

## Promjene dušičnih tvari tijekom zrenja polutvrđog sira proizvedenog na temelju koagregata proteina mlijeka

Snežana Jovanović, Ognjen Maćej, Miroljub Barać, Tanja Vučić

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 637.336.2

### Sažetak

Sirevi proizvedeni na osnovi koagregata proteina mlijeka razlikuju se od sireva proizvedenih na tradicionalan način, kako po tehnološkom procesu proizvodnje, tako i po senzorskim karakteristikama a, prije svega, po teksturi sirnog tijesta i po okusu. U okviru ovih istraživanja pošlo se od pretpostavke, da će primijenjeni način toplinske obrade mlijeka, kao i način obrade grušča, imati odgovarajući utjecaj na karakteristike proteina kao supstrata, koji podliježe hidrolizi tijekom zrenja, zbog prisustva serum proteina koji utječu na smanjenje udjela kazeina u ukupnim proteinima sira. Tijekom zrenja pokusnih sireva, koje je trajalo 4 mjeseca, praćene su promjene dušičnih tvari. Uočene su značajne promjene na proteinima mlijeka, koje su vidljive u povećanju udjela topljivih dušičnih tvari, sadržaja primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina, kao i dušika topljivog u 12 % trikloroocenoj kiselini (TCA) i 5 % fosfovolframskoj kiselini (PTA). Udjel topljivog dušika nakon proizvodnje, 15., 30., 60. i 120-og dana zrenja iznosio je prosječno: 135,48 mg %, 358,72 mg %, 473,52 mg %, 672,32 mg % i 845,13 mg %. S porastom udjela topljivog dušika, povećavao se i koeficijent zrelosti sira, koji je u istom razdoblju zrenja iznosio u prosjeku: 4,42 %, 10,14 %, 12,95 %, 18,21 % i 23,60 %. Udjel dušika primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina tijekom zrenja izrazito je rastao od prvog do 120-og dana zrenja. Na kraju ispitivanog razdoblja zrenja, udjel primarnih produkata razgradnje proteina bio je 4,90 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja, dok je udjel dušika sekundarnih produkata zrenja bio veći za 13,32 puta. Do najintenzivnijeg stvaranja primarnih produkata došlo je u prvih 15 dana zrenja. U usporedbi s literaturnim podacima pokusni sirevi su se malo razlikovali po «dubini» i «širini» zrenja u odnosu na tradicionalno proizvedene sireve tipa Edamskog, pa čak i u odnosu na sireve koje karakterizira duže razdoblje zrenja, kao što je Čedar. Spojevi topljivi u 12 % TCA i 5 % PTA mogu biti značajan pokazatelj dinamike proteolitičkih procesa tijekom zrenja sireva i mogu vrlo slikovito opisati «širinu», a osobito «dubinu» zrenja sireva. Udjel dušika topljivog u 12

*% TCA povećavao se tijekom zrenja. Nakon 120 dana zrenja udjel dušika topljivog u 12 % TCA bio je 19,58 puta veći nego prvog dana zrenja. Dušične tvari topljive u 5 % PTA, kojima su molekularne mase manje od 600, tijekom zrenja stalno su rasle. Udjel dušika topljivog u 5 % PTA u vrijeme zrenja od 1. do 120-og dana imao je prosječne vrijednosti: 12,98 mg %, 33,23 mg %, 53,87 mg %, 92,28 mg % i 148,32 mg %. Na kraju ispitivanog razdoblja zrenja udjel dušika topljivog u 5 % PTA bio je 11,43 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja. Generalno, može se zaključiti da su promjene na proteinima bile vrlo intenzivne tijekom ispitivanog vremena zrenja, a najintenzivnije su bile u prvih 15 dana.*

*Ključne riječi: koagregati proteina, polutvrđi sir, zrenje, proteoliza*

### **Uvod**

Tijekom zrenja sireva najsloženijim biokemijskim promjenama podliježu proteini, pa se razgradnja proteina definira kao zrenje u «užem» smislu riječi. Obim i dinamika razgradnje proteina u tijesnoj su svezi s tehnologijom izrade sira, uvjetima zrenja, aktivnošću primarnih starter kultura, enzima sekundarnih startera i nestarterskih bakterija mliječne kiseline, koje preživljavaju pasterizaciju mlijeka, nestarterskih bakterija mliječne kiseline, kao i dopunskih kultura, koje se koriste kod ubranog zrenja (Fox i Cogan, 2000.; Fox i sur., 1993.; Kindstedt, 1993.; Ross i sur., 2000.; Walstra i sur., 1993.; Wilkinson, 1993.). Proteoliza u siru direktno utječe na formiranje arome i okusa sira, stvaranjem aminokiselina i peptida, od kojih neki mogu izazvati mane okusa, promjenu pH i promjene u teksturi sira, uslijed promjena koje nastaju na proteinskoj matrici (Fox i sur., 1993.).

Primjena oštrijih načina toplinske obrade mlijeka (na temperaturama višim od 85 °C, u dužem vremenskom razdoblju, 10 minuta i duže), namijenjenog za proizvodnju sira u usporedbi s onima koji se primjenjuju pri tradicionalnom načinu proizvodnje, dovodi do formiranja kemijskog kompleksa između kazeina i serum proteina, koji su u literaturi označeni kao koagregati proteina mlijeka. Uslijed toga dolazi do inkorporiranja serum proteina u grušu, a dobiveni sir se razlikuje od tradicionalnih sireva, kako po tehnološkom procesu proizvodnje tako i po senzorskim karakteristikama, a prije svega po teksturi sirnog tijesta i po okusu.

Poznato je da kod sireva proizvedenih na tradicionalan način, osnovu proteinske matrice čini kazein koji znatno brže podliježe promjenama tijekom zrenja za razliku od serum proteina, koji inkorporirani u gruše uzrokuju tzv. «nespecifično» zrenje sira (Maćej i sur., 2007.).

Količina serum proteina u većini je tradicionalnih sireva veoma mala (npr. u Čedru približno 0,3 %), te se smatra da ovi proteini imaju neznatan utjecaj na karakteristike tradicionalnih sireva. Prisustvo serum proteina u većoj količini, može utjecati na teksturu i okus sira. Serum proteini značajno se razlikuju od kazeina, jer denaturiraju pod utjecajem visokih temperatura i znatno su bogatiji aminokiselinama koje sadrže sumpor. Hidroliza serum proteina u siru ovisi o tome jesu li oni u nativnom ili denaturiranom obliku, jer na ova dva oblika proteolitički enzimi prisutni u siru različito reagiraju (Lawrence i Lelièvre, 1990.).

Nativni serum proteini izravno utječu na teksturu sira, s obzirom da su inkorporirani u kazeinsku matricu i da utječu na proizvode biokemijskih procesa tijekom zrenja. Neizravan utjecaj očit je u činjenici da serum proteini fizički ograničavaju pristupačnost kazeina enzimima koji provode zrenje sira te može doći do maskiranja efekata proteolize, tako što imunoglobulini i PP frakcije vežu komponente arome. Također, serum proteini imaju učinak «razblaživanja», jer smanjuju koncentraciju kazeina u siru koji je izvor mnogih komponenti arome većine sireva (Lelièvre, 1995.).

Denaturirani serum proteini su rezistentni na hidrolizu u većini varijeteta sireva. Izravno utječu na karakteristike sira kada su u kompleksu vezani za kazein, jer reduciraju interakciju kazein-kazein u siru, a neki vežu  $\text{Ca}^{2+}$  što također utječe na teksturu sira. Ukoliko su u kompleksu s kazeinom, poprečnim vezivanjem polimernih lanaca mogu ograničiti rastezljivost i topljivost, što je nepoželjno kod sireva parenog tijesta kao što je npr. Mocarela. Denaturirani serum proteini direktno utječu na osobine sira preko biokemijskih procesa zrenja, jer  $\beta$ -lg inhibira plazmin i njegov prekursor plazminogen (Harper i sur., 1989.; Lelièvre, 1995.). Denaturirani  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -lg) inhibira alkalne proteinaze mlijeka (plazmin) preko tiol-disulfidne izmjene između slobodnih i aktivnih -SH skupina  $\beta$ -lg, kao rezultat toplinske obrade, i disulfidne skupine alkalnih proteinaza mlijeka (Grufferty i Fox, 1988.).

Sporija proteoliza proteina tijekom zrenja sira proizvedenog od mlijeka izloženog oštrijim postupkom toplinske obrade posljedica je toplinske inaktivacije i denaturacije plazmina, plazminogena i aktivatora plazminogena.

Ta inaktivacija je vjerojatno rezultat interakcije  $\beta$ -lg i komponenti sustava plazminogen aktivatora u mlijeku. Ipak, to ne isključuje djelovanje toplinske obrade i na druge native proteolitičke enzime u mlijeku (npr. katepsin D) (Benfeldt i sur., 1997.; Grufferty i Fox, 1988.; Lelièvre, 1995.).

### **Materijal i metode rada**

Polutvrđi sir je proizveden modificiranim tehnološkim postupkom u *Laboratoriji za tehnologiju mleka na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu* od standardiziranog mlijeka (3,25 % mliječne masti), obrađenog na temperaturi 87 °C / 10 min., koja omogućava stvaranje koagregata proteina mlijeka.

Za koagulaciju mlijeka korišteno je sirilo *Chymogen S (CHR. Hansen, Denmark)*, kod kojeg je odnos kimočina i pepsina 90:10, deklarirane jačine 540 CHU/g. U proizvodnji sira upotrijebljena je DVS koncentrirana kultura *CH-N-11 (CHR. Hansen, Denmark)*.

Pokusni sirevi su u fazi zrenja zaštićeni plastificiranim premazom s fungicidnim svojstvima *HA-LA PLAST (CHR. Hansen, Denmark)*, a nakon 15 dana zrenja sirevi su vakuumirani. Svaki pokus je izveden u 6 ponavljanja.

Za praćenje promjene dušičnih tvari tijekom zrenja sira primijenjene su sljedeće metode:

- ukupne dušične tvari po metodi Kjeldahl-a pomoću Kjeltex sustava (IDF standard 20B:1993) (IDF, 20B:1993);
- topljive dušične tvari metodom po van Slyke i Hart-u (Pejić i Đorđević, 1963.);
- dušik primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina modificiranom metodom po Đorđević-u (Pejić i Đorđević, 1963.);
- topljive dušične tvari metodom po Kuchroo i Fox-u (Kuchroo i Fox, 1982.);
- dušične tvari topljive u 12 % trikloroetanoj kiselini (TCA) metodom po O'Keefe i sur. (O'Keefe i sur., 1978.);
- dušične tvari topljive u 5 % fosfovolframskoj kiselini (PTA) metodom po Stadhousers-u (Stadhousers, 1960.);
- koeficijent zrelosti sira izražen je omjerom udjela topljivog dušika i ukupnog dušika.

Ispitivani parametri su praćeni tijekom 4 mjeseca zrenja i to po sljedećoj dinamici: nakon proizvodnje, 15., 30., 60. i 120-og dana nakon proizvodnje.

Osnovne karakteristike serija dobivenih podataka za ispitivana obilježja prikazane su preko srednjih vrijednosti ( $\bar{x}$ ), a dan je i interval variranja (min. i max.). Odstupanje pojedinačnih podataka u serijama od aritmetičke sredine, kao i jačinu njihove grupiranosti oko srednje vrijednosti, prikazana je preko mjera varijacija-standardne devijacije (Sd) i koeficijenta varijacije (Cv) (Stanković i sur., 1989.).

### Rezultati i rasprava

#### Dinamika kretanja ukupnog dušika

Kod sireva proizvedenih na tradicionalan način osnovu proteinske matrice čini kazein koji znatno brže podliježe promjenama tijekom zrenja u usporedbi sa serum proteinima (Grufferty i Fox, 1988.; Harper i sur., 1989.; Jovanović i sur., 2005.; Lawrence i Lelièvre, 1990.; Lelièvre, 1995.; Walstra i sur., 1993.). Osim ovoga, primjena visokih temperatura u obradi mlijeka sigurno će utjecati i na smanjenje aktivnosti plazmina u siru, bez obzira na njegovu izraženu toplinsku stabilnost (Fox i sur., 1993.; Harper i sur., 1989.; Rollema i Poll, 1986.).

Tablica 1: Dinamika udjela ukupnog dušika i proteina tijekom zrenja sira

Table 1. Total nitrogen and protein dynamics during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	Ukupni dušik / Total nitrogen(%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	2,9417	3,4125	3,5760	3,5986	3,3908
max.	3,1561	3,7535	3,7376	3,7721	3,6912
$\bar{x}$ (n=6)	3,07	3,55	3,66	3,69	3,59
Sd	0,08	0,12	0,06	0,06	0,11
Cv (%)	2,53	3,35	1,68	1,59	3,17
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	Proteini / Proteins (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	18,77	21,77	22,81	22,96	21,63
max.	20,14	23,95	23,84	24,06	23,55
$\bar{x}$ (n=6)	19,63	22,67	23,34	23,55	22,89
Sd	0,50	0,76	0,39	0,37	0,73
Cv (%)	2,53	3,36	1,68	1,58	3,17

U tablici 1 prikazana je dinamika udjela dušika i proteina (%) tijekom zrenja pokusnog sira.

Prvog dana zrenja udjel ukupnog dušika iznosio je 3,07 %, a udjel proteina 19,63 %. Nakon 15 dana zrenja, udjel dušika se razmjerno povećao povećanjem suhe tvari sira i u prosjeku je iznosio 3,55 %, a proteina 22,67 %. Između 30., 60. i 120-og dana zrenja, udjel dušika se praktično nije mijenjao zbog načina i uvjeta zrenja sira. Poslije 30-og dana zrenja udjel ukupnog dušika u siru iznosio je 3,66 %, 60-og dana 3,69 % i 120-og dana 3,59 %. Udjel proteina je tijekom zrenja od 30., 60. i 120-og dana imao sljedeće vrijednosti: 23,34 %, 23,55 % i 22,89 %.

### Dinamika kretanja topljivog dušika

Tijekom zrenja proteini u siru se transformiraju do produkata nižih molekularnih masa od kojih u velikoj mjeri ovise senzorske i reološke karakteristike sira. Zato se kao mjerilo intenziteta razgradnje proteina uzima količina proteina topljivih u vodi, odnosno udjel topljivih dušičnih tvari u vodi, koje nastaju tijekom zrenja.

Tablica 2: Dinamika udjela topljivog dušika tijekom zrenja sira

Table 2: Water soluble nitrogen dynamics during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	RN / SN (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	77,60	322,10	416,20	527,40	779,80
max.	186,20	459,10	520,30	802,70	895,40
x (n=6)	135,48	358,72	473,52	672,32	845,13
Sd	38,89	51,30	36,88	89,72	45,97
Cv (%)	28,70	14,30	7,79	13,34	5,44
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	RN u VF / SN in M (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	143,80	707,40	925,30	1 167,10	1 750,00
max.	344,20	932,60	1 170,00	1 748,40	2 058,40
x (n=6)	249,93	766,37	1 052,27	1 483,37	1 873,40
Sd	69,41	83,97	90,65	188,71	109,53
Cv (%)	27,77	10,96	8,61	12,72	5,85

RN - topljivi dušik / SN - soluble nitrogen

RN u VF - dušik topljiv u vodenoj fazi / SN in M - soluble nitrogen in moisture

U tablici 2 prikazana je dinamika udjela topljivog dušika i dušika topljivog u vodenoj fazi sira tijekom zrenja.

Iz podataka u tablici 2 se vidi da je prvog dana zrenja udjel topljivog dušika prosječno iznosio 135,48 mg % i kretao se u granicama 77,60 - 186,20 mg %, dok se nakon 15 dana zrenja sadržaj topljivog dušika povećao u prosjeku za 223,24 mg %, odnosno 2,65 puta u odnosu na prvi dan zrenja i u prosjeku je imao vrijednost 358,72 mg%. Nakon 30 dana zrenja uočava se daljnje povećanje udjela topljivog dušika, koji je u prosjeku bio 473,52 mg % i bio je 1,32 puta veći u odnosu na 15-i dan zrenja i 3,50 puta veći u odnosu na sir nakon proizvodnje. Nakon 60 dana zrenja udjel topljivog dušika u prosjeku iznosio 672,32 mg % i bio je veći za 198,80 mg %, odnosno za 1,42 puta veći u odnosu na 30-i dan zrenja i 4,96 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon 120 dana zrenja udjel topljivog dušika u prosjeku se povećao na 845,13 mg % i u odnosu na 60-i dan bio za 172,81 mg % veći, odnosno 1,26 puta veći u odnosu na 60-i dan zrenja i 6,24 puta veći u odnosu na sir nakon proizvodnje.

Kako bi bila što potpunija slika o razgradnji proteina tijekom zrenja, uobičajeno je da se topljive dušične tvari, s obzirom da su topljive u vodi, izražavaju kao topljivi dušik u vodenoj fazi sira. Podatci o topljivom dušiku u vodenoj fazi sira pokazuju također stalnu tendenciju porasta, kao i podatci za topljivi dušik.

Prvog dana zrenja udjel RN u VF sira u prosjeku je bio 249,93 mg %, s granicama variranja 143,80 - 344,20 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel RN u VF sira prosječno se povećao za 516,44 mg % i bio 3,07 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon zrenja od 30 dana udjel RN u VF sira prosječno je iznosio 1 052,27 mg % i bio za 285,90 mg % veći, odnosno 1,37 puta veći u odnosu na sir nakon 15 dana zrenja i za 802,34 mg % ili 4,1 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon 60 dana zrenja udjel RN u VF sira prosječno je iznosio 1 483,37 mg % i bio za 431,10 mg % veći, odnosno 1,41 puta veći u odnosu na 30-i dan. Povećanje u odnosu na 15-i i prvi dan zrenja iznosilo je 1,93 i 5,93 puta. Na kraju zrenja udjel RN u VF sira prosječno je iznosio 1 873,40 mg % i bio za 390,3 mg % veći, odnosno 1,26 puta veći u odnosu na 60-i dan zrenja i 7,50 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja.

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti, da se najveća količina topljivih dušičnih tvari stvara u prvih 15 dana zrenja, a da se u daljnjem tijeku zrenja sadržaj topljivih dušičnih tvari ravnomjerno povećava.

Utjecaj serum proteina na tijek zrenja i karakteristike sireva još uvijek je predmet izučavanja. Sva dosadašnja iskustva ukazuju na to da serum proteini izravno utječu na teksturu sira i biokemijske procese tijekom zrenja (Harper i sur., 1989.; Lelièvre, 1995.). Prema Puđi i Guinee-u (1998.) visoka toplinska obrada mlijeka utječe na stvaranje veće količine niskomolekularnih spojeva u početnoj fazi zrenja kod sireva izrađenih od UF mlijeka, pri čemu se dobiva dojam da je sir zreliji nego što jeste. Prema istim autorima, u kasnijoj fazi zrenja izostaje obimnija akumulacija niskomolekularnih komponenata, osobito slobodnih aminokiselina, što stvara dojam manje zrelosti sira. Walstra i sur. (1993.) navode podatke za količinu RN u ukupnom dušiku, izraženu preko peptida različitih molekularnih masa, koji nastaju djelovanjem sirila, starter kultura, proteinaza mlijeka, kao i količinu peptida koji nastaju ukupnim djelovanjem svih navedenih faktora kod Gaude tijekom zrenja u 6 mjeseci. Udio peptida molekularnih masa većih od 14 000 u UN, povećava se sa 1,8 %, nakon 1 mjeseca zrenja na 5,5 % nakon 6 mjeseci zrenja, dok peptidi molekularne mase 1 400 - 14 000 imaju vrijednost 2,3 %, nakon 3 mjeseca se povećavaju na 3,3 % i poslije 6 mjeseci ponovno imaju vrijednost od 2,3 %. Peptidi molekularnih masa manjih od 1 400 stalno se povećavaju u UN i to 6,1 %, 9,1 % i 10,8 % nakon 1, 3 i 6 mjeseci zrenja. Topljive dušične tvari izražene preko aminokiselina također značajno rastu tijekom zrenja 1 - 3 mjeseca i to 2,0 %, 4,8 % i 7,4 %. Ustanovljeno je da tijekom zrenja sirilo najviše utječe na stvaranje RN i taj se udio povećava sa 6,7 % u 1. mjesecu zrenja na čak 17,3 % nakon 6 mjeseci zrenja. Drugi faktor po važnosti nakon sirila su starter kulture, čiji udio u stvaranju peptida također raste sa 2,5 % nakon 1 mjeseca zrenja, na 7,6 % u vrijeme zrenja od 6 mjeseci. Udio proteinaza mlijeka u stvaranju RN tvari tijekom zrenja se povećava s 2,0 % tijekom 1. mjeseca zrenja na 4,7 % u razdoblju od 6 meseci.

Prema Walstra-i i sur. (1993.) razgradnja serum proteina u sirevima je sporija. Prema Visser-u (1981.) serum proteini, koji su bili identificirani u topljivim dušičnim tvarima pri pH 4,6, kod Čedra nisu bili hidrolizirani čak ni nakon 5 mjeseci zrenja. Banks i sur. (1993.) su ustanovili da je Čedar proizveden od mlijeka toplinski obrađenog na različitim temperaturama kod kojeg su serum proteini bili inkorporirani u sir, imali «nespecifično» zrenje.

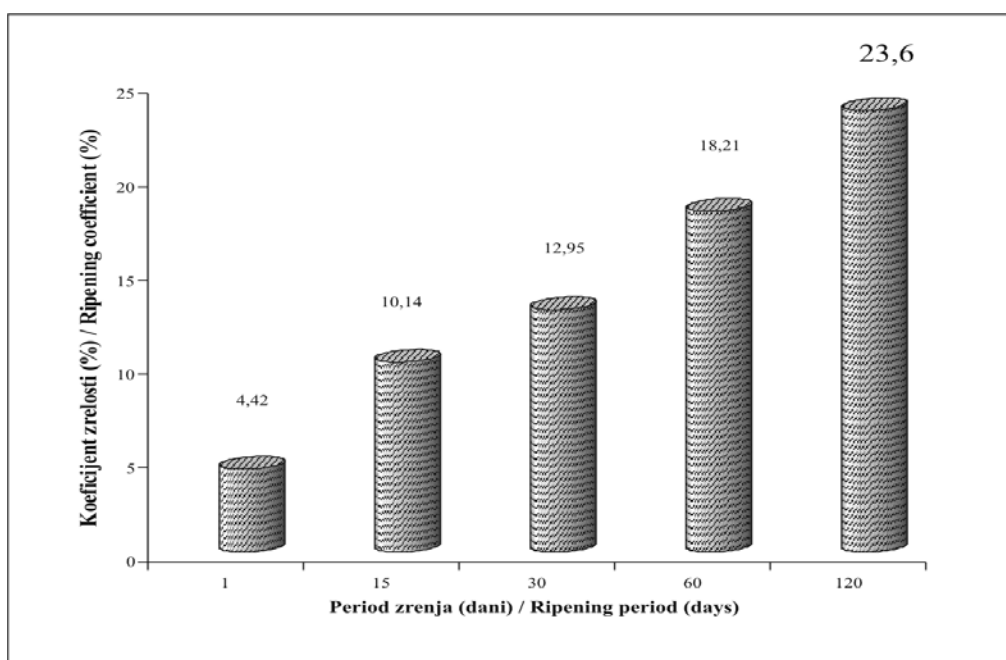
### **Dinamika kretanja koeficijenta zrelosti sira**

Kao pravi pokazatelj zrenja, ili stupnja zrelosti sira najčešće se koristi odnos udjela topljivog dušika i ukupnog dušika, koji se naziva koeficijentom zrelosti sira. Kako se sirevi međusobno razlikuju prema načinu izrade i



uvjetima zrenja, to će se oni međusobno razlikovati i prema obimu proteolize i nekim drugim promjenama, koje se događaju tijekom zrenja. Izražavanjem udjela topljivih dušičnih tvari preko koeficijenta zrelosti (KZ) eliminira se utjecaj promjene udjela vode i suhe tvari u siru na kretanje topljivih dušičnih tvari i dobivaju se mnogo realniji podaci o obimu razgradnje proteina, tako da se mogu uspoređivati s podacima za druge vrste sireva.

Grafikonom 1 prikazana je dinamika kretanja koeficijenta zrelosti pokusnih sireva tijekom zrenja.



Grafikon 1: Dinamika kretanja koeficijenta zrelosti sira tijekom zrenja

Fig. 1: Ripening coefficient dynamics during cheese ripening

Koeficijent zrelosti (KZ) pokusnog sira prvog dana zrenja u prosjeku je iznosio samo 4,42 %, što ukazuje da je KZ nakon proizvodnje bio znatno manji u odnosu na druge sireve koji se proizvode na tradicionalan način (Dozet i sur., 1996.; Mačej, 1989.). Nakon 15 dana zrenja KZ se povećao za 5,72 %, odnosno 2,29 puta i prosječno je iznosio 10,14 %. Nakon 30 dana zrenja zapaža se daljnji rast KZ za 2,81 % u odnosu na 15-i dan i za 8,53 % u

odnosu na prvi dan zrenja. Poslije zrenja od 60 dana KZ je iznosio u prosjeku 18,21 %, a nakon 120 dana 23,60 %. Na kraju zrenja KZ je bio 1,29; 1,82; 2,33 i 5,34 puta veći u odnosu na 60., 30., 15. i prvi dan zrenja.

### **Dinamika kretanja dušika primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina sira**

Razmatranjem dinamike ukupnog i topljivog dušika i koeficijenta zrelosti, može se steći slika o dinamici proteolize za vrijeme zrenja različitih vrsta sireva.

Produkti razgradnje proteina, koji nastaju tijekom zrenja mogu se podijeliti u 2 skupine: primarni i sekundarni produkti razgradnje. Primarni produkti razgradnje proteina obuhvaćaju termokoagulativne proteine, dok sekundarne produkte razgradnje čine spojevi malih molekularnih masa, kao što su aminokiseline, drugi aminospojevi, amidi i amonijak, koji nastaju kao posljedica dubljih promjena na proteinima. Čebotarev i Schavava (cit. Mačej, 1989.) topljive dušične tvari dijele na proteinske i neproteinske. Međutim, imajući u vidu prirodu ovih spojeva, koji su obuhvaćeni prvom i drugom klasifikacijom, može se konstatirati da među njima nema bitnih razlika. Na osnovi literaturnih podataka, nedvosmisleno se može zaključiti da se zrenje tvrdih, polutvrdih i mekih sireva kvalitativno i kvantitativno razlikuje. Tijekom zrenja mekih sireva, kojima je po pravilu kraće vremensko razdoblje zrenja, u većoj mjeri nastaju primarni produkti razgradnje proteina, dok kod tvrdih sireva u topljivim dušičnim tvarima, veći je udio sekundarnih produkata razgradnje, s obzirom na njihovo duže razdoblje zrenja. Kako bi se značaj primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina i razlike između njih bolje istaknule, Bondzinski (cit. Đorđević, 1960.) je uveo pojam «širine» i «dubine» zrenja sireva, što u prvom slučaju podrazumijeva nastajanje primarnih produkata, a u drugom slučaju sekundarnih produkata razgradnje proteina. Prema ovome, tvrdi sirevi se pri punoj zrelosti odlikuju većom «dubinom» i manjom «širinom» zrenja, dok je u sireva s kraćim razdobljem zrenja, kao što su sirevi u salamuri, slučaj obrnut.

Rezultati koji se odnose na dinamiku kretanja dušika primarnih produkata razgradnje proteina sira prikazani su u tablici 3.

Tablica 3: Dinamika udjela dušika primarnih produkata razgradnje tijekom zrenja sira

Table 3: Dynamics of primary products degradation nitrogen during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	NPP / NPP (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	65,30	260,60	317,70	407,40	483,10
max.	161,60	391,40	397,20	598,60	679,40
x (n=6)	113,97	303,33	370,48	505,78	558,47
Sd	35,97	46,11	31,24	62,16	66,75
Cv (%)	31,56	15,20	8,43	12,29	11,95
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	NPP u VF / NPP in M (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	121,00	579,90	706,30	901,50	1 053,00
max.	289,70	795,00	893,20	1 303,80	1 450,80
x (n=6)	208,30	647,82	823,30	1 116,13	1 236,53
Sd	61,62	76,51	75,72	131,59	134,42
Cv (%)	29,58	11,81	9,20	11,79	10,87

NPP - dušik primarnih produkata / NPP - primary products nitrogen

NPP u VF - dušik primarnih produkata u vodenoj fazi / NPP in M - primary products nitrogen in moisture

Iz podataka (tablica 3) se vidi da je nakon prvog dana zrenja udjel NPP prosječno iznosio 113,97 mg % i varirao u granicama 65,30 - 161,60 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel NPP se povećao za 189,36 mg %, odnosno 2,66 puta i prosječno iznosio 303,33 mg %. U daljnjem tijeku zrenja zapaža se daljnje povećanje NPP, ali je sporije u odnosu na prvih 15 dana zrenja, što je sukladno rezultatima koji se odnose na dinamiku topljivih dušičnih tvari sira (tablica 2). Nakon 30 dana zrenja udjel NPP prosječno je iznosio 370,48 mg % i bio je 1,22 puta veći u odnosu na 15-i dan i 3,25 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon 60. i 120-og dana, udjel NPP prosječno je iznosio 505,78 mg % i 558,47 mg %. Na kraju razdoblja zrenja udjel NPP prosječno je bio 4,90, 1,84, 1,51 i 1,10 puta veći u odnosu na 1., 15., 30. i 60-i dan zrenja. Prvog dana zrenja udjel NPP u VF sira prosječno je iznosio 208,30 mg %, s granicama variranja 121,00 - 289,70 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel NPP u VF povećao se 3,11 puta i u prosjeku je bio 647,82 mg %. U daljnjem tijeku zrenja udjel NPP se stalno povećavao i 30-og dana je u prosjeku iznosio

823,30 mg %, 60-og dana 1 116,13 mg %, a 120-og dana 1 236,53 mg %. Iz ovih podataka može se zaključiti, da je nakon zrenja od 4 mjeseca, udjel NPP u VF bio 5,94; 1,91; 1,50 i 1,11 puta veći u odnosu na 1., 15., 30. i 60-i dan zrenja.

Temeljem ovoga može se izvesti zaključak, da je dinamika razgradnje NPP i NPP u VF sira imala isti trend i da su se količine navedenih produkata najintenzivnije stvarale u prvih 15 dana zrenja.

U tablici 4 dati su podatci za dinamiku kretanja NSP razgradnje proteina i NSP u VF sira.

*Tablica 4: Dinamika udjela dušika sekundarnih produkata razgradnje tijekom zrenja sira*

*Table 4: Dynamics of secondary products degradation nitrogen during cheese ripening*

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	NSP / NSP (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	12,30	43,10	78,20	120,00	207,50
max.	24,60	67,70	123,10	204,10	325,70
x (n=6)	21,52	55,38	103,03	166,53	286,68
Sd	4,76	8,70	14,85	32,62	46,19
Cv (%)	22,14	15,70	14,41	19,59	16,11
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	NSP u VF / NSP in M (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	22,80	92,70	173,90	265,50	443,10
max.	46,30	137,50	276,80	444,60	748,70
x (n=6)	39,83	118,53	228,97	367,22	636,82
Sd	9,02	17,15	34,12	69,43	109,45
Cv (%)	22,64	14,47	14,90	18,91	17,19

NSP - dušik sekundarnih produkata / NSP - secondary products nitrogen

NSP u VF - dušik sekundarnih produkata u vodenoj fazi / NSP in M - secondary products nitrogen in moisture

Iz tablice 4 se može uočiti da je prvog dana zrenja udjel dušika sekundarnih produkata (NSP) u prosjeku iznosio 21,52 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel NSP razgradnje se povećao 2,57 puta i prosječno je iznosio 55,38 mg %. U daljnjem tijeku zrenja uočava se stalni porast količine NSP i nakon 30 dana njihov udjel prosječno je iznosio 103,03 mg %. Nakon 60 dana njihov udjel je bio 166,53 mg %, a nakon 120 dana 286,68 mg %. Na kraju zrenja

sadržaj NSP bio je 13,32; 5,18; 2,78 i 1,72 puta veći u odnosu na 1., 15., 30. i 120-i dan zrenja. U tablici 4 prikazani su i podatci za udjel NSP razgradnje proteina u VF sira. Prvog dana zrenja udjel NSP u VF sira prosječno je iznosio 39,83 mg % i varirao u intervalu 22,80 - 46,30 mg %. Nakon 15 dana zrenja sadržaj NSP u VF povećao se za 78,70 mg %, odnosno 2,97 puta u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon zrenja od 30 dana sadržaj NSP u VF povećao se 5,75 puta u odnosu na prvi dan i 1,93 puta u odnosu na 15-i dan. Nakon 60 i 120 dana sadržaj NSP u VF se i dalje povećavao i 60-og dana u prosjeku bio 367,22 mg %, a 120-og dana 636,82 mg %. Na kraju zrenja udjel NSP u VF sira je bio čak 15,99 puta veći nego prvog dana. U odnosu na 15., 30. i 60-i dan, povećanje je iznosilo 5,37; 2,78 i 1,73 puta.

Na osnovi ovih rezultata istraživanja može se zaključiti, da je dinamika razgradnje proteina u pokusnim sirevima izrađenim na temelju koagregata proteina najviše bila izražena između prvog i 15-og dana zrenja. Međutim, treba konstatirati da je nakon 120 dana zrenja sadržaj NPP bio 4,90 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja, a NSP razgradnje bio je veći, čak za 13,32 puta u odnosu na prvi dan zrenja. Na osnovi rezultata također se može zaključiti, da je udjel NPP u VF sira bio 5,94 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja, a NSP u VF sira čak 15,99 puta veći u odnosu na prvi dan zrenja.

Prema tome, ako se na osnovi količine topljivih dušičnih tvari u ukupnom dušiku određuje obim razgradnje proteina u siru, onda se na osnovi količine i međusobnog odnosa NPP i NSP razgradnje proteina, prije svega na osnovi njihova udjela u topljivom i ukupnom dušiku može odrediti karakter zrenja sireva. Da bi se dobila prava slika o «širini» i «dubini» zrenja oglednih sireva izrađenih na osnovi koagregata proteina, sadržaj NPP i NSP razgradnje proteina treba izraziti u odnosu na udjel RN i UN sira, što je prikazano u tablici 5.

Iz podataka u tablici 5 se vidi da je prvog dana zrenja sira udjel NPP u RN prosječno iznosio 83,57 %. U daljnjem tijeku zrenja NPP u RN se smanjivao, osim nakon 15-og dana zrenja i 30., 60. i 120-og dana je bio 78,23 %, 75,38 % i 65,96 %. Iz podataka se također vidi, da se smanjenjem udjela NPP u RN povećavao udjel NSP u RN. Prvog dana zrenja sadržaj NSP u RN iznosio je prosječno 16,43 %, a nakon 30., 60. i 120 dana 21,77 %, 24,62 % i 34,04 %.

Prvog dana zrenja udjel NPP u UN iznosio je prosječno 3,72 %, 15-og dana 8,58 %, 30-og dana 10,13 %, 60-og dana 13,70 % i 120-og dana zrenja 15,64 %. Udjel NSP razgradnje u UN prvog dana zrenja sira prosječno je iznosio 0,70 %, nakon 15 dana 1,56 %, nakon 30 dana 2,82 %, nakon 60 dana 4,51 % i nakon 120 dana 7,97 %.

Tablica 5: Dinamika udjela dušika primarnih i sekundarnih produkata razgradnje proteina u ukupnom i topljivom dušiku tijekom zrenja sira

Table 5: Dynamics of nitrogen of primary and secondary protein decomposition products in total and soluble nitrogen during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	NPP u RN (%) / NPP in SN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	79,31	80,91	76,33	72,18	60,17
max.	87,40	87,37	83,35	79,09	76,60
x (n=6)	83,57	84,48	78,23	75,38	65,96
Sd	3,32	2,09	2,64	2,47	5,70
Cv (%)	3,97	2,48	3,37	3,28	8,64
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	NPP u UN (%) / NPP in TN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
	min.	2,14	6,94	8,50	11,12
max.	5,23	11,47	11,03	16,19	20,04
x (n=6)	3,72	8,58	10,13	13,70	15,64
Sd	1,22	1,55	0,92	1,71	2,40
Cv (%)	32,75	18,10	9,07	12,46	15,36
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	NSP u RN (%) / NSP in SN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	12,60	12,63	16,65	20,91	23,40
max.	20,69	19,09	23,67	27,82	39,83
x (n=6)	16,43	15,52	21,77	24,62	34,04
Sd	3,32	2,09	2,64	2,47	5,70
Cv (%)	20,18	13,47	12,11	10,05	16,74
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	NSP u UN (%) / NSP in TN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
	min.	0,40	1,22	2,12	3,27
max.	0,79	1,98	3,33	5,52	9,21
x (n=6)	0,70	1,56	2,82	4,51	7,97
Sd	0,15	0,26	0,42	0,89	1,15

NPP u RN - dušik primarnih produkata u topljivom dušiku

NPP in SN - primary products nitrogen in soluble nitrogen

NPP u UN - dušik primarnih produkata u ukupnom dušiku

NPP in TN - primary products nitrogen in total nitrogen

NSP u RN - dušik sekundarnih produkata u topljivom dušiku

NSP in SN - secondary products nitrogen in soluble nitrogen

NSP u UN - dušik sekundarnih produkata u ukupnom dušiku

NSP in TN - secondary products nitrogen in total nitrogen

U tablici 6 dati su rezultati drugih autora, a odnose se na «dubinu» i «širinu» zrenja za različite vrste sireva, koji su u najvećem broju slučajeva proizvedeni na tradicionalan način.

Tablica 6: «Širina» i «dubina» zrenja različitih vrsta sireva

Table 6: «Width» and «depth» of ripening in different cheese types

Vrsta sira Cheese type		«Širina» zrenja Ripening «width»		«Dubina» zrenja Ripening «depth»	
		Količina NPP NPP amount (%)		Količina NSP NSP amount (%)	
		u UN in TN	u RN in SN	u UN in TN	u RN in SN
Ementalski Emmental	cit. Mačej (1989.)	13,00	41,90	18,00	58,10
Sovjetski Soviet		15,00	55,50	12,00	44,50
Čedar Cheddar		15,50	62,00	9,50	38,00
Edamski Edam		14,50	69,00	6,50	31,00
Moskovski Moscow		11,00	52,40	10,00	47,60
Kačkavalj Kachkaval		9,90	71,60	6,50	28,40
Rokfor Roquefort		31,00	62,00	19,00	38,00
Limburški Limburg		66,00	88,00	9,00	12,00
Kamamber Camambert		77,00	90,60	8,00	9,40
Pokusni Experimental <sup>1</sup>		13,93	84,87	2,50	15,13
Kontrolni Control <sup>1</sup>	9,73	79,18	2,56	20,82	

NPP - dušik primarnih produkata / NPP - primary products nitrogen

NSP- dušik sekundarnih produkata / NSP - secondary products nitrogen

<sup>1</sup>Mačej (1989.)

- pokusni (sir izrađen na temelju koagregata) / experimental (cheese based on coaggregates)

- kontrolni (sir izrađen na tradicionalan način) / control (traditionally made cheese)

Iz podataka prikazanih u tablici 6 se vidi da je u Edamskom siru udjel NPP u RN iznosio 69,00 % i bio je za 3,04 % veći u odnosu na pokusne sireve u okviru naših istraživanja. Udjel NPP u UN prosječno je iznosio 14,50 % i bio niži samo za 1,14 % u odnosu na pokusni sir. Usporedbom podataka u

tablicama 5 i 6 uočava se, da su se pokusni sirevi malo razlikovali glede «dubine» i «širine» zrenja u odnosu na rezultate za Edamski sir, pa čak i u odnosu na sireve koje karakterizira duže razdoblje zrenja, kao što je Čedar. U pokusnim sirevima, u okviru naših istraživanja, sadržaj NSP u UN i RN na kraju zrenja iznosio je 7,97 % i 34,04 %. U Edamskom siru izrađenom na tradicionalan način (tablica 6), udjel NSP u UN iznosio je 6,50 % i NSP u RN 31,0 %. Prema Đorđević-u (1974.) udjel NPP razgradnje proteina u Kačkavalju se povećava s 2,31 % u siru nakon proizvodnje na 2,97 % u zrelom siru. Povećanje udjela NSP je izraženo tijekom zrenja, pa u svježem siru iznosi 0,53%, a u zrelom siru 0,80 %.

U svakom slučaju može se zaključiti, da se pokusni sirevi praktički nisu mnogo razlikovali od tradicionalnih polutvrdih sireva na osnovi «dubine» i «širine» zrenja, bez obzira na literaturne podatke koji govore da sirevi izrađeni od mlijeka u kojem su stvoreni koagregati proteina imaju sporije zrenje u odnosu na tradicionalne sireve (Grufferty i Fox, 1988.; Lelièvre, 1995.; Visser, 1981.; Walstra i sur., 1993.).

#### **Dinamika dušika topljivog u 12 % trikloroetanoj kiselini (TCA) i 5 % fosfovolframskoj kiselini (PTA)**

«Dubina» i «širina» zrenja može se odrediti praćenjem nastalih produkata razgradnje proteina topljivih u 12 % TCA i 5 % PTA. Tijekom zrenja sireva najznačajnije se promjene događaju na  $\alpha_{s1}$ -kazeinu, pri čemu se u prvom stadiju hidrolize stvaraju spojevi veće molekularne mase, koji su topljivi u vodi ali nisu topljivi u 12 % TCA i 5 % PTA (Fox, 1989.; Kalit i sur., 2005.; McSweeney i Fox, 1993.; McSweeney i Fox, 1997.; Puđa, 1992.; Walstra i sur., 1993.).

Iz literature je poznato, da u 12 % TCA ostaju u otopini dušične tvari malih i srednjih molekularnih masa. Primjer za to je da se proteozo-peptonska frakcija definira kao smjesa peptida različitih molekularnih masa koji se precipitiraju u otopini 12 % TCA. Prema Christensen i sur. (1991.) RN u 12 % TCA sadrže male peptide (2 - 20 rezidua) i aminokiseline. To znači da spojevi topljivi u 12 % TCA i 5 % PTA mogu biti značajan pokazatelj dinamike proteolitičkih procesa tijekom zrenja sireva i mogu vrlo slikovito opisati «dubinu» zrenja sireva (Christensen i sur., 1991.; McSweeney i Fox, 1993.).

U tablici 7 prikazana je dinamika RN u 12% TCA i dinamika N topljivog u 12 % TCA u odnosu na udjel RN i UN u siru tijekom zrenja.



Tablica 7: Dinamika topljivog dušika u 12 % trikloroctenoj kiselini (TCA) tijekom zrenja sira

Table 7: Dynamics of soluble nitrogen in 12 % TCA during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	RN u 12 % TCA / SN in 12 % TCA (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	16,60	106,60	188,60	295,20	508,40
max.	41,50	149,30	237,80	426,40	689,00
x (n=6)	30,43	131,77	211,98	352,60	595,90
Sd	8,57	17,86	18,86	55,61	78,98
Cv (%)	28,17	13,55	8,90	15,77	13,25
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	RN u 12 % TCA u RN / SN in 12 % TCA in SN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	9,73	25,00	39,40	42,90	60,16
max.	42,78	43,74	51,22	77,74	77,69
x (n=6)	25,29	37,37	44,99	53,55	70,35
Sd	12,36	7,13	5,25	13,41	6,74
Cv (%)	48,88	19,09	11,68	25,05	9,58
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	RN u 12 % TCA u UN / SN in 12 % TCA in TN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	0,56	2,96	5,15	7,91	13,97
max.	1,31	4,32	6,65	11,85	20,32
x (n=6)	0,98	3,71	5,80	9,56	16,66
Sd	0,26	0,53	0,59	1,63	2,61
Cv (%)	26,59	14,22	10,17	17,04	15,69

RN u 12 % TCA - topljivi dušik u 12 % TCA / SN in 12 % TCA - soluble nitrogen in 12 % TCA

RN u 12 % TCA u RN - topljivi dušik u 12 % TCA u topljivom dušiku

SN in 12 % TCA in SN - soluble nitrogen in 12% TCA in soluble nitrogen

RN u 12 % TCA u UN - topljivi dušik u 12 % TCA u ukupnom dušiku

SN in 12 % TCA in TN - soluble nitrogen in 12 % TCA in total nitrogen

Prvog dana zrenja udjel RN u 12 % TCA iznosio je 30,43 mg % i varirao u intervalu 16,60 - 41,50 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel RN u 12 % TCA povećao se za 101,34 mg %, odnosno 4,33 puta u odnosu na prvi dan zrenja. Nakon 30., 60. i 120 dana, udjel RN u 12 % TCA permanentno se povećavao i u prosjeku iznosio 211,98 mg %, 352,60 mg % i 595,90 mg %. Temeljem ovih

podataka može se izvesti zaključak, da je nakon zrenja od 4 mjeseca sadržaj RN u 12 % TCA bio 19,58; 4,52; 2,81 i 1,69 puta veći nego 1., 15., 30. i 60-og dana zrenja. Ako se udjel RN u 12 % TCA izrazi u odnosu na udjel RN i UN bit će još jasnija slika o obimu i dubini razgradnje proteina sira tijekom zrenja. Iz podataka se vidi da je prvog dana zrenja udjel RN u 12 % TCA u RN prosječno iznosio 25,29 %. Nakon 15 dana zrenja RN u 12 % TCA u RN povećao se za 12,08 % i u prosjeku je iznosio 37,37 %. U daljnjem tijeku zrenja, razmjerno povećanju udjela RN u 12 % TCA, dolazi do povećanja udjela RN u 12 % TCA u RN. Nakon 30., 60. i 120-og dana zrenja, udjel RN u 12 % TCA u RN prosječno je iznosio 44,99 %, 53,55 % i 70,35 %. Nakon proizvodnje, prosječan udjel RN u 12 % TCA u UN iznosio je 0,98 %, a daljnjim tijekom zrenja izraženo je povećanje i to nakon 15., 30., 60. i 120-og dana iznosi 3,71 %, 5,80 %, 9,56 % i 16,66 %.

Prema Rohm i sur. (1996.), udjel RN tvari u 12 % TCA tijekom zrenja Ementalskog sira povećava se od 1,14 % (15 dan) do 4,40 % (120 dan). Reville i Fox (1978.) navode rezultate za udjel RN u 12% TCA u siru tipa Čedra u različitim stadijima zrenja. Pri tome se uočava, da se količina ovih produkata u razdoblju od 2,5 do 4 mjeseca zrenja ne mijenja i u prosjeku je iznosila 10,31 %, a do intenzivnijeg povećanja njihova udjela dolazi tek nakon 6 mjeseci zrenja i iznosi 23,84 %. U tvrdim sirevima od UF mlijeka i u kontrolnoj varijanti (A) i u varijantama B, C i D, u kojih je mlijeko podvrgnuto oštrijim toplinskim obradama, udjel RN u 12 % TCA se povećavao tijekom 24 tjedna zrenja, a isti trend je pokazivao i udjel RN u 12 % TCA u UN i RN. Udjel RN u 12 % TCA u RN na kraju zrenja u varijantama A, B, C i D je bio sljedeći: 77,06 %, 62,22 %, 65,94 % i 52,38 % (Puđa, 1992.).

Dušične tvari topljive u 5 % PTA su dušične tvari koje se uglavnom sastoje od slobodnih aminokiselina i peptida molekularnih masa manjih od 600 (Fox, 1989.; McSweeney i Fox, 1997.). Dušične tvari topljive u 5 % PTA su produkti duboke proteolize proteina, koji su nosioci arome sireva i u najvećoj mjeri su rezultat proteolitičkog djelovanja mikrobioloških enzima (McSweeney i Fox, 1993.; Pettersson i Sjostrom, 1975.).

U tablici 8 data je dinamika kretanja RN u 5 % PTA, te RN u 5 % PTA u odnosu na udjel RN i UN sira.

Tablica 8: Dinamika topljivog dušika u 5 % fosfovolframskoj kiselini (PTA) tijekom zrenja sira

Table 8: Dynamics of soluble nitrogen in 5 % PTA during cheese ripening

Izračunati pokazatelji Calculated parameters	Ispitivani pokazatelji / Investigated parameters				
	RN u 5 % PTA / SN in 5 % PTA (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	11,70	28,30	42,40	70,60	109,90
max.	16,30	36,00	60,10	108,10	177,50
x (n=6)	12,98	33,23	53,87	92,28	148,32
Sd	2,04	3,83	8,91	17,20	31,07
Cv (%)	15,74	11,53	16,54	18,64	20,95
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	RN u 5 % PTA u RN / SN in 5 % PTA in SN (mg %)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	6,28	7,71	8,95	10,50	13,00
max.	21,00	10,99	14,44	20,50	21,93
x (n=6)	10,76	9,37	11,43	13,99	17,53
Sd	5,42	1,43	2,14	3,70	3,52
Cv (%)	50,39	15,23	18,73	26,45	20,06
Izračunati pokazatelji Calculated parameters	RN u 5 % PTA u UN / SN in 5 % PTA in TN (%)				
	Vrijeme zrenja (dani) / Ripening period (days)				
	1	15	30	60	120
min.	0,37	0,75	1,15	1,89	3,02
max.	0,53	1,04	1,68	2,96	4,81
x (n=6)	0,42	0,94	1,47	2,50	4,1345
Sd	0,06	0,13	0,25	0,48	0,85
Cv (%)	15,61	13,70	16,83	19,35	20,64

RN u 5 % PTA - topljivi dušik u 5 % PTA / SN in 5 % PTA - soluble nitrogen in 5 % PTA

RN u 5 % PTA u RN - topljivi dušik u 5 % PTA u topljivom dušiku

SN in 5 % PTA in SN - soluble nitrogen in 5 % PTA in soluble nitrogen

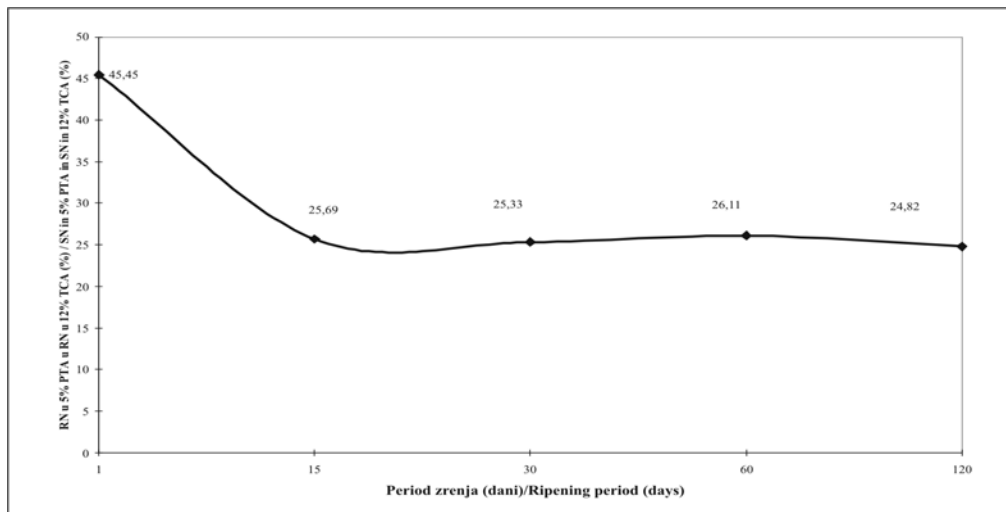
RN u 5 % PTA u UN - topljivi dušik u 5 % PTA u ukupnom dušiku

SN in 5 % PTA in TN - soluble nitrogen in 5 % PTA in total nitrogen

Prvog dana zrenja udjel RN u 5 % PTA prosječno je iznosio 12,98 mg % i kretao se u intervalu 11,70 - 16,30 mg %. Nakon 15 dana zrenja udjel RN u 5 % PTA povećao se za 20,25 mg %, odnosno 2,56 puta u odnosu na prvi dan zrenja. U daljnjem tijeku zrenja udjel RN u 5 % PTA stalno je rastao, tako je 30., 60. i 120-og dana prosječno iznosio 53,87 mg %, 92,28 mg % i 148,32 mg %. Iz tablice se također može uočiti da je udjel RN u 5 % PTA u RN prvog

dana prosječno iznosio 10,76 %, poslije 15 dana zrenja zapaža se malo smanjenje RN u 5 % PTA u odnosu na RN, što se može objasniti time da je u ovom razdoblju zrenja udjel RN u siru nešto brže rastao (2,65 puta) u odnosu na RN u 5 % PTA, čiji je porast tijekom prvih 15 dana bio nešto manji (2,56 puta). Međutim, nakon 30., 60. i 120 dana zrenja uočava se stalni porast RN u 5 % PTA u RN, tako je on u prosjeku iznosio 11,43 %, 13,99 % i 17,53 %. To znači da je u razdoblju od 30 do 120-og dana zrenja udjel RN u 5 % PTA nešto brže rastao nego RN.

Prema Puđi (1992.), u sirevima izrađenim od UF koncentrata mlijeka i u kontrolnim (A) i u uzorcima na koje je bila primijenjena strožija toplinska obrada (B, C, D), tijekom zrenja od 24 tjedna, zapaža se povećanje udjela RN u 5 % PTA u UN i RN. To povećanje je najizraženije u kontrolnim uzorcima i vrijednost RN u 5 % PTA kreće se od 9,21 % nakon proizvodnje do 41,38 %, nakon 24 tjedna zrenja. U pokusnim sirevima povećanje udjela RN u 5 % PTA je znatno manje izraženo u odnosu na kontrolne sireve, i na kraju zrenja varijante B, C i D imaju vrijednosti 24,35 %, 21,94 % i 19,83 %. Dinamiku nastajanja niskomolekularnih spojeva tijekom zrenja moguće je još bolje opisati ako se RN u 5 % PTA izrazi u odnosu na udjel RN u 12 % TCA, što je prikazano grafikonom 2.



Grafikon 2: Dinamika topljivog dušika (RN) u 5 % PTA u topljivom dušiku (RN) u 12 % TCA tijekom zrenja sira

Fig. 2: Dynamics of soluble nitrogen (SN) in 5 % PTA in SN in 12 % TCA during cheese ripening

Udio RN u 5 % PTA u RN u 12 % TCA prvog dana zrenja bio je visok i u prosjeku je iznosio 45,45 %. Ovo se može objasniti činjenicom da je prvog dana zrenja udjel RN u 12 % TCA prosječno iznosio 30,43 mg %, dok je udjel RN u 5 % PTA za ovo razdoblje zrenja bio izuzetno visok i imao je prosječnu vrijednost 12,98 mg %. To je i razlog zbog čega RN u 5 % PTA praktički činio skoro 50 % ukupnog RN u 12 % TCA. U daljnjem tijeku zrenja udjel RN u 5 % PTA u RN u 12 % TCA znatno se smanjio, bez obzira na njegovo stalno povećanje i praktički se nije mijenjao u daljnjem tijeku zrenja. Iz grafikona 1 se vidi da je 15., 30., 60. i 120-og dana udjel RN u 5 % PTA u RN u 12 % TCA prosječno iznosio 25,69 %, 25,33 %, 26,11 % i 24,82 %. Značajno smanjenje udjela RN u 5 % PTA u RN u 12 % TCA, nakon 15 dana zrenja objašnjava se znatno većim porastom RN u 12 % TCA u odnosu na porast udjela RN u 5 % PTA. Između prvog i 15-og dana zrenja, udjel RN u 12 % TCA porastao je čak 4,33 puta, dok je udjel RN u 5 % PTA porastao samo 2,56 puta. U razdoblju između 15. i 120-og dana zrenja praktički je izražen isti trend rasta udjela RN u 12 % TCA i RN u 5 % PTA, što je razlog da se njihov međusobni odnos nije značajno mijenjao u ovom razdoblju zrenja. Na osnovi podataka može se zaključiti, da se u odnosu na prvi dan zrenja udjel RN u 5 % PTA u RN u 12 % TCA praktički smanjio za oko 50 % i između 15 i 120-og dana činio je oko 1/4 ukupnog RN u 12 % TCA.

### ***Zaključci***

Generalno, može se zaključiti da su promjene na proteinima pokusnog sira bile vrlo intenzivne tijekom ispitivanog razdoblja zrenja, a najintenzivnije su bile u prvih 15 dana. Osim toga, pokusni sirevi praktički se nisu značajno razlikovali od tradicionalnih polutvrdih sireva na osnovi «dubine» i «širine» zrenja, bez obzira na literaturne podatke koji govore da sirevi izrađeni od mlijeka u kojem su stvoreni koagregati proteina imaju sporije zrenje u odnosu na tradicionalne sireve.

## ***NITROGEN MATTER CHANGES DURING RIPENING OF SEMIHARD CHEESE BASED ON MILK PROTEIN COAGGREGATES***

### ***Summary***

*Cheeses made on milk protein coaggregate basis are different than traditionally made cheeses, in technological production process and sensory*

characteristics, especially texture and taste. In this research it was assumed that applied milk thermal treatment, as well as curd processing, will have appropriate influence on proteins as substratum. During ripening, due to a presence of whey proteins, which influence decrease of casein content in total cheese proteins, substratum is hydrolyzed. In traditionally made cheeses, casein is the basis of protein matrix. In comparison to whey proteins, casein is substantially faster changed during ripening, while whey proteins incorporated in the curd give so called «unspecific» ripening. Besides, application of high temperatures influences decrease of plasmin activity in cheese, regardless of its significant thermal stability. During 4 months of experimental cheeses ripening, changes of nitrogen matter were investigated. Significant changes of milk proteins, such as increase of soluble nitrogen matter content, the primary and secondary nitrogen products of protein breakdown during cheese ripening, as well as non-protein nitrogen (12 % TCA) and phospho-tungstic-soluble nitrogen (5 % PTA) were observed. The average content of soluble nitrogen after production after 15, 30, 60 and 120 days of ripening were: 135.48 mg %, 358.72 mg %, 473.52 mg %, 672.32 mg % and 845.13 mg %, respectively. According to soluble nitrogen content increase, coefficient of ripening also increased and for the same ripening period was: 4.42 %, 10.14 %, 12.95 %, 18.21 % and 23.60 %, respectively. Content of primary and secondary products of protein breakdown during cheese ripening had significant rising trend from the first day of production to 120<sup>th</sup> day of ripening. At the end of investigated ripening period, content of primary products of protein decomposition was 4.90 times higher compared to the first day of ripening, while content of secondary products of protein decomposition was 13.32 times higher, for the same ripening period. The most intensive primary products formation occurred in the first 15 days of ripening. Compared to the literature, experimental cheeses were similar to traditionally made cheeses in the Edam type, and even to cheeses with longer ripening period such as Cheddar, regarding ripening «depth» and «width». Compounds soluble in 12 % TCA and 5 % PTA can be significant parameters of proteolytic processes dynamics during cheese ripening. Also, they can describe ripening «width», and especially «depth» of ripening. Nitrogen content soluble in 12 % TCA increased during ripening. After 120 days of ripening, nitrogen content soluble in 12 % TCA was 19.58 times higher compared to the first day of ripening. Nitrogen matter soluble in 5 % PTA, with molecule masses less than 600, also had permanent rising trend. Average values of nitrogen content soluble in 5% PTA during ripening period from 1 to

120 days were: 12.98 mg %, 33.23 mg %, 53.87 mg %, 92.28 mg % and 148.32 mg %. At the end of ripening period nitrogen content soluble in 5 % PTA was 11.43 times higher compared to the first day of ripening. Generally, it could be concluded that protein changes were very intensive during investigated ripening period. The most intensive changes occurred during the first 15 days of ripening.

*Key words:* proteins coaggregates, semi-hard cheese, ripening, proteolysis

### **Literatura**

- BANKS, J. M., LAW, A. J. R., LEAVER, J., HORNE, D. S. (1993): The inclusion of whey proteins in cheese. A overview in Cheese yield and factors affecting its control. *Special issue 9402, IDF*. Brussels, 387-401.
- BENFELDT, C., SØRENSEN, J., ELLEGÅRD, K. H., PETERSEN, T. E. (1997): Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 7 (11), 723-731.
- CHRISTENSEN, T. M. I. E., BECH, A. M., WERNER, H. (1991): Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. *Bulletin IDF* 261, 4-9.
- DOZET, N., ADŽIĆ, N., STANIŠIĆ, M., ŽIVIĆ, N. (1996.): Autohtoni mlječni proizvodi. Poljoprivredni institut, Podgorica i Silmir, Beograd.
- ĐORĐEVIĆ, J. (1960.): Promene belančevina tokom zrenja kačkavalja. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- ĐORĐEVIĆ, J. (1974.): Dinamika rastvorljivih azotnih materija u toku izrade kačkavalja. *Mljekarstvo* 24 (3), 54-61.
- FOX, P. F. (1989): The milk protein system in Developments in Dairy Chemistry-4. Functional milk proteins. Chapter 1, 1-53. Ed. Fox, P. F. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London and New York.
- FOX, P. F., COGAN, T. M. (2000): Cheese: scientific highlights of the 20<sup>th</sup> century. 6<sup>th</sup> *Cheese symposium*. Ed. by Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. and Guinee, T.P., Moorepark, 83-121.
- FOX, P. F., LAW, J., MCSWEENEY, P. L. H., WALLACE, J. (1993): Biochemistry of cheese ripening in Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Volume 1. General aspects. Second edition. Chapter 10, 389-438. Ed. by Fox, P.F., Chapman &Hall, London and New York.
- GRUFFERTY, M. B., FOX, P. F. (1988): Milk alkaline proteinase. Review article. *J. Dairy Res.* 55 (4), 609-630.

- HARPER, J., IYER, M., KNIGHTON, D., LELIÈVRE, J. (1989): Effects of whey proteins on the proteolysis of Cheddar cheese slurries (A model for the maturation of cheeses made from ultrafiltered milk). *J. Dairy Sci.* 72 (2), 333-341.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF) (1993): Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content. *IDF Standard 20B*.
- JOVANOVIĆ, S., MAĆEJ, O., BARAĆ, M. (2005.): Karakteristike sireva na bazi koagregata i koprecipitata. *Biotehnologija u stočarstvu* 21 (1-2), 147-173.
- KALIT, S., LUKAČ HAVRANEK, J., KAPŠ, M., PERKO, B., ČUBRIĆ ČURIK, V. (2005.): Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. *Int. Dairy J.* 15, 619-624.
- KINDSTEDT, P. S. (1993): Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition* 33 (22), 167-187.
- KUCHROO, C. N., FOX, P. F. (1982): Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwiissenschaft* 37 (6), 331-335.
- LAWRENCE, R. C., LELIÈVRE, J. (1990): Whey proteins in cheese. Proceedings of the XXIII International Dairy Congress "Dairying in a changing world". Volume 3, Montreal, 1880-1888.
- LELIÈVRE, J. (1995): Whey proteins in cheese-an overview in Chemistry of structure-function relationships in cheese. Ed. by Malin E.L. and Tunick, M.H. Plenum Press, New York and London, 359-365.
- MAĆEJ, O. (1989.): Proučavanje mogućnosti izrade mekih sireva na bazi koagregata belančevina mleka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- MAĆEJ, O., JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M. (2007.): Proteini mleka. Monografija. Univerzitet u Beogradu Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. (1993): Cheese: Methods of chemical analysis in Cheese: chemistry, physics and microbiology. Volume 1, Chapter 9, 341-388. Second edition. Ed. by Fox, P.F., Chapman & Hall, London.
- MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. (1997): Indices of cheddar cheese ripening. *5<sup>th</sup> Cheese symposium*. Ed. by: Cogan, T.M., Fox, P.F. and Ross, R.P. Moorepark, 73-89.
- O'KEEFFE, A. M., FOX, P. F., DALY, C. (1978): Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria. *J. Dairy Res.* 45 (3), 465-477.
- PEJIĆ, O., ĐORĐEVIĆ, J. (1963.): Mlekarski praktikum. Drugo, izmenjeno izdanje. Naučna knjiga, Beograd.
- PETTERSSON, H. E., SJOSTROM, G. (1975): Accelerated cheese ripening: a method for increasing the number of lactic starter bacteria in cheese without detrimental effect to cheese-making process, and its effect on the cheese ripening. *J. Dairy Res.* 42, 313-316.
- PUĐA, P. (1992.): Karakteristike tvrdih sireva izrađenih od mleka koncentrovanog ultrafiltracijom u zavisnosti od termičke obrade mleka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.



PUĐA, P. D., GUINEE, T. P. (1998.): Koagulacija mleka: značaj koncentracije kazeina i termičkog tretmana. *Zbornik radova III Jugoslovenskog simpozijuma prehrambene tehnologije. Sveska IV*, Beograd, 66-70.

REVILLE, W. J., FOX, P. F. (1978): Soluble protein in Cheddar cheese: a comparison of analytical methods. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 2 (1), 67-76.

ROHM, H., JAROS, D., ROCKENBAUER, C., RIEDLER-HELLRIGL, M., UNIACKE-LOWE, T., FOX, P. F. (1996): Comparison of ethanol and TCA fractionation for measurement of proteolysis in Emmental cheese. *Int. Dairy J.* 6 (11-12), 1069-1077.

ROLLEMA, H.S. AND POLL, J.K. (1986): The alkaline milk proteinase system: Kinetics and mechanism of heat-inactivation. *Milchwiissenschaft* 41 (9), 536-540.

ROSS, P. R., STANTON, C., HILL, C., FITZGERALD, G. F., COFFEY, A. (2000): Genetic approaches to cheese improvement: starters and enzymes. 6<sup>th</sup> Cheese symposium. Ed. by Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. and Guinee, T.P., Moorepark, 72-82.

STADHOUSERS, J. (1960): De eithyrolyse tijdens de kassrijping de enzyme die het eiwit in kaas hydrolyscen. *Neth. Milk Dairy J.* 14, 83-110.

STANKOVIĆ, J., RALEVIĆ, N., LJUBANOVIĆ-RALEVIĆ, I. (1989.): Statistika sa primenom u poljoprivredi. Savremena administracija, Beograd.

VISSER, S. (1981): Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 65-88.

WALSTRA, P., NOOMEN, A., GEURTS, T. J. (1993): Dutch-Type varieties in Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Volume 2. Major cheese groups. Second edition. Chapter 2, 39-82. Ed. by Fox, P.F., Chapman &Hall, London and New York.

WILKINSON, M. G. (1993): Acceleration of cheese ripening in Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Volume 1. General aspects. Second edition. Chapter 14, 523-555. Ed. by Fox, P.F., Chapman &Hall, London and New York.

**Adresa autora - Author's address:**

Prof. dr. sc. Snežana Jovanović

Prof. dr. sc. Ognjen Maćej

Prof. dr. sc. Miroljub Barać

Tanja Vučić, dipl. ing.

Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju  
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu  
Nemanjina 6  
Beograd, Srbija

**Prispjelo - Received:** 25.09.2007.

**Prihvaćeno - Accepted:** 17.10.2007.

