

Davorka Rujevčan, prof.¹

KARAKTERIZACIJA PROFILA PROTEOLIZE U ARGENTINSKOM OVČJEM SIRU NAPRAVLJENIM DVJEMA RAZLIČITIM METODAMA PROIZVODNJE

Characterisation of Proteolysis Profile of Argentinean Sheep Cheeses Made by Two Different Production Methods

SAŽETAK: U radu su proučeni profili proteolize u argentinskom ovčjem siru napravljenim dvjema metodama proizvodnje kako bi se dobile tipične i definirane karakteristike. Proizvedeni su sirevi s mikrobnom kulturom *Streptococcus thermophilus* (S-sirevi) i sirevi s miješanom mikrobnom kulturom *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* (L-sirevi). Sirevi su dozrijevali na 12°C i 80% relativne vlažnosti kroz 180 dana i uzorci su uzimani tijekom tog vremenskog razdoblja. Rezultati pokazuju određene sličnosti ali i razlike, posebice u pH vrijednosti, dok je senzorska analiza pokazala bitne razlike između te dvije vrste sireva. S-sirevi imaju nižu stupanj proteolize i blaži okus, što ih čini prikladnim za konzumaciju nakon kratkog vremena dozrijevanja. L-sirevi imaju viši stupanj proteolize, te puno izraženija senzorska svojstva, što ih čini prikladnim za konzumaciju nakon duljeg vremena dozrijevanja.

Cljučne riječi: ovčji sirevi, metode proizvodnje, profil proteolize, senzorska svojstva

ABSTRACT: In this work the proteolysis profile of Argentinean sheep cheeses made by two production methods were studied in order to develop products with typical and defined features. Cheeses with a starter of *Streptococcus thermophilus*, (S-cheeses) and cheeses with a mixed starter of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, (L-cheeses) were manufactured. The cheeses were ripened at 12°C and 80% relative humidity for 180 days and samples were taken throughout this period. Results show similarities but also some differences, especially in pH value, while sensory evaluation indicated important differences between the two types of cheeses. S-cheeses had a low proteolysis and soft flavor, making them appropriate for consumption after a short ripening time. L-cheeses

¹ Veleučilište u Karlovcu, drujevcan@vuka.hr

had a higher proteolysis level and more intense sensory characteristics, making them appropriate for consumption after a longer ripening time.

Keywords: sheep cheeses, production methods, proteolysis profile, sensory characteristics

1. UVOD

Ovaj rad je prijevod istraživačkog članka autora Maria C. Candiotia, Carine V. Bergamini, Susane B. Palma, Margarite Busetti, Carlota A. Meinardia and Carlota A. Zalazara objavljenog u *Journal of Science in Food and Agriculture* **90**, 36-42 (2009). Iako je Argentina jedna od vodećih zemalja u svijetu u proizvodnji kravljeg sira, proizvodnja sira iz ovčjeg mlijeka je nedovoljno razvijena. Tradicionalno, ovčji sirevi su bili proizvedeni u malom obiteljskom gospodarstvu, ali nedavno su se počeli proizvoditi i u malim proizvodnim pogonima¹. U mnogim regijama Argentine, ovčji sirevi se smatraju turističkom atrakcijom i često su dostupni u ekskluzivnijim restoranima i trgovinama u većim gradovima. Za proizvodnju mlijeka u Argentini se trenutno koristi oko 75000 ovaca, ali samo ih 3200 pripada registriranim mliječnim industrijama.^{1,2} Podatke o domaćim ovčjim sirevima i onima koji se proizvode u ograničenoj industrijskoj proizvodnji i prodaju se većinom na lokalnom ili regionalnom tržištu je jako teško dobiti. U 2002., zabilježeno je 56 mliječnih farmi s prosječnom veličinom stada od 150 grla, većinom u provincijama Buenos Airesa i Chubuta. Trajanje perioda mužnje je oko 180 dana od rujna do veljače i prosječna dnevna proizvodnja je 0,8L po životinji.²

Vrste ovaca koje u Argentini obitavaju su križanci između različitih vrsta iz Europe, Azije i Afrike. Pampinta je autohtona vrsta razvijena iz Frizijske i Corriedale vrste na Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Anguila, La Pampa, Argentina, institucija s velikim iskustvom u upravljanju stadima ovaca.³

U razdoblju od 2001-2002 prerađeno je 553000 l mlijeka kako bi se dobilo 73500 kg ovčjeg sira. Ta proizvodnja je znatno viša nego u razdoblju 1996-1997, kada je proizvedeno samo 39000 kg sira.^{1,2}

Industrija ovčjeg sira u Argentini je u početku. Bilo kakvo daljnje širenje će ovisiti o prikladnoj politici koja se razvija i komercijalizaciji problema koji se rješavaju. U vezi s time, mnoge vladine institucije surađuju s proizvođačima sira kako bi poboljšali kvalitetu ovčjeg mlijeka i sira. K tome, rastuća turistička aktivnost u Argentini može biti važan čimbenik u razvoju industrije ovčjeg sira. Kao posljedica toga, nužan je razvoj standardiziranog proizvoda dobre i stalne kvalitete. U našem institutu razvili smo dvije proizvodne metode za ovčje sireve kako bismo održali argentinski proizvod s tipičnim i definiranim karakteristikama.⁴ Cilj ovog rada je da okarakteriziramo profile proteolize u argentinskom ovčjem siru napravljenima dvjema proizvodnim metodama kako bi se definirao njihov identitet na znanstvenoj osnovi.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Proizvodnja sira

Svi sirevi su proizvedeni u pilot postrojenju El **Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)** koristeći sirovo mlijeko Pampinta ovce koju je omogućio INTA. Mlijeko je prikupljeno, rashlađeno (na 4°C) i dopremljeno u proizvodni pogon istog dana. Za svaku proizvodnju sira, 40 l mlijeka je pasterizirano na 65°C/20 min. Nakon hlađenja na 37°C, dodano je 0.2g/L CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Germany). Mlijeko se tada razdijelilo na dva dijela po 20 L, kako bi se istovremeno proizvele dvije vrste sira slijedeći dolje navedene metode proizvodnje (v. Tablica 1). U metodi 1, za proizvodnju S-sireva, kao početna mikrobna kultura koristila se komercijalna liofilizirana "direct-to-vat" kultura koju čine sojevi *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen, Hørsholm, Danska). Mikrobna kultura je dispergirana u maloj količini pasteriziranog mlijeka i dodana je preostaloj količini mlijeka kako bi se postiglo 10⁶ (colony-forming units) CFU mL⁻¹. Nakon 15 minuta dodano je 0,014g/L kimozina (Maxiren 150, Gist-Brocades, Francuska). Kada je gruš postigao traženu čvrstoću rezan je na komadiće veličine zrna kukuruza. Gruš je tada ispran tako da se 10% sirutke zamijenilo vrućom vodom (60°C) uz lagano miješanje. Dobivena mješavina (~40°C) se lagano zagrijavala (1°C/min) ubrizgavanjem pare na 43°C kako bi se otario udio vode. Kada su čestice gruša postigle željenu razinu vlage, miješanje je zaustavljeno i sirutka se procijedila i bacila. Gruš je tada stavljen u cilindrične kalupe (visine 9 cm, promjera 10 cm, i prešan (0,2 -0,3 kg/cm) 24 sata. Sirevi dobiveni tom metodom nazivaju se S-sirevi. Za proizvodnju L-sireva koristila se početna mikrobna kultura koju čine *S.thermophilus* (60%), *Lactobacillus bulgaricus* (20%) i *Lactobacillus helveticus* (20%) (Chr. Hansen). Upotrijebljena doza bila je dostatna da se postigne 10⁶ CFU mL⁻¹ u mlijeku za proizvodnju sira. Koagulacija je provedena kao i u proizvodnoj metodi 1. Kada je gruš postigao potrebnu čvrstoću, narezan je na čestice veličine riže, tj. manje čestice nego za S-sireve. Mješavina čestica gruša i sirutke je tada lagano promiješana i zagrijavana brzinom 1°C/min do 47°C indirektnom parom (bez faze ispiranja) kako bi se smanjio udio vlage u grušu na željeni nivo. Na kraju, gruš se stavlja u kalupe i preša kao u proizvodnoj metodi 1. Ovi sirevi su nazvani L-sirevi. I S i L sirevi su soljeni u salamuri (200g/L NaCl, pH 5.4) pri 12°C/7 sati (svaki sir težio je otprilike 700 g). Zrenje se odvija pri 12°C i 80% relativne vlažnosti tijekom 6 mjeseci.

U razdoblju od listopada 2005. do svibnja 2006. pripremljeno je šest šarži svake vrste sira.

Tablica 1. Proizvodne metode S i L sireva

	S sirevi	L sirevi
DVS početna mikrobna kultura (dodan radi postizanja 10^6 CFU mL ⁻¹ u mlijeku)	<i>S. Thermophilus</i> 100%	<i>S. thermophilus</i> 60% <i>L. bulgaricus</i> 20% <i>L. helveticus</i> 20%
Sirilo	Maxiren®150 (0,014 gL ⁻¹)	Maxiren®150 (0,014 gL ⁻¹)
Veličina čestica gruša	Veličina kukuruza	Veličina riže
Ispiranje gruša	10% sirutke zamijenjeno vrućom vodom (60°C)	Nije ga bilo
Brzina zagrijavanja / krajnja temperatura	1°C min ⁻¹ / 43°C	1°C min ⁻¹ / 47°C

2.2 Analiza mlijeka

Mlijeko za proizvodnju sira podvrgnuto je analizi radi utvrđivanja udjela bjelančevina i masti prema standardnoj metodi Međunarodne mljekarske federacije (IDF)^{5,6} Sve analize provedene su dva puta.

2.3 Analiza sira

2.3.1. Sastav i pH sireva

Udio bjelančevina i masti ispitivane su prema IDF standardiziranim metodama^{5,6} kod sireva nakon 2 dana zrenja. Udio suhe tvari je određen prema IDF standardnoj metodi⁷ kod sireva starih 2 i 180 dana. pH je određen uz pomoć pH metra (Horiba, Kyoto, Japan) prema standardnoj metodi Američke udruge za javno zdravstvo⁸ nakon 2, 45, 90 i 180 dana zrenja.

2.3.2. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza provedena je nakon 2, 45, 90 i 180 dana zrenja prema APHA standardnoj metodi⁹. *Streptococcus thermophilus* je određen na SMA agaru s obranim mlijekom (Saburo-maltozni agar) nakon 48 sati inkubacije pri temperaturi od 37°C. Populacija *C. Lactobacilla* je određena na Man-Rogosa-Sharp (MRS) agaru nakon 96 sati inkubacije pri 37°C.

2.3.3. Određivanje proteolize

Analiza proteoliza izvršena je nakon 2, 45, 90 i 180 dana zrenja određivanjem topivog dušika pri pH 4.6 (SN-pH 4.6) u 120 g/kg trikloroctene kiseline (SN-TCA) i 25 g/kg fosfovolframove kiseline (SN-PTA). Također je provedeno određivanje profila peptida u ekstraktu sireva topivih u vodi i elektroforeza netopivih dijelova dušika pri pH 4.6.

2.3.4. Topivi dušik

Uzorci sira su tretirani tako da zadrže sirove ekstrakte citrata i topive dijelove pri pH 4.6 (SN-pH 4.6) u trikloroctenoj kiselini (SN-TCA; 120g/kg) i u fosfovolframoj kiselini (SN-PTA, 25g/kg) prema Hynes i sur.¹⁰ Naribani sir (10g) pomiješan je s 20 mL otopine natrij citrata od 0.5 mol/l a zatim su homogenizirani u tarioniku s tučkom. Deionizirana voda dodana je volumenu od oko 90 mL i pH je prilagođen na 4.6. Nakon centrifugiranja pri 3000 x g za 15 min volumen topivih dijelova je prilagođen na 100mL. SN-TCA i SN-PTA frakcije dobivene su od SN pH 4.6 frakcija prema Gripon i sur.¹¹. Udio dušika određen je makro metodom po Kjeldahlu.⁵

2.3.5. Elektroforeza

Primarna proteoliza procijenjena je elektrolizom. Uzorci sira pripremljeni su taloženjem pri pH 4.6 i zatim pročišćeni. Netopivi ostatak pri pH 4.6 je analiziran elektroforezom s ureom i poliakrilamidnim gelom (urea PAGE) u MiniProteanII cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) primjenom metode po Andrews. Koncentracija acrilamida je 75g/kg¹³. Bjelančevine su obojane Coomassie Blue G-250.

2.3.6. Profili peptida

Profili peptida analizirani su uz pomoć inverzno-fazne visokotlačne tekućinske kromatografije (RP-HPLC). HPLC oprema se sastojala od kromatografa serije 200, kvaterarne pumpe, otplinjača i detektora UV-vidljivosti (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Modul sučelja spojen na računala korišten je za dobivanje kromatografskih podataka pomoću softvera Turbochrom (Perkin Elmer). Koristila se analitička kolona 220 mm x 4.6 mm Aquapore OD-300 C18, 5 nm, 300 Å (Perkin Elmer). Ekstrakti sira topivi u vodi dobiveni su miješanjem 5 g sira i 15 mL destilirane vode u tarioniku s tučkom, zatim se zagrijavalo na 40°C i ta se temperatura održavala 1 sat. Suspenzija je centrifugirana na 3000 x g i filtrirana. Dobivena otopina svedena je na krajnji volumen od 25 ml. Uzorci su filtrirani kroz 0.45 µm Millex membrane (Millipore, Sao Paulo, Brazil) i 20 µm alikvotni uzorci ubrizgani su u kromatograf. Utvrđivanje se odvijalo pri 214 nm i pri temperaturi kolone od 40°C. Kolona je uravnotežena prvotno sa 100% otapalom A (voda/trifluor octena kiselina (TFA), 1000:1.1 v/v). Nakon 10 min ubrizgavanja gradijent je dobiven povećavajući koncentraciju otapala B (acetonitril/voda/TFA, 600:400:1 v/v/v) od 0 do 80% tokom 80 min, zatim od 80 do 100% tijekom 1 min i na kraju održavan 100% B za 4 min. Kolona je zatim vraćena u početno stanje kroz 1 min. Ti posljednji uvjeti održavani su 10 min.

2.4. Senzorska analiza

Panel od 12 neobučeni ocjenjivača proveo je test trokuta u cilju utvrđivanja postojanja senzorskih razlika između proizvedenih S i L sireva nakon 45 dana zrenja. Ta metoda je posebno korisna u situacijama gdje su učinci obrade mogli proizvesti promjene u proizvodu koje se ne mogu karakterizirati jednostavno s jednim ili dva

obilježja. Uzorci sira pripremljeni su u jednakom broju 6 mogućih kombinacija (LSS, SLL, LLS, LSL i SLS) i ocjenjivačima su prezentirani nasumičnim odabirom. Zatim se zatražilo da ocjenjivači probaju uzorke s lijeva na desno i odrede koji uzorak je različit.

2.4.1. Statistička analiza

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Podatci su obrađeni jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), a aritmetičke sredine su uspoređivane primjenom testa najmanje značajne razlike (LSD) tamo gdje su razlike utvrđene.¹⁴ Profili peptida analizirani su primjenom metode glavnih komponenti (PCA), multivarijantne tehnike koja smanjuje broj izvornih varijabli na manji broj latentnih varijabli koje nazivamo glavne komponente (GK), a koje su linearne kombinacije izvornih varijabli.¹⁵ Kromatogrami su unaprijed obrađeni „fuzzy“ pristupom kako bi se smanjio broj pikova za kasniji PCA. Obrađeni podatci sastojali su se od skupina vremena zadržavanja u kojima su područja pikova akumulirani koristeći udaljenost od centra skupine kao težinu. „Fuzzy“ pristup omogućava brzu, uspješnu i objektivnu metodologiju za odabir varijabli kromatografa za kemometrijsku analizu.¹⁶

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Karakteristike mlijeka za sir

Srednja vrijednost sirovog mlijeka koje se koristi u proizvodnji sira bila je: ukupne bjelančevine 53.7 ± 3.5 g/kg, masnoće 76 ± 22 g/kg, ukupne krute tvari 193 ± 34 g/kg, pH 6.4 ± 0.1 i kiselost po Dornicu $22.4 \pm 2.5^\circ\text{D}$. Razine ukupnih bjelančevina, masnoća i krutih tvari su slične srednjim vrijednostima prosječnog sastava različitih vrsta ovčjeg mlijeka.¹⁷

3.2. Sastav i pH vrijednost sireva

Vrijednosti suhe tvari, masnoće, ukupnih bjelančevina i pH za proizvedene sireve su prikazane u Tablici 2. Kao što se može vidjeti, nisu pronađene razlike ($P > 0.05$) u suhoj tvari, masnoći i ukupnim bjelančevinama kod sireva proizvedenih različitim metodama. Unatoč tome, obje vrste sira su pokazale značajni gubitak vlage (oko 68%) tijekom zrenja, što je primijećeno i kod drugih ovčjih sireva sa dugim vremenom dozrijevanja, kao što su Idiazabal¹⁸, Manchego¹⁹, i Roncal.²⁰

Što se tiče pH vrijednosti, L-sirevi pokazali su značajno niže vrijednosti od S-sireva tijekom zrenja. Ti rezultati ukazuju na jaču kiselinsku aktivnost lactobacila i mikrobnih kultura u L-sirevima.

Udio suhe tvari i pH i kod S i L sireva na početku kao i na kraju zrenja su uspoređivi s onima koji su zabilježeni kod drugih ovčjih sireva kao što su Manchego¹⁹, Roncal²¹ i Idiazabal¹⁸, dok su udjeli masnoće i ukupnih bjelančevina bili niži od onih zabi-

lježenih za spomenute sireve. Ipak, udio masnoće je sličan razinama zabilježenih kod Kefalotiri i Halloumi sireva na kraju zrenja²¹.

Tablica 2. Približni sastav i pH S i L sireva

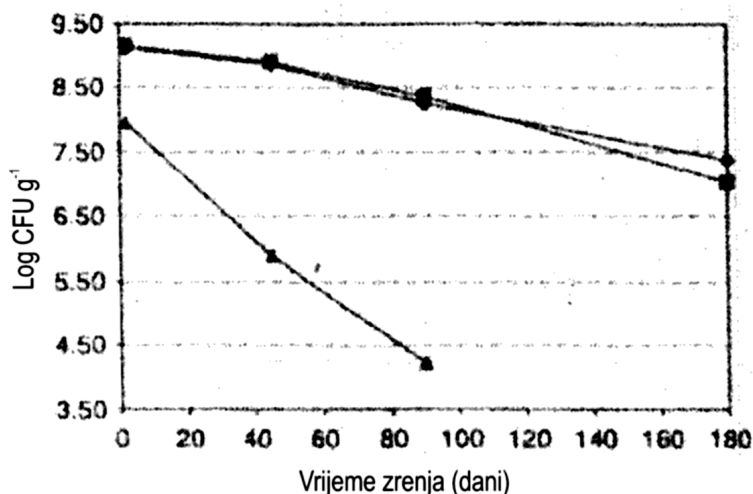
Sirevi	Suha tvar (g/kg) ¹		Masti (g/kg ⁻¹)	UB (g/kg ⁻¹)	pH			
	2 dana	180 dana	2 dana	2 dana	2 dana	45 dana	90 dana	180 dana
S	572 ± 10a	712 ± 16a	302 ± 17a	218 ± 13a	5,47±0,28a	5,35±0,06a	5,47±0,08a	5,46±0,08a
L	573 ± 23a	709 ± 14a	300 ± 26a	231 ± 9a	5,07±0,17b	4,95±0,05b	5,03±0,09b	5,13±0,10b

UB, ukupne bjelančevine
Srednje vrijednosti u stupcu s različitim slovima statistički su značajne (P<0,05)

3.3. Mikrobiološka svojstva sireva

Razvoj početne mikrobne kulture tijekom zrenja prikazan je u Slici 1. U obje vrste sireva, početni broj streptokoka je bio oko 10⁹ CFU/g, ali ta populacija se smanjila za dvije logaritamske jedinice kod 90 i 180 dana zrenja. Populacija streptokoka nije pokazala značajnije razlike između L i S sireva (P>0.05). Što se tiče početne mikrobne kulture laktobacila u L-sirevima značajno je pala od početka (108 CFU/g) do 90 dana (104 CFU/g), dok na 180 dana niti jedan laktobacil nije primijećen. Iako nismo proučavali autolizu, ti rezultati pokazuju da je vjerojatno došlo do smanjenja populacije laktobacila zajedno s njihovom autolizom. U stvari, nekoliko sojeva termofilnih laktobacila pokazali su autolitska svojstva u sirnoj matrici tijekom zrenja.^{22, 23}

Slika 1. Razvoj početne mikrobne kulture u S i L sirevima tijekom zrenja:
■ Streptococcus thermophilus u S-sirevima; u ◆ S.thermophilus u L-sirevima;
▲ laktobacili u L- sirevima

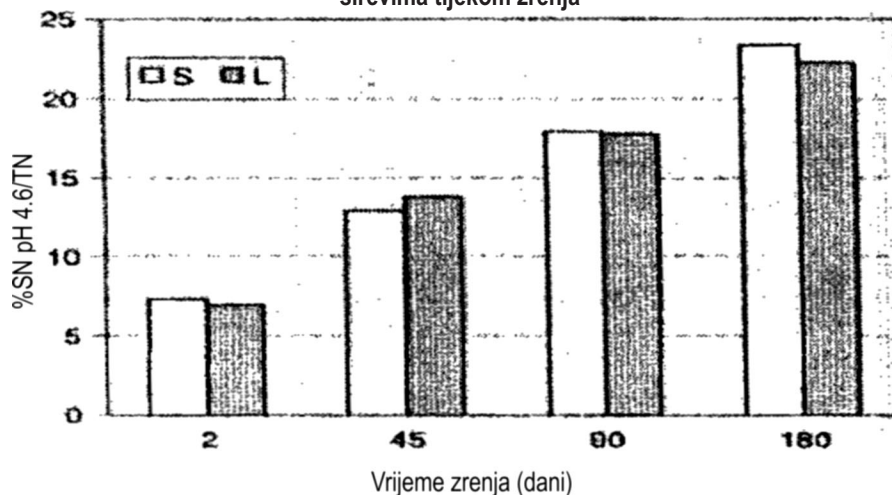


3.4. Procjena proteolize

3.4.1. Topivi dušik

SN-pH 4.6 povećao se tijekom zrenja, ali nije bilo značajnih razlika ($P > 0.05$) između S i L sireva (v. Slika 2). To nije iznenađujuće, zato što SN-pH 4.6 frakcija pokazuje većinom primarnu proteolizu, posebno zbog plazmina i mogućih ostataka ili reaktiviranog kimozina. Ta frakcija sastoji se od peptida i dušikovitih spojeva manje veličine kao što su amini/urea i amonijak.^{24,25} S druge strane, iako su različiti sojevi *L. helveticus* pokazali sposobnost da „napadnu“ α_s i β kazeine kroz proteaze njihovih staničnih stijenki, ta aktivnost je potvrđena samo in vitro.^{26,27}

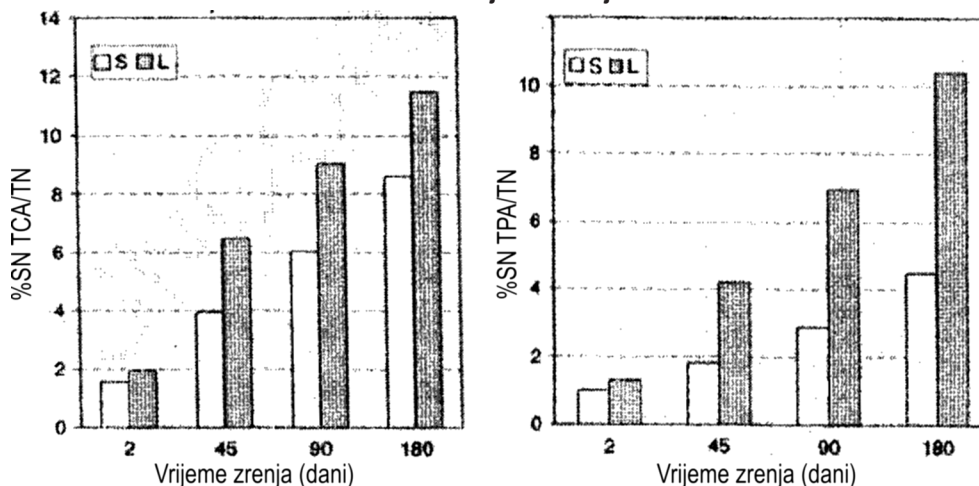
Slika 2. Topivi dušik pri pH 4.6 (SN-pH 4.6), izražen u% ukupnog dušika (TN) u S i L sirevima tijekom zrenja



Suprotno tome, SN-TCA i SN-PTA frakcije su pokazale značajne razlike ($P < 0.05$) između S i L sireva tijekom cijelog procesa zrenja. Vrijednosti objiju frakcija bile su više u L-sirevima nego u S-sirevima. Razlika je bila značajnija za SN-PTA frakciju čija je razina u L-sirevima bila dvostruko veća od one u S sirevima od 45 dana pa do kraja zrenja (v. Slika 3).

Različiti dijelovi SN-TCA i SN-PTA frakcije, kao što su mali peptidi i slobodne amino kiseline, vezane su za proteolitsku aktivnost početnih mikrobnih bakterija. Zbog toga dobiveni rezultati otkrivaju jaču aktivnost peptidaze laktobacila početnih mikrobnih kultura kod L-sireva u usporedbi sa streptokokima koji su dodani S-sirevima. Općenito, pretpostavlja se da bakterijske peptidaze mogu djelovati samo nakon što su otpuštene u matricu sira kao rezultat lize stanica.²² Iako nismo proučavali bakterijsku lizu, rezultat potvrđuje pretpostavku da će doći do smanjivanja populacija laktobacila sa lizom stanica. Ipak za to je potrebno daljnje istraživanje.

Slika 3. Topivi dušik u (A) 120 g/kg trikloroocetnoj kiselini (SN-TCA) i (B) 25 g/kg fosfovolframovoj kiselini (SN-PTA), izraženo kao % ukupnog dušika (TN) u S i L sirevima tijekom zrenja



3.4.2. Elektroforeza

Kod tipičnih uzoraka elektroforeze za netopivu frakciju dušika pri pH 4.6 može se vidjeti da se β (β_1 i β_2) kazein nije značajno razlikovao kod S i L sireva, i ta je frakcija ostala gotovo netaknuta cijelo vrijeme zrenja. Mendia i sur.¹⁸ i Ferreira i sur.²⁸ su svaki zasebno dobili iste rezultate za Idiazabal i Terrincho sireve. Ipak različite razine hidrolize β kazeina zabilježene su kod drugih vrsta ovčjih sireva. To se pripisuje većinom vrsti i porijeklu sirila mlijeka koji se koristi i aktivnosti plazmina, koji se povišuje nakon zagrijavanja gruš. ^{20,29} Po našem iskustvu, aktivnost plazmina (mliječno alkalinske proteaze) je zanemariva jer je pH vrijednost sira (5.0-5.4) znatno niža od optimalna vrijednost pH (7.5).³⁰

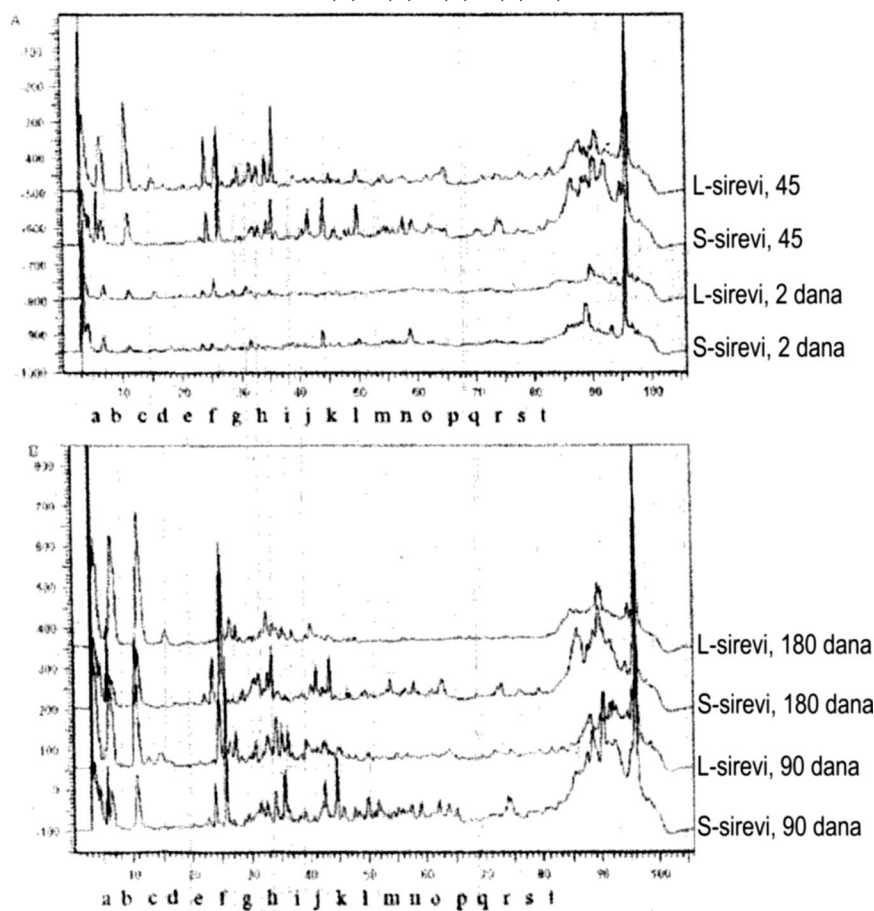
Suprotno drugim frakcijama bjelančevina, kazein α_{s1} je pokazao važnu hidrolizu, zato što ga lako napada kimozin.³¹ U biti, primarno mjesto aktivnosti kimozina na α_{s1} kazeinu je Phe₂₃-Val₂₄ veza koja otpušta peptide CN (f1-23) i α_{s1}^{-1} kazein³² čija je prisutnost primijećena nakon 2 dana zrenja kod obje vrste sira. Hidroliza α_{s1} kazeina je bila veća kod L-sireva na početku zrenja. To se može objasniti pomoću tri pretpostavke: (i) vjerojatno je da je niži udio koagulanta koji je preostao u S-sirevima zbog koraka ispiranja; (ii) pH vrijednost L-sireva je niža i zbog toga bliža optimalnoj pH vrijednosti kimozina; (iii) akumulacija α_{s1}^{-1} kazeina u S-sirevima, kao rezultat nije razgrađen peptidazama bakterija mliječne kiseline, mogle su spriječiti ili odgoditi hidrolizu α_{s1} kazeina²⁴.

3.4.3. Profili peptida

S-sirevi pokazali su postepen porast pikova profila peptida tijekom zrenja. Suprotno tome, većina pikova kod profila peptida u L-sirevima pokazala je porast s od-

stupanjem kod 180 dana zrenja, vjerojatno zbog hidrolize peptida i posljedičnog otpuštanja slobodnih amino kiselina (v. Slika 4).

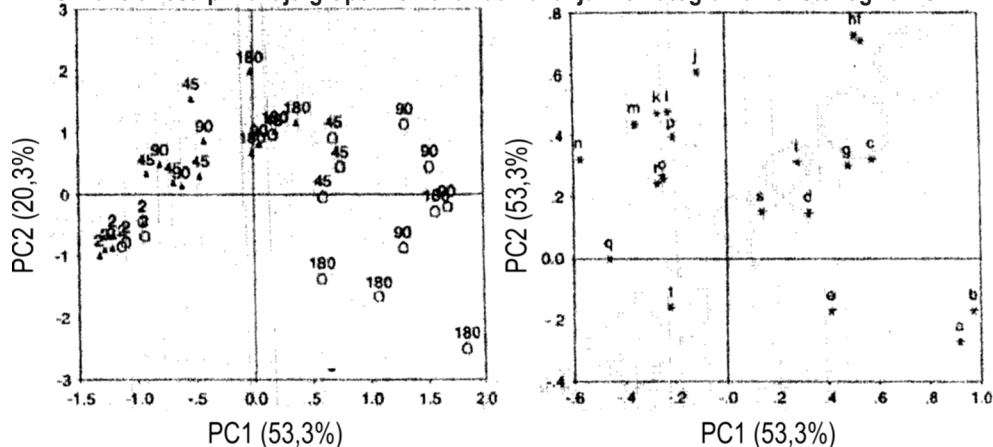
Slika 4. Profili Inverzno-fazne visokotlačne tekućinske kromatografije ekstrakata S i L sireva topivih u vodi tijekom zrenja: A 2 i 45 dana; B 90 i 180 dana. Slova od a-t prikazuju pikove odabrane za PCA i odnose se na sljedeća vremena zadržavanja: 5,0;9,1; 13,1; 17,2;21,2; 25,3; 29,3; 33,4; 37,4; 41,5; 45,5; 49,6; 53,6;57,7;61,7; 65,8; 68,8; 73,9; 77,9; 82,0



Općenito, područje pikova u središnjim i krajnjim područjima kromatografskih profila L-sireva je bilo niže nego kod S-sireva. Suprotna situacija je primijećena u početnim područjima gdje su primijećeni viši pikovi profila peptida u L-sirevima.

Uz vizualnu analizu, kromatografski profili su analizirani i pomoću multivarijantne metode. U prikazanom radu kromatografski profili podijeljeni su u 20 skupina vremena zadržavanja koji su označeni slovima a-t abecednim redom (v. Slika 5). Područja tih skupina smatraju se početnim varijablama za analizu glavnih komponenti sa standardizacijom prema kojoj im je prosjek nula i njihovim izvornim varijancama

Slika 5. PCA topivih profila peptida S() i L () sireva. (A) Prikaz rezultata za PC1 i PC2. Oznake rezultata uzoraka pokazuju vrijeme zrenja (dani). (B) Prikaz unosa za PC1 i PC2. Oznake unosa prikazuju grupe vremena zadržavanja kromatograma korištenog za PCA



(kovarijantna matrica). Izlučene su tri glavne komponente sa svojstvenom vrijednosti većom nego što je prosjek svojstvenih vrijednosti, što objašnjava 84,1% ukupne varijance. Rezultati i opterećenja za GK1 i GK2 prikazani su na Slici 5. U grafičkom prikazu rezultata primjećuje se da su svi uzorci slični na početku zrenja (2 dana). Suprotno tome, uzorci sireva stari 45, 90 i 180 dana pokazuju veću varijabilnost s obzirom na vrstu sira i vrijeme zrenja. Među tim uzorcima S-sirevi grupirali su se odvojeno od L-sireva uglavnom uz GK1, što je izlučilo više od polovice ukupne varijance (53,3%). U stvarnosti, L-sirevi pokazivali su pozitivne rezultate za tu glavnu komponentu, dok su S-sirevi općenito pokazivali negativne rezultate (v. Slika 5A). Grupe s najnižim vremenom retencije su karakteristika L-sireva, dok su one s dužim vremenom retencije tipične za S-sireve (v. Slika 5B) Ti rezultati su u skladu s vizualnom analizom. Peptidi koji eluiraju u početnim područjima kromatograma se smatraju hidrofilnim zbog svoje elucije pri niskim acetonitril koncentracijama. Uz to amino kiseline bez arome (Tyr, Phe, i Trp) eluiraju u tom početnom području. Obrnuto, peptidi s dužim vremenom zadržavanja smatraju se hidrofobnim zbog njihove elucije pri visokim koncentracijama acetonitrila. Zbog toga hidrofilni i hidrofobni peptidi karakteriziraju L i S sireve zasebno. Povećanje omjera hidrofobnih i hidrofilnih peptida je zamijećeno kao karakteristična promjena pri zrenju kod nekoliko vrsta sireva.³³⁻³⁵ Ta se činjenica smatra prikladnim objašnjenjem, jer se hidrofobni peptidi povezuju s gorkim okusom.³⁵ Stoga su rezultati dobiveni za L-sireve u skladu s ubrzanjem zrenja i mogućim učinkom smanjenja gorčine. Pored razlikovanja sireva po vrsti, primijećeno je i razlikovanje prema vremenu zrenja u odnosu na GK1 (v. Slika 5A). Zapravo, rezultati uzoraka obje vrste sira bili su veći kako se vrijeme zrenja povećavalo, osim uzorka L-sira starog 180 dana. Ti su se uzroci razlikovali od uzoraka L-sira starih 45 i 90 dana grupirajući se uz GK2 i pokazujući negativne rezultate na toj osi, kao i uzorci sireva stari 2 dana.

Ti se rezultati podudaraju s onima utvrđenim kod vizualne analize kromatograma pokazujući da topivi peptidi tih sireva postižu svoj maksimum i onda se smanjuju.

Na kraju zrenja, S-sirevi su po rezultatima bili slični 45 dana starom L-siru (v. Slika 5A). Ti rezultati pokazali su višu proteolizu i ubrzanje zrenja kod L-sireva u usporedbi sa S-sirevima, vjerojatno uzrokovano aktivnošću enzima proteolize *L. Helveticus* i *L. bulgaricus*. Slično tome, i drugi autori su primijetili povećanje u proteolizi i ubrzanje zrenja sireva s dodatkom različitih sojeva *L. helveticus*.^{23, 37}

3.4.4. Senzorska analiza

Test trokuta koji je proveden nakon 45 dana zrenja s grupom od 12 neobučanih ocjenjivača pokazao je značajne razlike između S i L sireva ($P < 0.01$). 11 ocjenjivača točno je prepoznalo različite uzorke u svakoj od šest kombinacija, a okus svojstven L-sirevima procijenili su intenzivnijim od okusa S-sireva. Ta senzorska procjena u skladu je s razlikama koje su ranije zabilježene u mikrobiološkim i fizikalno-kemijskim svojstvima.

4. ZAKLJUČAK

Ovaj rad daje informacije o procesu zrenja ovčjeg sira pripremljenim dvjema proizvodnim metodama koje trenutno nisu prisutne u Argentini. Razlike u početnoj mikrobnj kulturi korištenoj pri proizvodnji sira primijećene su u proizvodnji SN-TCA i SN-PT frakciji. Vrijednosti obje frakcije bile su veće u L-sirevima, a razlog tome je liza populacije laktobacila. Elektorforetski profili pokazali su veću hidrolizu α_{s1} kaseina u L-sirevima, zato što su S-sirevi zadržali nižu razinu sirila kao posljedicu ispiranja i višeg pH. Analiza glavnih komponenti profila peptida također je pokazala očite razlike između S i L sireva; veća peptidoliza potvrđena je u L-sirevima. Rezultati senzorske procjene pokazali su postojanje jačeg okusa u L-sirevima.

Literatura

1. McCormick, M., Lynch, G., **La lecheria ovina en la Argentina**, *Tecnol Láctea Latinoam* 9:12 -15, 2003.
2. McCormick, M., Borra, G., Peña, S., Lynch, G., **El tambo ovino en la Argentina** <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/ganaderia/otros/ovinos/leche/tambo.php>. (lipanj 2008.)
3. Suarez, V., Busetti, M., **Lecheria Ovina y Aptitud Lechera da la Raza Pampinata**, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Anguil, 1999.
4. Bergamini, C., Meinardi, C., Bernal, S., Wolf, I., Busetti, M., "Design of two different technologies for the production of Argentinian sheep cheeses", **Special Issue of the International Dairy Federation**, god. 2008 0801 /Part 3, str. 270-273.
5. FIL-IDF, **Latte Determinazione del Tenore in Azoto. Metoda di Riferimento N 20B**. International Dairy Federation, Brisel, pp.74-107, 1993.

6. FIL-IDF, **Lait Produits Laitiers. Détermination de la Teneur en Matière Grasse. Guide de Directives Générales Appliquées aux Méthodes Butyrométriques**, Norme FIL Internationale 152A:1997, International Dairy Federation, Brussels, 1997.
7. FIL-IDF, **Formaggio e Formaggio Fusso. Determinazione della Materia Secca. Metodo di Riferimento N 4A**. International Dairy Federation, Brussels, pp 184-188, 1982.
8. Bradley, R.L., Arnold, E., Barbano, D.M., Semerad, R.G., Smith, D.E., Vines, B.K., **Chemical and Physical methods in Standard Methods for the Examination of Dairy products**, ed. By Marshall R. American Public Health Association, Washington, DC, str.433-531, 1993.
9. Frank, J., Christen, G., Bullerman, L., **Test for group of microorganisms in Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, ed by Marshall R. American Public Health Association, Washington, DC, str. 271-286, 1993.
10. Hynes, E., Meinardi, C., Sabbag, N., Cattaneo, T., Candiotti, M.C., Zalazar, C.A., Influence of milk-clotting enzyme concentration on the α_{s1} casein hydrolysis during soft cheeses ripening, *J Dairy Sci* 84:1335 -1340, 2001.
11. Gripon, J.C., Desmazeaud, M.J., Le Bars, D., Bergere, J.L., **Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation du fromage, II Influence de la présure commerciale**, *Lait* 55:502 -516 1975.
12. Andrews, A.T., **Proteinases in normal bovine milk and their action on casein**, *J Dairy Res* 50:45-55 1983.
13. Hynes, E., Delacroix-Bucher, A., Meinardi, C.A., Zalazar, C.A., **Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese** *Aust J Dairy Technol* 54:24 -27, 1999.
14. Lisazoian, L., Joarusti, L., **SPSS for Windows**, Version 6.0 Editorial Paraninfo, Buenos Aires, 1995.
15. Hair, J.F., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C., **Análisis factorial in Análisis Multivariante**, ed by Prentice -Hall Iberia Madrid, pp.79-123, 1999.
16. Piraino, P., Parente, E., McSweeney, P.H.L., **Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptide profiles from cheese extracts: a novel approach**, *J. Agric Food Chem* 52:6904-6911, 2004.
17. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., **Composition of goat and sheep milk products: an update**, *Small Ruminant Res* 79:57-72, 2008.
18. Mendia, C., Inbáñez, F.J., Torre, P., Barcina, Y., **Effects of pasteurization and use of native starter culture on proteolysis in an ewes milk cheese**, *Food Control* 11:195-200, 2000.
19. Poveda, J.M., Sousa, M.J., Cabanez, L., McSweeney, P.H.L., **Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with defined-strain starter culture and adjunct starter (Lactobacillus plantarum) or a commercial starter**, *Int Dairy J* 13:169-178, 2003
20. Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibanez, F.C., Torre, P., **Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic and sensory characteristics of an ewe's milk cheese**, *Int Dairy J* 12:27-34, 2002.
21. Kalantzopoulos, G.C., **Cheeses from ewe's and goat's milk in Cheese Chemistry, Physics and Microbiology** (2nd edn), Vol.2 ed.by Fox PF, Chapman and Hall, London, 1993. str.507-543,
22. Crow, V.L., Coobear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H., **The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese**, *Int Dairy J* 5:855-875, 1995.

23. Kenny, O., Fitzgerald, R.J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K., **Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening**, *Int Dairy J* 16:797-804, 2006.
24. Visser, F.M., **Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk on proteolysis and flavour development in Gouda cheese 5: Some observation on bitter extracts from aseptically made cheeses**, *Neth Milk Dairy J* 31:265-275, 1977.
25. Delacroix-Buchet, A., Fournier, S., **Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée, II Influence de la chymosine et des conditions de fabrication**, *Liat* 72:53-72, 1992.
26. Torriani, S., Vescovo, M., Scolari, G., **An overview on *Lactobacillus helveticus***, *Ann Microbial Enzymol* 44:163-191, 1994.
27. Mäyä-Mäniken, A., Bigret, M., **Industrial Use and production of lactic acid bacteria**, in **Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects**, ed by Salminen S and von Wright A Marcelle Dekker, New York, NY, 1998., str. 73-102
28. Ferreira, I., Verios, C., Pinho, O., Veloso, A.C.A., Peres, A.M., Mendonca, A., **Casein breakdown in Terrincho ovine cheese: comparison with bovine cheese and with bovine/ovine cheese**, *J Dairy Sci* 89:2397-2407, 2006.
29. Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibanez, F.C., Torrw. P., **Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese**, *Food Chem* 72:137-144, 2001.
30. Grufferty, M., Fox, P., **Milk alkaline protease**, *J Dairy Res* 55:609-630, 1988.
31. Fox, P.F., Stepaniak, I., **Enzymes in cheese technology**, *Int Dairy J* 3:509-530, 1993.
32. Ferranti, P., Malorni, A., Nitti, G., Laezza, P., Pizzano, R., Chianese, L., et al, **Primary structure of ovine α s1 caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetics variants A, C, and D**, *J Dairy Res* 62:281-296, 1995.
33. Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, F., Kelly, A.I., Guamis, B., **Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening**, *Int Dairy J* 12:35-44, 2002.
34. Picon, A., de Torres, B., Gaya, P., Núñez, M., **Cheesemaking with *Lactococcus lactis* strain expressing a mutamn oligopeptide binding protein as starter results in a different peptide profile**, *Int J Food Microbial* 104:299 -307, 2005.
35. Morea, M., Matarante, A., Di Cagho, R., Baruzzi, F., Minervini, F., **Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciovallo Pugliese cheese**, *Int Dairy J* 17:525-534, 2006.
36. Monnet, V., Gripon, J.C., **Proteolytic system of lactic acid bacteria: properties and practical implications** *Tecnol Lactea Latinoam* 8:49-56, 1997.
37. Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A., Beresford, T.P., **Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese**, *Int. Dairy J* 13:313 -323, 2003.