

Utjecaj mikrobne kulture na koncentraciju ukupnih slobodnih aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira

Biljana Radeljević¹, Nataša Mikulec^{1*}, Neven Antunac¹, Zvonimir Prpić²,
Mirjana Maletić¹, Jasmina Havranek¹

¹Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za mljekarstvo, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za specijalno stočarstvo, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Received - Prispjelo: 10.01.2013.
Accepted - Prihvaćeno: 15.02.2013.

Sažetak

Cilj rada bio je odrediti utjecaj dodatka mikrobne (komercijalne, starter) kulture na koncentraciju ukupnih slobodnih amino skupina (aminokiselina) u sirevima u različitim fazama zrenja. Slobodne amino skupine određivane su reakcijom s ninhidrinom uz kadmij (Cd) u vodenom ekstraktu sira, te su izražene kao koncentracija leucina u suhoj tvari sira. Praćene su promjene koncentracije ukupnih slobodnih aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira (0., 30., 60., 90. i 120. dan). U vodenim ekstraktima sira u svim fazama zrenja detektirano je prisustvo slobodnih NH₂ skupina, odnosno amina, aminokiselina i manjih peptida, čija se koncentracija značajno ($P < 0,01$) povećavala tijekom zrenja. U sirevima proizvedenim sa i bez dodatka mikrobne kulture utvrđene su značajne razlike ($P < 0,01$) u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina 90. i 120. dana. Kadmij-ninhidriinska metoda se pokazala prikladnom za praćenje tijeka zrenja Krčkog sira, kao i za utvrđivanje razlika u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina zrelih sireva ovisno o tehnološkom procesu proizvodnje.

Ključne riječi: Krčki ovčji sir, zrenje sira, slobodne aminokiseline, mikrobne kulture

Uvod

Glavno obilježje tradicionalnih sireva je uporaba sirovog, odnosno termički neobrađenog mlijeka za sirenje. Mlijeko kao sirovina utječe na specifičnost (autohtonost) sireva ponajprije zbog bakterija mliječno kisele fermentacije prirodno prisutnih u sirovom mlijeku, koje doprinose karakterističnom i prepoznatljivom okusu, mirisu i konzistenciji određenog sira. Krčki sir je tradicionalni hrvatski otočki sir, proizveden od sirovog ovčjeg mlijeka. Pripada skupini tvrdih, punomasnih sireva (slike 1 i 2). Optimalno trajanje zrenja Krčkog sira je 90 dana (Antunac i sur., 2008). Karakteristike zrelog Krčkog sira su: promjer 11,5-15 cm; visina 4,5-6 cm; boja sira varira od svijetlo žute do zlatne, dok je na prerezu vidljiv mali broj nepravilno raspoređenih sirnih očica (slika 3).

Mikrobne kulture koriste se u proizvodnji sira s unutarnjim bakterijskim zrenjem uglavnom kada se mlijeko termički obrađuje. Primarna uloga mikrobne kulture je acidifikacija gruš u sirarskom kotlu/kadi i postizanje konačne pH vrijednosti, a sekundarna uloga očituje se tijekom zrenja, posebice tijekom proteolize kao važnog čimbenika u razvoju okusa sira. Ardö (1997; 2006) navodi da se dodatkom bakterija vrste *Lactobacillus helveticus* u nemasne sireve mogu spriječiti pogreške okusa i mirisa, jer iste utječu na formiranje veće količine slobodnih aminokiselina.

Na tijek proteolize važnu ulogu ima mikroflora sirovog mlijeka, aktivacija plazminogena u plazmin, tehnološki proces proizvodnje, tip mikrobne kulture, uvjeti u zrionici te trajanje zrenja. Na veći stupanj proteolize sira utječe viša temperatura zrenja, veća količina zadržanog sirila u tijestu sira, veća količina i

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 2393 904; e-mail: nmikulec@agr.hr



Slika 1. Krčki sir



Slika 2. Zrenje Krčkog sira

aktivnost vode u siru, manji udio soli i povoljna pH vrijednost sirne mase (Kalit i sur., 2005).

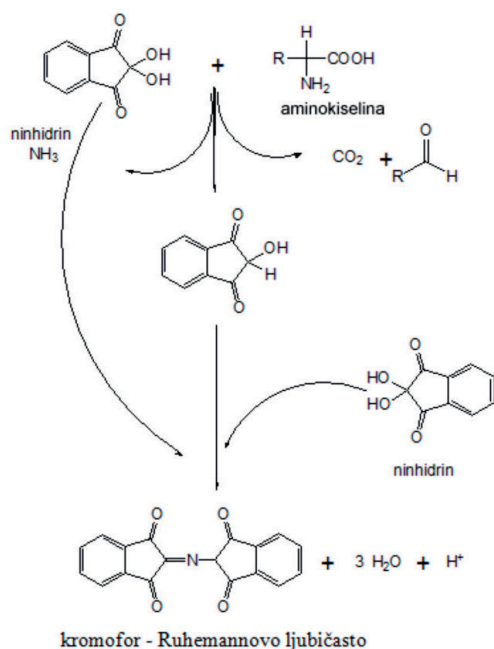
Enzimi koji sudjeluju u odvijanju proteolitičkih procesa potječu iz različitih izvora i to: zaostali enzimi pripravaka za sirenje (kimozin, pepsin ili mikrobnе proteinaze), enzimi mlijeka (plazmin, lipoproteinske lipaze, kisela fosfataza, ksantin oksidaza), enzimi sekundarne kulture (bakterije propionske kiseline, sojevi *Bacterium linens*, plemenite plijesni), prirodne bakterije mlijeka i bakterija nestarterske mikroflore. Nestarterske bakterije imaju posebnu važnost u sirevima proizvedenim od sirovog mlijeka, jer svojom proteolitičkom aktivnošću zamjenjuju aktivnost startera, proizvodeći aminokiseline i peptide mole-

kulskih masa sličnim onima koji nastaju djelovanjem startera (Mikulec i sur., 2010). U poodmakloj fazi zrenja odvijaju se sekundarne transformacije nastalih produkata razgradnje: dezaminacija, dekarboksilacija i desulfurizacija aminokiseline, beta oksidacija masnih kiselina i esterifikacija (Tratnik, 1998).

Proteolitičke promjene imaju presudnu ulogu u formiranju arome sira, jer količina i omjeri pojedinih aminokiseline i topljivih peptida utječu na teksturu i organoleptička svojstva sira (Aston i Dulley, 1982; Kristoffersen, 1985; Law, 1987). Poznato je da je okus sira koncentriran u frakciji topljivoj u vodi (peptidi, aminokiseline, organske kiseline i amini), dok je aroma uglavnom koncentrirana u



Slika 3. Prerez zrelog Krčkog sira



Slika 4. Reakcija ninhidrina s aminokiselinama (uzeto iz: Mikulec, 2010)

hlapljivoj frakciji: organske kiseline, aldehidi, amini i esteri (Mikulec i sur., 2010).

Odstupanja od standardnog postupka proizvodnje utječu na mjerljive sastojke u siru kao što su: sadržaj vode, soli, ukupni i topljivi dušikovi spojevi te pH vrijednost (Mikulec, 2010). Uz standardnu metodu po Kjeldahlu za određivanje ukupnog dušika i topljivog dušika, kao mjera proteolize i promjena sadržaja peptida i aminokiselina u siru koriste se metode za određivanje slobodnih amino skupina trinitrobenzensulfonskom kiselinom, *o*-ftaldialdehidom ili ninhidrinom u tvarima topljivim u vodi, sulfosalicilnoj, fosfovolframskoj, trikloroctenoj kiselini i etanolu (McSweeney i Fox, 1999). Reakcijom ninhidrina (2,2-dihidroksiindan-1,3-dion) koji je izvorno žute boje sa slobodnim aminokiselinama nastaje tamno plava ili ljubičasta boja poznata kao Ruhemanovo ljubičasto, što se koristi za dokazivanje prisustva postojanja primarnih i sekundarnih amina. Mehanizam reakcija prikazan je na slici 4.

Cilj ovog rada bio je utvrditi koncentraciju ukupnih slobodnih aminokiselina u Krčkom siru proizvedenom sa i bez dodatka mikrobne kulture u

različitim fazama zrenja, te utvrditi prikladnost Cd - ninhidrinske metode za praćenje tijekom zrenja sira.

Materijal i metode

Za potrebe istraživanja, proizvedeno je po pet serija (šarži) Krčkog sira sa i bez dodatka mikrobne kulture. Od 100 L mlijeka namijenjenog sirenju, 50 L mlijeka je podsireno uz dodatak mikrobne kulture, a 50 L bez dodatka mikrobne kulture. Istraživanje je provedeno tijekom jedne laktacije krčkih ovaca, na jednom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu s otoka Krka sukladno ranije opisanoj proceduri (Pavlinić i sur., 2010). Starter kultura sastojala se od *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* i *Lactobacillus helveticus* (EZAL KAZU 300, Sassenage, Francuska). Šarža predstavlja dnevnu proizvodnju sira unutar koje je proizvedeno po 3 sira s dodatkom mikrobne kulture i 3 sira bez dodatka mikrobne kulture. Zrenje sireva se odvijalo u zrionici s prosječnom temperaturom zraka od 15 °C-18 °C i relativnom vlažnosti zraka od 70-80 %. Uzorkovanje sira provedeno je prema postupku Licitra i sur. (2000). Uzorci su uzimani 0., 30., 60., 90. i 120. dana zrenja, nakon čega su pohranjeni u zamrzivač pri temperaturi od -80 °C do laboratorijske analize. Za uzimanje uzoraka sira korišteno je sirsarsko svrdlo dužine 13 cm. Nakon uzimanja uzorka, dio uzorka odrezan uz koru u dužini od 1 cm vraćen je kao čep na otvor sira i zatvoren voskom (slika 5), a sir je vraćen u zrionicu na daljnje zrenje.



Slika 5. Uzimanje uzorka sira

Određivanje slobodnih amino skupina

Vodeni ekstrakti sira pripremljeni su prema proceduri opisanoj u radu Mayer i sur. (1998). Slobodne amino skupine aminokiselina određivane su reakcijom s ninhidrinom uz kadmij u vodenom ekstraktu sira prema Folkertsma i Fox (1992). Uzorak (50 μ L) vodenog ekstrakta razrijeđen je do 1 mL s destiliranom vodom. Na razrijeđeni uzorak dodano je 2 mL Cd-ninhidrin reagensa. Reagens se sastojao od 0,8 g ninhidrina otopljenog u smjesi od 80 mL 99,5 % etanola i 10 mL octene kiseline, kojem je dodan 1 g CdCl₂ otopljen u 1 mL destilirane vode. Smjesa (uzorak + reagens) je zagrijana do temperature od 84 °C u trajanju od 5 minuta, a nakon hlađenja do sobne temperature mjerena je apsorpcija svjetla valne duljine 507 nm. Slijepa proba (1 mL vode + 2 mL reagensa) mjerena je na isti način. Za baždarni pravac korištena je 2 mM početna otopina leucina, od koje su napravljena razrjeđenja (0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,3; 0,5 i 1 mM Leu). Rezultati su izraženi kao g Leu u 100 g suhe tvari sira. Ukupno je analizirano 150 vodenih ekstrakata sira (75 ekstrakata sira proizvedenih s dodanom mikrobnom kulturom i 75 ekstrakata sira proizvedenih bez dodatka mikrobnog kulture). Analize sira provedene su u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

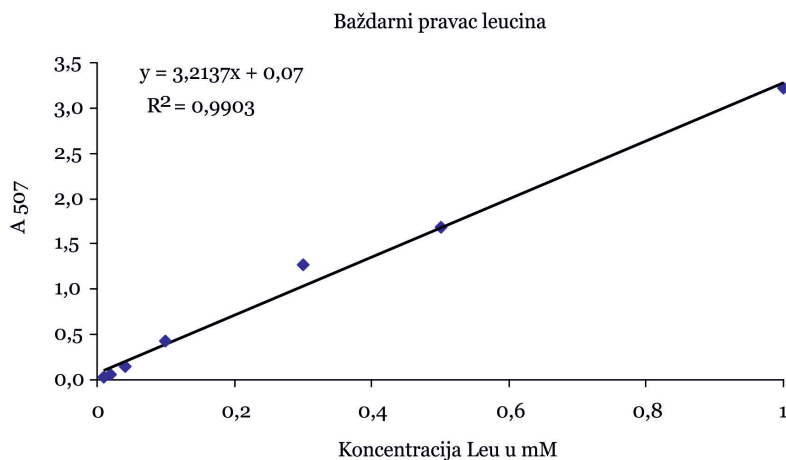
Statistička obrada podataka

Promjene koncentracija ukupnih slobodnih aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira statistički su analizirane Tukey-Kramer testom, u statističkom paketu SAS (1999). U programskom paketu Microsoft Office Excel (2007) izračunate su: srednje vrijednosti (\bar{x}), standardne devijacije (SD) i standardne greške (SE) za sireve proizvedene sa i bez dodatka mikrobnog kulture 0., 30., 60., 90., i 120. dana zrenja deskriptivnom analizom.

Rezultati i rasprava

Hidrolizom peptidnog veza proteina/peptida nastaju amino skupine, pa njihovo određivanje može dati uvid u napredovanje proteolize tijekom zrenja, posebice oslobađanje aminokiselina i malih peptida (Muehlenkamp-Ulate i Warthesen, 1999; Mikulec, 2010). Baždarni pravac dobiven je na temelju ovisnosti koncentracije leucina i apsorpcije svjetla valne duljine 507 nm, a jednadžba pravca i koeficijent determinacije (R^2) prikazani su na grafikonu 1.

Tijekom zrenja Krčkog sira povećavala se koncentracija ukupnih slobodnih aminokiselina, neovisno jesu li sirevi proizvedeni sa ili bez dodatka mikrobnog kulture (tablica 1; grafikon 2). Dušične tvari topljive u vodi, u koje se ubrajaju i slobodne aminokiseline, najčešće nastaju djelovanjem sirila, starter kulture, te manjim dijelom peptidaza iz mlijeka (Kalit i sur.,



Grafikon 1. Ovisnost koncentracije leucina i apsorpcije svjetla valne duljine 507 nm

Tablica 1. Prosječne koncentracije ukupnih slobodnih aminokiselina izraženih kao g Leu u 100 g suhe tvari sira u različitim fazama zrenja Krčkog sira

| Statistički pokazatelj | Dani zrenja | Sirevi bez mikrobne kulture | Sirevi sa mikrobnom kulturom |
|------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|
| $\bar{x} \pm SE$ | 0. | 0,22 ^a ± 0,01 | 0,28 ^a ± 0,01 |
| | 30. | 1,48 ^b ± 0,05 | 1,29 ^b ± 0,04 |
| | 60. | 2,34 ^c ± 0,06 | 1,99 ^c ± 0,08 |
| | 90. | 3,07 ^d ± 0,06 | 2,62 ^e ± 0,04 |
| | 120. | 3,28 ^d ± 0,05 | 2,81 ^e ± 0,05 |

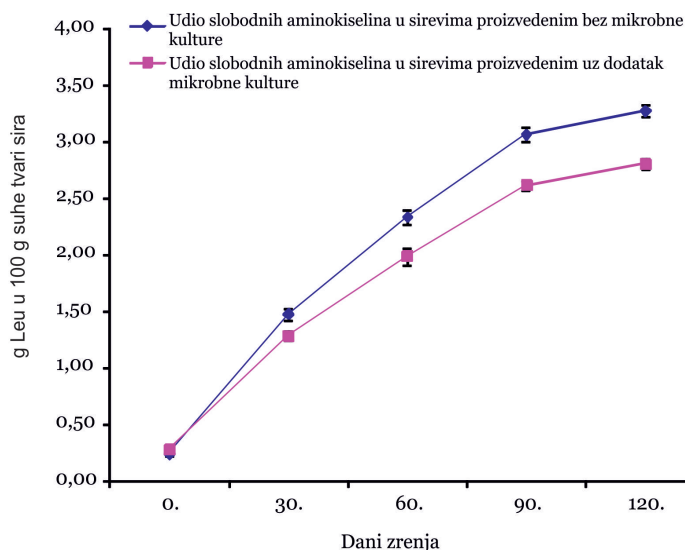
\bar{x} predstavlja prosječnu koncentraciju ukupnih slobodnih aminokiselina izraženih kao g Leu u 100 g suhe tvari sira. Rezultati izražavaju srednju vrijednost sa standardnom greškom ($\bar{x} \pm S.E.$) od 15 sireva u različitim fazama zrenja. ^{a,b,c,d,e} srednje vrijednosti u istom redu i koloni tablice s različitim oznakama su značajno različite ($P < 0,05$)

2005). Posljedično, tijekom zrenja Krčkog sira koncentracija ukupnih slobodnih aminokiselina značajno ($P < 0,01$) se povećavala, te je u 120. danu u prosjeku iznosila 3,28 g u 100 g suhe tvari sira s dodatkom mljekarske kulture, odnosno 2,81 g u 100 g suhe tvari sira bez dodatka mljekarske kulture.

Koncentracija ukupnih slobodnih aminokiselina 0.-og dana bila je neznatno ($P > 0,05$) viša u sirevima proizvedenim s dodatkom mikrobne kulture. Poznato je da bakterije startera dominiraju na početku tehnološkog procesa proizvodnje, i od početnih 10^5 - 10^7 cfu mL⁻¹ (eng. Colony Forming Units - cfu), brzo postižu 10^9 cfu mL⁻¹ (Cogan, 2002), ali najveći broj ih odumire u procesu soljenja, dok se broj nestarter-skih bakterija (eng. Non-Starter Lactic Acid Bacteria - NSLAB) povećava tijekom zrenja i dominira na

kraju tehnološkog procesa proizvodnje sira (Hickey i sur., 2007). U odnosu na ukupnu količinu slobodnih aminokiselina utvrđenih u 120.-om danu zrenja Krčkog sira, najveći porast vidljiv je u prvih 30 dana zrenja. Tako se koncentracija do 30. dana povećava za 45,12 % od ukupne količine aminokiselina u zrelih sirevima proizvedenim bez dodatka startera, odnosno za 45,91 % u sirevima proizvedenim sa starterom (120. dana). Isto su zaključili Freitas i sur. (1997) primjenom Cd-ninhidriinske metode za praćenje proteolize sira Picante, te Pavia i sur. (2000) za sir Manchego.

U prvih 30 dana zrenja u Krčkom siru dolazi do naglog povećanja frakcija kazeina (CN) α_{s1} -I-CN i α_{s1} -II-CN djelovanjem kimoza, nakon čega dolazi do njihove hidrolize u manje peptide (Mikulec i



Grafikon 2. Promjene koncentracije ukupnih slobodnih aminokiselina u različitim fazama zrenja Krčkog sira

sur., 2008). Elektroforetskom tehnikom isti autori su utvrdili da djelovanjem plazmina dolazi do razgradnje β -CN te kao glavni razgradni produkti nastaju manji γ -CN, koji su vidljivi na gelu tek nakon 30. dana zrenja. To potvrđuje činjenicu da tijekom proteolize dolazi do nastajanja slobodnih aminokiselina, najvećim dijelom zbog intenzivne aktivnosti kimozi koja je najizraženija u prva tri tjedna zrenja. Budući da primarna proteoliza Krčkog sira završava nakon 30-og dana zrenja, daljnje proteolitičke promjene znatno su sporije.

Sekundarna proteoliza uzrokovana je aktivnošću proteinaza i peptidaza bakterija mliječne kiseline i nestarterskih bakterija (Sousa i sur., 2001). U uzorcima Krčkog sira proizvedenog bez dodatka mikrobnog kulture, proteolitičke promjene u prvih 60 dana su bile intenzivnije u odnosu na sireve proizvedene s dodatkom mikrobnog kulture, iako nisu utvrđene statistički značajne razlike. Na smanjenje proteolitičke aktivnosti kimozi nakon 60. dana, mogao je utjecati smanjeni udio vode u siru (Grappin i sur., 1985).

Proteolitičke promjene tijekom zrenja Krčkog sira proizvedenog sa i bez mikrobnog kulture, praćene su i kromatografskom (HPLC) tehnikom (Pavlinić i sur., 2010). Navedenim istraživanjem utvrđene su značajne razlike u koncentraciji ukupnih peptida/aminokiselina tijekom zrenja za obje skupine sireva, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

U prvih 60 dana zrenja Krčkog sira nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$) u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina s obzirom na način proizvodnje. Međutim, utvrđene su statistički značajne razlike ($P < 0,01$) u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina između 90. i 120. dana zrenja, ovisno o korištenju ili ne korištenju mikrobnog kulture. Značajne razlike u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina mogu biti uzrokovane većom količinom NSLAB-a koje prevladavaju na kraju zrenja sireva (Hickey i sur., 2007). Budući da između 90. i 120. dana zrenja nisu utvrđene značajne promjene u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina u obje skupine sireva, može se zaključiti da je optimalno trajanje zrenja Krčkog sira 90 dana, što je u skladu s prethodnim istraživanjima Antunac i sur. (2008) i Mikulec i sur. (2010). Iz navedenog se može zaključiti da u proizvodnji Krčkog sira nema potrebe za korištenjem mikrobnog kulture ukoliko zrenje sira traje 90 ili više dana.

S obzirom na dobivene rezultate, koji su u skladu s Folkertsma i Fox (1992), Freitas i sur. (1997) te Pavia i sur. (2000), može se zaključiti da je Cd-ninhidriinska metoda pogodna za praćenja tijekom zrenja sira, te da se istom mogu utvrditi statistički značajne razlike u zrelih sirevima s obzirom na razlike u tehnološkom procesu proizvodnje. Pavia i sur. (2000) također su zaključili da se ova metoda može koristiti za određivanje stupnja zrelosti sira Manchego, te kao takva zamijeniti metodu po Kjeldahlu. Cd-ninhidriinska metoda pokazala se pogodnom za utvrđivanje stupnja zrelosti Krčkog sira. Određivanjem sastava peptida različitih duljina, te kataboličkim produktima razgradnje aminokiselina, zajedno s dobivenim rezultatima, mogli bi se predložiti detaljniji kriteriji za razlikovanje Krčkog sira od ostalih sličnih tradicionalnih sireva.

Zaključak

Kadmij-ninhidriinska metoda za utvrđivanje koncentracije ukupnih slobodnih aminokiselina pokazala se učinkovitom za praćenje tijekom zrenja Krčkog sira, te za utvrđivanje razlika u koncentraciji ukupnih slobodnih aminokiselina u zreлом siru. Rezultati su sukladni s rezultatima sličnih istraživanja, pa se ova metoda može primijeniti i za praćenje zrenja ostalih sireva.

Influence of starter culture on total free amino acids concentration during ripening of Krk cheese

Summary

The aim of this study was to determine the influence of microbial (commercial starter) culture on concentration of total free amino groups (amino acids) in cheeses in different ripening stages. Free amino groups were determined by reaction with ninhydrin with cadmium (Cd) in the water soluble cheese extract, and were expressed as the concentration of leucine in cheese dry matter. Changes in concentration of total free amino acids during cheese ripening (0th, 30th, 60th, 90th and 120th day) were monitored. In water soluble extracts of cheese, the presence of free NH_2 groups in all ripening stages was detected, which means smaller peptides and amino acids, whose concentration significantly

($P < 0.01$) increased during ripening. Cheeses produced with and without microbial culture resulted in statistically significant differences ($P < 0.01$) in content amino acids free on the 90th and 120th day of ripening. Cd - ninhydrin method was found to be suitable for cheese ripening monitoring, as well as for determination of the differences in mature characteristics of cheeses, depending on the production process.

Key words: ewe cheese from the island of Krk, cheese ripening, total free amino acids, microbial culture

Zahvala

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstvenog projekta naslova "Elementi ekološke proizvodnje i analitičke metode za dokazivanje izvornosti sira" financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH (šifra projekta: 178-1782128-2127).

Literatura

1. Antunac, N., Mikulec, N., Bendelja, D., Prpić, Z., Barać, Z. (2008): Karakterizacija i istraživanje kvalitete mlijeka u proizvodnji krčkog sira. *Mljekarstvo* 58 (3), 203-222.
2. Ardö, Y. (1997): Flavour and texture in low-fat cheese. U: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. B.A. Law (Ed.), Chapman and Hall, London, 207-218.
3. Ardö, Y. (2006): Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24, 238-242.
4. Aston, J.W., Dulley, J.R. (1982): Cheddar cheese flavour. *Australian Journal of Dairy Technology* 37, 59-64.
5. Cogan, T.M. (2002): Microbiology of cheese. U: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.), Vol. 1, Academic Press, London, 306-314.
6. Freitas, A.C., Fresno, J., Prieto, M.B., Malcata, F.X., Carballo, J. (1997): Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* 60, 219-229.
7. Folkertsma, B., Fox, P.F. (1992): Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research* 59, 217-224.
8. Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F. (1985): Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science* 68, 531-640.
9. Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Sheehan, E.M. (2007): Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 74, 9-17.
10. Kalit, S., Havranek, J., Kaps, M., Perko, B., Cubric Curik, V. (2005): Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *International Dairy Journal* 15, 619-624.
11. Kristoffersen, T. (1985): Development of flavour in cheese. *Milchwissenschaft* 40, 197-199.
12. Law, B.A. (1987): Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. U: *Cheese: Chemistry, Physics and microbiology*. Vol 1, Ur. P.F. Fox, Elsevier Applied Science, London, 365-392.
13. Licitra, G., Campo, P., Manenti, M., Portelli, G., Scuderi, S., Carpino, S., Barbano, D.M., (2000): Composition of Ragusano cheese during aging. *Journal of Dairy Science* 83, 404-411.
14. Mayer, H., Rockenbauer, C., Mlcak, H. (1998): Evaluation of proteolysis in Parmesan cheese using electrophoresis and HPLC. *Lait* 78, 425-438.
15. McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1999): Methods of Chemical Analysis. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. P.F. Fox (Ed.), Vol. 1: General Aspects, An Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 341-388.
16. Mikulec, N., Kalit, S., Havranek, J., Antunac, N., Horvat, I., Prpić, Z. (2008): Characteristics of traditional Croatian ewe's cheese from the island of Krk. *International Journal of Dairy Technology* 61 (2), 126-132.
17. Mikulec, N. (2010): Promjene sadržaja topljivih peptida i aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Zagreb.
18. Mikulec, N., Habuš, I., Antunac, N., Vitale, Lj., Havranek, J. (2010): Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira. *Mljekarstvo* 60 (4), 219-227.
19. Muehlenkamp-Ulate, M.R., Warthesen, J.J. (1999): Evaluation of several nonstarter lactobacilli for their influence of Cheddar cheese slurry proteolysis. *Journal of Dairy Science* 82, 1370-1378.
20. Pavia, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., Ferragut, V. (2000): Proteolysis in Manchego - type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal of Dairy Science* 83, 1441-1447.
21. Pavlinić, I., Mikulec, N., Kalit, S., Jakaša, I., Havranek, J., Tudor, M., Antunac, N. (2010): Influence of starter culture on peptide profiles of Krk cheese. *Milchwissenschaft* 65 (3), 262-266.
22. Tratnik, Lj. (1998): *Mlijeko-Tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 280-295.
23. SAS (1999): SAS Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
24. Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. (2001): Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 327-345.