

Studije strukture mlečnih proizvoda: Praktični aspekti*

Miloslav KALÁB,

Food Research Centre Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, Canada

Autorski pregled — Author's review

UDK: 637.053

Prispjelo: 8. 7. 1990.

Sažetak

Ovaj pregled predstavlja najnovija dostignuća u primeni elektronske mikroskopije i srodnih tehnika u tehnologiji mleka.

Pored opštih aspekata istraživanja koja se sporovode u laboratorijama za elektronsku mikroskopiju, posebna pažnja je posvećena razvoju strukture mlečnih proizvoda, kao što su: jogurt, beli sir, zreli sir, sirni namaz, retentat ultrafiltriranog mleka i mlečni proizvodi u prahu.

Uvod

Elektronska mikroskopija omogućava vizuelno praćenje transformacije mleka u mlečne proizvode i upoređivanje strukturnih karakteristika sa drugim osobinama proizvoda, kao što su čvrstoća, viskozitet ili mazivost. Razvijanje strukture u mlečnim proizvodima, primenom elektronske mikroskopije već je prikazano u ovom časopisu (Kaláb, 1986). Ovde će se više pažnje posvetiti osnivanju laboratorije za elektronsku mikroskopiju i nekim praktičnim aspektima proučavanja strukture u okviru nauke o mleku.

Laboratorija za elektronsko mikroskopiranje

Postoje dva načina izvođenja elektronske mikroskopije, a svaki podrazumeva korišćenje specijalnih, namenskih mikroskopa. Jedan način je »scanning« elektronska mikroskopija (SEM), a drugi je transmisiona elektronska mikroskopija (TEM). SEM načinom površina uzorka se postupno izlaže snopu elektrona, a sekundarni (odbijeni) elektroni daju uvećanu sliku strukture površine; TEM postavlja tanki sloj uzorka ili njegovu repliku napravljenu od platine ili ugljenika u elektronski snop i promatra se njihova uvećana senka.

Postoje i elektronski mikroskopi koji kombinuju SEM i TEM u jednom instrumentu (STEM), no ipak su češći odvojeni instrumenti. Funkcionišući na dva različita principa, SEM i TEM daju različite slike uzorka sa istom strukturom, ali informacije dobijene na jedan način slažu se s podacima dobijenim

* Ovaj pregled se bazira na predavanju održanom na Prehrambeno-biotehničkom fakultetu u Zagrebu, 8 septembra, 1989.

na drugi način. Korisno je zbog toga, uvek kada je to moguće, koristiti oba načina da bi se izbegle zabune zbog artéfakta, koje je teško razlikovati ako se koristi samo jedna tehnika.

Razvijene su različite tehnike za svaki način mikroskopije da bi se mogle prilagoditi velikom broju uzoraka (Schmidt, 1982). Brooker i Wells (1984) su razvili metod kojim su prvo primenom TEM promatrali uzorke postavljene u smolu, a zatim su, nakon uklanjanja smole, primenili SEM.

Svaka metoda mikroskopije zahteva odgovarajuću opremu, kao što je npr. uređaj za »critical point« sušenje, oprema za nanošenje zlata ili platine na uzorak, da se obezbedi električna provodljivost ili proizvede replika, ultramikrotom, itd. (Kaláb, 1983). Osim toga, svaka laboratorija za elektronsku mikroskopiju treba da ima opremu za fotografiju, kojom se razvijaju filmovi, uvećavaju i štampaju negativi.

Priprema uzorka hrane za elektronsko mikroskopiranje mora osigurati da slike vjerno prikazuju strukturu.

Uzorci za elektronsko mikroskopiranje ne smeju otpuštati paru ili gasove u elektronskom mikroskopu gde se uzorci izlažu vakuumu. Postoji nekoliko načina da se ovaj uslov ispuni, što je objašnjeno u nastavku.

Jedan od najboljih načina je brzo smrzavanje i nakon toga prelamanje u smrznutom stanju, a naročito je pogodan za analizu tečnih mlečnih proizvoda, punomasnih proizvoda, skrobaste i smrznute hrane. Ti se uzorci mogu analizirati u smrznutom-hidratisanom stanju primenom cryo-SEM, ili se mogu replicirati platinom i ugljenikom, a dobijene kopije se analiziraju primenom TEM (Buchheim, 1982). Osnovno je da se spreči formiranje ledenih kristala u uzorku brzim zamrzavanjem ili korištenjem agenasa koji štite od smrzavanja i da se sva voda u njemu pretvori u staklasti led. Ledeni kristali koji bi se razvili kao rezultat sporog zamrzavanja oštetili bi i promenili originalnu strukturu koju treba proučiti.

Tradicionalnim tehnikama uzorak se hemijski fiksira i dehidrira. On se zatim priprema ili za SEM — prelamanjem u smrznutom stanju i sušenjem, ili za TEM — postavljanjem u smolu, sekcioniranjem i bojanjem. O ovim i drugim tehnikama bilo je ranije detaljnije referisano (Kaláb, 1983).

Osim vizueliziranja strukture, elektronski mikroskopi mogu dati informacije o hemijskom sastavu i distribuciji različitih elemenata u uzorku, ukoliko se mikroskop priključi na »energy-dispersive« spektrometar. Moguće je npr. ispitati sastav kristala soli u siru (Carić et al., 1985). Vizuelne slike i šeme distribucije elemenata mogu se obrađivati analizatorom slike. Ova oprema može biti vezana za elektronski mikroskop ili se upotrebljava posebno.

Zbog relativno visoke cene opreme za elektronsku mikroskopiju, preporučljivo je da nekoliko istraživačkih ustanova ili univerzitetskih katedri zajednički deli troškove i angažuje tehničare za održavanje opreme i za potrebe naučnih radnika. Primer višestrukog korištenja je Electron Microscope Unit pri Research Branch, Agriculture Canada u Otavi, koja zadovoljava potrebe naučnika iz različitih disciplina, kao što su nauka o hrani, pedologija, etnologija i botanika.

Primena elektronske mikroskopije se rapidno širi u istraživačkim laboratorijama velikih industrijskih kompanija za proizvodnju hrane usprkos visokoj ceni opreme. Pri univerzitetima katedre za nauku o hrani obično koriste mikroskope koji su vlasništvo katedri za biologiju, medicinu ili prirodne nauke.

Razlog sve većeg korišćenja elektronske mikroskopije je taj što nalazi često objašnjavaju odnose između različitih osobina hrane, jer na mnoge od njih (osetljivost na sinerezis, viskozitet, čvrstoća) utiče fizička struktura hrane. Ovi odnosi su od velikog značaja za proizvođače, prodavce (u maloprodaji) i potrošače hrane.

Razvijanje strukture u proizvodima od mleka

Izgled ima važnu ulogu pri izboru hrane koju nameravamo da pojedemo. Golo oko, međutim, ima ograničenu moć razdvajanja — ono je dovoljno da potrošaču pomogne u razlikovanju makroskopskih struktura, kao što su žilice u »plavom« siru, dobro tučeno vrhnje, mrvljivi masni sir, itd., ali za razlikovanje detalja potrebno je povećalo i snažniji mikroskopi. Manje čestice, kao što su kazeinske micelle, mogu se videti samo pomoću elektronskog mikroskopa. Elektronski mikroskopi omogućuju vizuelno praćenje transformacije mleka u mlečne proizvode.

Komponente mleka mogu da se podele na one koje se mogu videti pod elektronskim mikroskopom i one koje ostaju nevidljive i uz najveća uvećanja. Najmanje vidljive čestice u mleku su kazeinske submicelle, čiji je prečnik oko 10 nm (10×10^{-9} m). Kazeinske micelle su veće i njihov prečnik se kreće od 100 do 300 nm. Masne globule imaju prečnik od nekoliko mikrometara ($1 \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6}$ m). Bakterije mlečne kiseline koje imaju važnu ulogu u proizvodnji mnogih mlečnih proizvoda, u prečniku imaju oko 1 μm .

Proteini surutke i laktoze ne mogu se videti ni pod elektronskim mikroskopom dokle god su rastvoreni u vodenoj fazi. Koagulirani proteini surutke i kristali laktoze su, naravno, vidljivi, jer molekule tih supstanci ili mestimično formiraju grozdaste nakupine (koagulat proteina surutke) ili su pravilno raspoređene u obliku čvrstih kristala sastavljenih od velikog broja molekula.

Mleko

Poznato je da mleko lako stvara penu kada se leva ili mučka. Brooker (1985) je hemijski fiksirao strukturu pene mleka. Pronašao je da se razvila membrana (nabijena elektronima debljine oko 5 nm) na međupovršini tečnost—gas u mehurićima vazduha i da su stanice kazeinskih micela na nju vezane (Sl. 1). Budući da mehurići vazduha pucaju i pena se dezintegriše, ostaci mehurića (»bubble ghosts«) koji se sastoje od jedinog sloja micela kazeina vezanih na fragmente međuprostora zrak—serum mogu se naći u mleku. Vremenom micelle disociraju iz međuprostora zrak—serum i njihovi ostaci se mogu naći u mleku. Na osnovu HPLC Brooker pretpostavlja da se međupovršina sastoji od mešavine (smeše) globularnih proteina surutke i nekih rastvorljivih kazeina.

Jogurt

Kazein je jedan od najvažnijih konstituenata mleka na kome se bazira struktura mnogih mlečnih proizvoda zbog njegove sposobnosti da pod uticajem proteolitičkih enzima i/ili kiselina agregira u lance i grozdaste nakupine. Kazein se u mleku uglavnom nalazi u obliku micela, ali je prisutan, doduše u malim količinama, i u obliku submicela i kao rastvorljivi kazein.

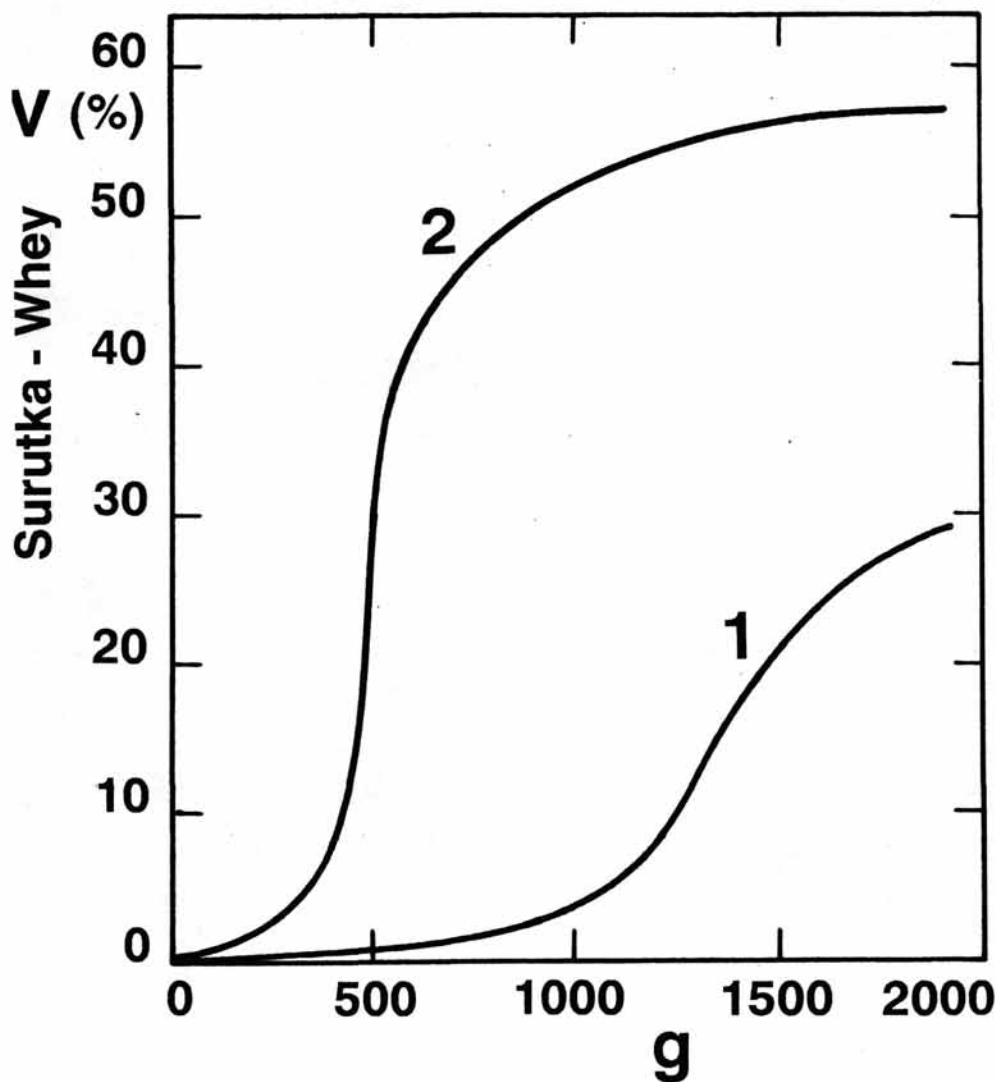
Nasuprot nezagrevanom mleku, u mleku zagrevanom do najmanje 85°C, kazeinske micelle imaju naboranu površinu (Sl. 4). Izmenjena topografija površine je rezultat nagomilavanja agregata proteina koji se sastoje od kazein- β -laktoglobulin kompleksa, nastalog kao posledica zagrevanja. Ovi agregati mogu imati različit izgled, zavisno od tehnike elektronske mikroskopije primenjene za njihovo vizualiziranje. Tanke sekcije agregata pokazuju »dlačice« ili »kukice« (Horwalkar i Vreeman, 1978), ali je analiza duplikata dobijenog smrzavanjem i prelamanjem kazeinskih micela pokazala agregate u obliku malih globularnih proteinskih čestica (Schmidt, 1982). Očigledna razlika u odnosu na nezagrevane kazeinske micelle ogleđa se u formiranju kratkih, međusobno povezanih lanaca zagrevanih kazeinskih micela (Sl. 5). Koagulat je uniformne strukture s manjim prazninama i znatno čvršće drži vodenu fazu u poređenju s koagulatom od nezagrevanog mleka. Zagrevano mleko se zbog toga koristi za proizvodnju jogurta.

Nasuprot nezagrevanom mleku, u mleku zagrevanom do najmanje 85°C, kazeinske micelle imaju naboranu površinu (Sl. 4). Izmenjena topografija površine je rezultat nagomilavanja agregata proteina koji se sastoje od kazein- β -laktoglobulin kompleksa, nastalog kao posledica zagrevanja. Ovi agregati mogu imati različit izgled, zavisno od tehnike elektronske mikroskopije primenjene za njihovo vizualiziranje. Tanke sekcije agregata pokazuju »dlačice« ili »kukice« (Horwalkar i Vreeman, 1978), ali je analiza duplikata dobijenog smrzavanjem i prelamanjem kazeinskih micela pokazala agregate u obliku malih globularnih proteinskih čestica (Schmidt, 1982). Očigledna razlika u odnosu na nezagrevane kazeinske micelle ogleđa se u formiranju kratkih, međusobno povezanih lanaca zagrevanih kazeinskih micela (Sl. 5). Koagulat je uniformne strukture s manjim prazninama i znatno čvršće drži vodenu fazu u poređenju s koagulatom od nezagrevanog mleka. Zagrevano mleko se zbog toga koristi za proizvodnju jogurta.

Čvrstina kojom se vodena faza drži u matriksu kazeinskih čestica može se izmeriti izlaganjem koagulata centrifugiranju pri malim brzinama (Harwalkar i Kaláb, 1986). Kazeinska matrica odoleva centrifugalnoj sili do određene vrednosti, a zatim počinje da se ruši, pri čemu se izdvaja surutka i njena zapremina se može meriti (Dijagram 1). Kako je količina proteina u kazeinskoj mreži povećana, dimenzije pora su smanjene, a izdvajanje surutke je smanjeno, tako da se centrifugiranjem ne može izdvojiti nikakva tečnost iz jogurta koji ima gustu proteinsku matricu (Sl. 6).

Povećanje vezivanja vode u proteinskoj matrici s ekonomskog aspekta mnogo je bolje postići primenom drugih načina, kao što su fortifikacija mleka korišćenjem koncentrata proteina surutke ili dodavanjem takozvanih »ugušćivača« (modifikovani skrob, različite gume (Kaláb et al., 1983), želatin ili pektin nego povećanjem ukupne suve materije gela. Prisustvo aditiva može, a ne mora, izmeniti strukturu matrice do mere da se razlika može uočiti elektronskom mikroskopijom. Prisustvo koncentrata proteina surutke u jo-

gurtu bitno menja strukturu (Modler i Kaláb, 1983). Proteini surutke inkorporiraju u lance kazeinskih čestica i sprečavaju međusobne direktne kontakte kazeinskih čestica (Sl. 7). Suprotno ovome, želatin ne pokazuje uticaj na



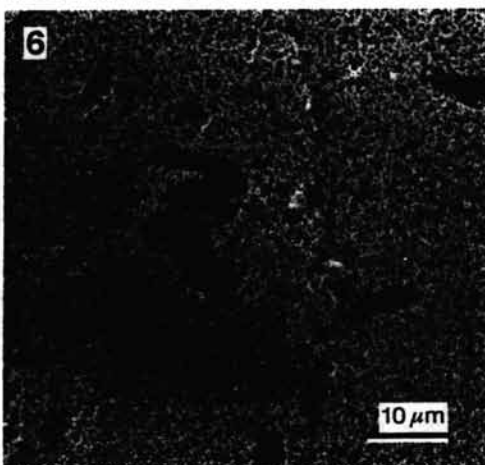
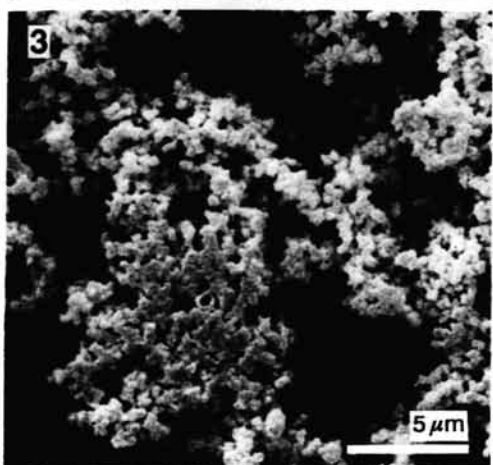
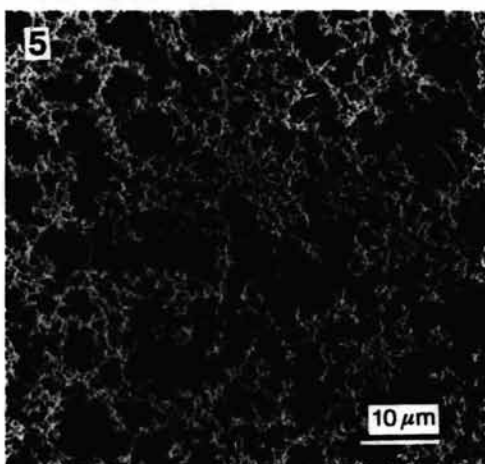
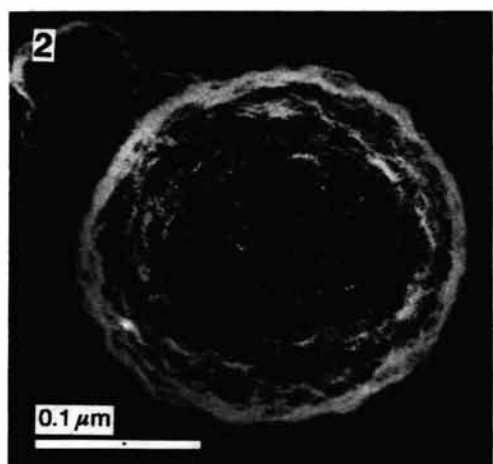
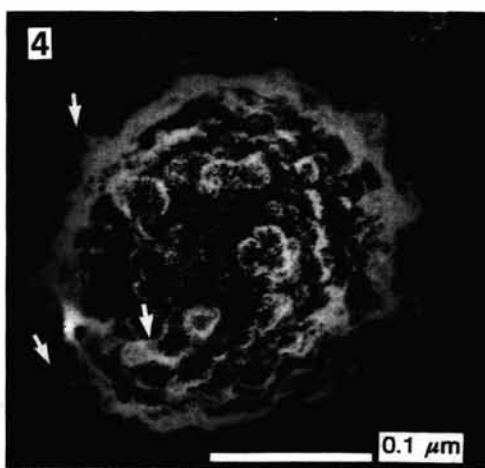
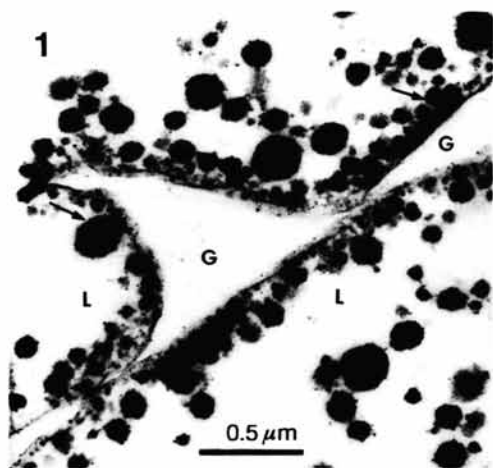
Centrifugalna sila - Centrifugal force

Dijagram 1. Centrifugiranje jogurta pri maloj brzini odvaja surutku od proteinske matrice, što ukazuje na osetljivost jogurta prema sinerezi.

Kriva 1 otporan (postojan) jogurt

Kriva 2: osetljiv jogurt

Diagram 1. Low-speed centrifugation of yoghurt separates whey from the protein matrix and thus reveals susceptibility of the yoghurt to syneresis. Curve 1 Resistant yoghurt; Curve 2: Susceptible yoghurt.



strukturu jogurta čak i u koncentraciji od 10%, kada želatinska konzistencija jogurta već pokazuje da je želatin prisutan.

Povećano vezivanje vode u matrici jogurta takođe se može postići primenom tzv. lepljivih bakterija ili bakterija koje proizvode sluz, kao što je ranije navedeno (Kaláb, 1986). Bakterijski polisaharidi, prisutni u sluzi, povećavaju viskozitet jogurta.

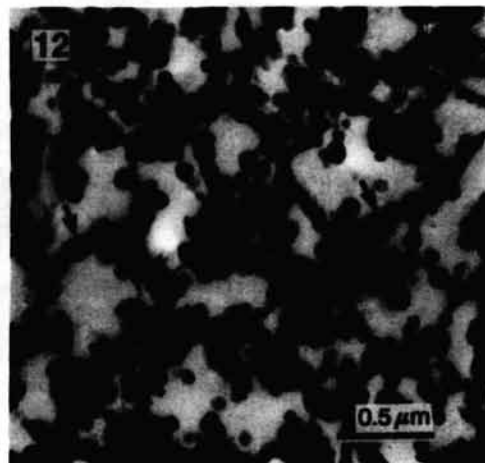
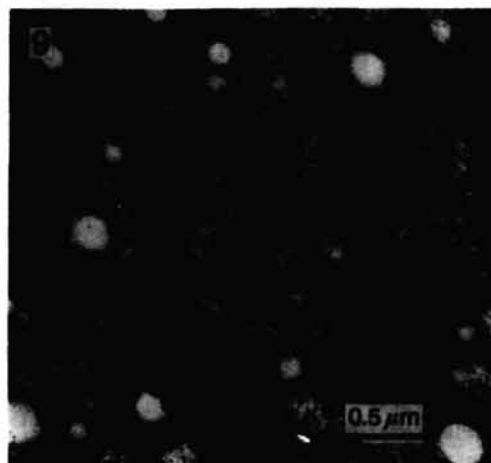
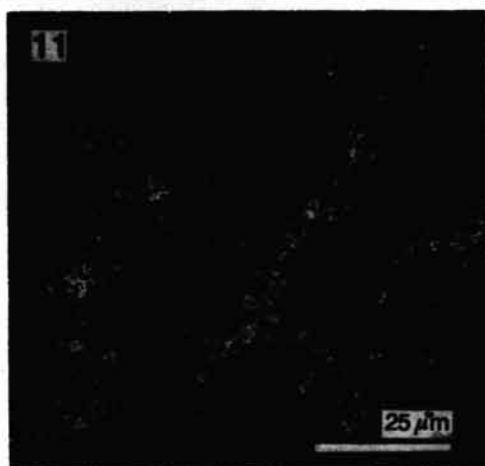
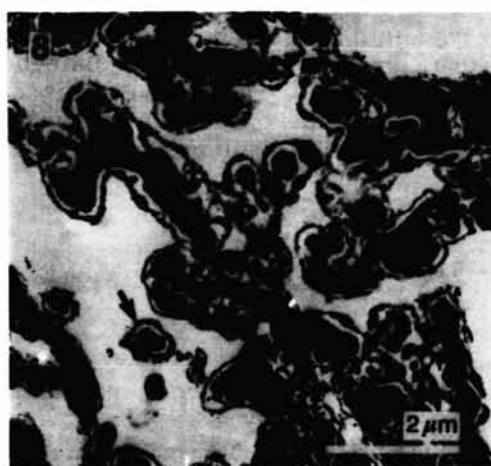
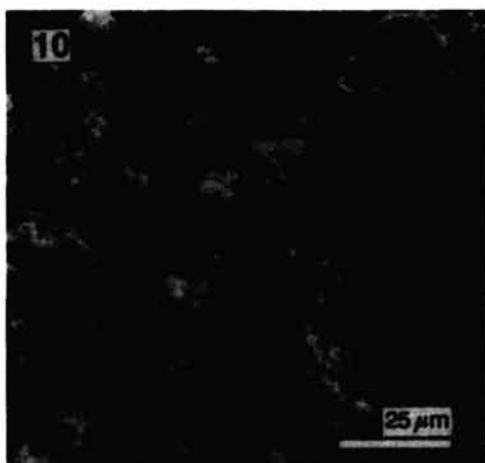
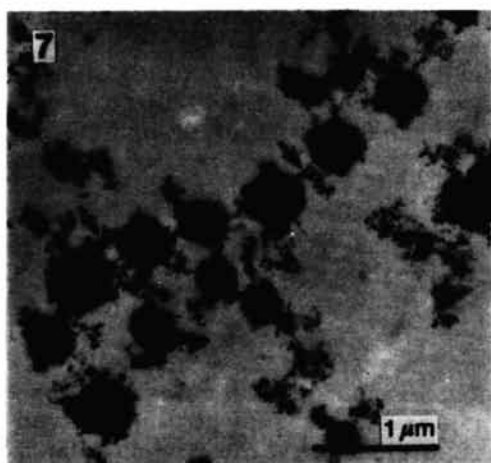
Sveži beli sir

Kazeinske čestice u gelu dobijenom kiselinskom koagulacijom mleka zagrevanog (najmanje 10 min/90°C) imaju »Core-and-shell« (ranije nazvanu »core-and-lining«) strukturu (Sl. 8), ako je krajnja pH vrednost gela blizu 5,5 (Harwalkar i Kaláb, 1981). Ova struktura je u pravilu nađena u svim komercijalnim mlečnim proizvodima proizvedenim koagulacijom toplog mleka uz primenu kiseline. Tipični primeri su južnoamerički bel sir »Queso Blanco«, severnoamerički beli sir — »White Cheese«, i indijski »Paneer«. »Panner« se pravi koagulacijom toplog mleka vinskom ili limunskom kiselinom, ispiranjem gruš vodom i formiranjem u obliku kolačića. Konzumira se ili svež ili

Legenda za slike — Legends to figures

(1—6)

- Sl. 1. Kazeinske micelle (male strelice) pripojene proteinskoj membrani na dodirnoj površini tečnost (L)-gas (G) jedne ćelije vazduha u peni mleka
- Fig. 1. Casein micelles (small arrows) attached to a proteinaceous membrane at the liquid (L)-gas (G) interface of an air cell in milk foam.
- Sl. 2. Kazeinske micelle u nezagrevanom mleku imaju glatku površinu (TEM).
- Fig. 2. Casein micelles in unheated milk have smooth surfaces (TEM).
- Sl. 3. Gruš proizveden od nezagrevanog mleka sadrži kazeinske čestice u obliku grozdastih nakupina (SEM).
- Fig. 3. Curd made from unheated milk consists of casein particle clusters (SEM).
- Sl. 4. Agregati proteina (strelice) su pripojeni kazeinskim micelama u zagrevanom mleku i čine njihovu površinu grubom (TEM).
- Fig. 4. Protein aggregates (arrows) are attached to casein micelles in heated milk and make their surfaces coarse (TEM).
- Sl. 5. Jogurt (10% ukupne suve materije) sastoji se od kazeinskih lanaca (SEM)
- Fig. 5. Yoghurt (10% of total solids) consists of casein particle chains (SEM).
- Sl. 6. Pri 20% ukupne suve materije proteinska matrica jogurta je gusta (SEM)
- Fig. 6. At 20% of total solids, the yoghurt protein matrix is dense (SEM).



pržen u ulju (Kaláb et al., 1989). »Paneer« se također pržen može kuvati u slanoj vodi. Elektronska mikroskopija je pokazala da je u svežem »Paneeru« proizvedenom od kravljeg mleka pravilno razvijena »jezgra i ljuska« (»core-and-shell«) struktura, dok je nešto drugačija u »Paneeru«, proizvedenom od mleka bivola. Prženje redukuje količinu vode u »Paneeru« i, u isto vreme, izaziva nastanak zbijenije strukture. Međutim, kuvanjem prženog »Pannera« vraća mu se prvobitna struktura.

Beli sir »White cheese« može da se proizvodi koagulacijom toplog mleka hlorovodoničnom ili limunskom kiselinom do pH blizu 5,5. U Severnoj Americi ovaj sir se takođe naziva »Ricotta« (dok se u Evropi »Ricotta« proizvodi od proteina surutke). Carić i Kaláb (1987) su utvrdili da je »core-and-shell« struktura u tom belom siru veoma stabilna i da se ne dezintegriše tokom topljenja sira, što omogućava otkrivanje belog sira kao komponente u topljenom siru (Sl. 9). Ovo je važno sa različitih aspekata: »White-cheese« je nezreo sir, te je njegova proizvodnja jeftinija od proizvodnje zrelog sira, koji se najčešće koristi u proizvodnji topljenog sira. Prirodna nezrelost belog sira menja druga svojstva topljenog sira u kome je »White cheese« komponenta (Kaláb et al., 1990).

Legenda za slike — Legends to figures

(7—12)

- Sl. 7. Proteini surutke (strelice) vezuju kazeinske čestice u jogurtu obogaćenom koncentracijom proteina surutke (TEM)
 Fig. 7. Whey proteins (arrows) link casein particles in a yoghurt fortified with a whey protein concentrate (TEM).
- Sl. 8. »Core-and-lining« struktura (strelica) kazeinskih čestica (TEM)
 Fig. 8. Core-and-lining structure (arrow) of casein particles (TEM).
- Sl. 9. Prisustvo »core-and-lining« strukture (strelica) ukazuje da je beli sir bio sastavni deo smeše topljenog sira (TEM)
 Fig. 9. Finding of the core-and-lining structure (arrow) in proces cheese indicates that White cheese was part of the proces cheese blend (TEM).
- Sl. 10. Kompaktne čestice koje uzrokuju pojavu zrnaste (peskovite) strukture (grittiness) u pasterezovanom sirnom namazu (SEM)
 Fig. 10. A compact particle which caused grittiness in a pasteurized cheese spread (SEM).
- Sl. 11. Zagrevanje mleka je rezultiralo u glatkom sirnom namazu, pakovanom »na toplo« (SEM)
 Fig. 11. Heating of milk resulted in a smooth hot-packed cheese spread (SEM).
- Sl. 12. Gel retentata ultrafiltriranog mleka proizveden sirilom, sastavljen od međusobno povezanih lanaca kazeinskih čestica (strelice) (TEM)
 Fig. 12. An ultrafiltration milk retentate gel made with rennet consisted of interconnected casein particle chains (arrows) (TEM).

Sirni namaz

Nezreli gruša se sve više upotrebljava kao ingredient u novoj grupi sirnih namaza (Kaláb i Modler, 1985a, 1985b). Homogenizacija smeše kiseline ili nezrelog gruša i punomasne pavlake daje glatku i mazivu emulziju, čija konzistencija zavisi od sadržaja vlage i masti. Za stabilizaciju proizvoda mogu se koristiti ugušćivači slični onima koji se koriste u proizvodnji jogurta. Eksperimentisanjem sa različitim recepturama (kombinacijama) može se dobiti grizast namaz (Modler et. al., 1989). Male čvrste čestice su nađene u namazu od gruša (sa kiselinom ili sirilom), proizvedenog od nezagrevanog mleka. I fluorescentna mikroskopija svežeg gruša, kao i »scanning electron« mikroskopija pokazale su da se čestice sastoje od kompaktnog-proteina (Sl. 10), a ne od kristala soli ili agregata stabilizatora, kako se pretpostavljalo. Ovaj nalaz je potvrđen primenom TEM na obojene tanke sekcije proizvoda postavljene u smolu. Pošto je poznato da kazeinska matrica od nezagrevanog mleka lako postaje kompaktna, ova greška je otklonjena zagrevanjem mleka namenjenog za proizvodnju namaza (na temperaturi od 90°C u trajanju od 10 minuta) pre koagulacije. Proteinska matrica, slična onoj jogurta, pokazala se otpornijom prema kompaktizaciji u odnosu na istu dobijenu od nezagrevanog mleka. Pasterizovani sirni namaz, pakovan »na toplo«, zadržao je glatku strukturu (Sl. 11).

Retentat ultrafiltriranog mleka

Ultrafiltracija znatno menja hemijski sastav mleka. Ultrafiltracijom se mleko razdvaja na visokomolekularnu frakciju koja se zadržava (retentat) i na niskomolekularnu frakciju (permeat) koja se koristi za druge namene (pekarstvo, stočna hrana ili kao izvor laktoze). Retentat sadrži veće koncentracije proteina i manje koncentracije laktoze. Količina proteina u retentatu može biti i do 50% suve materije, a ako je dodavana voda tokom ultrafiltracije (dijafiltracija), količina proteina se može povećati do 70% suve materije.

Uvođenje ultrafiltracije u preradu mleka i potreba da se pronade zame-na za skupi himozin primenom proteolitičkih enzima mikrobiološkog porekla, zahteva proučavanje uticaja koje ovaj razvoj može imati u proizvodnji sira i, konkretno, na kvalitet gruša.

Gavarić et al. (1989) su pokazali da kravlje sirilo i mikrobiološke proteaze izolovane iz *Mucor miehei* i *Mucor Pusillus* proizvode čvrste gruševе, što je ustanovljeno penetrometrom. Nalazi elektronskog mikroskopa bili su u bliskoj korelaciji sa penetrometrijskim nalazima: proteinska matrica čvrstog gruša je sadržala kratke ali robustne i razgranate kazeinske lance (Sl. 12), dok je u mekim gelovima, gdje je proizvela proteaza *Bacillus polymixa*, proteinska matrica bila formirana od malih nakupina kazeinskih micela, koje su samo u par tačaka imale vezu sa susednima (Sl. 13).

Razlike u čvrstini gruša od nehomogenizovanog i homogenizovanog mleka mogu se objasniti mikrostrukturom proteinskih matrica: Grozdaste nakupine masnih globula (kapljica) u mekšem grušu, proizvedenom od nehomogenizovanog mleka (Sl. 14) pre bi bile inkluzije nego strukturne komponente proteinske matrice. Homogenizacija je dezintegrirala globule masti u

veoma male čestice koje stupaju u interakciju sa proteinima retentata i postaju integralni deo matrice (Sl. 15). S obzirom da je ukupna količina suve materije u oba retentata bila ista, više čestica je bilo u homogenizovanom retentatu i, sledstveno tome, gruš je bio čvršći.

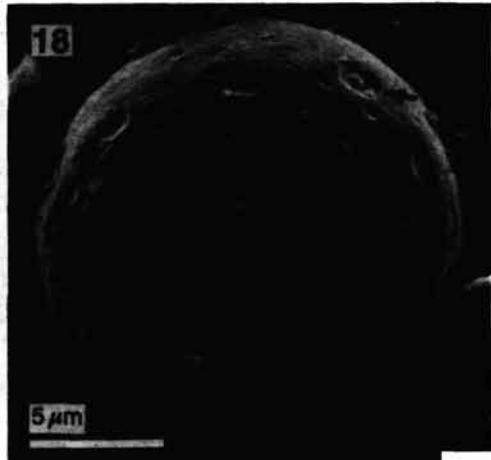
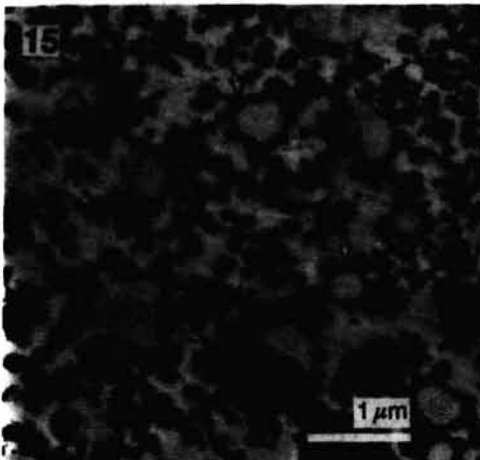
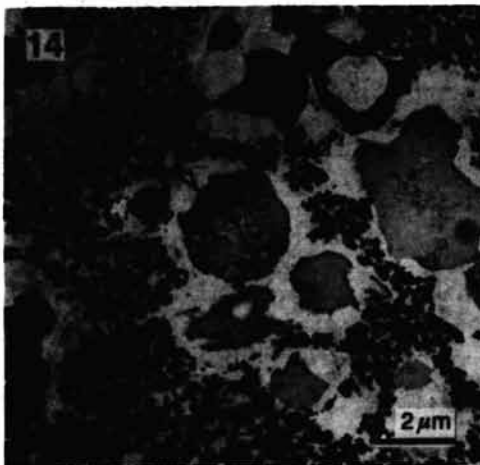
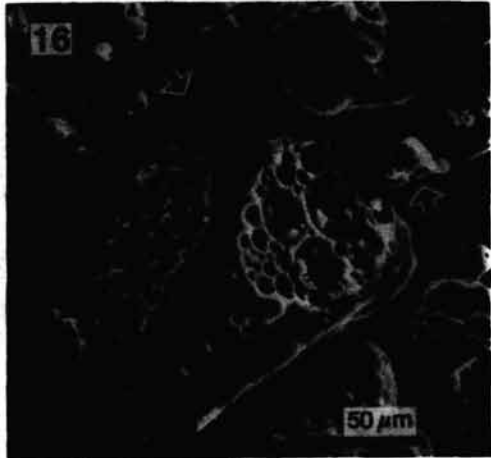
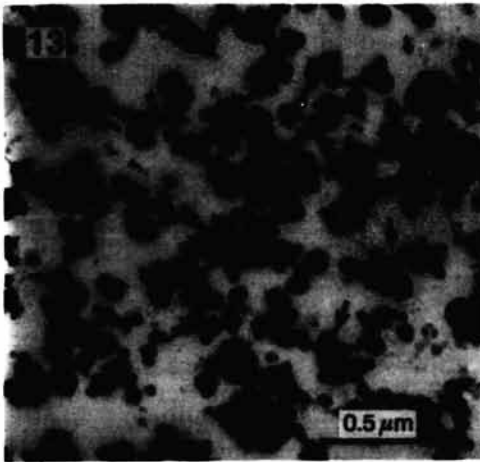
Sirevi

Mikroorganizmi su važan ingredient sira. Oni pomažu koagulisanje mleka i doprinose zrenju sira. Bakterije truljenja mogu inicirati formiranje kristala soli kalcijuma, delujući kao jezgra kristalizacije (Kaláb, 1980). Promena pH vrednosti autolizom mrtvih bakterija može biti faktor koji inicira taloženje soli. Brooker (1987) je otkrio da hife *Penicillium camemberti* funkcionišu kao »kalcijumova crpka«. Kalcijumove soli se pri niskoj pH vrednosti od oko 4,6 rastvaraju u mladom siru. Pošto površinska mikroflora stvara veću pH vrednost od oko 7,6, kalcijum fosfat iz kontinualne vodene faze počinje da se taloži. Talog troši rastvorljivi kalcijum fosfat u vodenoj fazi i izaziva stvaranje gradijenta pri čemu kalcijumove soli iz dubljih delova sira migriraju prema površini sira. Ovde, pri višoj pH vrednosti, one formiraju nerastvorljive kristale kalcijum fosfata koji se uvećavaju i proces se nastavlja. Primenom mikroanalize x-zracima, Brooker (1987) je dokazao da visoka koncentracija kalcijum fosfata na površini sira ne može biti pripisana sušenju površine, jer ne postoji odgovarajući porast koncentracije ostalih elemenata kao što je hlor.

Topljeni sir ponekad može biti prekomerno zagrevan tokom kontinualne proizvodnje i njegove fizičke osobine se mogu promeniti. Takav problem se javlja kada linije za pakovanje u automatizovanom procesu postanu preopterećene pa se topljeni sir mora duže zadržavati u zagrejanim cevovodima. Sir očvršćava i gubi sposobnost da se topi. Po njegovom odstranjivanju iz cevovoda, očvršli sir se seče i kao takozvani »rework« dodaje u svežu šaržu sira. Elektronska mikroskopija je pokazala da se u siru razvijaju mala osmofilna područja (Kaláb, et al., 1987) kao rezultat zagrevanja i označavanja »rework« sir. Njegovo prisustvo u topljenom siru se tako može otkrivati.

Mlečni proizvodi u prahu

Sušenje raspršivanjem postaje preovlađujući način konzervisanja mleka i drugih tečnih proizvoda kao što su surutka, mlaćenica, ili natrijum kazeinat namenjenih za kasniju upotrebu. Ovoj listi su nedavno pridodati retentati ultrafiltriranog mleka (Kaláb et al., 1989) i permeati ultrafiltriranog mleka (Sl. 16) (Carić et al., 1990). Čestice sušene raspršivanjem su globule dimenzija od nekoliko mikrometara do nekoliko desetina mikrometara. Njihove površine mogu biti karakteristično namreškane i veruje se da ove odlike reflektuju hemijski sastav proizvoda koji se suše (Buma i Henstra, 1971 a, 1971 b; Carić i Kaláb, 1987). Tehnika sušenja i način na koji se tečnost atomizira u raspršivaču, međutim, značajno doprinosi izgledu praha. Sudaranje kapljica, viskoziteta koji postepeno raste sa smanjenjem sadržaja vode u uređaju za sušenje, nesumljivo doprinosi oblikovanju čestica. Male kapi se suše i očvršćavaju brže od velikih. Otuda, male globule koje su vezane (priljubljenе) na površinu velikih čestica mlaćenice i okružene rubom verovatno su već čvrste



kada se sudaraju i smeštaju u veće, još uvek viskozne čestice. Udari rezultuju u formiranju ivica (Sl. 17). Na sličan način depresije (ulegnuća) nadene u retentatu sušenom raspršivanjem takođe su znakovi kolizije malih čvrstih kapljica sa većim česticama; u ovom slučaju, međutim, veće čestice više nisu bile viskozne, ali bile su još uvek meke. Očigledno, male kapljice odskoču i ostavljaju otiske kolizija u površinama velikih čestica (Sl. 18).

Retentati mleka, sušenog raspršivanjem, koji sadrže znatno manje laktoze (10—15%) u odnosu na obrano mleko, sušeno raspršivanjem (približno 40%) manje su osetljivi na rekristalizaciju laktoze kada se izlože uticaju vlažne atmosfere, što je utvrđeno primenom »scanning« elektronske mikroskopije (Kaláb et al., 1989), a takođe su manje osetljivi na stvaranje grudvi do čega može doći u mleku u prahu kada se ono skladišti u atmosferi velike vlažnosti u defektne spremnike.

Legenda za slike — Legends to figures

(13—18)

- Sl. 13. Retentat ultrafiltriranog mleka koagulisanog proteazom *B. polymixa* formira gruš koji se sastoji od grozdastih nakupina malih kazeinskih čestica (TEM)
 Fig. 13. An ultrafiltration milk retentate coagulated by *B. polymixa* protease formed a curd which consisted of small individual casein particle clusters (TEM).
- Sl. 14. Velike grozdaste nakupine masnih globula (strelica) su inkorporirane u gruš gela dobijenog od retentata nehomogenizovanog ultrafiltriranog mleka (TEM)
 Fig. 14. Large fat globule clusters (arrow) were incorporated in the curd made gel made from a nonhomogenized ultrafiltration milk retentate (TEM).
- Sl. 15. Male masne globule (strelice) su deo gruša proizvedenog od homogenizovanog retentata ultrafiltriranog mleka (TEM)
 Fig. 15. Minute fat globules (arrows) were part of the curd made from a homogenized ultrafiltration milk retentate (TEM).
- Sl. 16. Čestice permeata ultrafiltriranog mleka osušene raspršivanjem kristalnog su oblika (strelica) i ukazuju da je laktoza već kristalisala u permeatu pre sušenja raspršivanjem (spray-drying) (SEM)
 Fig. 16. The crystal-like shapes (arrows) of spray-dried particles of an ultrafiltration milk permeate indicate that lactose had already crystallized in the permeate before spray-drying (SEM).
- Sl. 17. Ivica (strelice) formirane oko malih globula pripojenih česticama mlaćenice sušene raspršivanjem (SEM)
 Fig. 17. Rims (arrows) formed around minute globular particles attached to spray-dried buttermilk particles (SEM).
- Sl. 18. Jamice u retentatu mleka sušenog raspršivanjem verovatno su znak kolizija (sudaranja) sa malim čvrstim česticama u »spray-dryer-u« (SEM)
 Fig. 18. Dimples (arrows) in spray-dried milk retentate are probably the marks of collisions with minute hard particles in the spray-dryer (SEM).

Buduća istraživanja

Skupljanje osnovnih podataka je za studije strukture hrane, slično kao i u drugim naučnim disciplinama, bilo esencijalno. Primenom različitih tehnika elektronske mikroskopije dobijene su mikrografije kazeinskih micela i masnih globula, proučavana je njihova ultrastruktura (Schmidt, 1982), mere su njihove dimenzije (Holt, 1985) u različitim uslovima, od onih u mlečnoj žljezdi (Rüegg i Blanc, 1982) do onih u probavnom traktu, gde se mlečni proizvodi vare (Nakai i Li Chan, 1987). Tokom rešavanja problema, nove studije obično stvaraju nove probleme. Usavršavanje instrumenata i razvoj novih tehnika omogućava naknadno proveravanje ranijih nalaza.

Jedan od najvažnijih noviteta je početak primene analize »digitalne slike« u mikroskopiji, sa ciljem da se mikroskopija postavi na kvantitativnu osnovu, tako da se može koristiti matematički metod za izražavanje dimenzija, distribucije i oblika svih strukturnih elemenata. Analiza »digitalne slike« može se primenjivati u rešavanju mnogih problema, npr. uticaj topivih soli na distribuciju čestica masti u topljenom siru, korelacija dimenzija čestica masti u topljenom siru i njegove čvrstoće, uticaj dimenzije kristala na senzorne osobine sladoleda, polimorfizam bakterija mlečne kiseline itd. Uspešna primena analize »digitalne slike« za ove svrhe zavisi od razvoja i dostupnosti odgovarajućeg »software« programa.

Spektrometrija energije, koja se raspršava, naročito u sprezi sa cryo-SEM, obezbediti će podatke o hemijskom sastavu mlečnih proizvoda koji se istražuju, odnosno o distribuciji kalcijuma i fosfora u topljenom siru i drugih elemenata u različitim proizvodima gde mogu biti deo hrane ili deo kontaminata, itd.

Zahvalnost

Autor zahvaljuje Mrs. Paula Allan-Wojtas i Miss Gisèle Larocque za pomoć kod elektronske mikroskopije, dr. H. Wayne Modleru za korisne sugestije, i prof. Jovanki Mičić za prevođenje rukopisa.

Instrumente je obezbedio Electron Microscope Unit, Research Branch, Agriculture Canada iz Ottawe. Prilog 858 Food Research Centre-a.

STRUCTURAL STUDIES OF DAIRY PRODUCTS: PRACTICAL ASPECTS

Summary

This review presents an overview of the most recent developments of application of electron microscopy and related techniques in dairy technology.

In addition to general aspects of investigations conducted in an electron microscope laboratory, special attention has been paid to development of structure, in milk products, like: yoghurt, unripened cheese, ripened cheese, cheese spread, ultrafiltered milk retentate and dried milk products.

Literatura

- BROOKER, E. B. (1985): Observations on the air-serum interface of milk foams. **Food Microstruc.** 4(2), 289—296.
- BROOKER, B. E. (1987): The crystallization of calcium phosphate on the surface of mould-ripened cheeses. **Food Microstruc.** 6(1), 25—33.
- BROOKER, B. E., WELLS, K. (1984) Preparation of dairy products for scanning electron microscopy: Etching of epoxy resin-embedded material. **J. Dairy Res.** 51, 605—613.
- BUCHHEIM, W. (1982): Aspects of sample preparation for freeze-fracture/freeze-etch studies of proteins and lipids in food systems. A review. **Food Microstruc.** 1(2), 189—208.
- BUMA, T. J., HENSTRA, S. (1971): Particle structure of spray-dried products as observed by a scanning electron microscope. **Neth. Milk Dairy J.** 25, 75—80.
- BUMA, T. J., HENSTRA, S. (1971): Particle structure of spray-dried caseinate and spray-dried lactose as observed by a scanning electron microscope. **Neth. Milk Dairy J.** 25, 278—281.
- CARIĆ, M., GANTAR, M., KALÁB, M. (1985): Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese — A review. **Food Microstruc.** 4(2), 297—312.
- CARIĆ, M., KALÁB, M. (1987): Processed cheese products. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 2. P. F. Fox (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London, 339—383.
- CARIĆ, M., KALÁB, M. (1987): Effects of drying techniques on milk powders quality and microstructure. A review. **Food Microstruc.** 6(2), 171—180.
- CARIĆ, M., MILANOVIĆ, S., KALÁB, M. (1990): Spray-dried permeates obtained from the ultrafiltration of milk. *Milchwissenschaft* (in press).
- GAVARIĆ, D. Đ., CARIĆ, M., KALÁB, M. (1989) Effects of protein concentration in ultrafiltration milk retentates and the type of protease used for coagulation on the microstructure of resulting gels. **Food Microstruc.** 8(1), 53—66.
- HARWALKAR, V. R., KALÁB, M. (1981): Effect of acidulants and temperature on microstructure, firmness and susceptibility to syneresis of skim milk gels. *Scanning Electron Microsc.* 1981(III), 503—513.
- HARWALKAR, V. R., KALÁB, M. (1986): Relationship between microstructure and susceptibility of syneresis in yoghurt made from reconstituted nonfat dry milk. **Food Microstruc.** 5(2), 287—294.
- HARWALKAR, V. R., VREEMAN, H. J. (1978): Effect of added phosphates and storage on changes in ultra-high temperature short-time sterilized concentrated skim milk. 2. Micelle structure. **Neth. Milk Dairy J.** 32, 204—216.
- HOLT, C. (1985): The size distribution of bovine casein micelles: A review. **Food Microstruc.** 4(1), 1—10.
- KALÁB, M. (1980): Decayed lactic bacteria — a possible source of crystallization nuclei in cheese. **J. Dairy Sci.** 63(2), 301—304.
- KALÁB, M. (1986): Mikrostruktura mlečnih proizvoda — Pregled. **Mljekarstvo** 36(12), 355—370.

- KALÁB, M., CARIĆ, M., ZAHER, M., HARWALKAR, V. R. (1989): Composition and some properties of spray-dried retentates obtained by the ultrafiltration of milk. *Food Microstruc.* 8(2), 225—233.
- KALÁB, M., GUPTA, S. K., DESAI, H. K., PATIL, G. R. (1988): Development of microstructure in raw, fried, and fried and cooked Paneer made from buffalo, cow, and mixed milks. *Food Microstruc.* 7(1), 83—91.
- KALÁB, M., MODLER, H. W. (1985a): Milk gel structure. XV. Electron microscopy of whey protein-based cream cheese spread. *Milchwissenschaft* 40(4), 193—196.
- KALÁB, M., MODLER, H. W. (1985b): Development of microstructure in a cream cheese based on Queso Blanco cheese. *Food Microstruc.* 4(1), 89—98.
- KALÁB, M., MODLER, H. W., CARIĆ, M., MILANOVIĆ, S. (1990): Electron microscopic detection of White cheese as an ingredient present in process cheese. *Food Struct.* 9(3) (in press).
- KALÁB, M., YUN, J., YUN, S. H. (1987): Textural properties and microstructure of process cheese food rework. *Food Microstruc.* 6(1), 181—192.
- MODLER, H. W., KALÁB, M. (1983): Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 430—437.
- MODLER, H. W., YIU, S. H., BOLLINGER, U. K., KALÁB, M. (1989): Grittiness in a pasteurized cheese spread: A microscopic study. *Food Microstruc.* 8(2), 201—210.
- NAKAI, S., LI-CHAN, E. (1987): Effect of clotting in stomachs of infants on protein digestibility of milk. *Food Microstruc.* 6(2), 161—170.
- RÜEGG, M., BLANC, B. (1982): Structure and properties of particulate constituents in human milk. A review. *Food Microstruc.* 1(1), 25—47.
- SCHMIDT, D. G. (1982): Electron microscopy of milk and milk products: Problems and possibilities. *Food Microstruc.* 1(2), 151—165.