa *E. parasitica* proteaze, izračunata na bazi sekvence aminokiselina, iznosi 33800.<sup>25</sup> Za razliku od animalnih, fungalne proteaze se produkuju odmah u svojoj aktivnoj formi.<sup>35</sup>

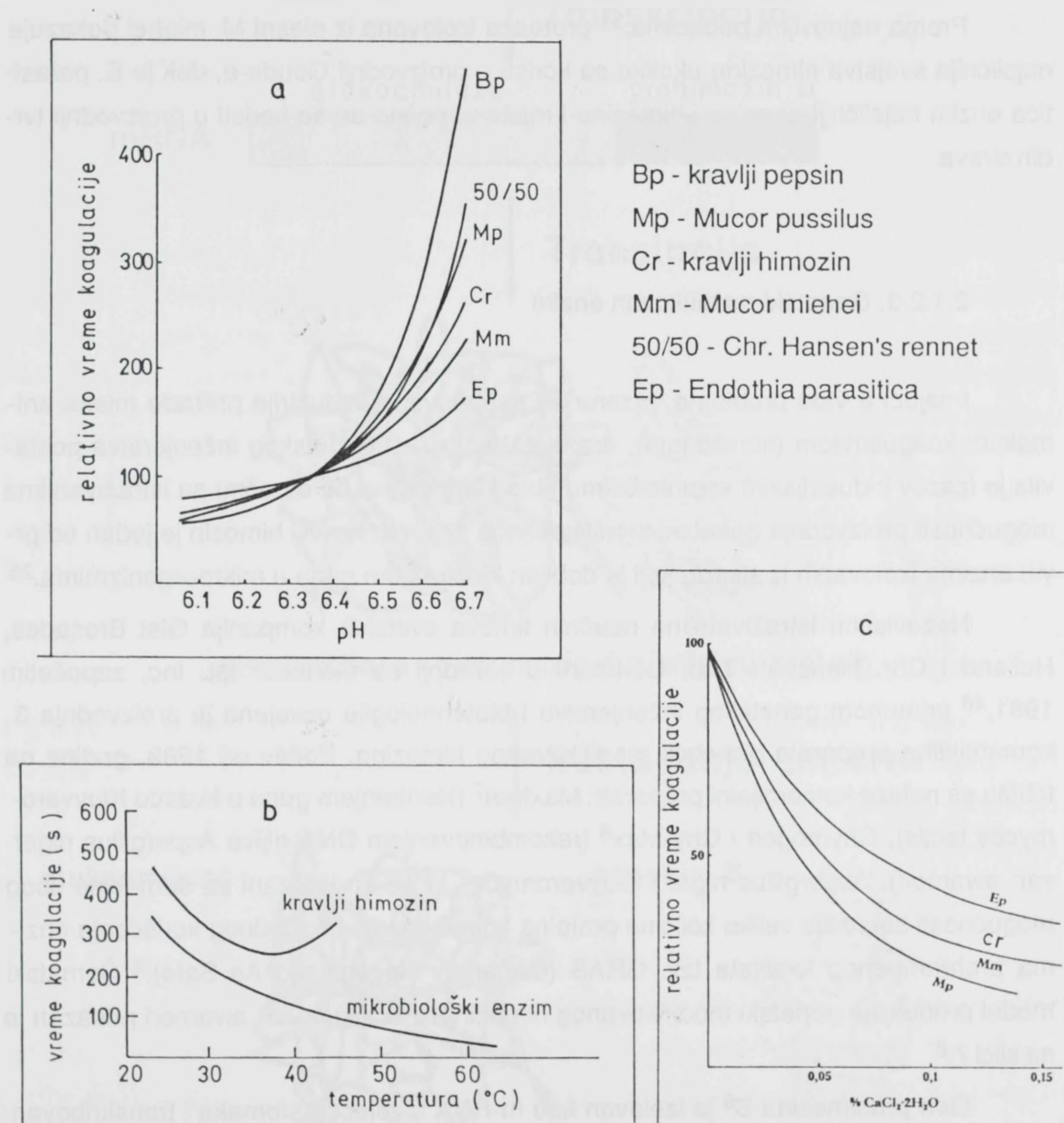
Informacije iz literature o proteolitičkoj aktivnosti mikrobioloških proteaza u proizvodnji sira nisu konzistentne.<sup>36</sup> Većina istraživača se slaže da je proteolitička aktivnost ovih supstituenata himozinskog preparata jače izražena, a prema drugima random sira se značajno smanjuje korišćenjem mikrobioloških enzima u odnosu na himozin.<sup>36</sup>

Dejstvo mikrobioloških proteaza na  $\chi$ -kazein nije u potpunosti razjašnjeno.<sup>35</sup> Veruje se da navedeni enzimi, kao i himozin, hidrolizuju specifičnu vezu Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>, čime se odvaja zaštitni hidrofilni deo  $\chi$ -kazeina, ali i da poseduju jače ili slabije izraženu nespecifičnu aktivnost.

Tabela 3. Proteolitička aktivnost različitih koagulišućih enzima u odnosu na kazein<sup>27</sup>  
Table 3. Proteolytic activity of different coagulating enzymes according to casein<sup>27</sup>

Kazein	$\alpha$	$\beta$	$\chi$
<i>Endothia parasitica</i>	+++	++	+
<i>Mucor pusillus</i>	++	++	++
<i>Mucor miehei</i>	++	+	++
Himozin	++	+	++

Proteolitička aktivnost himozina i mikrobioloških proteaza na  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\chi$ -kazein se razlikuje u intenzitetu i specifičnosti, kako je prikazano u tabeli 3,<sup>27</sup> a senzitivnost pojedinih enzima na promenu relevantnih faktora: pH, temperature i koncentracije kalcijumovih jona u mleku data je na slici 6.<sup>10, 24</sup>



Slika 6. Uticaj: a) pH; b) temperature i c) koncentracije Ca jona na vreme koagulacije mleka različitim enzimima

Fig. 6. Influence of: a) pH; b) temperature and c) concentration of Ca ions on relative coagulation time according to various enzymes

Za proces zrenja sira od velike je važnosti količina koagulišućeg enzima koja zaostaje u grušu nakon koagulacije mleka. Retencija pepsina i mikrobioloških enzima *M. pusillus* var. *Lindt* i *M. miehei* pokazala se nezavisnom od promene pH vrednosti, dok niži pH favorizuje retenciju himozina i time utiče na stepen proteolize sira.<sup>37, 38, 39</sup>

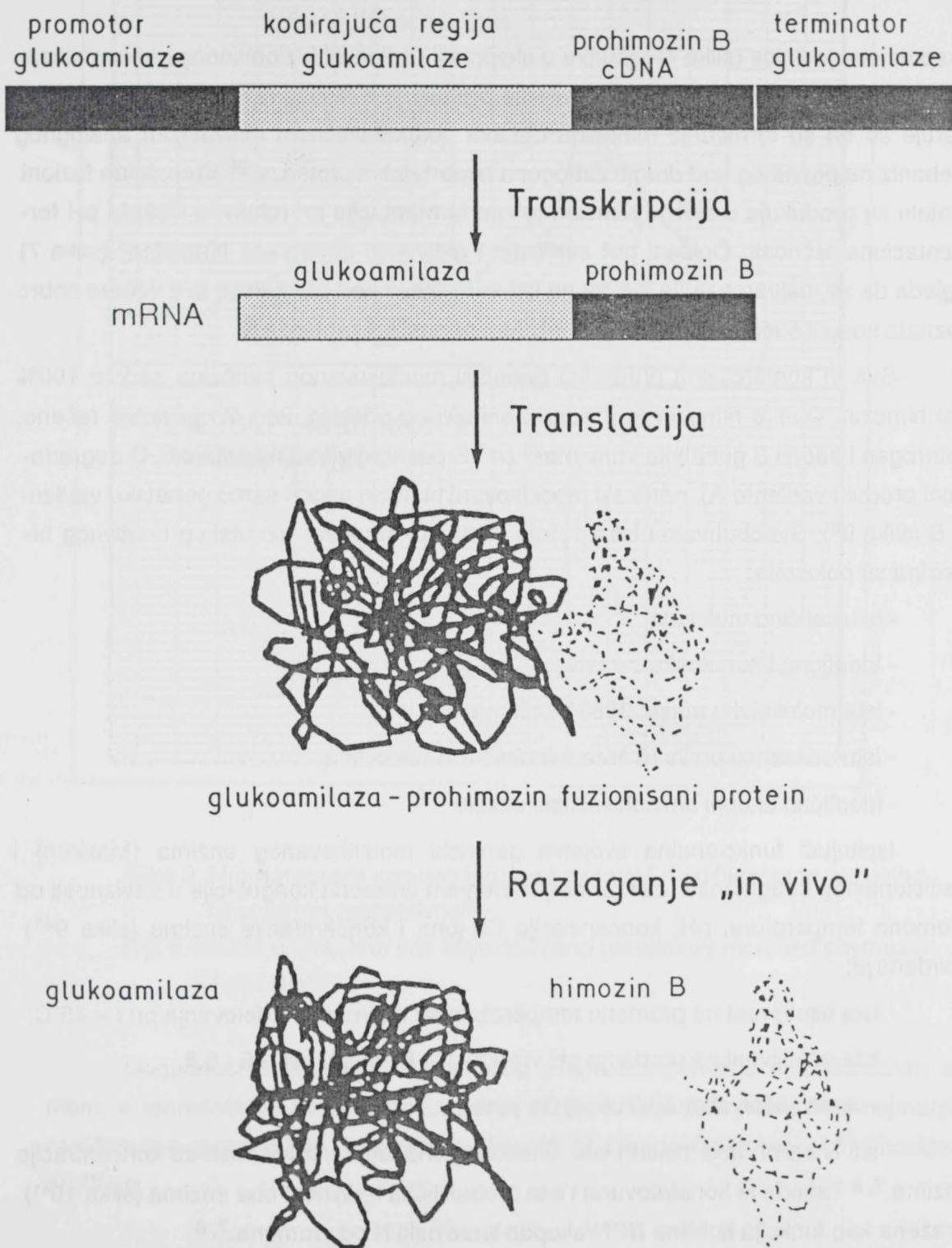
Prema najnovijim podacima,<sup>31</sup> proteaza izolovana iz plesni *M. miehei* pokazuje najbližnja svojstva himozinu ukoliko se koristi u proizvodnji Gouda-e, dok je *E. parasitica* enzim najbližnji pepsinu i himozinu i može uspešno da se koristi u proizvodnji tvrdih sireva.

### 2.1.2.3. Genetski modifikovan enzim

Imajući u vidu probleme vezane za snabdevanje industrije prerade mleka animalnim koagulansom (himozinom), era biotehnologije i genetskog inženjerstva postavila je izazov industrijskim enzimolozima i biotehnolozima da otpočnu sa istraživanjima mogućnosti proizvodnje genetski modifikovanog enzima. Kravlji himozin je jedan od prvih enzima izolovanih iz sisara, koji je dobijen kloniranjem gena u mikroorganizmima.<sup>25</sup>

Nezavisnim istraživanjima naučnih timova svetskih kompanija Gist Brocades, Holland i Chr. Hansen's Lab, Denmark u saradnji sa Genecor Int. Inc, započetim 1981,<sup>40</sup> primenom genetskog inženjerstva i biotehnologije osvojena je proizvodnja 3 komercijalna preparata genetski modifikovanog himozina. Počev od 1989. godine na tržištu se nalaze komercijalni preparati: Maxiren<sup>7</sup> (kloniranjem gena u kvascu *Kluyveromyces lactis*), Chymogen i Chy-Max<sup>8</sup> (rekombinovanjem DNA gljive *Aspergillus niger* var. *awamori*). *Aspergillus niger* i *Kluyveromyces lactis* su izabrani za domaćine zbog mogućnosti sekrecije velike količine proteina i duge istorije bezbednog korišćenja enzima prehrambenog kvaliteta tzv. GRAS (Generally Recognised As Safe).<sup>8</sup> Šematski model produkcije genetski modifikovanog himozina iz *A. niger* var. *awamori* prikazan je na slici 7.<sup>8</sup>

Gen prohimozina B<sup>8</sup> je izolovan kao m-RNA iz telećeg stomaka i transkribovan u c-DNA pre kloniranja u himozin ekspresion vektor (vektor prenosilac). Prohimozin c-DNA je direktno ubačen u ekspresioni vektor nakon kodiranja *A. niger* za produkciju glukoamilaze. Ekspresija je kontrolisana promotorom glukoamilaze i ferminatorom *A. niger* var. *awamori* koji se transformiše pomoću vektora ekspresije tako što se ekspresiona jedinica integriše u genom. Genetska stabilnost inkorporisanih gena u genomu je značajno poboljšana u poređenju sa genima lociranim u plazmidima. Konstrukcija



Slika 7. Šematski model produkcije himozina iz glucoamilaza - prohimozin ekspresione jedinice<sup>8</sup>

Fig. 7. Schematic model for the production of chymosin from the glucoamylase-prochymosin expression unit<sup>8</sup>

ekspresione jedinice (slika 7) rezultira u ekspresiji i sekreciji fuzionisanog glukoamilaza-prohimozin proteina koji se ekstracelularno produkuje u aktivni himozin i glukoamilazu. Veruje se da se formiranje himozina dešava autokatalitičnom aktivacijom analognog mehanizma poznatog kod drugih zimogena aspartatskih proteaza.<sup>25</sup> Kompletan fuzioni protein se produkuje u aktivni himozin tokom fermentacije pri relativno niskom pH fermentacione tečnosti. Opisani put sekrecije i aktivacije genetskog himozina<sup>8</sup> (slika 7) izgleda da se, najverovatnije, odvija na isti način kao i kod produkcije dva veoma dobro poznata koagulišuća enzima, M. miehei i Mucor pusillus proteaze.<sup>8</sup>

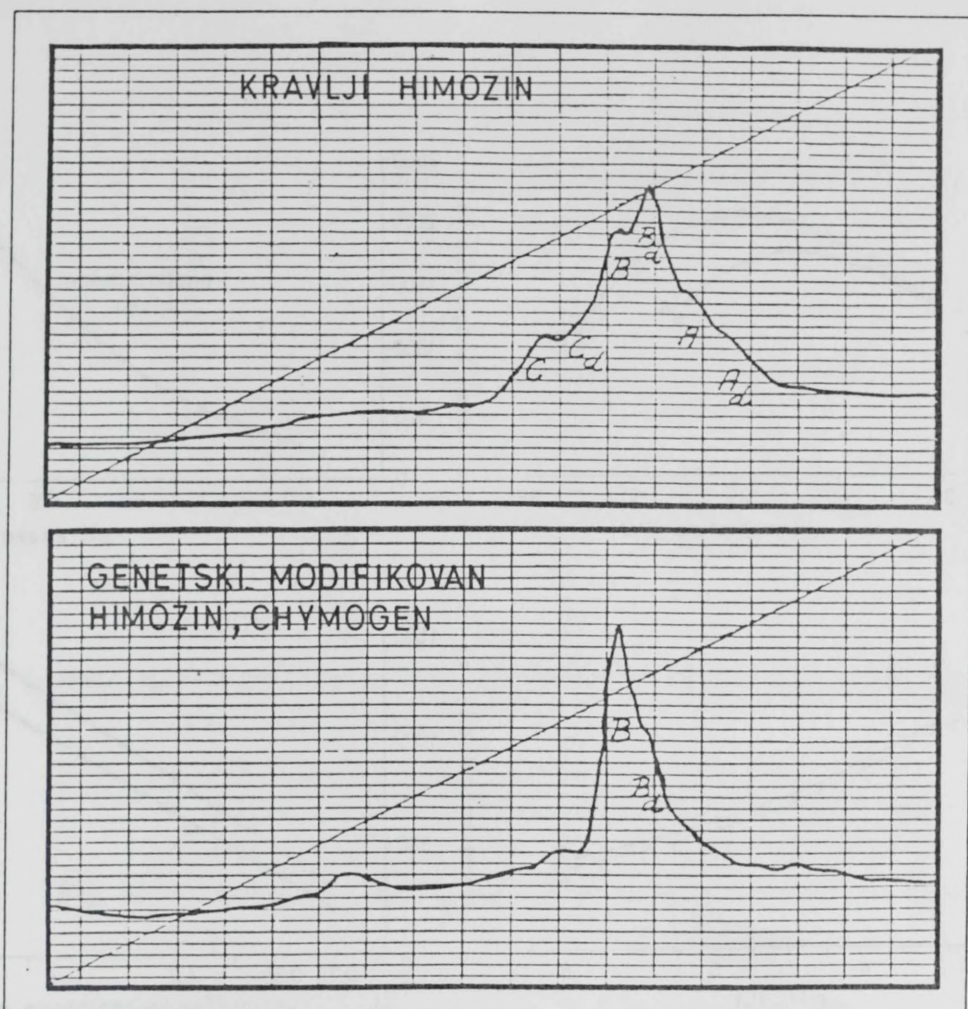
Sva tri komercijalna preparata genetski modifikovanog himozina sadrže 100% čist himozin. Dok je himozinski preparat animalnog porekla, kao što je ranije rečeno, heterogen i sadrži 3 genetske varijante<sup>25</sup> (A i B posebni genetski produkti, C degradacioni produkt varijante A), genetski modifikovani himozin sadrži samo genetsku varijantu B (slika 8<sup>8</sup>). Sveobuhvatna istraživanja sastava i strukture genetskog i nativnog himozina su pokazala:

- istu veličinu molekula,
- identična imunološka svojstva;
- iste molekulske mase: 36800 Daltona;
- istu sekvencu prvih 10 N-terminalnih aminokiselina;
- identičan ukupni aminokiselinski sastav.<sup>7, 8</sup>

Ispitujući funkcionalna svojstva genetski modifikovanog enzima (Maxiren) i tradicionalnog koagulansa (calf rennet) merenjem vremena koagulacije u zavisnosti od promena temperature, pH, koncentracije Ca-jona i koncentracije enzima (slika 9<sup>41</sup>) utvrđena je:

- ista osetljivost na promenu temperature sa optimumom delovanja pri  $t = 45^{\circ}\text{C}$ ,
- ista osetljivost na promenu pH vrednosti u intervalu  $\text{pH} = 6 - 6,8$ ,
- veoma sličan stimulišći uticaj Ca-jona,
- isti linearni reciprocitet i isto kinetičko ponašanje u zavisnosti od koncentracije enzima.<sup>7, 8</sup> Takođe je konstatovana i ista proteolitička aktivnost oba enzima (slika 10<sup>41</sup>) izražena kao funkcija količine NPN/ukupan kazeinski N od vremena.<sup>7, 8</sup>

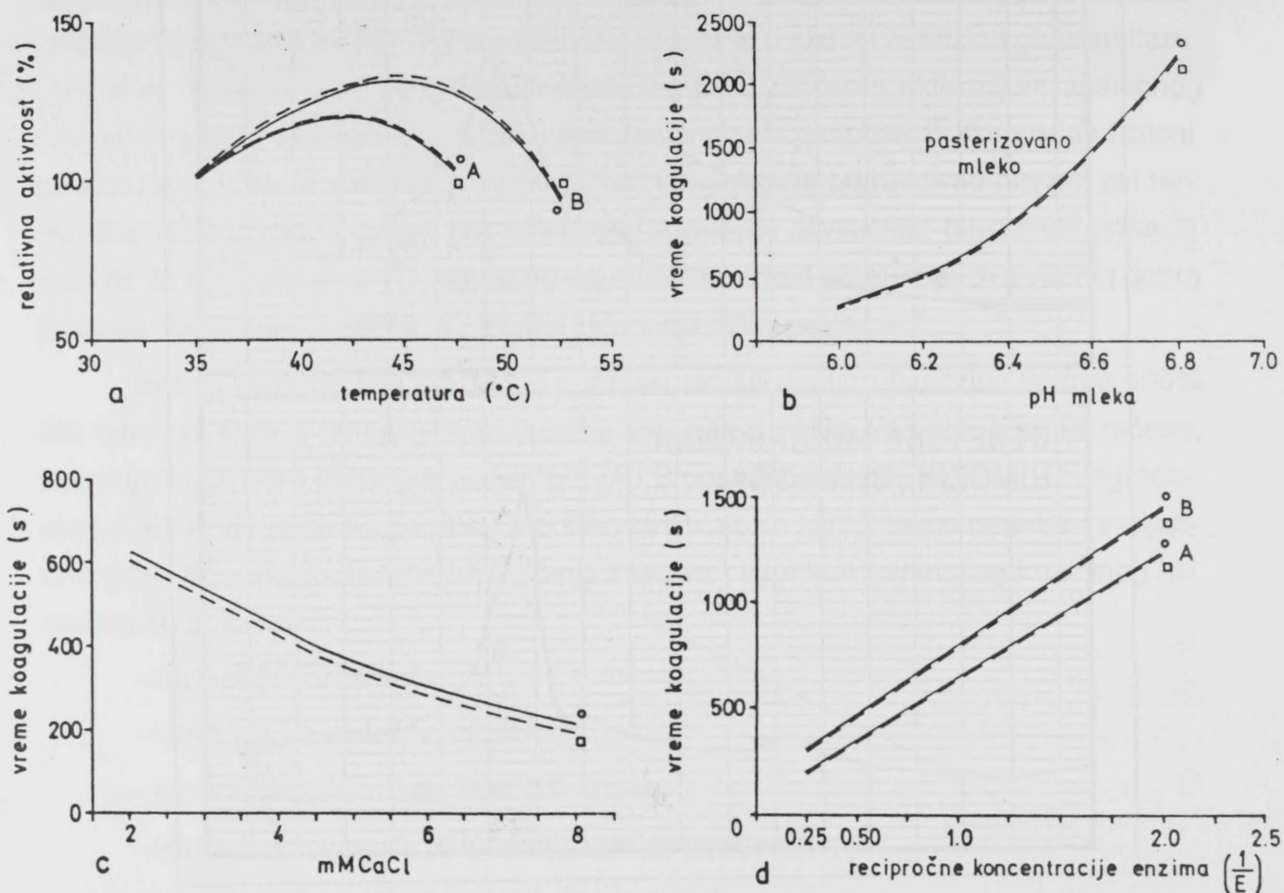
Bazirajući se na rezultate toksikoloških studija Joint Expert Committee za Food Additives pri FAO/WHO je odobrio nesmetano korišćenje genetski modifikovanih enzima u prehrambenoj industriji. Međutim, time legalizovano korišćenje genetski modifikovanog enzima i dalje nailazi na različite barijere bilo religiozne ili ekonomske prirode u mnogim zemljama Evrope i sveta.<sup>7</sup>



Slika 8. Hromatogrami kravljeg hiozina i genetski modifikovanog himozina Chymogen, respektivno<sup>8</sup>

Fig. 8 Chromatograph of calf chymosin and genetically modified chymosin, Chymogen<sup>8</sup>

Mogućnost supstitucije himozinskog preparata genetski modifikovanim enzimom, u tehnološkom procesu proizvodnje sira, do sada je ispitana kod najmanje 19 različitih tipova sireva kao što su Edam i Tilsit<sup>42, 43</sup>, Gouda<sup>44</sup>, Emmental,<sup>45</sup> Cheddar<sup>46, 47, 48</sup> idr.



Slika 9. Uticaj: a) temperature, b) pH vrednosti, c) koncentracije Ca-jona i d) koncentracije enzima na vreme koagulacije mleka himozinskim preparatom i genetski modifikovanim enzimom, Maxiren<sup>41</sup>

○ - Maxiren, □ - kravliji himozin

A - sirovo mleko, pH = 6.60

B - pasterizovano mleko, pH = 6.50

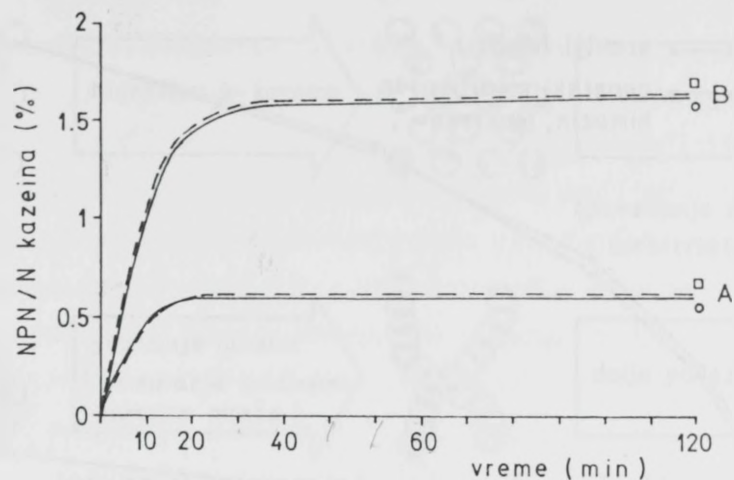
Fig. 9. Influence of: a) temperature; b) pH value; c) concentration of Ca ions and d) enzyme concentration to milk coagulation time using calf rennet and genetically modified chymosin, Maxiren<sup>41</sup>

○ - Maxiren, □ - calf rennet

A - raw milk, pH = 6.60

B - pasteurized milk, pH = 6.50





Slika 10. Proteolitička aktivnost enzima izražena kao sadržaj NPN/kazeinski N u zavisnosti od vremena <sup>41</sup>

○ - Maxiren, □ - kravljji himozin

A - primarna proteolitička aktivnost, pH mleka = 6.50, TCA 12%

B ukupna proteolitička aktivnost, pH mleka = 5.50, TCA 2%

Fig. 10. Proteolytic activity expressed by the NPN/N casein ratio in relation to time<sup>41</sup>

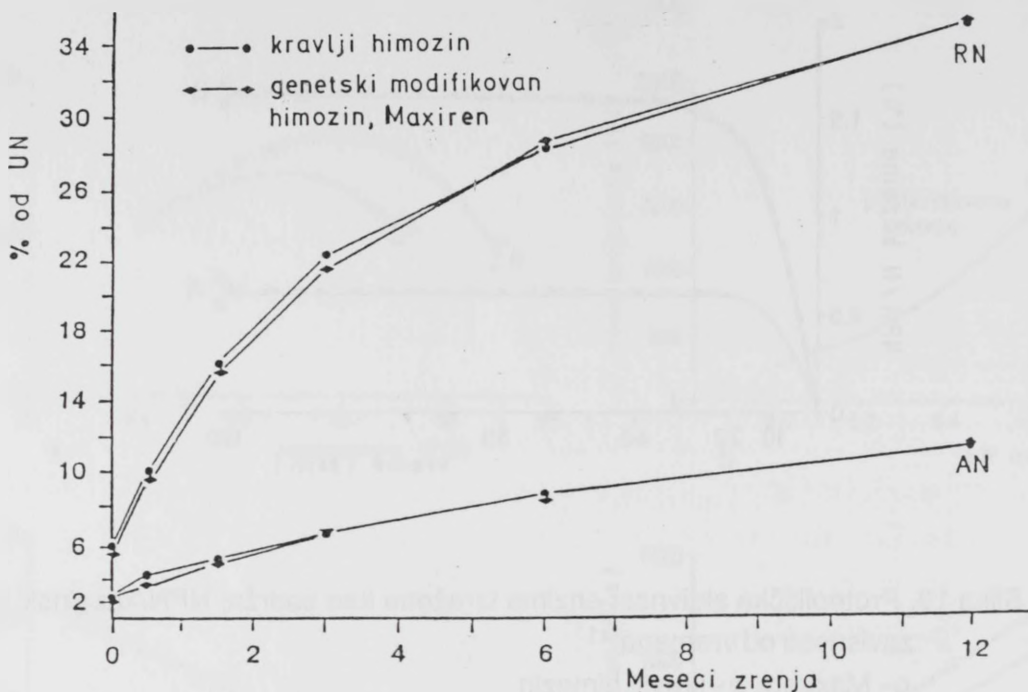
○ - Maxiren, □ - calf rennet:

A Primary proteolytic activity. pH of the milk pH 6.50. TCA 12%

B Total proteolytic activity. pH of the milk pH 5.50. TCA 2%

Proteoliza ispitivanih sireva tokom zrenja, merena različitim tehnikama, je uglavnom ista. Genetski modifikovani enzim i standardni rennet razlažu identično svaku individualnu frakciju kazeina:  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -. Npr. na slici 11 <sup>44</sup> prikazana je količina rastvorljivog N i amino N izražena kao % od ukupnog N tokom 12 meseci zrenja Gouda-e. Na osnovu ovih rezultata<sup>44</sup> i drugih istraživanja eksperimentalnih sireva može se zaključiti da onečišćenje himozinskog preparata pepsinom nema relevantnu ulogu u procesu zrenja sira.<sup>7</sup> Randman nekih eksperimentalnih sireva proizvedenih dodatkom rekombinovanog himozina je isti ili čak veći nego istih sireva dobijenih standardnim sirilom.<sup>7, 8, 31</sup>.

Prema nekim podacima<sup>31</sup>, u poređenju sa standardnim koagulišućim enzimom, potrebna je manja količina genetski produkovanog himozina jednake aktivnosti da bi se postiglo isto vreme koagulacije kazeina (oko 80% ukupno potrebnog vremena za koagulaciju kazeina himozinskim preparatom u proizvodnji Gauda-e potrebno je za koagulaciju genetskim himozinom pri istoj dodatnoj količini  $\text{CaCl}_2$ , posmatrano vizuelno).



Slika 11. Razlaganje proteina tokom zrenja Gouda-e<sup>44</sup>

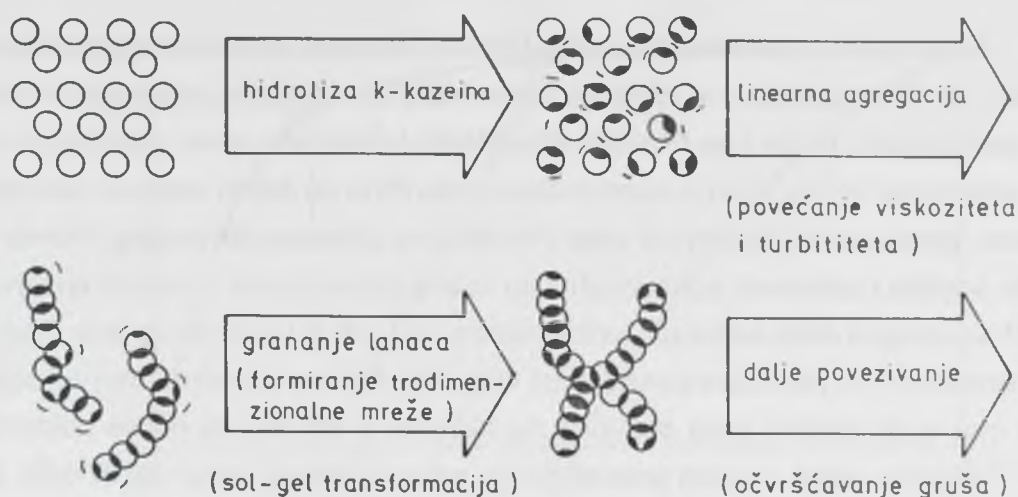
RN - rastvorljivi azot, AN - azot amino kiselina

Fig. 11. Protein breakdown during ripening of Gouda cheese<sup>44</sup>

SN - soluble nitrogen, AN - amino acid nitrogen

### 2.1.3. Mehanizam koagulacije kazeina

Koagulacija mleka, koja se manifestuje formiranjem gela u I fazi tehnološkog procesa proizvodnje sira, je rezultat dva procesa koji se definišu kao primarna i sekundarna faza koagulacije. Slika 12<sup>49</sup> prikazuje simplificiran model verovatne sekvence događaja. Svi napred navedeni enzimi, animalnog i mikrobiološkog porekla, kao i genetski modifikovani (rekombinovani DNA) himozin poseduju sposobnost koagulacije kazeinskog kompleksa u mleku. Na prethodne dve faze nadovezuje se tercijalna faza, koja je još nedovoljno razjašnjena, a obuhvata tzv. post-koagulišuće fenomene: proces sinerezisa i nespecifičnu proteolizu kazeinskog grušā neobično važne za kvalitet sira.



Slika 12. Šematski prikaz hidrofobnih interakcija tokom enzimske koagulacije mleka<sup>49</sup>

Fig. 12. Schematic representation of hydrophobic interactions during enzymic coagulation<sup>49</sup>

#### 2.1.3.1. Primarna faza koagulacije

Izolovanjem  $\chi$ -kazeina i dokazima da je on odgovoran za stabilnost micela (Waugh, Hippel)<sup>50</sup>, postalo je moguće precizno definisati primarnu fazu koagulacije. Specifična peptidna veza Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> u molekulu  $\chi$ -kazeina hidrolizuje tokom primarne faze koagulacije pri čemu nastaju dva peptidna lanca različitih osobina: para- $\chi$ -kazein i glikomakropeptid (GMP, kazeinomakropeptid ili Hammarsten-ova albumoza).<sup>9, 14, 19, 23, 35</sup>

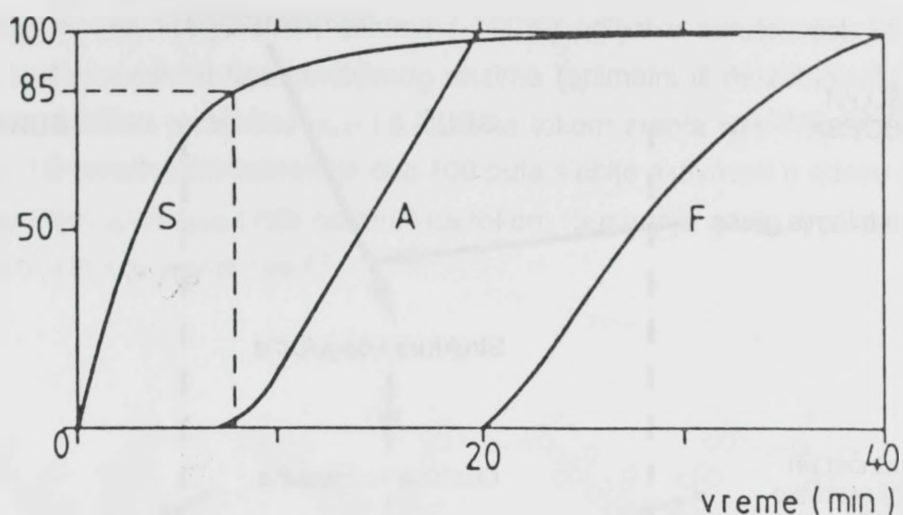
Para- $\chi$ -kazein (1-105 rezidua aminokiselina) je izrazito hidrofoban i senzitivna na prisustvo dvovalentnih jona, posebno kalcijuma, dok je glikomakropeptid (rezidue 106-169 aminokiselina) molekulske mase oko 8000<sup>51</sup>, čini 4% ukupne težine kazeina<sup>52</sup>, hidrofilan je i odlazi sa surutkom<sup>23</sup>. Pošto je rastvorljiv u 12% trihlorsirćetnoj kiselini, može da posluži kao metod za praćenje toka primarne faze koagulacije.<sup>23</sup> Međutim, primenom HPLC (high performance liquid chromatography) metode moguće je, danas, mnogo brže odrediti GMP i formiranje para- $\chi$ -kazeina<sup>35</sup> Gubitak GMP verovatno rezultira u preuređenju hidrofobnih mesta kojima se povećava broj i gustina na površini kazeinske micela<sup>49</sup> (slika 12).

Sama priroda peptidne veze Phe-Met nije posebno osetljiva na proteolizu tako da u di-, tri- ili tetrapeptidu ne dolazi do njene hidrolize. Međutim, ubacivanjem ove veze u pentapeptid, H-Ser-Leu-Phe-Met-Ala-OMethyl dolazi do njene hidrolize, a zamenom aminokiselina Ser i Leu u ovom pentapeptidu da bi se dobila pravilna sekvenca  $\chi$ -kazeina, povećava se osetljivost veze Phe-Met na delovanje himozina. Prema tome, dužina peptida i sekvenca aminokiselina su važne determinante u reakciji enzim-supstrat. Povećavajući dalje sekvencu aminokiselina od N i/ili C terminalnog dela ovog peptida, intenzivno se povećava senzitivnost veze Phe-Met na hidrolizu. Sve to doprinosi da je ova veza nekoliko puta osetljivija na hidrolizu u odnosu na ostale peptidne veze.<sup>14, 35</sup> Važnu ulogu u ovom procesu imaju aminokiselinski ostaci od 97-129, a posebno, His<sub>102</sub>, Ser<sub>104</sub> i rezidue u poziciji 98-102 (His-Pro-His-Pro-His).<sup>35</sup>

### 2.1.3.2. Sekundarna faza koagulacije

Odvajanjem GMP hidrofilnog makropeptida tokom enzimske faze koagulacije narušava se stabilnost kazeinske micela koja je dobrim delom uslovljena njenim naelektrisanjem. Smanjuje se zeta-potencijal kazeinskih micela od 10-20 mV na 5-7 mV, čime se menja odnos aktivnih i repulzivnih (elektrostatičkih i steričnih) sila, pa sama površina micela postaje hidrofobnija.<sup>14, 35, 53, 54</sup> Kada je 80-85% ukupnog  $\chi$ -kazeina hidrolizovano<sup>14, 35, 54</sup> počinje agregiranje micela po mehanizmu Smoluchowski-og tj. linearan rast veličine molekula sa vremenom<sup>35, 49, 53</sup>, pri čemu raste viskozitet i turbiditet.<sup>49</sup> Kazeinomakropeptidni (GMP) segmenti se jedan po jedan odvajaju iz micela sve dok svaka micela ne sadrži  $10^3$  molekula  $\chi$ -kazeina i dok broj micela nije  $10^2$  puta veći od broja molekula himozina.<sup>53</sup> Konzekventno tome, reaktivnost micela tj. sposobnost micela da flokulišu je na početku mala, da bi se znatno povećala kada je najveći deo  $\chi$ -kazeina hidrolizovan, postajući uočljiva pri 85 procentnoj hidrolizi (slika 13<sup>53</sup>). Gel koji pri tome nastaje je viskoelastični materijal čije se osobine konstantno menjaju sa vremenom i mogu se pratiti elektronskom mikroskopijom uzoraka uzetih u određenim vremenskim intervalima.<sup>55</sup> Najpre se formiraju lanci micela koji se potom povezuju u labavu mrežu, a kasnije međusobnim povezivanjem lanaca veze između pojedinih micela postaju sve jače, što sve dovodi do transformacije sol u gel stanje: mleko prelazi iz viskozne tečnosti u viskoelastično čvrsto stanje<sup>49</sup> (slika 12).

Stepen agregacije micela veoma mnogo zavisi od koncentracije jona kalcijuma, temperature i količine koloidnog kalcijuma fosfata.



Slika 13. Promene u mleku nakon dodavanja himozina.

Stepen razgradnje  $\alpha$ -kazeina (S), agregacija parakazeinskih micela predstavljena turbiditetom (A) i čvrstoća nastalog gela (F) kao procenat od dobijenih vrednosti nakon 40 min, u funkciji vremena.<sup>53</sup>

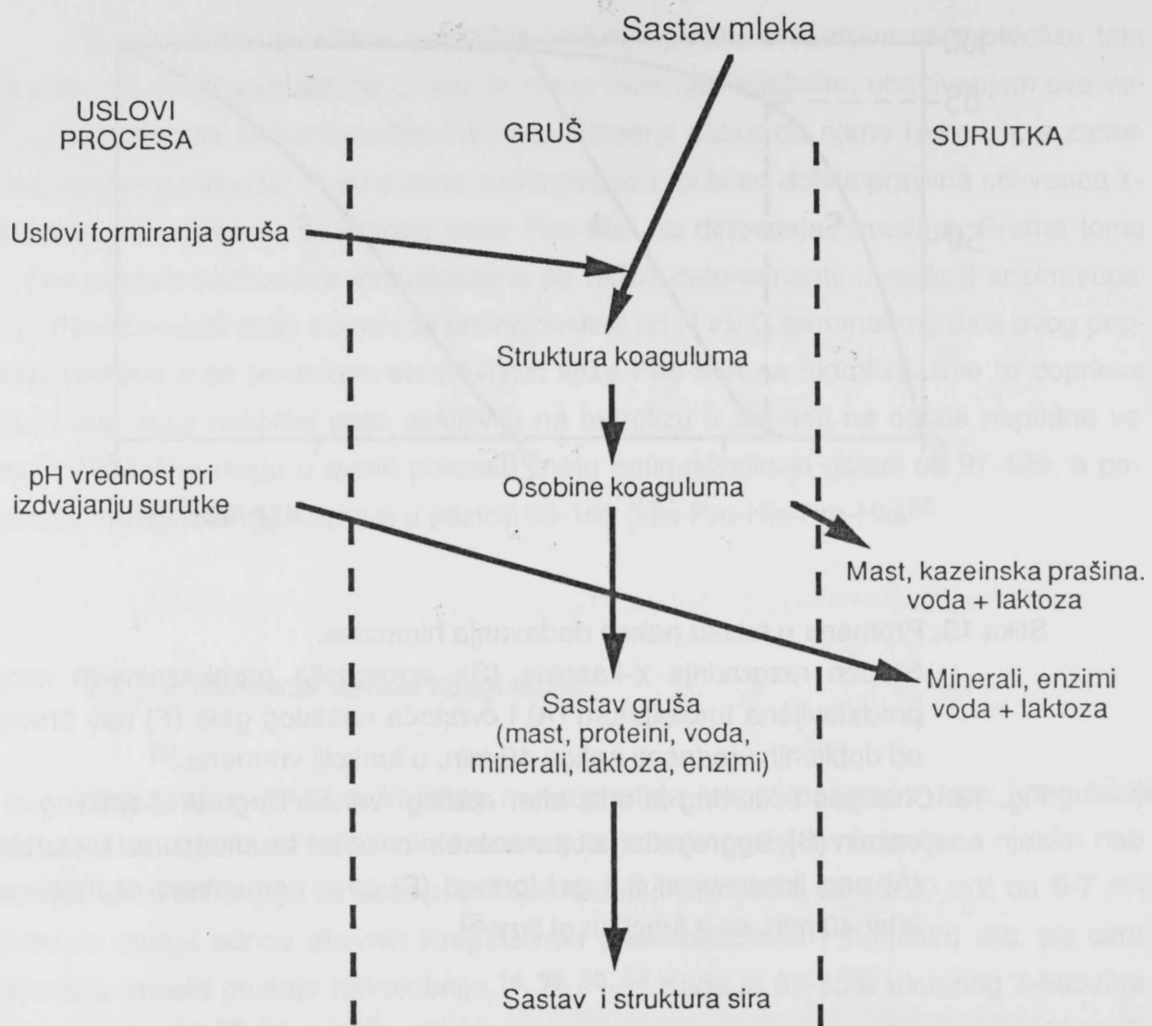
Fig. 13. Changes occurring in milk after adding rennet. Degree of splitting of  $\alpha$ -casein (S), aggregation of paracasein micelles as measured by turbidity (A) and firmness of the gel formed (F) as a percentage of their value after 40 min, as a function of time<sup>53</sup>

### 2.1.3.3. Post-koagulišući fenomeni

Izučavanje post-koagulišućih fenomena je neobično značajno sa aspekta proizvodnje sira i aktuelno je i danas.

Gel nastao tokom sekundarne faze koagulacije kazeina je veoma stabilan ukoliko se mehaničkim putem ne razori (sečenjem ili razrušavanjem), pri čemu dolazi do tzv. sinerezisa, odnosno izdvajanja surutke. Čvrstoća gela i stepen sinerezisa bitno utiču na kvalitet grušča i sira, a posledica su prethodne dve faze koagulacije mleka (primarne i sekundarne faze) što je ilustrativno prikazano na slici 14.<sup>55</sup>

Fenomen sinerezisa, koji je u osnovi poznat u koloidnoj hemiji kao starenje gela, kada je koagulacija mleka u pitanju, nije u potpunosti razjašnjen, ali na osnovu najnovijih istraživanja<sup>53</sup>, osnovni uzroci su:



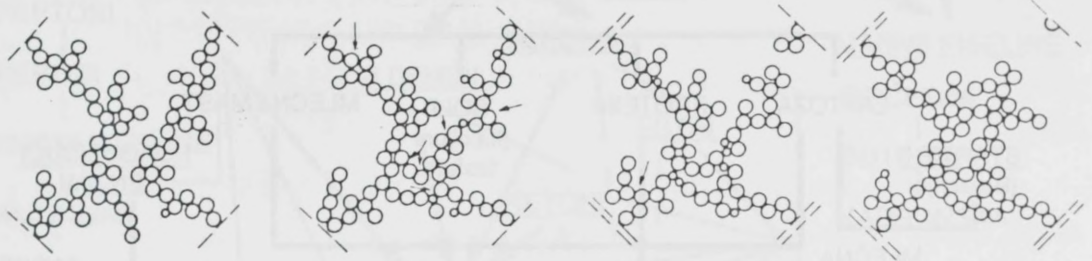
Slika 14. Uticaj različitih faktora na sastav i strukturu gruša i sira<sup>53</sup>

Fig. 14. Factors influencing the composition and structure of curd and cheese<sup>53</sup>

- promena rastvorljivosti gela;
- preuređenje nastale trodimenzionalne mreže para- $\kappa$ -kazeinskih micela formiranjem većeg broja veza i smanjenjem ukupne slobodne energije (slika 15<sup>53</sup>);
- skupljanje kazeinskih micela, npr. sniženjem pH vrednosti ili povišenjem temperature.

Količinu izdvojene surutke, pri tome, moguće je povećati eksternim pritiskom kojim se izlaže gruš, mešanjem smeše gruš-surutka, povećanjem temperature (događanje gruša) i/ili acidifikacijom mleka pre koagulacije.<sup>53</sup>

Najveći deo koagulišućih enzima (~ 90%) odlazi u surutci, dok količina koja ostaje u grušu zavisi od tipa korišćenog enzima (animalni ili mikrobiološki)<sup>38, 39, 56</sup> i izaziva nespecifičnu proteolizu  $\alpha_{s1}$ - i  $\beta$ -kazeina tokom zrenja sira<sup>23,57, 58, 59</sup>. Razlaganje  $\alpha_{s1}$ - i  $\beta$ -kazeina himozinom je oko 100 puta slabije aktivnosti u odnosu na specifičnu vezu Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> i nije od značaja tokom formiranja gruša, već daleko veću ulogu ima u procesu zrenja sira.<sup>23</sup>



Slika 15. Šematski prikaz lanaca parakazeinskih micela tokom sinerezisa gruša<sup>53</sup>

Fig. 15. Schematic representation of strands of paracasein micelles during syneresis of curd<sup>53</sup>

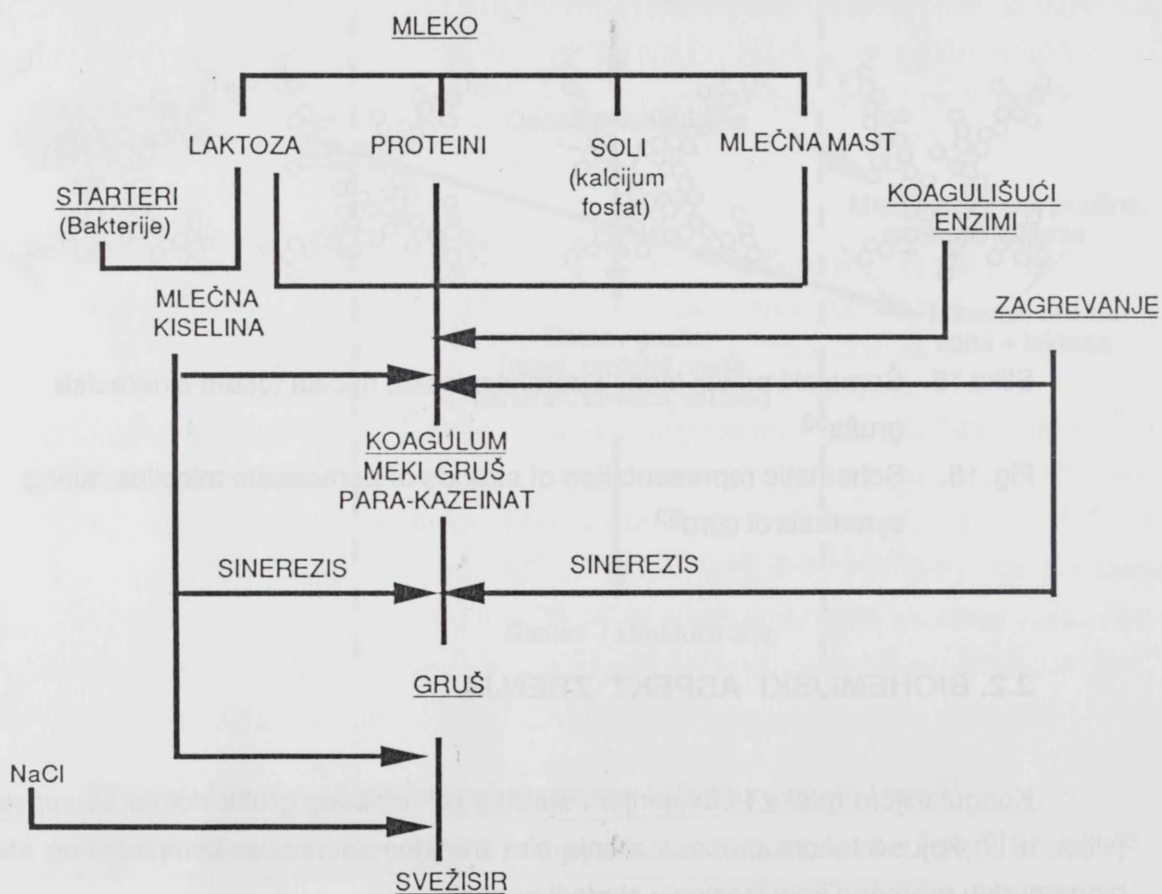
## 2.2. BIOHEMIJSKI ASPEKT ZRENJA

Koagulacijom mleka i odvajanjem surutke od nastalog gruša dobija se supstrat (slika 16<sup>10</sup>) koji se tokom procesa zrenja sira transformiše preko kompleksnog seta biohemijskih promena koje izazivaju sledeći agensi:

1. Indogeni enzimi, posebno proteaze i lipaze;
2. Enzimi za koagulaciju mleka;
3. Starteri i njihovi enzimi;
4. Sekundarna mikroflora i njihovi enzimi.

Glavni konstituenti sira - proteini, lipidi i preostala laktoza se degradiraju na primarne i sekundarne produkte tokom procesa zrenja.<sup>54</sup> Primarne biohemijske promene uključuju glikolizu, lipolizu i proteolizu, a praćene su i sekundarnim kataboličkim promenama: deaminacijom, dekarboksilacijom, desulfurizacijom,  $\beta$ -oksidacijom i esterifikacijom. Pri tome se sastav i struktura inicijalno tvrdog, kompaktnog i bezukusnog testa

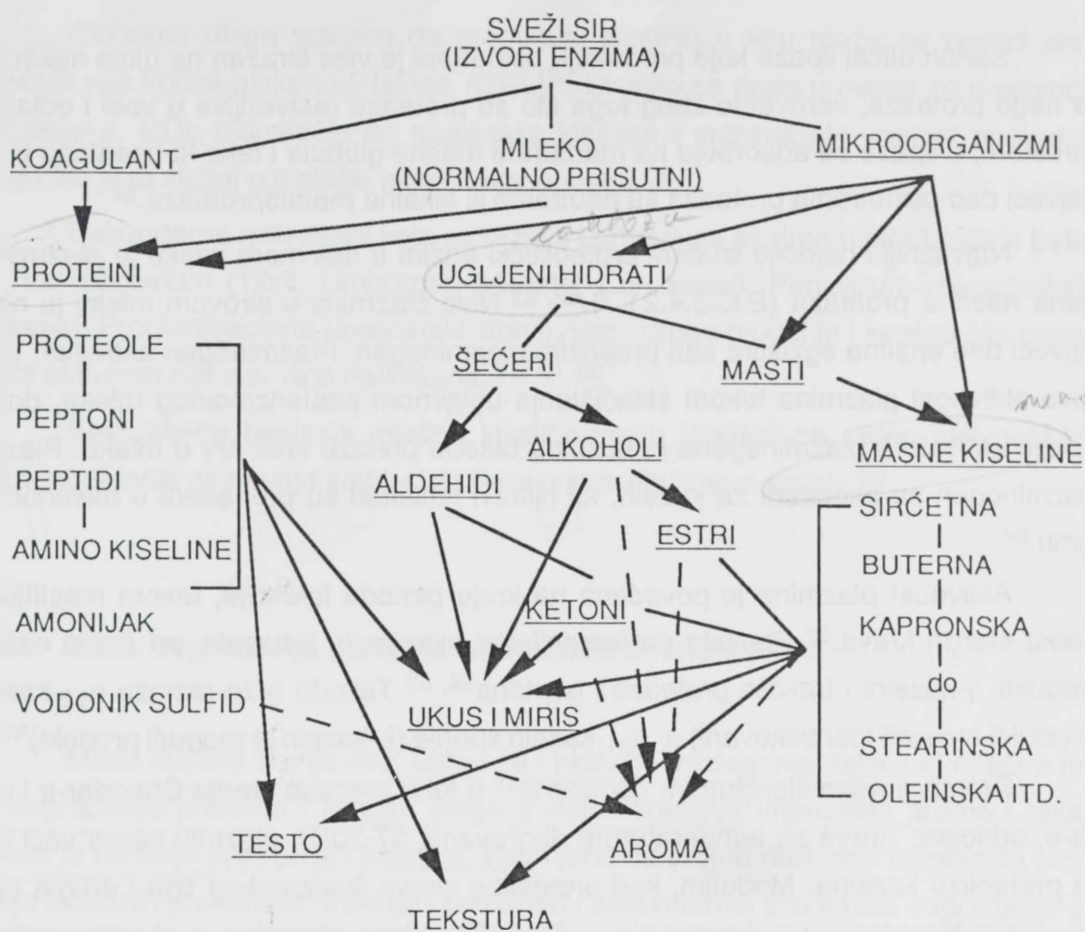
sira modifikuje poprimajući odgovarajući izgled, konzistenciju, boju, ukus i miris karakteristične za svaku vrstu sira.<sup>10, 28, 54</sup> Na slici 17<sup>10</sup> šematski je prikazan proces zrenja sira kroz aktivnost enzima.



Slika 16. Kompleksnost procesa proizvodnje sira<sup>10</sup>

Fig. 16. Complexity of cheese production<sup>10</sup>





Slika 17. Dijagramski prikaz zrenja sira kroz aktivnost enzima<sup>10</sup>

Fig. 17. Diagram showing the ripening of chreese through enzymatic activity<sup>10</sup>

### 2.2.1. Izvori enzima u siru

Naturalno mleko sadrži veliki broj indogenih enzima od kojih je više od 20 izolovano ili identifikovano. Nativne enzime izlučuje mlečna ćelija i to su: toplotno labilne kisele i neutralne proteaze i amino peptidaze i toplotno stabilne serin proteaze.<sup>60</sup> Mleko takođe sadrži i ekstracelularne enzime psihotropnih bakterija<sup>63</sup> koje dospevaju preko sena, slame, prašine, neopranih sudova i prilikom skladištenja mleka pri niskim temperaturama (4-5°C).<sup>54, 60</sup> Broj psihotropnih bakterija u mleku do 10<sup>6</sup>/ml ne utiče signifikantno na proces zrenja sira, međutim, veća populacija izaziva neželjeni ukus i teksturu nekih sireva.<sup>54</sup>

Štetan uticaj lipaze koje proizvode psihotropi je više izražen na ukus nekih sireva nego proteaza, verovatno zbog toga što su proteaze rastvorljive u vodi i odlaze sa surutkom, a lipaze se adsorbuju na membrani masne globule i tako koncentrišu u sir.<sup>54</sup> Najveći deo psihotropnih proteaza su neutralne ili alkalne metaloproteaze.<sup>61</sup>

Najvažniji i najbolje izučeni proteolitički enzim u nativnom mleku je plazmin, alkalna mlečna proteaza (E.C.3.4.21.7).<sup>62, 63</sup> Nivo plazmina u sirovom mleku je nizak i najveći deo enzima egzistira kao proenzim plazminogen. Plazminogen aktivator, povećava aktivnost plazmina tokom skladištenja uglavnom pasterizovanog mleka, dok inhibitori aktivatora plazminogena i plazmina takođe prelaze kroz krv u mleko. Plazmin i plazminogen su asocirani za kazein, ali njihovi inhibitori su pronađeni u mlečnom serumu.<sup>64</sup>

Aktivnost plazmina je povećana na kraju perioda laktacije, tokom mastitisa i u mleku starijih krava.<sup>62</sup> Plazmin preferencijalno hidrolizuje  $\beta$ -kazein, pri čemu nastaju produkti:  $\gamma$ -kazeini i frakcije proteaza i peptona<sup>54, 62</sup> Takođe brže razlaže  $\alpha_{s2}$ -kazein (produkti nisu još identifikovani) a  $\alpha_{s1}$ -kazein sporije ( $\lambda$ -kazein je mogući produkt)<sup>54</sup>

Prema novijim literaturnim podacima<sup>65</sup> u toku procesa zrenja Cheddar-a i Gouda-e, odnosno sireva sa temperaturom dogrevanja 37-30°C, plazmin nema veći uticaj na proteolizu kazeina. Međutim, kod proteolize sireva švajcarskog tipa i drugih sireva sa većom temperaturom dogrevanja (~ 50-53°C), uloga plazmina je značajnije izražena.

Mada je primarna funkcija himozina i drugih proteolitičkih koagulanasa (pepsin, mikrobiološke proteaze) da stvori uslove za formiranje gela, tokom koagulacije mleka, jedna količina ovih enzima zaostaje u grušu (kao što je rečeno u poglavlju 2.1) i učestvuje u tzv. nespecifičnoj proteolizi tokom zrenja sira.<sup>28, 54, 60, 66, 67</sup> Izuzeci su sirevi Mozzarella i Emmental kod kojih se tokom proizvodnje, zbog visoke temperature dogrevanja, potpuno denaturišu himozin i većina supstituišućih enzima, tako da rezidua ovih koagulišućih agenasa nema u grušu.<sup>28, 60</sup> Brojne tehnike su razvijene sa ciljem inaktivacije koagulišućih enzima posle hidrolize  $\chi$ -kazeina, među kojima primena imobilisanih enzima, koji mogu da hidrolizuju  $\chi$ -kazein bez inkorporacije u grušu, izgleda najprihvatljivija.<sup>10, 54</sup>

Bakterije mlečne kiseline, koje se koriste kao starter kultura u proizvodnji sira, pokazuju slabiju proteolitičku aktivnost u poređenju sa tipično proteolitičkim bakterijama (Bacillus, Proteus, Pseudomonas).<sup>60</sup> Kiselomlečne bakterije oslobađaju ili ekstracelularne enzime u grušu ili posle smrti i lize ćelija deluju njihovi intracelularni enzimi koji pripadaju grupi proteolitičkih enzima, lipaza, dekarboksilaza, deaminaza, dehidrogenaza.<sup>28, 60</sup>

Osnovna uloga startera da produkuju kiselinu u siru može se postići ako se umesto njih koristi glukono- $\delta$ -lakton (GDL)<sup>54</sup> Ukoliko se doda u mleko za proizvodnju Cheddar-a, GDL hidrolizuje do glukonske kiseline i snižava pH vredost mnogo brže nego što je to slučaj u biološki acidifikovanom siru.<sup>68</sup>

Sekundarna mikroflora koja se razvija i produkuje enzime u sir uključuje bakterije *Brevibacterium* (Tilzit, Limburger, Munster i dr. sirevi), *Penicillium roqueforti* (Blue cheese), *Propionibacteria* (švajcarski sirevi), kao i druge bakterije i kvasce čija proteolitička aktivnost nije dovoljno definisana.<sup>28, 54, 60</sup>

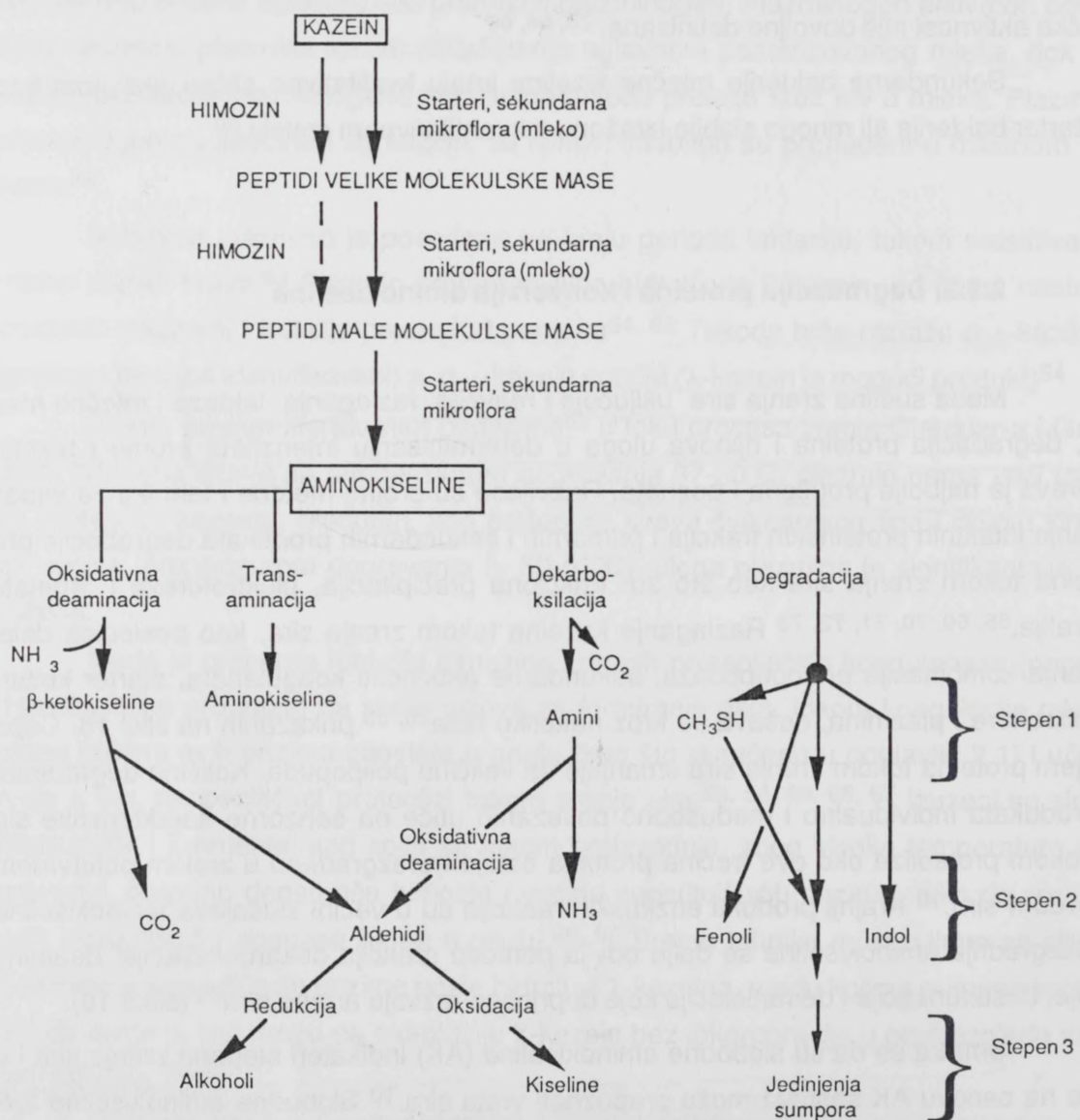
Sekundarne bakterije mlečne kiseline imaju kvalitativno sličnu aktivnost kao i starter bakterije ali mnogo slabije izraženu u kvantitativnom smislu.<sup>60</sup>

## 2.2.2. Degradacija proteina i konverzija aminokiselina

Mada suština zrenja sira uključuje i reakcije razlaganja laktoze i mlečne masti, degradacija proteina i njihova uloga u determinisanju intenziteta arome i teksture sireva je najbolje proučena i poznata. Razvijene su brojne metode i tehnike za separiranje intaktnih proteinskih frakcija i primarnih i sekundarnih produkata degradacije proteina tokom zrenja sira kao što su: frakciona precipitacija, elektroforeza i hromatografija.<sup>65, 69, 70, 71, 72, 73</sup> Razlaganje kazeina tokom zrenja sira, kao posledica delovanja kombinacije endopeptidaza, sekundarne aktivnosti koagulanata, starter kulture, mikroflore i plazmina, dešava se kroz nekoliko faza<sup>28, 60</sup> prikazanih na slici 18. Cepanjem proteina tokom zrenja sira smanjuje se veličina polipeptida. Količina degradiranih produkata individualno i međusobno povezanih utiče na senzorne karakteristike sira. Tokom proteolize oko dve trećine proteina ostaje nerazgrađeno u zreloom polutvrdom i tvrdom siru.<sup>10</sup> Krajnji produkti enzimskih reakcija su u većini slučajeva aminokiseline. Razgradnja aminokiselina se dalje odvija pomoću reakcija dekarboksilacije, deaminacije, desulfurizacije i demetilacije koje doprinose razvoju arome sira<sup>60</sup> (slika 18).

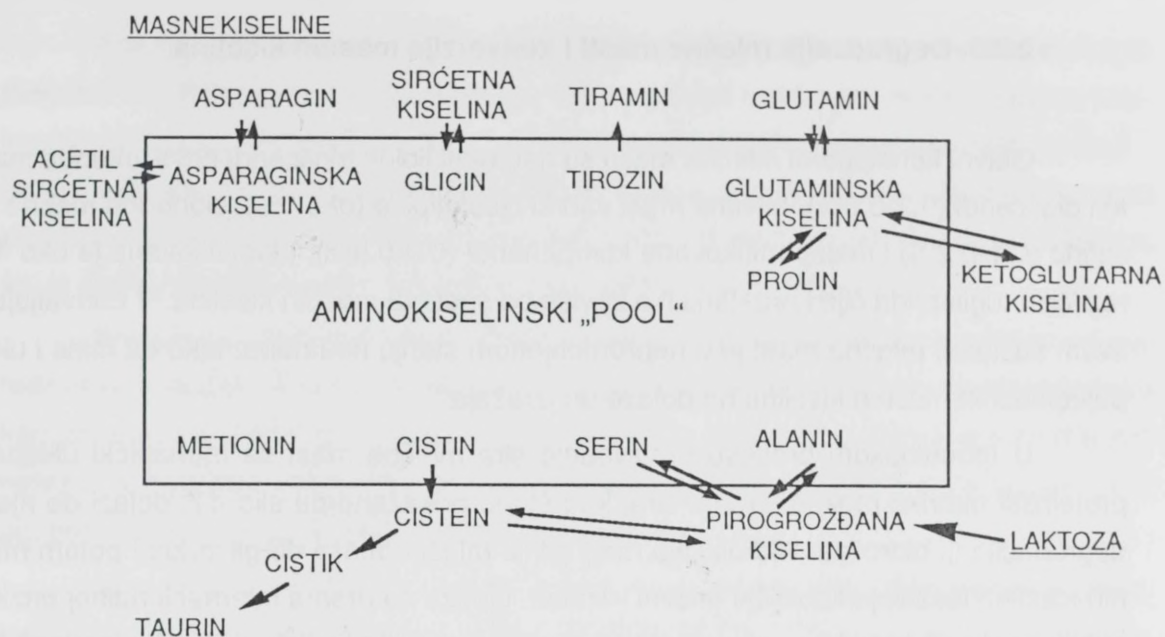
Smatra se da su slobodne aminokiseline (AK) indikatori stepena zrenja sira i da se na osnovu AK sastava može prepoznati vrsta sira.<sup>10</sup> Slobodne aminokiseline formiraju skupine („pool“) od kojih se formiraju komponente ukusa i mirisa (slika 19<sup>10</sup>). Mnogi od ovih skupina AK su amini nastali dekarboksilacijom i uključuju histamin, tirozin, asparagin, glutamin i triptamin. Jasno izražen prvi ukus aminokiselina može da se tokom zrenja sira delimično promeniti. Tako npr. prvobitno gorak ukus sira potiče od prisustva sledećih aminokiselina: metionin, histidin, lizin, triptofan, leucin, izoleucin,

arginin, fenilalanin i tirozin; sladak ukus daju serin, glicin, alanin, prolin, aminobuterna kiselina, valin, treonin, ukus supe potiče od asparaginske i glutaminske kiseine. Peptidi nastali degradacijom proteina imaju ukus u zavisnosti od toga koje se aminokiseline nalaze na kraju peptidnog lanca. U toku dalje razgradnje npr. gorki peptidi u sredini lanca mogu da na kraju procesa zrenja izgube taj gorak ukus, jer se odvojila krajnja aminokiselina.<sup>10</sup>



Slika 18. Razlaganje kazeina tokom zrenja sira<sup>28, 60</sup>

Fig. 18. Breakdown of casein during cheese ripening<sup>28, 60</sup>



Slika 19. Šematski prikaz mogućeg „pool“-a amino kiselina koji se razvija tokom zrenja sira<sup>10</sup>

Fig. 19. Diagrammatic representation of a possible amino acid „pool“ developed during cheese ripening<sup>10</sup>

Aroma sira potiče od isparljivih komponenata koje se oslobađaju tokom zrenja sira. To su estri, masne kiseline, aldehidi, ketoni, alkoholi, amini, vodoniksulfid i amonijak. Međutim, najvažnije aromatične komponente su aldehidi, ketoni i alkoholi. Deaminacijom metionina, nastaju jedinjenja koja su izvori sulfhidrilnih grupa, a degradacijom aminokiselina koje sem metionina sadrže sumpor (cistin i cistein) nastaju merkaptani, sirćetna kiselina, mravlja kiselina, amonijak, ugljendioksid i vodonik.

Amonijak i vodonik se dalje troše u drugim reakcijama. Metionin se može transformisati u metional koji daje siru ukus sličan hlebu i koji se smatra nosačem arome. Komponente arome su prisutne u siru u veoma malim količinama koje se mere u delovima na milion („parts per million“). Savremenim istraživanjima primenom metode gasne hromatografije i masene spektroskopije u polutvrdim i tvrdim sirevima<sup>74</sup> kao i u sirevima sa plesnima<sup>75</sup>, identifikovano je i kvantitativo određeno više od 40 aromatičnih jedinjenja, a više od 100 komponenata je detektovano.

### 2.2.3. Degradacija mlečne masti i konverzija masnih kiselina

Glavni konstituenti mlečne masti su neutralni lipidi: trigliceridi (98% ukupne mas-ti) i digliceridi (0.2-0.5%). Mlečna mast sadrži i fosfolipide (oko 1%), slobodne masne ki-seline (0.1-0.2%) i nesaponifikovane komponente (0.3-0.5%). Identifikovano je oko 400 različitih triglicerida čije karakteristike zavise od sastava masnih kiselina.<sup>28</sup> Zahvaljujući svom sastavu, mlečna mast je u nepromenjenom stanju neutralna, tako da miris i ukus pojedinačnih masnih kiselina ne dolaze do izražaja.

U tehnološkom procesu proizvodnje sira mlečna mast se mehanički uklapa u proteinski matriks i tokom zrenja sira, kao što je prikazano na slici 17, dolazi do njene degradacije tj. hidrolize. Hidrolitičku razgradnju mlečne masti do glicerida i potom mas-nih kiselina izazivaju lipolitički enzimi - lipaze. Lipaze su prema internacionalnoj enzim-skoj klasifikaciji hidrolaze glicerol estara (E.C.3.1.1.3) ili triacilglicerol-acil hidrolaze (R-Co-ostatak karbonske kiseline).<sup>28</sup> Generalno posmatrano, lipaze hidrolizuju trigliceride do različitog stepena u zavisnosti od molekulske mase triglicerida<sup>76</sup> na sledeći način: trigliceridi → 1, 2 ili 2,3- digliceridi → 2-monogliceridi → glicerol + slobodne masne ki-seline. Put hidrolitičke degradacije masnih kiselina, pri čemu nastaju komponente aro-me, ukusa i mirisa - ketokiseline i ketoni, prikazan je na slici 20.<sup>10</sup>



Slika 20. Put hidrolitičke razgradnje masnih kiselina<sup>10</sup>

Fig. 20. Pathway of hydrolytical degradation of fatty acids<sup>10</sup>

Kao što je već rečeno, ukus, miris i aromu sira izaziva prisustvo ekstremno kompleksnih hemijskih smeša komponenata, koje u osnovi potiču od masnih kiselina kratkog lanca C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>, najčešće C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> i C<sub>10</sub>.<sup>3</sup> Ukoliko je lipolitička razgradnja mlečne masti uznapredovala, dolazi do pojave užeglosti usled prisustva slobodnih isparljivih masnih kiselina, najčešće buterne. Pojava užeglosti može biti poželjna ukoliko je kontrolisana, što je slučaj kod italijanskih sireva, Romano, Parmesan i Provolone.<sup>10, 77</sup>

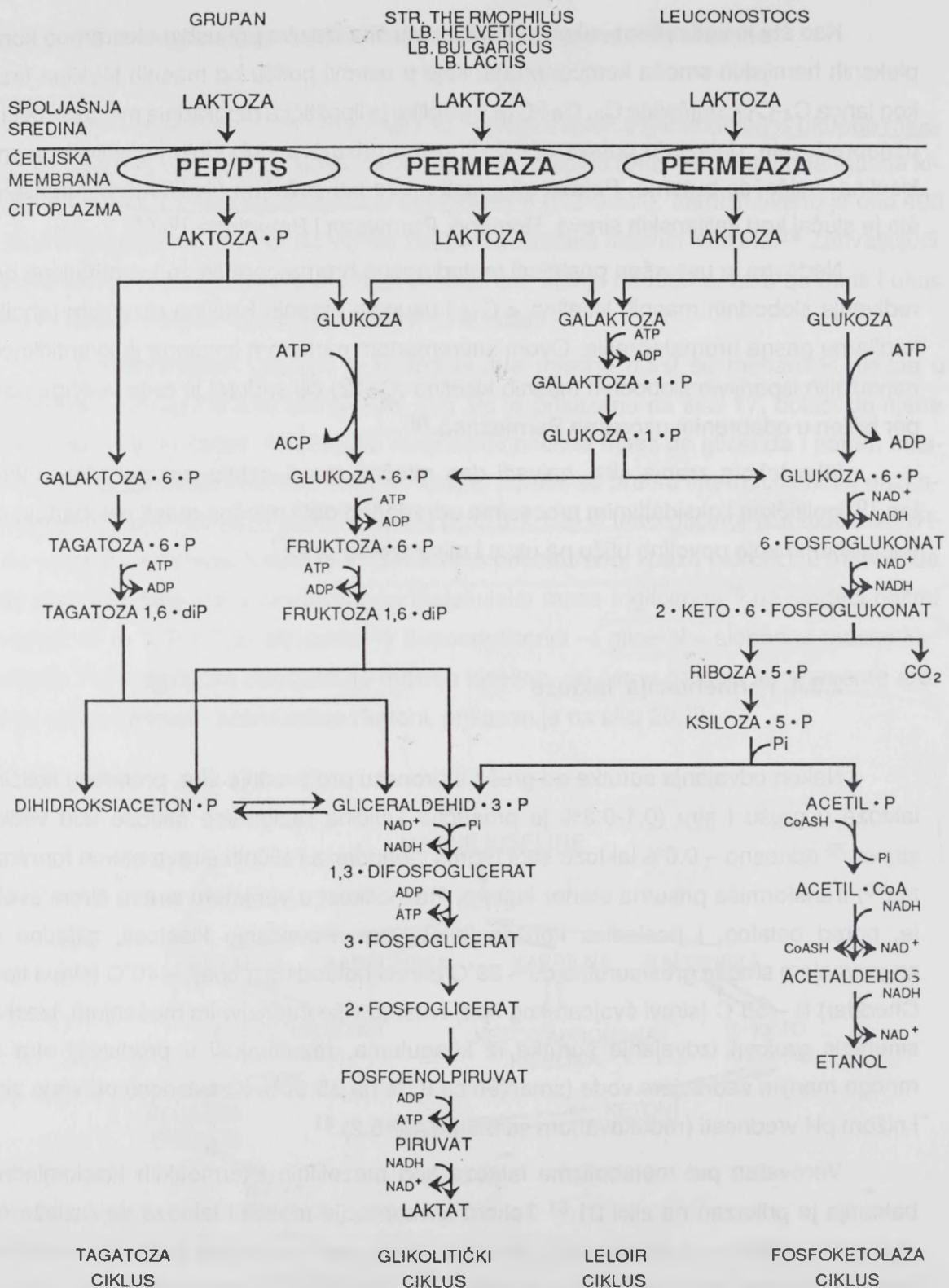
Nedavno je usavršen postojeći metod gasne hromatografije za kvantitativno određivanje slobodnih masnih kiselina < C<sub>12</sub> i ukupnih masnih kiselina razvojem tehnike kapilarne gasne hromatografije. Ovom savremenom metodom izvršena je kvantifikacija najvažnijih isparljivih slobodnih masnih kiselina (C<12) čiji sadržaj je reda veličine parts per billion u odabranim uzorcima Parmezana.<sup>78</sup>

Iako tokom zrenja sira, najveći deo mlečne masti ostaje nerazgrađen, intaktan,<sup>10</sup> lipolitičkim i oksidativnim procesima određenog dela mlečne masti oslobađaju se komponente koje povoljno utiču na ukus i miris zrelog sira.<sup>77</sup>

#### 2.3.4. Fermentacija laktoze

Nakon odvajanja surutke od gruša u procesu proizvodnje sira, preostalu količinu laktoze u grušu i siru (0.1-0.3% je prosečna količina rezidualne laktoze kod većine sireva,<sup>79</sup> odnosno ~ 0.6% laktoze sadrži gruš Cheddar-a i sličnih sireva nakon formiranja<sup>80</sup>) transformiše prisutna starter kultura. Raznolikost u varijetetu sireva širom sveta je, pored ostalog, i posledica korišćenih startera. Povećanje kiselosti, zajedno sa zagrevanjem smeše gruš/surutka do ~ 35°C (sirevi holandskog tipa), ~ 40°C (sirevi tipa Cheddar) ili ~ 53°C (sirevi švajcarskog tipa) i manje više intenzivnim mešanjem, izaziva sinerezis gruša i izdvajanje surutke iz koaguluma, rezultirajući u produkciji sira sa mnogo manjim sadržajem vode (smanjen sa 87% na 35-60% u zavisnosti od vrste sira) i nižom pH vrednosti (redukovanom sa 6.6 na 4.6-5.2).<sup>81</sup>

Verovatan put metabolizma laktoze kod mezofilnih i termofilnih kiselomlečnih bakterija je prikazan na slici 21.<sup>81</sup> Tokom fermentacije molekul laktoze se razlaže na glukozu i galaktozu, a potom dolazi do degradacije ova dva šećera preko niza složenih reakcija. Postoje mala variranja u metabolizmu mezofilnih i termofilnih starter kultura. Kod mezofilnih kultura nakon fosforilacije laktoze nastaje laktoza difosfat koju potom degradiraju enzimi lakto-β-galaktozidaze dajući glukozu-6-fosfat. U slučaju termofilnih



Slika 21. Verovatan put metabolizma laktoze kod mezofilnih i termofilnih kiselomlečnih bakterija.<sup>61</sup>

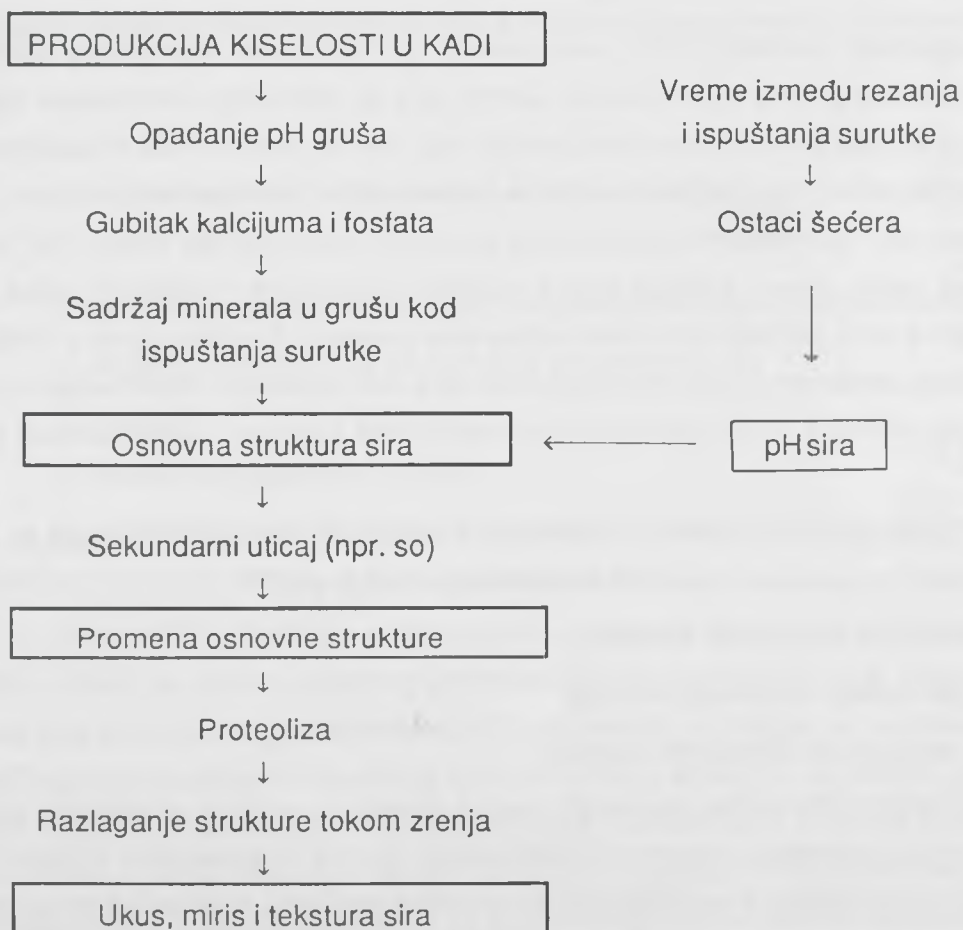
Fig. 21. Probable pathways for the metabolism of lactose in mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria.<sup>61</sup>



kultura krajnji produkt fosforilacije laktoze je galaktoza-glukoza-6-fosfat, koja hidrolizuje na galaktozu i glukozu-6-fosfat.<sup>28</sup>

Intenzitet razgradnje laktoze kao i nastanak razgradnih produkata je različit kod pojedinih vrsta sireva. Fermentacijom laktoze kod sireva sa zrenjem, nastala mlečna kiselina snižava pH i redoks potencijal pa je potrebno određeno vreme za postizanje odgovarajućeg optimalnog ukusa i mirisa sira. Niži redoks potencijal omogućava da aromatična jedinjenja bogata sumporom zadrže svoj redukovani oblik.<sup>77</sup> Kod sireva, kao što je Emmental, sva laktoza se potpuno razgradi 4-5 h nakon proizvodnje, a kod Cheddar-a u prvih 6 h zrenja fermentira oko 50% laktoze.<sup>28</sup>

pH vrednost gruša i sira tokom zrenja najvažniji je faktor koji utiče na tok biohemijskih procesa. Međuzavisnost produkcije kiselosti i kvaliteta sira (npr. Cheddar-a) prikazana je na slici 22.<sup>82</sup> U ranijim fazama procesa proizvodnje sira fermentacijom



Slika 22. Međuzavisnost produkcije kiselosti i kvaliteta sira (Cheddar)<sup>82</sup>

Fig. 22. Relationship between extent of acid production and production of cheese flavour (Cheddar)<sup>82</sup>

laktose snižava se pH vrednost sira. U kiselim sirevima pH vrednost se menja od 4.7-5.5, a u sirevima sa plesnima 4.9-7.0 i više. Aktivnošću mikroorganizama dolazi do dekompozicije sastojaka gruša tokom zrenja, pri čemu nastaju neutralne ili čak alkalne komponente koje dovode do povećanja pH sira. Ovakva promena pH omogućava da se proces zrenja dalje odvija postepeno, segment po segment, pri čemu komponente arome i ukusa dostižu određen intenzitet. Kako proces zrenja napreduje, deo komponenata se degradira, i kao rezultat se formira tipična aroma sira.<sup>10</sup> Aktivnost enzima u toku procesa zrenja zavisi od optimalnog pH. Kod većine tvrdih sireva optimalni pH za delovanje enzima je u granicama 4.9-5.5.<sup>10</sup>

### 2.3. MOGUĆNOST UBRZANJA ZRENJA SIRA

Mogućnost ubrzanja zrenja sira selektivnim metodama već mnogo godina je predmet izučavanja brojnih istraživača. Zrenje sira je najvažnija i vremenski najduža operacija u tehnološkom procesu proizvodnje sira. Vreme potrebno da se postigne željeni organoleptički i hemijski kvalitet sira u kontrolisanim uslovima temperature i vlažnosti, preko niza kompleksnih biohemijskih promena komponenata mleka (1/2 ili 1 i 2 godine kod nekih sireva), iziskuje visoke troškove proizvodnje i angažuje velika sredstva imajući u vidu godišnji obim proizvodnje sira u svetu (15 miliona tona u 1989. godini<sup>83</sup>). Stoga, svako skraćivanje procesa zrenja sira, bez negativnih reperkusija na kvalitet finalnog produkta, znači povećanje ekonomičnosti procesa i produktivnosti proizvodnje.<sup>84</sup>

Odgovarajuća IDF (International Dairy Federation) komisija eksperata je 1981. godine predložila osnovne metode za akceleraciju zrenja sira:<sup>85</sup>

1. dodatak egzogenih enzima
2. povećanje temperature zrenja
3. dodatak modifikovanih startera

Novijim istraživanjima poslednjih godina navedene metode su doživele poboljšanja u smislu otklanjanja navedenih nedostataka. Svaka od navedenih metoda može da se koristi samostalno ili u kombinaciji sa drugim metodama, a najčešće se od preporučenih metoda primenjuje dodavanje egzogenih: proteolitičkih i lipolitičkih enzima.

### 2.3.1. Dodatak egzogenih enzima

Razvojem tehnologije izolovanja i prečišćavanja pojedinih vrsta enzima animalnog, vegetabilnog i mikrobiološkog porekla, osvojena je proizvodnja različitih komercijalnih preparata prehrambenog kvaliteta koji mogu da se koriste za ubrzanje zrenja sira. Kao sirovine za proizvodnju ovih enzima najčešće se koriste različite plesni: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Mucor*, *Rhizopus* i dr., i bakterije *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei* itd. Komercijalni preparati enzima predstavljaju smešu lipaza i proteaza ili pojedinačno izolovan enzim; međusobno se razlikuju po optimalnom pH delovanja, a postupak proizvodnje je zakonom zaštićen. Prednosti ubrzanja zrenja dodatkom egzogenih enzima su: niska cena, specifično delovanje i mogućnost formulacije enzima u smeši (tzv. „koktel“ enzima) ili pojedinačno u cilju postizanja željenog ukusa i mirisa sira. Međutim, negativni efekat korišćenja egzogenih enzima je opasnost od neželjene, nekontrolisane proteolize i/ili lipolize.<sup>86</sup>

#### 2.3.1.1. Mogući načini dodavanja enzima

Generalno posmatrano, postoje tri načina dodavanja egzogenih enzima:

1. direktno u mleko koje se koristi za proizvodnju sira
2. u grušu ili
3. mikroenkapsulacijom u mleko.

U tabeli 4<sup>87</sup> prikazani su zbirno literaturni navodi za poslednjih pet godina o vrsti enzima za ubrzanje zrenja, izvoru i načinu dodavanja.

Proteolitički i lipolitički enzimi dodati u mleko pre podsiravanja, dobro se distribuiraju u mleku ali izazivaju predzrenje mleka čime se stvara mek gruša, smanjen je randman sira zbog gubitka niskomolekularnih razgradnih produkata sa surutkom; značajna količina enzima odlazi sa surutkom (oko 90%) što predstavlja ekonomski gubitak enzima i negativno utiče na dalju primenu surutke. Ukoliko se npr. koriste lipolitički enzimi za ubrzanje zrenja, isključuje se upotreba takve surutke u proizvodnji sladoleda, jer je kontaminirana lipazama koje mogu da izazovu degradaciju masti u sladoledu.<sup>86</sup>

Tabela 4. Ubrzanje zrenja sira dodatkom egzogenih enzima<sup>87</sup>Table 4. Acceleration of cheese ripening by using exogenous enzymes<sup>87</sup>

Dodati enzim	Izvor	Način dodavanja	Ispitivani parametri	Efekat ubrzanja (%)
Neutralne proteaze	<i>Aspergillus oryzae</i>	Mleveni gruš (Cheddar)	Nivo slobodnih aminokiselina	25-66
Ukupni ekstrakt (dipeptidaze, karboksipeptidaze i frakcije aktivnih proteinaza) ± Neutrased <sup>1</sup>	Pivski kvasac	Gruš, u toku sušenja (Cheddar)	Ukus i miris	-
Ukupne proteinaze ± suvi aceton <i>Lactobacillus helveticus</i> ili <i>Candida cylindracea</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ili <i>Aspergillus melleus</i>	Formiranje (Gouda)	Rastvorljivi azot u vodi, TCA-rastvorljivi azot Azot aminokiselina	10-29
Rulactine <sup>2</sup>	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	Mleko	Tekstura, randman, elektroforeza	-
Rennilase <sup>3</sup> + 45 svinjski pepsin/ pileći pepsin		Mleko		
Fromase <sup>4</sup>	<i>Mucor miehei</i> <i>Mucor miehei</i>	Mleko	Organoleptika	11-15
Piccantase <sup>5</sup>		Mleko (Domiat)	Organoleptika, užeglost	50
Piccantase B + CapalaseK <sup>6</sup>		Mleko (Domiat)	Organoleptika, užeglost	
Lipaze		Gruš (Ras)	Slobodne masne kiseline Organoleptika	
C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> lipaze	<i>A. oryzae</i>	Mleko	Slobodne masne kiseline Organoleptika	
Italase <sup>7</sup>		Mleko	Slobodne masne kiseline Organoleptika	
NaturAge <sup>8</sup> / Neutrased		Mleko (Cheddar)	Slobodne masne kiseline	
Lipaze	<i>Penicillium roqueforti</i>	Gruš (Blue cheese)	Karbonilna jedinjenja	
Lipaze	<i>Penicillium roqueforti</i>	Gruš (Blue cheese)	Slobodne aminokiseline Ispaljive masne kiseline Ukupna karbonilna jedinjenja	
β-galaktozidaza	<i>A. oryzae</i>	Mleko (Domiat)	Slobodne aminokiseline, Slobodne masne kiseline, Organoleptika	

<sup>1</sup>Neutrased, mikrobiološka proteaza (NOVO enzimi)<sup>2</sup>Rulactine, proteaza (Roussel-Uclaf, France).<sup>3</sup>Rennilase, koagulišući enzim (NOVO enzimi).<sup>4</sup>Fromase, koagulišući enzim (Gist -Brocades).<sup>5</sup>Piccantases, mikrobiološka esteraza (Gist-Brocades).<sup>6</sup>Capalases, animalna esteraza (Dairy Land Laboratories).<sup>7</sup>Italase, animalna esteraza (Dairy Land Laboratories).<sup>8</sup>Natur Age, smeša enzima iz starter bakterija (Miles Laboratories).

Stoga se preporučuje dodavanje enzima u grušu pre presovanja, obično pri soljenju zajedno sa suvom soli koja je normalni ingredijent većine polutvrdih i tvrdih sireva.<sup>88, 89, 90</sup> Primenom ove metode postiže se znatna ušteda ali i loša distribucija enzima, što se negativno odražava na kvalitet gotovog proizvoda. Rešenje ovog problema može se postići eventualnim dodatkom enzima u vidu spreja ili injektovanjem u tečnom obliku.<sup>60, 86</sup>

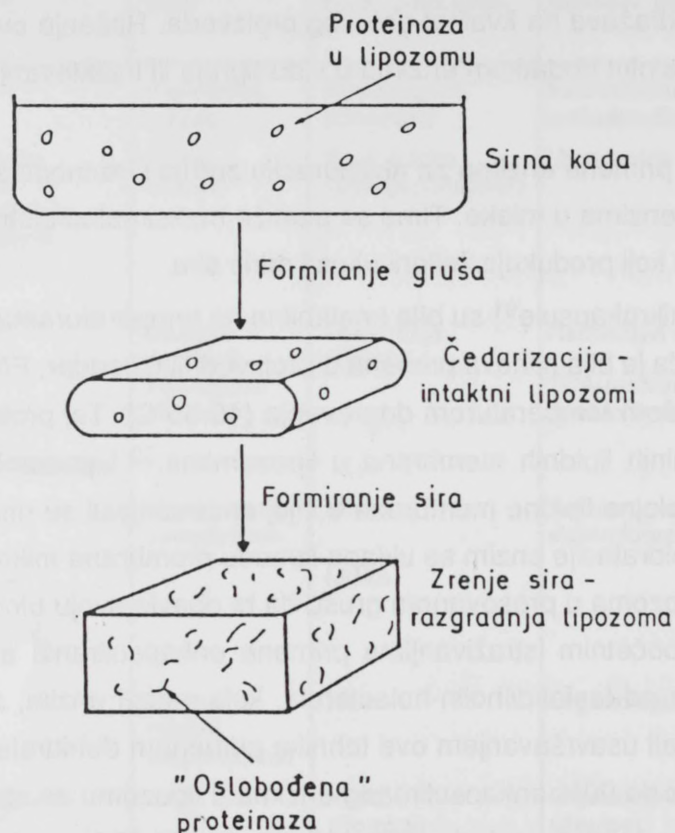
Najbolji rezultati primene enzima za akceleraciju zrenja sira mogu se postići dodatkom enkapsuliranih enzima u mleko. Time se postiže maksimalna distribucija i kontroliše aktivnost enzima koji produkuje željeni ukus i miris sira.

Prve razvijene mikrokapsule<sup>91</sup> su bile nestabilne na temperaturama iznad 33°C, pa samim tim, nemoguća je bila njihova primena u proizvodnji Cheddar, Emmental i sličnih tipova sireva sa višom temperaturom dogrevanja (40-55°C). Taj problem je rešen korišćenjem termostabilnih lipidnih membrana u lipozomima.<sup>92</sup> Lipozomi su kapsule koje se sastoje od višeslojne lipidne membrane u čijoj unutrašnjosti se nalazi enzimski materijal.<sup>93, 94</sup> Tokom hidratacije enzim se uklapa između membrana mikrokapsule i oslobađa neoštećen iz lipozoma u presovanom grušu da bi obavio svoju ulogu u procesu zrenja (slika 23<sup>92</sup>). U početnim istraživanjima primene enkapsuliranih enzima višeslojna kapsula izrađena od fosfatidilholin-holesterola, koja sadrži enzim, se samo oko 17% zadržala u grušu, ali usavršavanjem ove tehnike primenom dehidrataciono-hidratacione mikrokapsule čak do 90% enkapsuliranog enzima u lipozomu se zadrži u grušu. Obzirom da su u pitanju čestice prečnika 200-400 nm, ili 200-600 nm, lako se distribuiraju u grušu pa je stoga gubitak enzima sa surutkom relativno mali (oko 10%).<sup>93</sup> Pored navedenog, prednosti korišćenja lipozoma su sledeće: sadržaj unutar lipozoma se može osloboditi na eksterni signal (promenom pH ili temperature) odnosno u višeslojnom postupku u programiranom trenutku. U lipozomu se, pored enzima mogu enkapsulirati i komponente nosioci ukusa i arome proizvoda odnosno koktel enzima, a takođe i labilan materijal u odnosu na spoljnu sredinu.<sup>92</sup>

U novijim istraživanjima izučavan je uticaj površinskog naelektrisanja lipozoma na stepen enkapsulacije enzima (Neutrase) i retenciju lipozoma u Saint Paulin siru.<sup>95</sup> Pokazalo se da su neutralni i pozitivni lipozomi stabilniji od negativnih, dok je najveći stepen retencije pozitivnih, zatim negativnih a najmanje neutralnih lipozoma.

Temperaturno senzitivni lipozomi izgrađeni od dipalmitoil-fosfatidil holina korišćeni su za ubrzanje zrenja Domiat sira.<sup>96</sup> Mada je enzim Corolase PN (neutralna proteaza izolovana iz *Aspergillus* sp.) oslobođen na neutralni signal temperature, ovaj sistem nije se pokazao dovoljno efikasnim za skraćanje perioda zrenja sira, jer su konstatovane marginalne razlike u sadržaju rastvorljivog azota u TCA (trihlorsirćetna kiselina)

i PTA (fosforvolframska kiselina) kontrolnog i eksperimentalnih sireva, koje su verovatno posledica denaturacije Corolase PN tokom pripreme lipozoma.



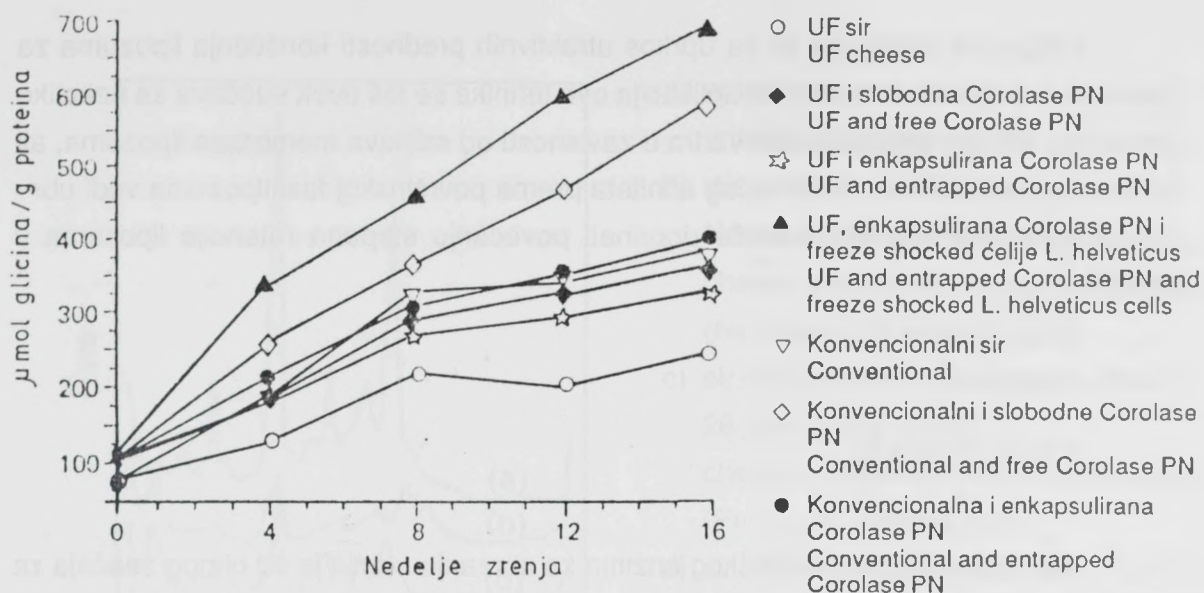
Slika 23. Inkorporiranje proteinaza u sir putem lipozoma<sup>92</sup>

Fig.23. Proteinase incorporation into cheese via liposomes<sup>92</sup>

Problem sporijeg zrenja sireva dobijenih primenom ultrafiltracije u odnosu na klasične sireve, moguće je rešiti korišćenjem kombinacije enkapsulirane proteaze (Corolase PN) u lipozomu i „freeze-shocked“ ćelija *Lactobacillus*-a. Gauda sir proizveden iz UF retentata i tretiran navedenom kombinacijom enzima sadržao je najveći nivo TCA rastvorljivog azota (slika 24) što ukazuje da primenjeni tretman može da ubrza proces zrenja UF sira.<sup>97</sup>

Kombinacija komercijalnih proteaza i lipaza dodata u UF retentat pre koagulacije stimuliše produkciju veće količine organskih kiselina: limunske, propionske, sirćetne i piruvatne u UF Cheddar siru sa niskim sadržajem mlečne masti.<sup>98</sup>

Preparat neutralne proteaze (Neutrase) dodat u gruš zajedno sa solju izaziva razgradnju  $\beta$ -kazeina i formiranje sličnih peptida u UF Cheddar siru proizvedenom iz tretiranog ili netretiranog retentata.<sup>99</sup>



Slika 24. Uticaj proteolitičkih agenasa za ubrzanje zrenja na proteolizu merenu količinom TCA rastvorljivog N tokom zrenja sira <sup>97</sup>

Fig. 24. Effect of different ripening agents on proteolysis as measured by TCA soluble N during cheese ripening<sup>97</sup>

Učinak enkapsulacije proteaza i peptidaza u različitim tipovima lipozoma i nivo retencije lipozoma u siru prikazan je u tabeli 5, na bazi najnovijih literaturnih podataka.

Tabela 5. Učinak enkapsulacije proteinaza i peptidaza u različitim tipovima lipozoma  
Table 5. Encapsulation efficiency of proteinases and peptidases in different types of liposomes

Enzim	Učinak enkapsulacije i tip lipozoma	% retencije	Literatura
Neutrased	1-2%(MLK) <sup>1</sup>	17	100
Rulactine	7% (MLK), 1% (MUK) <sup>2</sup> , 7.5% (REK) <sup>3</sup>	60, 41, 37	101
Neutrased	% REK		96
Corolase PN	11% (MLK), 14% REK, 4% MUK		97
Lactobacillus helveticus	19% (MLK), 17% REK	90	97
Neutrased	37% (DRK) <sup>4</sup>		102

<sup>1</sup>MLK = Multilamelarna kesica

<sup>2</sup>MUK - Mala unilamelarna kesica

<sup>3</sup>REK = Reverznom fazom evaporisana kesica

<sup>4</sup>DRK = Dehidrirana - rehidrirana kesica

Očigledno je (tabela 5) da uprkos atraktivnih prednosti korišćenja lipozoma za ubrzanje zrenja sira, industrijska aplikacija ove tehnike se još uvek suočava sa nekoliko problema. Učinak enkapsulacije varira u zavisnosti od sastava membrane lipozoma, ali korišćenje vezivnih molekula većeg afiniteta prema površinskoj fazi lipozoma vodi ubrzanju procesa zrenja sira i može doprineti povećanju stepena retencije lipozoma u siru.<sup>87</sup>

### 2.3.1.2. Proteaze

Izbor pogodnog proteolitičkog enzima za ubrzanje zrenja je od bitnog značaja za kvalitet sira. Razvijeni su brojni komercijalni preparati kiselih, neutralnih i alkalnih proteaza, peptidaza, bakterijskog ili fungalnog porekla čije dejstvo na ubrzanje zrenja različitih tipova sireva su ispitivali mnogi autori.

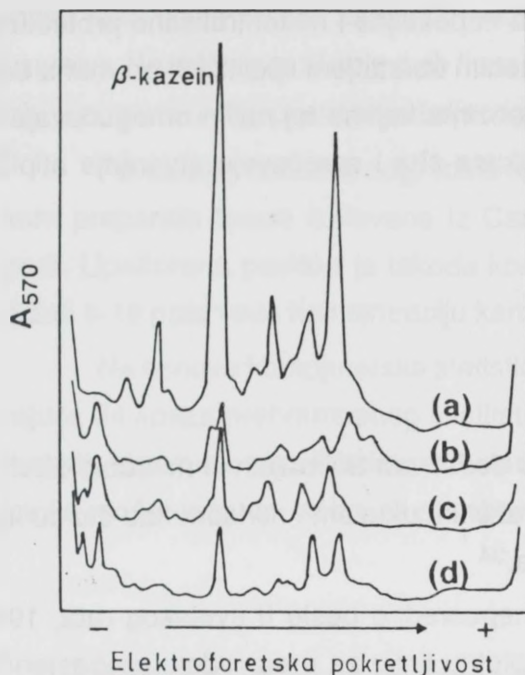
Neutralne proteaze su najpogodnije za ubrzanje zrenja dok se korišćenjem kiselih proteaza dobijaju lošiji rezultati zbog nastanka gorkih peptida.<sup>103</sup> Pojava gorkog ukusa pripisuje se peptidima nastalim tokom zrenja sira koji sadrže visok udeo aromatičnih i hidrofobnih rezidua aminokiselina koji pokazuju tendenciju akumulacije u siru kada je brzina njihove produkcije veća od brzine degradacije.<sup>104</sup>

U enzimski tretiranim sirevima serin proteinazom (Pro C i Pro-D-E) i metaloproteinazom (Neutrase),  $\beta$ -kazein se, kao što se sa PAG elektroforegrama vidi (slika 25), intenzivno degradira nakon 2 meseca zrenja dok ostaje intaktan u kontrolnom siru.<sup>105</sup> Prema tome, logično je da se uglavnom aspartatske, cistein ili metaloproteaze čiji je optimalni pH slabo kiseo ili neutralan, uspešno mogu koristiti za ubrzanje zrenja sira obzirom da je pH sira ~5.

Najnoviji rezultati ispitivanja ubrzanja zrenja sira Cheddar (najviše ispitivani sir) primenom savremene reverzne HPLC tehnike, pokazuju velike razlike u profilu peptida sira tretiranog smešom Neutrase i starter peptidaze *S. lactis* u odnosu na druga tri eksperimentalna sira<sup>106</sup> (I - Neutrase, II - Accelase, III - kontrola)

Kombinacijom ekstracelularne aminopeptidaze (*Brevibacterium linens*) i komercijalne metaloproteinaze (Neutrase) postiže se bolji efekat ubrzanja zrenja Cheddar sira nego ukoliko se enzim dodaje samostalno. Mada je aminopeptidaza nestabilna u kiseljoj sredini, pokazala se veoma stabilnom u siru, jer se aktivnost ovog enzima neznatno smanjila tokom 3 meseca zrenja.<sup>107</sup>





- a) netretirani kontrolni sir  
untreated control cheese
- b) sir tretiran metaloproteinazom  
Neutrase, 8,6 jedinica/kg gruša)  
cheese treated with metalloproteinase  
(Neutrase, 8,6 units/kg curd)
- c) sir tretiran serin proteinazom (Pro-C,  
26 jedinica/kg gruša)  
cheese treated with serine proteinase  
(Pro-C, 26 units/kg curd)
- d) sir tretiran serin proteinazom (Pro-D-E,  
26 jedinica/kg gruša)  
cheese treated with serine proteinase  
(Pro-D-E, 26 units/kg curd)

Slika 25. PAG elektroferogrami sira nakon 2 meseca zrenja<sup>105</sup>

Fig. 25. Polyacrylamide gel electropherograms of cheese after 2 months of ripening<sup>105</sup>

Dodatak enzima za ubrzanje zrenja: proteaze (Neutrase 1-5S) i peptidaze (Amino-peptidase DP-102) nema signifikantan uticaj na preživljavanje gram<sup>+</sup>, ali ima na gram<sup>-</sup> sekundarne bakterije u siru: *Staphylococcus auerus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Salmonella sp.* tokom 4 meseca zrenja sira.<sup>108</sup>

Dodatkom citrata inhibira se aktivnost komercijalnih fungalnih preparata proteaza i peptidaza izolovanih iz *Aspergillus oryzae*, što ima negativne implikacije na tok zrenja sira.<sup>109</sup>

Korišćenjem proteolitičkog enzima izolovanog iz *Bacillus subtilis-a* Novozym, u koncentraciji 10 i 20 g/1000 l mleka, postižu se dobri rezultati u ubrzanju zrenja Gruyere-a.<sup>110</sup>

Sirevi tretirani enzimima neutralnom proteazom (*B. subtilis*), kiselom proteazom (*Asp. oryzae*) i „heat-shocked“ kulturama (*Str. thermophilus* i *L. bulgaricus*) imaju tipičan ukus, miris i teksturu nakon 40 dana zrenja kao kontrolni Feta sir nakon 80 dana zrenja.<sup>104</sup>

Nema sumnje da efekat primene egzogenih proteaza za akceleraciju zrenja sira zavisi od vrste i količine enzima. Opasnost od nepoželjne i nekontrolisane proteolize u procesu zrenja sira može se otkloniti istovremenim ubrzanjem lipolitičkih promena dejstvom egzogenih lipaza, tj. dodatkom koktela enzima koji na taj način omogućavaju izbalansiranu pojavu karakteristične arome i ukusa sira i sprečavaju stvaranje atipične teksture.

### 2.3.1.3. Lipaze

Akceleracija lipolitičkih promena u siru dodatkom animalnih ili mikrobioloških lipaza uspešno se primenjuje kod sireva sa izraženim ukusom i mirisom kao što su italijanski tvrdi sirevi Romano, Provolone i Fontina.<sup>34</sup>

Primena lipolitičkih enzima otpočinje neposredno posle II svetskog rata, 1946. godine, kada je Farnham otkrio i razvio kompletnu liniju za proizvodnju pregasteričnih lipaza iz ovčijeg gastro-intestinalnog trakta.<sup>103, 111</sup> Glavna karakteristika ovih lipaza je njihova specifičnost, hidrolizuju masne kiseline kratkog i srednjeg lanca u trigliceridima dok su ostale lipaze ili nespecifične ili oslobađaju masne kiseline dugog lanca.<sup>111</sup>

Veće količine animalnih lipaza (jagnjeća i teleća esteraza) izazivaju užeglost sira zbog prisustva masnih kiselina kratkog lanca, dok mikrobiološka lipaza (*Mucor* spp.) stvara manju količinu slobodnih masnih kiselina i blaži užegao ukus.<sup>112</sup> Stoga je kod izbora lipaza veoma važno poznavati mehanizam njihovog delovanja na mlečnu mast i odrediti optimalnu koncentraciju koja neće izazvati neželjene organoleptičke promene sira..<sup>34</sup>

Nezadovoljavajući rezultati prvobitnih pokušaja primene lipaza za ubrzanje zrenja su verovatno, pored ostalog, posledica sirovine iz koje su se proizvodili preparati, odnosno kontaminiranosti drugim enzimima.<sup>113</sup>

Lipaza izolovana iz plesni *A. oryzae* preferencijalno hidrolizuje trigliceride oslobađajući masne kiseline sa C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> atoma za razliku od ranije korišćenih lipaza koje su ili primarno oslobađale buternu kiselinu (C<sub>4</sub> atoma) produkujući užegao ukus ili slobodne masne kiseline dužeg lanca (C<sub>12</sub> atoma ili više) koje daju sapunast ukus<sup>114</sup>

Prema poslednjim podacima<sup>115</sup>, hidrolitička razgradnja triglicerida lipazama animalnog i mikrobiološkog porekla vodi oslobađanju značajnih količina slobodnih masnih kiselina čiji sastav zavisi od porekla lipaze. Prema tome, animalne lipaze oslobađaju masne kiseline sa C<sub>4</sub> i C<sub>6</sub>-atoma, dok mikrobiološke lipaze (*Asp. niger*, *Mucor miehei*)

nisu pokazale nikakvu sklonost prema masnim kiselinama male ili velike molekulske mase tako da je sastav slobodnih masnih kiselina uglavnom isti kao kod netretiranih uzoraka. Različito ponašanje ovih lipaza u razvoju arome sira dozvoljava njihovu selekciju u primeni u cilju postizanja željenog optimalnog ukusa i mirisa proizvoda.<sup>115</sup>

Povećanje koncentracije metil-ketona kod sireva sa plesnima postiže se dodatkom preparata lipaze izolovane iz *Candida cylindracea* u mleko pre koagulacije ili u grušu. Lipolizirana pavlaka je takođe korišćena u tu svrhu. Eksperimentalni sirevi su sadržali 8-10 puta veću koncentraciju karbonilnih jedinjenja nego tradicionalni sir.<sup>116</sup>

Na osnovu kompjuterske statističke analize Kwak et al<sup>117</sup> su klasifikovali egzistirajuće 24 lipaze prehrambenog kvaliteta u 4 grupe u zavisnosti od količine oslobođenih masnih kiselina u simuliranim uslovima prirodne fermentacije proizvoda. Takva klasifikacija može da bude od koristi pri izboru optimalnog enzima za ubrzanje zrenja sira.

### 2.3.2. Kontrola temperature zrenja

Mada je povišenje temperature zrenja jedna od strateških metoda za ubrzanje zrenja sira, veoma je malo literaturnih podataka o tome poslednjih godina.

Primena povišene temperature zrenja nema zakonskih barijera i tehnički je jednostavno izvodljiva.<sup>86</sup>

Poznata je činjenica da sir mogo brže zri na višim temperaturama (>10°C) jer su na nižim temperaturama usporeni biohemijski procesi kao i rast i aktivnost bakterija prisutnih u siru.

Period zrenja Cheddar-a na temperaturi 15°C je 50% redukovan, a zrenjem na 13°C umesto na 8°C skraćen je za trećinu.<sup>118</sup>

Sadržaj PTA (fosforvolframska kiselina) - rastvorljivog N i slobodnih masnih kiselina se više od 90% povećava u tvrdom (Manchego) siru u procesu zrenja na 20°C umesto na 5°C.<sup>119</sup>

Kombinacijom povišene temperature zrenja (16° umesto 8°C), povećane populacije starter mutanta (Lac<sup>-</sup>, laktoza negativni i Prt<sup>-</sup>, proteaze negativni starteri) i dodatkom neutraza u sirni grušu redukuje se period zrenja sira za 50%.<sup>120</sup>

Uprkos prednostima, ova metoda ipak nema širu praktičnu primenu zbog povećanog rizika od neželjene mikrobiološke aktivnosti tokom zrenja na temperaturama višim od uobičajenih.

### 2.3.3. Dodatak modifikovanih startera

Ubrzanje zrenja sira primenom modifikovanih startera, podrazumeva ili menjanje uslova pripreme starter bakterija („heat“ i „freeze shocked“ ćelije) ili modifikaciju njihovog enzimskog balansa fizičkim, hemijskim ili genetskim putem.

Znatan progres je poslednjih godina postignut u genetskoj modifikaciji starter kultura koje se koriste u industriji mleka. Najnoviji pokušaji istraživača iz ove oblasti su sumarno prikazani u tabeli 6. Posebna pažnja je usmerena na genetsku modifikaciju starter bakterija u cilju dobijanja ne samo povećanog stepena zrenja sira već takode i razvoja bakteriofago-rezistentnih mikroorganizama i mehanizama za in vivo inhibiranje nepoželjnih mikroorganizama.<sup>87</sup>

Tabela 6. Primena genetskog inženjerstva za ubrzanje zrenja sira<sup>87</sup>

Table 6. Genetic engineering approaches to accelerate cheese ripening<sup>87</sup>

Ispitivani gen	Izvor gena	Verovatna uloga u zrenju sira kada je kloniran u bakterijama za sir
Površinska proteaza	Lactococcus cremoris	Ubrzava razgradnju proteina
Aminopeptidaza	Lactobacillus helveticus	U velikom broju slučajeva ubrzava razgradnju (eliminise pojavu gorkog ukusa)
Autolizini	Lactococcus lactis, L. helveticus	Pomaže lizu bakterija u siru u procesu zrenja oslobadajući intracelularne enzime u grušu
Lizozim	Kokoš (belance)	Ubrzava lizu (?)

Prema najnovijim podacima o primeni modifikovanih startera, ubrzanje zrenja Gouda-e postiže se direktnom inokulacijom Lac<sup>-</sup> mutanta Lactococcus lactis subsp. cremoris u mleko. Gorak ukus sira nije konstatovan. Stepem proteolize izražen preko odnosa rastvorljivi N/ukupan N i neproteinski N/ukupan N je veći kod eksperimentalnih sireva nego kod kontrolnih.<sup>121</sup>

Signifikantno povećanje proteolize u Cheddar siru je postignuto korišćenjem „freeze shocked“ ćelija L. casei i Pediococcus, dok nema razlike u proteolizi između sireva tretiranih liofiliziranim ekstraktima nekoliko mikroorganizama: Propionibacterium

shermanii, *Pediococcus*, *B. linens*, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *L. casei* i kontrolnog sira.<sup>122</sup>

## 2.4. PRIMENA ULTRAFILTRACIJE U TEHNOLOGIJI SIRA

Pronalaskom prvih membrana izrađenih od acetata celuloze (Loeb i Sourirajan, 1959. godine)<sup>123</sup> i njihovim usavršavanjem (otkriće asimetričnih membrana 1964. godine<sup>124</sup>) otpočela su istraživanja mogućnosti korišćenja ultrafiltracije (UF) u prehrambenoj industriji. Praktično, proces membranske filtracije je prvi put primenjen u industriji šećera 1965. godine,<sup>125</sup> ali je do danas po obimu najveća i najvažnija aplikacija u industriji prerade mleka, posebno u tehnološkom procesu proizvodnje koncentrata proteina surutke i sira.

Koncept proizvodnje sira iz UF retentata utemeljen je patentom grupe francuskih naučnika Maubois, Mocquot i Vassal (MMV postupak) još 1969. g.<sup>1</sup>

Tokom proteklih više od dvadeset godina proces ultrafiltracije je ogromno evoluirao kako u razvoju membrana (hemijski i temperaturno rezistentne), modula, tehnoloških procesa tako i u kvalitetu i asortimanu proizvoda.<sup>4, 126</sup>

Zahvaljujući značajnom progresu u dizajnu sistema za ultrafiltraciju danas se primenom ove metode koncentrisanja i frakcionisanja proizvode različiti tipovi sireva.

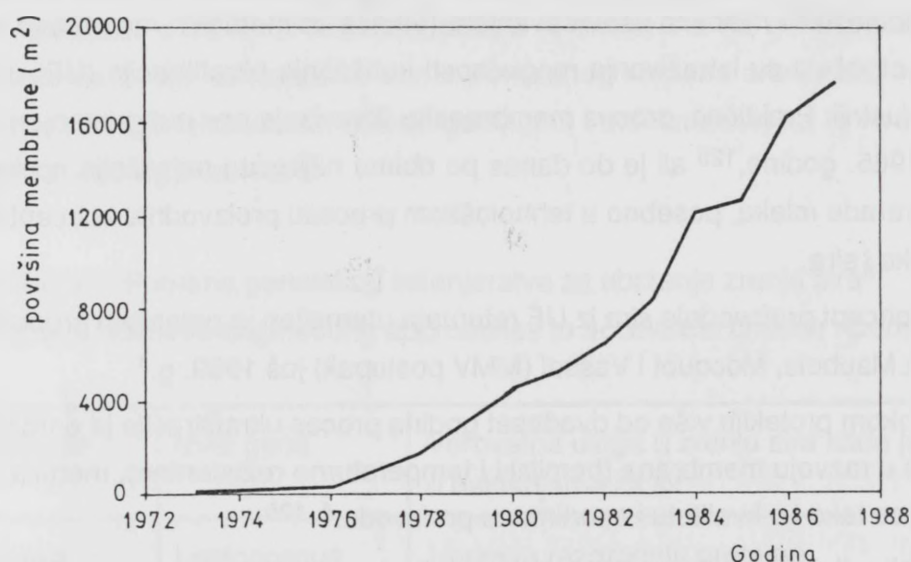
U konvencionalnom procesu proizvodnje sira sa surutkom se gubi oko 25% ukupnih proteina mleka i oko 10% mlečne masti, što predstavlja iskorišćenje 75% proteina, odnosno 90% mlečne masti. Nasuprot tome, primenom UF tehnike, iskorišćenje proteina je prosečno 95% (max 99%<sup>127</sup>), a mlečne masti 100%, što u odnosu na klasičnu tehnologiju iznosi povećanje od 20 odnosno 10%, respektivno.<sup>4</sup>

Prema podacima iz 1988. godine oko 3% ukupne produkcije sira u svetu, ili 400000 t sira godišnje, proizvede se primenom ultrafiltracije<sup>2</sup>. Na slici 26. prikazana je ukupna površina UF membrana (m<sup>2</sup>) u instaliranim industrijskim postrojenjima za proizvodnju sira u periodu 1973-1987. g.<sup>2</sup>

Osnovne prednosti primene ultrafiltracije u tehnologiji sira su:<sup>2, 4, 128</sup>

- povećanje randmana sira 10-30%;
- smanjenje gubitka kazeina;
- smanjenje potrošnje sirila i starter kulture (do 50%);
- smanjenje gubitka mlečne masti (ispod 2%);

- ušteda radne snage;
- kontinualan proces;
- visok stepen automatizacije;
- produženje roka trajanja proizvoda zbog visokih sanitarnih uslova proizvodnje;
- nutritivna vrednost proizvoda povećana zbog inkorporacije serum proteina;
- uniforman kvalitet proizvoda.

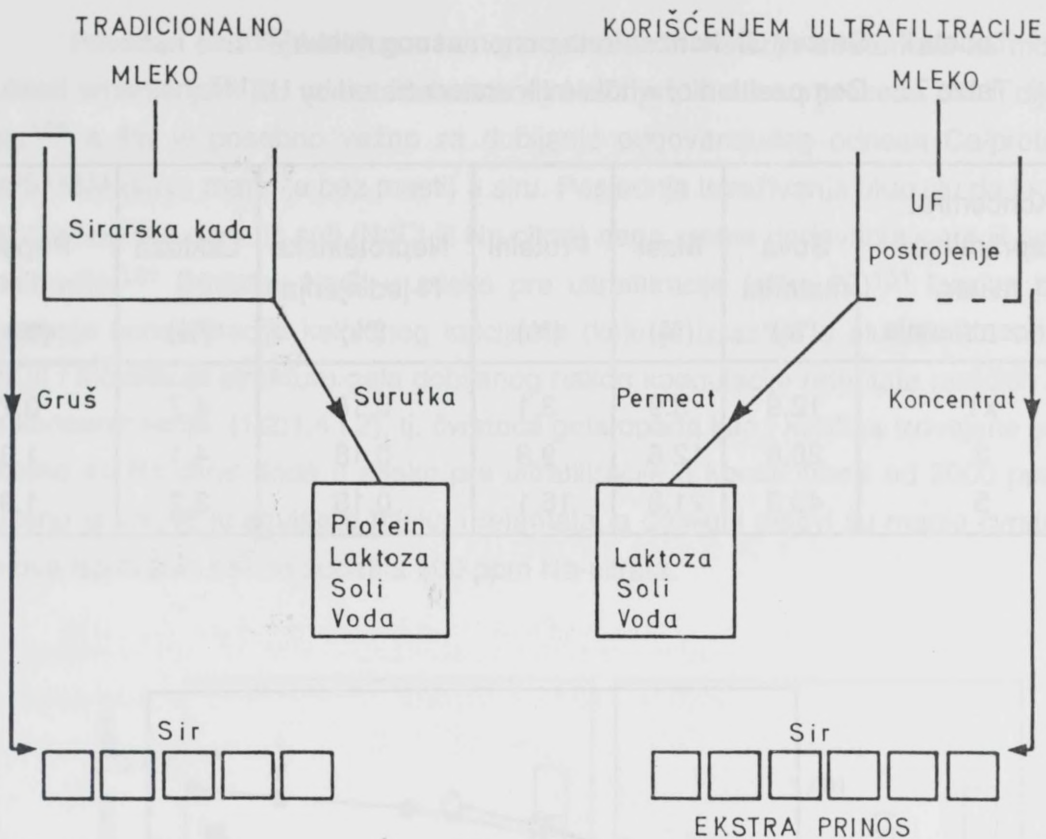


Slika 26. Sumarni prikaz ukupne površine UF membrana (m<sup>2</sup>) u instaliranim i industrijskim postrojenjima za proizvodnju sira u periodu 1972-1987.<sup>2</sup>

Fig. 26. Summarized scale of membrane area for cheese making in square metres over the period 1973-1987.<sup>2</sup>

#### 2.4.1. Uticaj ultrafiltracije na sastav i osobine retentata

Osnovna uloga UF postrojenja u tehnologiji sira je dobijanje retentata određenog sadržaja suve materije, odnosno fiksnog sastava komponenata, i visokog mikrobiološkog kvaliteta<sup>129</sup>, da bi bilo moguće proizvesti sir relativno uniformnog kvaliteta i poboljšanog randmana<sup>125</sup> (slika 27).



Slika 27. Primena ultrafiltracije u tehnologiji sira - inkorporiranje proteina surutke daje povećan randman sira<sup>127</sup>

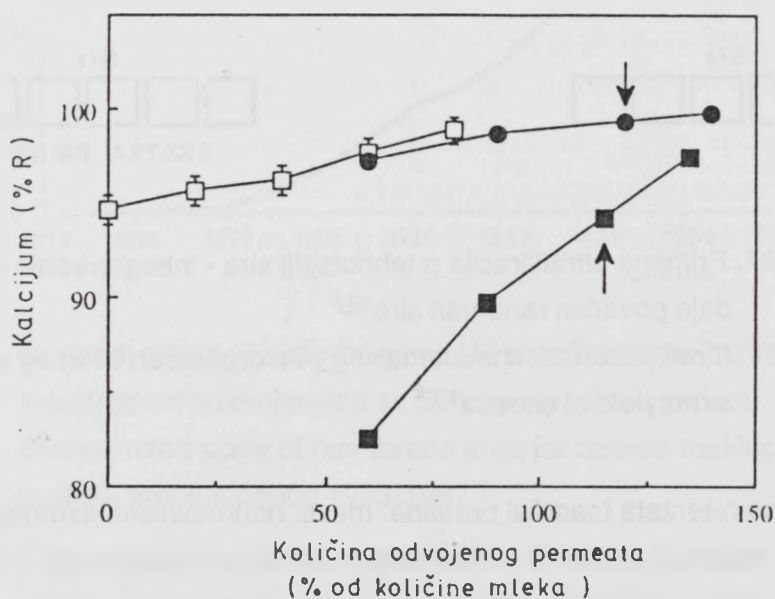
Fig. 27. Ultrafiltration for cheesemaking - incorporation of whey proteins giving extra yield of cheese<sup>127</sup>

Sastav retentata (sadržaj proteina, masti, neproteinskih azotnih materija, laktoze i mineralnih materija) zavisi od performansi sistema za ultrafiltraciju. U tabeli 7, kao primer, dat je sastav retentata dobijenog ultrafiltracijom mleka na temperaturi 50°C, pri različitim stepenima koncentrisanja, na pilot plant postrojenju sa tubularnim membranama.<sup>127</sup> Retencija konstituenata mleka tokom ultrafiltracije zavisi od stepena koncentrisanja, primenjene dijafiltracije ili prethodne acidifikacije mleka. Prema najnovijim istraživanjima<sup>130</sup>, retencija laktoze, natrijuma, fosfora i riboflavina je veća tokom dijafiltracije nego tokom ultrafiltracije neacidifikovanog mleka. Dijafiltracijom acidifikovanog mleka opada retencija kalcijuma, fosfora, natrijuma i riboflavina u komparaciji sa dijafiltracijom neacidifikovanog mleka. Retencija kalcijuma varira od 82 do 99% (prosečno 96.6%) pri čemu je uticaj dijafiltracije manje izražen nego acidifikacije (slika 28).

Tabela 7. Sastav UF koncentrata punomasnog mleka<sup>127</sup>

Table 7. Composition of whole milk concentrated by UF<sup>127</sup>

Koncentrat Zapreminski faktor koncentrisanja	Suva materija (%)	Mast (%)	Proteini (%)	Neproteinska N-jedinjenja (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)
x1	12.9	3.9	3.1	0.18	4.7	0.77
3	28.6	12.6	9.8	0.18	4.1	1.3
5	43.3	21.8	16.1	0.18	3.2	1.9

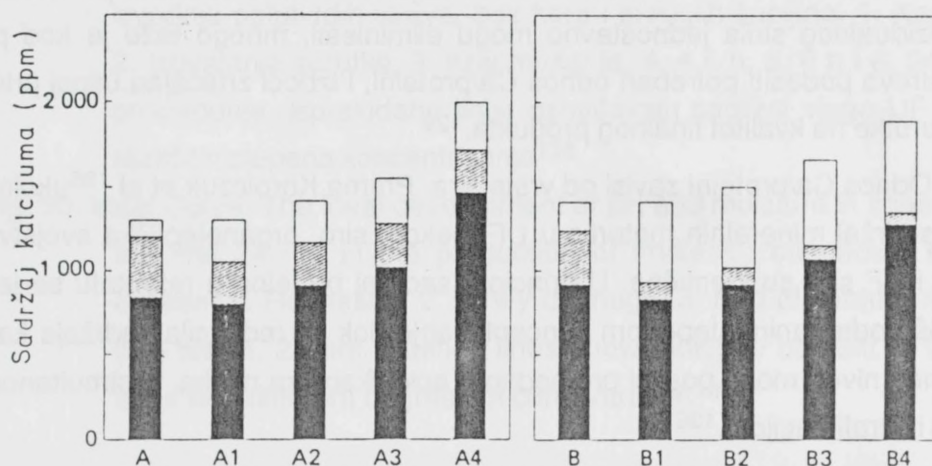


Slika 28. Procenat retencije (%R) Ca pri pH = 6,7: bez dijafiltracije (□), sa 60% dijafiltracije (●) i 55% dijafiltracije (■). Dijafiltracija je otpočela nakon odvajanja 60% permeata. Strelice pokazuju kraj dijafiltracije<sup>130</sup>

Fig. 28. Percentage retention (%R) of Ca at pH 6,7 with no diafiltration (□), pH 6,7 with 60% diafiltracion (●) and pH 5,8 with 55% diafiltration (■). Diafiltration started at 60% permeate removed. Arrows mark the end of diafiltration<sup>130</sup>



Povećan sadržaj kalcijuma i drugih mineralnih materija u retentatu se može regulisati smanjenjem pH mleka ili dodatkom NaCl pre ili u toku procesa UF ili dijafiltracije,<sup>129</sup> a što je posebno važno za dobijanje odgovarajućeg odnosa Ca/proteini ili Ca/SMBM (suve materije bez masti) u siru. Poslednja istraživanja ukazuju da je mnogo važnija količina dodatih soli (NaCl ili Na-citrat) nego vreme dodavanja - pre ili posle ultrafiltracije.<sup>131</sup> Dodatak NaCl u mleko pre ultrafiltracije (slika 29)<sup>131</sup> izaziva blago opadanje koncentracije koloidnog kalcijuma (koje je izrazitije u slučaju 2% nego 1% NaCl) i modifikuje strukturu gela dobijenog nakon koagulacije retentata različitih stepena koncentrisanja (1.2;1.4 i 2), tj. čvrstoća gela opada kao i količina izdvojene surutke. Ukoliko se Na-citrat doda u mleko pre ultrafiltracije u koncentraciji od 2000 ppm produženo je vreme koagulacije mleka i retentata, a dobijeni gelovi su manje čvrstoće od gelova ispitivanih nakon dodatka 500 ppm Na-citrata.



Slika 29. Distribucija kalcijuma u mleku (A, B), mleku sa 1% (A1) i 2% (B1) natrijum hlorida i retentatima mleka sa 1% (A2, A3, A4) i 2% (B2, B3, B4) natrijum hlorida<sup>131</sup>

Fig. 29. Calcium distribution in milk (A,B), milk with 1% (A1) and 2% (B1) sodium chloride and retentates obtained from milk with 1% (A2, A3, A4) and 2% (B2, B3, B4) sodium chloride<sup>131</sup>

Povećanje sadržaja proteina i koloidnog Ca-fosfata u retentatu u odnosu na nativno mleko, proporcionalno stepenu koncentrisanja<sup>132</sup>, izaziva povećanje pufernog kapaciteta retentata odnosno pH vrednosti. Relativno velika količina mlečne kiseline treba da se proizvede da bi se dobila željena pH vrednost retentata. Sposobnost starter

kultura da proizvode odgovarajući stepen kiselosti u retentatu varira, mada se njihovim pravilnim izborom može postići željeni kvalitet sira.<sup>129</sup>

Značajno povećanje viskoziteta retentata u odnosu na mleko otežava pravilnu distribuciju koagulišućeg enzima i starter kulture što može da se negativno odrazi na teksturu sira. Zbog otežanog hlađenja moguća je i mikrobiološka kontaminacija retentata.

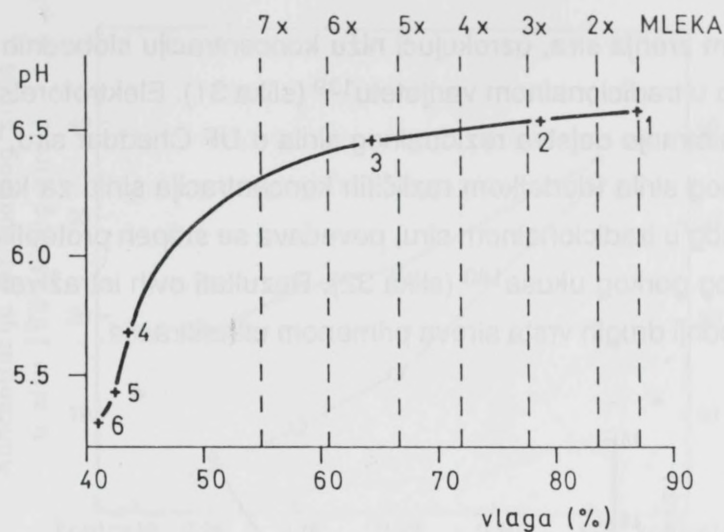
Tokom procesa ultrafiltracije do izvesnog stepena se redukuje veličina masnih globula i razara njihova membrana u zavisnosti od karakteristika UF postrojenja.<sup>127, 133</sup> Istovremeno dolazi i do delimične denaturacije serum proteina.<sup>1129</sup>

Koncentracija laktoze u retentatu se može relativno jednostavno redukovati primenom dijafiltracije čime se postiže kontrola pH vrednosti sira proizvedenog primenom ultrafiltracije.<sup>129; 134</sup>

Prema tome, dok se razlike u sadržaju rezidualne laktoze, pH vrednosti kao i nivo rezidualnog sirila jednostavno mogu eliminisati, mnogo teže je kod polutvrdih i tvrdih sireva podesiti potreban odnos Ca/proteini, i izbeći značajan uticaj prisutnih proteina surutke na kvalitet finalnog produkta.<sup>129</sup>

Odnos Ca/proteini zavisi od vrste sira. Prema Korolczuk et al.<sup>135</sup> ukoliko se kontroliše sadržaj mineralnih materija u UF mekom siru, organoleptička svojstva tradicionalnog i UF sira su identična. U principu, sadržaj proteina u retentatu se jednostavno kontroliše odabranim stepenom koncentrisanja dok se redukcija sadržaja kalcijuma do potrebnog nivoa može postići prethodnom acidifikacijom mleka, ili simultanom fermentacijom i ultrafiltracijom.<sup>136</sup>

Ukoliko se ultrafiltracija izvodi pri pH = 6.7 dobijeni sirevi imaju veći sadržaj mineralnih materija nego klasični analozi, jer se tokom tradicionalnog postupka kontinualno snižava pH vrednost zbog odvajanja surutke i sa njom intenzivno odlaze mineralni sastojci. Do koje vrednosti treba redukovati pH retentata pre ultrafiltracije a da ne izazove preteranu demineralizaciju zavisi od vrste sira. Na bazi podataka dobijenih istraživanjem tradicionalnih sireva ustanovljena je i idealna relacija između pH vrednosti i ekspulzije surutke (sadržaj vlage) u pojedinim fazama procesa proizvodnje polutvrdog sira sa okruglim okcima na preseku i bez kore, i konstruisana tzv. idealna kriva (slika 30). Važno je istaći da izgled idealne krive zavisi od vrste sira, a od posebnog značaja je u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva.<sup>136</sup> Korektan odnos Ca/proteini je od presudne važnosti za sposobnost istezanja i topljenja sirnog testa<sup>129</sup> u procesu proizvodnje sireva iz grupe Pasta Filata. Propusti kod podešavanja sadržaja mineralnih materija uzrokuju stvaranje depozita kalcijum laktata u zreom UF siru.<sup>137</sup>



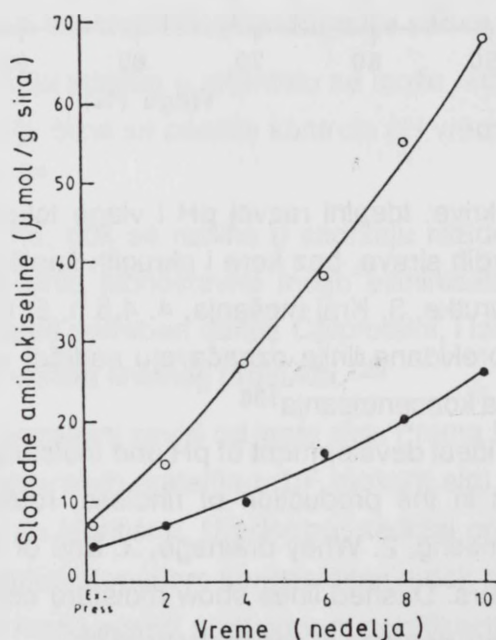
Slika 30. Izgled idealne krive: Idealni razvoj pH i vlage tokom prva 24 h proizvodnje polutvrdih sireva, bez kore i okruglih šupljina. 1. Koagulacija, 2. Izdvajanje surutke, 3. Kraj mešanja, 4. 4,5 h, 5. 6 h i 6. 24 h nakon proizvodnje. Isprekidane linije označavaju sadržaj vlage UF retentata različitih stepena koncentrisanja<sup>136</sup>

Fig. 30. Ideal Curve: The ideal development of pH and moisture in cheese during the first 24 hrs in the production of rindless, roundholed semi-hard cheese: 1. Renneting, 2. Whey drainage, 3. End of stirring, 4. 4.5 hrs, 5. 6 hrs, 6. 24 hrs. Dashed lines show moisture content of UF retentates with different degrees of concentration<sup>136</sup>

Uticaj proteina surutke na karakteristike tradicionalnih sireva je minimalan jer je njihov udeo kod većine sireva veoma mali (npr. 0.3% u Cheddar siru).<sup>138</sup> Međutim, uticaj proteina surutke na osobine UF sireva je još uvek predmet istraživanja brojnih naučnika. Glavni konstituenti proteina surutke  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -lg) i  $\alpha$ -laktoglobulin ( $\alpha$ -la) čine u proseku oko 60% ekstra azotnih materija koje tokom ultrafiltracije prelaze u sir,<sup>127</sup> a ostatak su krvni serum albumin, imunoglobulini i frakcije proteoza-peptona.<sup>138</sup> Pouzdano je utvrđeno da inkorporacija serum proteina ne utiče na tok zrenja mekih sireva, ali nivo i sastav ovih proteina kao i oblik u kojem se nalaze (denaturisani ili nendenaturisani) su od posebnog značaja za kvalitet polutvrdih i tvrdih sireva.<sup>129</sup>

Nendenaturisani proteini surutke inhibiraju dejstvo himozina i drugih proteaza, starter bakterija i plazmina. Ponašaju se kao punioci dajući UF sireve, mekše i nežnije teksture, ometaju formiranje trodimenzionalnog kazeinskog matriksa i čak ga razrušavaju. U nekim slučajevima, frakcija proteina surutke  $\beta$ -lg utiče na tok biohemijских

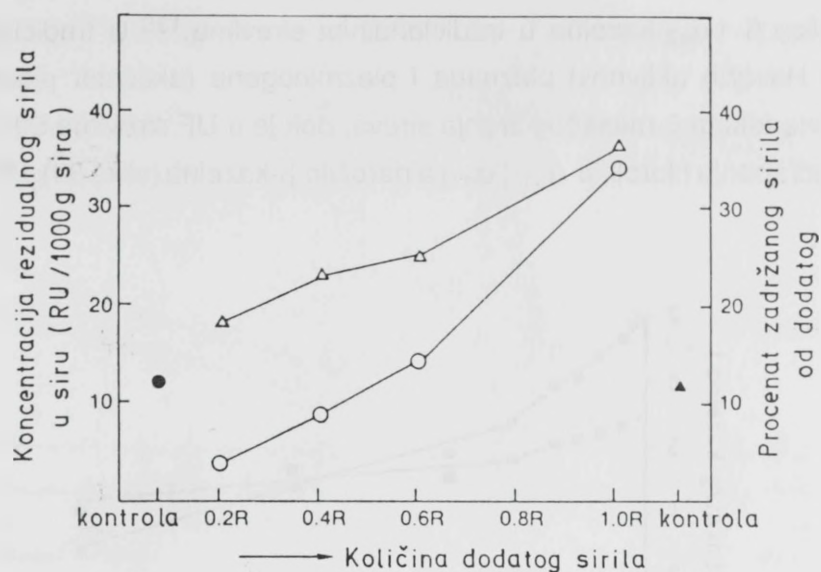
procesa tokom zrenja sira, uzrokujući nižu koncentraciju slobodnih aminokiselina u UF sirevima nego u tradicionalnom varijetetu<sup>139</sup> (slika 31). Elektroforetskim ispitivanjima je potvrđeno inhibiranje dejstva rezidualnog sirila u UF Cheddar siru.<sup>140</sup> Povećanjem nivoa rezidualnog sirila (dodatkom različitih koncentracija sirila za koagulaciju retentata) iznad utvrđenog u tradicionalnom siru, povećava se stepen proteolize UF sira bez pojave nepoželjnog gorkog ukusa<sup>140</sup> (slika 32). Rezultati ovih istraživanja se mogu primeniti i u proizvodnji drugih vrsta sireva primenom ultrafiltracije.



Slika 31. Akumulacija slobodnih amino kiselina u Cheddar siru proizvedenom iz normalnog i UF mleka. ○, Normalni sir sa 2% S. cremoris E8, ●, UF sir sa 4% S. cremoris E8<sup>139</sup>

Fig. 31. The accumulation of free amino acids in Cheddar cheese manufactured from normal and ultrafiltered milk. ○, N-cheese with 2% S. cremoris E8, ● UF-cheese with 4% S. cremoris E8.<sup>139</sup>

Pretpostavlja se da proteini surutke indirektno utiču na proces zrenja sira preko tzv. efekta razblaženja tj. snižavanja udela kazeina u proizvodu. Pošto je kazein izvor nastanka mnogih aromatičnih jedinjenja, proteini surutke svojim prisustvom limitiraju osetljivost kazeina na dejstvo enzima tokom zrenja. Druga alternativa je da imunoglobulini i frakcije proteoza-peptona maskiraju efekat proteolize u UF sirevima, vezujući nastale komponente koje doprinose mirisu i ukusu sira.<sup>129</sup>



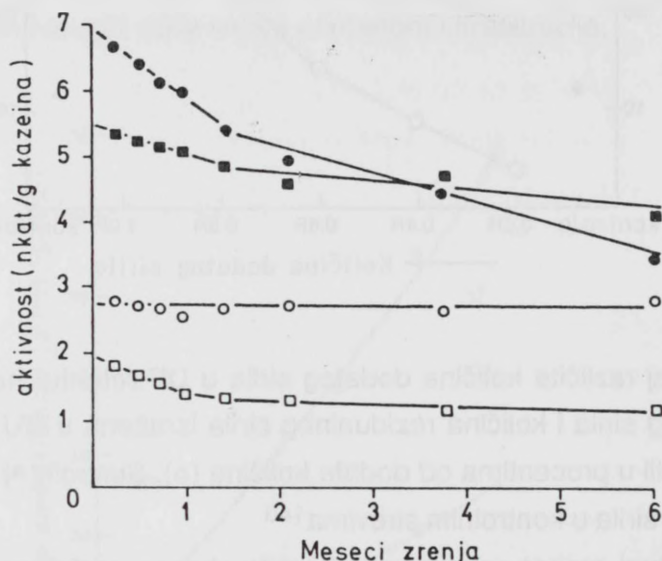
Slika 32. Uticaj različite količine dodatog sirila u UF retentat na sadržaj rezidualnog sirila i količina rezidualnog sirila izražena u RU jedinicama (o) u siru ili u procentima od dodate količine ( $\Delta$ ). Simboli (●) i (▲) označavaju nivo sirila u kontrolnim sirevima<sup>140</sup>

Fig. 32. Residual rennet concentration (o) in cheese and percentage of added rennet retained ( $\Delta$ ) in the cheese made from UF retentate with various levels of rennet addition. The levels in control cheeses are indicated by closed symbols (●, ▲)<sup>140</sup>

Tokom procesa ultrafiltracije dolazi do denaturacije serum proteina (5-50% ili 75-90% u slučaju dijafiltracije<sup>129</sup>), pri čemu se oslobađaju -SH i -COOH-grupe. Nastale -COOH-grupe vezuju Ca-jone dajući glatku strukturu nekim sirevima (UF Feta)<sup>138</sup>. Dok je prisustvo denaturisanih proteina surutke poželjno kod nekih UF sireva, kod drugih izaziva neželjene efekte. Otežano istezanje sirnog testa i smanjena sposobnost topljenja UF sireva (Mozzarella i Havarti) i sirne baze su posledica i denaturacije serum proteina.<sup>129</sup>

Prisustvo denaturisanih proteina surutke značajno menja tok zrenja i randman polutvrdih i tvrdih UF sireva.<sup>138</sup> Pokušaji poboljšanja randmana UF sira prethodnim zagrevanjem (60-80°C, 5 min ili 90°C, 15 s) koncentrata različitih stepena koncentrisanja nisu dali očekivane rezultate jer termički tretman negativno utiče na sastav i senzorne karakteristike Cheddar sira.<sup>99, 141, 142, 143</sup> Randman UF sira u direktnoj je vezi sa intenzitetom termičkog tretmana koji utiče na gubitak suve materije mleka sa surutkom i količinu zadržane vode u siru.<sup>138</sup> Denaturisani  $\beta$ -Ig inhibira plazmin koji je odgovoran

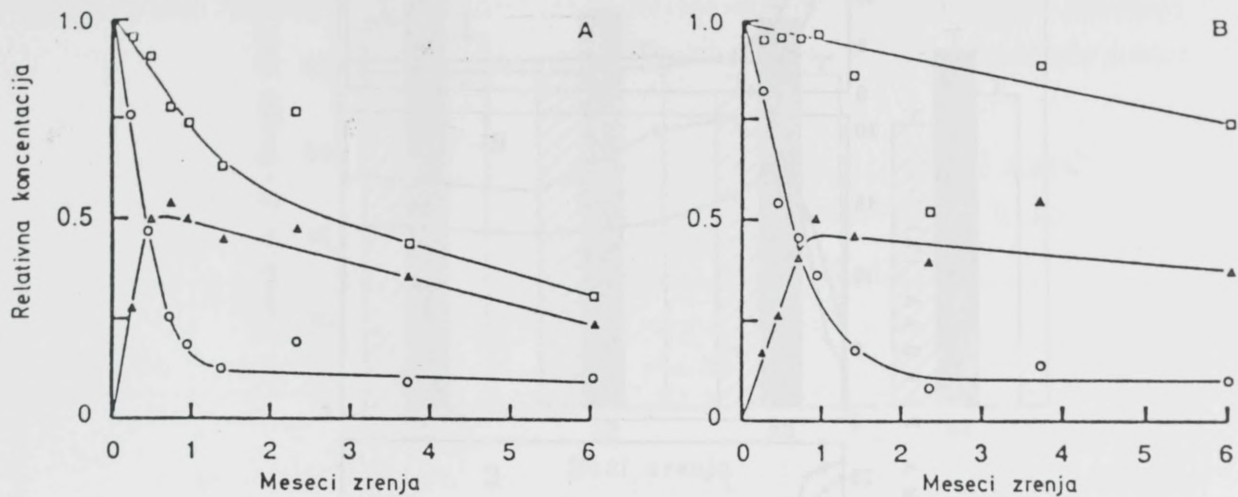
za hidrolizu  $\beta$ - i  $\alpha_{s2}$ -kazeina u tradicionalnim sirevima.<sup>138</sup> U tradicionalnim sirevima (Danbo, Havarti) aktivnost plazmina i plazminogena (aktivator plazmina) je približno konstantna tokom 6-mesečog zrenja sireva, dok je u UF sirevima 50% manja (slika 33) izazivajući sporiju hidrolizu  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s11}$  a naročito  $\beta$ -kazeina (slika 34).<sup>144</sup>



Slika 33. Stabilnost plazmina i plazminogena tokom zrenja tradicionalnog i UF sira. Svaka tačka predstavlja prosek od 6 uzoraka sireva, 3 Danbo i 3 Havarti. Plazmin: tradicionalni sir (○) i UF sir (□). Plazminogen: tradicionalni sir (●) i UF sir (■)<sup>144</sup>

Fig. 33. Stability of plasmin and plasminogen during ripening of traditional and UF cheese. Each point represents an average of 6 cheeses, 3 Danbo and 3 Havarti. Plasmin: traditional cheese (○) and UF cheese (□). Plasminogen: traditional cheese (●) and UF cheese (■)<sup>144</sup>

Hidroliza  $\alpha_{s1}$ -kazeina i  $\alpha_{s11}$ -peptida u Danbo i Havarti sirevima zaostaje oko 2 nedelje u odnosu na sireve proizvedene klasičnim postupkom. Primenom UF procesa 20-40% manje hidrolizuje  $\beta$ -kazein od  $\gamma$ -kazeina. Sadržaj ovih proteina i odnos  $\gamma/\beta$ -kazein je u značajnoj korelaciji sa sadržajem rastvorljivog N tokom zrenja, dok je samo odnos  $\gamma/\beta$ -kazein u korelaciji sa organoleptičkim kvalitetom sireva.<sup>145</sup> Relativni sadržaj  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -kazeina i  $\alpha_{s11}$ -peptida tokom zrenja tradicionalnih i UF sireva prikazan je na slici 35.

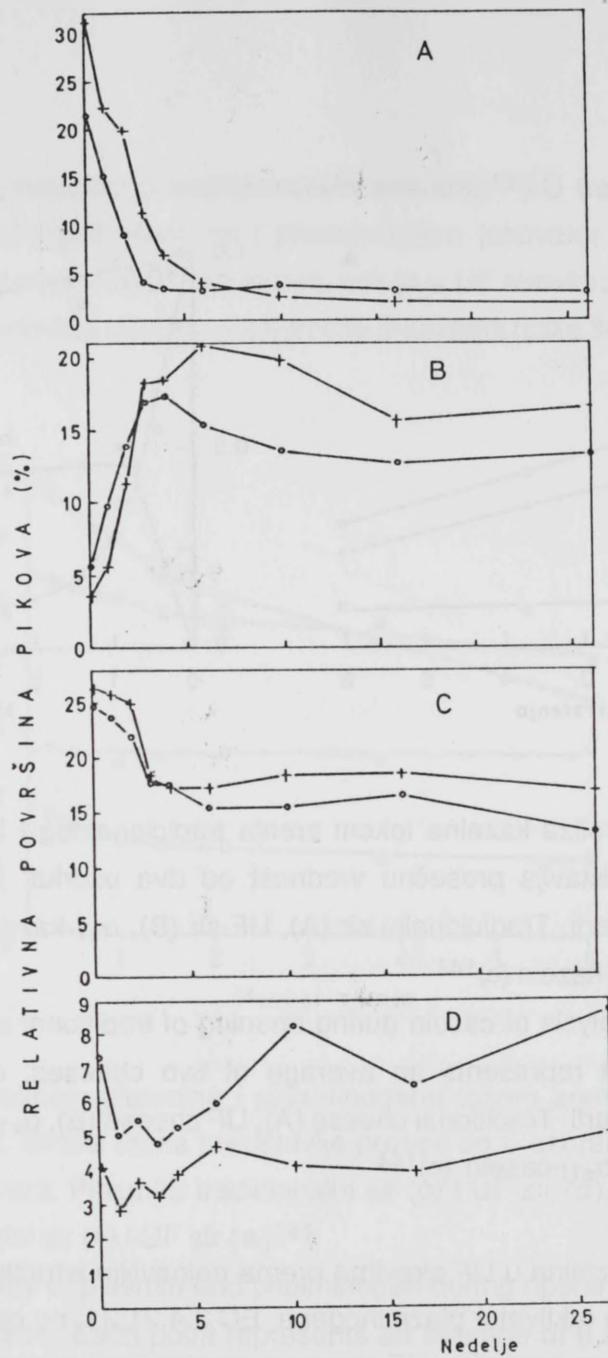


Slika 34. Hidroliza kazeina tokom zrenja tradicionalnog i UF sira. Svaka tačka predstavlja prosečnu vrednost od dva uzorka, jedan Danbo i jedan Havarti. Tradicionalni sir (A), UF sir (B),  $\alpha_{s1}$ -kazein (o),  $\beta$ -kazein (□) i  $\alpha_{s11}$ -kazein ( $\Delta$ )<sup>144</sup>

Fig. 34. Hydrolysis of casein during ripening of traditional and UF cheese. Each point represents an average of two cheeses, one Danbo and one Havarti. Traditional cheese (A), UF cheese (B),  $\alpha_{s1}$ -casein (o),  $\beta$ -casein (□),  $\alpha_{s11}$ -casein ( $\Delta$ )<sup>144</sup>

Aktivnost plazmina u UF sirevima prema najnovijim istraživanjima, se povećava dodatkom urokinaze (aktivator plazminogena, EC 3.4.21.31, ne cepa kazein) više nego dva puta u odnosu na kontrolne UF sireve, a samim tim i degradacija  $\beta$ -kazeina.<sup>146</sup> Razlike u sadržaju intaktnog  $\beta$ -kazeina tokom zrenja konvencionalnih i UF sireva, sa i bez dodatka urokinaze date su na slici 36.

Ubrzanje proteolize UF sireva se pokušava, u poslednje vreme, postići dodatkom različitih proteolitičkih i lipolitičkih enzima samih ili u kombinaciji sa modifikovanim starterima<sup>97, 98, 99</sup> (obrađeno u poglavlju 2.3).



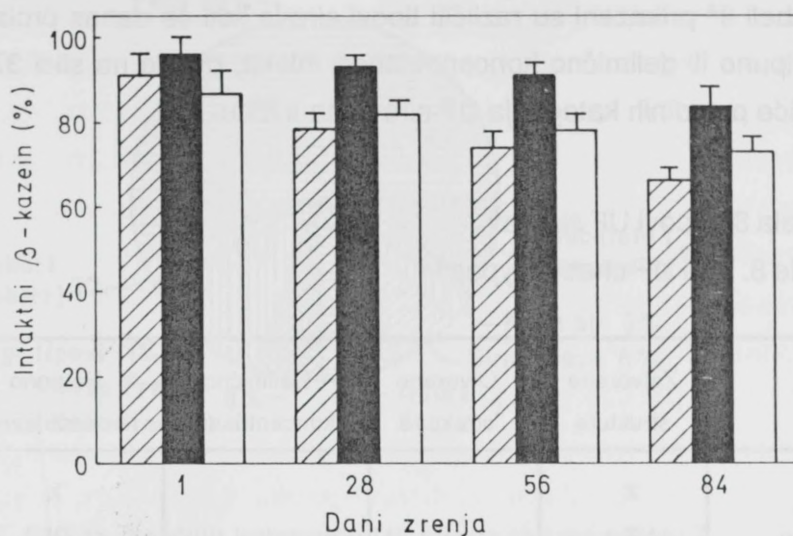
Slika 35. Relativni sadržaj  $\alpha_{s1}$ - (A),  $\beta$ - (B) i  $\gamma$ -kazeina (C) i  $\alpha_{s11}$ - peptida (D) tokom zrenja sira:<sup>145</sup>

- - tradicionalni Danbo, Havarti
- + - UF Danbo i UF Havarti

Fig. 35. Relative contents of  $\alpha_{s1}$ - (A),  $\beta$ - (B) and  $\gamma$ - casein (C) and  $\alpha_{s11}$ - peptide (D) during cheese ripening<sup>145</sup>

- - Traditional Danbo, Havarti
- + - UF Danbo and UF Havarti





Slika 36. Procenat intaktnog  $\beta$ -kazeina tokom 3 meseca zrenja tradicionalnog sira, UF kontrolnog sira i UF sireva sa dodatkom urokinaze određen skeniranjem elektroforetskih gelova na denzitometru. Svaka tačka predstavlja presek od četiri uzorka, dva Havarti i dva Saint-Paulin sira<sup>146</sup>

Fig. 36. Percentage of  $\beta$ -casein remaining intact during 3-mo ripening of traditional cheese, UF control cheese and UF cheese with added urokinase as determined by densitometric scanning of electrophoretic gels. Each point represents the mean of four cheeses, two Havarti and two Saint-Paulin<sup>146</sup>

#### 2.4.2. Postupci za proizvodnju sira iz UF retentata

Obzirom na sadržaj proteina surutke, UF sirevi se razlikuju po hemijskom sastavu od tradicionalnih sireva. Primenom UF tehnike, danas se u principu mogu proizvesti 3 osnovne grupe sireva:<sup>4</sup>

1. Identični ili uglavnom identični tradicionalnim sirevima
2. Razlikuju se od tradicionalnih ali mogu da se prihvate kao tradicionalni tipovi
3. Potpuno novi proizvodi, prilagođeni za tradicionalan ili netradicionalan način upotrebe.

U tabeli 8<sup>4</sup> prikazani su različiti tipovi sireva koji se danas proizvode ultrafiltracijom iz potpuno ili delimično koncentrisanog mleka, dok je na slici 37<sup>2</sup> dato procentualno učešće pojedinih kategorija UF sireva na tržištu.

Tabela 8. Tipovi UF sireva<sup>4</sup>

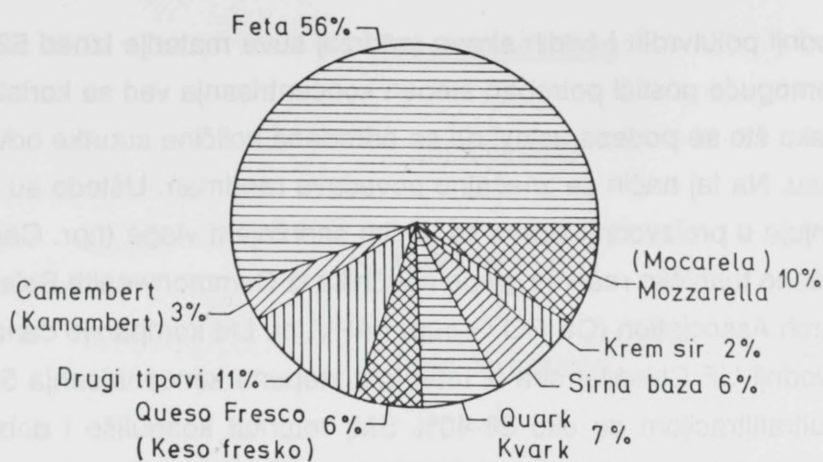
Table 8. The UF cheese types<sup>4</sup>

Tip sira	Zatvorene strukture	Otvorene strukture	Delimično koncentrisanje	Potpuno koncentrisanje	UF + evaporacija
Kvark	X			X	
Pate Fraiche	X			X	
Krem sir	X			X	
Cast Feta	X			X	
Domiat	X			X	
Ricotta	X			X	
Sirna baza	X			X	X
Structure Feta		X	X		
Mozzarella	X	X	X		
Questo Fresco		X	X		
Quartiolo		X	X		
Blue Cheese		X	X		
Havarti/Tilsit		X	X		
Danbo/Gouda/Edam	X	X			
Američki varijeteti	X	X	X		

Sumirajući dosadašnje rezultate procesa ultrafiltracije u tehnologiji sira, generalno postoje 4 postupka:<sup>136, 147</sup>

1. MMV ili potpuno koncentrisanje (5-7 stepen koncentrisanja)
2. Kombinacija UF (4-6 stepen koncentrisanja) i izdvajanje surutke
3. Kombinacija UF (do 5 stepen koncentrisanja) i evaporacija
4. LCR (Low Concentrated Retentate) ili delimično koncentrisanje ( $\leq 2$  stepen koncentrisanja)

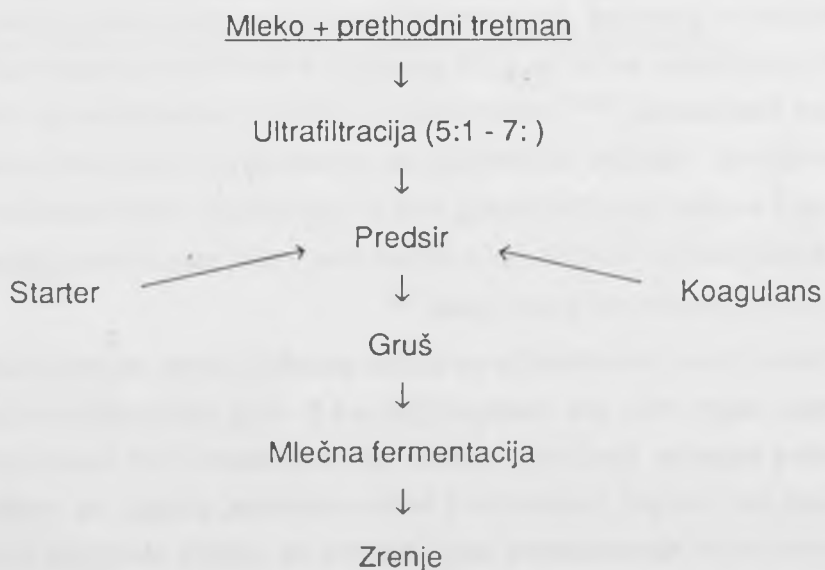
MMV postupak je sinonim za početak primene ultrafiltracije u proizvodnji sira. Camembert je jedan od prvih sireva proizveden ovim postupkom.<sup>1</sup> Na slici 38<sup>125</sup> prikazan je simplificiran MMV postupak. MMV postupkom se vrši koncentrisanje mleka



Slika 37. Prikaz različitih kategorija UF sireva (%) na tržištu <sup>2</sup>

Fig. 37. Different categories of UF-cheese marketed expressed in percentage<sup>2</sup>

ultrafiltracijom do krajnjeg sadržaja suve materije u gotovom proizvodu (full concentration). Danas se primenjuje u proizvodnji sireva čiji sadržaj suve materije ne prelazi 50-52% a sadržaj masti u suvoj materiji 45-50%.<sup>148</sup> To su uglavnom sveži, krem sirevi i slični sirevi sa kratkim periodom zrenja (UF Quarg, UF Ricotta, UF Feta, više od 100000 t/godišnje, <sup>123</sup> UF Cast Feta, UF Domiati, UF sirevi sa plesnima itd.)



Slika 38. MMV postupak za proizvodnju UF sira<sup>125</sup>

Fig. 38 . MMV Ultrafiltration cheese making procedure<sup>125</sup>

U proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva (sadržaj suve materije iznad 52%) MMV postupkom je nemoguće postići potreban stepen koncentrisanja već se koristi dodatno koncentrisanje tako što se podese uslovi da se određena količina surutke odvoji slično klasičnom procesu. Na taj način se značajno povećava randman. Uštede su veće ako se metod primenjuje u proizvodnji sireva sa većim sadržajem vlage (npr. Camembert, 14%).<sup>148</sup> Predloženo tehničko rešenje grupe naučnika iz Commonwealth Scientific and Industrial Research Association (CSIRO Group) i APV Int. Ltd kompanije danas se primenjuje u proizvodnji UF Cheddar sira iz retentata stepena koncentrisanja 5:1. Mleko se koncentriše ultrafiltracijom do oko 38-40% SM, retentat koaguliše i dobijeni gruš reže u specijalno dizajniranom koagulatoru, izdvoji surutka i potom gruš prerađuje po klasičnom postupku. Povećanje randmana je oko 6-8%. Ovim postupkom tzv. APV CSIRO Curd Method postiže se kvalitet sira identičan konvencionalnom.<sup>3</sup>

Alternativa izdvajanju surutke, kao dopuna ultrafiltraciji, je evaporacija u specijalnim uparivačima (scraped surface evaporator).<sup>148, 149</sup> Ovim postupkom, pod nazivom UF+ evaporacija postiže se maksimalni randman sira, ali su investicioni troškovi zbog dodatog korišćenja opreme za evaporaciju visoki. Ultrafiltracijom se koncentriše mleko do oko 40% SM, a potom evaporacijom postiže 58-70% SM u zavisnosti od željenih karakteristika produkta. Tekstura, ukus i miris dobijenog proizvoda se razlikuju od tradicionalnog, pa se ovaj postupak najčešće koristi u proizvodnji sirne baze za dobijanje topljenog sira.

Ukoliko se proizvod željenih karakteristika ne može dobiti primenom jednog od navedenih postupaka, koristi se LCR postupak ili delimično koncentrisanje. LCR postupak, autora Kosikowski,<sup>150</sup> podrazumeva delimično koncentrisanje mleka (max 2 x) i potom korišćenje klasične tehnologije sa eventualnom manjom modifikacijom (slika 39). Sastav i kvalitet tako dobijenog sira je najpribližniji klasičnom. Mada je povećanje randmana marginalno, investicioni troškovi nisu veliki, pa se mnogi sirevi uspešno mogu proizvesti primenom ovog postupka.<sup>136</sup>

Prema tome, ultrafiltracija se danas uspešno koristi za proizvodnju sireva visokog sadržaja vlage i niže pH vrednosti (pH = 4.6 - 4.8) čije osobine ne zavise od stepena proteolize kazeina. Međutim, ukoliko se tradicionalni i UF sirevi značajno razlikuju, što je slučaj sa mnogim polutvrdim i tvrdim sirevima, javljaju se problemi marketinga takvih sireva novih karakteristika kao i zahtevi za zaštitu identiteta tradicionalnih sireva.<sup>129</sup> Danas se primenom ultrafiltracije uspešno proizvode različiti polutvrđi i tvrdi sirevi: Cheddar, Danbo, Havarti/Tilsit (randman povećan 10%, ušteda sirila 80-85%<sup>151</sup>), St. Paulin, Low Moisture Mozzarella i dr.

Punomasno mleko



Ultrafiltracija



Retentat (1,8:1)



Termički tretman



Klasični postupak

Slika 39. LCR postupak za proizvodnju UF sira<sup>125</sup>

Fig. 39. LCR Ultrafiltration cheese making procedure<sup>125</sup>

Stoga je, na bazi dosadašnjih iskustava, primena ultrafiltracije profitabilan metod za proizvodnju određenih vrsta sireva.

Budući trendovi razvoja UF tehnologije sira podrazumevaju sledeće:<sup>2</sup>

1. Realniji prilaz razmatranju ekonomske dobiti
2. Mogućnost unapređenja tehnike UF za proizvodnju tradicionalnih sireva u okviru postojeće specifikacije proizvoda
3. Mogućnost proizvodnje sireva potpuno novih karakteristika.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE KAČKAVALJA

Sir Kačkavalj je proizveden u industrijskim uslovima u mlekarama „Mlekoprodukt“, Zrenjanin i „Somboled“, Sombor. Urađene su dva vremenski nezavisna industrijska ogleda. Primenom klasične tehnologije proizvedena su 4 uzorka sira u I seriji - KONVENCIONALNI KAČKAVALJ. U II seriji su proizvedena analogna 4 uzorka Kačkavalja iz UF retentata stepena koncentrisanja 2:1 po LCR postupku - UF KAČKAVALJ. Za koagulaciju mleka, odnosno UF koncentrata, korišćeni su proteolitički enzimi različitog porekla:

1. himozinski preparat - HA-BO, Chr. Hansen's Laboratories, A/S, Copenhagen, Denmark, kontrola,
2. genetski modifikovan himozin kloniranjem gena u kvasac *Kluyveromyces lactis* - Maxiren 15L (100% pure chymosin), Gist Brocades, Delft, Holland,
3. mikrobiološki enzim izolovan iz plesni *Mucor miehei* - Rennilase 50L, type XL, Novo Industri A/S, Denmark.

U cilju ispitivanja mogućnosti skraćenja perioda zrenja Kačkavalja u jednom uzorku svake serije koagulisano himozinom, dodata je kombinacija enzima za ubrzanje zrenja:

- proteolitički enzim, aminopeptidaza izolovana iz bakterije *Streptococcus lactis* - Accelase AHC 100, Imperial Biotechnology Limited, Great Britain i
- lipolitički enzim izolovan iz plesni *Mucor miehei* - Palatase M 1000 L, Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark.

Identifikacija uzoraka konvencionalnog i UF Kačkavalja i korišćene količine odabranih koagulišućih enzima i kombinacije enzima za ubrzanje zrenja sira data je u tabeli 9. Optimalne koncentracije odabranih enzima za koagulaciju mleka i UF koncentrata dobijene su na osnovu preliminarnih laboratorijskih istraživanja. Proteolitički enzim Accelase za ubrzanje zrenja sira dodat je po preporuci proizvođača, a navedena koncentracija lipolitičkog enzima Palatase dobijena je na osnovu pozitivnih rezultata primene ovog enzima za ubrzanje zrenja polutvrdog sira Baranjac.<sup>152</sup>

Tabela 9. Identifikacija uzoraka

Table 9. Sample identification

Uzorak	Enzim	Šifra uzorka	I ogled Količina enzima/ 1000 l mleka	II ogled Količina enzima/ 150 l retentata
1	Himozin	CHR <sup>1</sup>	25 g	8 g
2	Himozin	ARE <sup>2</sup>	25 g	8 g
	Accelase		50 g	7.5 g
	Palatase		4.5 ml (300 LU <sup>5</sup> )	1 ml ( 300 LU <sup>5</sup> )
3	Maxiren	GENC <sup>3</sup>	100 ml	15 ml
4	Rennilase	REN <sup>4</sup>	60 ml	7 ml

<sup>1</sup>CHR - Chr. Hansen's enzim (Chr. Hansen's rennet)

<sup>2</sup>ARE - Enzimi za ubrzanje zrenja (Accelerated ripening enzymes)

<sup>3</sup>GENC - Genetski himozin (Genetic chymosin)

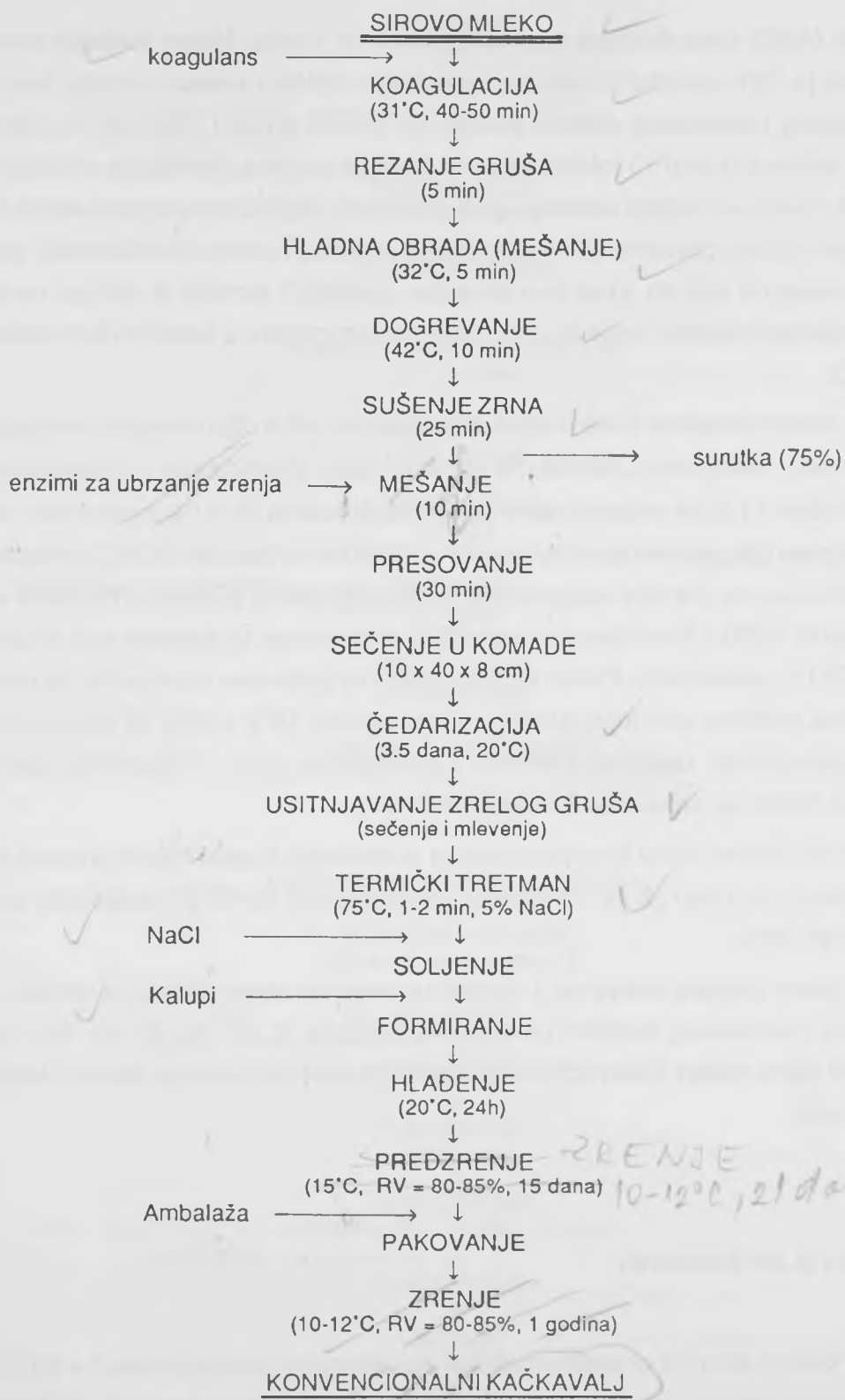
<sup>4</sup>REN - Mikrobiološki enzim Rennilase (Microbial rennet, Rennilase)

<sup>5</sup>LU - Lipaze jedinica (Lipase Unit) : 1 LU - količina enzima koja oslobađa 1 μmol buterne kiseline/min iz tributirin supstrata pri t = 30°C i pH = 7.0

### 3.1.1. Konvencionalni Kačkavalj

Konvencionalni Kačkavalj (4 uzorka, tabela 9) proizveden je šaržnim postupkom po standardnoj tehnologiji po kojoj se odvija redovna industrijska proizvodnja sira u mlekari „Mlekoprodukt“, Zrenjanin. Blok šema tehnološkog procesa proizvodnje konvencionalnih sireva prikazana je na slici 40.

Sirovo mleko (4 x 1000 l), uzeto iz skladišnog tanka kao zbirno mleko da bi se eliminisao uticaj variranja sastava sirovine na kvalitet sira, koagulirano je u duplikatorima dodatkom odgovarajućih količina odabranih eksperimentalnih koagulišućih agensa prema tabeli 9. Vreme koagulacije mleka rennetom u uzorku CHR i ARE iznosilo je 53 i 55 min, respektivno, genetskim himozinom (uzorak GENC) 40 min a Renilase-om (uzorak REN) 56 min. Tehnološki proces je vođen tako da su parametri pojedinih operacija tokom obrade gruš sva 4 uzorka konvencionalnih sireva identični što je evidentno sa slike 40. Jedina modifikacija klasičnog tehnološkog postupka je izvršena u



Slika 40. Blok šema tehnološkog procesa proizvodnje konvencionalnog sira Kačkavalj

Fig. 40. Flow chart of conventional Kashkaval cheese manufacture



uzorku 2 (ARE) zbog dodatka enzima za ubrzanje zrenja. Nakon sušenja sirnog zrna izdvojeno je 75% surutke u odnosu na polaznu količinu mleka i dodata kombinacija proteolitičkog i lipolitičkog enzima (tabela 9). Smeša gruša i preostale surutke intenzivno je mešana u toku 10 minuta da bi se postigla pravilna distribucija enzima u grušu. Potom je, kao i kod ostalih uzoraka, gruš izvađen iz duplikatora pomoću sirnih marama i presovan ručnim presama 30 minuta. Nakon sečenja i zrenja (čedarizacije) gruša, po šemi procesa na slici 40, zreo sirni gruš (tzv. „baskija“) termički je tretiran na tradicionalan način potapanjem korpi sa usitnjenom sirnom masom u poseban kotao sa rastvorom NaCl.

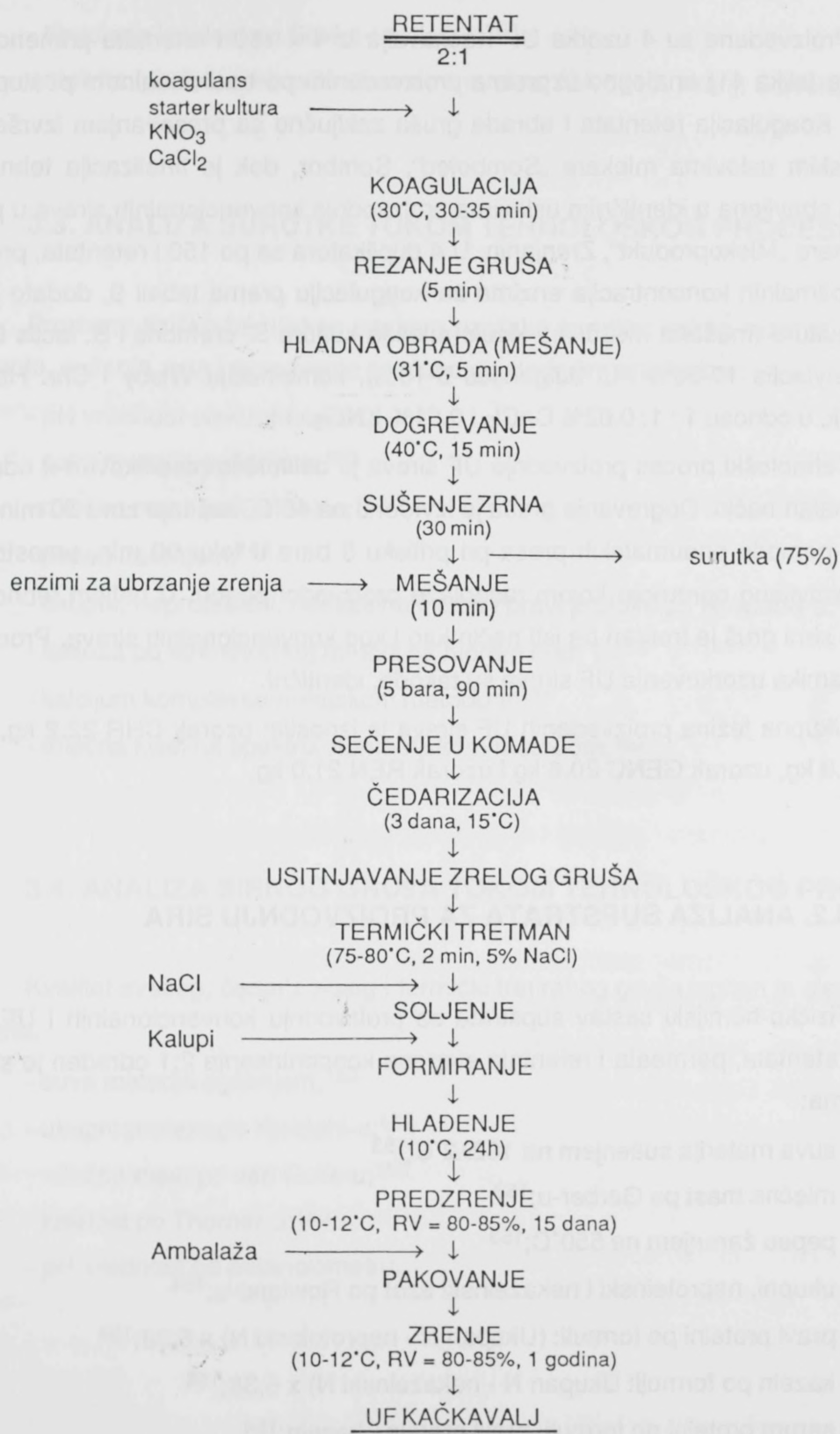
Obrada istopljene sirne mase i dodatak suve soli u cilju korekcije sadržaja ukupne soli u siru, obavljani su, takođe, na klasičan način. Formirani sir u kalupima prečnika 27 cm i visine 11,5 cm ostao je da se ohladi na policama 24 h na temperaturi ambijenta. Primenom Chr. Hansen's sirila (kontrola) i Maxiren-a (uzorak GENC) proizvedeno je po 11 komada sira jednake ukupne težine od 84 kg, dok je primenom Palatase + Accelase (uzorak ARE) i Rennilase (uzorak REN) dobijeno po 10 komada sira ukupne težine 80 i 79 kg, respektivno. Potom je proizvedeni sir prenesen u prostorije za predzrenje u uslovima relativne vlažnosti 80-85% na temperaturi 15°C u toku 15 dana. Nakon završenog predzrenja, uzorci su pakovani u polietilensku foliju, Tipoplastika, Gornji Milanovac na mašini za pakovanje Multivac, Germany.

Proizvedeni uzorci konvencionalnog Kačkavalja su podvrgnuti procesu zrenja u prostorijama za zrenje sa kontrolisanom temperaturom 10-12°C i relativnom vlažnošću vazduha 80-85%.

Tokom perioda zrenja od 1 godine uzimani su uzorci sireva za analizu fizičko-hemijskog i senzornog kvaliteta po sledećoj dinamici: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 i 360 dana nakon proizvodnje. 0-ti uzorak je uzet neposredno nakon hlađenja formiranog sira.

### 3.1.2. UF Kačkavalj

Polazna sirovina za proizvodnju UF Kačkavalja je pasterizovani ( $t = 80^{\circ}\text{C}$ ,  $\tau = 15$  sec) retentat stepena koncentrisanja 2:1, dobijen mešanjem odgovarajućih količina retentata i permeata, nakon ultrafiltracije mleka u mlekari „Somboled“, Sombor na industrijskoj liniji za ultrafiltraciju APV Pasilac (Copenhagen, Denmark) moduo 35 sa membranama GR 61 PP, pri ulaznom pritisku 3 bara, izlaznom 2 bara i temperaturi 50°C.



Slika 41. Blok šema tehnološkog procesa proizvodnje UF sira Kačkavalj  
Figure 41. Flow chart of UF Kashkaval cheese manufacture

Proizvedena su 4 uzorka UF Kačkavalja iz 4 x 150 l retentata primenom LCR postupka (slika 41) analogno uzorcima proizvedenim po tradicionalnom postupku (tabela 9). Koagulacija retentata i obrada gruša zaključno sa presovanjem izvršeni su u industrijskim uslovima mlekare „Somboled“, Sombor, dok je finalizacija tehnološkog procesa obavljena u identičnim uslovima proizvodnje konvencionalnih sireva u pogonima mlekare „Mlekoprodukt“, Zrenjanin. U 4 duplikatora sa po 150 l retentata, pre dodavanja optimalnih koncentracija enzima za koagulaciju prema tabeli 9, dodato je 1.5% starter kulture (mešana mezofilna kiselomlečna kultura *S. cremoris* i *S. lactis* 60-80%, *S. diacetylactis* 10-30% i *L. bulgaricus* 5-15%), kombinacija Wisby i Chr. Hansen's, Denmark, u odnosu 1 : 1; 0.02%  $\text{CaCl}_2$  i 0.01%  $\text{KNO}_3$ .

Tehnološki proces proizvodnje UF sireva je delimično modifikovan u odnosu na tradicionalan način. Dогреvanje gruša je izvršeno na 40°C, sušenje zrna 30 min, a presovanje pomoću pneumatskih presa pri pritisku 5 bara u toku 90 min, umesto ručno, što je uslovljeno opremom kojom raspolaže proizvodni pogon. U daljem tehnološkom procesu sirni gruš je tretiran na isti način kao i kod konvencionalnih sireva. Proces zrenja i dinamika uzorkovanja UF sireva su takođe, identični.

Ukupna težina proizvedenih UF sireva je iznosila: uzorak CHR 22.2 kg, uzorak ARE 20.9 kg, uzorak GENC 20.6 kg i uzorak REN 21.0 kg.

### 3.2. ANALIZA SUPSTRATA ZA PROIZVODNJU SIRIA

Fizičko-hemijski sastav supstrata za proizvodnju konvencionalnih i UF sireva: mleka, retentata, permeata i retentata stepena koncentrisanja 2:1 određen je sledećim metodama:

- suva materija sušenjem na  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ ;<sup>153</sup>
- mlečna mast po Gerber-u;<sup>153</sup>
- pepeo žarenjem na  $550^\circ\text{C}$ ;<sup>153</sup>
- ukupni, neproteinski i nekazeinski azot po Rowland-u;<sup>154</sup>
- pravi proteini po formuli: (Ukupan N - neproteinski N) x 6,38;<sup>154</sup>
- kazein po formuli: Ukupan N - nekazeinski N) x 6,38;<sup>154</sup>
- serum proteini po formuli: pravi protein - kazein;<sup>154</sup>
- laktoza po titrimetrijskoj metodi sa hloraminom T;<sup>155</sup>
- kalcijum kompleksometrijskom metodom;<sup>156</sup>

- titraciona kiselost po Soxlet-Henkel-u;<sup>153</sup>
- aktivna kiselost (pH) potenciometrom Iskra, MA 5713, Kranj, Slovenija.

### 3.3. ANALIZA SURUTKE TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

Promene fizičko-hemijskog sastava uzoraka surutke: nakon rezanja gruša, do- grevanja, sušenja zrna i presovanja pračene su sledećim analizama:

- pH vrednost elektrohemijiski;
- suva materija sušenjem;<sup>153</sup>
- mlečna mast po Gerber-u;<sup>153</sup>
- pepeo žarenjem;<sup>153</sup>
- ukupni, neproteinski, nekazeinski azot i pravi proteini po Rowland-u;<sup>154</sup>
- laktoza po titrimetrijskoj metodi sa hloraminom T;<sup>155</sup>
- kalcijum kompleksometrijskom metodom;<sup>156</sup>
- mlečna kiselina spektrofotometrijskom metodom.<sup>157</sup>

### 3.4. ANALIZA SIRNOG GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

Kvalitet svežeg, čedarizovaog i termički tretiranog gruša ispitan je sledećim me- todama:

- suva materija sušenjem;<sup>153</sup>
- ukupni proteini po Kjeldahl-u;<sup>153</sup>
- mlečna mast po van Gulik-u;<sup>153</sup>
- kiselost po Thorner-u;<sup>153</sup>
- pH vrednost na potenciometru.

### 3.5. ANALIZA KAČKAVALJA

Uticaj vrste koagulišućeg enzima i kombinacije lipolitičkog i proteolitičkog enzima na fizičko-hemijski kvalitet konvencionalnih i UF sireva tokom 1 godine zrenja ispiti-  
van je sledećim metodama:

- voda sušenjem na  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ ;<sup>153</sup>
- pepeo žarenjem na  $550^\circ\text{C}$ ;<sup>153</sup>
- mlečna mast po van Gulik-u;<sup>153</sup>
- ukupni proteini po Kjeldahl-u na aparatu Kjell-Foss, Foss electric, Denmark;<sup>153</sup>
- neproteinski azot u 12% TCA (trihlor sirćetnoj kiselini) po Rowland-u;<sup>154</sup>
- pravi proteini po Rowland-u;<sup>154</sup>
- rastvorljivi N u vodi po Kuchroo i Fox-u;<sup>73</sup>
- rastvorljivi pravi proteini po Rowland-u;<sup>154</sup>
- koeficijent zrelosti po formuli:  $\text{rastvorljivi N/ukupan N} \times 100$ ;
- NaCl po Volhard-u;<sup>158</sup>
- titraciona kiselost po Thorner-u;<sup>153</sup>
- aktivna kiselost potenciometrijski po O'Sullivan i Fox-u;<sup>159</sup>
- PAG elektroforeza kazeina po Raymond i Nakamichi.<sup>160</sup> Elektroferogrami su dobijeni snimanjem gelova na aparatu Scanner II, tip TLC, Camag, Switzerland pri  $\lambda = 480 \text{ nm}$ ;
- isparljive komponente arome nakon 9, 6 i 12 meseci zrenja sira metodom kapilarnog gasne hromatografije uz prethodnu pripremu uzoraka po de Frutos et al.<sup>161</sup> mikrometodom simultane destilacije - ekstrakcije (SDE)<sup>162</sup> na aparaturi firme Chrom-pack, Holland. Gasno hromatografska analiza izvođena je na aparatu HP 5890 serija II hromatogram sa FID detektorom i He kao gasnim nosačem u split modulu 1:30 na koloni fused silica HP FFAP 25 m x 0.32 mm x 52  $\mu\text{m}$ , na temperaturi injektovanja i detektovanja  $275^\circ\text{C}$ , pri temperaturnom programu  $60 - 200^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}/\text{min}$  pri čemu je  $200^\circ\text{C}$  održavano 25 min. Određivanje retencionog vremena i integracija su izvršeni na integratoru HP 3396 serija II. Identifikacija je izvršena na kuplovanom sistemu gasna hromatografija/masena spektroskopija. Uzorci sira su čuvani na temperaturi od  $-20^\circ\text{C}$  do analize;
- Reološke karakteristike sireva su ispitane određivanjem čvrstoće:
  - penetrometrom firme SuP Berlin, tip PNRG, Germany<sup>163</sup> i

- kompresijom cilindričnih uzoraka sira prečnika 2.54 cm i visine 2.5 cm do 80% originalne visine na sobnoj temperaturi na aparatu Instron Universal Testing Mashine, model 4301, Instron Limited, High Wycombe, Buckinghamshire, England, pri brzini 0.1 m/min. Čvrstoća je definišana silom (N) potrebnom da se uzorci sira komprimuju do određene (zadate) visine.<sup>164</sup>

Analizirano je po 6 uzoraka svakog sira.

### 3.6. MIKROSTRUKTURA GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

Nakon proizvodnje konvencionalnih i UF sireva uzorci gela mleka i retentata koaguliranih različitim proteazama i gruša nakon dogrevanja, presovanja, čedarizacije, termičkog tretmana i formiranja, dimenzija 1 x 1 x 10 mm su fiksirani u 2.8% rastvoru glutaraldehida i poslani na TEM (transmisiona elektronska mikroskopija) analizu u Food Research Centre, Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Priprema uzoraka za TEM analizu obuhvatila je sečenje fiksiranih uzoraka u kome dimenzija 1 x 1 x 1 mm; fiksiranje u 2% rastvoru osmium tetroksida u 0.05 M veronal acetatnom puferu, pH = 6.75 na 20°C u toku 2 h; ispiranje u puferu; sušenje u seriji rastvora etanola: 20; 40; 60; 80; 96 i 100% i potapanje dehidriranih uzoraka u Spurr's medijum niskog viskoziteta (J.B. Em Service, Inc., Pointe-Claire, Dorval, Quebec, Canada). Sekcije uzoraka debljine približno 90 nm dobijene sečenjem dijamantskim nožem koji je sastavni deo OM U2 ultramikrotoma (Reichert Optische Werke, Wien, Austria), obojeni su rastvorima uranil acetata<sup>165</sup> i olovo acetata<sup>166</sup> i ispitivani Philips EM 300 elektronskim mikroskopom (N.V. Philips, Eindhoven, The Netherlands) na 60 kV. TEM mikrografi su dobijeni korišćenjem 35 mm Eastman Kodak Fine Grain Release Positive Film 5302.

### 3.7. SENZORNA ANALIZA SIRA

Senzorni kvalitet proizvedenih klasičnih i UF uzoraka Kačkavalja tokom 6 meseci zrenja ocenila je grupa stručnjaka mlekarne „Mlekoprodukt“, Zrenjanin i saradnici na predmetu Tehnologija mleka, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu po sistemu ponderisanih bodova prema Filajdiću.<sup>167</sup>

### 3.8. GUBITAK TEŽINE SIRA

Gubitak težine (kalo) ispitivanih sireva praćen je merenjem težine sireva tokom 360 dana zrenja.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV MLEKA, RETENTATA I PERMEATA

Rezultati ispitivanja fizičko-hemijskog sastava supstrata korišćenih za proizvodnju konvencionalnih i UF sireva prikazani su u tabeli 10.

Iz prikazanih rezultata određivanja osnovnih pokazatelja fizičko-hemijskog sastava sirovog mleka, korišćenog za proizvodnju Kačkavalja po klasičnoj tehnologiji, vidljivo je da prosečna vrednost suve materije iznosi 10.41%, što je niža vrednost u odnosu na literaturne podatke.<sup>52, 168</sup> Navedena vrednost suve materije posledica je standardizacije sadržaja mlečne masti na 1.5% u mleku za proizvodnju Kačkavalja u dotičnom mlekarskom pogonu. Međutim, sadržaj suve materije bez masti je iznosio 8.91% i iznad je vrednosti propisane važećim Pravilnikom o kvalitetu mleka, proizvoda od mleka, sirila i čistih kultura<sup>169</sup> (min. 8.5%). Vrednosti ukupnog azota (0.58%), kazeina (2.74%) i serum proteina (0.53%), kao i neproteinskog i nekazeinskog azota su, takođe u granicama literaturnih podataka.<sup>13, 52, 168</sup> Sadržaj pravih proteina je 3.27%, a količina laktoze iznosi 4.33%. Prosečan uzorak mleka je sadržao 0.76% pepela i 1.24 g/l kalcijuma što je u granicama poznatih vrednosti.<sup>52, 168</sup> Kiselost mleka je 66°SH dok je pH vrednost 6.7. Prema tome, evidentno je iz date tabele 10 da je mleko korišćeno za proizvodnju Kačkavalja standardnog kvaliteta.

Sastav retentata i permeata prikazan u tabeli 10 je direktna posledica tehničkih mogućnosti instalisanog postrojenja za ultrafiltraciju i sastava polaznog mleka. Tokom procesa ultrafiltracije menja se relativni odnos pojedinih komponenata mleka, pri čemu raste udeo proteina i mlečne masti u retentatu, dok komponente manje molekulske mase rastvorljive u vodi (laktoza, mineralne materije, vitamini kao i individualne slobodne amino kiseline) prolaze u permeat.<sup>123, 127, 128, 132</sup>

Suva materija retentata je iznosila 33.06 a permeata 5.19%, što je u skladu sa dosadašnjim literaturnim navodima za isti UF modul.<sup>170, 171</sup> Retencija mlečne masti je praktično 100%,<sup>127</sup> tako da retentat sadrži 13.90% mlečne masti a permeat 0%. Relativno povećanje udela pojedinih azotnih frakcija u retentatu posledica je koncentrisanja



Tabela 10. Fizičko-hemijski sastav mleka (M), retentata (R), permeata (P) i retentata R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> i R<sup>4</sup> \* stepena koncentrisanja 2:1

Table 10. Physico-chemical composition of milk (M), retentate (R), permeate (P) and 2 fold concentrated retentates - R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup>

Uzorak	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	Ukupni N (%)	Ukupni proteini (%)	NPN (%)	NKN (%)	Pravi proteini (%)	Kazein (%)	Serum proteini (%)	Laktoza (%)	Pepeo (%)	Kalcijum g/l	Kiselost *SH	pH
M	10.41	1.50	0.58	3.70	0.067	0.15	3.27	2.74	0.53	4.33	0.76	1.24	6.6	6.7
R	33.06	13.90	2.10	13.39	0.110	0.18	12.64	12.19	0.45	4.12	1.46	3.12	12.8	6.6
P	5.19	0	0.055	0.35	0.052	-	-	-	-	4.36	0.47	0.44	1.2	7.0
R <sup>1</sup> ,	18.76	6.9	1.066	6.80	0.074	0.14	6.33	5.91	0.42	3.90	0.96	1.86	8.6	6.6
R <sup>2</sup>	18.64	6.85	1.051	6.70	0.079	0.12	6.20	5.93	0.27	3.90	0.99	1.84	8.8	6.7
R <sup>3</sup>	18.54	6.85	1.048	6.69	0.080	0.16	6.18	5.67	0.51	3.85	0.95	1.84	8.8	6.7
R <sup>3</sup>	18.54	6.85	1.048	6.69	0.080	0.16	6.18	5.67	0.51	3.85	0.95	1.84	8.8	6.7
R <sup>4</sup>	18.43	6.85	1.051	6.70	0.070	0.12	6.25	5.93	0.32	3.80	0.94	1.86	8.8	6.7

\* R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> i R<sup>4</sup>. Uzorci retentata R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> i R<sup>4</sup> - korišćeni su za proizvodnju UF Kačkavalja prema tabeli 9.

Samples of retentates R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> intended for UF Kashkaval production according to Table 9.

mleka, npr. sadržaj ukupnih proteina je 13.34%, pravih proteina 12.64% a kazeina 12.19%. Sadržaj neproteinskog azota u retentatu (0.11%) nije znatnije povećan, obzirom da su to supstance male molekulske mase pa stoga lako prolaze kroz membrane.<sup>127</sup> Pošto se proces ultrafiltracije u praksi ne odvija idealno, odnosno UF membrane pokazuju delimičnu retenciju laktoze i soli, stoga retentat sadrži 4.12% laktoze i 1.46% pepela. Povećan sadržaj pepela i retentata u odnosu na mleko je posledica koncentrisanja koloidnog kalcijum fosfata, zajedno sa proteinima odnosno kazeinom.<sup>127</sup> Usled povećanja sadržaja koloidnog kalcijum fosfata i proteina, povećan je i puferni kapacitet retentata,<sup>132</sup> pa kiselost retentata iznosi 12.8°SH dok je pH retentata 6.6 i gotovo je identičan vrednosti u mleku.

Iz prikazanih rezultata u tabeli 10, može se zaključiti da je sadržaj individualnih konstituenata permeata u dobrom slaganju sa literaturnim podacima.<sup>127, 172</sup> Sadržaj ukupnog azota u permeatu odgovara sadržaju neproteinskog azota, dok je sadržaj laktoze niži od prosečnih vrednosti datih u literaturi <sup>172</sup> za 0.23%. Sadržaj pepela i kalcijuma u permeatu je za oko 50% niži od sadržaja istih komponenata u mleku zbog opisanih promena koje se dešavaju tokom procesa ultrafiltracije.

Sastav retentata stepena koncentrisanja 2:1, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> i R<sup>4</sup>, pripremljenih za izradu UF sireva mešanjem retentata i permeata u određenom odnosu, je posledica navedenih fizičko-hemijskih karakteristika retentata i permeata i šaržnog načina proizvodnje. Praktično, sadržaj ukupnih proteina u uzorku retentata R<sup>1</sup> je za 0.1% veći u odnosu na ostala tri uzorka koji sadrže prosečno 6.7% ukupnih proteina, dok je sadržaj mlečne masti u istom uzorku veći za 0.05% od vrednosti konstatovane u ostalim uzorcima (6.85%). Minimalne razlike u sadržaju suve materije kao i individualnih makro i mikro konstituenata pripremljenih retentata stepena koncentrisanja 2:1 (tabela 10), uslovljene šaržnim načinom proizvodnje, nisu signifikantne da bi mogle uticati na kvalitet UF sireva.

## 4.2. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV SURUTKE TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

U tabelama 11 i 12 prikazani su rezultati promena fizičko-hemijskog kvaliteta surutke tokom tehnološkog procesa proizvodnje konvencionalnih i UF sireva.

Podataka o makro i mikro hemijskom sastavu i fizičkim karakteristikama surutke tokom pojedinih operacija u tehnološkom procesu proizvodnje Kačkavalja u literaturi

nema. Dostupni podaci se uglavnom odnose na prosečan sadržaj suve materije, masti, proteina i kiselosti surutke nakon obrade gruša.

Poznato je da kvalitet surutke tokom tehnološkog procesa zavisi od vrste sira i analogno tome, sadržaj pojedinih konstituenata suve materije značajno varira. Nakon rezanja gruša sa surutkom se gubi određena količina proteina i soli.<sup>10</sup> U komparaciji sa himozinom gubitak proteina sa surutkom je veći ukoliko se koriste enzimi mikrobiološkog porekla.<sup>173</sup> Sa surutkom se gubi i oko 90% koagulišućih agenasa, a ostatak se zadrži u grušu.<sup>174</sup> Svega 2-3% aktivnosti *M. miehei* i *M. pusillus* proteaza je detektovano nakon presovanja gruša tokom proizvodnje Cheddar-a<sup>38</sup> ukazujući da je uloga mikrobioloških enzima u procesu zrenja sira minorna u odnosu na aktivnost dodate starter kulture.

Rezultati kvaliteta surutke dati u tabelama 11 i 12 su u skladu sa navedenim literaturnim podacima. Variranje fizičko-hemijskog sastava surutke između uzoraka i u okviru istog uzorka je posledica različitih supstrata za proizvodnju Kačkavalja (sirovo mleko ili retentat) i momenta uzorkovanja surutke tj. primenjenih operacija tokom tehnološkog procesa proizvodnje sira. Koncentracija individualnih komponenata je najveća u surutki nakon rezanja gruša u procesu proizvodnje obe grupe sireva.

U okviru istih uzoraka konvencionalnih sireva (tabela 11), najveća suva materija surutke nakon rezanja gruša je kod uzorka CHR i iznosi 7.35%, a minimalna u uzorku REN (7.08%), dok su vrednosti suve materije uzorka surutke ARE i GENC približne i manje za 0.9 odnosno 0.7% od maksimalno utvrđene. Analogno sadržaju suve materije koncentracije individualnih konstituenata surutke, zadržale su iste relativne odnose (npr. mlečna mast, pepeo). Izuzetak su rezultati sadržaja ukupnih proteina (UP) i neproteinskog azota (NPN) koji pokazuju da surutka nakon rezanja gruša dobijenog *M. miehei* proteazom sadrži 2.00% UP i 0.064% NPN odnosno 9 i 20% respektivno više ovih komponenata nego surutka dobijena nakon koagulacije mleka CHR sirilom, što je u skladu sa literaturnim podacima da se primenom mikrobioloških sirila u procesu proizvodnje sira sa surutkom gube veće količine proteina.<sup>173</sup>

Obzirom na sastav i iste funkcionalne osobine genetski modifikovanog himozina i standardnog reneta<sup>7, 8, 40, 41</sup> utvrđene razlike u sastavu surutke uzorka GENC i kontrolnog uzorka CHR nisu signifikantne i posledica su šaržnog postupka proizvodnje.

Minimalne razlike u sadržaju osnovnih sastojaka surutke uzorka ARE i CHR (kontrola) navedene u tabeli 11 su takođe posledica šaržnog načina proizvodnje sira.

Generalno se može zaključiti da su rezultati prikazani u tabeli 11, u skladu sa najnovijim literaturnim navodima<sup>5</sup> po kojima razlika u nivou ukupnog azota u surutki

Tabela 11. Fizičko-hemijski sastav surutke tokom tehnološkog procesa proizvodnje konvencionalnog Kačkavalja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN navedeni su u tabeli 9.

Table 11. Physico-chemical composition of whey during conventional Kashkaval cheese manufacture. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Surutka	Uzorak	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	Pepeo (%)	UN (%)	UP (%)	NKN (%)	NPN (%)	Pravi proteini (%)	Laktoza (%)	Mlečna kiselina (%)	pH	Ca g/l
Nakon rezanja	CHR	7.35	0.60	0.59	0.295	1.88	0.136	0.053	1.54	4.16	0.215	6.6	0.424
	ARE	7.26	0.65	0.57	0.279	1.78	0.138	0.050	1.46	4.22	0.175	6.6	0.436
	GENC	7.28	0.55	0.56	0.279	1.78	0.132	0.050	1.46	4.20	0.250	6.6	0.421
	REN	7.08	0.40	0.58	0.321	2.05	0.110	0.064	1.64	4.03	0.210	6.6	0.424
Nakon dogrevanja	CHR	6.78	0.40	0.56	0.293	1.87	0.130	0.036	1.64	3.82	0.230	6.5	0.424
	ARE	6.80	0.45	0.56	0.273	1.74	0.136	0.050	1.42	3.89	0.230	6.5	0.436
	GENC	6.52	0.40	0.56	0.239	1.52	0.131	0.050	1.20	3.85	0.285	6.5	0.340
	REN	6.70	0.35	0.57	0.291	1.86	0.112	0.042	1.59	3.82	0.235	6.4	0.488
Nakon sušenja	CHR	6.40	0.35	0.53	0.273	1.74	0.124	0.032	1.53	3.60	0.255	6.5	0.428
	ARE	6.10	0.45	0.54	0.224	1.43	0.127	0.042	1.16	3.51	0.335	6.5	0.424
	GENC	5.90	0.30	0.53	0.196	1.23	0.126	0.044	0.97	3.53	0.365	6.5	0.400
	REN	6.25	0.25	0.55	0.287	1.83	0.102	0.036	1.60	3.55	0.309	6.4	0.432
Nakon presovanja	CHR	5.30	<0.05	0.53	0.188	1.20	0.104	0.011	1.13	-	0.325	6.4	0.464
	ARE	5.20	<0.05	0.58	0.185	1.18	0.108	0.036	0.95	3.19	0.560	6.3	0.509
	GENC	5.19	<0.05	0.57	0.189	1.21	0.126	0.040	0.95	3.23	0.425	6.4	0.448
	REN	5.60	0	0.54	0.279	1.78	0.100	0.035	1.55	3.15	0.515	6.3	0.360

dobijenoj nakon koagulacije mleka kravljim sirilom i rekombinovanim himozinom u proizvodnji Cheddar-a, nisu signifikantne, ali su veoma izražene u slučaju korišćenja M. Miehei proteaze, što sa ekonomskog aspekta negativno utiče na randman sira.

Manipulacijom gruša (dogrevanjem, sušenjem i presovanjem) koncentracija pojedinih sastojaka surutke opada (tabela 11) i u skladu je sa literaturnim podacima.<sup>10, 174</sup> Međutim, relativni odnosi individualnih konstituenata u okviru pojedinih uzoraka surutke su ostali nepromenjeni. Pri tome, sadržaj laktoze intenzivno opada nakon dogrevanja gruša, a koncentracija mlečne kiseline raste kao rezultat prisutne mikroflore u mleku.<sup>10, 82, 174</sup> Analogno tome, pH vrednost opada i to za 0.2 jedinice kod uzoraka CHR i GENC, dok je intenzivniji pad konstatovan u uzorcima ARE (zbog dodatih enzima za ubrzanje zrenja) i REN (0.3 jedinice manje od početne pH vrednosti).

Sadržaj kalcijuma u svim uzorcima surutke tokom pojedinih operacija u procesu je približno konstantan.

Gubitak mlečne masti u surutki nakon presovanja je zanemarljiv i iznosi < 0.05% u uzorcima CHR, ARE i GENC, a u uzorku REN čak 0%, što je značajno sa aspekta randmana sira.

Podaci o sastavu surutke u pojedinim fazama tehnološkog procesa proizvodnje UF sireva su relativno malobrojni i uglavnom se odnose na proizvodnju UF Cheddar-a i UF Gauda-e. Međutim, prema dosadašnjim saznanjima literaturnih podataka o kvalitetu surutke tokom tehnološkog procesa proizvodnje UF Kačkavalja nema.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 12 vrednosti suve materije surutke nakon rezanja gruša tokom izrade UF Kačkavalja su veće za 2.45-4.48% u uzorcima CHR - REN, respektivno. Apsolutna vrednost suve materije uzorka CHR je minimalna (9.8%) dok je suva materija uzoraka surutke nakon rezanja gruša ARE, GENC i REN približno ista i iznosi 11.70; 11,31 i 11.56% respektivno. Nakon finalizacije obrade gruša (surutka nakon presovanja) sadržaj suve materije u svim uzorcima je približno isti i prosečno iznosi 6.53%, što je u skladu sa rezultatima ispitivanja kvaliteta surutke dobijene tokom tehnološkog procesa proizvodnje UF Goude.<sup>164</sup>

Sadržaj mlečne masti, pepela, ukupnog azota i pravih proteina je, analogno sadržaju suve materije, povećan u odnosu na klasičnu surutku. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim navodima o sastavu surutke dobijene sinerezom retentata različitog sadržaja proteina koaguliranih proteolitičkim enzimima različitog porekla, pri čemu je surutka dobijena nakon koagulacije Rennilase-om bogatija proteinima nego surutka dobijena nakon koagulacije himozinskim preparatom.<sup>175</sup>

Tabela 12. Fizičko-hemijski sastav surutke tokom tehnološkog procesa proizvodnje UF Kačkavalja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN navedeni su u tabeli 9.

Table 12. Physico-chemical composition of whey during UF Kashkaval cheese manufacture. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Surutka	Uzorak	Suva materija (%)	Mlečna mast (%)	Pepeo (%)	UN (%)	UP (%)	NKN (%)	NPN (%)	Pravi proteini (%)	Laktoza (%)	Mlečna kiselina (%)	pH	Ca (g/l)
Nakon rezanja	CHR	9.80	1.90	0.54	0.537	3.43	0.147	0.049	3.11	3.88	0.421	6.5	0.541
	ARE	11.70	3.60	0.53	0.500	3.19	0.158	0.042	2.92	4.13	0.249	6.5	0.381
	GENC	11.31	2.60	0.63	0.489	3.12	0.165	0.045	2.83	4.16	0.420	6.8	0.521
	REN	11.56	3.50	0.62	0.519	3.31	0.193	0.044	3.03	4.03	0.490	5.8	0.741
Nakon dogrevanja	CHR	8.88	1.60	0.65	0.475	3.03	0.137	0.040	2.76	-	0.370	6.6	0.581
	ARE	10.49	2.80	0.49	0.459	2.93	0.154	0.039	2.68	4.10	0.388	6.0	0.521
	GENC	10.10	2.00	0.53	0.462	2.95	0.159	0.044	2.67	4.10	-	5.9	0.521
	REN	11.52	3.40	0.51	0.489	3.12	0.162	0.042	2.85	4.05	0.303	5.6	0.481
Nakon sušenja	CHR	7.82	1.35	0.47	0.390	2.49	0.036	0.039	2.24	3.47	0.195	6.7	0.541
	ARE	10.04	2.50	0.52	0.450	2.87	0.149	0.032	2.67	4.04	0.282	6.6	0.601
	GENC	9.56	1.70	0.51	0.450	2.87	0.077	0.043	2.59	-	0.209	6.4	0.501
	REN	10.55	3.30	0.47	0.479	3.06	0.052	0.042	2.79	3.56	0.334	6.8	0.481
Nakon presovanja	CHR	6.45	0.35	0.45	0.329	2.10	0.028	-	-	3.40	0.298	6.8	0.441
	ARE	6.71	0.60	0.35	0.399	2.54	0.148	0.030	2.35	3.19	0.235	6.8	0.461
	GENC	6.65	0.70	0.46	0.423	2.70	0.011	0.032	2.49	2.87	0.209	6.8	0.421
	REN	6.34	0.35	0.41	0.469	2.99	0.010	0.040	2.74	2.68	0.387	6.8	0.361

Sadržaj neproteinskog azota je približan vrednostima u surutki konvencionalnih sireva zbog poznatih karakteristika (semipermeabilnost) UF membrana.<sup>127</sup>

Koncentracija mlečne kiseline je na približno istom nivou u svim uzorcima surutke (tabela 12) ali je dvostruko veća u odnosu na surutku analiziranu tokom proizvodnje Kačkavalja po klasičnoj tehnologiji, zbog povećanog pufernog kapaciteta retentata.<sup>127, 129, 132</sup>

Analizirani uzorci surutke sadrže prosečno 4.09% laktoze pokazujući isti trend opadanja vrednosti tokom obrade gruša kao i kod klasičnih analoga.

Povećan sadržaj kalcijuma u ispitanim UF uzorcima surutke je rezultat različitih fizičko-hemijskih karakteristika retentata u odnosu na nativno mleko.<sup>127</sup>

### 4.3. FIZIČKO-HEMIJSKI SASTAV SIRNOG GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

Tehnologija Kačkavalja je specifična i, kao što se zna, karakterišu je dve potpuno nezavisne faze: 1. proizvodnja gruša i 2. termički tretman zrelog (čedarizovanog) gruša potapanjem u toplu vodu u cilju dobijanja plastične i rastegljive sirne mase koja može da se oblikuje po želji.<sup>176, 177, 178</sup>

Prema Pejiću<sup>177</sup> i Đorđeviću<sup>178</sup>, prva faza u procesu zrenja sira započinje već tokom čedarizacije svežeg gruša. Tokom čedarizacije povećava se kiselost gruša kao rezultat kiselomlečne fermentacije, a time i koncentracija rastvorljivog kalcijuma (čedarizovana gruda sadrži 53% više rastvorljivog kalcijuma nego sveža gruda) i formira monokalcijum parakazeinat prema sledećoj reakciji:<sup>176</sup>



kalcijum parakazeinat	mlečna kiselina	monokalcijum parakazeinat	kalcijum laktat
--------------------------	--------------------	------------------------------	--------------------

Fenomen je karakterističan za sve sireve grupe Pasta Filata.<sup>179</sup> Utvrđeno je da monokalcijumparakazeinatni gruš poseduje jedinstvena svojstva: rastvorljivost u toplom rastvoru NaCl (12% NaCl na 72-75°C u toku 35-50 s)<sup>176</sup> i sposobnost istezanja pri termičkoj obradi dajući sirno testo lisnate strukture. Ukoliko monokalcijum parakazeinat i dalje gubi kalcijum, ako je acidifikacija iznad optimalne, formira se treće jedinjenje - parakazein, koje teško zadržava mast.<sup>179</sup> Takva gruda pri termičkoj obradi gubi

sposobnost slepljivanja i istezanja, već naprotiv, dolazi do dezintegriranja. Zrela gruda sadrži u proseku 3.6 puta veću količinu monokalcijum parakazeinata nego sveža.<sup>178</sup>

Pokazatelji kvaliteta svežeg, čedarizovanog i termički tretiranog sirnog gruša tokom proizvodnje konvencionalnih i UF uzoraka Kačkavalja prikazani su u tabelama 13 i 14.

Različiti koagulišući enzimi nisu bitno uticali na sadržaj suve materije, odnosno vode svežeg gruša tradicionalnih sireva, pa stoga registrovane razlike nisu značajne (tabela 13). Međutim, iz tabele 14 uočavaju se razlike u sadržaju suve materije svežeg gruša u seriji UF uzoraka (npr. uzorak REN sadrži 55.72% suve materije a kontrolni (CHR) uzorak maksimalnu vrednost - 59.80%. Sadržaj suve materije se povećava u toku čedarizacije gruša, što je u skladu sa literaturnim podacima<sup>178</sup>, ali nivo povećanja nije istog intenziteta kod svih uzoraka. U konvencionalnim uzorcima čedarizovanog gruša CHR, ARE i GENC vrednost suve materije se povećala za približno 5%, odnosno u uzorku sa dodatkom Rennilase-om (uzorak REN) 3%, u odnosu na sadržaj suve materije svežeg gruša. Redosled povećanja sadržaja suve materije kod UF uzoraka čedarizovanog gruša je izmenjen i iznosi: 5.26 ; 4.39; 4.36 i 3.15% u uzorcima REN, GENC, CHR i ARE, respektivno.

Tokom termičke obrade čedarizovane grude gubi se jedan deo suve materije<sup>178</sup> što kod klasičnih sireva iznosi od 2.09% u uzorku REN do prosečno 4.48% u ostala tri uzorka. Gubitak suve materije tokom termičke obrade UF gruša je različit i kreće se od 2.13% kod uzorka CHR, do 6.37% kod uzorka GENC.

Dok promene sadržaja ukupnog azota odnosno ukupnih proteina nisu jače izražene tokom čedarizacije i termičke obrade gruša (npr. termički tretiran UF gruša uzorka CHR sadrži 1.14% ukupnih proteina manje od čedarizovanog gruša), sadržaj mlečne masti pokazuje značajno drugačiji trend kod konvencionalnih i UF uzoraka. Registrovani rezultati u tabeli 13 su u skladu sa literaturnim podacima<sup>180</sup> i uklapaju se u navedene vrednosti za gubitak masti sa surutkom (tabela 11 i 12). Nakon termičke obrade čedarizovanog gruša minimalno smanjenje sadržaja mlečne masti je kod klasičnog uzorka sa dodatkom *M. miehei* proteaze (uzorak REN) 0.5%, dok kod svih ostalih klasičnih uzoraka iznosi 1%. Kod UF analoga znatan gubitak sadržaja mlečne masti je verovatno posledica vrste koagulišućih enzima i povećanog sadržaja proteina i koloidnog kalcijum fosfata u retentatu odnosno neizbalansiranog odnosa Ca/proteini.<sup>129</sup> Drastično smanjenje apsolutnog sadržaja mlečne masti za 10% konstatovano je u uzorku REN tj. primenom mikrobiološke proteaze *M. miehei* (tabela 14) što izaziva negativne efekte na randman sira.



Tabela 13. Fizičko-hemijski sastav svežeg, čedarizovanog i termički tretiranog gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje konvencionalnog Kačkavalja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN navedeni su u tabeli 9.

Table 13. Physico-chemical composition of fresh curd, curd after cheddaring and curd after texturing during conventional Kashkaval cheese manufacture. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Komponenta	Sveži gruš			Čedarizovani gruš			Termički tretirani gruš		
	CHR	ARE	GENC REN	CHR	ARE	GENC REN	CHR	ARE	GENC REN
Suva materija (%)	49.75	49.94	49.83 49.20	54.80	54.89	55.08 52.21	50.25	50.45	50.62 50.12
Voda (%)	50.25	50.06	50.17 50.80	45.20	45.11	44.92 47.79	49.75	49.55	49.38 49.88
Mlečna mast (%)	17.0	17.0	17.0 14.5	17.0	17.0	16.0 14.5	16.0	16.0	15.0 14.0
UN (%)	-	3.14	2.02 2.74	-	3.17	3.00 2.86	-	-	- -
UP (%)	-	20.03	12.88 17.48	-	20.22	19.14 18.25	-	-	- -
Kiselost (*T)	104	102	108 110	172	208	194 190	-	-	- -
pH	5.7	5.7	5.8 5.7	5.3	5.28	5.4 5.38	5.5	5.48	5.65 5.5

Tabela 14. Fizičko-hemijski sastav svežeg, čedarizovanog i termički tretiranog gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje UF Kačkavalja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN navedeni su u tabeli 9.

Table 14. Physico-chemical composition of fresh curd, curd after cheddaring and curd after texturing during UF Kashkaval cheese manufacture. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Komponenta	Sveži gruš				Čedarizovani gruš				Termički tretirani gruš			
	CHR	ARE	GENC	REN	CHR	ARE	GENC	REN	CHR	ARE	GENC	REN
Suva materija (%)	59.80	56.28	56.68	55.72	64.16	59.43	61.07	60.98	62.03	56.09	54.70	57.32
Voda (%)	40.20	43.72	43.32	44.28	35.84	40.57	38.93	39.02	37.97	43.91	45.30	42.68
Mlečna mast (%)	33.0	24.5	25.0	29.0	34.0	25.5	27.0	28.0	32.0	22.0	23.0	18.0
UN (%)	4.13	3.93	4.27	4.45	4.05	4.20	3.92	4.08	4.23	4.35	4.7	5.63
UP (%)	26.35	25.07	27.24	28.39	25.84	26.79	25.01	26.03	26.98	27.75	29.98	35.92
Kiselost (*T)	73	107	91	110	131	162	148	168	94	119	120	128
pH	5.7	5.45	5.57	5.58	5.35	5.20	5.25	5.37	5.5	5.46	5.49	5.43

Podaci u tabeli 13 pokazuju da je titraciona kiselost čedarizovane grude u procesu proizvodnje klasičnog Kačkavalja 1.9 puta veća nego u svežoj grudi kod uzoraka CHR, GENC i REN, dok je kombinacija enzima za ubrzanje zrenja, Accelase i Palatase, uslovlila da uzorak ARE ima nešto veću kiselost u odnosu na ostale klasične uzorke (2.04 puta veća titraciona kiselost čedarizovane grude nego sveže u uzorku ARE). Dobijeni rezultati titracione kiselosti su u granicama literaturnih podataka.<sup>178, 180</sup>

Evidentirane niže vrednosti kiselosti UF uzoraka sveže i zrele grude (tabela 14) su rezultat sastava i osobina retentata<sup>127, 129</sup> (povećan sadržaj masti, proteina i koloidnog kalcijum fosfata u odnosu na nativno mleko), kao i činjenice da kiselost zrele grude kod izrade polumasnog Kačkavalja (što je slučaj sa klasičnim uzorcima) mora da bude znatno veće nego kod proizvodnje punomasnog sira<sup>178</sup> kako bi se proizvela dovoljna količina monokalcijum parakazeinata neophodna za dalju obradu gruša. Termička obrada čedarizovane grude izaziva smanjenje kiselosti usled ispiranja kiselih sastojaka<sup>178</sup> za prosečno 28°T kod uzorka sa rekombinovanim himozinom a 48°T kod uzorka sa Rennilase-om. Prosečno smanjenje kiselosti UF uzorka termički tretiranog gruša sa dodatim „koktelom“ enzima za ubrzanje zrenja iznosi 43°T i neznatno se razlikuje od kiselosti kontrolnog uzorka CHC - 37°T.

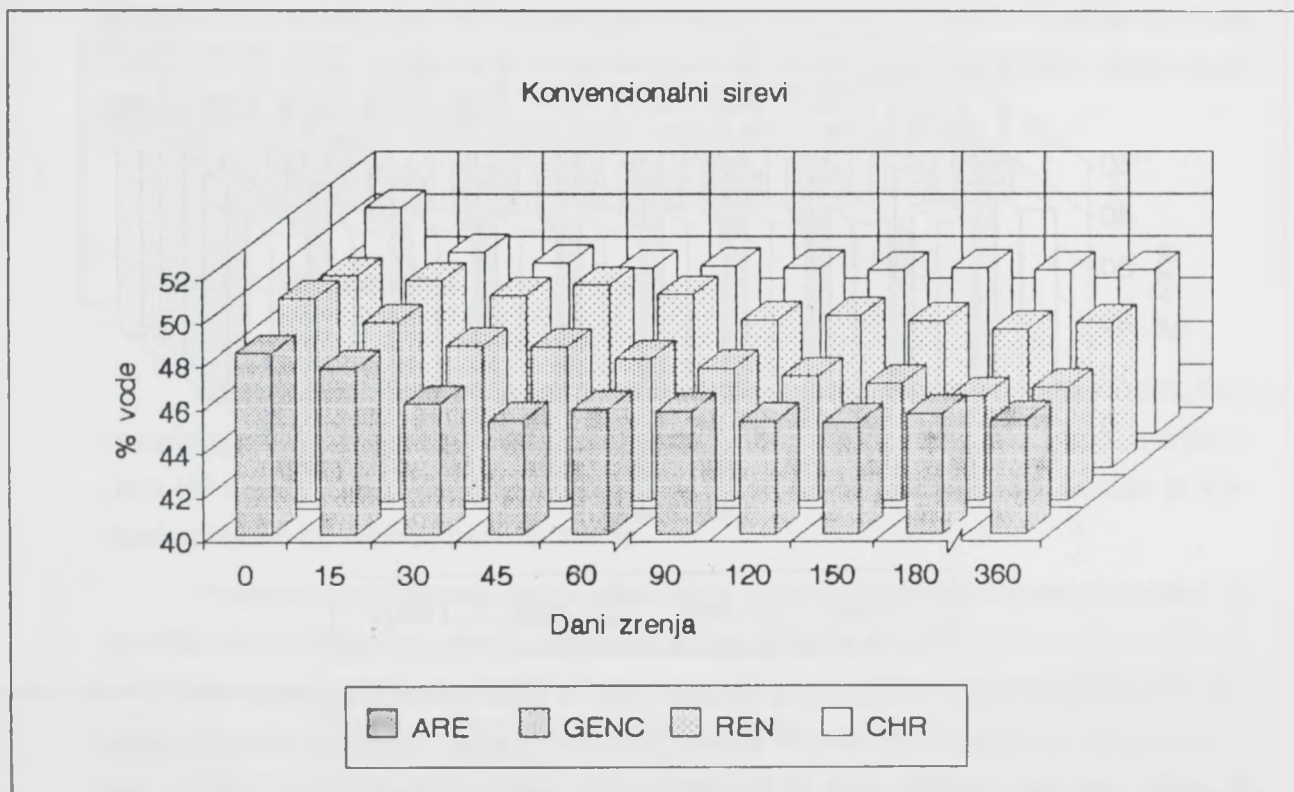
Promene aktivne kiselosti (pH vrednost) su u skladu sa promenama titracione kiselosti analognih uzoraka tokom čedarizacije i termičke obrade gruša. pH vrednost sirnog testa nakon termičkog tretmana ima veliki uticaj na reološke karakteristike sira. Pri pH vrednostima 5.2-5.3 menja se karakter proteinskog matriksa i testo pokazuje sposobnost istezanja što je karakteristično za Kačkavalj i druge sireve iz grupe „Pasta Filata“<sup>10</sup> Dobijene pH vrednosti čedarizovane grude prikazane u tabeli 13 i 14 su uglavnom u granicama literaturnih podataka i kreću se od minimalnih vrednosti 5.2 i 5.28 kod konvencionalnog i UF uzorka ARE, respektivno, do maksimalne vrednosti pH = 5.4 kod konvencionalnog uzorka GENC.

#### 4.4. PROMENE SADRŽAJA POJEDINIH KOMPONENATA ISPITIVANIH KONVENCIONALNIH I UF SIREVA TOKOM ZRENJA

##### 4.4.1. Voda

Sadržaj vode u siru značajno utiče na tok i intenzitet biohemijskih promena tokom zrenja.<sup>10, 28, 82</sup>

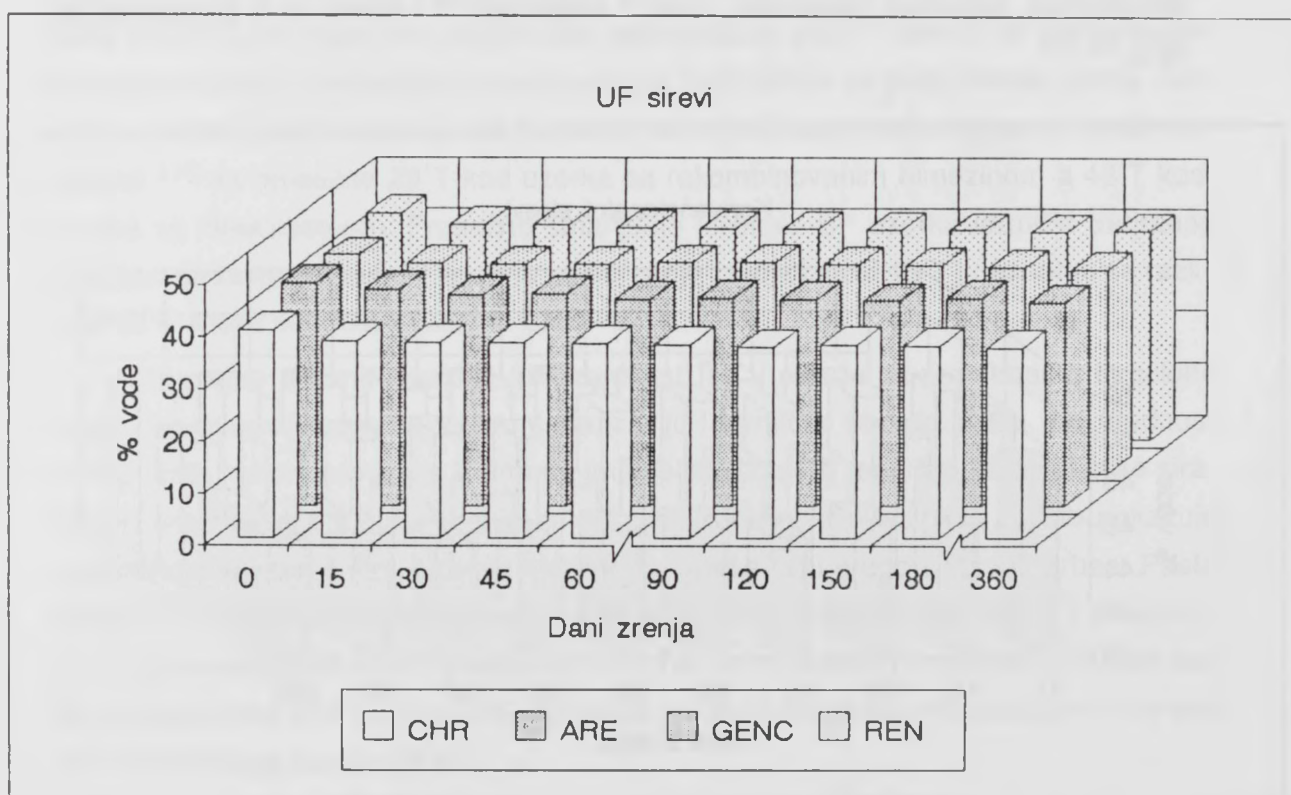
Sadržaj vode, odnosno suve materije, u Kačkavalju zavisi od varijeteta tj. vrste mleka iz kojeg se proizvodi (kravlje, ovčje, kozje ili mešano; sirovo ili pasterizovano) i tehnološkog postupka (balkanski, ruski i italijanski)<sup>176</sup> i kreće se u granicama 35 - 42%.<sup>10, 176</sup>



Slika 42. Promene sadržaja vode u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 42. Changes of water content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 42 i 43, razlike u sadržaju vode konvencionalnih i UF sireva su rezultat ranije opisanih promena sastava sirnog gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje eksperimentalnih sireva. U seriji konvencionalnih sireva (slika 42) primenom animalnog i genetskog himozina proizvedeni su sirevi približnog sadržaja vode 50.53% i 49.32% respektivno, što je saglasno literaturnim podacima za Cheddar<sup>46, 207</sup> imajući u vidu istu strukturu i funkcionalne osobine tradicionalnog i rekombinovanog himozina. Sa slike 42. se takođe može zaključiti da su i druga dva uzorka klasičnog Kačkavalja sadržala približnu količinu vode: uzorak ARE - 48.30% a uzorak REN - 48.88%.



Slika 43. Promene sadržaja vode u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 43. Changes of water content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Međusobno različite vrednosti sadržaja vode UF sireva (slika 43) posledica su različitog fizičko-hemijskog sastava termički tretiranog sirnog gruša (tabela 14). Minimalan sadržaj vode konstatovan je u UF Kačkavalju dobijenom primenom rennet-a (kontrolni UF sir - 39.84%) i u granicama je jedino raspoloživih literaturnih podataka za UF „Vitoša“ (~40% vode)<sup>181</sup> UF Kačkavalj dobijen primenom Rennilase sadrži maksimalnu količinu vode (43.92%) tj. 4.08% više od kontrolnog UF sira.

Tokom prvih 15 dana zrenja karakterističan je intenzivan gubitak vlage u obe grupe ispitivanih sireva koji je uzrokovan zrenjem sireva bez folije u tom vremenskom intervalu. Nakon 15 dana zrenja svi sirevi su upakovani u plastične vrećice tako da su gubici vode minimalno izraženi napretkom zrenja.

Utvrđeni relativni odnosi između pojedinih uzoraka u sadržaju vode na početku zrenja su uglavnom zadržani i tokom celokupnog ispitivanog perioda. Gubitak vlage u periodu 0-12 meseci kod konvencionalnih sireva CHR, ARE, GENC i REN iznosi: 2.95; 3.05; 4.15 i 2.45%, respektivno. Kod analognih UF sireva prosečan gubitak vlage iznosi 3.3% nakon 12 meseci zrenja.

#### 4.4.2. Mlečna mast

Analogno sadržaju vode i sadržaj mlečne masti ispitivanih sireva je različit. Tako je sadržaj mlečne masti u konvencionalnim sirevima iznosio prosečno 14.5% a u uzorcima UF sireva: CHR - 32.5%, ARE - 23%, GENC 24% i REN - 18% i ostao je konstantan tokom ispitivanog perioda zrenja.

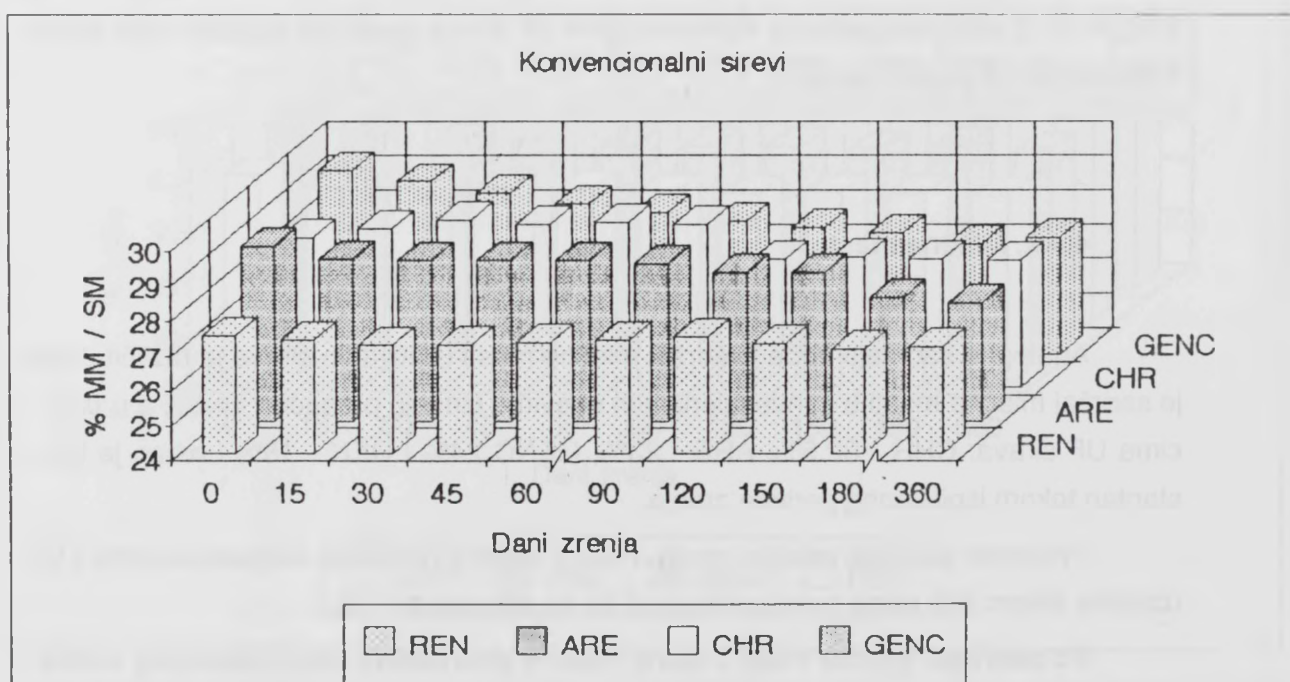
Promene sadržaja mlečne masti u suvoj materiji (MM/SM) konvencionalnih i UF uzoraka tokom 360 dana zrenja prikazane su na slikama 44 i 45.

Po sadržaju mlečne masti u suvoj materiji proizvedeni uzorci klasičnog Kačkavalja (slika 44) pripadaju grupi polumasnih sireva<sup>169</sup> (min 25% MM/SM). Nasuprot tome, uzorci UF Kačkavalja (slika 45) sadrže od 32.10% MM/SM (uzorak REN) do 54.02% MM/SM (uzorak CHR). Ovakve signifikantne razlike u koncentraciji MM/SM UF sireva u odnosu na klasične analoge, kao i između pojedinačnih uzoraka u okviru iste grupe (UF serija), posledica su primarno različitog sadržaja masti u mleku (1.5%) i retentatu (6.9%) koji su korišćeni za proizvodnju eksperimentalnih sireva, kao i gubitka masti pri termičkoj obradi čedarizovane grude.

Poznato je da je gel nastao koagulacijom UF retentata krtiji, lomljiviji, teže zadržava mlečnu mast i vlagu u odnosu na tradicionalni.<sup>129, 137, 182</sup> Takođe i specifičnost

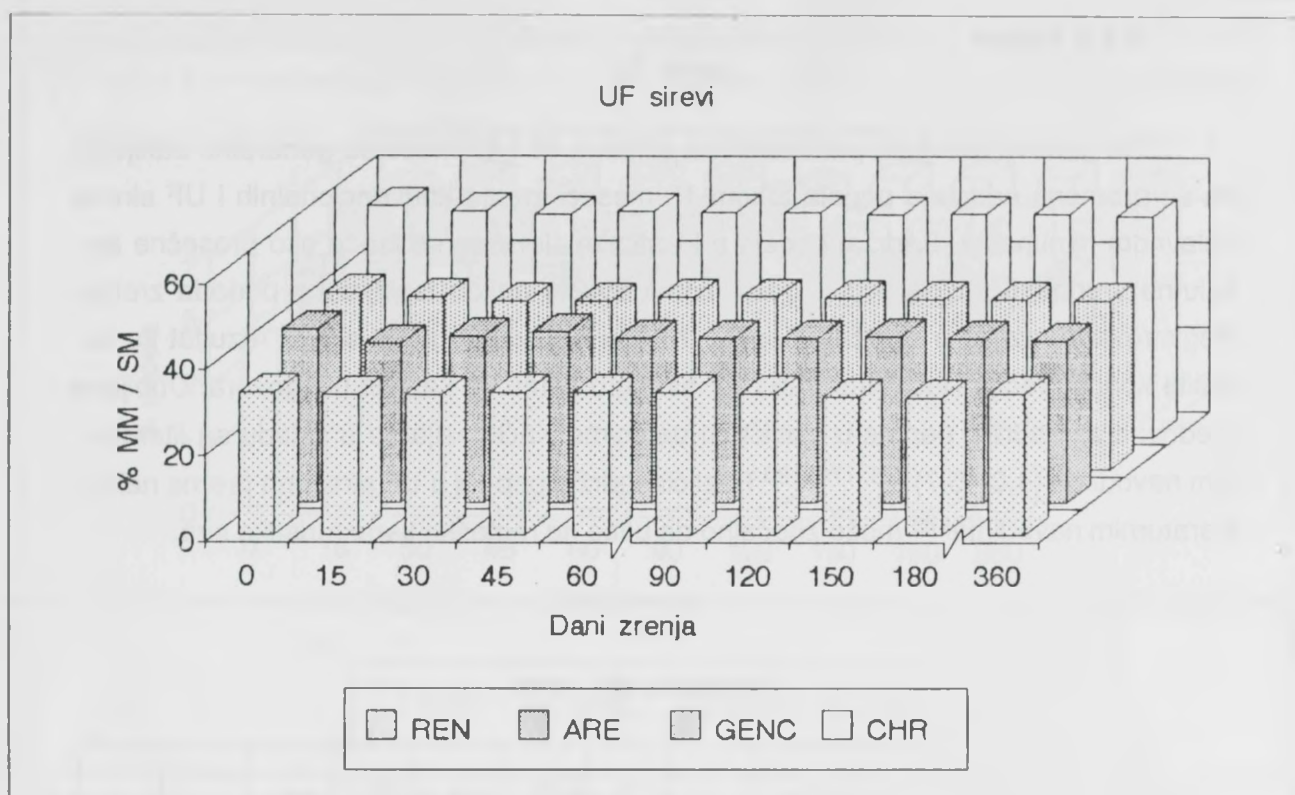
tehnologije Kačkavalja, u odnosu na druge tvrde sireve (npr. Cheddar) je dodatni razlog, pored vrste koagulišućeg enzima, što su registrovane navedene vrednosti sadržaja mlečne masti u suvoj materiji UF sireva (slika 43).

Koncentracija mlečne masti u suvoj materiji ispitivanih konvencionalnih i UF sireva nije se signifikantno menjala tokom zrenja što je uočljivo iz prikazanih rezultata na slikama 44 i 45. Izrazitije variranje sadržaja mlečne masti u suvoj materiji tokom 15 dana zrenja je u analogiji sa konstatovanim promenama sadržaja vode odnosno suve materije. Nakon 360 dana zrenja klasičnih sireva sadržaj mlečne masti u suvoj materiji prosečno iznosi 27.37% a kod UF analoga se kreće u granicama od maksimalno 51.80% u uzorku CHR do minimalno 32.74% u uzorku REN.



Slika 44. Promene sadržaja mlečne masti u suvoj materiji (MM/SM) u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 44. Changes of milk fat content in total solids of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 45. Promene sadržaja mlečne masti u suvoj materiji (MM/SM) u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

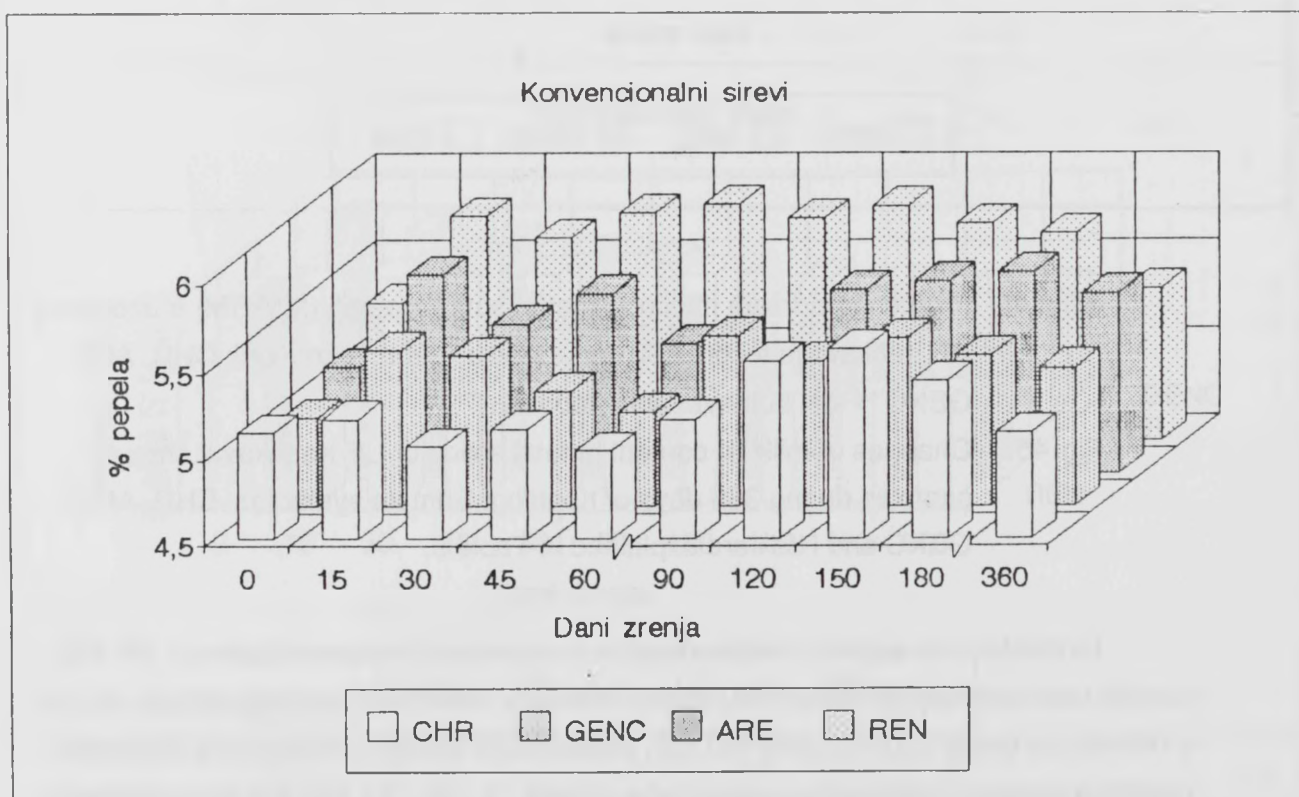
Fig. 45. Changes of milk fat content in total solids of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Evidentno niži sadržaj mlečne masti u suvoj materiji konvencionalnog i UF Kačkavalja proizvedenog primenom *M. miehei* proteaze tokom celokupnog perioda zrenja u odnosu na druge uzorke (slike 44 i 45), posledica je većeg gubitka masti tokom tehnološkog procesa proizvodnje ovog uzorka (tabela 11, 12, 13 i 14), što se sa ekonomskog aspekta negativno odražava na randman sira. Dobijeni rezultati su potvrda u literaturi konstatovane drugačije aktivnosti mikrobiološkog koagulansa Rennilase i himozina u tehnološkom procesu proizvodnje Cheddar-a i Gouda-e.<sup>30, 31, 36, 183, 184</sup>



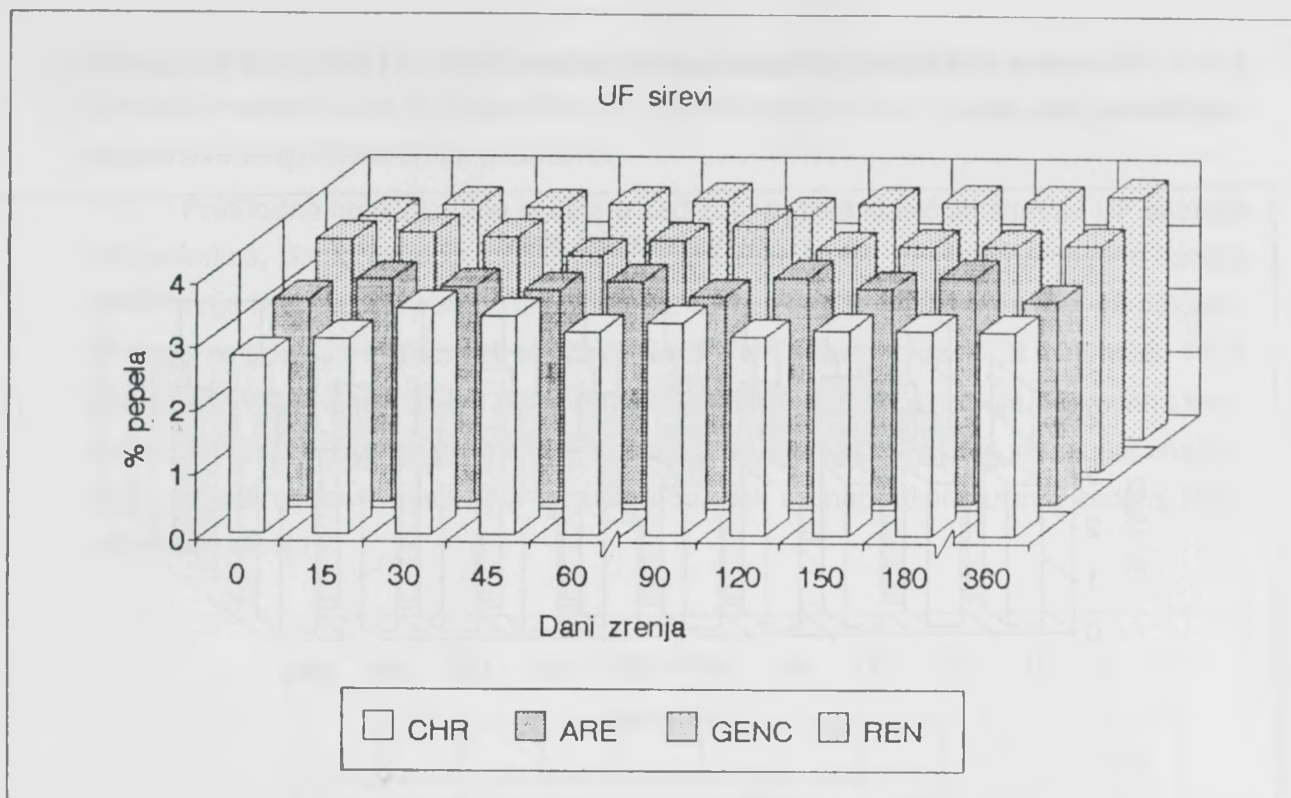
#### 4.4.3. Pepeo

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 46 i 47 može se generalno zaključiti da su promene sadržaja pepela tokom 12 meseci zrenja konvencionalnih i UF sireva uglavnom minimalne. Sadržaj pepela u klasičnim sirevima se kreće oko prosečne apsolutne vrednosti 5.33% a u UF analogima 3.42% nakon ispitivanog perioda zrenja. Registrovane razlike u sadržaju pepela između ispitivanih grupa sireva rezultat su različite koncentracije NaCl klasičnih i UF sireva o čemu će kasnije biti govora. Dobijene vrednosti za sadržaj pepela u klasičnim uzorcima Kačkavalja su u skladu sa literaturnim navodima (4.0 - 5.7)<sup>176, 179, 180</sup> Različiti sadržaj pepela u UF sirevima prema nekim literaturnim navodima<sup>185</sup> može značajno da utiče na reološke karakteristike sira.



Slika 46. Promene sadržaja pepela u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 46. Changes of ash content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



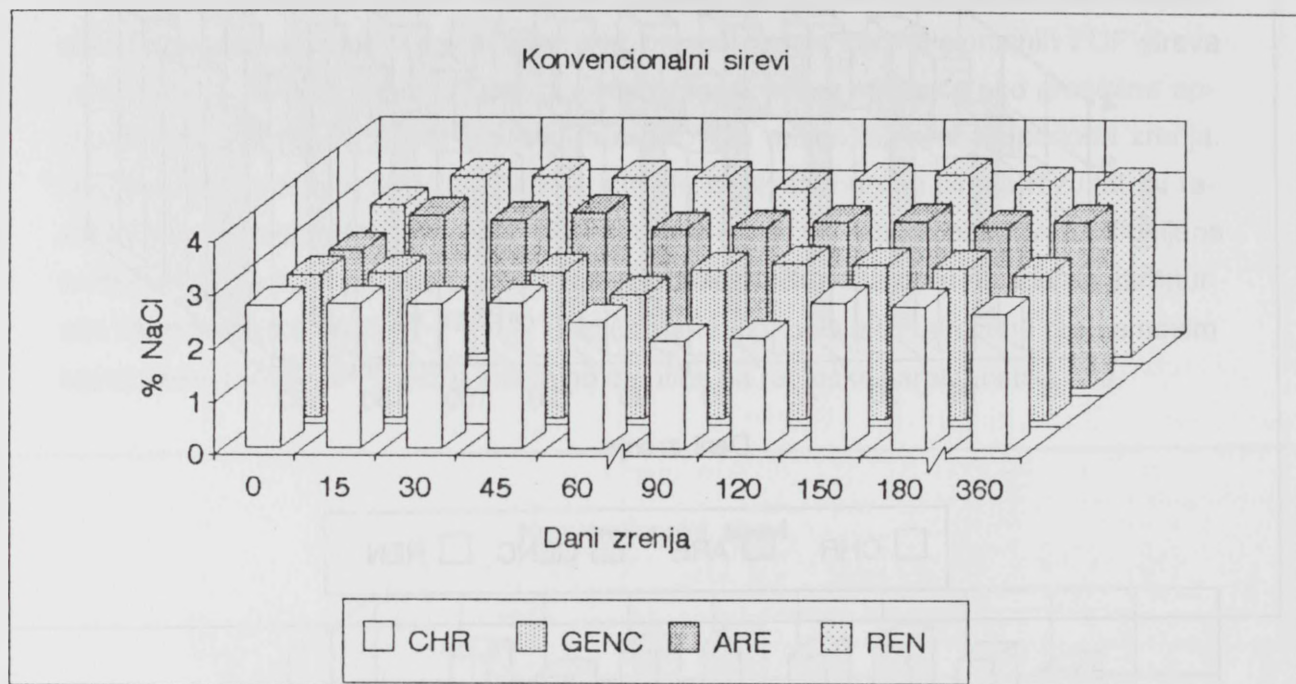
Slika 47. Promene sadržaja pepela u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 47. Changes of ash content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.4. NaCl

Koncentracija NaCl u siru je relevantan faktor koji utiče na intenzitet promena komponenata tokom zrenja sira. Kompleksnost uloge NaCl se ogleda u regulisanju gubitka vlage u siru (aktivnost vode -  $A_w$ ) odnosno kontroli aktivnosti enzima prisutnih u siru (starter kulture, endogenih enzima i rezidua koagulišućih agenasa). Generalno posmatrano, sadržaj vlage u siru zavisi od stepena apsorpcije i/ili difuzije soli.<sup>80</sup> Aktivnost startera i njihova sposobnost da fermentišu rezidualnu laktozu i stimulišući efekat soli na aktivnost himozina i drugih koagulanasa isključivo zavisi od nivoa NaCl u vodi koji prema literaturnim navodima, maksimalno iznosi do 5%.<sup>80</sup>

Promena sadržaja NaCl tokom zrenja konvencionalnih i UF sireva prikazana je na slikama 48 i 49.



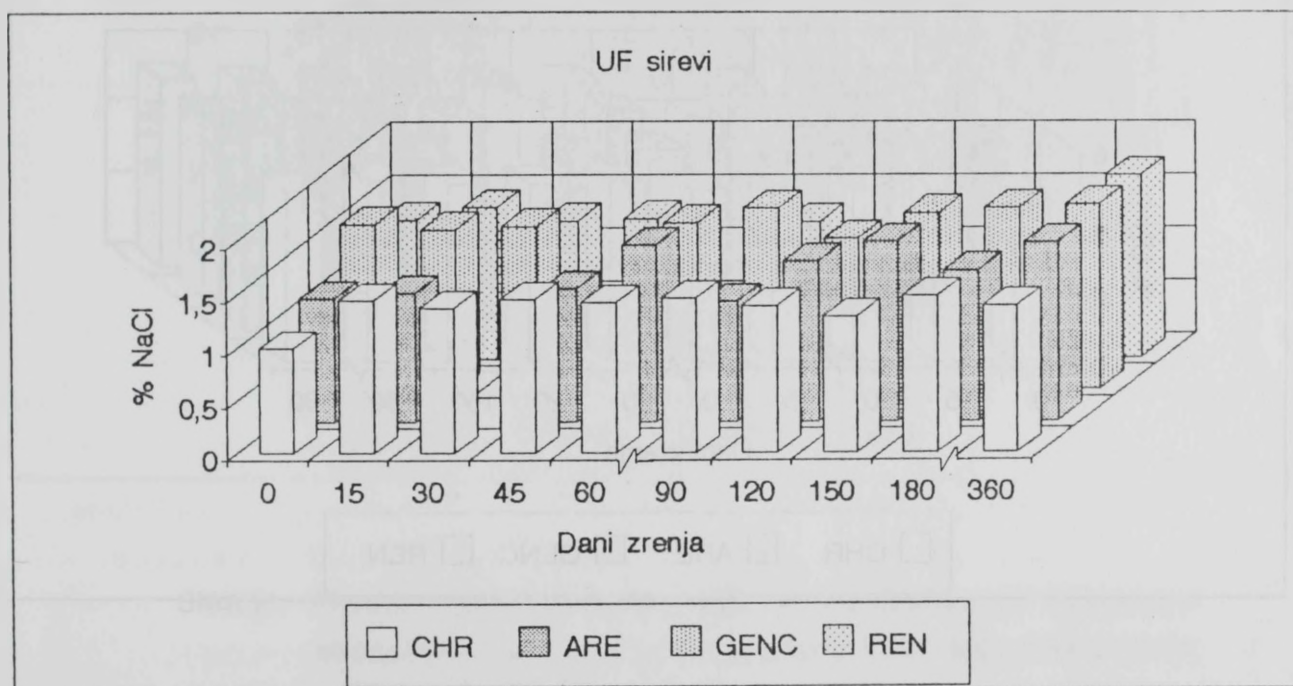
Slika 48. Promene sadržaja NaCl u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 48. Changes of NaCl content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Analogno ostalim makro komponentama prema literaturnim navodima, i sadržaj NaCl u klasičnom Kačkavalju varira u zavisnosti od varijeteta i kreće se u granicama od 2.0 do 4.5%.<sup>10, 176</sup> Evidentno je, iz rezultata prikazanih na slici 48, da u konvencionalnim sirevima prosečna koncentracija NaCl iznosi 2.65% na početku zrenja. Nakon 15 dana došlo je do intenzivnijeg povećanja sadržaja NaCl u uzorku ARE i REN (0.67% i 0.56%, respektivno više NaCl u odnosu na početne vrednosti) nego kod druga dva uzorka, što je u saglasnosti sa rezultatima suve materije istih sireva. Napretkom perioda zrenja registrovane su minimalne promene sadržaja NaCl kod ispitivanih konvencionalnih sireva, pri čemu uzorak CHR i GENC sadrži približno iste količine (2.57 i 2.70%) a uzorak ARE i REN 3.10 i 3.22% NaCl, respektivno na kraju perioda zrenja. Prema

tome, prikazane apsolutne vrednosti za promenu sadržaja NaCl konvencionalnih sireva (slika 48) minimalno se razlikuju između pojedinih uzoraka kao i tokom zrenja i u skladu su sa navedenim literaturnim podacima.

Prethodno konstatovane razlike u sadržaju pepela klasičnih sireva i UF analoga su posledica, pored ostalog, i različite koncentracije NaCl. UF sirevi prosečno sadrže 50% manje NaCl od konvencionalnih sireva. Iz rezultata prikazanih na slici 49 očigledno je da se apsolutne vrednosti sadržaja NaCl u UF sirevima kreću od minimalno 1% u uzorku CHR do maksimalno 1.57% u uzorku GENC na početku zrenja. Povećana koncentracija NaCl u svim ispitivanim UF sirevima nakon 15 dana zrenja je rezultat značajnijeg povećanja suve materije u tom periodu, dok se napretkom zrenja sadržaj NaCl nije bitnije menjao.



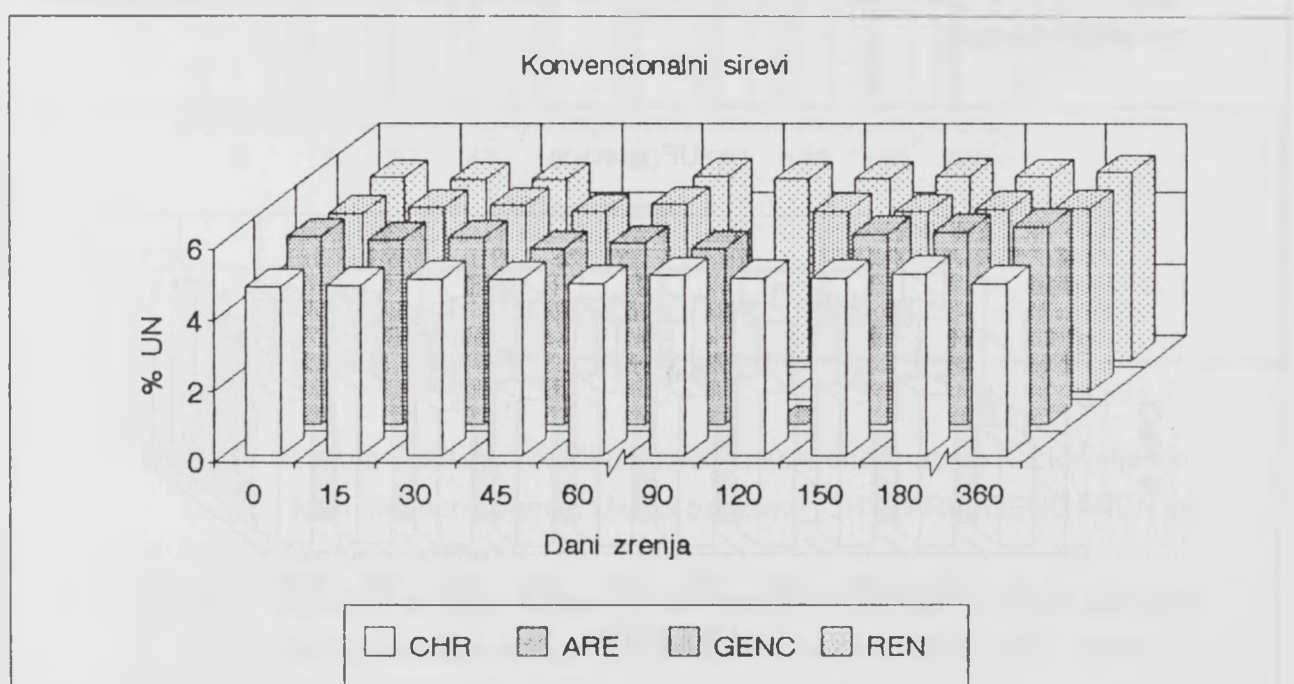
Slika 49. Promene sadržaja NaCl u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 49. Changes of NaCl content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.5. Promene sadržaja proteinskih frakcija

##### 4.4.5.1. Ukupni azot

Promena sadržaja ukupnog azota u apsolutnom iznosu konvencionalnih i UF sireva tokom 360 dana zrenja prikazana je histogramski na slikama 50 i 51, dok je analogna promena sadržaja ukupnih proteina u suvoj materiji (UP/SM) data na slikama 52 i 53.

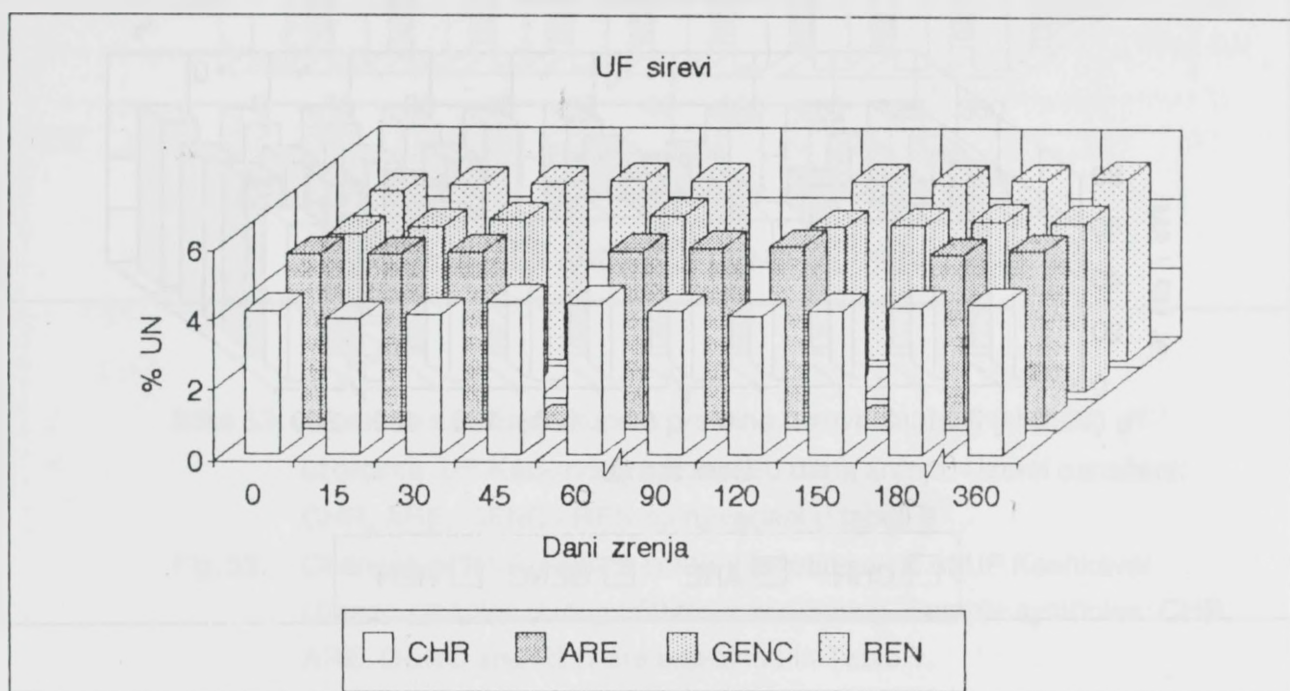


Slika 50. Promene sadržaja ukupnog azota (UN) u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 50. Changes of total nitrogen content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Kao što se vidi iz prikazanih rezultata (slike 50 i 51) UF sirevi sadrže prosečno 9.7% manje ukupnog N u odnosu na klasične uzorke na startu zrenja. Međutim, navedene razlike u koncentraciji ukupnog N nisu signifikantne da bi bitno uticale na tok

zrenja ispitivanih sireva. Registrovani podaci za apsolutne vrednosti ukupnog azota su u saglasnosti sa relativnim odnosima sadržaja vode odnosno suve materije konvencionalnih i UF sireva, i kreću se u granicama literaturnih podataka (19.60 - 26.0% ukupnih proteina).<sup>176, 177, 178, 179, 180, 181</sup> Tokom 360 dana zrenja koncentracija ukupnog N svih sireva se minimalno menja pokazujući tendenciju blagog povećanja vrednosti, što je posledica povećanja sadržaja suve materije, odnosno gubitka vode konvencionalnih i UF sireva u ispitivanom periodu zrenja.

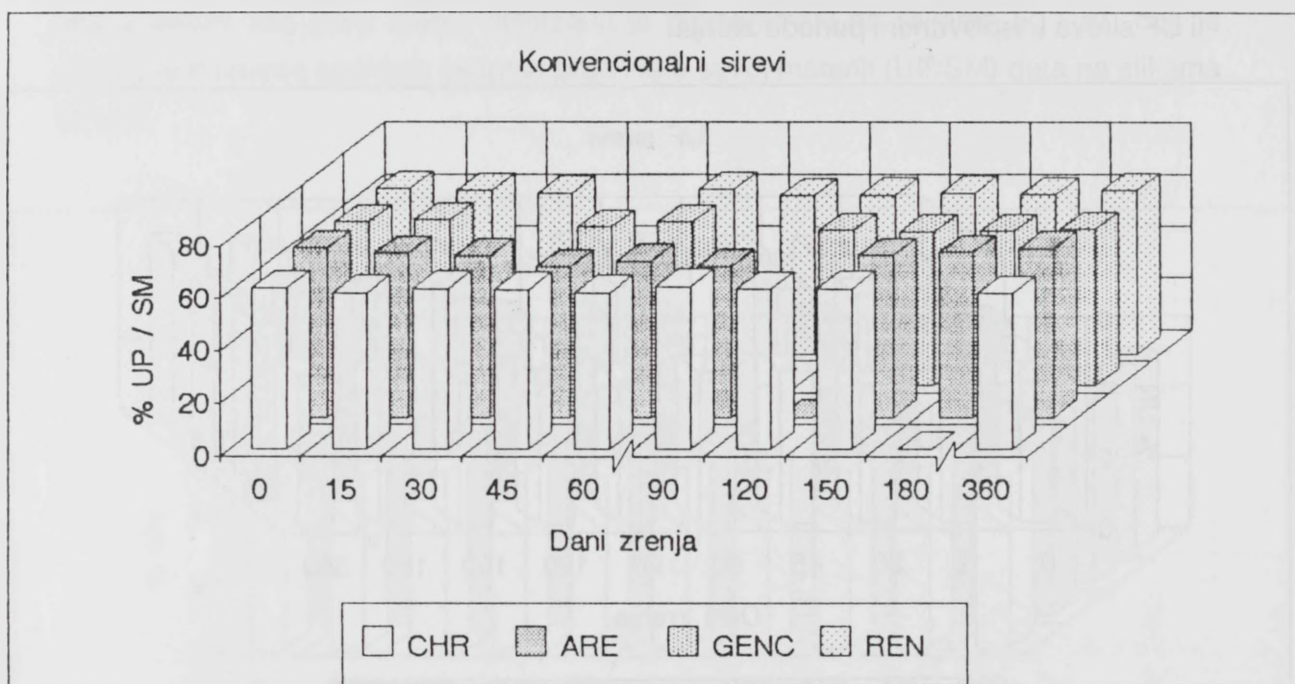


Slika 51. Promene sadržaja ukupnog azota (UN) u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 51. Changes of total nitrogen content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

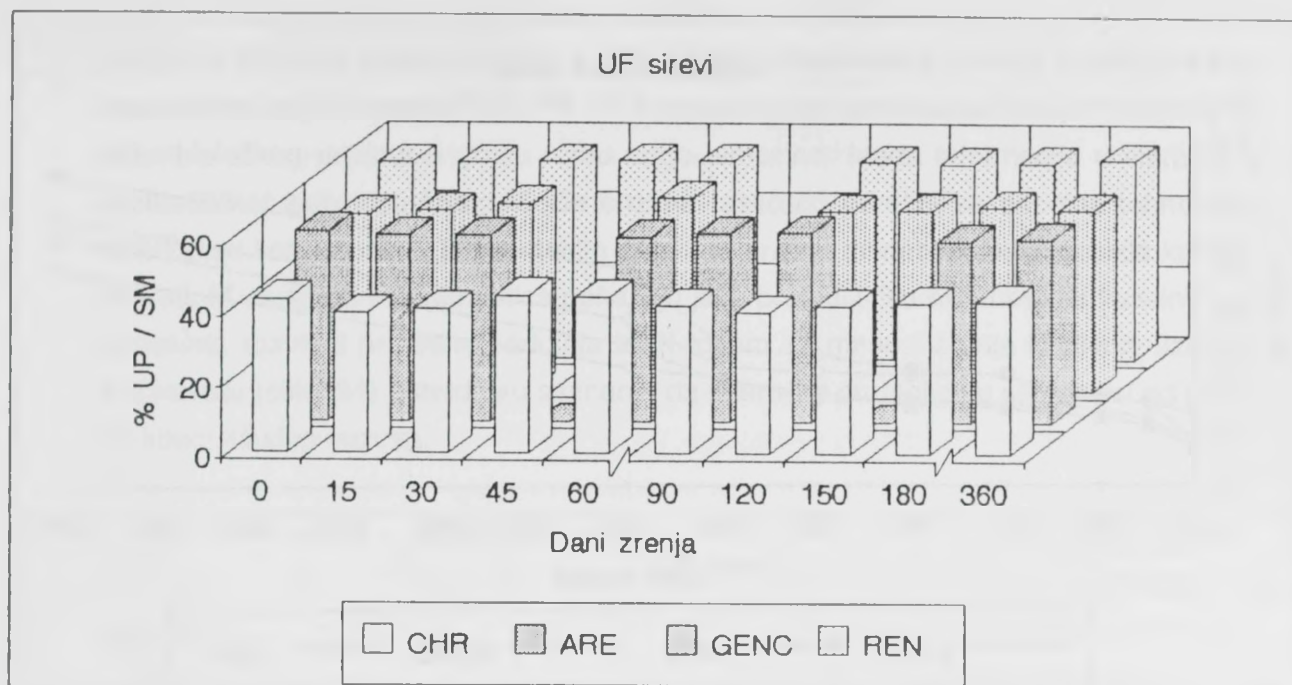
Manji sadržaj ukupnih proteina u suvoj materiji u seriji UF uzoraka sira (slika 53) je rezultat veće suve materije a nižeg sadržaja UN ove grupe sireva u odnosu na ispitivane analogne klasične varijante. Tokom zrenja, trend promena koncentracije ukupnih proteina u suvoj materiji klasičnih i UF sireva je saglasan promenama ukupnog azota i suve materije. Tako je, na kraju perioda zrenja (1 godina) sadržaj ukupnih proteina u

suvoj materiji bio najmanji kod kontrolnog klasičnog i UF sira (uzorci sa animalnim hi-mozinom) i iznosio 59.14 i 43.10%, respektivno. Konvencionalni Kačkavalj sa dodatim proteolitičkim i lipolitičkim enzimima za ubrzanje zrenja (uzorak ARE) sadržao je mak-simalnu količinu UP/SM - 64.63% dok je u UF seriji Kačkavalj dobijen primenom Renni-lase (uzorak REN) sadržao maksimalno 56.56% UP/SM nakon 360 dana zrenja.



Slika 52. Promene sadržaja ukupnih proteina u suvoj materiji (UP/SM) u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 52. Changes of total proteins content in total solids of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



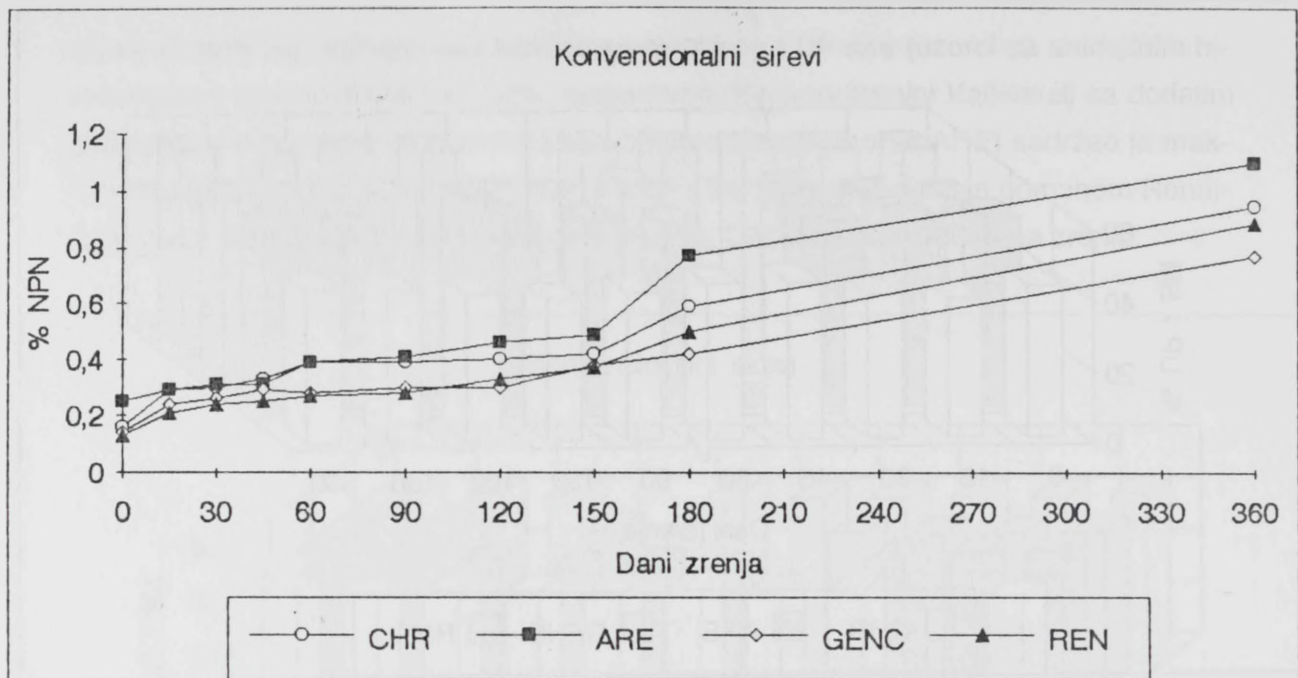
Slika 53. Promene sadržaja ukupnih proteina u suvoj materiji (UP/SM) u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 53. Changes of total proteins content in total solids of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.5.2. Nепroteinski azot

Promena sadržaja neproteinskog azota (NPN, azotne frakcije rastvorljive u 12%-noj trihlorsirćetnoj kiselini) tokom zrenja konvencionalnih i UF sireva, kao važnog indikatora stepena degradacije proteina, prikazane su dijagramski na slikama 54 i 55. Iz prikazanih rezultata evidentan je konstantan porast koncentracije neproteinskog azota u svim uzorcima Kačkavalja dobijenog klasičnom tehnologijom i primenom ultrafiltracije. Međutim, intenzitet povećanja sadržaja NPN razlikuje se kod klasičnih (slika 54) i UF uzoraka (slika 55) sira. Očigledno, tehnološki proces proizvodnje Kačkavalja (klasični i UF), vrsta koagulišućih enzima, dodati „koktel“ enzima za ubrzanje zrenja i termička obrada zrelog (čedarizovanog) grušča uticali su na različit intenzitet proteolize u ispitivanim klasičnim i UF sirevima.





Slika 54. Promene sadržaja neproteinskog azota (NPN) u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

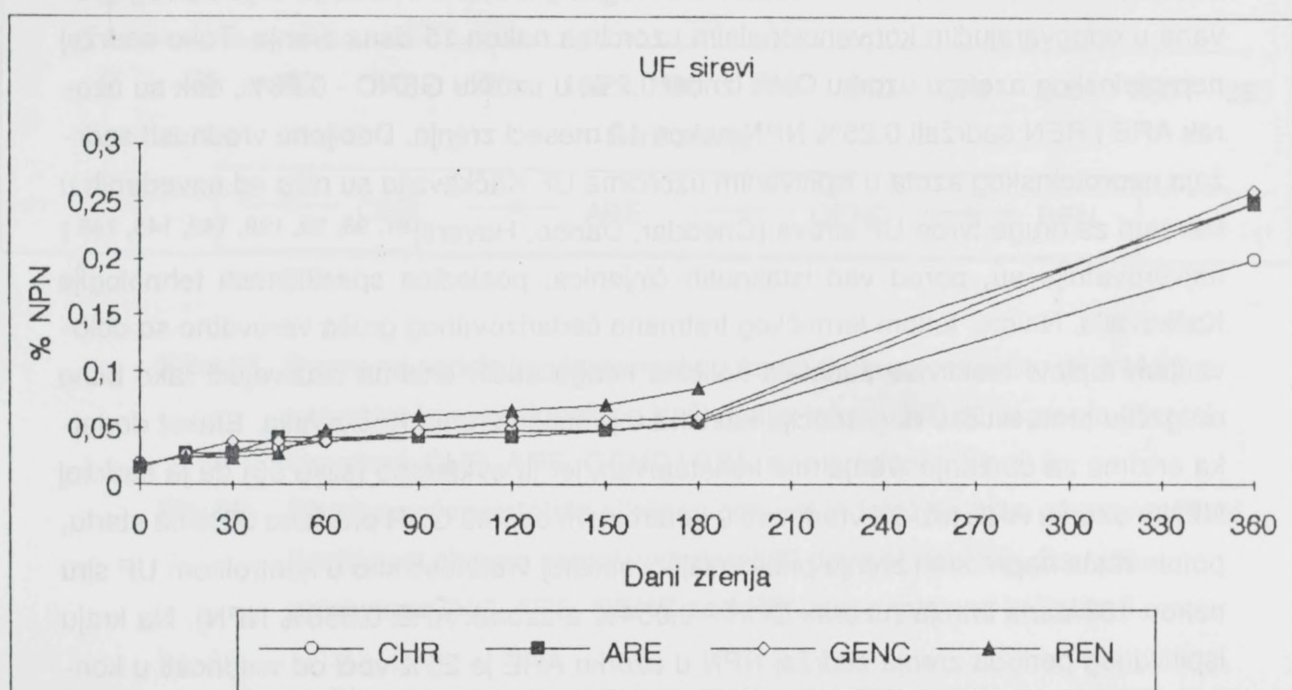
Fig. 54. Changes of nonprotein nitrogen (NPN) content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

U grupi konvencionalnih sireva, uzorak ARE tretiran Accelase-om i Palatase-om, proteolitičkim i lipolitičkim enzimima za ubrzanje zrenja, prema očekivanju, sadrži najveću količinu neproteinskog azota tokom celokupnog ispitivanog perioda zrenja (0.28% na početku i 1.10% nakon 360 dana zrenja) pri čemu ukupno povećanje iznosi 4.4 puta u odnosu na početnu vrednost (slika 54).

Sadržaj NPN u klasičnom Kačkavalju sa genetski modifikovanim himozinom (uzorak GENC) je približan vrednostima u kontrolnom uzorku (uzorak CHR) do 150 dana zrenja, dok se sa napretkom zrenja menja, pokazujući niže apsolutne vrednosti za prosečno 25% (slika 54). Dobijene vrednosti su potvrda dosadašnjih saznanja o minimalnim razlikama tokom zrenja ispitivanih polutvrdih i tvrdih sireva dobijenih primenom rekombinovanog himozina<sup>7, 42, 43, 44, 46</sup> i standardnog himozina.

Niže vrednosti neproteinskog azota u uzorku konvencionalnog Kačkavalja dobijenog primenom *M. miehei* proteaze (uzorak REN) u odnosu na kontrolni sir (uzorak

CHR) za 20% na početku zrenja i 10% na kraju ispitivanog perioda u skladu su sa rezultatima brojnih autora<sup>38, 69, 184, 186</sup> i verovatno su uzrokovane manjom retencijom mikrobiološkog enzima u gršu i siru nego himozina. Mada informacije u literaturi o proteolitičkoj aktivnosti koagulišućih enzima različitog porekla sa aspekta tehnologije sira<sup>36</sup> nisu konzistentne, jer po nekim autorima enzimi mikrobiološkog porekla kao *M. miehei*, *M. pussilus* i *E. parasitica* pokazuju jaču proteolitičku aktivnost na kazein<sup>56</sup> od himozina, rezultati promene sadržaja NPN tokom 12 meseci zrenja klasičnih uzoraka Kačkavalja (slika 54) potvrda su saznanja da intenzitet proteolize u siru zavisi od prirode koagulišućeg enzima.



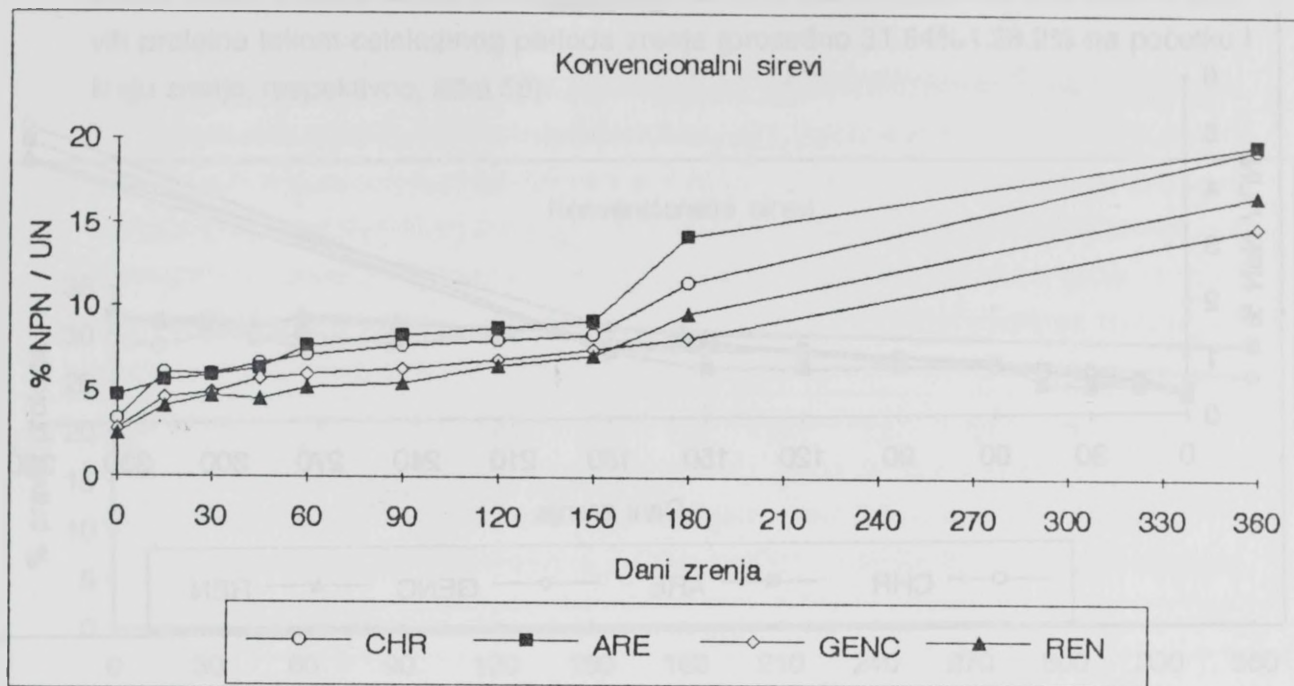
Slika 55. Promene sadržaja neproteinskog azota (NPN) u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 55. Changes of nonprotein nitrogen (NPN) content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Sa slike 55 vidljive su značajno niže vrednosti sadržaja NPN u svim UF sirevima što ukazuje na usporeni tok proteolize ispitivanih uzoraka UF Kačkavalja. Usporeno zrenje polutvrdih i tvrdih UF sireva, koje su konstatovali brojni istraživači, pripisuje se

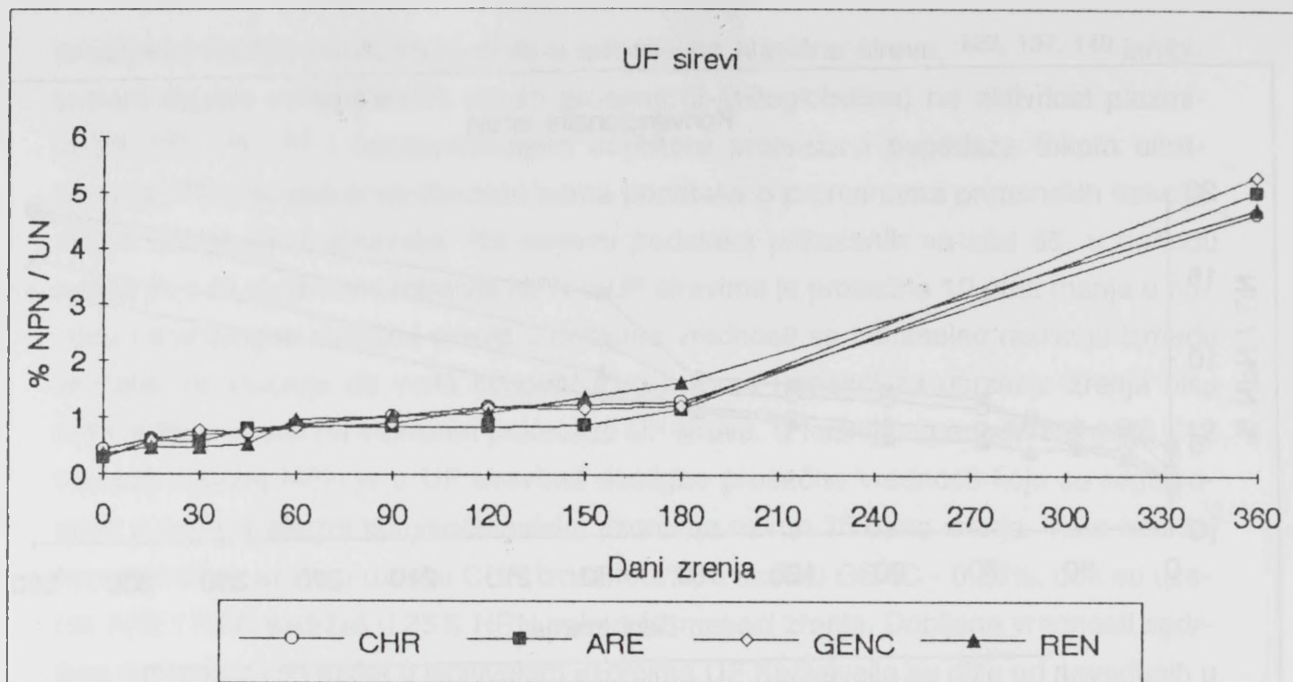
smanjenoj količini rezidualnog sirila u odnosu na klasične sireve, <sup>129, 137, 140</sup> inhibi-  
tornom dejstvu inkorporiranih serum proteina ( $\beta$ -laktoglobulina) na aktivnost plazmi-  
na<sup>143, 145, 146, 164</sup> i koncentrisanjem inhibitora proteaza i peptidaza tokom ultra-  
filtracije.<sup>139</sup> U dosadašnjoj literaturi nema podataka o promenama proteinskih frakcija  
tokom zrenja UF Kačkavalja. Na osnovu podataka prikazanih na slici 55, u periodu  
zrenja do 180 dana koncentracija NPN u UF sirevima je prosečno 10 puta manja u od-  
nosu na analogne klasične sireve a dobijene vrednosti se minimalno razlikuju između  
uzoraka što ukazuje da vrsta koagulišućeg enzima i enzimi za ubrzanje zrenja nisu  
signifikantno uticali na intenzitet proteolize UF sireva. U kasnijem periodu zrenja (6 - 12  
meseci) sadržaj NPN je u UF sirevima dostigao prosečne vrednosti koje su registro-  
vane u odgovarajućim konvencionalnim uzorcima nakon 15 dana zrenja. Tako sadržaj  
neproteinskog azota u uzorku CHR iznosi 0.2%, u uzorku GENC - 0.26%, dok su uzo-  
rak ARE i REN sadržali 0.25% NPN nakon 12 meseci zrenja. Dobijene vrednosti sadr-  
žaja neproteinskog azota u ispitivanim uzorcima UF Kačkavalja su niže od navedenih u  
literaturi za druge tvrde UF sireve (Cheddar, Danbo, Havarti)<sup>97, 98, 99, 129, 143, 145, 146</sup> i  
najverovatnije su, pored već istaknutih činjenica, posledica specifičnosti tehnologije  
Kačkavalja. Naime, tokom termičkog tretmana čedarizovanog grušta verovatno se delo-  
vanjem toplote inaktiviše zaostala količina koagulišućih enzima izazivajući tako bitno  
drugačiju proteolitičku degradaciju kazeina u procesu zrenja Kačkavalja. Efekat dodat-  
ka enzima za ubrzanje zrenja nije konstatovan, jer je evidentno (slika 55) da je sadržaj  
NPN u uzorku ARE niži od vrednosti u kontrolnom uzorku CHR približno 30% na startu,  
potom raste napretkom zrenja približavajući se istoj vrednosti kao u kontrolnom UF siru  
nakon 180 dana zrenja (uzorak CHR - 0.054% a uzorak ARE 0.056% NPN). Na kraju  
ispitivanog perioda zrenja sadržaj NPN u uzorku ARE je 25% veći od vrednosti u kon-  
trolnom UF siru. Mogući razlog nedovoljno izraženog efekta dodatka proteolitičkog en-  
zima Accelase na ubrzanje zrenja UF Kačkavalja može biti loša distribucija enzima,  
gubitak aktivnosti tokom termičkog tretmana zrele grude ili nedovoljna količina enzim-  
skog preparata.

Ukoliko se dobijene apsolutne vrednosti neproteinskog azota prikažu kao pro-  
mena sadržaja NPN u ukupnom azotu ispitivanih sireva (NPN/UN), što je dato na sli-  
kama 56 i 57, dobija se pravilno povećanje ove komponente tokom zrenja konvencio-  
nalnih sireva (slika 56), za razliku od UF analoga kod kojih je iz već opisanih razloga  
intenzitet povećanja sadržaja NPN/UN veoma slabo izražen (slika 57). Relativni odnosi  
sadržaja NPN/UN između pojedinih varijeteta Kačkavalja proizvedenih klasičnom i UF  
tehnologijom nisu se menjali tokom zrenja i u saglasnosti su sa dinamikom sadržaja  
neproteinskog azota odgovarajućih uzoraka.



Slika 56. Promene sadržaja neproteinskog azota u ukupnom azotu (NPN/UN) u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 56. Changes of nonprotein nitrogen content in total nitrogen of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 57. Promene sadržaja neproteinskog azota u ukupnom azotu (NPN/UN) u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

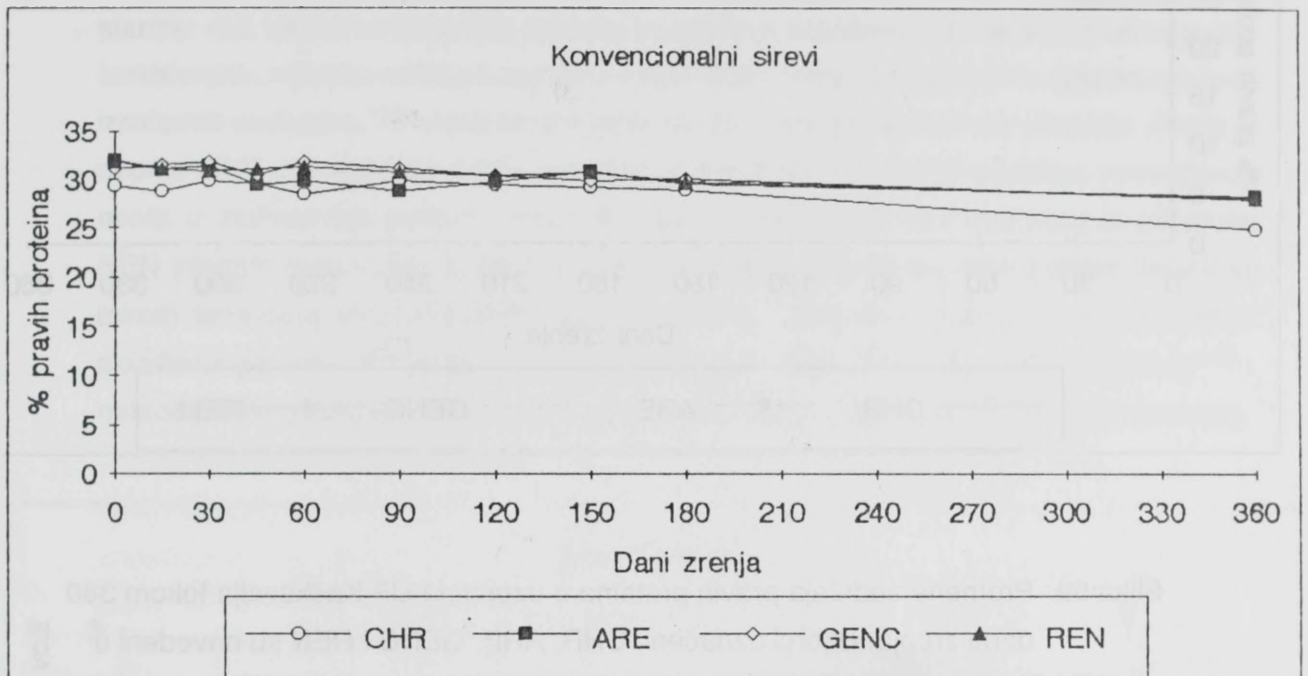
Fig. 57. Changes of nonprotein nitrogen content in total nitrogen of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.5.3. Pravi proteini

Na slikama 58 i 59 prikazane su promene sadržaja pravih proteina tokom zrenja ispitivanih sireva, frakcije koju sačinjavaju slobodne aminokiseline i drugi sekundarni produkti dekompozicije proteina.

Dobijene vrednosti su u direktnoj korelaciji sa sadržajem ukupnog azota i frakcije neproteinskog azota u pojedinim fazama zrenja konvencionalnih i UF sireva i suprotne su tendenciji kretanja sadržaja neproteinskog azota. Naime, utvrđeno je nepravilno opadanje koncentracije pravih proteina kod svih uzoraka klasičnog Kačkavalja (slika 58). Pri tome, najintenzivniji pad vrednosti pravih proteina konstatovan je kod kontrolnog sira (uzorak CHR) sa početnih 29.35% na 24.95% nakon 360 dana zrenja zbog najmanjeg sadržaja ukupnog azota u tom uzorku u odnosu na ostale klasične

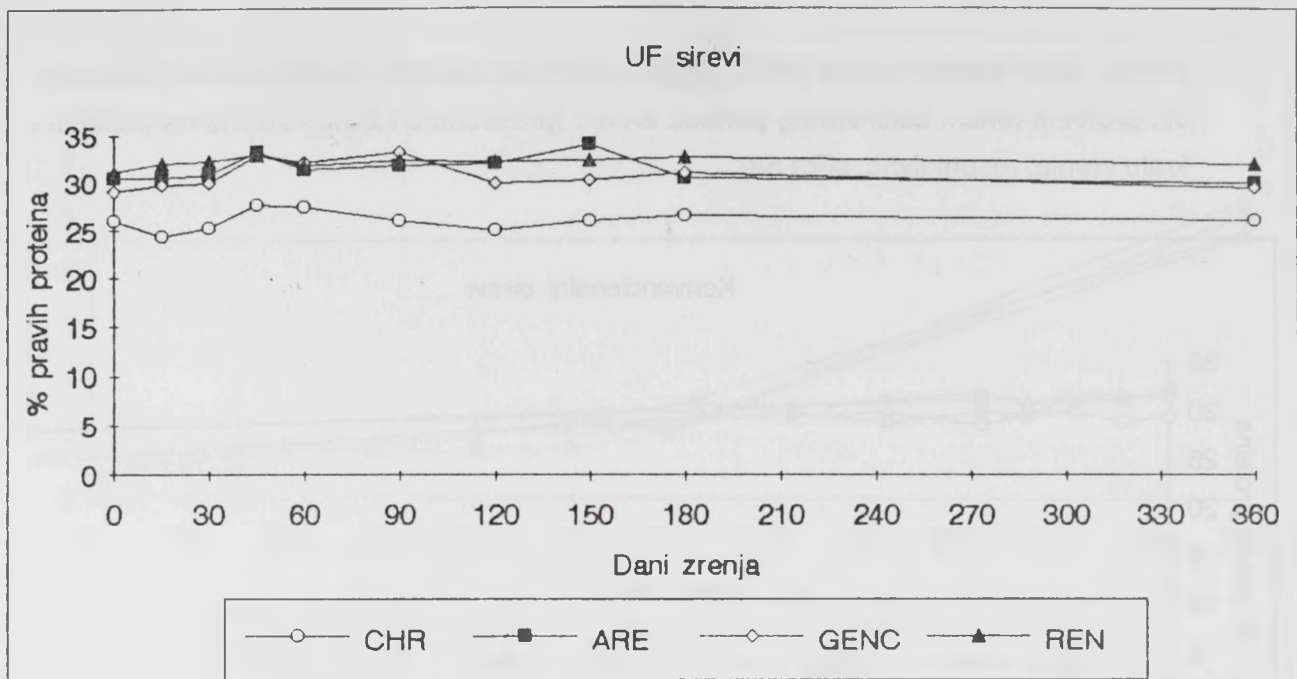
sireve. Ostali klasični uzorci (ARE, GENC i REN) su sadržali približno istu količinu pravih proteina tokom celokupnog perioda zrenja (prosečno 31.64% i 28.2% na početku i kraju zrenja, respektivno, slika 58).



Slika 58. Promene sadržaja pravih proteina u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig.58. Changes of true proteins content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Kod analognih UF sireva, evidentne su sa slike 59 kvantitativne razlike u koncentraciji pravih proteina, kao i razlike u trendu promena ove frakcije tokom zrenja, koje su posledica drugačijih apsolutnih vrednosti sadržaja neproteinskog azota ove grupe ispitivanih sireva. Upravo zbog toga sadržaj pravih proteina u svim UF uzorcima minimalno varira tokom celokupnog perioda zrenja, pri čemu je dominantan uticaj koncentracije ukupnog azota na dobijene vrednosti ove komponente.



Slika 59. Promene sadržaja pravih proteina u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

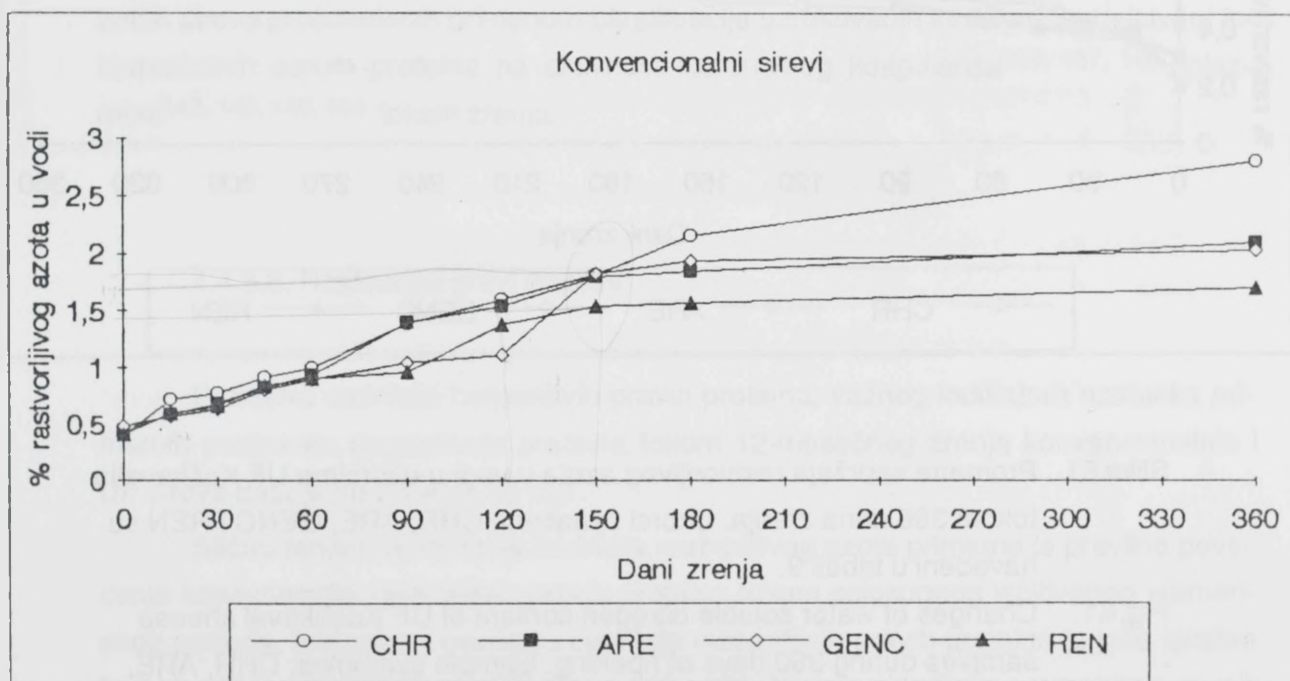
Fig. 59. Changes of true proteins content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.5.4. Rastvorljivi azot

Usporen trend rasta sadržaja rastvorljivog azota u vodi, uzrokovan inaktivacijom enzima prisutnih mikroorganizama (indogeni i/ili egzogeni) tokom termičkog tretmana čedarizovanog gruša, karakteristika je proteolize Kačkavalja.<sup>176, 178</sup> Rezultati promene sadržaja rastvorljivih azotnih materija u vodi (RN) tokom 360 dana zrenja konvencionalnih i UF sireva, prezentirani na slikama 60 i 61 to potvrđuju.

Koncentracija rastvorljivog azota u vodi kod svih varijanti ispitivanih sireva pokazuje tendenciju blagog porasta, dok je intenzitet promena varijabilan u zavisnosti od primenjenog tehnološkog postupka (klasični ili UF) i prirode korišćenih enzima. U globalu, svi konvencionalni sirevi (slika 60) sadrže prosečno 0.4% rastvorljivog azota na početku zrenja što ukazuje da je marginalan uticaj vrste enzima. Analogno sadržaju

neproteinskog azota, koncentracija ove proteinske frakcije usporeno raste do 150 dana zrenja a potom intenzivnije, dostižući maksimalnu vrednost u kontrolnom siru (uzorak CHR) 2.81% a minimalnu u siru sa Rennilase-om (uzorak REN) 1.70% na kraju zrenja. Kao što se vidi sa slike 60, slično promenama NPN, sadržaj rastvorljivog azota je konstantno niži tokom celokupnog perioda zrenja kod klasičnog Kačkavalja proizvedenog korišćenjem mikrobiološkog koagulansa Rennilase nego himozinom i u granicama je literaturnih podataka.<sup>180</sup> Interesantno je istaći da prisustvo enzima za ubrzanje zrenja u uzorku ARE nije izazvalo bitnije povećanje apsolutnih vrednosti sadržaja rastvorljivog azota u ispitivanom periodu zrenja iz razloga navedenih kod razmatranja promena NPN (dodata nedovoljna količina enzima, loša distribucija u grušu ili gubitak aktivnosti tokom termičkog tretmana čedarizovane grude), mada su u literaturi poznati primeri skraćenja perioda zrenja Kačkavalja korišćenjem lipolitičkih preparata animalnog<sup>187</sup> i mikrobiološkog porekla.<sup>188</sup> Koncentracija rastvorljivog azota u uzorku ARE je neznatno

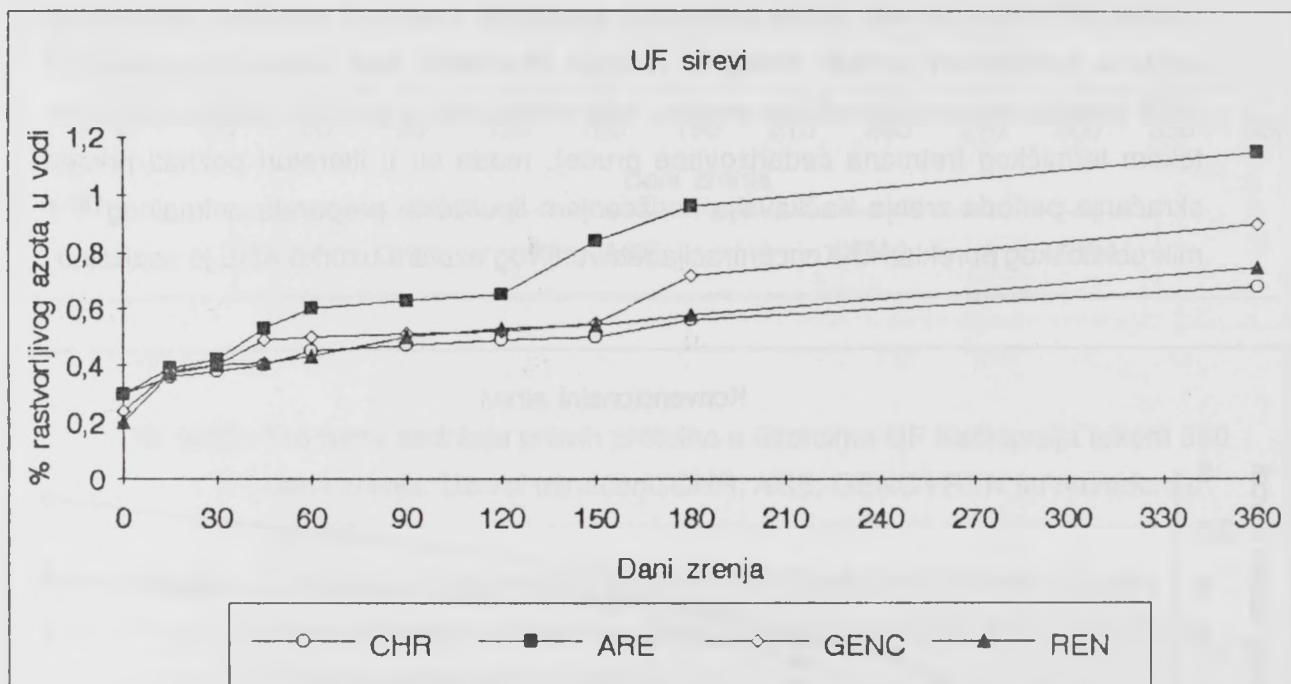


Slika 60. Promene sadržaja rastvorljivog azota u vodi u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 60. Changes of water soluble nitrogen content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



veća od vrednosti u kontrolnom uzorku na početku zrenja (0.43% umesto 0.4%, respektivno), potom različitim intenzitetom raste u pojedinim vremenskim intervalima da bi se, nakon 360 dana zrenja najviše od svih uzoraka približila vrednosti u kontrolnom siru. Utvrđene vrednosti rastvorljivog azota na kraju ispitivanog perioda zrenja klasičnih sireva su sledeće: 2.81; 2.10; 2.03 i 1.70% RN u uzorcima CHR, ARE, GENC i REN, respektivno (slika 60).



Slika 61. Promene sadržaja rastvorljivog azota u vodi u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 61. Changes of water soluble nitrogen content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Analogni UF sirevi (slika 61) sadrže prosečno 50% (uzorak GENC i REN) i 75% (uzorak CHR i ARE) manje rastvorljivog azota. Intenzitet promena sadržaja rastvorljivih azotnih materija u vodi tokom zrenja ispitivanih UF sireva je očigledno drastično smanjen u komparaciji sa odgovarajućim klasičnim sirevima i predstavlja nov doprinos dosadašnjim saznanjima o kvalitativno drugačijoj proteolizi tvrdih sireva proizvedenih primenom UF procesa. Dobijene vrednosti sadržaja rastvorljivog azota su približne kod

uzoraka CHR, GENC i REN što ukazuje da je uticaj različitih enzima za koagulaciju retentata na degradaciju proteina tokom zrenja UF sireva minimalan. Iz prikazanih rezultata na slici 61 se može zaključiti da dodati proteolitički enzim za ubrzanje zrenja Accelase u uzorku ARE značajno povećava nivo rastvorljivog azota (pojava registrovana u literaturi kod UF Cheddar-a<sup>97, 98, 99</sup>) već nakon 45 dana zrenja (0.53% RN sadrži uzorak ARE a uzorci CHR, GENC i REN prosečno 0.43% RN). Nakon 120 dana zrenja koncentracija rastvorljivog azota u uzorku ARE je dostigla približno istu vrednost (0.65%) kao u kontrolnom UF siru nakon 360 dana zrenja (0.68%), dok na kraju ispitivanog perioda iznosi 1.15%, što je za 67% niža vrednost od minimalno konstatovane kod uzorka REN u seriji klasičnih sireva. Na osnovu utvrđenih vrednosti može se pretpostaviti da bi tretiranjem UF sireva većom koncentracijom enzimskog preparata od upotrebljene efekat ubrzanja proteolize bio jače izražen.

Registrovane različite vrednosti sadržaja rastvorljivog azota u vodi klasičnih i UF sireva rezultat su u literaturi opisanih fenomena koji se dešavaju kod polutvrdih i tvrdih sireva proizvedenih primenom ultrafiltracije uzrokovanih inhibitorynim dejstvom inkorporiranih serum proteina na aktivnost rezidualnog koagulansa<sup>129, 137, 140</sup> i plazmina<sup>143, 145, 146, 164</sup> tokom zrenja.

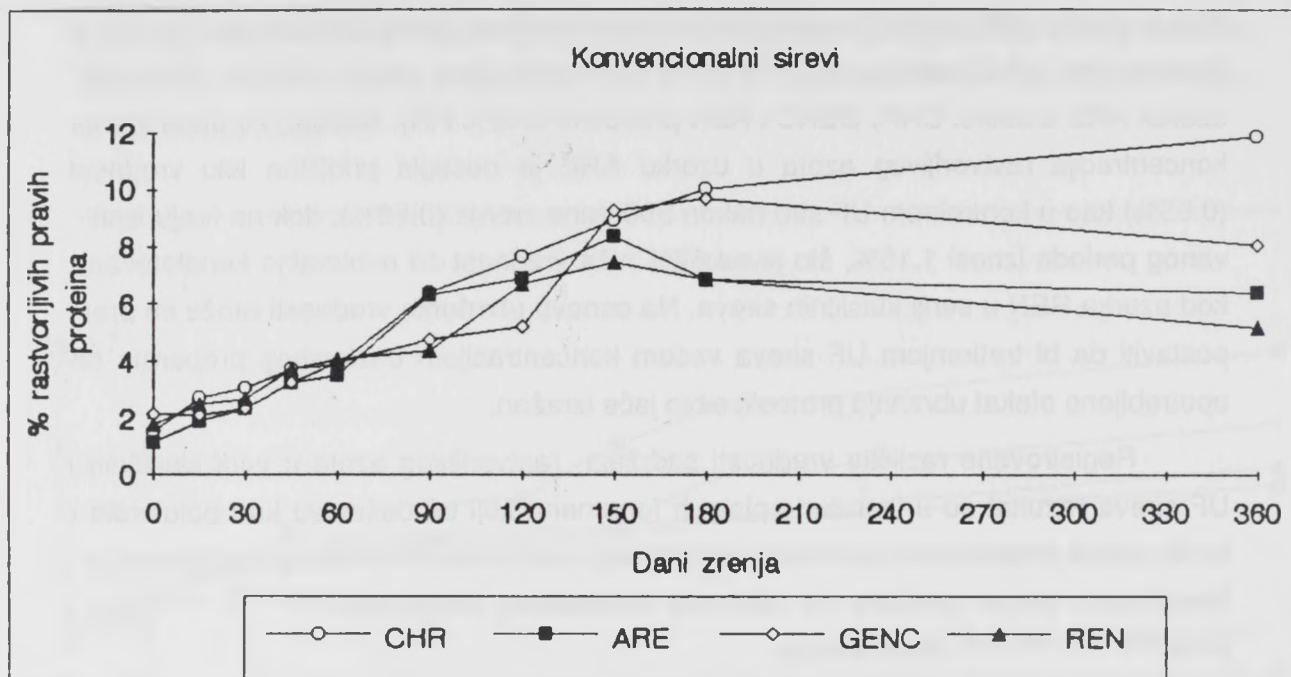
#### 4.4.5.5. Rastvorljivi pravi proteini

Promena sadržaja rastvorljivih pravih proteina, važnog indikatora nastanka primarnih produkata degradacije proteina tokom 12-mesečnog zrenja konvencionalnih i UF sireva data je na slikama 62 i 63.

Slično tendenciji kretanja sadržaja rastvorljivog azota primetno je pravilno povećanje koncentracije rastvorljivih pravih proteina tokom celokupnog ispitivanog vremenskog perioda. Intenzitet povećanja sadržaja rastvorljivih pravih proteina je jače izražen kod klasičnih (slika 62) nego UF sireva (slika 63), što je u skladu sa promenama drugih proteinskih frakcija ispitivanih varijanti Kačkavalja. Analogno tome, trend rasta frakcije rastvorljivih pravih proteina varira između uzoraka u istoj seriji i u funkciji je opisanih promena hemijskog sastava sirnog gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje Kačkavalja, prirode supstrata i koagulišućeg enzima.

Iz prikazanih rezultata na slici 62, vidi se da je i u slučaju ove frakcije zadržan relativni odnos između uzoraka tokom zrenja. Naime, redosled sadržaja rastvorljivih

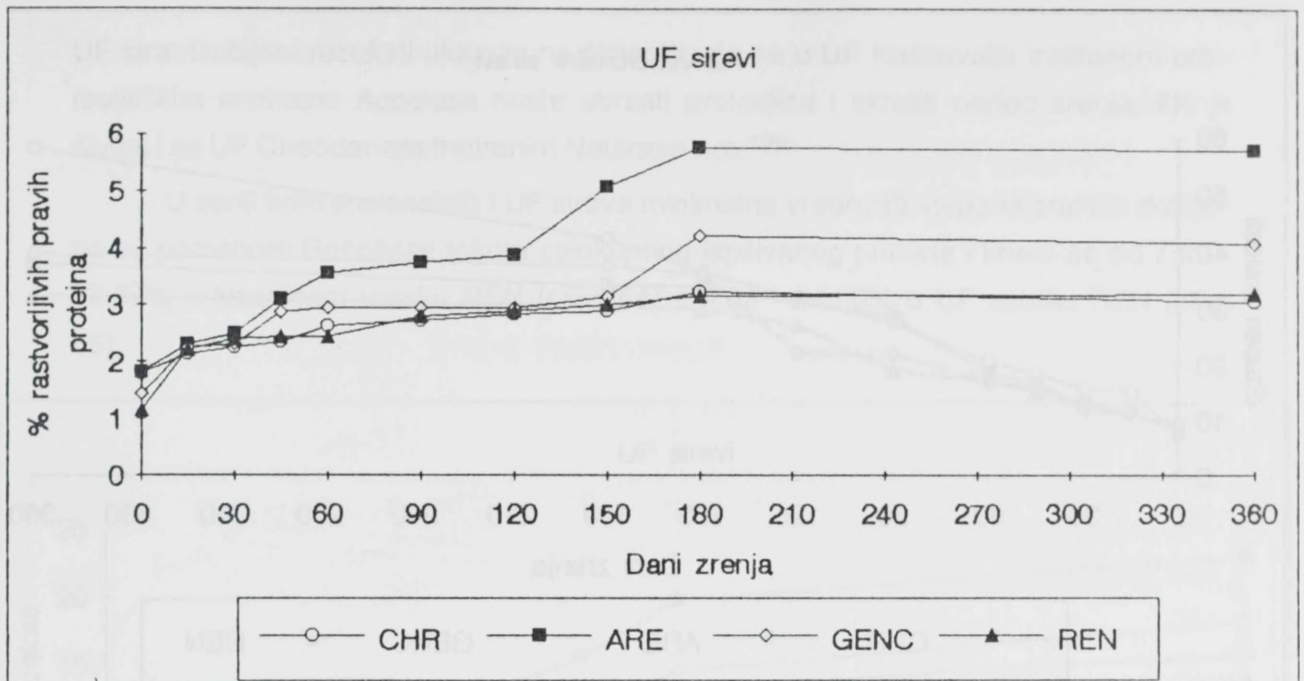
pravih proteina nakon 360 dana zrenja je sledeći: 11.87, 8.04, 6.38 i 5.14% u uzorcima klasičnog Kačkavalja CHR, GENC, ARE i REN, respektivno.



Slika 62. Promene sadržaja rastvorljivih pravih proteina u uzorcima konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig.62. Changes of soluble true proteins content of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

U seriji UF Kačkavalja dobijene su niže vrednosti rastvorljivih pravih proteina zbog inhibiranog zrenja<sup>129</sup> i drugačiji relativni odnosi među uzorcima (slika 63). UF Kačkavalj tretiran enzimima za ubrzanje zrenja sadrži maksimalno 5.74% rastvorljivih pravih proteina na kraju ispitivanog procesa zrenja (360 dana), što je 11% više od minimalne koncentracije iste frakcije u uzorku REN (mikrobiološki koagulišući enzim, Rennilase) u grupi klasičnih sireva.



Slika 63. Promene sadržaja rastvorljivih pravih proteina u uzorcima UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

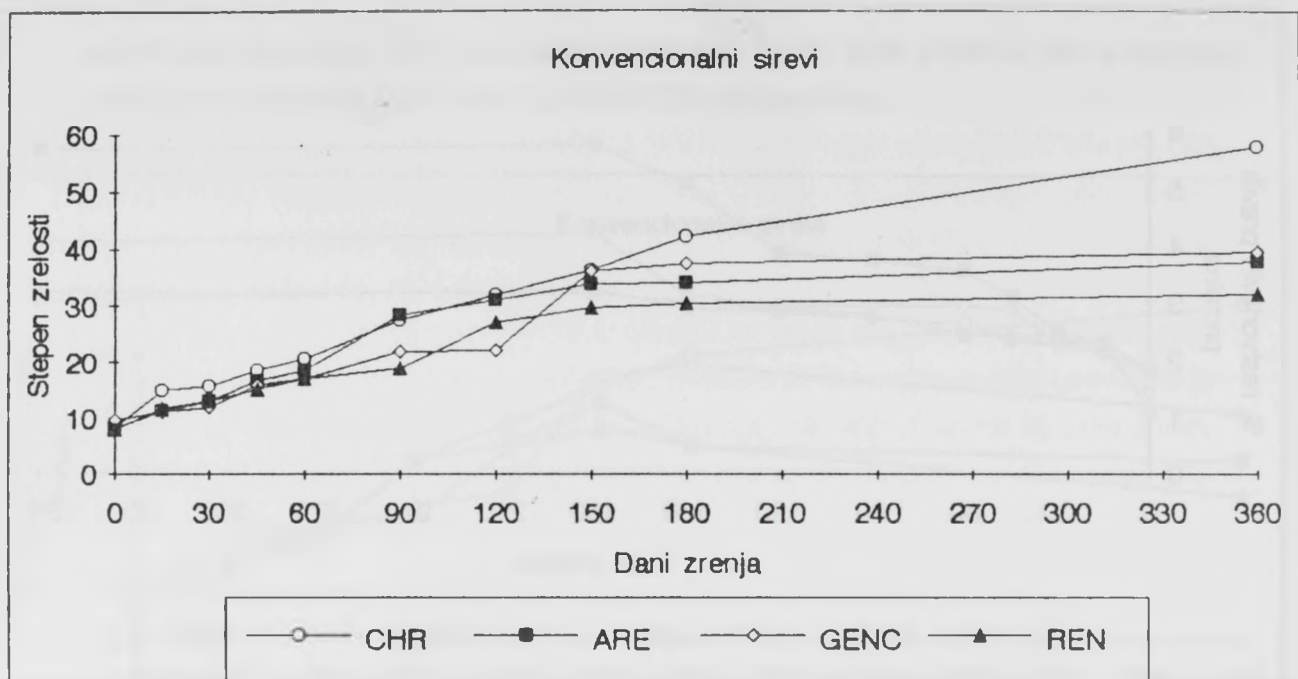
Fig. 63. Changes of soluble true proteins content of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.5.6. Stepen zrelosti

Potvrda ustanovljenog usporenog i dugotrajnog procesa zrenja Kačkavalja<sup>176, 177, 178, 180</sup> su rezultati ispitivanja promena stepena zrelosti konvencionalnih i UF sireva prikazani na slikama 64 i 65.

Registrovane vrednosti stepena zrelosti (slike 64 i 65) pokazuju tendenciju konstantnog povećanja tokom celokupnog ispitivanog perioda zrenja konvencionalnih i UF sireva, a posledica su kretanja sadržaja frakcije u vodi rastvorljivih azotnih materija u ukupnom azotu.

Analogno rezultatima sadržaja rastvorljivog azota i rastvorljivih pravih proteina, stepen zrelosti 4 eksperimentalna sira proizvedena primenom klasične tehnologije je veći i još je jedna potvrda intenzivnije proteolize ovih sireva u odnosu na UF analoge.



Slika 64. Promene stepena zrelosti uzoraka konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

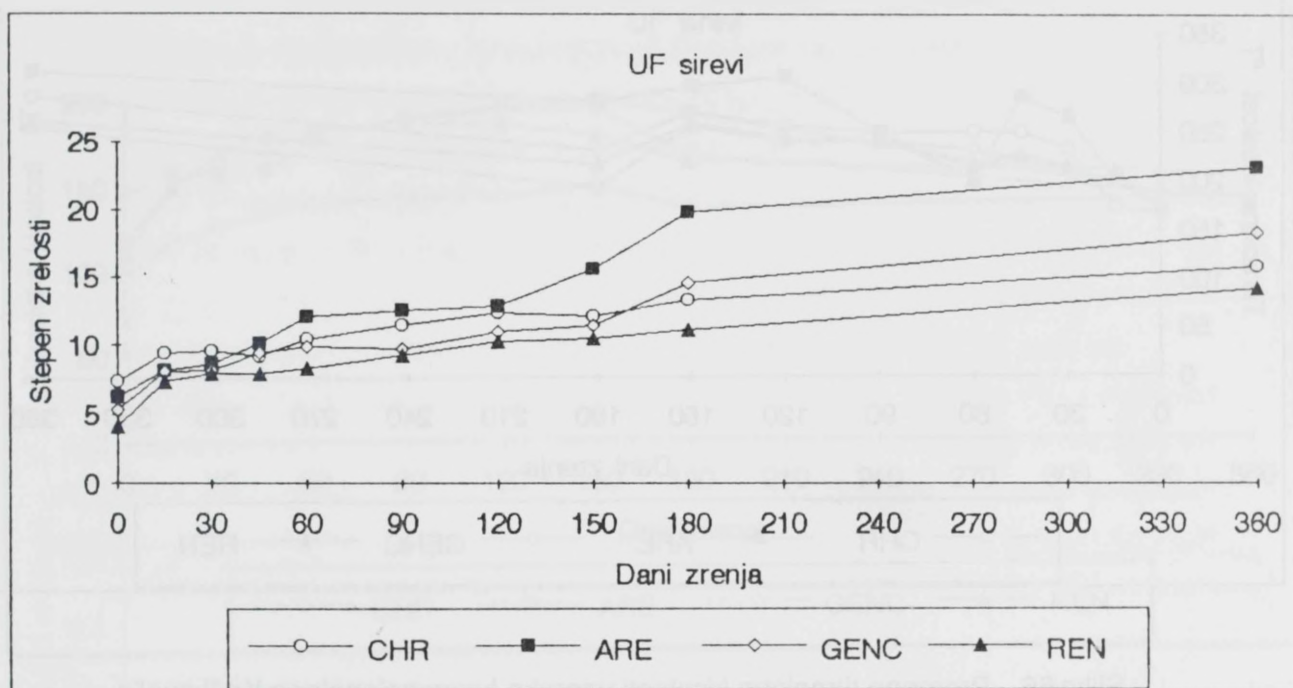
Fig. 64. Changes of ripening rate of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Stepen zrelosti konvencionalnog Kačkavalja, prema literaturnim podacima, varira u zavisnosti od primenjenog tehnološkog postupka (ruski, balkanski, italijanski), prirode enzima za koagulaciju mleka, sadržaja vode u siru, kiselosti odnosno pH vrednosti sira, korišćene starter kulture i po nekim autorima kreće se od 4.13 do 30.64%;<sup>176</sup> 8.46 - 22.9%<sup>187</sup> ili 9.63 - 32.79%<sup>180</sup> Posmatrajući rezultate ispitivanja stepena zrelosti uzoraka klasičnog Kačkavalja prikazane na slici 64, može se zaključiti da se dobijene vrednosti uklapaju u do sada publikovane u literaturi.

Efekat ubrzanja zrenja dodatkom kombinacije proteolitičkog i lipolitičkog enzima, Accelase + Palatase, nije postignut u klasičnom Kačkavalju jer stepen zrelosti uzorka ARE je 37.84% a kontrolnog uzorka CHR 57.82% nakon 360 dana. Kod UF analoga (uzorak ARE, slika 65) stepen zrelosti nakon 5 meseci iznosi 15.58% i približno je isti kao kod UF kontrolnog sira na kraju perioda zrenja (15.85%). Nako 360 dana zrenja stepen zrelosti UF uzorka ARE je približno 1.5 puta veći od stepena zrelosti kontrolnog

UF sira. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da se u UF Kačkavalju tretiranom proteolitičkim enzimom Accelase može ubrzati proteoliza i skratiti period zrenja, što je slučaj i sa UF Cheddar-om tretiranim Neutrase-om.<sup>199</sup>

U seriji konvencionalnih i UF sireva minimalne vrednosti stepena zrelosti dobijene su primenom Rennilase tokom celokupnog ispitivanog perioda i kreću se od 7.99 - 32.07% u klasičnom uzorku REN (slika 64) a 4.08 - 14.20% u UF uzorku REN (slika 65).

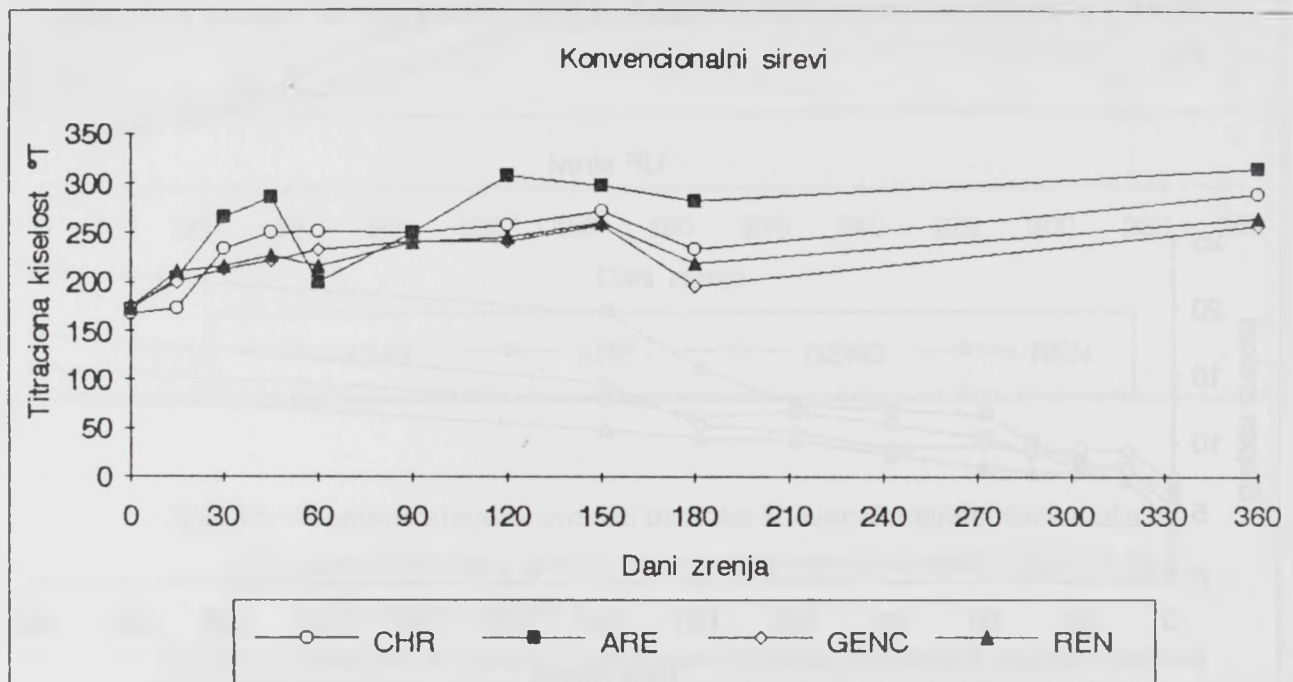


Slika 65. Promene stepena zrelosti uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 65. Changes of ripening rate of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.4.6. Titraciona kiselost

Dinamika promene titracione kiselosti tokom zrenja konvencionalnih i UF uzoraka Kačkavalja data je na slikama 66 i 67.

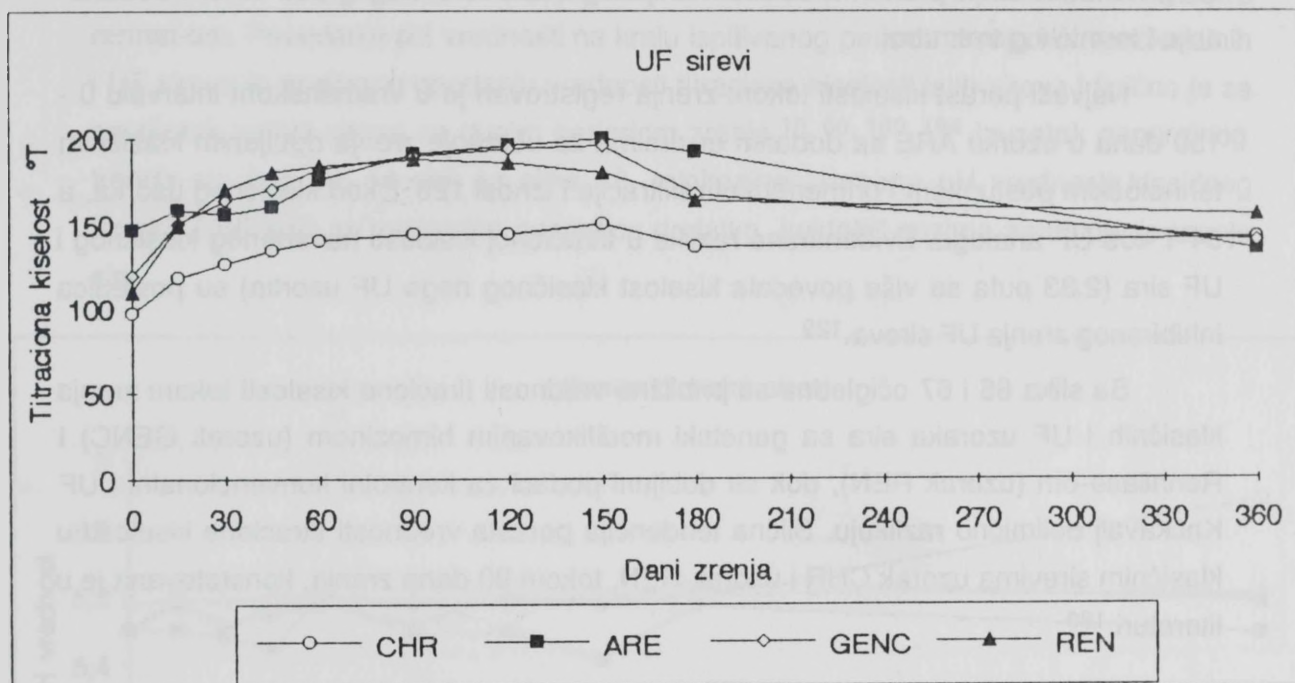


Slika 66. Promene titracione kiselosti uzoraka konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 66. Changes of titratable acidity of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Titraciona kiselost sira je važan indikator intenziteta fermentativnih procesa u toku zrenja sira a u korelaciji je sa hemijskim sastavom, reološkim svojstvima i strukturom sira.<sup>176</sup> Vrednosti titracione kiselosti zavise od koncentracije laktata, fosfata, kazeina, citrata, kiselih grupa peptida, amino kiselina i produkata dekompozicije amino kiselina u vodenom ekstraktu sira.<sup>189</sup> Tokom prvih 10-15 dana zrenja kod većine sireva sva prisutna količina laktoze se degradira i produkovana mlečna kiselina uzrokuje direktno povećanje titracione kiselosti. Napretkom zrenja kazein i peptidi velike molekulske mase hidrolizuju u frakcije manje molekulske mase koje su u vodi rastvorljive, tako

da se njihove karboksilne grupe titrišu. Daljim zrenjem sira povećava se koncentracija drugih kiselih produkata nastalih aktivnošću bakterija ili degradacijom amino kiselina. Prema tome, realno posmatrano, titraciona kiselost raste tokom zrenja, pri čemu intenzitet varira u zavisnosti od vrste sira.<sup>190</sup> Titraciona kiselost npr. Cheddar-a proizvedenog iz pasterizovanog mleka je signifikantno niža nego kod sira dobijenog iz sirovog mleka nakon 1 i 6 meseci zrenja.<sup>189</sup>



Slika 67. Promene titracione kiselosti uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 67. Changes of titratable acidity of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Iz rezultata prikazanih na slikama 66 i 67 generalno se uočava tendencija povećanja titracione kiselosti kod svih ispitivanih sireva do 150 dana zrenja, pri čemu je intenzitet rasta jače izražen do 30 dana zrenja. Napretkom zrenja titraciona kiselost konvencionalnih sireva (slika 66) blago opada do 180 dana zrenja, a potom ponovo raste dostižući maksimalne vrednosti na kraju ispitivanog perioda zrenja: 290, 316, 258 i 266°T u uzorcima CHR, ARE, GENC i REN, respektivno. Titraciona kiselost analognih uzoraka UF Kačkavalja (slika 67) blago opada u intervalu od 150 do 360 dana zrenja a



dobijene vrednosti su prosečno 2 puta niže od utvrđenih kod klasičnih sireva. Navedeno variranje titracione kiselosti u završnom periodu zrenja konvencionalnih i UF sireva se može objasniti povećanom proteolitičkom degradacijom kazeina, pri čemu nastaju razgradni produkti baznog karaktera koji snižavaju kiselost sira.<sup>10, 60</sup> Početne apsolutne vrednosti titracione kiselosti pojedinih uzoraka (slike 66 i 67) minimalno se razlikuju kod tradicionalnih uzoraka ali su razlike jače izražene kod UF analognih sireva zbog konstatovanih promena fizičko-hemijskog sastava sirnog gruša tokom čedarizacije i termičkog tretmana.

Najveći porast kiselosti tokom zrenja registrovan je u vremenskom intervalu 0 - 150 dana u uzorku ARE sa dodatim enzimima za ubrzanje zrenja dobijenim klasičnim tehnološkim postupkom i primenom ultrafiltracije i iznosi 126°T kod klasičnog uzorka, a 54°T kod UF analoga. Evidentirane razlike u titracionoj kiselosti navedenog klasičnog i UF sira (2.33 puta se više povećala kiselost klasičnog nego UF uzorka) su posledica inhibiranog zrenja UF sireva.<sup>129</sup>

Sa slika 66 i 67 očigledne su približne vrednosti tiracione kiselosti tokom zrenja klasičnih i UF uzoraka sira sa genetski modifikovanim himozinom (uzorak GENC) i Rennilase-om (uzorak REN), dok se dobijeni podaci za kontrolni konvencionalni i UF Kačkavalj delimično razlikuju. Slična tendencija porasta vrednosti titracione kiselosti u klasičnim sirevima uzorak CHR i uzorak REN, tokom 90 dana zrenja, konstatovana je u literaturi.<sup>180</sup>

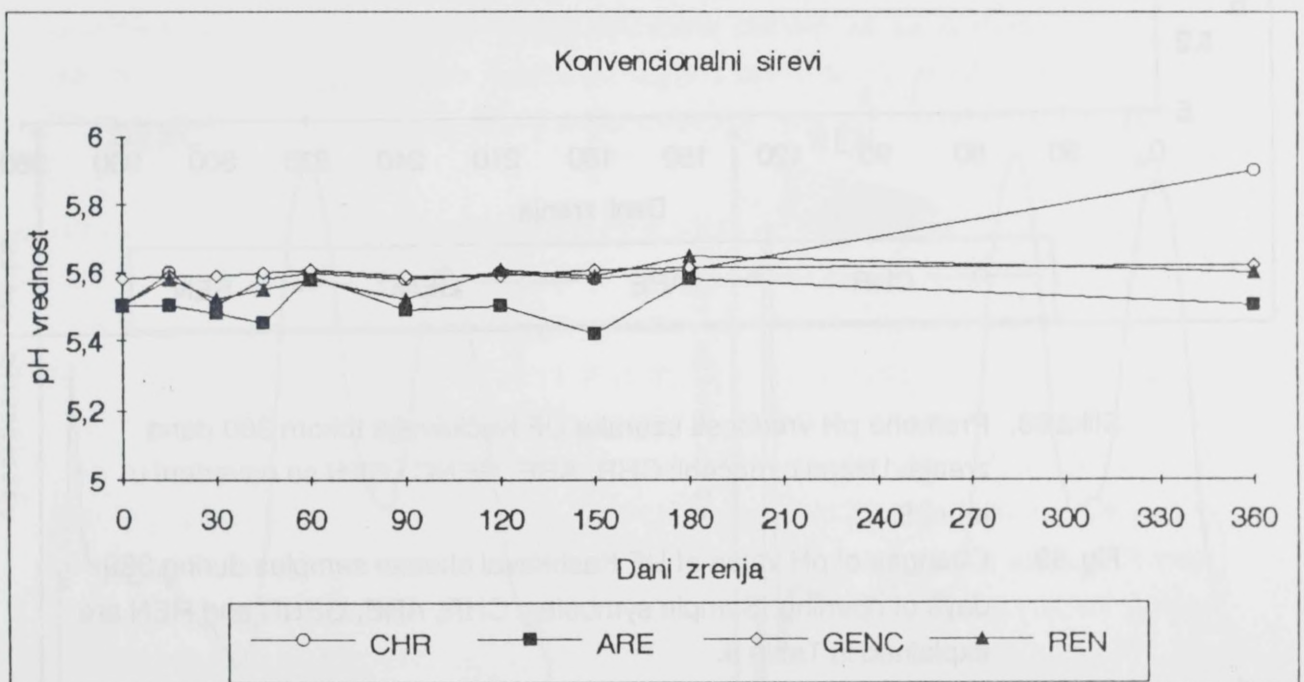
#### 4.4.7. pH vrednost

Analogno promenama titracione kiselosti ispitivanih sireva tokom zrenja praćene su i promene pH vrednosti (aktivne kiselosti), a dobijeni rezultati prikazani su na slika 68 i 69.

pH vrednost suvo soljenih sireva (npr. Cheddar-a) primarno zavisi od kiselosti sirne grude pri soljenju, a svako dalje snižavanje pH vrednosti je u funkciji koncentracije rezidualne laktoze i aktivnosti starter kulture.<sup>134</sup> Finalna pH vrednost sira takođe zavisi i od pufernog kapaciteta sirne grude koji je determinisan koncentracijom proteina.<sup>134, 191</sup>

Prema literaturnim podacima mnogih autora pH vrednost Kačkavalja varira u zavisnosti od primenjenog tehnološkog postupka i vrste startera dostižući maksimalan iznos na kraju zrenja 4.9;<sup>192, 193</sup> 5.0;<sup>180</sup> 5.2;<sup>176, 177</sup> 5.65<sup>907</sup> ili čak 5.9.<sup>194</sup>

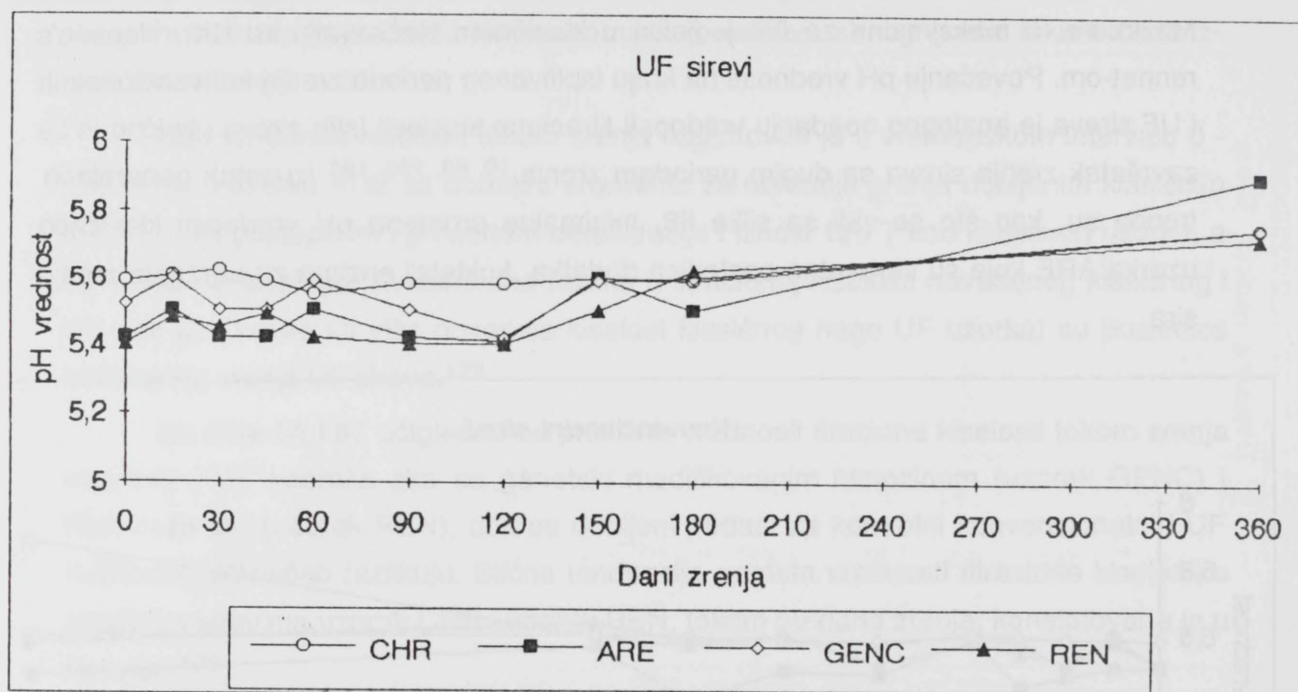
Iz rezultata prikazanih na slikama 68 i 69, evidentno je da se pH vrednost konvencionalnih i UF sireva minimalno razlikuje na početku zrenja, mada je prema nekim autorima, pH vrednost UF sireva 1 dan nakon proizvodnje veća nego odgovarajućih klasičnih zbog većeg pufernog kapaciteta retentata.<sup>185</sup> Tokom 180 dana zrenja ispitivanih sireva pH vrednost se minimalno menja da bi se napretkom zrenja povećala u svim uzorcima za minimalno 0.04 jedinice u klasičnom Kačkavalju dobijenom primenom Maxiren-a, a maksimalno za 0.4 jedinice u klasičnom Kačkavalju sa Chr. Hansen's rennet-om. Povećanje pH vrednosti na kraju ispitivanog perioda zrenja konvencionalnih i UF sireva je analogno opadanju vrednosti titracione kiselosti istih sireva i tipično je za završetak zrenja sireva sa dugim periodom zrenja.<sup>10, 60, 190, 194</sup> Izuzetak generalnog trenda su, kao što se vidi sa slike 68, minimalne promene pH vrednosti klasičnog uzorka ARE koje su verovatno posledica dodatka „koktela“ enzima za ubrzanje zrenja sira..



Slika 68. Promene pH vrednosti uzoraka konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 68. Changes of pH value of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Uticaj mikrobiološkog enzima Rennilase na promene pH vrednosti klasičnog uzorka REN (slika 68) nije signifikantnije izražen u komparaciji sa delovanjem rennet-a i u skladu je sa literaturnim podacima,<sup>191</sup> dok je pH vrednost UF analognog sira (slika 69) neznatno manja od pH vrednosti kontrolnog UF sira. Nakon 360 dana zrenja pH vrednost UF uzorka CHR iznosi 5.75 a UF uzorka REN je 5.72.



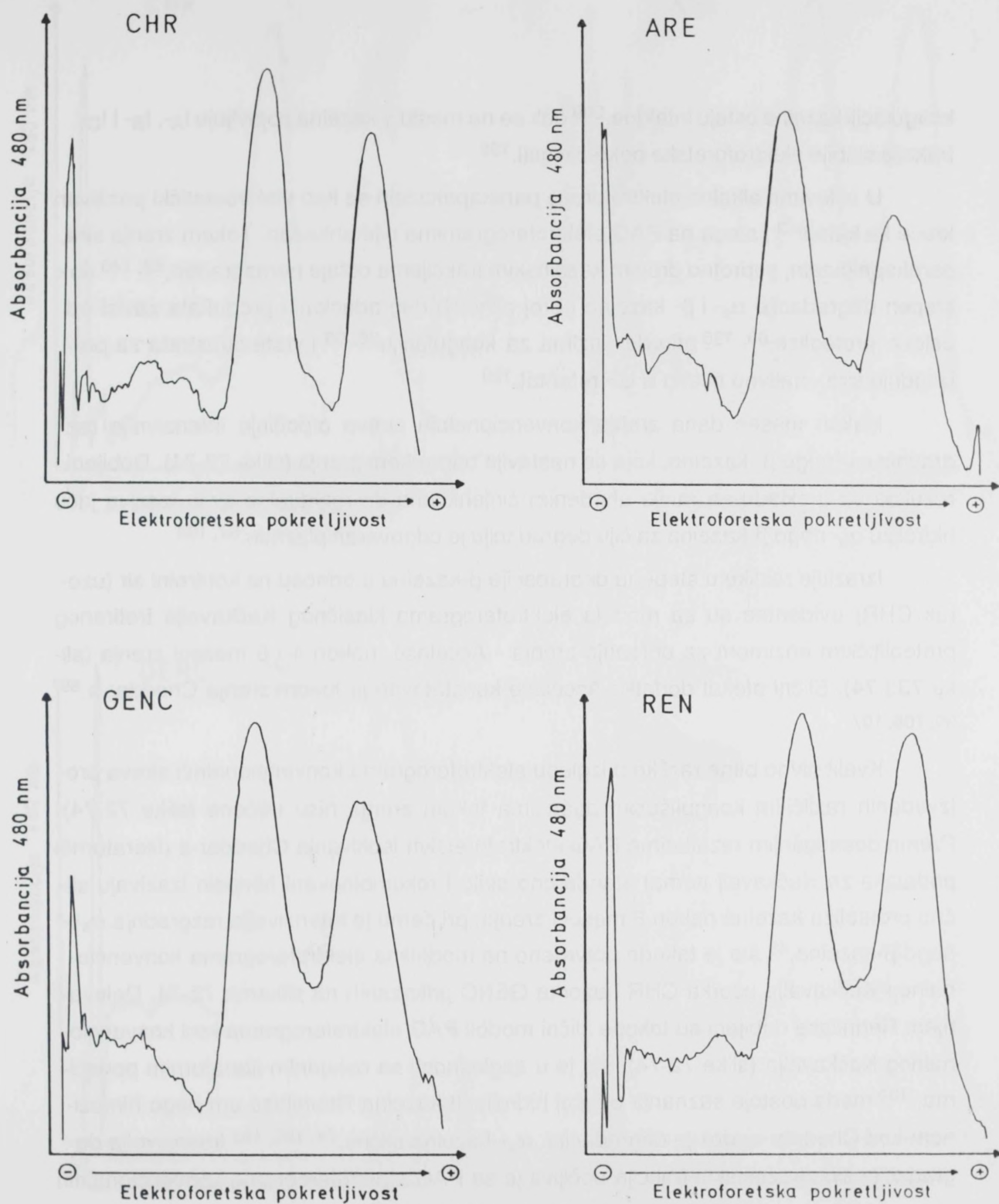
Slika 69. Promene pH vrednosti uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 69. Changes of pH value of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

#### 4.5. PAG ELEKTROFOREZA

Na slikama 70-78 prikazani su odabrani elektroferogrami dobijeni poliakrilamid gel (PAG) elektroforezom konvencionalnih i UF sireva tokom 360 dana zrenja.

Za sve modele elektroferograma na početku zrenja (0 dana) (slike 70 i 71), tipično je prisustvo dve frakcije veće elektroforetske pokretljivosti,  $\alpha_s$ - i  $\beta$ - kazeina, koje pri



Slika 70. Elektroferogram uzoraka konvencionalnog Kačkavalja na početku zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 70. Electropherogram of conventional Kashkaval cheese samples at the beginning of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

koagulaciji kazeina ostaju intaktne,<sup>209</sup> dok se na mestu  $\gamma$ -kazeina pojavljuju I<sub>A</sub>-, I<sub>B</sub>- i I<sub>C</sub>-frakcije slabije elektroforetske pokretljivosti.<sup>195</sup>

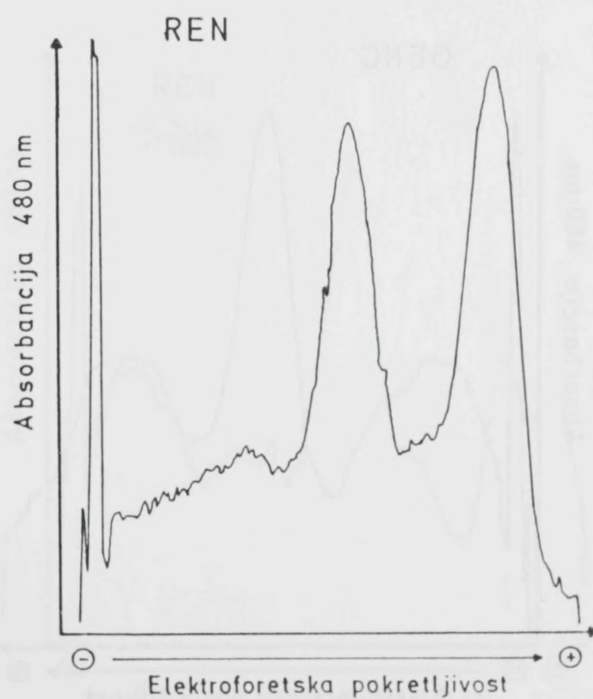
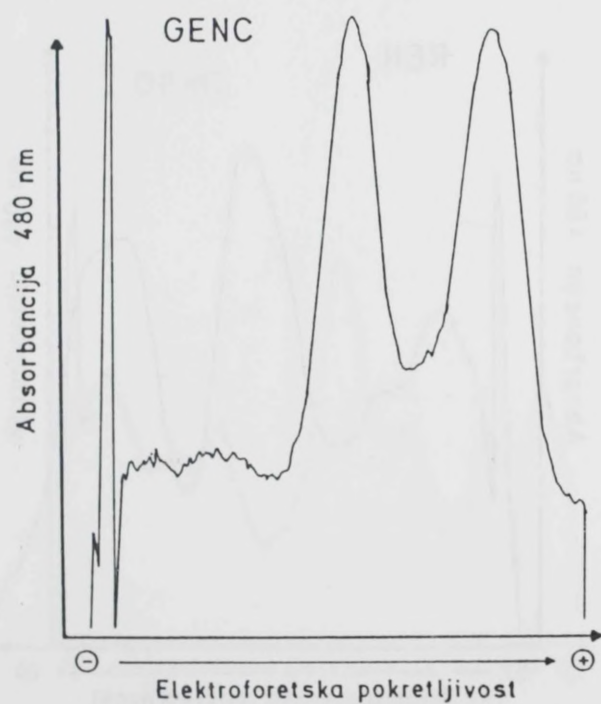
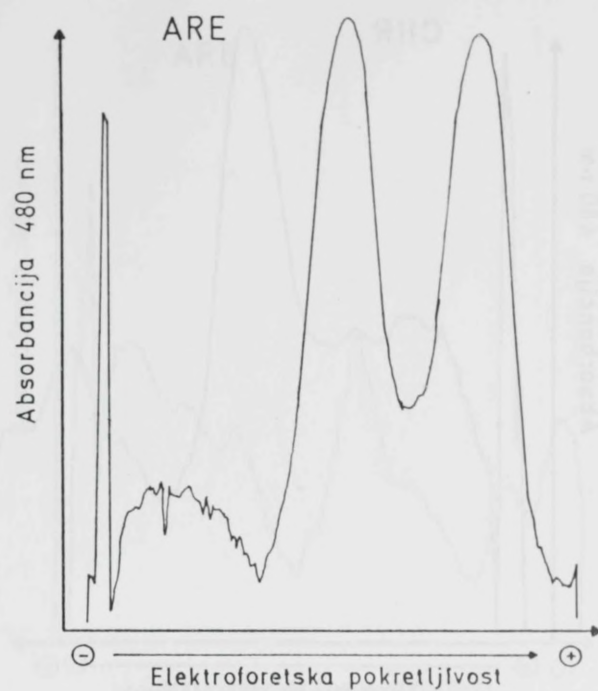
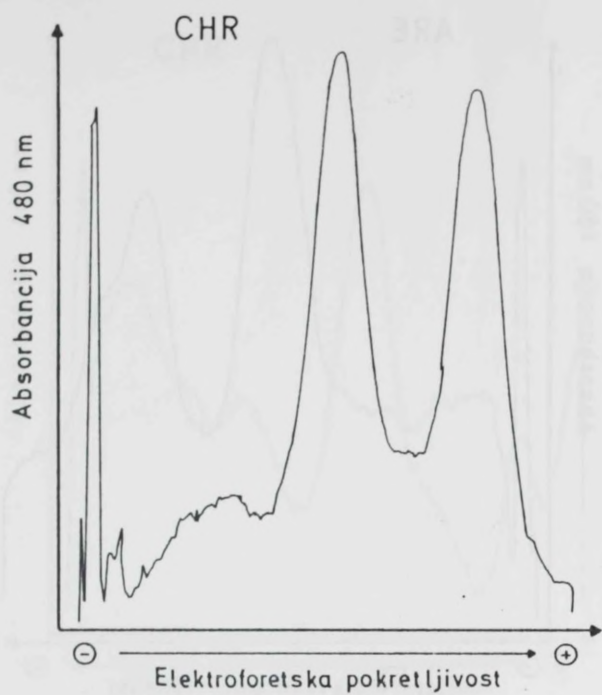
U uslovima alkalne elektroforeze parakapakazein se kao elektrostatički pozitivan kreće ka katodi<sup>13</sup> i stoga na PAG elektroferogramima nije prikazan. Tokom zrenja sira, parakapakazein, suprotno drugim kazeinskim frakcijama ostaje nerazgrađen,<sup>69, 140</sup> dok stepen degradacije  $\alpha_s$ - i  $\beta$ - kazeina i broj njihovih degradacionih produkata zavisi od uslova proteolize,<sup>69, 195</sup> prirode enzima za koagulaciju<sup>36, 56</sup> i vrste supstrata za proizvodnju sira - nativno mleko ili UF retentat.<sup>129</sup>

Nakon mesec dana zrenja konvencionalnih sireva otpočinje intenzivnija razgradnja  $\alpha_s$ - nego  $\beta$ - kazeina, koja se nastavlja napretkom zrenja (slike 72-74). Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije utvrđenim činjenicama da rezidualno sirilo izaziva jaču hidrolizu  $\alpha_s$ - nego  $\beta$ -kazeina za čiju degradaciju je odgovoran plazmin.<sup>57, 193</sup>

Izrazitije razlike u stepenu degradacije  $\beta$ -kazeina u odnosu na kontrolni sir (uzorak CHR) evidentne su sa modela elektroferograma klasičnog Kačkavalja tretiranog proteolitičkim enzimom za ubrzanje zrenja - Accelase, nakon 4 i 6 meseci zrenja (slike 73 i 74). Slični efekat dodatka Accelase konstatovan je tokom zrenja Cheddar-a.<sup>89, 90, 106, 107</sup>

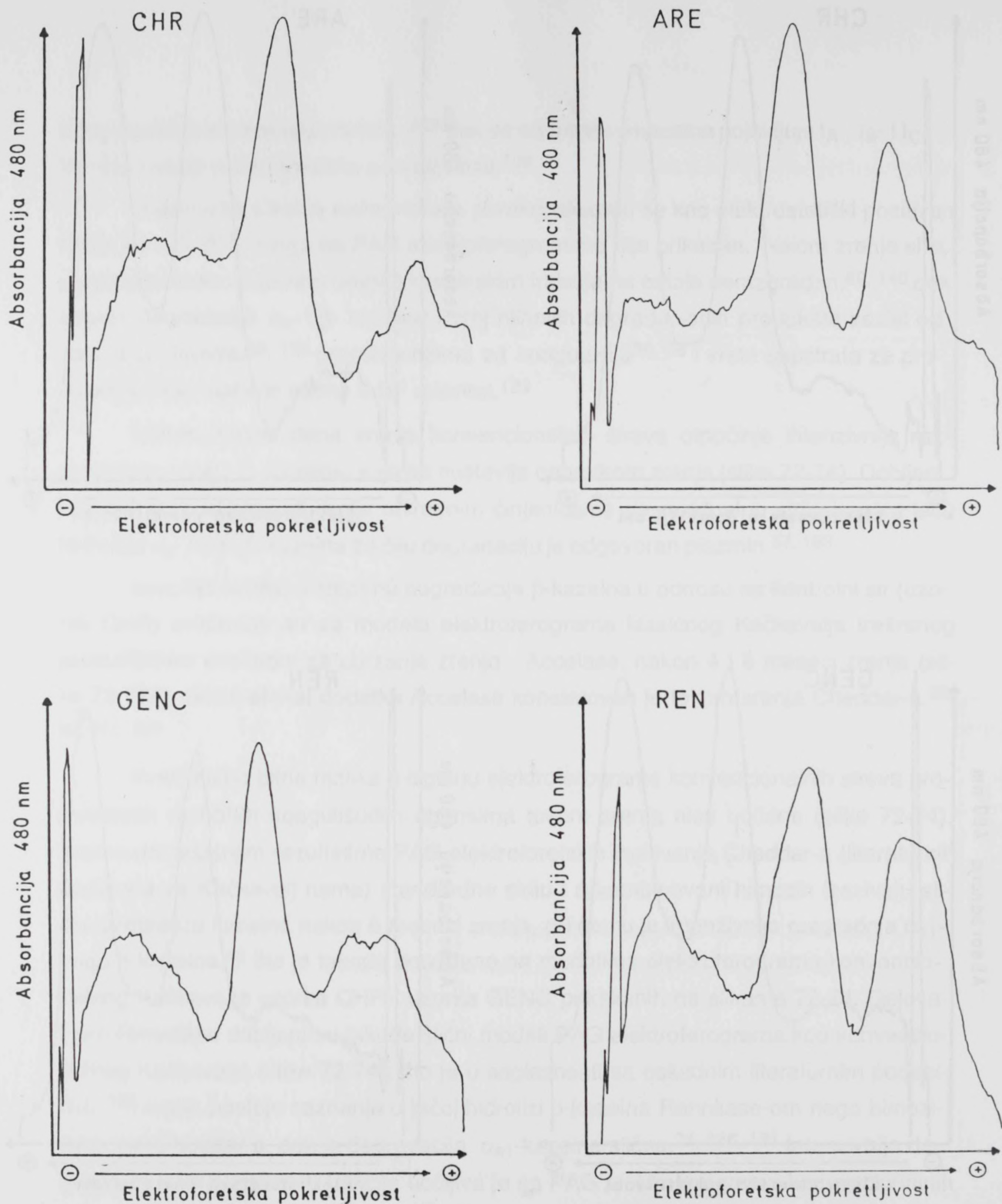
Kvalitativno bitne razlike u izgledu elektroferograma konvencionalnih sireva proizvedenih različitim koagulišućim agensima tokom zrenja nisu uočene (slike 72-74). Prema dosadašnjim rezultatima PAG elektroforetskih ispitivanja Cheddar-a (literaturnih podataka za Kačkavalj nema) standardno sirilo i rekombinovani himozin izazivaju sličnu proteolizu kazeina nakon 6 meseci zrenja, pri čemu je intenzivnija razgradnja  $\alpha_s$ - nego  $\beta$ -kazeina,<sup>46</sup> što je takođe potvrđeno na modelima elektroferograma konvencionalnog Kačkavalja uzorka CHR i uzorka GENC prikazanih na slikama 72-74. Delovanjem Rennilase dobijeni su takođe slični modeli PAG elektroferograma kod konvencionalnog Kačkavalja (slike 72-74), što je u saglasnosti sa oskudnim literaturnim podacima,<sup>180</sup> mada postoje saznanja o jačoj hidrolizi  $\beta$ -kazeina Rennilase-om nego himozinom kod Cheddar-a, dok je degradacija  $\alpha_s$ -kazeina slična.<sup>74, 186, 191</sup> Intenzivnija degradacija svih kazeinskih frakcija uočljiva je sa PAG elektroferograma konvencionalnih sireva nakon 6 meseci zrenja (slika 74) da bi kulminirala nakon 12 meseci zrenja. Pri tome napretkom zrenja koncentracija  $\beta$ -kazeina opada, a relativni odnosi I<sub>A</sub>-, I<sub>B</sub>- i I<sub>C</sub>-frakcije se intenzivnije menjaju.

Generalno se može zaključiti da dobijeni PAG elektroferogrami ispitivanih klasičnih varijanti Kačkavalja ukazuju na drugačiji stepen proteolitičke degradacije kazeina nego u sirevima Gouda, Cheddar, Ras ili Domiati.<sup>74, 193</sup>



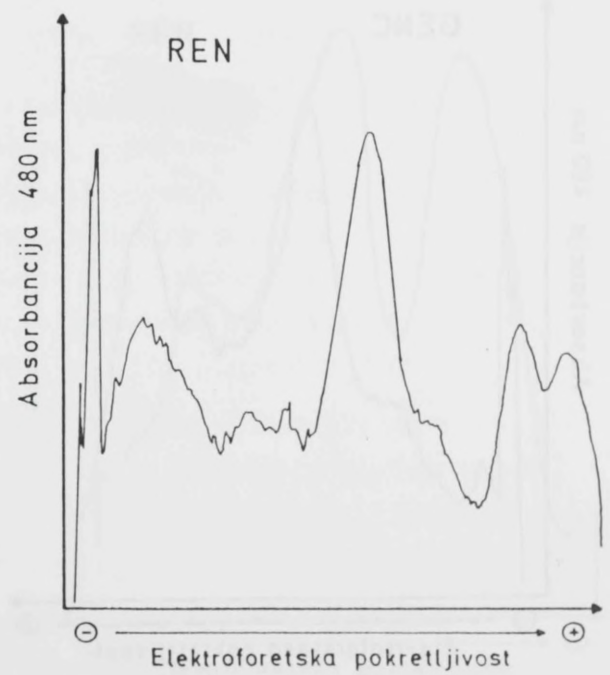
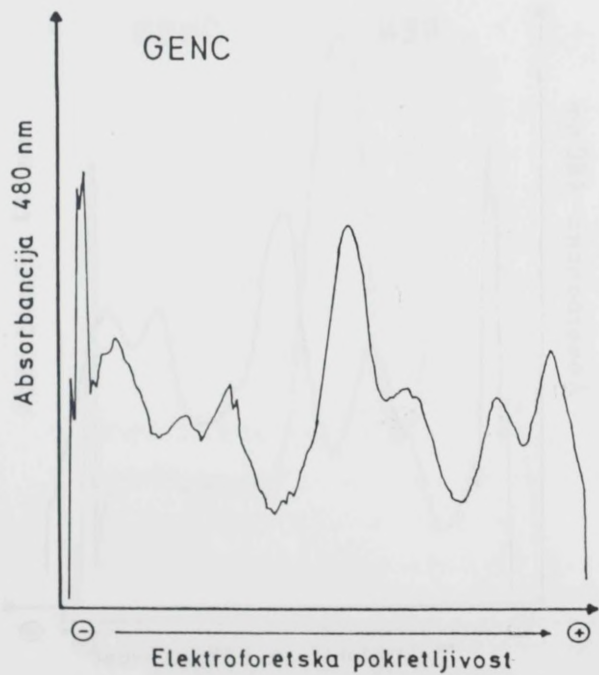
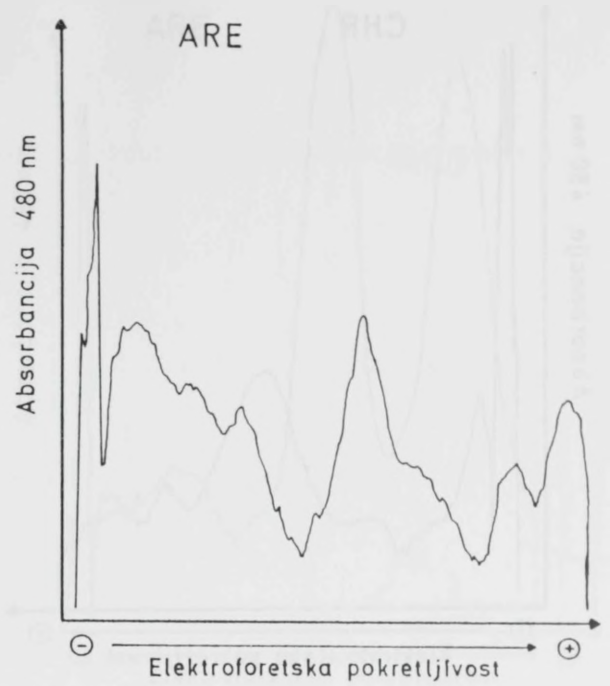
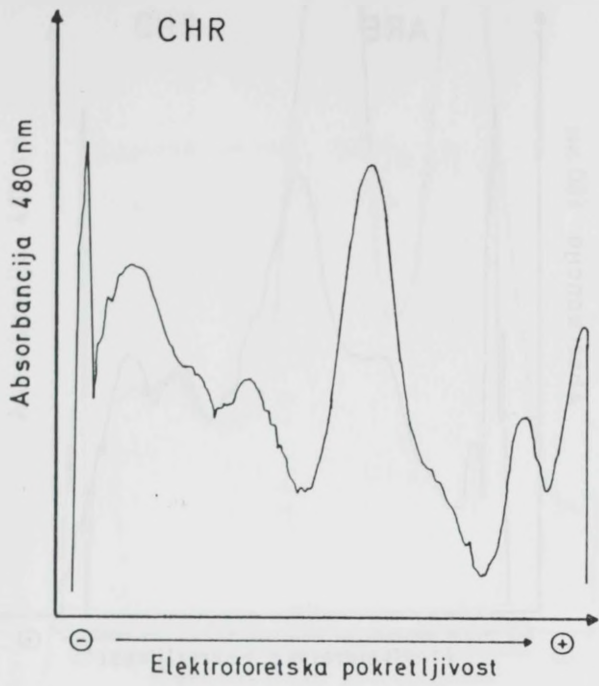
Slika 71. Elektroferogram uzoraka UF Kačkavalja na početku zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 71. Electropherogram of UFKashkaval cheese samples at the beginning of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 72. Elektroferogram uzoraka konvencionalnog Kačkavalja nakon 2 meseca zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

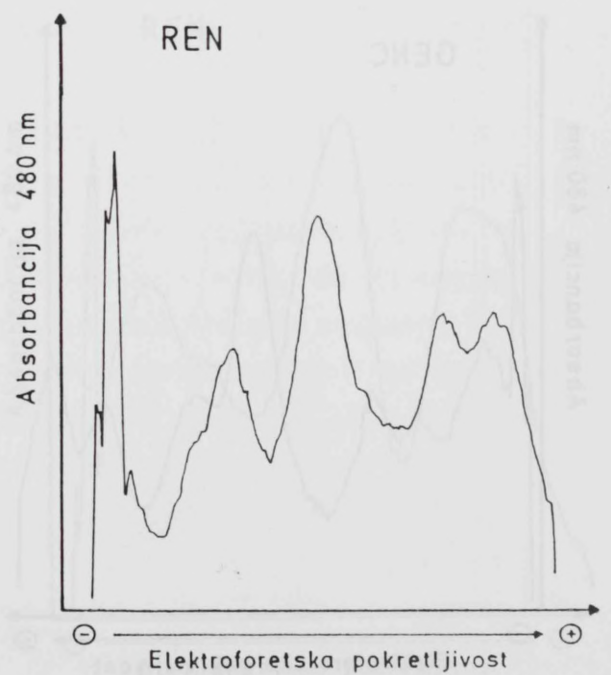
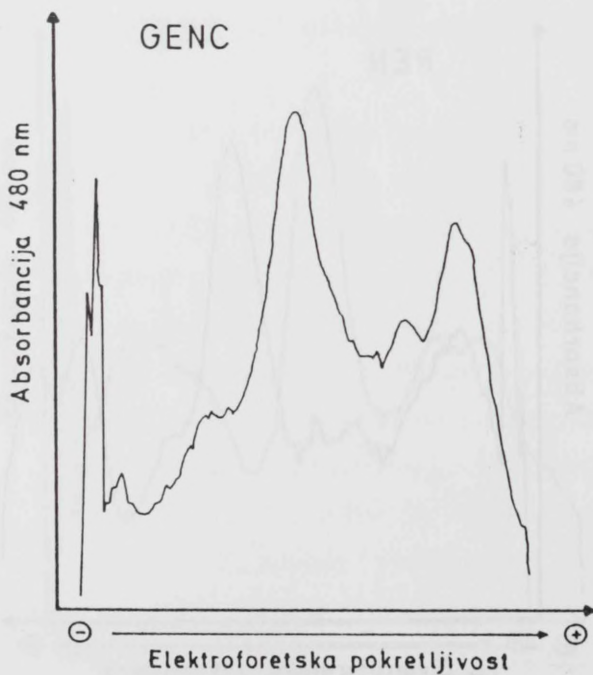
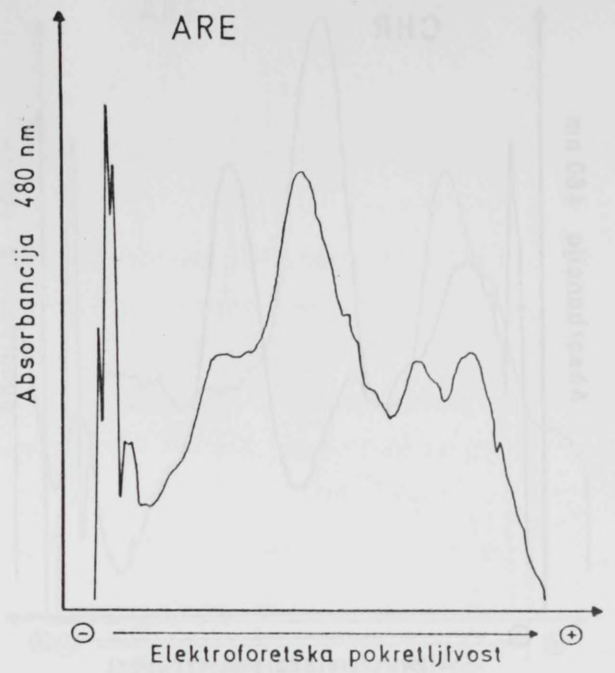
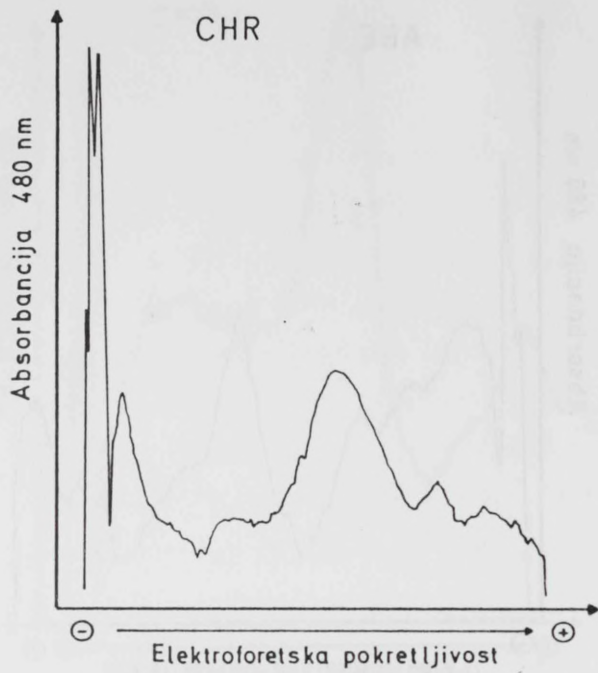
Fig. 72. Electropherogram of conventional Kashkaval cheese samples after 2 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 73. Elektroferogram uzoraka konvencionalnog Kačkavalja nakon 4 meseca zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

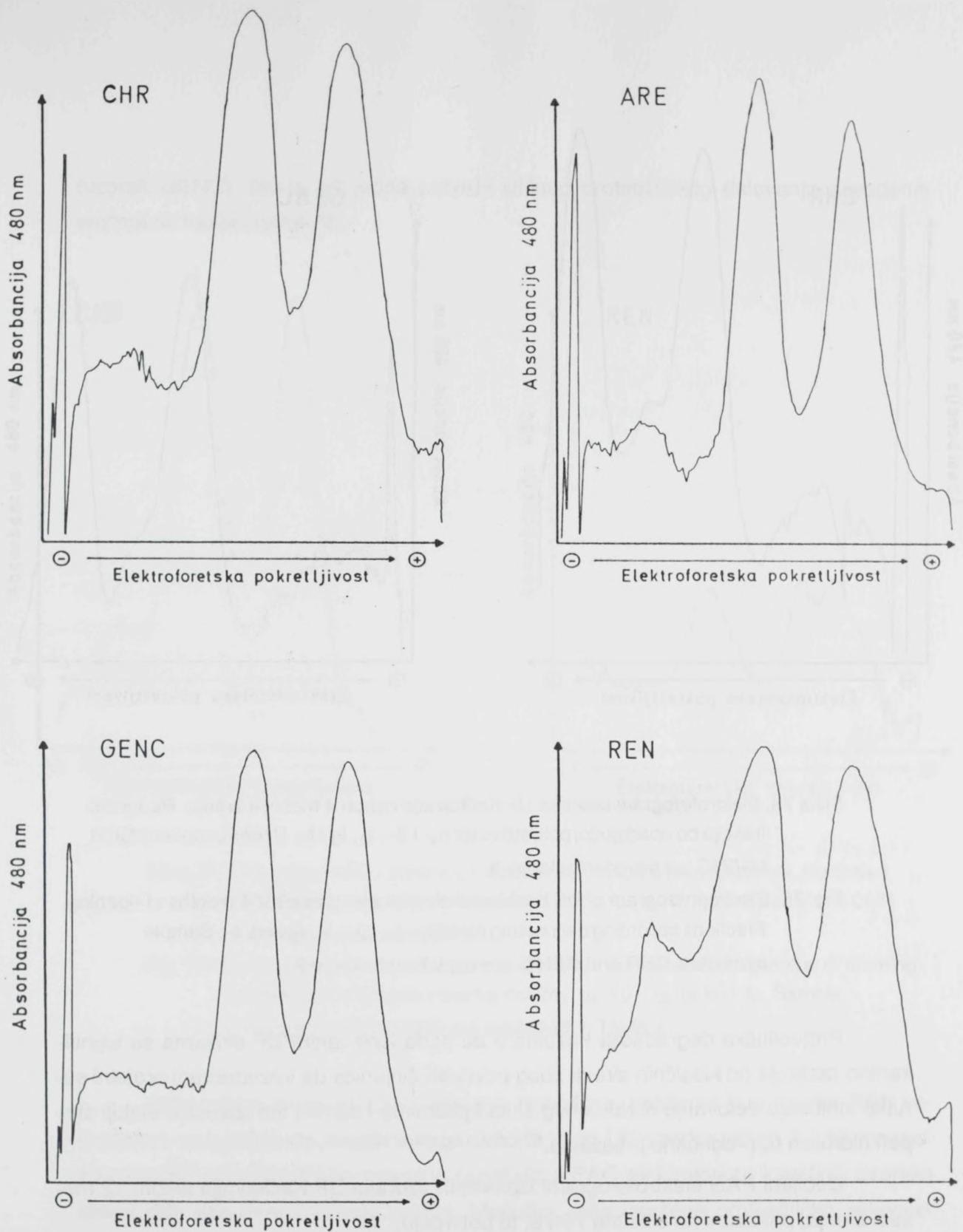
Fig. 73. Electropherogram of conventional Kashkaval cheese samples after 4 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.





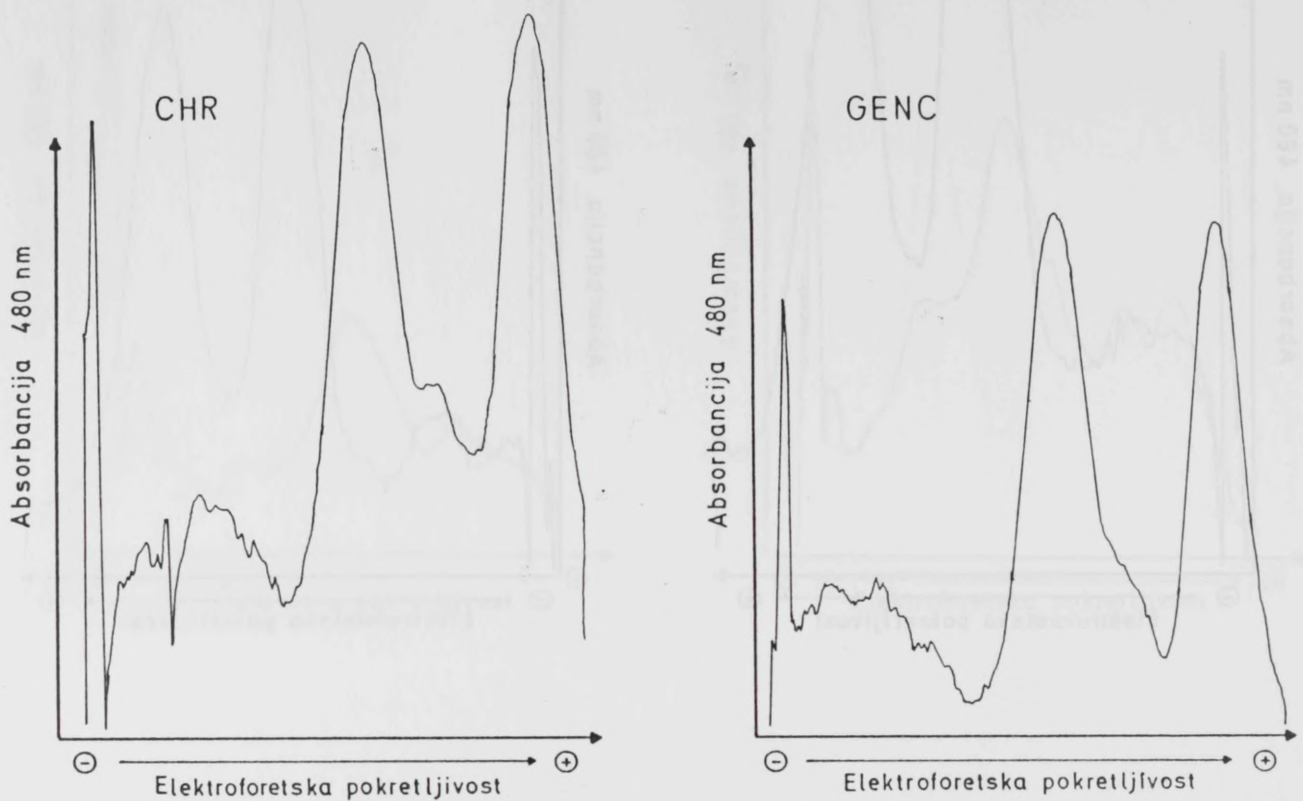
Slika 74. Elektroferogram uzoraka konvencionalnog Kačkavalja nakon 6 meseci zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 74. Electropherogram of conventional Kashkaval cheese samples after 6 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 75. Elektroferogram uzoraka UF Kačkavalja nakon 2 meseca zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 75. Electropherogram of UF Kashkaval cheese samples after 2 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 76. Elektroferogram uzoraka UF Kačkavalja nakon 4 meseca zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR i GENC su navedeni u tabeli 9.

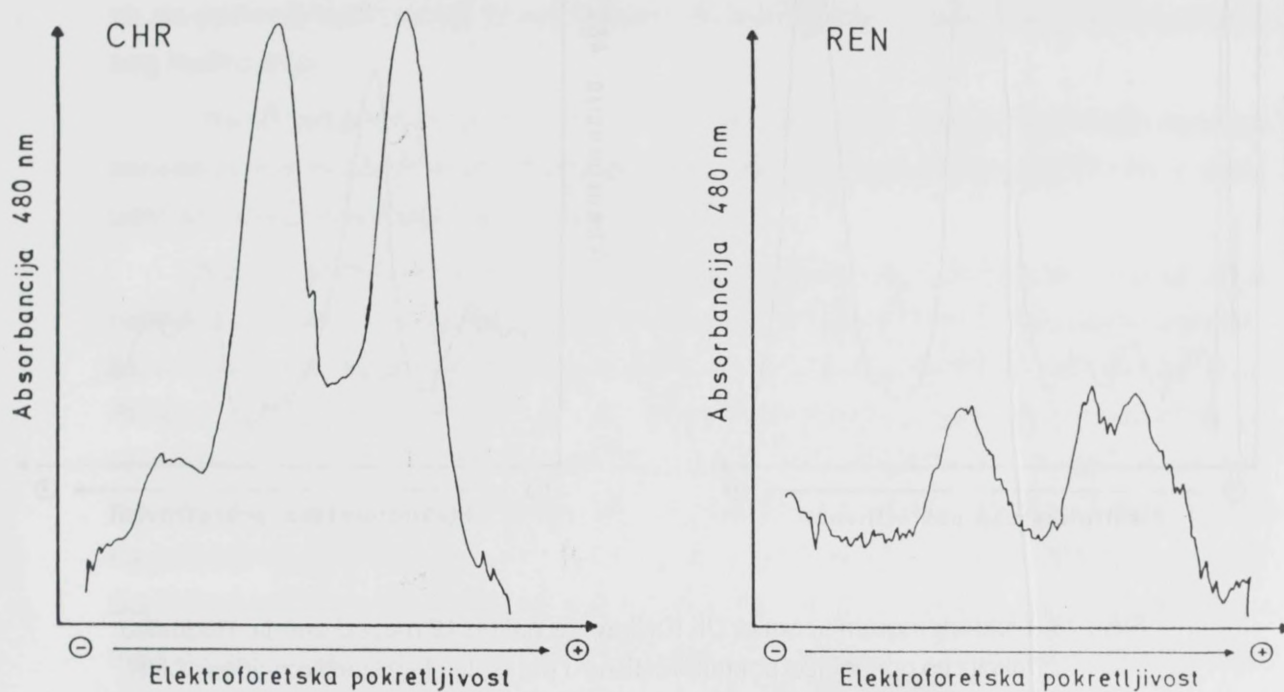
Fig. 76. Electropherogram of UF Kashkaval cheese samples after 4 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols: CHR and GENC are explained in Table 9.

Proteolitička degradacija kazeina u do sada ispitivanim UF sirevima se značajno razlikuje od klasičnih sireva zbog poznatih činjenica da inkorporirani proteini su rutke inhibiraju delovanje rezidualnog sirila i plazmina i samim tim izazivaju slabiji stepen hidrolize  $\alpha_s$ - odnosno  $\beta$ -kazeina.<sup>97, 129, 140, 144, 145, 146, 164</sup>

Dobijeni PAG elektroferogrami ispitivanih uzoraka UF Kačkavalja tokom 12 meseci zrenja, prikazani na slikama 75-78, to potvrđuju.

Efekat intenzivnije proteolize kazeina, koji se postiže kod UF Cheddar-a dodatkom enzima za ubrzanje zrenja Neutrase,<sup>99, 137</sup> nije izražen kod eksperimentalnog UF sira tretiranog Accelase-om nakon 2 meseca zrenja, a ni u kasnijem periodu, što se vidi iz sličnosti odabranog elektroferograma uzorka ARE i ostalih uzoraka (slika 75). Degradacija  $\beta$ -kazeina je uočljiva tek nakon 4 meseca zrenja UF sireva tretiranih Chr. Hansen's rennet-om (uzorak CHR) i genetski modifikovanim himozinom Maxiren-om

(uzorak GENC), što je još jedna potvrda sličnog proteolitičkog delovanja navedenih enzima na kazein (slika 76).

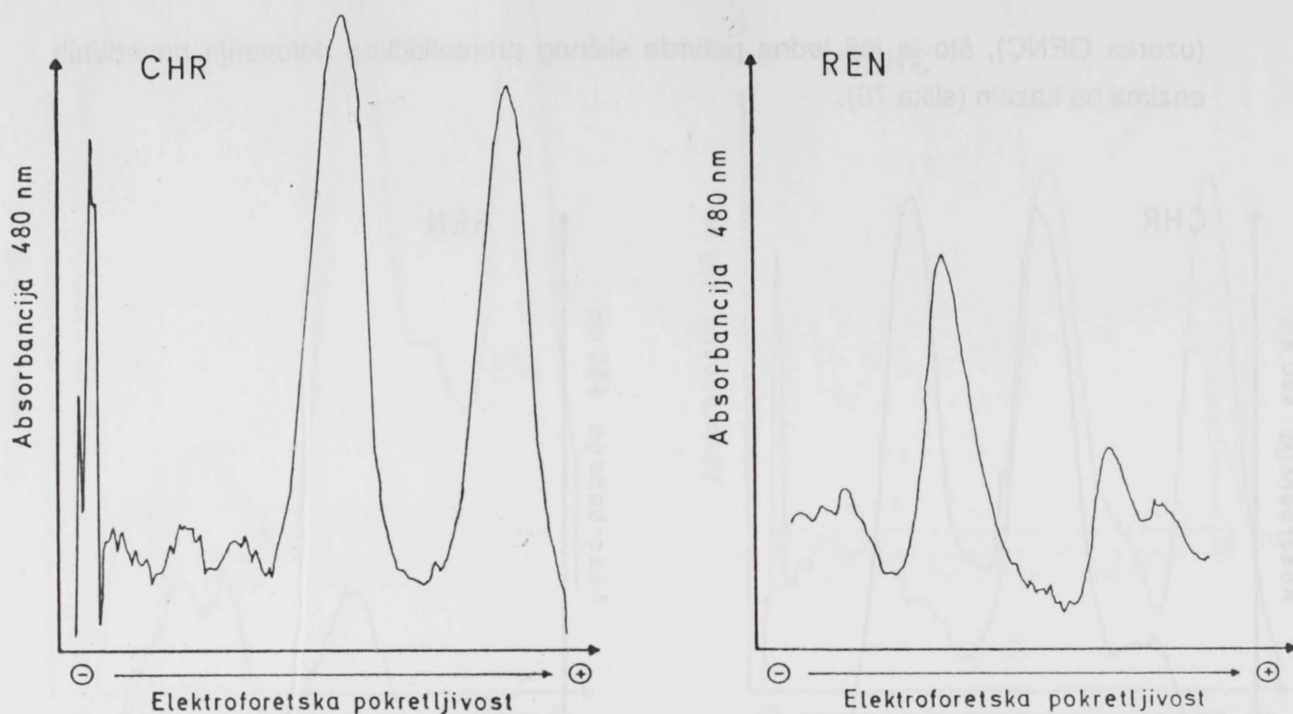


Slika 77. Elektroferogram uzoraka UF Kačkavalja nakon 6 meseci zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 77. Electropherogram of UF Kashkaval cheese samples after 6 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols CHR and REN are explained in Table 9.

Delovanjem mikrobiološke proteaze, Rennilase, postignut je u uzorku REN veći stepen razgradnje  $\alpha_s$ -kazeina nego u kontrolnog UF uzorku nakon 6 i 12 meseci zrenja (slike 77 i 78), što je suprotno rezultatima PAG elektroforeze klasičnih uzoraka sireva gde nisu konstatovane razlike. Međutim, jače izražena proteolitička aktivnost Rennilase na  $\alpha_{s1}$ -kazein ustanovljena je i kod sireva UF Danbo i UF Havarti.<sup>196</sup>

Prikazani rezultati PAG elektroforeze (slike 70-78) ispitivanih varijanti konvencionalnog i UF Kačkavalja još su jedna potvrda različitog profila proteolitičke degradacije kazeina tradicionalnih i UF sireva.



Slika 78. Elektroferogram uzoraka UF Kačkavalja nakon 12 meseci zrenja. Redosled frakcija po opadajućoj pokretljivosti:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  i  $I_C$ . Uzorci označeni: CHR i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 78. Electroferogram of UF Kashkaval cheese samples after 12 months of ripening. Fractions according decreasing mobility:  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -,  $I_A$ ,  $I_B$  and  $I_C$ . Sample symbols CHR and REN are explained in Table 9.

#### 4.6. ISPARLJIVE KOMPONENTE AROME

Prema dosadašnjim naučnim saznanjima aroma sira potiče od isparljivih komponenata koje se oslobađaju u kompleksnim procesima degradacije proteinske i lipidne faze tokom zrenja sira. Pri tome je, profil isparljivih komponenata arome različitih tipova sireva determinisan korišćenom metodom za izolovanje isparljive frakcije sira, kao prve faze u identifikaciji komponenata arome primenom gasne hromatografije (GS) ili kombinovanog sistema gasna hromatografija/masena spektroskopija (GH/MS). Mada se head space tehnika, pored ekstrakcije, vakuum ili parne destilacije, često koristi u tu svrhu, mikro metoda simultane destilacije/ekstrakcije (SDE) se veoma uspešno zbog svoje efikasnosti primenjuje u savremenim istraživanjima arome sira. Dok su nosioci arome sira određeni head space tehnikom gasne hromatografije komponente: acetal-

dehid, aceton, diacetil, etanol, <sup>152, 197, 198, 199</sup> u SDE frakciji sira dominiraju isparljive niže masne kiseline (C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>), estri (metil i/ili etil), ketoni i aldehidi<sup>74, 75, 78, 161, 162, 200</sup>

Literaturni podaci o sastavu arome Kačkavalja su relativno malobrojni i odnose se na primenu head space tehnike gasne hromatografije u identifikaciji arome klasičnog Kačkavalja.

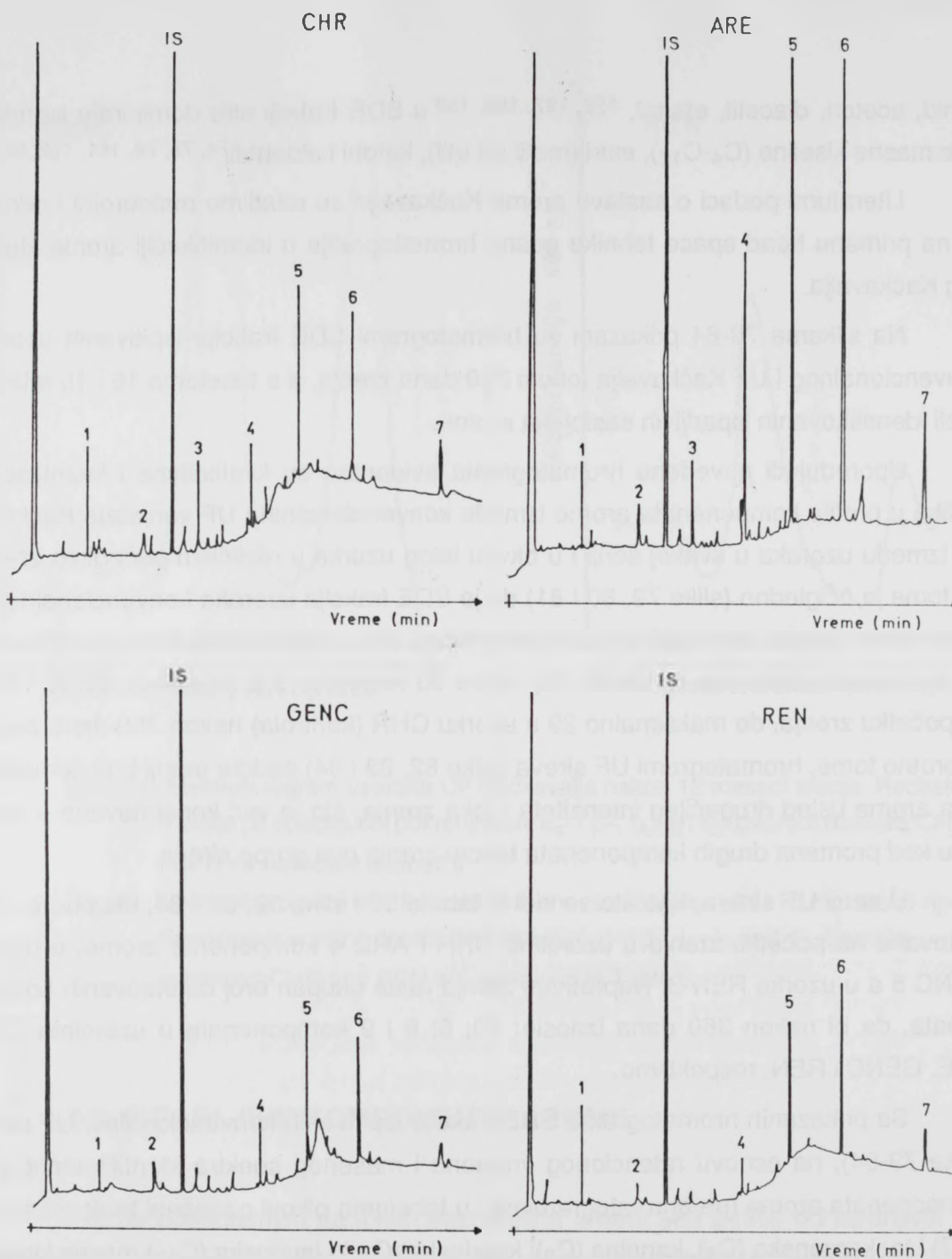
Na slikama 79-84 prikazani su hromatogrami SDE frakcije ispitivanih uzoraka konvencionalnog i UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja, a u tabelama 15 i 16 relativni udeli identifikovanih isparljivih sastojaka arome.

Upoređujući navedene hromatograme evidentne su kvalitativne i kvantitativne razlike u profilu komponenata arome između konvencionalnih i UF varijeteta Kačkavalja, između uzoraka u svakoj seriji i u okviru istog uzorka u različitim periodima zrenja. Pri tome je očigledno (slike 79, 80 i 81) da je SDE frakcija uzoraka konvencionalnih sireva veoma bogata aromatičnim komponentama. Broj detektovanih komponenata arome konvencionalnih sireva (tabela 15) varira od najmanje 8 u uzorcima GENC i REN na početku zrenja, do maksimalno 29 u uzorku CHR (kontrola) nakon 360 dana zrenja. Suprotno tome, hromatogrami UF sireva (slike 82, 83 i 84) sadrže manji broj komponenata arome usled drugačijeg intenziteta i toka zrenja, što je već konstatovano u ovom radu kod promena drugih komponenata tokom zrenja ove grupe sireva.

U seriji UF sireva, kao što se vidi iz tabele 16 i slika 82, 83 i 84, ukupno su detektovane na početku zrenja u uzorcima CHR i ARE 4 komponente arome; u uzorku GENC 5 a u uzorku REN 3. Napretkom zrenja raste ukupan broj detektovanih komponenata, da bi nakon 360 dana iznosio: 10; 6; 6 i 9 komponenata u uzorcima CHR, ARE, GENC i REN, respektivno.

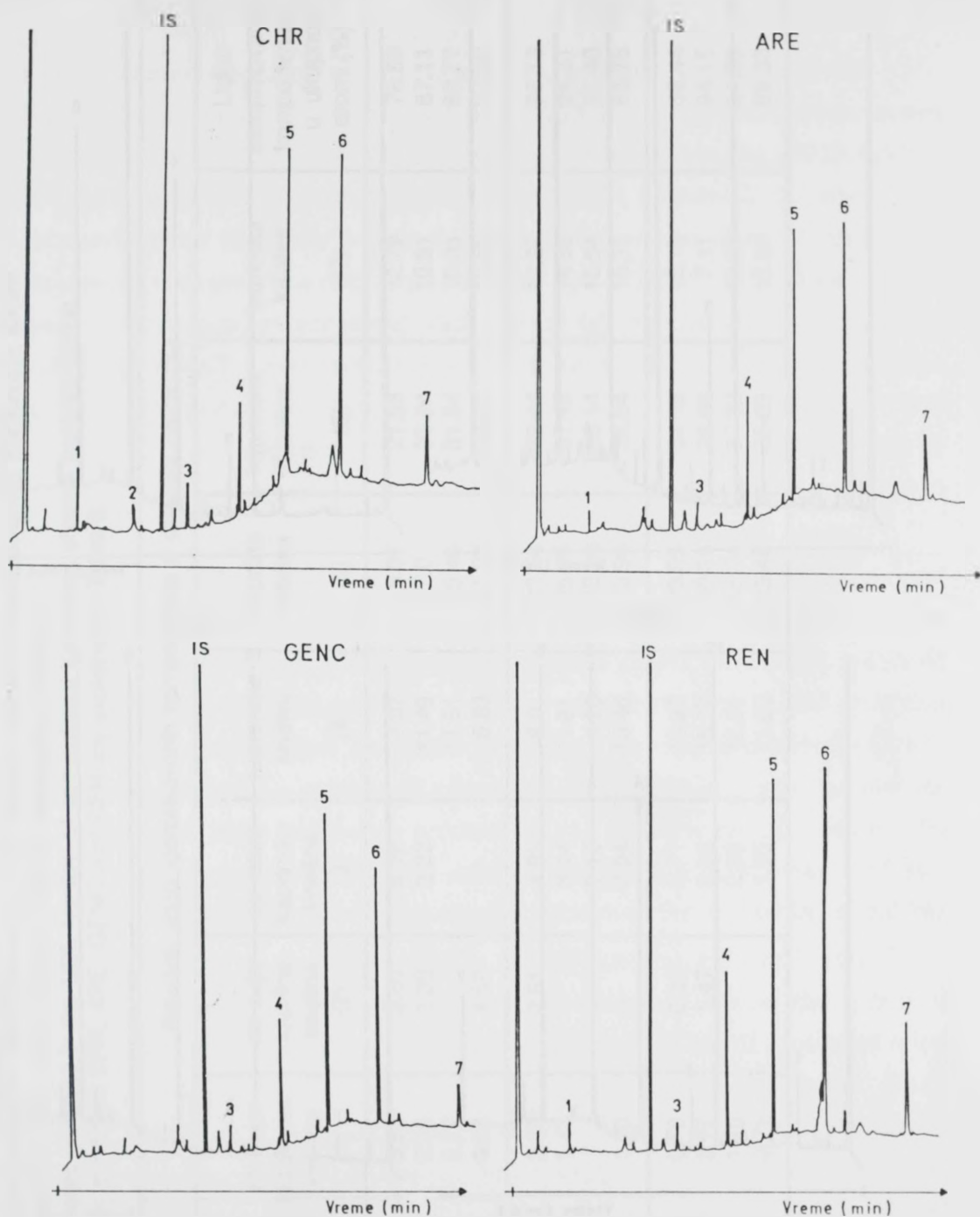
Sa prikazanih hromatograma SDE frakcije ispitivanih konvencionalnih UF sireva (slike 79-84), na osnovu retencionog vremena i masenog spektra identifikovano je 7 komponenata arome (na hromatogramima i u tabelama pikovi označeni brojevima od 1 do 7) i to: kapronska (C<sub>6</sub>), kaprilna (C<sub>8</sub>), kaprinska (C<sub>10</sub>) i laurinska (C<sub>12</sub>) masna kiselina i etil ester kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline. Prisustvo isparljivih masnih kiselina homologne serije (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) i njihova uloga u formiranju karakterističnog ukusa i mirisa i arome klasičnog Kačkavalja je konstatovana ranije u literaturi,<sup>190, 193</sup> i tipično je za polutvrde i tvrde sireve.<sup>10, 77</sup>

U aromi svih uzoraka konvencionalnog i UF Kačkavalja (tabele 15 i 16), očigledna je dominantna uloga kaprilne (C<sub>8</sub>) i kaprinske (C<sub>10</sub>) masne kiseline u odnosu na druge identifikovane aromatične sastojke.



Slika 79. Hromatogram SDE frakcije uzoraka konvencionalnog Kačkavalja na početku zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

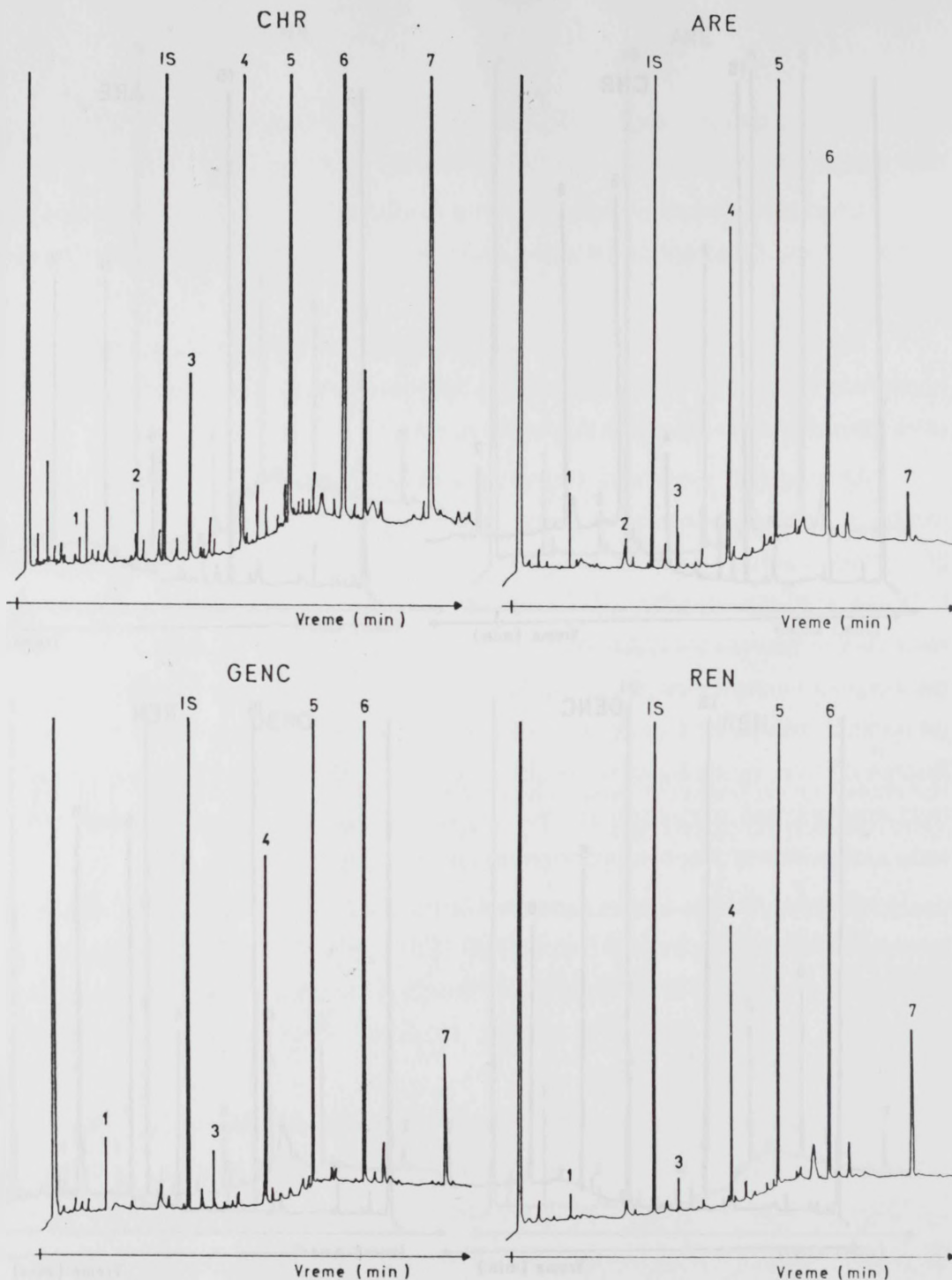
Fig. 79. Chromatogram of the SDE fraction of conventional Kashkaval cheese samples at the beginning of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)



Slika 80. Hromatogram SDE frakcije uzoraka konvencionalnog Kačkavalja nakon 180 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

Fig. 80. Chromatogram of the SDE fraction of conventional Kashkaval cheese samples after 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)





Slika 81. Hromatogram SDE frakcije uzoraka konvencionalnog Kačkavalja nakon 360 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

Fig. 81. Chromatogram of the SDE fraction of conventional Kashkaval cheese samples after 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)

Tabela 15. Promene sadržaja isparljivih komponenata identifikovanih u SDE frakciji uzoraka konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9.

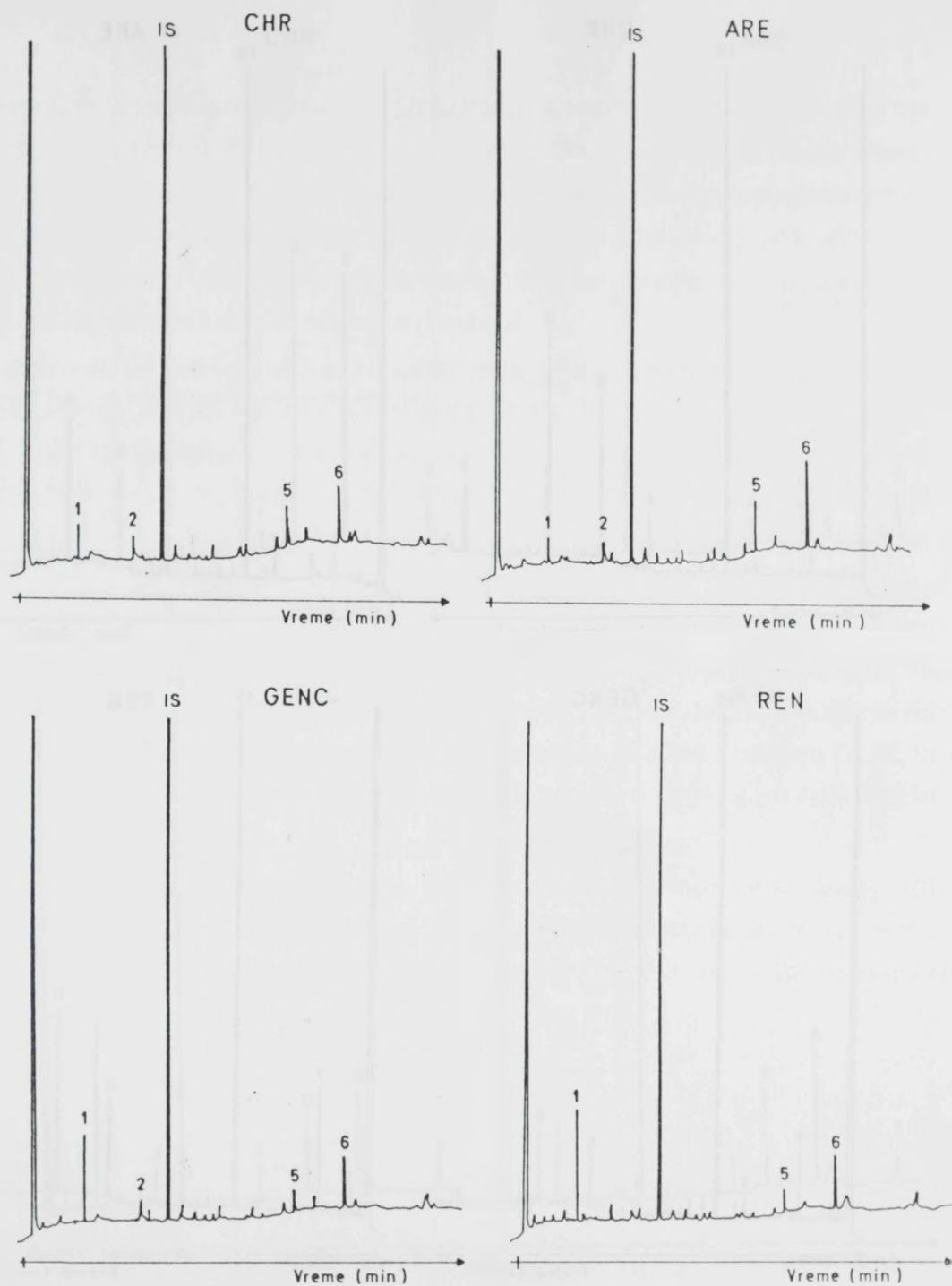
Table 15. Changes of volatile components identified in the SDE fraction of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Relativni udeo identifikovanih komponenata u ukupnoj aromi (%)										
Period zrenja (dani)	Uzorak	Ukupan broj detektovanih komponenata	etil estar kapronske kiseline (1)	etil estar kaprine kiseline (2)	etil estar kaprinske kiseline (3)	kapronska kiselina (4)	kaprina kiselina (5)	kaprinska kiselina (6)	laurinska kiselina (7)	Udeo identifikovanih komponenata u ukupnoj aromi (%)
0	CHR	13	5.85	3.65	9.98	7.02	16.07	21.53	12.79	76.89
	ARE	14	2.35	1.30	3.22	11.49	27.0	30.94	10.81	87.11
	GENC	8	3.77	-	-	11.51	25.44	31.94	10.05	82.71
	REN	8	9.93	4.50	-	5.83	21.23	39.66	16.65	97.80
180	CHR	12	2.80	2.51	4.85	8.0	23.56	32.14	12.27	86.13
	ARE	9	1.43	-	3.14	11.81	25.95	37.15	14.83	94.31
	GENC	8	-	-	3.10	1.26	30.26	36.14	10.64	81.40
	REN	10	1.20	-	2.04	10.46	20.90	32.84	16.31	83.75
360	CHR	29	0.18	0.30	2.71	13.97	23.95	32.18	16.15	89.44
	ARE	13	2.77	1.47	3.96	18.77	30.39	29.68	7.11	94.15
	GENC	10	1.76	-	2.28	12.91	28.04	37.32	12.02	94.33
	REN	10	0.71	-	1.95	11.86	23.48	35.69	15.64	89.33

Koncentracija, tj. relativni udeli identifikovanih sastojaka arome konvencionalnih sireva varira u zavisnosti od korišćenog koagulišućeg enzima: Chr. Hansen's rennet (uzorak CHR), genetski himozin (uzorak GENC) i Rennilase (uzorak REN) tokom zrenja (tabela 15). Generalno posmatrano, koncentracija isparljivih masnih kiselina nepravilno raste ili opada, a koncentracija njihovih estara, uz manje izuzetke opada, u ispitivanim vremenskim intervalima 0, 180 i 360 dana zrenja. Promene u modelu distribucije isparljivih komponenata arome su verovatno posledica kompleksnosti procesa zrenja ovog tipa sira<sup>190</sup> u odnosu na druge sireve (Ras, Provolone, Gouda, Roquefort, Domiati i dr.)<sup>193</sup>. Različita evolucija etil estara masnih kiselina u ovim uzorcima ukazuje da se oni formiraju na različite načine tj. različit je put nastanka u toku degradacionih promena osnovnih konstituenata sira (proteini i masti).<sup>75</sup>

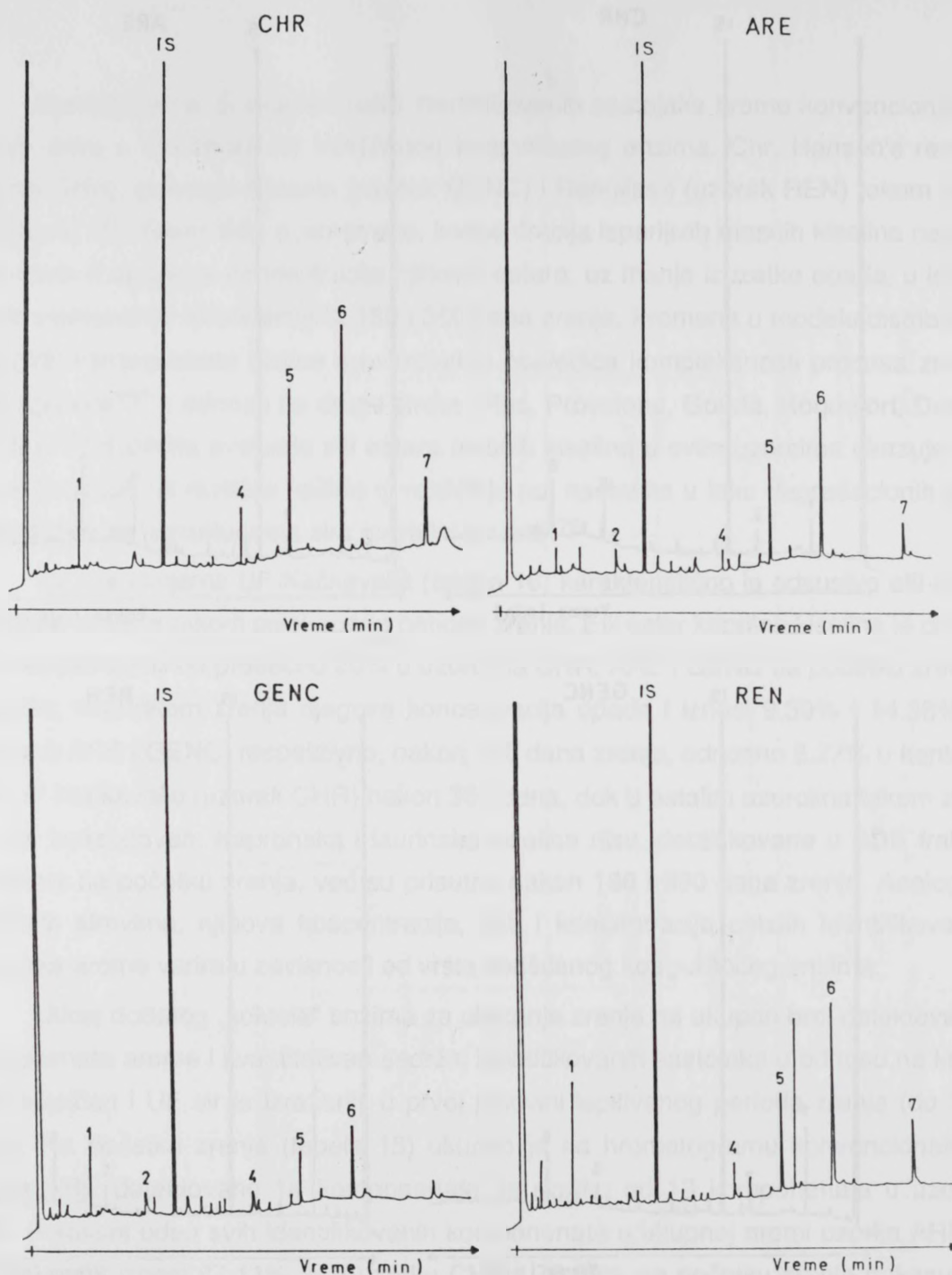
Za sve varijante UF Kačkavalja (tabela 16) karakteristično je odsustvo etil estara kaprinske kiseline tokom celokupnog perioda zrenja. Etil ester kaprilne kiseline je prisutan u koncentraciji od prosečno 20% u uzorcima CHR, ARE i GENC na početku zrenja. Međutim, napretkom zrenja njegova koncentracija opada i iznosi 9.39% i 14.38%, u uzorcima ARE i GENC, respektivno, nakon 180 dana zrenja, odnosno 3.27% u kontrolnom UF Kačkavalju (uzorak CHR) nakon 360 dana, dok u ostalim uzorcima tokom zrenja nije konstatovan. Kapronska i laurinska kiselina nisu identifikovane u SDE frakciji UF sireva na početku zrenja, već su prisutne nakon 180 i 360 dana zrenja. Analogno klasičnim sirevima, njihova koncentracija, kao i koncentracija ostalih identifikovanih sastojaka arome varira u zavisnosti od vrste korišćenog koagulišućeg enzima.

Uticaj dodatog „koktela“ enzima za ubrzanje zrenja na ukupan broj detektovanih komponenata arome i kvantitativan sadržaj identifikovanih sastojaka u odnosu na kontrolni klasičan i UF sir je izraženiji u prvoj polovini ispitivanog perioda zrenja (do 180 dana). Na početku zrenja (tabela 15) ukupno je na hromatogramu konvencionalnog uzorka ARE detektovano 14 komponenata za razliku od 13 komponenata u uzorku CHR. Relativni udeo svih identifikovanih komponenata u ukupnoj aromi uzorka ARE je takođe veći i iznosi 87.11%, a u uzorku CHR - 76.89% na početku zrenja pokazujući trend rasta za 9.24% u uzorku CHR a 7.20% u uzorku ARE nakon 180 dana zrenja. Ukupna količina arome u klasičnim uzorcima CHR i ARE se minimalno menjala tokom sledećih 6 meseci zrenja. Nakon 360 dana zrenja koncentracija identifikovanih sastojaka arome u uzorku ARE je iznosila 94.15%, a u uzorku CHR 89.44%. Iako su kod analognog UF uzorka sa dodatkom kombinacije proteolitičkog i lipolitičkog enzima (tabela 16) ukupno detektovane i identifikovane 4 komponente arome na početku zrenja, kao i u kontrolnom UF siru, njihove koncentracije se razlikuju. Npr. koncentracija etil estara kaprinske kiseline u uzorku ARE je približno 5% niža od koncentracije u uzorku CHR,



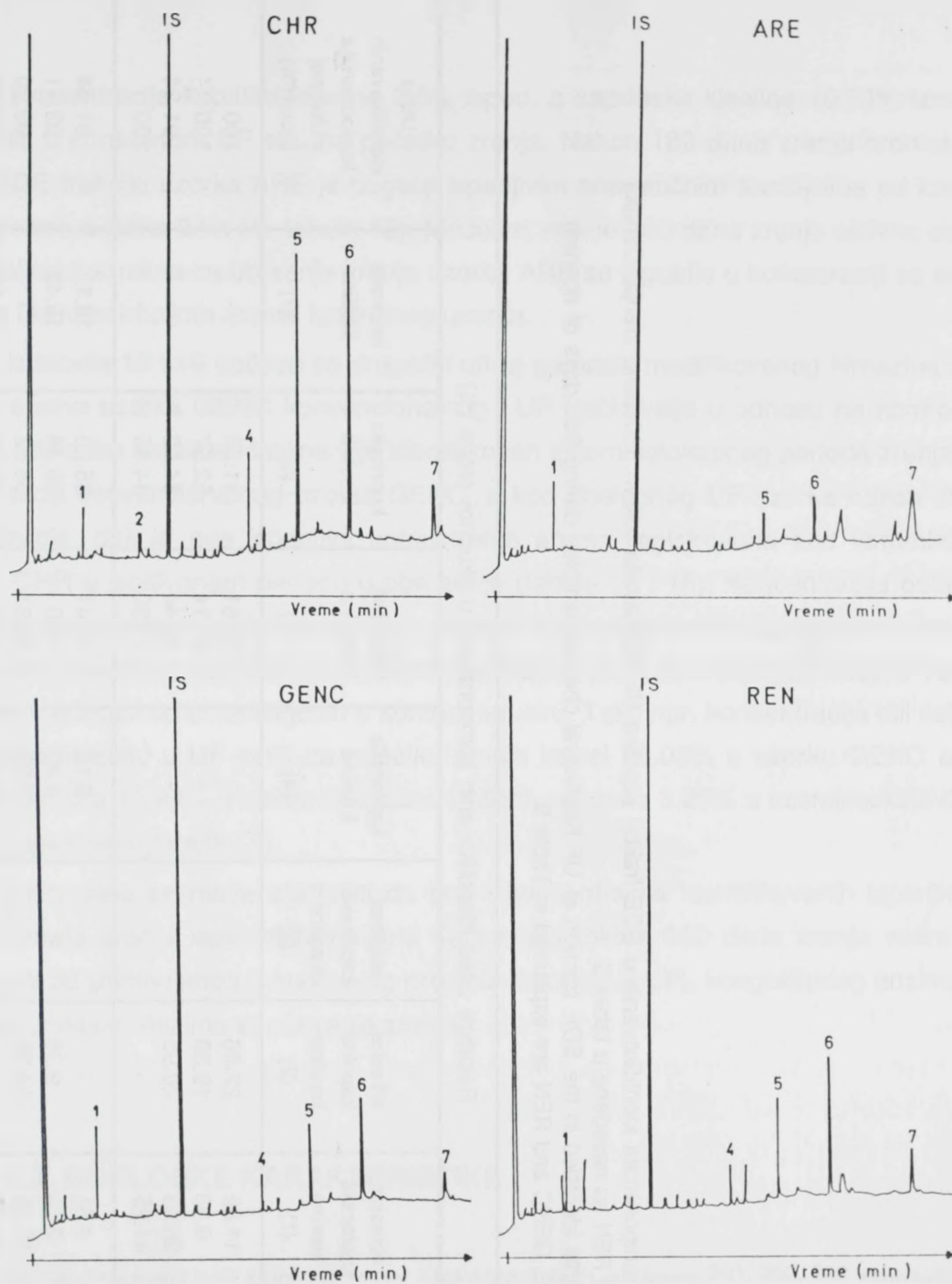
Slika 82. Hromatogram SDE frakcije uzoraka UF Kačkavalja na početku zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

Fig. 82. Chromatogram of the SDE fraction of UF Kashkaval cheese samples at the beginning of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)



Slika 83. Hromatogram SDE frakcije uzoraka UF Kačkavalja nakon 180 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

Fig. 83. Chromatogram of the SDE fraction of UF Kashkaval cheese samples after 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)



Slika 84. Hromatogram SDE frakcije uzoraka UF Kačkavalja nakon 360 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9; identifikovane isparljive komponente označene brojevima 1-7 su date u tabeli 15; IS - interni standard (kamfor)

Fig. 84. Chromatogram of the SDE fraction of UF Kashkaval cheese samples after 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 15; identified volatile components numbered 1-7 are listed in Table 15; IS - internal standard (camphor)

Tabela 16. Promene sadržaja isparljivih komponenata identifikovanih u SDE frakciji uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9.

Table 16. Changes of volatile components identified in the SDE fraction of UF Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Period zrenja (dani)	Uzorak	Ukupan broj detektovanih komponenata	Relativni udeo identifikovanih komponenata u ukupnoj aromi (%)							Udeo identifikovanih komponenata u ukupnoj aromi (%)
			etil estar kaprinske kiseline (1)	etil estar kaprilne kiseline (2)	etil estar kaprinske kiseline (3)	kaprinska kiseline (4)	kaprilna kiseline (5)	kaprinska kiseline (6)	laurinska kiseline (7)	
0	CHR	4	11.89	22.66	-	-	23.61	41.84	-	100
	ARE	4	6.90	19.39	-	-	21.14	52.57	-	100
	GENC	5	26.03	20.95	-	-	10.44	34.52	-	91.94
	REN	3	41.25	-	-	-	14.30	44.45	-	100
180	CHR	6	4.61	-	-	6.16	17.47	35.28	18.12	81.64
	ARE	8	2.74	9.39	-	4.40	19.0	39.46	18.42	93.71
	GENC	7	15.15	14.38	-	7.02	18.33	36.02	-	90.90
	REN	8	11.67	-	-	5.49	14.0	38.97	21.93	92.06
360	CHR	10	3.20	3.27	-	9.35	25.97	34.84	16.45	93.38
	ARE	6	6.40	-	-	-	4.81	9.45	54.02	74.68
	GENC	6	14.58	-	-	9.23	17.90	37.83	17.38	96.92
	REN	9	5.77	-	-	6.19	14.08	29.73	16.38	72.15

dok je koncentracija kaprilne kiseline 2.5% ispod, a kaprinske kiseline 10.73% iznad vrednosti u kontrolnom UF siru na početku zrenja. Nakon 180 dana zrenja hromatogram SDE frakcije uzorka ARE je bogatiji isparljivim aromatičnim sastojcima od kontrolnog uzorka (slika 83 a i b, tabela 16). Međutim, nakon 360 dana zrenja aktivno dejstvo „koktela“ enzima za ubrzanje zrenja uzorka ARE se izgubilo u komparaciji sa sastavom i koncentracijom arome kontrolnog uzorka.

Iz tabela 15 i 16 uočava se drugačiji uticaj genetski modifikovanog himozina na sastav arome uzorka GENC konvencionalnog i UF Kačkavalja u odnosu na kontrolni uzorak. Etil ester kaprilne kiseline nije identifikovan tokom celokupnog perioda zrenja u SDE frakciji konvencionalnog uzorka GENC, a kod analognog UF uzorka nakon 360 dana zrenja, dok je ova isparljiva komponenta arome registrovana kod kontrolnog uzorka CHR u ispitivanom periodu u obe serije (tabele 15 i 16). Koncentracija ostalih identifikovanih komponenata arome obe varijante Kačkavalja tretiranog genetski modifikovanim himozinom različito varira tokom ispitivanog perioda zrenja, pokazujući veće ili manje vrednosti od ustanovljenih u kontrolnom siru. Tako npr. koncentracija etil estra kaprinske kiseline u UF seriji na početku zrenja iznosi 26.03% u uzorku GENC a u kontrolnom siru 11.89% a nakon 360 dana 14.58% odnosno 3.20% u uzorcima GENC i CHR, respektivno (tabela 16).

Generalno se može zaključiti da broj i koncentracija identifikovanih isparljivih komponenata arome ispitivanih varijanti Kačkavalja tokom 360 dana zrenja varira u zavisnosti od primenjenog tehnološkog procesa (klasični ili UF), koagulišućeg enzima i dodatog „koktela“ enzima za ubrzanje zrenja.

#### 4.7. REOLOŠKE KARAKTERISTIKE

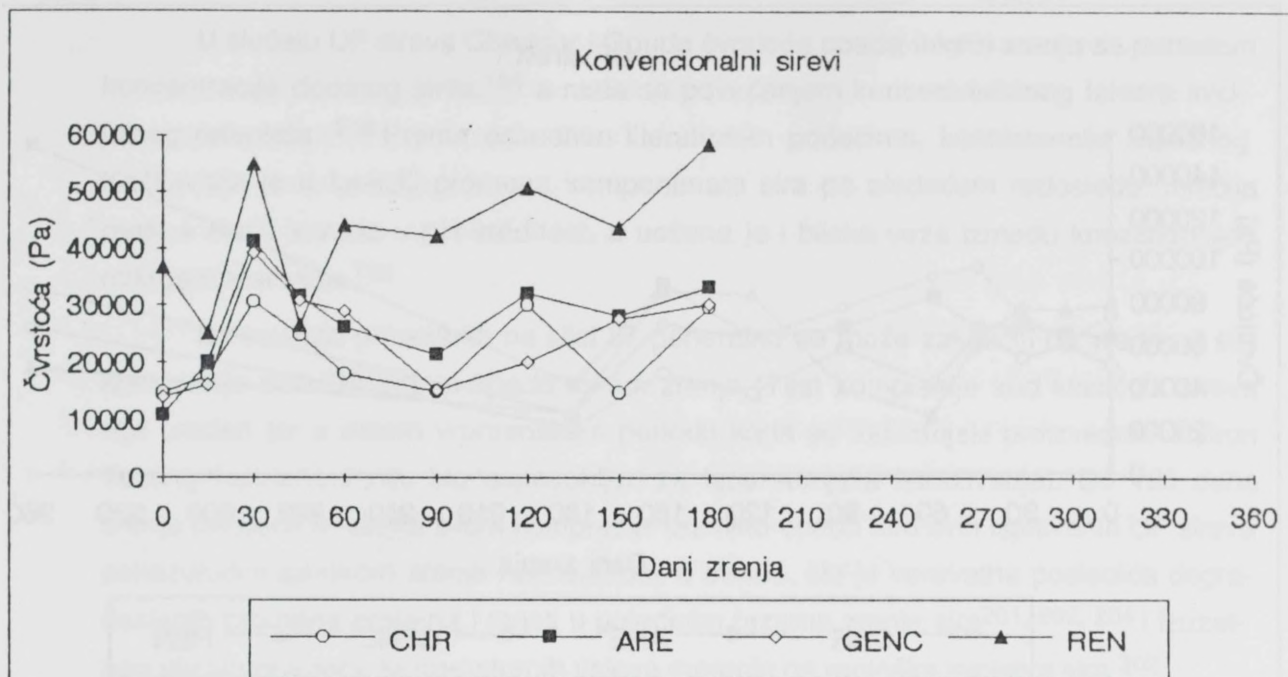
Sir je proizvod koji pripada grupi viskoelastičnih sistema.<sup>201, 202, 203</sup> Reološke karakteristike sira determinišu neke relevantne senzorne osobine sira kao što su čvrstoća, elastičnost, mazivost i dr. koje su bitne za prihvatljivost proizvoda od strane konzumenata.<sup>201</sup> Konzistencija sira se ne može odrediti samo jednim parametrom. Naime, da bi se dobila kompletna slika konzistencije, neophodno je analizirati kompleksan broj parametara pri različitim uslovima deformacije primenom različitih metoda.<sup>203, 204</sup> Rezultati reoloških testova značajno zavise od uslova ispitivanja,<sup>203</sup> a ustanovljena je čvrsta korelacija između instrumentalnih i senzornih analiza.<sup>205</sup> Na osnovu dosadašnjih saznanja može se reći da dominantan uticaj na reološke karakteristike sira ima



hemijski sastav i tehnološki proces proizvodnje sira.<sup>201, 202, 204, 206</sup> Sadržaj vode (odnosno suva materija sira bez masti), koncentracija proteina (nosioc elastičnih svojstava), sastav mlečne masti (komponenta senzitivna na promenu temperature), pH vrednost, koncentracija NaCl i proteoliza tokom zrenja su relevantni faktori koji signifikantno determinišu reološke karakteristike sira.<sup>201, 202</sup> Pošto je sir nehomogene i varijabilne strukture prisustvo nekoliko faza: čvrste, tečne, gasa, masnih globula u vodenom matriksu, pukotina ili šupljina, dehidratacije i progresivne proteolize tokom zrenja čini neverovatno teškim dobijanje reproduktibilnih i komparativnih rezultata reoloških testova.<sup>204</sup> Slučajna greška u ovim testovima je niža kod starijih sireva zbog činjenice da napretkom zrenja sirevi postaju homogenije strukture.<sup>186</sup> Promena konzistencije sira sa starošću je, pored navedenih faktora, u direktnoj korelaciji sa uslovima zrenja, naročito temperaturom, oblikom i veličinom sira, količinom rezidualnog sirila i tipom starter kulture.<sup>191</sup> Ispitivanje uticaja proteolize, pri konstantnim ostalim faktorima, na konzistenciju Cheddar-a pokazuje da razgradnja proteina, posebno  $\alpha_{s1}$ -kazeina, izaziva mekšu teksturu sira.<sup>201</sup>

Za razliku od drugih sireva, reološke osobine sirnog testa tokom zrenja Kačkavalja pokazuju drugačiji karakter usled termičke obrade sirne grude koja je specifična za ovu vrstu sira,<sup>202</sup> čime se remeti uobičajeni tok proteolize na početku zrenja. Odsustvo intenzivnije proteolize u početnom periodu zrenja je verovatno jedan od značajnih uzroka veće čvrstoće Kačkavalja u odnosu na druge sireve.<sup>178</sup>

Rezultati ispitivanja promene reoloških osobina konvencionalnih i UF sireva tokom 360 dana zrenja mereni penetrometrom prikazani su na slikama 85 i 86. Očigledno je da se tokom zrenja svih ispitivanih sireva čvrstoća nepravilno menja pokazujući različite trendove kod konvencionalnih sireva i UF analoga. Pri tome je značajno istaći da se čvrstoća klasičnih sireva (slika 85) dobijenih primenom standardnog sirila (uzorak CHR, 14857-29715 Pa), i genetski modifikovanog himozina (uzorak GENC, 13925-30252 Pa), signifikantno ne razlikuju potvrđujući ranije konstatacije da je rekombinovani himozin potpuno kompetentan proteolitički agens za koagulaciju mleka u tehnološkom procesu proizvodnje sira.<sup>46, 207</sup> Nasuprot tome, u grupi UF sireva (slika 86) promene čvrstoće registrovane kod uzorka sa genetskim himozinom su najpribližnije vrednostima čvrstoće u uzorku sira proizvedenim primenom Rennilase uz izvesno odstupanje u pojedinim vremenskim intervalima. Čvrstoća UF sireva je, kao što se sa slike 86 vidi, prosečno 2 (uzorak REN) do 5.5 puta (uzorak ARE i uzorak GENC) veća u odnosu na analogne klasične sireve. Uzrok ovoj pojavi je kao što je napred rečeno, različit hemijski sastav (naročito sadržaj vode i sadržaj NaCl) i drugačiji intenzitet promena pojedinih proteinskih frakcija tokom zrenja ispitivanih klasičnih i UF sireva. Iz rezultata prikazanih

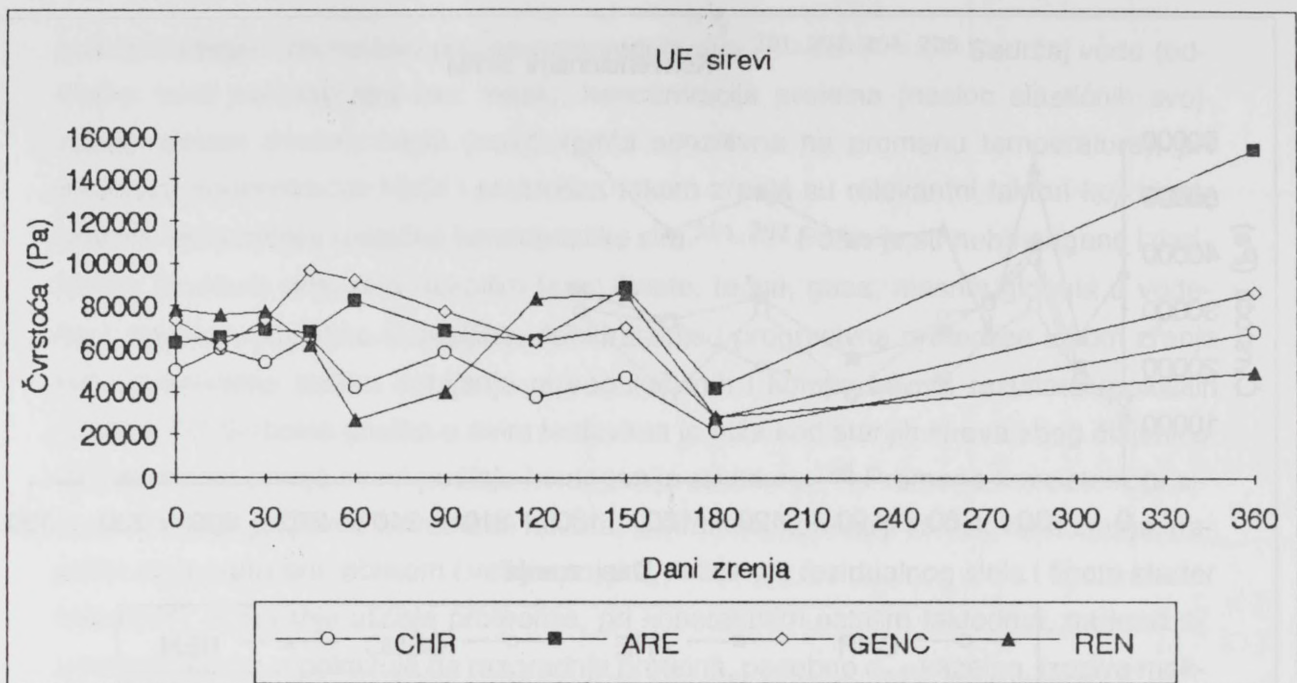


Slika 85. Promene čvrstoće uzorka konvencionalnog Kačkavalja tokom 180 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 85 Changes of hardness of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

na slikama 85 i 86 uočava se značajno variranje vrednosti čvrstoće ispitivanih sireva tokom zrenja koje je, verovatno, posledica oscilovanja temperature ambijenta na kojoj su vršena reološka merenja što su utvrdili i drugi istraživači.<sup>201, 202</sup> Veće variranje temperature utiče na karakteristike mlečne masti, prevodeći je delimično u tečno stanje na povišenoj temperaturi uslovljavajući mekšu konzistenciju sira i niže vrednosti čvrstoće merene penetrometrom.<sup>201, 202</sup>

Pošto su ispitivanja čvrstoće konvencionalnih i UF sireva vršena na sobnoj temperaturi u vremenskom intervalu od 12 meseci, izvesno je da se temperatura ambijenta drastično menjala i, pored navedenih drugih relevantnih faktora, dominantno uticala da vrednosti čvrstoće pokazuju nepravilan trend rasta i opadanja tokom zrenja. Sa slika 85. i 86. uočljiv je porast čvrstoće svih ispitivanih sireva, sa izuzetkom UF uzorka REN (slika 86), na kraju perioda zrenja u odnosu na početne vrednosti što je u skladu sa literaturnim podacima.<sup>201, 202, 203</sup> Generalno posmatrano, različite vrednosti čvrstoće



Slika 86. Promene čvrstoće uzoraka UF Kačkavalja tokom 1360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

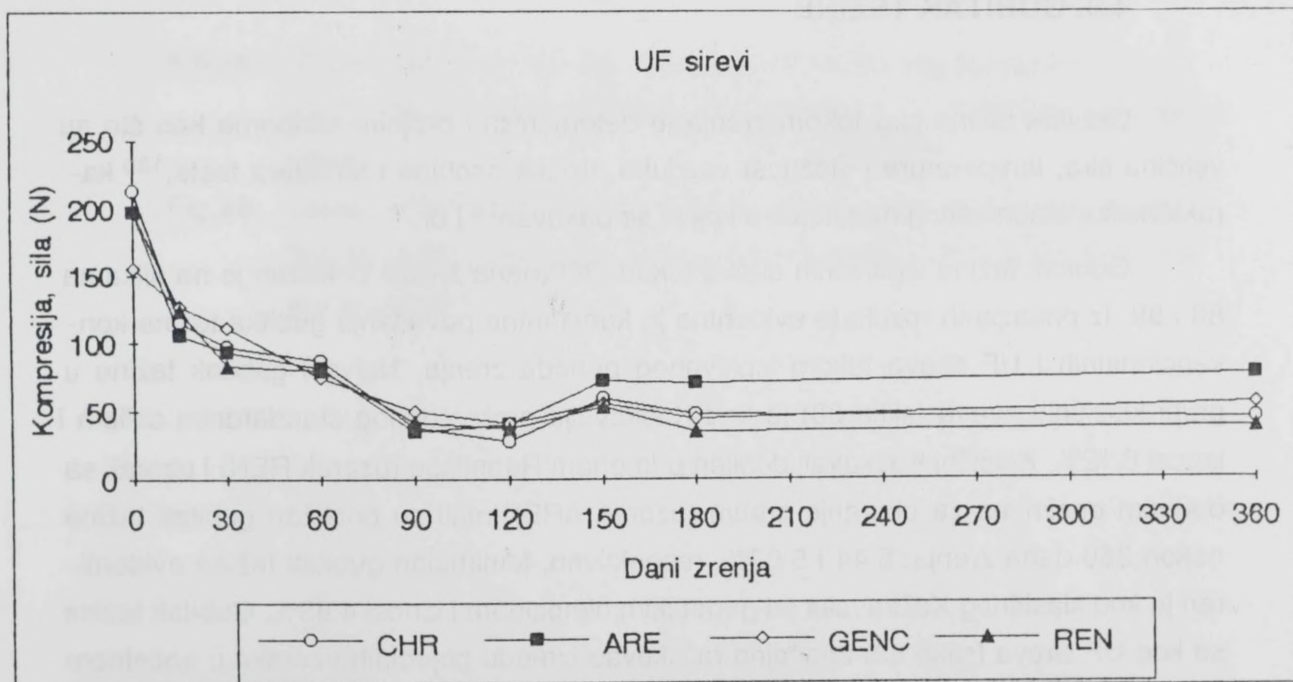
Fig. 86. Changes of hardness of UF Kashkaval cheese samples during 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

između uzoraka i kod istih uzoraka tokom zrenja su posledica prirode supstrata za proizvodnju sira, hemijskog sastava i promena komponenata tokom ispitivanog perioda. Nakon 12 meseci zrenja testo klasičnih sireva je poprimilo kruti, neelastični karakter, dezintegrisalo se, pa stoga nisu izvršena reološka ispitivanja čvrstoće penetrometrom. Pojava da su stariji sirevi manje elastični a više kruti konstatovana je i kod Cheddar-a proizvedenog primenom himozinskog preparata i mikrobiološkog koagulansa Rennilase nakon 14 meseci zrenja.<sup>186</sup>

Jedan od savremenih pokazatelja reoloških karakteristika sira jeste čvrstoća, prikazana vrednošću sile kompresije određene na Instron Testing instrumentu. Različiti sirevi podvrgnuti testu kompresije na Instronu daju različite modele dijagrama.<sup>202, 204</sup> Za do sada ispitane polutvrde i tvrde sireve (Cheddar, Colby, Cheshire, Emmentaler, Gouda) karakteristično je opadanje sile kompresije sa porastom temperature na kojoj se izvode merenja (4-20°C).<sup>202</sup> Porastom stepena acidifikacije mleka bez obzira na prirodu koagulišućeg enzima (standardni himozin ili Rennilase) čvrstoća sira merena testom kompresije takode opada.<sup>74, 186, 191</sup>

U slučaju UF sireva Cheddar i Gouda čvrstoća opada tokom zrenja sa porastom koncentracije dodatog sirila,<sup>164</sup> a raste sa povećanjem koncentracionog faktora inicijalnog retentata.<sup>208</sup> Prema oskudnim literaturnim podacima, konzistencija klasičnog Kačkavalja je u funkciji promena komponenata sira po sledećem redosledu: mlečna mast > NaCl > voda > pH vrednost, a uočena je i bliska veza između konzistencije i mikrostrukture sira.<sup>192</sup>

Iz rezultata prikazanih na slici 87 generalno se može zaključiti da vrednost sile kompresije svih UF sireva opada tokom zrenja (Test kompresije kod klasičnih sireva nije urađen jer u datom vremenskom periodu kada su industrijski proizvedeni Instron Testing instrument nije bio osposobljen za laboratorijska istraživanja). Do 120 dana zrenja čvrstoća izražena silom kompresije pravilno opada kod svih ispitivanih UF sireva pokazujući napretkom zrenja nepravilnosti u trendu, što je verovatna posledica degradacionih promena proteina i masti u pojedinim fazama zrenja sira<sup>201, 202, 204</sup> i izuzetnog uticaja promene temperaturnih uslova merenja na reološka svojstva sira.<sup>202</sup>



Slika 87. Promene čvrstoće uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja određene na Instron Testing instrumentu. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

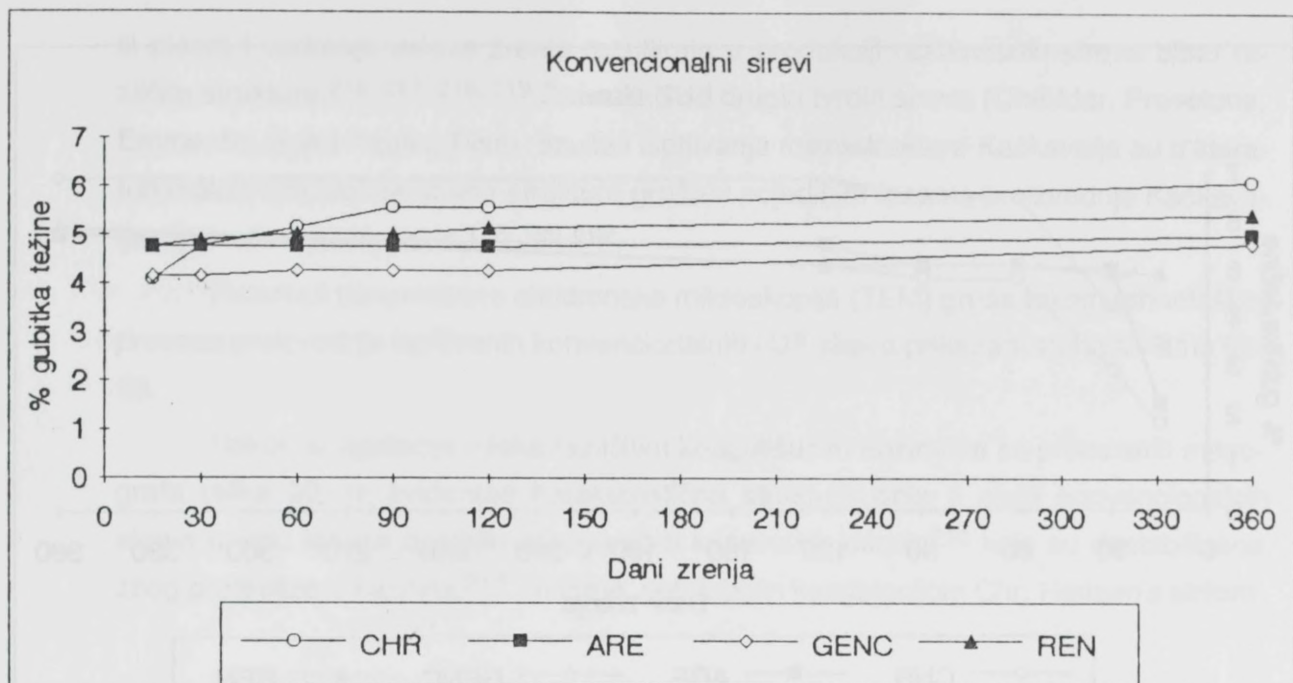
Fig. 87. Changes of hardness of UF Kashkaval cheese samples during 180 days of ripening determined by Instron Testing instrument. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Nakon 360 dana zrenja najniža vrednost sile kompresije je ustanovljena kod UF sira sa Rennilase-om (37.7 N) što je za 6.5 N niža vrednost od dobijene u kontrolnom UF siru (uzorak CHR). Slični rezultati su dobijeni kod Cheddar-a koji proizveden primenom Rennilase pokazuje nešto niže vrednosti sile kompresije konzekventno većoj proteolitičkoj aktivnosti ovog koagulansa nego himozina.<sup>191</sup> Dodati enzimi za akceleraciju zrenja u uzorku ARE usloveli su niže vrednosti sile kompresije (slika 87) a time i mekšu konzistenciju sira u odnosu na kontrolni sir do 90 dana zrenja. U kasnijem periodu zrenja rezultati ispitivanja sile kompresije pokazali su čvršću konzistenciju ovog uzorka u odnosu na kontrolni (vrednost sile kompresije je za 3.21 N veća u uzorku ARE nego u uzorku CHR nakon 360 dana zrenja). Uticaj genetski modifikovanog himozina na promene reoloških osobina UF Kačkavalja tokom zrenja se razlikuje od animalnog himozina što je suprotno sličnim promenama hemijskog sastava odgovarajućih UF sireva.

#### 4.8. GUBITAK TEŽINE

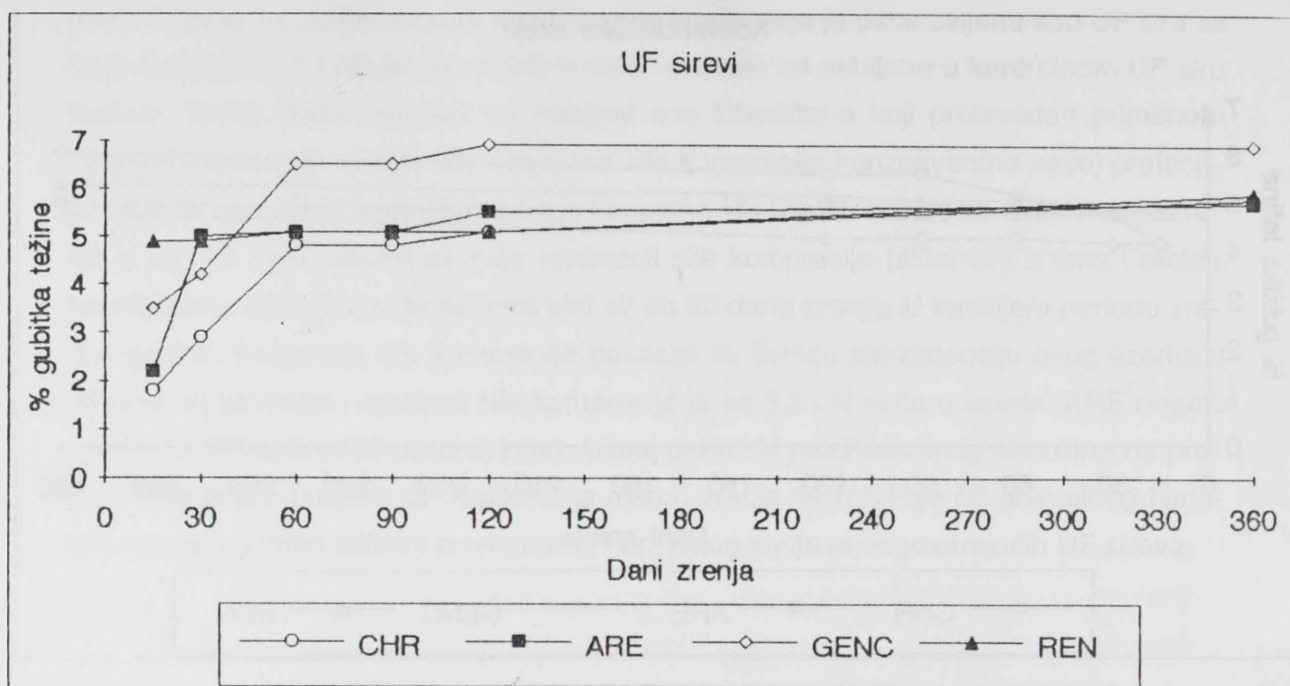
Gubitak težine sira tokom zrenja je determinisan brojnim faktorima kao što su veličina sira, temperatura i vlažnost vazduha, fizičke osobine i struktura testa,<sup>180</sup> karakteristike ambalažnog materijala u koji je sir pakovan<sup>28</sup> i dr.

Gubitak težine ispitivanih sireva tokom 360 dana zrenja prikazan je na slikama 88 i 89. Iz prikazanih rezultata evidentno je konstantno povećanje gubitka težine konvencionalnih i UF sireva tokom ispitivanog perioda zrenja. Najveći gubitak težine u grupi klasičnih sireva (slika 88) je kod Kačkavalja proizvedenog standardnim sirilom i iznosi 6.12%. Klasični Kačkavalj dobijen primenom Rennilase (uzorak REN) i uzorak sa dodatim enzimima za ubrzanje zrenja (uzorak ARE) imali su približan gubitak težine nakon 360 dana zrenja: 5.44 i 5.03%, respektivno. Minimalan gubitak težine evidentiran je kod klasičnog Kačkavalja sa genetskim himozinom i iznosi 4.83%. Gubitak težine se kod UF sireva (slika 89) značajno razlikovao između pojedinih uzoraka u početnom periodu zrenja ali je na kraju ispitivanog perioda približno isti i registrovane su sledeće vrednosti: uzorak GENC 6.92%, uzorak REN 6.30%, uzorak CHR 6.25% i uzorak ARE 6.15%.



Slika 88. Promene težine uzoraka konvencionalnog Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 88. Losses of weight of conventional Kashkaval cheese samples during 360 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



Slika 89. Promene težine uzoraka UF Kačkavalja tokom 360 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 89. Losses of weight of UF Kashkaval cheese samples during 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

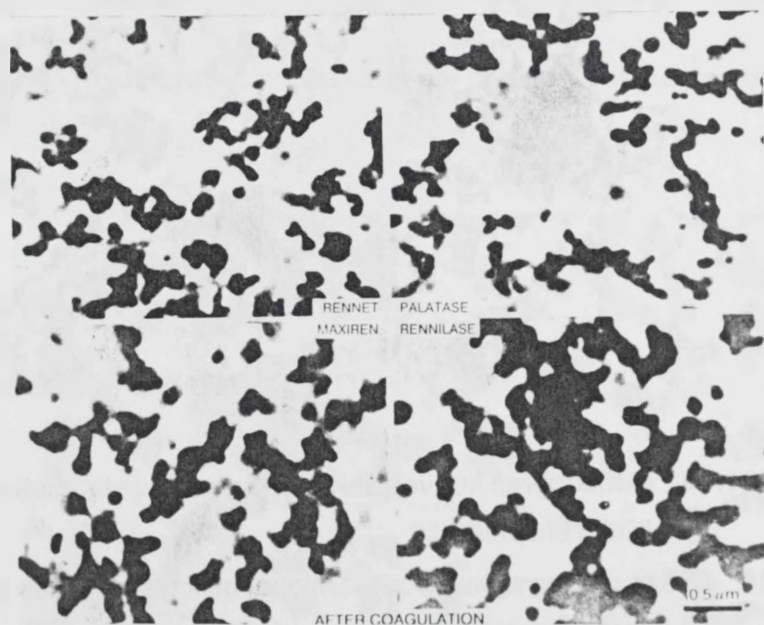
#### 4.9. MIKROSTRUKTURA GRUŠA TOKOM TEHNOLOŠKOG PROCESA

Izučavanje strukturnih promena gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje sira primenom elektronske mikroskopije otpočelo je pre dvadesetak godina, najpre TEM<sup>210</sup> (transmisiona elektronska mikroskopija) a kasnije i SEM (scanning elektronska mikroskopija<sup>211, 212</sup>) tehnikom. Hemijski sastav finalnog gruša i njegova struktura, zajedno sa uslovima zrenja, determinišu strukturu zrelog sira,<sup>213</sup> od koje značajno zavise reološke karakteristike gotovog proizvoda. Primena UF retentata kao supstrata za proizvodnju sira<sup>213</sup>, supstitucija himozina pepsinom<sup>211</sup> ili mikrobiološkim proteazama<sup>175</sup>, postupci manipulacije gruša (sečenje, čedarizacija)<sup>214, 215</sup>, korišćenje bakterija

ili plesni i variranje uslova zrenja rezultiraju u produkciji raznovrsnih sireva bitno različite strukture.<sup>216, 217, 218, 219</sup> Za razliku od drugih tvrdih sireva (Cheddar, Provolone, Emmental, Saint Paulin, Tilsit) rezultati ispitivanja mikrostrukture Kačkavalja su u literaturi malobrojni, dok promena strukture gruša u pojedinim fazama proizvodnje Kačkavalja nije izučavana do sada.<sup>176, 190, 192</sup>

Rezultati transmisione elektronske mikroskopije (TEM) gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje ispitivanih konvencionalnih i UF sireva prikazani su na slikama 90-99.

Nakon koagulacije mleka različitim koagulišućim enzimima sa prikazanih mikrografa (slika 90) je evidentna karakteristična struktura gela u seriji konvencionalnih sireva u vidu lanaca nastalih agregacijom kazeinskih micela<sup>210</sup> koje su destabilisane zbog proteolize  $\chi$ -kazeina.<sup>216</sup> Pri tome, gel dobijen koagulacijom Chr. Hansen's sirilom

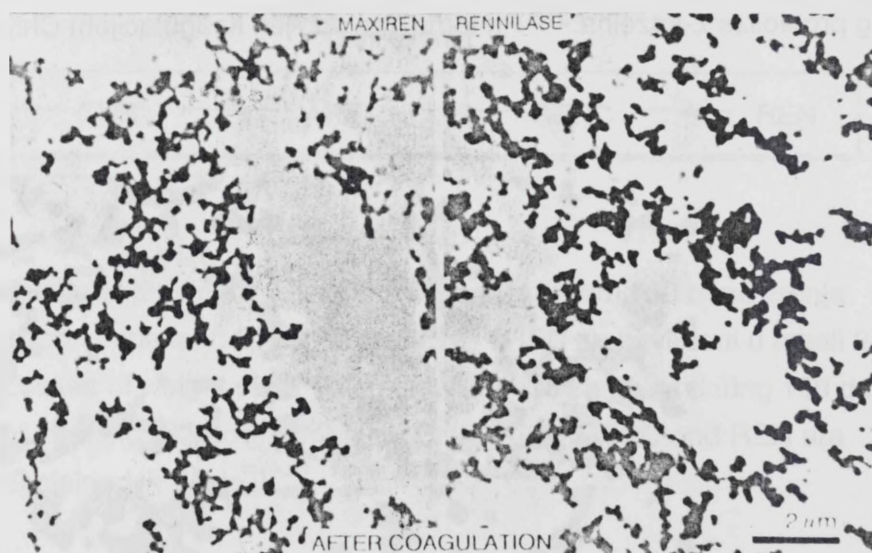


Slika 90. TEM mikrografi konvencionalnih uzoraka gela mleka koaguliranih različitim enzimima. Rennet - uzorak CHR; Palatase - uzorak ARE; Maxiren - uzorak GENC; Rennilase - uzorak REN. Oznake uzoraka CHR, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9.

Fig. 90. TEM micrographs of conventional milk gel samples coagulated by different enzymes. Rennet - CHR sample; Palatase - ARE sample; Maxiren - GENC sample; Rennilase - REN sample. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.



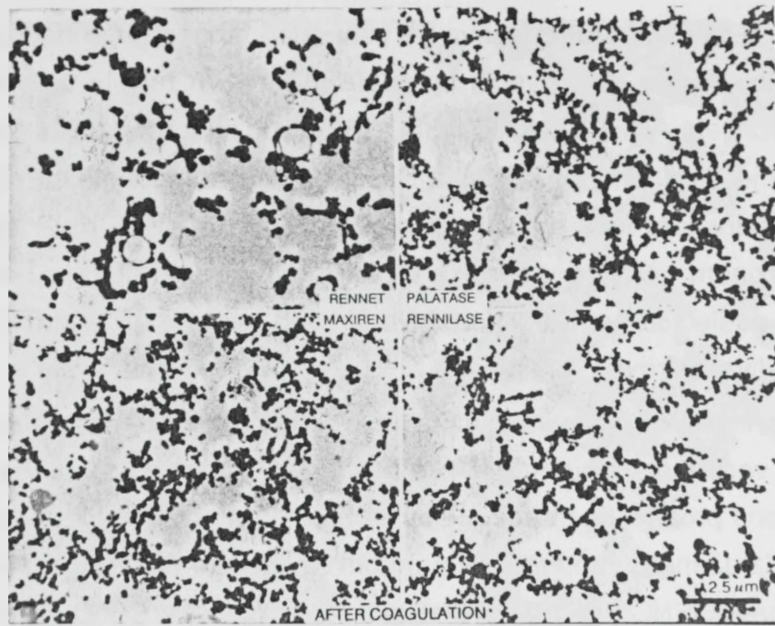
u uzorcima CHR i ARE se sastoji od manjih kazeinskih partikula nego gel mleka koagulisanog genetskim himozinom (uzorak GENC) i Rennilase-om (uzorak REN), kod kojih je uznapredovala fuzija kazeinskih micela, što se izrazitije vidi sa mikrografa prikazanih na slici 91. Sličan izgled SEM i TEM mikrografa je dobijen upoređivanjem gruša mleka koagulisanog himozinom, kravljim i svinjskim pepsinom u proizvodnji Cheddar-a.<sup>211</sup> Primenom pepsina dobija se gruš otvorenije strukture kao posledica nespecifične hidrolize kazeina, koji teško uklapa mast što se negativno odražava na kvalitet sira. Rezultirajući sir je tvrde konzistencije i randman je manji nego što je slučaj sa sirom proizvedenim primenom himozina.<sup>211</sup>



Slika 91. TEM mikrografi konvencionalnih uzoraka gela mleka koagulisanih različitim enzimima.

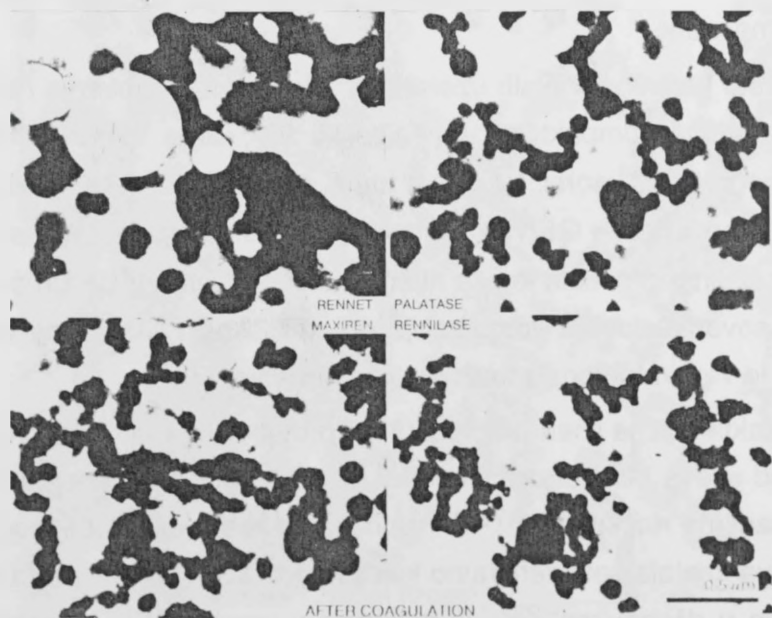
Fig. 91. TEM micrographs of conventional milk gel samples coagulated by different enzymes.

Analogni gelovi dobijeni koagulacijom UF retentata (slika 92) razlikuju se po izgledu proteinskog matriksa od bazične strukture konvencionalnih gelova, što je konstatovano ranije u literaturi.<sup>129, 213, 220</sup> Uzorci UF retentata koagulisanog himozinskim preparatom (CHR) i *M. miehei* proteazom (REN) su slične strukture što je u skladu sa rezultatima Gavarić et al.<sup>175</sup> Ispitivani uzorci CHR i REN imaju više razvučen proteinski matriks nego uzorak retentata koagulisan genetskim himozinom (GENC) u koji su uklopljene masne globule.



Slika 92. TEM mikrografi uzoraka gela retentata koaguliranih različitim enzimima.

Fig. 92. TEM micrographs of retentate gel samples coagulated by different enzymes.



Slika 93. TEM mikrografi uzoraka gela retentata koaguliranih različitim enzimima.

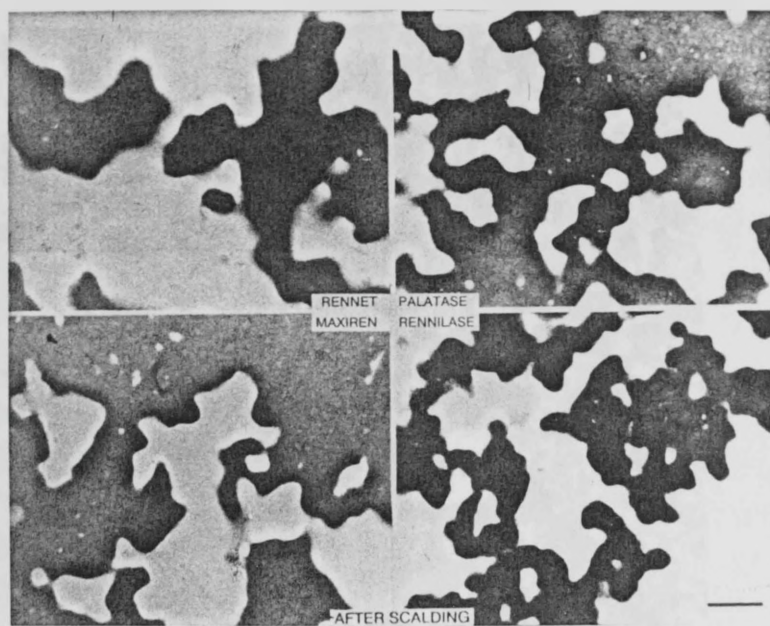
Fig. 93. TEM micrographs of retentate gel samples coagulated by different enzymes.

Sa TEM mikrografa uočava se veći udeo lanaca nego nakupina u proteinskom matriksu koji se sastoji od većih agregata kazeinskih micela u uzorku CHR, a potom slede uzorci gela ARE, GENC i na kraju REN koji sadrži signifikantno manje kazeinske micelle što je očigledno sa slike 93. Prisustvo masnih globula sa očuvanom membranom u proteinskom matriksu se jasno uočava u uzorku UF gela koagulisanog genetskim himozinom - Maxiren. Razlika u distribuciji masnih globula konvencionalnih i UF gelova su posledica hemijskog sastava sirovog mleka i UF retentata iz kojih su proizvedeni ispitivani sirevi.

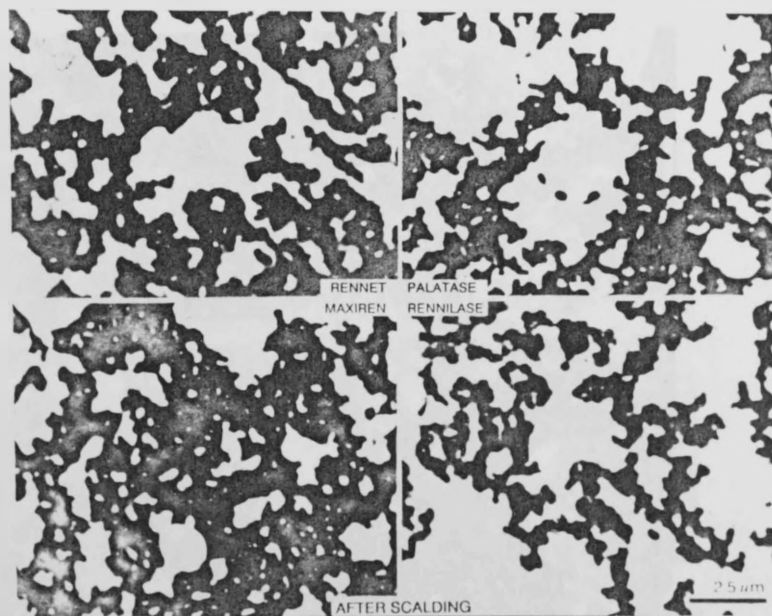
U svim konvencionalnim uzorcima gruša nakon dogrevanja kazeinske micelle su spojene u većem stepenu nego u prethodnoj fazi. Odvajanje surutke uzrokuje nastanak gusto zbijene proteinske mreže,<sup>212</sup> usled fuzije dva obezmaščena zrna gruša,<sup>216</sup> koja je najviše izražena u uzorku REN a potom slede uzorak CHR, zatim uzorak ARE i konačno uzorak GENC (slika 94). Razlike između uzoraka REN i GENC su gotovo zanemarljive pri manjem uvećanju (1940 x) (slika 95). Razlike u strukturi uzoraka UF gruša konstatovane nakon koagulacije su pojačane nakon dogrevanja što se vidi sa mikrografa prikazanih na slici 96. Delovanjem standardnog sirila (CHR) formirane su male nakupine agregata kazeinskih micela u kojima masne globule grade veze između lanaca. Lanci se takođe uočavaju i kod uzorka GENC, dok uzorak UF gruša koagulisan Rennilase-om sadrži uglavnom grozdaste nakupine kazeinskih micela, a lanci su pretežno veoma kratki.

U setu konvencionalnih uzoraka gruša nakon presovanja na TEM mikrografima se uočava slična kompaktnost gruša (slika 97), ali je uzorak CHR nešto otvorenije strukture nego ostali uzorci. Nasuprot tome, najkompaktniji UF gruš (slika 98) je produkovao Maxiren (uzorak GENC), zatim Chr. Hansen's rennet, potom Rennilase. Kompaktnost kazeinskih micela je bila nešto slabije izražena u UF grušu uzorka ARE u koji je pre presovanja dodata kombinacija proteolitičkog i lipolitičkog enzima za ubrzanje zrenja što je verovatno posledica njihovog dodatka.

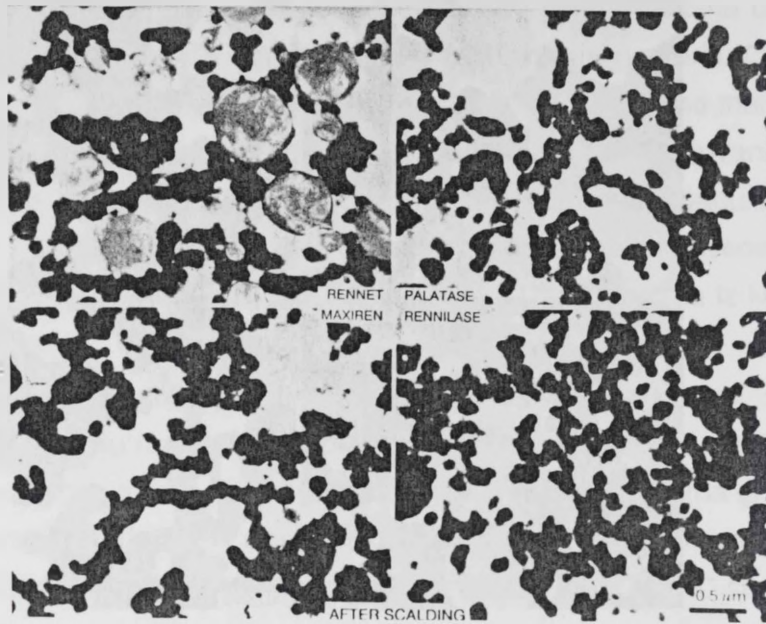
Karakteristična linearna orijentacija proteinskog matriksa formirana nakon čedarizacije kod sireva Mozzarella, Cheddar, Provolone,<sup>212, 221</sup> konstatovana i u malobrojnim ispitivanjima Kačkavalja,<sup>176, 190</sup> uočava se kod gruša dobijenog primenom Rennilase. Pojava kristala soli, verovatno kalcijum fosfata, kao posledica kristalizacije surutke zaostale u džepovima<sup>222</sup>, je najmanja u uzorku GENC, potom u uzorku ARE, a najveća u uzorku REN. Prisustvo kiselomlečnih bakterija<sup>219</sup> je u koncidenciji sa pojavom kristala u uzorcima.



Slika 94. TEM mikrografi konvencionalnih uzoraka gruša nakon dogrevanja.  
 Fig. 94. TEM micrographs of conventional curd samples after scalding.

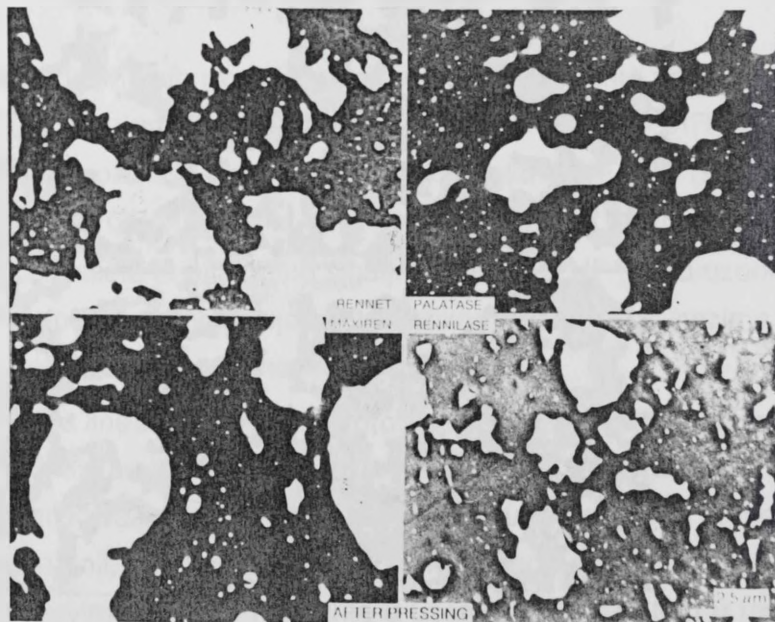


Slika 95. TEM mikrografi konvencionalnih uzoraka gruša nakon dogrevanja.  
 Fig. 95. TEM micrographs of conventional curd samples after scalding.



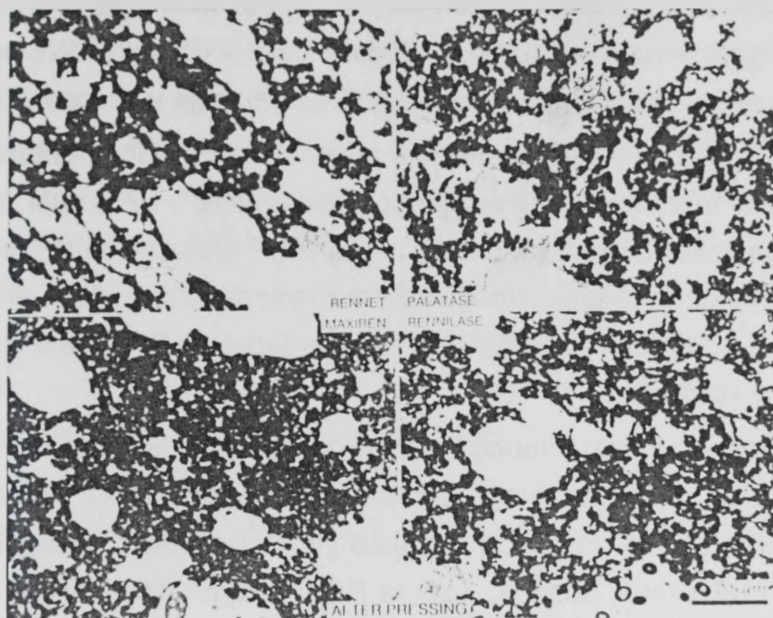
Slika 96. TEM mikrografi uzoraka UF gruša nakon dogrevanja.

Fig.96. TEM micrographs of UF curd samples after scalding.

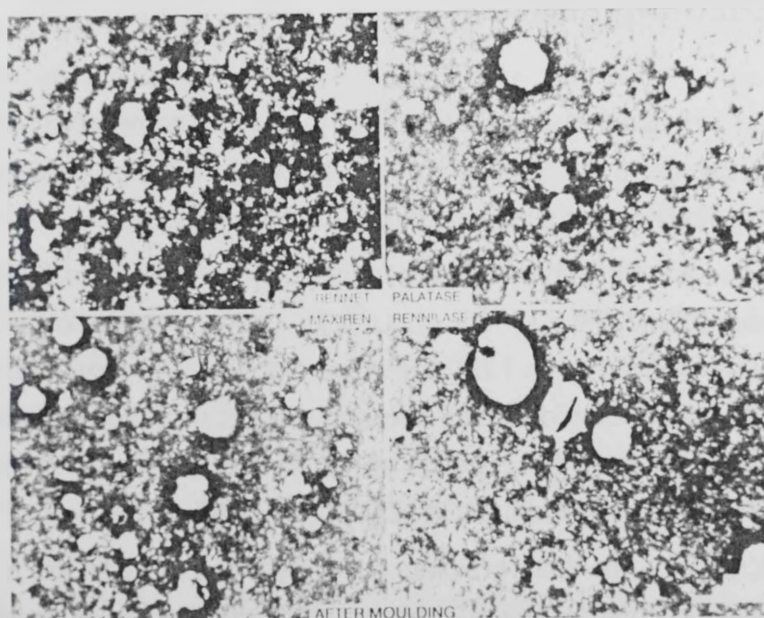


Slika 97. TEM mikrografi gruša konvencionalnih uzoraka nakon presovanja.

Fig.97. TEM micrographs of conventional curd samples after pressing.



Slika 98. TEM mikrografi uzoraka UF gruša nakon presovanja.  
 Fig.98. TEM micrographs of UF curd samples after pressing.



Slika 99. TEM mikrografi konvencionalnih uzoraka gruša nakon formiranja.  
 Fig.99. TEM micrographs of conventional curd samples after moulding.

U svim uzorcima UF gruša nakon čedarizacije struktura proteinskog matriksa je kompaktna pri čemu je redosled uzoraka sledeći: CHR > REN > GENC > ARE. Kristali kalcijum fosfata se jasno uočavaju u uzorku ARE, a bakterije u uzorku REN.

Kompaktnost proteinskog matriksa je povećana termičkim tretmanom zrele (čedarizovane) grude u procesu proizvodnje konvencionalnih i UF sireva. Kristali soli su regularan konstituent svih uzoraka. U seriji uzoraka UF gruša konstatovana je značajna razlika u strukturi gruša dobijenog koagulacijom retentata standardnim sirilom u odnosu na druge uzorke. Uzorak CHR sadrži više masti u formi malih globula što je značajno za kvalitet finalnog produkta.

Sa TEM mikrografa formiranog konvencionalnog sira (slika 99) uočava se pojava delimične granulacije proteinskog matriksa u svim uzorcima. U grupi analognih UF sireva uzorak CHR se takođe jasno razlikuje u strukturi naročito u pogledu distribucije masti od ostalih UF sireva, posebno uzorka REN. Uzorci ARE i GENC su tvrdi i kruti. Dobijeni rezultati ispitivanja mikrostrukture mladog sira su u saglasnosti sa rezultatima osnovnog hemijskog sastava (sadržaj vode i masti) i reoloških karakteristika konvencionalnih i UF sireva.

#### 4.10. SENZORNA ANALIZA

U tabeli 17 prikazani su rezultati senzorne analize konvencionalnih i UF sireva tokom 180 dana zrenja, a na slikama 100 i 101 dat je histogramski prikaz promene ukupnih organoleptičkih ocena sireva tokom ispitivanog perioda.

Svi uzorci konvencionalnih i UF sireva su posedovali karakteristike mladog, nezrelog sira nakon proizvodnje (0 dana). U toku ispitivanog perioda (15-180 dana) senzorni kvalitet konvencionalnih i UF sireva se signifikantno razlikovao zbog drugačijeg intenziteta degradacionih promena komponenata tokom zrenja. Različiti enzimi za koagulaciju mleka i enzimi za akceleraciju zrenja su takođe uticali na senzorne karakteristike pojedinih sireva proizvedenih klasičnim ili UF postupkom.

Svi klasični sirevi su imali pravilan oblik i glatku površinu, pa je spoljni izgled ocenjen maksimalnim brojem bodova 2 i nije se menjao tokom celokupnog perioda zrenja. Površina analognih UF sireva nije bila potpuno glatka, stoga je spoljni izgled ove grupe sireva ocenjen sa 1.8 bodova.

Boja konvencionalnih i UF sireva je bila tipična, bledo-žuta, nije se menjala tokom zrenja i dodeljen joj je maksimalno 1 bod.

Testo klasičnog Kačkavalja dobijenog primenom standardnog sirila je tokom celog ispitivanog perioda mekše i elastičnije od ostalih uzoraka i ocenjeno je sa minimalno 1.2 boda nakon 180 dana zrenja. Najbolju ocenu za testo, dobio je klasični Kačkavalj proizveden sa Rennilase-om: 1.6 bodova u periodu od 30-180 dana zrenja. Testo UF sireva je bilo tvrdo, neelastično, zatvorene strukture na preseku, kraćih vlakana nego što je tipično za klasičan Kačkavalj. Ocena za testo svih UF sireva je iznosila 1.4, a za presek 2.1 bod i nije se menjala tokom ispitivanog perioda zrenja.

Klasični sirevi su posedovali zadovoljavajući vlaknastu, slojevitou strukturu sa većim brojem tehnoloških šupljina na preseku. Ovo svojstvo klasičnih sireva je ocenjeno sa 2.0 (CHR) odnosno 2.3 boda (uzorak ARE, GENC i REN) nakon 15 dana zrenja da bi do 90 dana zrenja u proseku ocena porasla za 0.1 bod i zadržala se na tom nivou do kraja zrenja, sem kod uzorka CHR gde je ocena za presek opala na 1.8 boda.

Kao što se vidi iz tabele 17 senzorne ocene za miris i naročito ukus konvencionalnih i UF sireva se signifikantno međusobno razlikuju u odnosu na druga senzorna svojstva zbog usporenog zrenja UF sireva.<sup>129</sup>

Svi klasični sirevi su imali nedovoljno izražen miris i ukus nakon 15 dana zrenja. Najvišu ocenu za ukus dobio je sir sa Chr. Hansen's sirilom - 8.8 bodova, potom sir sa Rennilase-om - 8.6 bodova, dok su sir sa dodatkom enzima za ubrzanje zrenja i sir sa genetskim himozinom ocenjeni istim brojem bodova 8.4. Do 90 dana miris i ukus klasičnih sireva je bio pikantan, prijatan, tipičan za vrstu sira i prilično ujednačen u svim uzorcima bez obzira na poreklo korišćenih enzima za koagulaciju. Nakon 120 dana zrenja, ukus uzorka CHR je postao nepoželjan, netipičan, uzorka ARE (dodati enzimi za ubrzanje zrenja) suviše izražen, gorak i sapunast za razliku od blagog, prijatnog ukusa uzorka GENC i REN. Stoga je ukus uzorka CHR i ARE ocenjen sa 8.4 i 8.8 bodova, respektivno nakon 120 dana zrenja i navedene ocene su se minimalno menjale do kraja perioda zrenja od 180 dana. Najbolje je ocenjen miris i ukus klasičnog sira sa Rennilase-om u ovoj grupi. Miris uzorka REN je dobio 1.9 bodova od mogućnih max 2, dok je ocena za ukus iznosila 9.8 bodova od max 10, nakon 90 dana zrenja. Dodeljene ocene su ostale nepromenjene do kraja ispitivanog perioda. Ukus klasičnog sira proizvedenog primenom genetskog himozina je takođe visoko ocenjen sa 9.4 boda nakon 180 dana zrenja.

Miris i ukus UF sireva je nedovoljno izražen, manje slan nego konvencionalnih sireva i minimalno se razlikovao između pojedinih uzoraka do 30 dana zrenja. Nakon tog perioda izdvojili su se po senzornom kvalitetu uzorci UF sira sa genetskim himozinom (uzorak GENC) i Rennilase-om (uzorak REN) koji su dobili iste maksimalne ocene za miris 1.9 bodova i ukus 9.4 boda nakon 180 dana zrenja.



Tabela 17. Rezultati senzorne analize konvencionalnih i UF sireva tokom 180 dana zrenja. Oznake uzoraka: CHR, ARE, ARE, GENC i REN su navedene u tabeli 9.

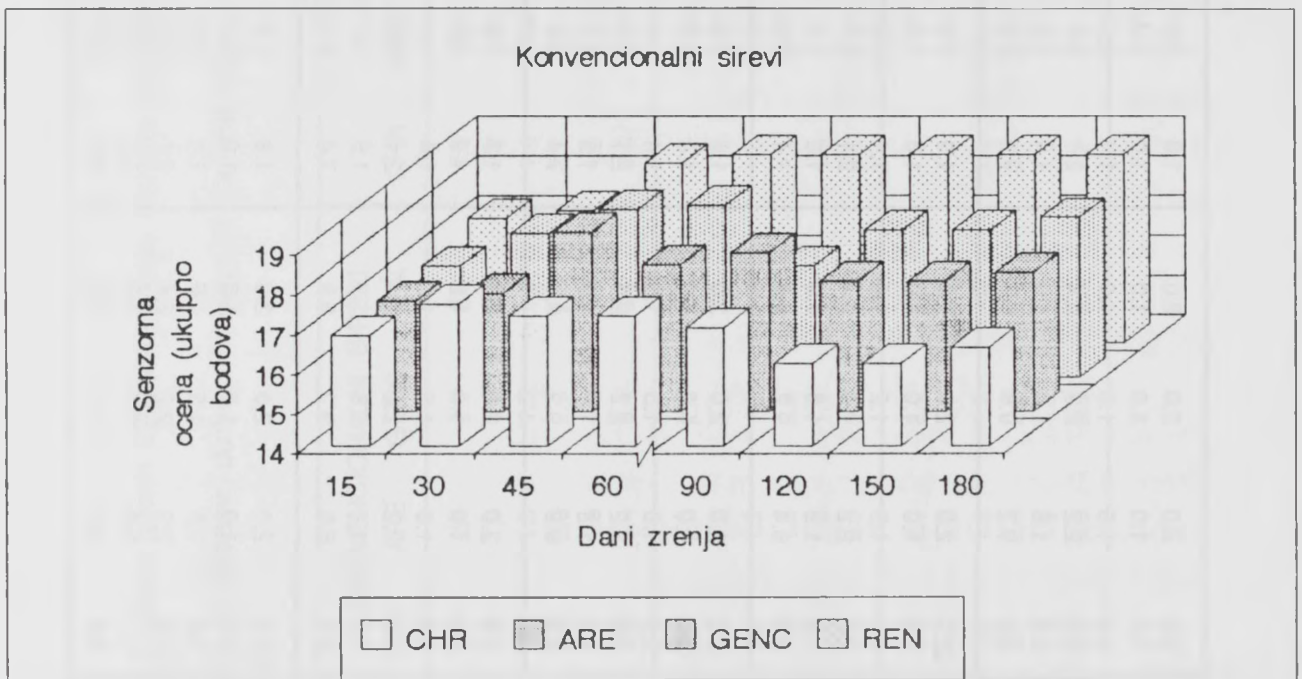
Table 17. Results of sensory analysis of conventional and UF cheeses during 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Dani zrenja	Svojstvo	Max poena	Faktor važnosti	KONVENCIONALNI SIREVI			UF SIREVI				
				CHR	ARE	GENC	REN	CHR	ARE	GENC	REN
15	Spoljni izgled	2	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	1	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	2	0.4	1.3	1.5	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	3	0.6	2.0	2.3	2.3	2.3	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	2	0.4	1.7	1.6	1.6	1.7	1.2	1.2	1.2	1.2
Ukus	10	2.0	8.8	8.4	8.4	8.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
30	Spoljni izgled	2	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	1	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	2	0.4	1.5	1.3	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	3	0.6	2.3	1.9	2.3	2.3	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	2	0.4	1.8	1.8	1.8	1.7	1.3	1.4	1.5	1.4
Ukus	10	2.0	9.0	9.0	9.0	8.8	6.8	7.2	7.6	7.0	7.0
45	Spoljni izgled	2	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	1	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	2	0.4	1.4	1.6	1.5	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	3	0.6	2.1	2.4	2.2	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	2	0.4	1.8	1.9	1.9	1.9	1.4	1.5	1.6	1.6
Ukus	10	2.0	9.0	9.6	9.6	9.6	7.2	7.8	8.4	8.2	8.2

60	Spoljni izgled		0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	1	0.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	2	0.6	2.1	2.2	2.3	2.4	2.4	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	3	0.4	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.4	1.5	1.7	1.6
	Ukus	2	2.0	9.0	9.2	9.6	9.8	9.8	9.8	7.2	7.8	8.4	8.2
90	Spoljni izgled	10	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	1	0.4	1.4	1.5	1.2	1.6	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	2	0.6	2.0	2.2	1.8	2.4	2.4	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	3	0.4	1.8	1.9	1.6	1.9	1.9	1.9	1.5	1.6	1.7	1.7
	Ukus	2	2.0	8.8	9.4	9.2	9.8	9.8	9.8	7.4	8.0	8.8	8.6
120	Spoljni izgled	10	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	1	0.4	1.2	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	2	0.6	1.8	2.2	2.2	2.4	2.4	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	3	0.4	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	1.5	1.7	1.8	1.7
	Ukus	2	2.0	8.4	8.8	9.2	9.8	9.8	9.8	7.4	8.8	9.2	8.6
150	Spoljni izgled	10	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	1	0.4	1.2	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	2	0.6	1.8	2.2	2.2	2.4	2.4	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	3	0.4	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	1.5	1.7	1.8	1.7
	Ukus	2	2.0	8.4	8.8	9.2	9.8	9.8	9.8	7.4	8.8	9.2	8.6
180	Spoljni izgled	10	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.8
	Boja	2	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Testo	1	0.4	1.2	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4
	Presek	2	0.6	1.8	2.2	2.2	2.4	2.4	2.4	2.1	2.1	2.1	2.1
	Miris	3	0.4	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	1.6	1.8	1.9	1.9
	Ukus	2	2.0	8.8	9.0	9.4	9.8	9.8	9.8	8.0	9.0	9.4	9.4

Dodati proteolitički i lipolitički enzimi za ubrzanje zrenja u uzorku ARE su doprineli da ocena za ukus iznosi 9 bodova i bude viša od ocene za ukus UF sira proizvedenog istim Chr. Hansen's sirilom (uzorak CHR) koji je dobio najnižu ocenu (8 bodova) nakon završenog zrenja.

Analogno različitim ocenama senzornih svojstava konvencionalnih i UF sireva konstatovane su i razlike u ukupnim senzornim ocenama koje su prikazane na slikama 100 i 101.

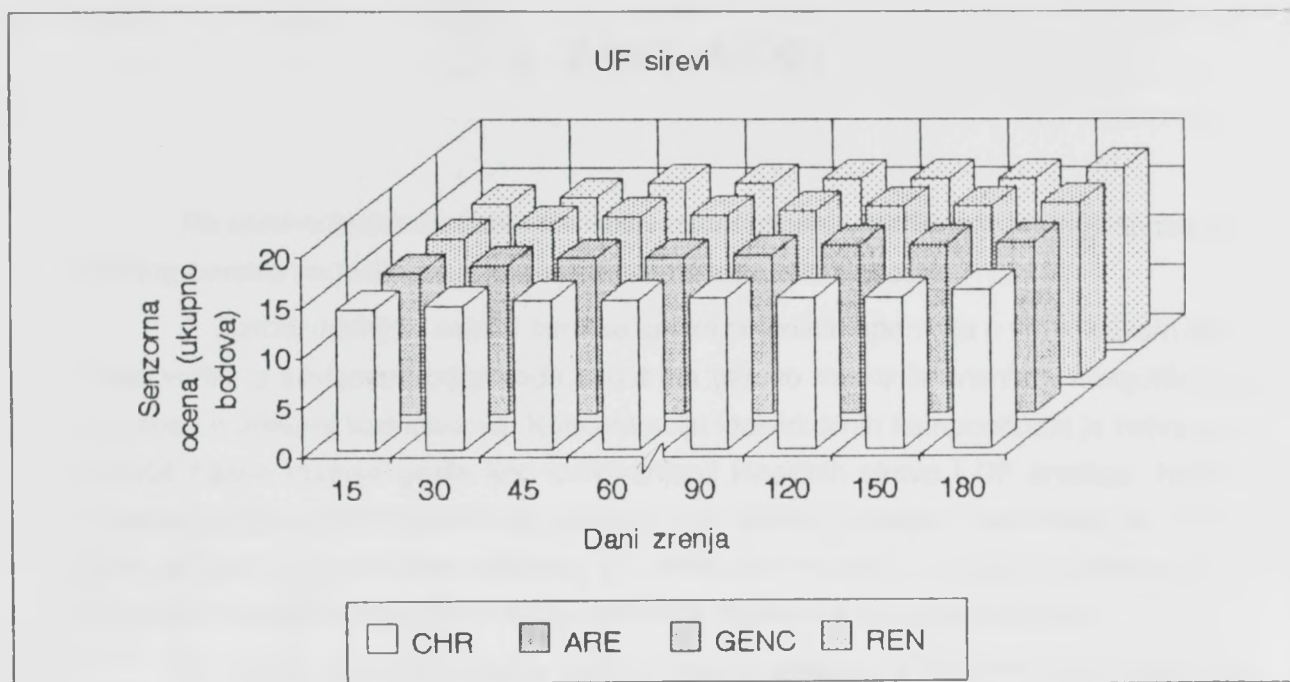


Slika 100. Rezultati senzorne analize uzoraka konvencionalnih Kačkavalja tokom 180 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 100. Results of sensory analysis of conventional Kashkaval cheese samples during 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

Minimalne ukupne senzorne ocene (slike 100 i 101) dobili su klasični sir proizveden primenom standardnog sirila i UF analog: 16.5 i 15.9 bodova, respektivno. U grupi klasičnih sireva sa maksimalno 18.7 ukupnih senzornih bodova, ocenjen je sir dobijen primenom M. miehei proteaze (uzorak REN) koji prema tome pripada kategoriji proizvoda odličnog kvaliteta.<sup>167</sup> UF sirevi proizvedeni sa M. miehei proteazom (uzorak REN) i genetskim himozinom (uzorak GENC) dobili su isti ukupan broj bodova 17.6 što

je i maksimalna ukupna senzorna ocena u ovoj seriji ispitivanih uzoraka. Na osnovu postignutih ukupnih bodova senzorni kvalitet uzorka GENC i uzorka REN je na granici odličan/dobar prema utvrđenoj kategorizaciji kvaliteta prehrambenih proizvoda.<sup>167</sup>



Slika 101. Rezultati senzorne analize uzoraka UF Kačkavalja tokom 180 dana zrenja. Uzorci označeni: CHR, ARE, GENC i REN su navedeni u tabeli 9.

Fig. 101. Results of sensory analysis of UF Kashkaval cheese samples during 180 days of ripening. Sample symbols: CHR, ARE, GENC and REN are explained in Table 9.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem uticaja ultrafiltracije i koagulanasa različitog porekla na kvalitet Kačkavalja može se zaključiti sledeće:

1. Fizičko-hemijski sastav surutke tokom pojedinih operacija u tehnološkom procesu varira u zavisnosti od prirode supstrata (sirovo mleko ili retentat), koagulišućeg enzima i momenta uzorkovanja. Koncentracija individualnih komponenata je najveća u surutki nakon rezanja gruša kod svih varijanti klasičnih sireva i UF analoga. Nakon rezanja gruša u obe serije sireva primenom *M. miehei* proteaze (Rennilase) sa surutkom se gube veće količine ukupnog N i NPN, dok razlike u slučaju korišćenja Chr. Hansen's rennet-a i rekombinovanog himozina Maxiren-a nisu signifikantne.

2. Tokom termičke obrade čedarizovanog gruša kod klasičnih sireva gubi se 0.5% mlečne masti kod uzorka koagulisanog Rennilase-om odnosno 1% kod uzoraka dobijenih primenom genetski modifikovanog i standardnog himozina. U seriji UF analoga znatan gubitak sadržaja mlečne masti (naročito izražen u uzorku REN pri upotrebi *M. miehei* proteaze), kao i niže vrednosti titracione kiselosti rezultat su drugačijeg sastava i osobina UF retentata (povećan sadržaj masti, proteina i koloidnog kalcijum fosfata) u odnosu na nativno mleko.

3. Korišćeni koagulišućí enzimi nisu bitno uticali na sadržaj vode u proizvedenim konvencionalnim sirevima. Međusobno različite vrednosti sadržaja vode UF sireva posledica su različitog fizičko-hemijskog sastava termički tretiranog sirnog gruša.

4. Signifikantne razlike u koncentraciji mlečne masti u suvoj materiji (MM/SM) konvencionalnih i UF sireva kao i između pojedinačnih uzoraka u UF seriji su primarno posledica različitog sadržaja masti u mleku (1.5%) i retentatu (6.9%) koji su korišćeni za proizvodnju eksperimentalnih sireva, kao i delimičnog gubitka masti pri termičkoj obradi čedarizovanog gruša. Najniži sadržaj MM/SM tokom celokupnog perioda zrenja registrovan je kod konvencionalnog i UF Kačkavalja proizvedenog primenom Rennilase što se sa ekonomskog aspekta negativno odražava na kvalitet sira.

5. Varijante UF Kačkavalja sadrže prosečno 50% manje NaCl od konvencionalnih, što je uzrokovalo i niži sadržaj pepela za približno 2% u odnosu na konvencionalne sireve.

6. Tokom 360 dana zrenja koncentracija ukupnog N se minimalno menja kod svih ispitivanih varijanti Kačkavalja, pokazujući tendenciju blagog povećanja vrednosti usled povećanja sadržaja suve materije odnosno gubitka vode.

7. Koncentracija primarnih i sekundarnih produkata dekompozicije proteina tokom zrenja konvencionalnih i UF sireva se značajno razlikuje. Varijante Kačkavalja proizvedene po klasičnoj tehnologiji sadrže prosečno 10 puta veću količinu NPN, odnosno 60% više rastvorljivog azota u vodi od UF analoga. Pri tome se dejstvo rekombinovanog i tradicionalnog himozina minimalno razlikuje, dok *M. miehei* proteaza pokazuje drugačiju aktivnost.

Sadržaj pravih proteina, rastvorljivih pravih proteina i frakcije rastvorljivih azotnih materija u ukupnom azotu (tzv. stepen zrelosti sira) je u direktnoj korelaciji sa odgovarajućim sadržajem UN, NPN i RN u pojedinim fazama zrenja konvencionalnih i UF sireva. Minimalne vrednosti stepena zrelosti dobijene su primenom *M. miehei* proteaze tokom celokupnog ispitivanog perioda zrenja komparativnih sireva. Dodatkom egzogenih enzima postiže se efekat ubrzanja proteolize klasičnog i UF Kačkavalja.

8. PAG elektroforezom nisu ustanovljene kvalitativno bitne razlike u stepenu proteolitičke degradacije  $\alpha_s$ - i  $\beta$ -kazeina tokom zrenja konvencionalnih sireva tretiranih različitim koagulansima. Sa modela elektroferograma UF analoga konstatovan je različit profil proteolize kazeina u odnosu na tradicionalne varijante, pri čemu je dejstvo genetskog i standardnog himozina na  $\beta$ -kazein slično. Jača proteolitička aktivnost Rennilase na  $\alpha_s$ -kazein u odnosu na dejstvo himozina je izražena nakon 6 i 12 meseci zrenja UF Kačkavalja.

9. Promene u modelu distribucije identifikovanih isparljivih komponenata arome ispitivanih varijanti Kačkavalja tokom 360 dana zrenja su u funkciji primenjenog tehnološkog procesa (klasični ili UF), prirode koagulišućeg enzima i dodatog koktela enzima za ubrzanje zrenja. U SDE frakciji konvencionalnih i UF sireva identifikovane su isparljive niže masne kiseline homologne serije (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), etil ester kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline. Tokom ispitivanog perioda zrenja koncentracija isparljivih masnih kiselina nepravilno raste ili opada, dok različita evolucija etil estara masnih kiselina ukazuje da se formiraju na različite načine u toku degradacionih promena osnovnih konstituenata sira (proteini i masti).

10. Titraciona kiselost svih varijanti konvencionalnog i UF Kačkavalja pravilno raste do 150 dana zrenja, a napretkom zrenja varira.

11. Aktivna kiselost (pH vrednost) minimalno varira tokom 180 dana zrenja. Povećanje pH vrednosti na kraju ispitivanog perioda zrenja je tipično za završetak zrenja tvrdih sireva a uzrokovano je intenzivnom proteolitičkom degradacijom kazeina pri čemu nastaju razgradni produkti baznog karaktera.

12. Čvrstoća UF sireva određena penetrometrom je prosečno 2 (uzorak tretiran Rennilase-om) do 5.5 puta (uzorak tretiran genetskim himozinom) veća u odnosu na analogne klasične sireve. Klasični sirevi dobijeni primenom genetskog himozina i standardnog rennet-a su približne čvrstoće, dok se čvrstoća klasičnog Kačkavalja proizvedenog korišćenjem Rennilase razlikuje.

Reološke karakteristike UF sireva određene testom kompresije na Instron Testing instrumentu se međusobno razlikuju. Nakon 360 dana zrenja najniža vrednost sile kompresije je ustanovljena kod UF sira sa Rennilase-om (37.7 N) dok je vrednost sile kompresije u UF sirevima tretiranim enzimima za ubrzanje zrenja (uzorak ARE) i genetski himozinom (uzorak GENC) za 32.1 N odnosno 11.0 N veća u odnosu na kontrolni sir.

13. Mikrostruktura gela i gruša tokom tehnološkog procesa proizvodnje klasičnih varijanti Kačkavalja i UF analoga se razlikuje u zavisnosti od primenjenog enzima i prirode supstrata. Gel dobijen koagulacijom mleka standardnim himozinom sadrži manje kazeinske micelle u odnosu na gel mleka koagulisano genetskim himozinom i Rennilase-om kod kojih je uznapredovala fuzija kazeinskih micela. Sa mikrografa analognih UF gelova dobijenih koagulacijom retentata uočava se veći udeo lanaca nego nakupina u proteinskom matriksu koji se sastoji od većih agregata kazeinskih micela pri dejstvu Chr. Hansen's rennet-a nego delovanjem genetskog himozina i Rennilase. Tokom dogrevanja, presovanja, čedarizacije, termičkog tretmana i formiranja konvencionalnih i UF sireva dolazi do fuzije kazeinskih micela u kompaktnu grušu i pojave delimične granulacije proteinskog matriksa.

14. Senzorni kvalitet klasičnog Kačkavalja proizvedenog primenom Rennilase je najbolje ocenjen u grupi klasičnih sireva sa 18.7 ukupnih bodova, dok su najveću senzornu ocenu (17.6 ukupnih bodova) dobili u UF seriji sirevi proizvedeni delovanjem genetski modifikovanog himozina i Rennilase.

15. Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem hemijskog sastava, reoloških karakteristika, mikrostrukture i senzornog kvaliteta proizvedenih varijanti konvencionalnog Kačkavalja i UF analoga tokom jednogodišnjeg zrenja, može se zaključiti da se

dejstvo rekombinovanog himozina, Maxiren-a i standardnog himozina, Chr. Hansen's rennet-a signifikantno ne razlikuje, potvrđujući dosadašnja saznanja da je genetski modifikovan himozin potpuno kompetentan proteolitički agens za koagulaciju mleka u tehnološkom procesu proizvodnje sira.

Efekat ubrzanja zrenja dodatkom koktela enzima proteolitičkog i lipolitičkog dejstva je jače izražen u prvoj polovini zrenja konvencionalnog i UF Kačkavalja.

Dobijeni rezultati ispitivanja primene ultrafiltracije u tehnološkom procesu proizvodnje Kačkavalja predstavljaju nov doprinos dosadašnjim naučnim saznanjima u svedu o mogućnosti korišćenja metoda membranske filtracije u tehnologiji različitih tipova tvrdih sireva.



## 6. LITERATURA

1. Maubois, J.L., Mocquot, G., Vasal, L. (1969): French Patent 2052121.
2. Jensen, G.K., Olsen, P.M., Hyldig, G. (1988): Scandinavian Dairy Ind. 3, 39.
3. Garrett, N.L.T. (1987): North European Food and Dairy J. 5, 135.
4. Ostergaard, B., Muller, L.L., Lane, G. (1988): APV Bulletin 080988B
5. Burgess, K., Shaw, M. (1986): Industrial Applications, Dairy, in Industrial Enzymology, The Application of Enzymes in Industry, edited by Godfrey, T., Reichelt, J., Macmillan Publishers Ltd., 260.
6. Fox, P.F. (1987): Cheese, An Overview, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1. edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., Barking, 1.
7. Praaning van Dalen, D.P. (1992): IDF Bulletin No. 269, 8.
8. Harboe, M.K. (1992): IDF Bulletin No 269, 3.
9. Brule, G., Lenoir, J. (1987): The Coagulation of Milk in Cheesemaking, Science and Technology. edited by Eck, A., Lavoisier Publishing Inc, Paris, English Translation of the Second French ed. 1.
10. Scott, R. (1981): Cheesemaking Practice, Applied Science Publishers Ltd, London, 475.
11. Farrell, H.M., Brown, E.M., Kumosinski, T.F. (1990): Proceedings of XXIII International Dairy Congress, Montreal, vol. 2, 1526.
12. Dalgleish, D.G. (1990): The Proceedings of XXIII International Dairy Congress, Montreal, vol. 2, 1513.
13. Swaisgood, E.H. (1986): Chemistry of Milk Proteins in Developments in Dairy Chemistry, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Barking, 1.
14. Fox, P.F. (1987): Proceedings of XXII International Dairy Congress, The Hague, 61.
15. Schmidt, D.G. (1986): Association of Caseins and Casein Micelle Structure in Developments in Dairy Chemistry, vol 1., edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Barking 61.

16. Vissers, S., Slanger, K.J., Alting, A.C., Vreeman, H.J. (1989): *Milchwissenschaft* 44, 336.
17. van Dijk, H.J.M. (1992): *Neth. Milk Dairy J.* 46, 101
18. Holt, C. (1985): *Food Microstructure* 4, 1.
19. Walstra, P. (1990): *J. Dairy Science*, 73, 1965.
20. Holt, C., van Kemenade, M.J.J.M., Nelson, S.L., Sawyer, L., Harries, E.J., Bailey, T.R., Hukins, L.D. (1989): *J. Dairy Research* 56, 411.
21. Aoki, T., Umeda, T., Kako, Y. (1990): *J. Dairy Research* 57, 349.
22. Singh, H. (1988): *New Zealand J. Dairy Science & Technology* 23, 257.
23. Dalgleish, D.G. (1986): *The Enzymatic Coagulation of Milk in Developments in Dairy Chemistry*, vol 1, edited by Fox, P.F., Elsevier, Applied Science Publishers Ltd, 157.
24. Budtz, P. (1989): *Dairy Industries International* 54, 15.
25. Foltman, B. (1987): *General and Molecular Aspects of Rennets*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Ltd, Barking, 33.
26. Coulson, J., Pawlett, D., Wivell, R. (1992): *IDF Bulletin*, No 269, 29.
27. Rammet, J.P. (1987): *The agents of milk conversion in Cheesemaking*, *Science and Technology* edited by Eck, A., Lavoisier Publishing Inc., Paris, English Translation of the second French ed., 101.
28. Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., Tourneur, C. (1987): *Microbiological and Biochemical aspects of Ripening in Cheesemaking*, *Science and Technology*, edited by Eck, A., Lavoisier Publishing Inc., Paris, English Translation of the second French ed. 62.
29. Winwood, J. (1989): *J. Society Dairy Technology* 42, 1.
30. Emmons, D.B., Binns, M.R. (1991): *Milchwissenschaft* 46, 343.
31. van den Berg, G. (1992): *IDF Bulletin* No. 269, 13.
32. Godfrey, T. (1986): *Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source*, in *Industrial Enzymology, The Application of Enzymes in Industry* edited by Godfrey, T., Reichelt, J., Macmillan Ltd, 466.
33. Godfrey, T., Reichelt, J. (1986): *Introduction in Industrial Enzymology, The Application of Enzymes in Industry*, Macmillan Ltd, 1.
34. Jepsen, S.J. (1987): *Zbornik Biotehniške fakultete, Univerze Edvarda Kardelja Ljubljana*, Suppl. 11, 47.

35. Dalgleish, D.G. (1987): The Enzymatic Coagulation of Milk, in Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers, Ltd., Barking 63
36. Emmons, D.B., Beckett, D.C., Binns, M. (1990): J. Dairy Science 73, 200.
37. Carić, M., Gavarić, D. (1991): Prehrambena industrija, 1-2, 17.
38. Holmes, D.G., Duersch, J.W., Ernstom, C.A. (1977): J. Dairy Science, 60, 862.
39. Creamer, L.K., Lawrence, R.C., Gilles, J. (1988): New Zealand J. Dairy Science & Technology, 20, 185.
40. Repelinu, C. (1988): Norht European Food and Dairy J. 2, 56.
41. Prospects Material, Gist Brocades, Food Ingredients Inc.
42. Prokopek, D., Meisel, H., Frister, H., Krusch, U., Reuter, H., Schlimme, E., Teuber, M. (1988): Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberiche 40, 43.
43. Prokopek, D., Meisel, H., Krusch, U., Teuber, M., Schlimme, E. (1990): Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberiche 42, 597.
44. van den Berg, G., de Koning, P.J. (1990): Neth. Milk Dairy J. 40, 189.
45. Chamba, J.F., Metais, T., Veter, M.P., (1988): Gist Brocades Bulletin, 1.
46. Bines, V.E., Young, P., Law, B. (1989): J. Dairy Research 56, 657.
47. Kamali, K.M., Johnson, M.E., Marth, E.H. (1989): Milchwissenschaft 44, 343.
48. Hicks, C.L., O'Leary, J., Bucy, J. (1988): J. Dairy Science 71, 1127.
49. Peri, C., Pagliarini, E., Iametti, S., Bonomi, F. (1990): J. Dairy Research 57, 101.
50. Waugh, D.F., Hippel, P.H. (1956): J. American Chemistry Society 78, 456.
51. Hooydonk, A.C.M. (1987): The Renneting of Milk, Doctoral Thesis, Agricultural University, Wageningen.
52. Đorđević, J. (1982): Mleko, Fizika i hemija, INI PKB Agroekonomik, NIRO Tribina, Beograd, 277.
53. Walstra, P., van Dijk, H.J.M., Geurts, T.J. (1987): The Syneresis of Curd, in Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.E., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Barking, 135.
54. Fox, P.F. (1989): J. Dairy Science 72, 1379.
55. Green, L.M., Grandison, A.S. (1987): Secondary (Non-enzymatic) Phase of Rennet Coagulation and Post-coagulation Phenomena in Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., Barking 97.
56. Vanderpoorten, R., Weckx, M. (1972): Neth. Milk Dairy J. 26, 47.

57. Creamer, L.K., Richardson, B.S. (1974): *New Zealand J. Science & Technology*, 9, 9.
58. Mulvihile, D.M., Fox, P.F. (1979): *J. Dairy Research* 46, 641.
59. Creamer, L.K. (1976): *New Zealand J. Science & Technology* 11, 30.
60. Law, A.B. (1987): *Proteolysis in Relation to Normal and Accelerated Cheese Ripening in Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Barking, 365.
61. Fairbairn, D.J., Law, A.B. (1986): *J. Dairy Research* 64, 139.
62. Bastian, E.D., Brown, P.J., Ernstrom. C.A. (1991): *J. Dairy Science* 74, 3677.
63. Humbert, G., Guingamp, M.F., Kouomegue, R., Linden, G. (1990): *J. Dairy Research* 87, 143.
64. Grufferty, M.B., Fox, P.F. (1988): *New Zealand J. Dairy Science & Technology* 23, 95.
65. Ollikainen, P., Kivela, T. (1989): *Milchwissenschaft* 44, 204.
66. Andrews, A.T., Alichanidis, E. (1983): *J. Dairy Research* 50, 275.
67. Schaar, J. (1985): *J. Dairy Research* 52, 369.
68. O'Keefe, R.B., Fox, P.F., Dalby, C. (1975): *J. Dairy Research*. 42, 111.
69. Grappin, R., Rank, I.C., Olson, N.F. (1985): *J. Dairy Science* 68, 531.
70. Reville, W.J., Fox, P.F. (1978): *Irish J. Food Sci. & Technology*, 2, 67.
71. Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982): *Milchwissenschaft* 37, 561.
72. Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982): *Milchwissenschaft* 38, 76.
73. Kuchroo, C.N, Fox, P.F. (1982): *Milchwissenschaft* 37, 331.
74. Martinez-Castro, I., Sanz, J., Amigo, L., Ramos, M., Martinez-Alvarez, P. (1991): *J. Dairy Research* 58, 239.
75. Llang, G., Ramos, S.M., Polo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (1990): *J. Dairy Science* 73, 1676.
76. Macrae, A.R. (1983): *Extracellular Microbial Lipases in Microbial Enzymes and Biotechnology* edited by Fogarty, W.M., Applied Science Publishers Ltd., 225.
77. Law, A.B. (1984): *Flavour Development in Cheeses in Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk* edited by Davies, E.F., Law B.A., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 187.
78. Kim, J., Lindsay, R.C. (1990): *J. Dairy Science* 73, 1988.
79. Renner, E. (1987): *Nutritional Aspects of Cheese*, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, edited by Fox P.F., Elsevier Applied Science, 345.

80. Guinee, T.P., Fow, P.F. (1987): Salt, in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science, London, 251.
81. Cogan, T.M., Daly, C. (1987): Cheese Starter Cultures in Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd, Barking, 179.
82. Lawrence, R.C., Gilles, J. (1987): Cheddar Cheese and Related Dry-Salted Cheese Varieties, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 2, edited by Fox, P.F., 1.
83. Osteras, M. (1989): Dairy Industries International 54, 17.
84. Milanović, S. (1990): Prehrambena industrija, 1-2, 26.
85. Law, A.B. (1985): Accelerated ripening of cheese and cheese properties, Report of Group F16 of IDF
86. Law, A.B. (1984): The Accelerated Ripening of Cheese, in Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, edited by Davies E.F., Law B.A., Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 209.
87. Ed Soda, M., Pandian, S. (1991): J. Dairy Science 74, 2317.
88. Sood, V.K., Kosikowski, F.V. (1979): J. Dairy Science 62, 1865.
89. Law, A.B., Wigmore, A. (1982): J. Society Dairy Technology, 35, 75.
90. Law, A.B., Wigmore, A. (1982): J. Dairy Research 49, 137.
91. Magee, E.L., Olson, N.F. (1981): J. Dairy Science 64, 600.
92. Kirby, C.J., Law, A.B. (1987): Dairy Industries International 52, 19.
93. Kirby, C.J., Brooker, B.E., Law, A.B. (1987): Int. J. Food Sci & Technology 22, 356.
94. AFRC Institute, Reading Reports (1988): Research 8, 31.
95. Alkhalaf, W., El Soda, M., Gripton, J.C., Vassal, L. (1989): J. Dairy Science 72, 2233.
96. El Soda, M., Johnson, M., Olson, N.F. (1989): Milchwissenschaft 44, 213
97. Spangler, P.L., El Soda, M., Johnson, M.E., Olson, N.F., Amundson, C.H., Hill, C.G. (1989): Milchwissenschaft 44, 199.
98. McGregor, J.U., White, C.H. (1990): J. Dairy Science, 73, 571.
99. Green, M.L. (1990): J. Dairy Research, 57, 559.
100. Law, A.B., King, J.S. (1985): J. Dairy Research 52, 183.
101. Priard, J.C., El Soda, M., Alkhalaf, W., Rousseau, M., Desmazeaud, M., Vassal, L., Gripton, J.C., (1986): Biotechnology Letters 8, 241.

102. Kirley, C.B., Brooker, E., Law, A.B. (1987): *Int. J. Food Sci. Technol.* 22, 355.
103. Kosikowski, F.V. (1988): *J. Dairy Science* 71, 557.
104. Vafopoulou, A., Alichanidis, E., Zerfiridis, G. (1989): 56, 285.
105. Hayashi, K., Revell, D.F., Law, A.B. (1990): *J. Dairy Science* 73, 579.
106. Cliffe, A.J., Law, A.B. (1991): *Food Biotechnology* 5, 1.
107. Hayashi, K., Revell, D.F., Law, A.B. (1990): *J. Dairy Res*, 57, 571.
108. Bantista, L., Kroll, R.G. (1988): *J. Dairy Research* 55, 597.
109. Kun, M.S., Olson, N.F. (1989): *J. Dairy Science* 72, 1418.
110. Carić, M., Gavarić, D., Milanović, S., Kulić, Lj., Radovančev, Ž. (1989): *Mljekarstvo*, 39, 115.
111. Birschback, P. (1992): *IDF Bulletin*, 269, 36.
112. Law, A.B., Wigmore, A. (1985): *J. Soc. Dairy Techn.* 38, 86.
113. Jolly, R.C., Kosikowski, F.V. (1978): *J. Dairy Science* 61, 536.
114. Arbige, M., Freud, P.R., Silver, S.C., Zelko, J.T. (1986): *Food Tech.* 4, 91.
115. De Felice, M., Gomes, T., De Leonardis, T. (1991): *Lait* 71, 637.
116. Revah, S., Lebeault, J.M. (1989): *Lait*, 69, 281.
117. Kwak, H.S., Jeon, I.J., Perng, S.K. (1989): *J. Food Sci.* 54, 1559.
118. Fedrick, I. (1987): *Australian J. Dairy Techn.* 3-6, 33.
119. Nunez, M.G., Garna-Aser, M.A., Rodrigez, M., Meding, M., Gaya, P. (1986): *Food Chem.* 21, 115.
120. Fedrick, I.A., Cromie, S.J., Dullay, J.R., Gilles, J.E. (1986): *N.Z. J. Dairy Science Technol.* 21, 191.
121. Nakajima, H., Toyoda, S., Kitamura, K., Akiro, K. (1991): *Milchwissenschaft* 46, 8.
122. El Soda, M., Chen, C., Riesterer, B., Olson, N. (1991): *Milchwissenschaft*, 46, 358.
123. Madsen, R. (1985): *Theory of Membrane Filtration in Evaporation, Membrane Filtration, Spray Drying* edited by P. Hansen, *North European Dairy Journal*, 179.
124. Loeb, S., Sourirajan, S. (1964): *US Patent* 3133132.
125. Kosikowski, F. (1986): *Food Technology*, 40, 71.
126. Carić, M. (1990): *Tehnologija koncentrovanih i sušenih mlečnih proizvoda*, Naučna knjiga, Beograd, 293.
127. Glover, F.A. (1985): *Ultrafiltration and Reverse Osmosis for the Dairy Industry*, *Technical Bulletin*, 5, NIRO, Reading, England, 206.

128. Cheryan, M. (1986): *Ultrafiltration Handbook*, Technomic Publishing Co. Inc, Lancaster, USA, 375.
129. Lelievre, J., Lawrence, R.C. (1988): *J. Dairy Research* 55, 465.
130. Bastian, E.D., Collinge, S.K., Ernstrom, C.A. (1991): *J. Dairy Science* 74, 2423.
131. Casiraghi, E., Lucisano, M. (1991): *Milchwissenschaft* 46, 775.
132. Premaratne, R.J., Cousin, M.A. (1991): *J. Dairy Science* 74, 788.
133. Green, M., Scott, K.J., Anderson, M., Griffin, M.C.A., Glover, F.A. (1984): *J. Dairy Research* 51, 267.
134. Lawrence, P.C., Gilles, J. (1987): *Proceedings of XXII Int. Dairy Congress, The Hague*, 111.
135. Korolczuk, J., Maubois, J.L., Fauquant, J.R. (1986): *Proceedings of XXII Int. Dairy Congress, The Hague*, 123.
136. Quist, K.B. (1989): *CDR's Cheese Research and Technology Conference, Madison, Wisconsin, March 29-30*. 1.
137. Green, M.L. (1985): *J. Dairy Research* 52, 555.
138. Lawrence, R.C., Lelievre, J. (1990): *Proceedings of the XXIII Int. Dairy Congress, Montreal, 1980*.
139. Hickey, M.W., van Leeuwen, H., Hillier, A.J., Jago, G.R. (1983): *Austr. J. Dairy Tech*, 38, 110.
140. Creamer, L.K., Iyer, M., Lelievre, J. (1987): *New Zealand Dairy Science & Technology*, 205.
141. Rao, V.D., Renner, E. (1988): *Milchwissenschaft* 43, 216
142. Rao, V.D., Renner, E. (1988): *Milchwissenschaft* 43, 708.
143. Rao, V.D., Renner, E. (1989): *Milchwissenschaft* 44, 351.
145. Christensen, T.M.I.E., Kristiansen, K.R., Werner, H. (1991): *Milchwissenschaft* 46, 279.
146. Bastian, E.D., Hansen, K.G., Brown, J.R. (1991): *J. Dairy Science* 74, 3669.
147. Dalgleish, D.G. (1981): *J. Dairy Research* 48, 65.
148. Olson, F.N., Qvist, B.K. (1989): *1st Symposium on Advances in Dairy Product Technology „Applications of Membrane Separation Processes“*, October 4-5, Embassy Suites Hotel, San Luis Obispo
149. Ernstrom, C.A., Sautherland, B.J., Jameson, G.W. (1980): *J. Dairy Science* 63, 228.
150. Kosikowski, F.V. (1982): *J. Dairy Science* 65, 1705.

151. Skovhauge, E. (1987): *Nordeuropaeisk Mejeritidsskrift*, 3, 61.
152. Carić, M., Gavarić, D., Ognjenović, R., Milanović, S., Kulić, Lj. (1993): *Hungarian J. Ind. Chem.* (in press)
153. Pejić, O, Đorđević, J. (1973): *Mlekarski praktikum*, Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd, 167.
154. Rowland, J.C. (1938): *J. Dairy Research* 9, 42.
155. International Dairy Federation (1974): Document No 28.
156. Ntalianas, F.A., Whitney, R.L. (1964): *J. Dairy Science* 47, 19.
157. Heincsholt, K., Calbert, H.E. (1960): *Milchwissenschaft* 31, 402.
158. Marth, H.E. (1978): *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 14<sup>th</sup> edition, American Public Health Association, Washington, USA.
159. O'Sullivan, M., Fox, P.F. (1991): Flair Project, Chemical Methods used to Monitor Cheese Ripening, Department of Food Chemistry, University College, Cork, Ireland.
160. Raymond, S., Nakamichi, M. (1963): *Anal. Biochem.* 3, 23.
- ✓ 161. de Frutos, M., Sant. J. Martinez-Castro, I. (1988): *Chromatographia* 25, 861.
- ✓ 162. Godefroot, M., Sandra, P., Verzele, M. (1981): *J. Chromatography* 203, 325.
163. Cocks, L.V., van Rede, C. (1966): *Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts*, Academic Press Inc., London, 281.
164. Spangler, P.L., Jensen, L.A., Amundson, C.H., Olson, N.F., Hil, C.G. (1990): *J. Dairy Science* 73, 1420.
165. Watson, M.L. (1958): *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 727.
166. Reynolds, E.S. (1963): *J. Cell Biol.* 17, 208.
167. Filajdić, M., Ritz, M., Vojnović, V. (1988): *Mljekarstvo*, 38, 295.
168. Webb, B.H., Johnson, A.H. (1964): *Fundamentals of Dairy Chemistry*, AVI Publishing Company Inc., Westport, USA 827.
169. Pravilnik o kvalitetu mleka , proizvoda od mleka, sirila i čistih kultura (1982): *Sl. list SFRJ*, 51.
170. Gavarić, D. (1988): *Uticaj koncentrisanja mleka ultrafiltracijom na koagulaciju proteolitičkim enzimima*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad
171. Carić, M., Gavarić, D., Milanović, S., Marić, R. (1989): *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta*, Novi Sad, 20. 67.
172. Milanović, S., Carić, M. (1990): *Milchwissenschaft* 45, 303.
173. Emmons, D.B. (1990): *J. Dairy Science* 73, 2016.



174. Tamine, A.Y. (1986): Modern Cheesemaking: Hard Cheeses in Modern Dairy Technology, vol. 2, edited by R.K. Robinson, Elsevier Applied Sci Publishers Ltd. London, 35.
175. Gavarić, D., Carić, M., Kalab, M. (1989): Food Microstructure, 8, 53.
176. Carić, M. (1987): Mediterranean Cheese Varieties: Ripened Cheese Varieties Native to the Balkan Countries, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 2, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Science Publishers Ltd. 257.
177. Pejić, O.M. (1956): Mlekarstvo, II deo, Naučna knjiga, Beograd, 514.
178. Đorđević, J. (1972) Kačkavalj, Autorizovano predavanje za posle diplomске studije, Poljoprivredni fakultet, Sarajevo.
179. Kosikowski, F.V. (1982): Cheese and Fermented Milk Foods, Edvard Brothers Inc., Ann Arbor Mich. 690.
180. Arubai, A. (1979): Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
181. Škvarlova, H.C.M. (1990): Reznameta na dokladi i naučni sobšenja, Obnovjavane na tehnologite - Osnova na naučno tehničkeskija, Progres v mlečnata promišlena, Vidin, 29.
182. Green, M.L., Marshall, R.J., Glover, F.A. (1983): J. Dairy Research 50, 341.
183. Emmons, D.B., Binns, M. (1990): J. Dairy Science 73, 2028.
184. Fedrick, I.A., Fuller, S.C. (1988): Austr. J. Dairy Technol. 12.
185. Sutherland, B.J., Jameson, G.W. (1981): Austr. J. Dairy Technol. 136.
186. Creamer, L.K., Astor, J., Knighton, D. (1988): New Zealand Dairy Sci. & Technol. 23, 185.
187. Krčal, Z., Herian, K., Durko, M. (1984): Zbornik Prac Vyskumneko Ustavu Mliekarskeho v Žiline 8, 131.
188. Iozzok, U.I. (1984): Manufacture of Kasar cheese using ultrafiltration and using different cultures with or without lipase. Thesis, German Federal Republic.
189. Lau, Y.K., Barbano, M.D., Rasmussen, R.R. (1991): J. Dairy Science 74, 727.
190. Omar, M.M., El-Zayat, A. (1986): Food Chemistry 22, 83.
191. Creamer, K.L., Gilles, J., Lawrence, C.R. (1988): New Zealand J. Dairy Sci. & Technol. 23, 23.
192. Hassan, H.N. (1988): Alex. Sci. Exch. 9, 53.
193. Hassan, H.N., El-Deeb, S.A. (1988): Food Chemistry, 30. 245.
194. Gyosheva, B., Stefanova, M., Bankova, N. (1988): Die Nahrung, 32, 121.
195. Carić, M., Marić, S., Gavarić, D. (1978): Milchwissenschaft, 33. 518.

196. Christensen, T.M.I.E., Kristiansen, K.R., Madsen, J.S. (1989): *J. Dairy Science* 56, 823.
197. Hardi, J. (1987): *Mljekarstvo* 37, 8, 107.
198. Hardi, J. (1987): *Mljekarstvo*, 37, 9, 259.
199. Ognjenović, R., Carić, M., Gavarić, D., Milanović, S. (1991): *Proceedings of 8th World Congress of Food Science and Technology, Toronto, PO50*, 173.
200. Đulinac, B. (1993): *Zbornik radova sa Savetovanja o unapređenju uljarstva Jugoslavije, Beograd*, 308.
201. Walstra, P. (1987): *Consistency of cheese. Milk - The vital force, Proceeding of XXII International Dairy Congress, Hague*, 159.
202. Prentice, J.H. (1987): *Cheese Rheology, in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 1, edited by Fox, P.F., Elsevier Applied Sci. Publishers, Ltd. London*, 299.
203. Walstra, P. (1991): *IDF Bulletin N° 268*, 3.
204. Werner, H. (1989): *Scandinavian Dairy Industry*, 1, 52.
205. Zoon, P. (1991): *IDF Bulletin N° 268*, 30.
206. Tunick, M.H., Molan, E.J., Shien, J.J., Basch, J.J., Thompson, M.P., Maleeff, B.E., Holsinger, V.H. (1990): *J. Dairy Science* 73, 1671.
207. Banks, J.M. (1992): *Milchwissenschaft*, 47, 153.
208. Spangler, P.L., Jensen, L.A., Amundson, C.H., Olson, N.F., Hill, C.G. (1991): *J. Dairy Science* 74, 2809.
209. Marcos, A., Esteban, M.A., Leon, F., Fernandez-Salguero, J. (1979): *J. Dairy Science* 62, 892.
210. Knoop, E. (1972): *Milchwissenschaft* 27, 364.
211. Eino, M.F., Biggs, D.A., Irvine, D.M., Stanley, D.W. (1976): *J. Dairy Research* 43, 113.
212. Kalab, M. (1977): *Milchwissenschaft*, 32, 449.
213. Green, M.L., Turkey, A., Hobbs, G.D. (1981): *J. Dairy Research* 48, 343.
214. Kalab, M., Lowrie, J.R., Nichols, D. (1982): *J. Dairy Science* 65, 1117.
215. Lowrie, J.R., Kalab, M., Nichols, D. (1982): *J. Dairy Science* 65, 1122.
216. Kalab, M. (1986): *Mljekarstvo* 36, 355.
217. Kalab, M. (1990): *Mljekarstvo*, 40, 235.
218. Kalab, M., Carić, M. (1990): *Proceedings of the XXIII Int. Dairy Congress, vol. 2, Montreal*, 1457.

219. Kalab, M. (1990): Food Structure and Milk Products, in Encyclopedia of Food Science and Technology, Wiley Interscience, 1172.
220. Green, L.M. (1984): Milk Coagulation and the Development of Cheese Texture, in Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, edited by Davies, E.L., Law, A.B., 1.
221. Kalab, M., Emmons, D.B. (1978): Milchwissenschaft, 33, 670.
222. Brooker, E.B., Hobbs, D.G., Turvey, A. (1975): J. Dairy Research 42, 341.

